



HAL
open science

Le développement des sous-populations des neurones producteurs de l'hormone de mélanocortine reflète un changement de l'organisation précoce du prosencéphale de l'embryon de rongeur

Sophie Croizier

► **To cite this version:**

Sophie Croizier. Le développement des sous-populations des neurones producteurs de l'hormone de mélanocortine reflète un changement de l'organisation précoce du prosencéphale de l'embryon de rongeur. Médecine humaine et pathologie. Université de Franche-Comté, 2011. Français. NNT : 2011BESA3015 . tel-00808444

HAL Id: tel-00808444

<https://theses.hal.science/tel-00808444>

Submitted on 5 Apr 2013

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.

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANÇON
ECOLE DOCTORALE « HOMME, ENVIRONNEMENT, SANTE »

Année 2010-2011

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

*Le développement des sous-populations des neurones
producteurs de l'hormone de mélanocortine
reflète un changement de l'organisation précoce du
prosencephale de l'embryon de rongeur*

THESE

présentée et soutenue
le 22 juin 2011

par

Sophie CROIZIER

Née le 16/09/1984 à Besançon (25)

Membres du jury :

| | | |
|------------|--------------------|---------------------------------|
| S BOURET | Rapporteur | INSERM U837, Lille |
| P CIOFI | Rapporteur | INSERM U862, Bordeaux |
| J-L NAHON | Examineur | CNRS UMR 6097, Sophia-Antipolis |
| C LELOUP | Examineur | CNRS UMR 5548, Dijon |
| D FELLMANN | Examineur | Université de Franche-Comté |
| P-Y RISOLD | Directeur de thèse | Université de Franche-Comté |

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANÇON

ECOLE DOCTORALE « HOMME, ENVIRONNEMENT, SANTE »

Année 2010-2011

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

*Le développement des sous-populations des neurones
producteurs de l'hormone de mélanocortine
reflète un changement de l'organisation précoce du
proscéphale de l'embryon de rongeur*

THESE

présentée et soutenue

le 22 juin 2011

par

Sophie CROIZIER

Née le 16/09/1984 à Besançon (25)

Membres du jury :

S BOURET

Rapporteur

INSERM U816, Lille

P CIOFI

Rapporteur

INSERM U378, Bordeaux

J-L NAHON

Examineur

CNRS UMR 6097, Sophia-Antipolis

C LELOUP

Examineur

CNRS UMR 5548, Dijon

D FELLMANN

Examineur

Université de Franche-Comté

P-Y RISOLD

Directeur de thèse

Université de Franche-Comté

A ma mamie Tounette,

A Thérèse,

Puisse la recherche effacer leurs maux

Remerciements

Avant de soutenir ma thèse, lors de son écriture, j'avais hâte et plus que hâte d'écrire mes remerciements, probablement le désir de tout thésard lors de la rédaction (histoire de se distraire un peu...). Et puis est venu le temps de la soutenance, puis l'après et la vaine tentative de les écrire dans l'avion en revenant de vacances (de chez ma copine Carole !!!) et voilà, nous sommes le 16 août 2011 et j'arrive enfin à les transcrire par écrit.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Pierre-Yves pour tout ce qu'il m'a appris au cours de mon Master 2 et de ma thèse. Tes connaissances m'ont toujours impressionnée, particulièrement celles en neuroanatomie, domaine dans lequel je suis parfois perdue... Je te suis reconnaissante pour le temps que tu as passé à me transmettre un peu de ton savoir.

Je tiens à remercier très sincèrement le Docteur Sébastien Bouret pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger mon travail. Je suis extrêmement reconnaissante de la confiance qu'il m'accorde en m'acceptant dans son équipe et très enthousiaste à l'idée de travailler avec lui.

Je souhaite également remercier le Docteur Philippe Ciofi d'avoir accepté et pris le temps de juger ce travail dont le sujet était parfois éloigné de ses thématiques de recherche.

J'adresse mes plus profonds remerciements au Docteur Jean-Louis Nahon, grand spécialiste de la MCH, d'avoir apporté des critiques constructives à ce travail. Je suis sincèrement honorée de sa présence dans mon jury de thèse.

Je remercie le Professeur Corinne Leloup d'avoir jugé ce travail et d'avoir apporté des critiques d'un point de vue fonctionnel sur mes résultats.

Monsieur le Professeur Fellmann, un grand merci pour avoir été présent et pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. J'espère poursuivre dans ma lancée, tel un b... ☺

Une pensée au Professeur Michèle Jouvenot qui m'a acceptée au sein de son équipe de recherche et pour qui, j'ai le plus grand respect. Je garderai un très bon souvenir de vous et de vos cours auxquels j'avais plaisir à assister.

Je suis très nostalgique à l'idée d'écrire cette partie de mes remerciements, celle qui concerne ma vie au labo et ses acteurs principaux. Tout d'abord, honneur aux dames, un

grand merci à Annie pour tes coupes au cryostat, tu es restée des heures assises devant cet engin pour me fournir la base de mon travail. Ces foutus plis, toujours là où il ne faut pas... nous aurons fait rager mais n'oublions pas que la chaleur est la clé !!! Claude C., toujours là pour répondre à mes questions, m'aider sur des immunos... un grand merci ! Tes p'tits mots vont me manquer. Gaby, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée et le temps que tu m'as fait gagner en réalisant la plupart des HIS. Tu es quelqu'un que j'apprécie beaucoup, je te souhaite le meilleur. Claude J. merci pour tous tes conseils en immuno. Martine, j'ai passé de bons moments à tes côtés, surtout lors de l'organisation du forum des jeunes chercheurs. Merci pour ton aide.

*Aaaahhhh Fafa ! Tu vas énormément me manquer ! Mais Skype existe. Ouf !!! Il est vrai que je n'ai pas eu trop à utiliser de bio mol au cours de cette thèse mais le peu de moments que j'ai passé à travailler avec toi ont été plus qu'agréables. On sera peut être amenés à se recroiser, je l'espère (probablement dans la 4^{ème} dimension). Je t'apprécie pour ce que tu es et pour ton travail, t'es trop fort (sirop sport). Alors, de la part de Mme Croisette, un **merci** plus que sincère, et n'oublie pas !!! Les Bermudes, c'est par là... hop !!!*

Christophe !!! Alias le « professionnel de la profession », tu vas aussi beaucoup me manquer !!! Les discussions le temps de midi, sur tout et n'importe quoi, les rigolades avec Fafa dans le congèl, toi derrière le hublot... que de bons souvenirs. Tes avertissements sur les bulles et autres... sont à jamais gravés dans ma mémoire (merci Mme l'hippocampe) because the bubble is... Je te souhaite d'être heureux.

Et bien sûr tous les autres...Merci Régis pour ta présence et tes conseils, tu es quelqu'un que j'apprécie beaucoup. On se reverra à LA, quand vous viendrez me rendre visite avec Karine et la famille. Je vous y attends avec plaisir !!! Annick, je t'ai toujours apprécié, et ce depuis que je t'ai eu en cours, tu as toujours su être à notre écoute, c'était appréciable. Merci pour tout ce que tu es. Gilles, t'es au top !!! Merci pour tes conseils pour la PCR en temps réel et pour tout le reste. On se refera une chenille... Nadège, c'est dommage qu'on n'ait pas travaillé plus ensemble. Je garderai un excellent souvenir de toi. Pascale, merci pour tous les moments de rire qu'on a vécu ensemble... (Souvenirs des thèses de Steph, Fatima...). Et pour tous les autres, Saïd, Karine, Michaël, Mai, Jean, Nassima, Valérie, Martine G.

Et bien sûr, un gros pincement au cœur en pensant à tous mes compagnons de bureau de la fac de médecine et de la Bouloie (vieux et neuf...enfin avant inondation☺). A Karine, une dinde à part, qui a partagé la plupart de mon temps aux Hauts de Chazal. On a vécu de bons moments ensemble, nos hauts, nos bas, enfin une thèse quoi... Le bureau était bien vide après ton départ. Enfin, tu m'avais laissé toute ta m..., tes restes (disquettes, oui oui j'ai bien écrit disquettes !!!, vieilles coupes colorées au bleu...), ça m'a tenu compagnie !!! Je vais les transmettre à Sandrine... (Elle va être ravie et honorée☺). Sacré dinde, nos courses de fauteuil me manquent déjà. Et de toute façon, ton souvenir est inscrit à jamais dans le mur de la salle café... Ah non c'est de la mayo... Merci pour ces bons moments, je vous souhaite à Guillaume et toi, beaucoup de bonheur.

Les autres étudiants et ATER, Kévin, Fatima, Nicolas, Nicole, Anne merci pour tous les bons moments passés avec vous au labo ou en dehors, on a bien rigolé !!! Nicole merci pour ton aide en anglais et pour ta « crème fouette ». François le français aussi, je t'ai côtoyé seulement pendant moins d'un an mais t'es un gars en or, je t'adore, t'es trop fort. J'espère que ta thèse va bien se passer, je te le souhaite, tu es quelqu'un de bien. Sandrine, pareil, je m'en vais alors que tu arrives, on aura quand même passé de bons moments ensemble, je te souhaite une bonne thèse mais ici ça va aller, j'en suis sûre !!!

Enfin ma dinde, LA DINDE, Steph (ou mon rôti dindonneau comme dirait François), tu vas trop me manquer, enfin heureusement, on se voit en dehors du labo, et on continuera à se voir même si c'est par Skype. Je vous attends de pied ferme à LA... et même à Lille...T'es vraiment un pti bout de femme que j'adore. On en aura vécu des misères, des joies, des n'imp..., du sport, des coups, des repas chez l'une, chez l'autre (avec nos gars très joyeux... « Gérald Py, tu es s... »☺), des Mac Do... (ba pas bon !!!), des heures au confocal (x 10 euros). T'es une amie à qui je tiens énormément. Bisous

On en arrive à nos compagnons du Mac Do, ma Carole adorée, my american turkey, qui est déjà dans des contrées lointaines (Chicago) à qui je pense tout le temps et qui me manque beaucoup, ainsi que Dudu (Adrien Dunand avec un 'D' comme Dunand), évidemment. A la Mag, qui vient d'avoir son petit Louis et qui me manquera beaucoup. A Romain, nos sorties débiles (genre chic et choc) vont me manquer mais toi aussi je te verrai aux US...

Pour finir, merci à tous mes potes de Scye, de Favorney, de Vesoul dont certains ont émigré un peu partout. Petite pensée à la famille Guerret et vive la chasse aux trésors !!! A Juju et Emilie et à la crevette, qui sera, j'en suis sûre un grand chercheur (premier coup de pied oblige...). Un merci à ma famille, ma sœur et Chouchou qui sont toujours présents pour moi, mon papa, Vincent, à Pat et bien sûr ma maman, qui a toujours voulu le meilleur pour moi et qui m'a toujours soutenu. Merci maman. Une pensée à tous ceux qui ne sont malheureusement plus là. Et bien sûr, un grand merci à mon Z'amoureux, Simon qui est vraiment une personne en or. Merci pour ta présence, ton soutien enfin merci d'être toi. S.

« Et le mental pour le moteur... »

TABLE DES MATIERES

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| TABLE DES MATIERES | 15 |
| INDEX DES ILLUSTRATIONS | 17 |
| INDEX DES TABLEAUX | 21 |
| INDEX DES ANNEXES | 21 |
| ABREVIATIONS | 23 |
| INTRODUCTION | 29 |
| I. Présentation générale du système à MCH | 32 |
| II. Données sur le développement de l'hypothalamus | 55 |
| III. Mise en place des tractus de fibres..... | 67 |
| IV. Hypothèses de travail et objectifs spécifiques | 73 |
| MATERIEL ET METHODES | 77 |
| I. Matériel d'étude | 78 |
| II. Traçage des voies nerveuses | 84 |
| III. Techniques immunohistochimiques | 85 |
| IV. Obtention des ribosondes..... | 93 |
| V. Hybridation <i>in situ</i> | 101 |
| VI. Etudes <i>in vitro</i> | 105 |
| VII. Implant de cristal de DiI dans l'hypothalamus postérieur d'embryons de souris | 117 |
| VIII. Observations, acquisition et traitement des images | 117 |
| TAMPONS ET SOLUTIONS | 119 |
| I. TAMPONS | 120 |
| II. FIXATIONS ET PERFUSIONS..... | 120 |
| III. TRACAGE DES VOIES NERVEUSES | 121 |
| IV. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES | 121 |
| V. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> ET BIOLOGIE MOLECULAIRE..... | 122 |
| VI. TECHNIQUES DE CULTURE..... | 124 |
| PARTIE I | 127 |
| RESULTATS | 127 |
| I. Différences morphofonctionnelles du système à MCH entre deux espèces de rongeurs : le rat et la souris | 128 |
| II. Genèse des neurones à MCH et à Hcrt chez la souris | 152 |
| DISCUSSION | 157 |
| I. Distribution comparée des péricaryons MCH chez le rat et la souris | 158 |
| II. Distribution comparée des projections MCH chez la souris et le rat | 160 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| III. Genèse comparée des neurones à MCH | 164 |
| IV. Conclusions de la première partie | 165 |
| PARTIE II | 169 |
| RESULTATS | 169 |
| I. Différenciation du système MCH dans l'hypothalamus postérieur de l'embryon de souris 170 | |
| II. Prolifération cellulaire dans le neuroépithélium germinatif prosencéphalique et mésencéphalique | 177 |
| III. Différenciation des tractus de fibres..... | 200 |
| DISCUSSION | 233 |
| I. La différenciation précoce du phénotype MCH en fait un modèle de choix | 234 |
| II. Différenciation MCH et prolifération cellulaire | 236 |
| III. Différenciation MCH et expression génique dans l'hypothalamus | 241 |
| IV. Développement des projections | 250 |
| V. Schéma de la différenciation des neurones à MCH | 256 |
| VI. Signification de ces données pour le développement du prosencéphale | 261 |
| VII. Perspectives..... | 270 |
| BIBLIOGRAPHIE | 273 |
| ANNEXES | 293 |

INDEX DES ILLUSTRATIONS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1 Comparaison des précurseurs et des séquences peptidiques de MCH1 de saumon et de rat. | 34 |
| Figure 2 Microphotographies illustrant le marquage MCH sur des coupes frontales de cerveaux de lamproie (A, B), de grenouille (C, D) et de lézard (E, F) voisines de coupes colorées au bleu de toluidine..... | 42 |
| Figure 3 Schéma adapté de Baker et Bird (2002) proposant un modèle d'évolution des vertébrés depuis les agnathes. | 45 |
| Figure 4 Localisation et projections des neurones à MCH sur une coupe parasagittale d'un cerveau de rat adulte..... | 53 |
| Figure 5 Schéma illustrant les pics successifs de genèse des sous-populations des neurones à MCH et des neurones à Hcrt, chez le rat. | 54 |
| Figure 6 Schémas résumant l'action de certaines protéines dans la mise en place des précurseurs hypothalamiques à l'origine de l'hypothalamus caractérisé par l'expression de Nkx2.1. | 61 |
| Figure 7 Les neurones hypothalamiques se mettent en place selon une migration radiale ou tangentielle..... | 66 |
| Figure 8 Schéma illustrant les réponses du cône de croissance aux signaux chimiques environnants, comme Nétrine1 ou Slit2 (Lin et Holt 2008). | 69 |
| Figure 9 Photographie d'un gel d'agarose après migration des produits de PCR afin de génotyper les souris $Shh^{+/-}$ et $^{-/-}$ | 79 |
| Figure 10 Graphique et gel témoignant de l'intégrité des ARN totaux extraits grâce à la qualité des ARN ribosomiaux 18S et 28S..... | 94 |
| Figure 11 Détermination de la température de fusion..... | 110 |
| Figure 12 Détermination du Ct. | 111 |
| Figure 13 Détermination de l'efficacité du couple d'amorces pMCH..... | 112 |
| Figure 14 Schéma représentant le mode opératoire pour la culture tridimensionnelle d'explants hypothalamiques, ainsi que le mode de calcul des axones en croissance..... | 116 |
| Figure 15 Distribution des péricaryons MCH dans l'hypothalamus de souris adulte..... | 131 |
| Figure 16 Marquage immunohistochimique sMCH et coloration des noyaux par le DAPI, illustrant la distribution des péricaryons MCH dans le noyau périventriculaire postérieur de l'hypothalamus (PVp)..... | 132 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 17 Photographies illustrant les co-expressions MCH/NEI, CART et NK3 sur des coupes frontales de cerveaux de souris adultes..... | 136 |
| Figure 18 Microphotographies de coupes frontales de cerveaux de souris illustrant les axones corticaux MCH-positifs exprimant ou non CART et illustrant les axones corticaux CART-positifs et MCH-négatifs..... | 140 |
| Figure 19 Origine des projections MCH sur le cortex cérébral de souris | 141 |
| Figure 20 Microphotographies illustrant l'innervation du cortex piriforme de souris et de rat par les axones MCH. | 145 |
| Figure 21 Marquages immunohistochimiques des axones MCH ou NEI et des neurones Parvalbumine dans le globus pallidus de rat et de souris. | 146 |
| Figure 22 Photographies illustrant le marquage immunohistochimique MCH dans le noyau arqué de souris en comparaison du rat..... | 148 |
| Figure 23 Photographies illustrant l'innervation des neurones à proopimélanocortine (POMC) par les axones MCH dans le noyau arqué (ARH) | 150 |
| Figure 24 Schéma illustrant la localisation des péricaryons MCH/BrdU positifs après injection de BrdU à des femelles gestantes entre E10-E12 (rouge) et E12-E15 (orange) sur une coupe frontale d'hypothalamus de rat adulte. | 153 |
| Figure 25 Photographies illustrant les doubles marquages MCH/BrdU et Hcrt/BrdU chez la souris..... | 153 |
| Figure 26 Graphiques résumant la genèse des neurones à MCH et des neurones NK3 chez la souris..... | 154 |
| Figure 27 Graphique illustrant la genèse des neurones à Hcrt dans l'hypothalamus de souris. | 156 |
| Figure 28 Plan de coupe de cerveau adulte ou embryonnaire de rat utilisé dans cette étude (Amiot 2006)..... | 171 |
| Figure 29 Distribution des péricaryons MCH marqués par hybridation <i>in situ</i> chez l'embryon de souris. | 173 |
| Figure 30 Distribution des péricaryons MCH marqués par immunohistochimie chez l'embryon de souris. | 174 |
| Figure 31 Microphotographies de marquages immunohistochimiques illustrant l'ontogenèse de neurones GFP-MCH sur des coupes horizontales de cerveaux d'embryons de souris..... | 176 |
| Figure 32 Microphotographies illustrant le profil de 'migration' des neurones GFP-MCH. . | 177 |
| Figure 33 Analyse séquentielle du marquage BrdU..... | 182 |
| Figure 34 Genèse des neurones à MCH chez le rat..... | 186 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 35 Schéma récapitulatif de la distribution de Nkx2.1, Nkx2/2-Shh, Pax6 et Dlx1/2 dans le cerveau embryonnaire de rat. | 188 |
| Figure 36 Photographies sur des coupes horizontales voisines de cerveaux embryonnaires E9, E11, E14 et E15 illustrant les signaux <i>in situ</i> pour Shh, pMCH et immunohistochimiques pour Nkx2.2 et Nkx2.1 | 190 |
| Figure 37 Photographies illustrant le double marquage MCH (HIS) et Nkx2.1 (immunohistochimie) sur des coupes horizontales de cerveaux embryonnaires E14 de rat .. | 192 |
| Figure 38 Photographies illustrant deux embryons E18 de souris Shh ^{-/-} (A) et Shh ^{+/+} (B).... | 193 |
| Figure 39 Taux d'expression de l'ARNm pMCH dans différents modèles de souris et après différentes conditions expérimentales de culture..... | 195 |
| Figure 40 Photographies illustrant le signal HIS de Lhx9 et de MCH sur des coupes horizontales de cerveaux embryonnaires (E14) de rat | 197 |
| Figure 41 Schéma illustrant la distribution des facteurs de transcription de la famille des LIM dans l'hypothalamus embryonnaire de rat par comparaison à l'expression MCH (en rouge). | 199 |
| Figure 42 Schéma et photographies illustrant les tractus de fibres pionniers du cerveau embryonnaire de souris..... | 203 |
| Figure 43 Microphotographies illustrant les projections GFP-MCH sur coupes sagittales de cerveau embryonnaire E12 en direction des régions postérieures du système nerveux central. | 205 |
| Figure 44 Microphotographies illustrant la différenciation des projections des neurones à MCH | 206 |
| Figure 45 Cartographies et photographies montrant l'influence du mésencéphale ventral ou du télencéphale basal sur la croissance des axones MCH..... | 210 |
| Figure 46 Histogrammes illustrant le nombre d'axones MCH compté par explant embryonnaire après culture..... | 212 |
| Figure 47 Microphotographies illustrant le signal <i>in situ</i> de Nétrine1 et Slit2 à différents stades embryonnaires..... | 216 |
| Figure 48 Microphotographies illustrant les marquages DCC et Robo2 obtenus par hybridation <i>in situ</i> et immunohistochimie sur des coupes de cerveau de rat..... | 220 |
| Figure 49 Cultures tridimensionnelles d'explants issus d'hypothalamus postérieur de souris E16 mettant en évidence l'attraction de Nétrine1 sur les axones des neurones hypothalamiques révélés par β 3-tubuline. | 224 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 50 Photographies et données graphiques illustrant l'influence de Nétrine1 sur la croissance des axones des neurones à MCH..... | 228 |
| Figure 51 Photographies et données graphiques illustrant l'influence de Slit2 sur la croissance des axones des neurones à MCH..... | 230 |
| Figure 52 Schéma représentant les zones de différenciation du diencephale de l'embryon E14 de Hamster (Keyser 1979) | 238 |
| Figure 53 Schéma récapitulatif de la distribution de facteurs de transcription dans l'hypothalamus de souris E12 (selon nos critères de datation) et microphotographies sur coupes sagittales illustrant leur distribution par hybridation <i>in situ</i> (Shimogori et al. 2010).243 | 243 |
| Figure 54 Représentation schématique du plan d'organisation du cerveau de Hamster suivant la date de genèse des différentes structures (Keyser 1979) | 245 |
| Figure 55 Schéma illustrant la différenciation du système MCH précocement au cours du développement embryonnaire | 258 |
| Figure 56 Schéma récapitulatif de la distribution spatio-temporelle de Nétrine1 dans le cerveau embryonnaire de souris..... | 259 |
| Figure 57 Schéma illustrant que le développement des neurones à MCH met en évidence un changement dans l'organisation précoce du prosencéphale de rongeur..... | 266 |
| Figure 58 Schéma proposant un modèle d'évolution du système MCH des vertébrés depuis les agnathes jusqu'aux mammifères | 269 |

INDEX DES TABLEAUX

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 1 Tableau des anticorps primaires utilisés dans cette étude. | 89 |
| Tableau 2 Expression du peptide CART dans les neurones à MCH de souris. | 135 |
| Tableau 3 Neurones MCH projetant sur le cortex cérébral de souris adulte. | 142 |
| Tableau 4 Nombre de neurones à MCH et proportion de neurones MCH/BrdU positifs comparés au nombre de neurones MCH après injection de BrdU à E11 ou E12,5 et sacrifice à E14. | 184 |

INDEX DES ANNEXES

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Annexe 1 Territoires de genèse des neurones à MCH | 296 |
| Annexe 2 Photographies illustrant le trajet des fibres dopaminergiques sur des coupes parasagittales de cerveau embryonnaire de rat | 298 |
| Annexe 3 : Publication | 301 |

ABBREVIATIONS

| | |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire | DAKO TRS : DAKO target retrieval solution |
| AEP : aire antopédonculaire antérieure | DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole |
| AgRP : agouti-related protein | DCC : delated in colorectal cancer |
| AHN : Noyau antérieur de l'hypothalamus | DiI : [1,1' - Dioctadecyl - 3,3,3',3' - tetramethylindocarbocyanine iodide] |
| ANT : Aire hypothalamique antérieure | DIG : digoxygénine |
| ARH : noyau arqué | DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| ARN : acide ribonucléique | DMH : noyau dorsomédian de l'hypothalamus |
| ARNm : acide ribonucléique messenger | dNTP : désoxyribonucléique triphosphate |
| BET : bromure d'éthidium | DOR : thalamus dorsal |
| BME : Basal Medium Eagle | DR : récepteur à la dopamine |
| BMP : Bone Morphogenic Protein | FITC : fluorescein isothiocyanate |
| BrdU : 5'-bromo-2'-deoxyuridine | fx : fornix |
| BSA : serum albumin bovine | GABA : acide γ -aminobutyrique |
| BST : noyau du lit de la strie terminale | Gad : Glutamate decarboxylase or glutamic acid decarboxylase |
| CAM : cell adhesion molecule | GFP : green fluorescent protein |
| CART : cocaine and amphetamine regulated transcript | GnRH : gonadotropin releasing hormone |
| cc : cell cord | GPI : globus pallidus latéral |
| ChAT : Choline acétyltransférase | GPM : globus pallidus médian |
| CP : caudoputamen | GRF37 : fragment 37 du "growth hormone-releasing factor" humain |
| cpd : pédoncule cérébral | GRH : growth hormone releasing hormone |
| CRH : corticotropin releasing hormone | Hcrt : hypocréline |
| Ct : Threshold cycle | HIS : hybridation <i>in situ</i> |
| Ctrl : contrôle | 5-HT : 5-hydroxytryptamine |
| CTX : cortex | HYP : hypothalamus |
| Cy : cyanine | |
| Cyclo : cycloamine | |
| DA : dopamine | |
| DAB : diaminobenzidine | |

| | |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| ic : capsule interne | NK3 : neurokinine 3 |
| icv: intra-cérébro-ventriculaire | NLT: noyau latéral tubéral |
| ID : diagonal intrahypothalamica | NPY : neuropeptide Y |
| IgG : immunoglobuline G | ns : non significatif |
| IP : intrapéritonéale | och : chiasma optique |
| IPTG : isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside | ORB : aire orbitale du cortex |
| IS : immunsérum | os : tige optique |
| LHA : aire hypothalamique latérale | ot : tractus optique |
| Lot : tractus olfactif latéral | p/d : proximal/distal |
| MAM : région mammillaire de l'hypothalamus | PAP : peroxydase anti-peroxydase |
| MCH : hormone de mélanine concentration | Parv : parvalbumine |
| MCH-R1 : récepteur 1 de la MCH ou SLC-1 | PBS : tampon phosphate salin |
| MCH-R2 : récepteur 2 de la MCH | PBT : tampon phosphate salin tween |
| ME : éminence médiane | PCR : "polymerization chain reaction" |
| Mes : mésencéphale | PFA : paraformaldéhyde |
| mfb : faisceau médian du télencéphale | Pfx : périfornical |
| MGE : éminence ganglionique médiane | PH : noyau postérieur de l'hypothalamus |
| MGOP : « MCH gene overprinted polypeptide » | PIR : cortex piriforme |
| MPO : noyau préoptique médian | PIRd : cortex piriforme dorsal |
| mlf : faisceau longitudinal médian | PLR : éminence du pallidum |
| mtt : faisceau mamillothalamique | pMCH : préproMCH |
| NEI : neuropeptide acide glutamique-isoleucine | POa : aire préoptique |
| NGE : neuropeptide glycine-acide glutamique | poc : commissure postoptique |
| nh : neuroépithélium germinatif | POMC : proopiomélanocortine |
| | PPC : plaque préchordale |
| | PRO : hypothalamus préoptique |
| | PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus |
| | PVp : noyau périventriculaire postérieur |
| | RCH : aire rétrochiasmatisique |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| rMCH : MCH de rat | SS : somatostatine |
| α MSH : “ α -melanocyte-stimulating hormone” ou α -mélanotropine | STN : noyau sous thalamique |
| RIN : RNA integrity number | STR : striatum |
| RNase : ribonucléase | SVF : sérum de veau fœtal |
| RT : noyau réticulé du thalamus | TB : True Blue |
| SDS: sodium dodecyl sulfate | Tel : télencéphale |
| Shh : sonic hedgehog | TGF β : transforming growth factor β |
| SLC-1 : somatostatine-like receptor 1 | TH : tyrosine hydroxylase |
| sm : strie médullaire | <i>tpoc</i> : <i>tractus postopticus</i> |
| sMCH : MCH saumon | TUB : hypothalamus tubéral |
| SN/VTA : substance noire/ aire tegmentale ventrale | TRH : thyrotropin releasing hormone |
| SNC : système nerveux central | V3 : troisième ventricule |
| SON : noyau supraoptique de l’hypothalamus | VL : ventricule latéral |
| Sopt : sulcus opticus | VMH : noyau ventromédian |
| Sot : tractus supraoptique | VNT : thalamus ventral |
| SP : moelle épinière | WT : wild type |
| SSC : tampon chlorure de sodium/citrate de sodium | X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside |
| | ZI : <i>zona incerta</i> |
| | <i>zli</i> : <i>zona limitans intrathalamica</i> |

INTRODUCTION

Les termes ‘hypothalamus’ et ‘régions hypothalamiques’ ont pour la première fois été utilisés par His en 1893. L’hypothalamus n’a cessé depuis de susciter un vif intérêt de la part de la communauté scientifique. Depuis le début du XX^{ème} siècle, un nombre conséquent de travaux mettent en évidence un lien entre l’hypothalamus, le système limbique et la formation réticulée. Ces interactions jouent un rôle important dans le contrôle de l’initiation de certains comportements fondamentaux dits motivés comme la prise alimentaire, le cycle veille/sommeil ou la reproduction mais aussi dans celui de nombreuses fonctions végétatives telles que par exemple l’adaptation de la pression artérielle, de la respiration ou encore le maintien de la température corporelle. L’hypothalamus est donc un centre indispensable à la survie de l’individu mais aussi à la perpétuation de l’espèce. Il est situé à la base du cerveau, ventralement au thalamus et est limité rostralement par la lame terminale, caudalement par le tegmentum mésencéphalique et latéralement par le pédoncule cérébral. Chez le rat, l’hypothalamus est classiquement divisé en trois régions longitudinales distinctes (périvericulaire, médiane et latérale, Crosby et Woodburne 1940) et en quatre régions rostro-caudales (préoptique, antérieure, tubérale et mammillaire, Legros Clark 1938). En 1987, Swanson divise ainsi l’hypothalamus en douze compartiments mais suggère que chacune des zones longitudinales présente des caractéristiques cytoarchitecturales et fonctionnelles différentes (Swanson 1987). La zone périvericulaire contient des noyaux bien différenciés et notamment, les neurones neuroendocriniens. La région médiane comprend de grands noyaux bien différenciés, influencés par le système limbique du télencéphale. Collectivement, ces noyaux jouent un rôle dans l’initiation de comportements motivés comme la reproduction (copulation), les comportements de défense (agressivité) et d’appétit. La région latérale a été impliquée dans le traitement d’informations sensorielles et dans l’expression de certains comportements motivés tels que la faim, la soif ou la reproduction mais peu de structures différenciées peuvent y être distinguées. En effet, les régions latérales

de l'hypothalamus (LHA) sont traversées par les fibres du faisceau médian du télencéphale (mfb) qui est le système de fibres le plus complexe du cerveau des mammifères puisqu'y transitent les axones de plus de cinquante groupes de cellules différents. Il contient des fibres descendantes ou ascendantes provenant des régions préfrontales du cortex cérébral, de l'hypothalamus et des parties ventrales de la formation réticulée du tronc cérébral. Le LHA est perçu comme une extension rostrale de la formation réticulée. Lors de ces dernières années, L.W. Swanson a proposé un nouveau schéma de division de cette région basé sur l'expression de deux populations peptidergiques majeures, les neurones exprimant l'hormone de mélano-concentration (MCH) et ceux exprimant l'hypocrétine (Hcrt) (Swanson et al. 2005; Hahn 2010; Hahn et Swanson 2010).

Depuis plusieurs années, notre équipe travaille sur les neurones producteurs de MCH et s'est attachée à comprendre l'organisation morphofonctionnelle de cette population chez le rongeur. Plus spécifiquement, s'appuyant sur les progrès récents dans le domaine de la biologie du développement, nous nous sommes consacrés à caractériser certains processus précoces qui éclairent sous un angle nouveau l'organisation de cette population chez l'animal adulte, notamment dans l'émergence d'afférences ascendantes et descendantes spécifiques à des sous-populations de ces neurones.

I. Présentation générale du système à MCH

Dès 1955, les travaux d'Enami, montrent qu'une injection d'extraits hypophysaires de poisson chat à ces mêmes poissons entraîne une accumulation de pigments dans les mélanophores de la peau, laissant penser que ces structures renferment une hormone de mélano-concentration (Enami 1955). Trois années plus tard, Imai confirme ces résultats (Imai 1958). Il faut attendre les travaux de Baker et Rance (1983) pour montrer que la plupart de la bioactivité MCH provient d'extraits hypothalamiques. La même année, l'hormone de mélano-concentration est purifiée à partir d'hypophyse de saumon : sMCH est un peptide de 17 acides aminés, possédant un pont disulfure entre deux cystéines (5 et 14) qui lui confère une conformation cyclique (Kawauchi et al. 1983). Chez les poissons, cette conformation cyclique est importante pour l'activité biologique (Baker et al. 1985). En 1985, un immunosérum (IS) contre la sMCH synthétique permet de mettre en évidence que la MCH est synthétisée dans des neurones hypothalamiques de rat et que ce peptide est transporté dans les prolongements axoniques jusqu'à la neurohypophyse où il est concentré dans les terminaisons nerveuses à proximité des vaisseaux sanguins (Naito et al. 1985). Le système alors mis en évidence, est très similaire à celui décrit pour l' α MSH (l' α -mélanotropine ou α -melanocyte stimulating hormone) par Watson et Akil (1979). Grâce à des études immunohistochimiques à l'aide d'un IS dirigé contre l' α MSH, dérivée de la proopiomelanocortine ou POMC, ces auteurs ont, pour la première fois, mis en évidence une population de neurones localisée dans l'hypothalamus dorso-latéral du rat, alors que les premières études immunohistochimiques du système à POMC révélaient un marquage exclusif dans le noyau arqué (ARH). En 1986, Naito et al. montrent la co-expression d' α MSH (α_2) et de sMCH dans les mêmes neurones. De plus, il n'existe pas d'expression de sMCH dans l'ARH alors qu'une expression d' α MSH y persiste (Naito et al. 1986). Les premières descriptions du système MCH chez les mammifères ont

alors été réalisées par immunohistochimie avec un IS anti-sMCH sur des coupes de cerveaux de rat puis à l'aide d'un IS anti-rMCH (dirigé contre le peptide de rat) (Skofitsch et al. 1985; Zamir et al. 1986; Bittencourt et al. 1992). Entre temps, notre équipe a montré sur des coupes de cerveaux de rat que les IS anti-rMCH, -neuropeptide acide glutamique-isoleucine (NEI), -neuropeptide glycine-acide glutamique (NGE) marquaient une population unique de neurones de l'hypothalamus dorso-latéral dont la distribution était identique à celle observée pour les marquages growth hormone-releasing factor 37 (GRF37), α MSH, sMCH et que ces neurones étaient tous les mêmes (Fellmann et al. 1987; Risold et al. 1989 ; Nahon et al. 1989).

1. Structure du précurseur du peptide MCH : préproMCH

En (1989), Vaughan et al. ont isolé la MCH de rat qui est un peptide cyclique de 19 acides aminés différents de deux acides aminés supplémentaires en N-Ter par rapport au peptide de saumon et de quatre substitutions dont une entre les cystéines formant un pont disulfure (**Figure 1**). Par la suite, l'ADNc rMCH, puis ceux de souris et d'Homme ont été clonés (Nahon et al. 1989; Presse et al. 1990 ; Breton et al. 1993a; Breton et al. 1993b). Ces travaux ont révélé que la séquence peptidique de la MCH est identique chez toutes les espèces de mammifères étudiées mais aussi que ce peptide dérive d'un précurseur appelé préproMCH (pMCH) et que d'autres peptides sont issus du clivage de ce même précurseur. Chez les mammifères, le gène de la MCH est caractérisé par trois exons et deux introns. Il existe un processus d'épissage alternatif qui conduit à l'ARN messenger (ARNm) pMCH, qui comporte les trois exons ou à l'ARNm préproMGOP (MCH gene overprinted peptide), qui est dépourvu de l'exon II. Les ARNm sont alors traduits en protéines, soit la pMCH, soit le préproMGOP. La pMCH subit ensuite des modifications post-traductionnelles qui consistent en plusieurs clivages libérant trois peptides : MCH, NEI et NGE.

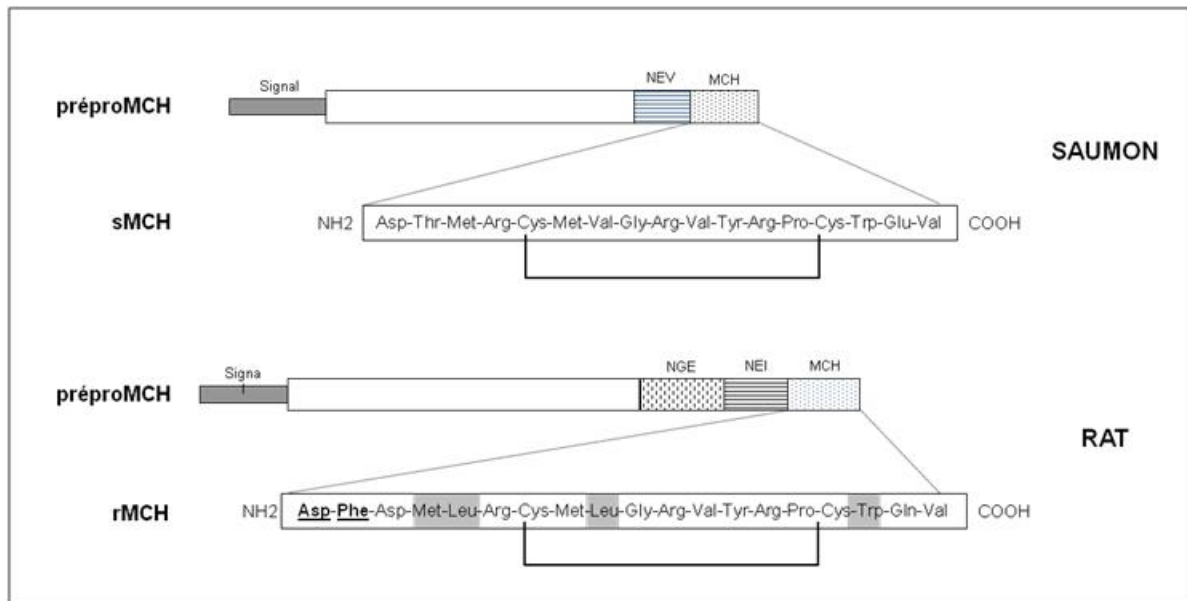


Figure 1 Comparaison des précurseurs et des séquences peptidiques de MCH1 de saumon et de rat.

Dans la séquence peptidique de MCH de rat, les deux acides aminés supplémentaires en N-terminal sont représentés en gras et soulignés alors que les quatre acides aminés substitués sont représentés sur fond gris.

Il existe des différences structurelles entre les gènes MCH de poissons et de mammifères. Le gène MCH de saumon ne possède pas d'introns alors que celui de mammifères en possède deux. Chez les poissons, la fonction de MCH sur les téguments nécessite une traduction rapide de ce peptide, la présence d'introns et donc d'un épissage alternatif retarderait ce processus, rendant vulnérables les poissons (Nahon 1994). En 2009, une étude a rapporté qu'il existe, deux gènes MCH chez les poissons zèbres fournissant les peptides MCH1 et MCH2. Le premier fournit un peptide identique au peptide MCH de saumon et le second, possède une forte homologie de séquence avec la MCH de mammifères. Ces deux gènes sont exprimés dans des neurones hypothalamiques distincts mais dans des territoires similaires. Les neurones exprimant MCH2 envoient des axones sur des régions riches en récepteur MCH-R1, impliquées dans la satiété, la mémoire ou l'éveil. De plus, la quantité de MCH2 augmente

quand les poissons sont à jeun suggérant une régulation positive de ce peptide en réponse à des signaux physiologiques. Par ailleurs, le taux d'expression du messenger pMCH1 varie avec les changements de pigmentation de la peau : plus précisément, le taux d'expression de pMCH1 augmente quand les mélanosomes des poissons sont agrégés.

2. Les récepteurs du peptide MCH

A ce jour, deux récepteurs du peptide MCH ont été identifiés. Le premier récepteur, appelé SLC-1 (somatostatine-like receptor 1) du fait de son homologie avec le récepteur à la somatostatine, a été identifié chez plusieurs espèces comme l'homme (Kolakowski et al. 1996; Saito et al. 2000), le rat (Lakaye et al. 1998) et la souris (Kokkotou et al. 2001). Les trois séquences nucléotidiques montrent une grande homologie (98% entre le rat et la souris et 91% entre le rat et l'homme). SLC-1 ou MCH-R1 est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G. MCH-R1 lie spécifiquement la MCH de mammifères (Hawes et al. 2000). Des études immunohistochimiques, d'hybridation *in situ* et de RT-PCR ont montré que ce récepteur est exprimé dans divers territoires du système nerveux central (SNC) de rat adulte comme par exemple l'hippocampe, le noyau accumbens ou encore certaines aires hypothalamiques pouvant être en lien avec la prise alimentaire (hypothalamus latéral, noyau arqué et dorsomédian) (Hervieu et al. 2000; Saito et al. 2001). Cette distribution est compatible avec la distribution des fibres MCH (Bittencourt et al. 1992). Un second récepteur, appelé MCH-R2, a été identifié chez l'Homme. Il montre seulement 38% d'homologie au niveau aminique avec MCH-R1 (Hill et al. 2001). D'autres espèces, comme le chien ou le furet expriment également ce second récepteur (pour revue, Eberle et al. 2004). MCH-R2 apparaît plus abondant dans des sites périphériques comme les lymphocytes ou les adipocytes.

3. Fonctions attribuées aux neurones à MCH

Chez les poissons, la fonction neuroendocrinienne du peptide MCH est bien caractérisée. Il joue un rôle sur la pigmentation de la peau (voir le paragraphe 4.3 Les poissons p44). Chez les mammifères, la MCH est considérée comme un neurotransmetteur et/ou neuromodulateur auquel de multiples fonctions ont été attribuées. Elle est associée à des comportements instinctifs tels que la prise alimentaire ou la reproduction mais aussi à l'intégration de processus complexes liés à la cognition ou au cycle veille/sommeil ou à l'activité générale du SNC (Swanson 1987). Beaucoup reste à comprendre dans les mécanismes en jeu et de nombreuses études contradictoires ont été publiées (pour revue, Griffond et Risold 2009). Il ressort généralement que la MCH est un peptide orexigène. L'administration de MCH entraîne, dans la majorité des cas, une augmentation de la prise alimentaire et une obésité (Griffond et Risold 2009). Pour exemple, le niveau d'expression du messager pMCH augmente chez les souris ob/ob obèses et déficientes pour la leptine, ces souris sont hyperphagiques (Qu et al. 1996). L'étude des modèles de rats obèses fa/fa conduit aux mêmes constats (Rovere et al. 1996). A l'inverse, des souris déficientes pour MCH sont hypophagiques et maigres (Shimada et al. 1998). En revanche, des souris déficientes pour la leptine mais aussi pour MCH sont hyperphagiques mais restent maigres, leur activité de locomotion étant augmentée (Segal-Lieberman et al. 2003). L'étude de la prise alimentaire sur des modèles de souris déficientes pour le récepteur MCH-R1 complète ces travaux. Ces souris sont hyperphagiques mais ne sont pas obèses et grossissent moins vite que des souris sauvages, ceci étant dû à leur hyperactivité (Marsh et al. 2002). L'expression de MCH-R1 est augmentée chez des souris ob/ob, suggérant le rôle de la leptine plutôt que de MCH dans sa régulation (Kokkotou et al. 2001). Plus rarement, l'administration de MCH conduit à la diminution de la prise alimentaire ou n'a pas d'effet (pour revue, Griffond et Risold, 2009).

Des expériences de lésions du noyau ventromédian de l'hypothalamus, considéré comme le centre de la satiété, provoquent une stimulation de la synthèse et du transport de la MCH, n'entraînent pas d'augmentation de la prise alimentaire et les animaux lésés présentent une insulïnémie et une glycémie normales (Deray et al. 1994; Griffond et al. 1995).

Le récepteur MCH-R1 est fortement exprimé dans la capsule du noyau accumbens par les neurones à enképhaline et à dynorphine (Saito et al. 2001; Georgescu et al. 2005). Cette structure est importante dans la régulation de l'appétit et est bien connue pour son rôle dans les phénomènes d'addiction aux drogues (Ikemoto 2007). Divers travaux plaident en faveur de l'existence d'un lien fonctionnel entre ce noyau et le système à MCH. L'administration de MCH, cette fois-ci, dans la capsule du noyau accumbens stimule les comportements liés à la prise alimentaire alors que l'injection d'un antagoniste de MCH-R1 dans ce même noyau diminue la prise alimentaire (Georgescu et al. 2005; Nestler et Carlezon 2006; Guesdon et al. 2009). Les mécanismes d'action de MCH via son récepteur MCH-R1 font l'objet de nombreuses recherches (Hervieu 2003; Saito et al. 2003; Saito et al. 2004; Cook et al. 2008; Aizaki et al. 2009).

Une étude a montré que la capsule du noyau accumbens reçoit des projections du LHA (Phillipson et Griffiths 1985). Plus récemment, Chung et al. (2009) ont observé que les neurones de cette région expriment, en plus des récepteurs dopaminergiques DR1 et DR2, le récepteur MCH-R1. L'injection de MCH en intra-cérébro-ventriculaire (icv) potentialise l'action de la cocaïne sur l'activité motrice. Cette drogue est connue pour augmenter la concentration en dopamine dans les terminaisons nerveuses, la MCH peut ainsi potentialiser les effets de ce neurotransmetteur. Les mêmes expériences réalisées chez les souris dont le gène du récepteur MCH-R1 est invalidé, n'entraînent pas une augmentation de l'activité locomotrice de ces animaux. Par ailleurs, l'injection d'un antagoniste de MCH-R1 appelé TPI 1361-17, inhibe l'auto-administration de cocaïne des rats. L'injection de ce même antagoniste

dans la capsule du noyau accumbens réduit cette administration. L'ensemble de ces résultats indique que le système MCH module la réponse dopamine-dépendante dans la capsule du noyau accumbens. Par ailleurs, l'abus de consommation de drogue augmente les taux extracellulaires de dopamine et entraîne une diminution de la prise alimentaire. L'influence de la dopamine dans les régions hypothalamiques se fait via les neurones à Hcrt (Yamanaka et al. 2003; Alberto et al. 2006; Yamanaka et al. 2006). Une étude récente relate des effets de la dopamine sur les neurones à MCH. Ainsi, en présence d'une forte concentration en dopamine, les neurones sont hyperpolarisés, diminuant de ce fait, leur excitabilité et la libération de MCH. Une faible concentration en dopamine entraîne également une diminution de l'excitabilité de ces neurones mais par des mécanismes différents (Conductier et al. 2011).

L'autre grande fonction à laquelle les neurones à MCH sont associés est le sommeil. Une étude récente a montré que ces neurones présentent une activité électrophysiologique spécifique associée aux états de vigilance (Hassani et al. 2009). Ceux-ci ne déchargent quasi uniquement que lors du sommeil paradoxal. Les neurones à MCH sont 'sleep-on/wake-off' et les neurones à Hcrt, 'sleep-off/wake-on', ce qui leur confère un rôle complémentaire dans la régulation des états de veille/sommeil. Une interconnection entre les neurones à MCH et ceux voisins, à Hcrt, a été montrée par Guan et al. (2002). Les neurones à MCH pourraient être impliqués dans l'inhibition des neurones à Hcrt. Il est intéressant d'étudier cette complémentarité car elle peut contribuer à certains désordres physiopathologiques du sommeil comme la narcolepsie. L'injection en icv de MCH conduit à une augmentation de 200% de la quantité de sommeil paradoxal et de 70% du sommeil lent (Verret et al. 2003). Ces neurones participeraient à l'élaboration du sommeil en inhibant les structures impliquées dans l'état d'éveil comme le locus coeruleus, le noyau du raphé dorsal, le noyau tubéromammillaire ventral sur lesquels les neurones à MCH projettent et où le récepteur

MCH-R1 est exprimé (Bittencourt et al. 1992; Hervieu et al. 2000; Kilduff et de Lecea 2001; Saito et al. 2001; Sapin Emilie 2009).

D'autres études rapportent également les effets de peptides issus du même précurseur que MCH. Parkes et Vale (1992) ont été les premiers à montrer que les neurones hypothalamiques en culture étaient capables de sécréter le peptide MCH mais aussi NEI. L'injection de NEI en icv chez le rat entraîne une augmentation des activités de toilettage, de comportements maternels et de locomotion, suggérant que ce peptide est biologiquement actif (Sanchez et al. 1997). Une étude *in vitro* a rapporté que NEI mais aussi α MSH, influençaient la différenciation neuronale dans le cerveau (Kistler-Heer et al. 1998).

4. Anatomie du système MCH

4.1 Anatomie comparée du système à MCH

Comme évoqué précédemment, les premières données concernant le système à MCH ont été obtenues chez un poisson téléostéen, le saumon (Kawauchi et al. 1983). Son action éclaircissante sur les téguments lui a valu son nom d'hormone de mélan-concentration (Kawauchi et Baker 2004). Depuis sa découverte, ce système a été décrit chez une multitude d'espèces de vertébrés différents, des lamproies aux mammifères comme les rongeurs ou l'Homme. Chez tous les vertébrés, l'hypothalamus peut être divisé en deux grandes régions : une région antérieure/préoptique, située au dessus et en avant du chiasma optique et une région postérieure. La description du système MCH montre des points communs entre ces espèces. En effet, un groupe de cellules immunoréactives pour MCH est présent dans l'hypothalamus postérieur de tous ces vertébrés. De plus, les projections de ces neurones sont diffuses, du pallium à la moelle épinière, avec une innervation dense du télencéphale basal. Chez une grande majorité de vertébrés, les neurones à MCH sont en position périventriculaire

dans l'hypothalamus postérieur dorsal, comme chez les lamproies, les poissons, les batraciens. Ces neurones se positionnent dans les régions latérales de l'hypothalamus postérieur, chez les tortues et les mammifères tels que les rongeurs ou l'Homme. L'hypothalamus est une structure bien conservée au cours de l'évolution mais des différences majeures existent comme l'apparition de régions latérales riches en cellules parmi les fibres reliant le tronc cérébral au télencéphale. Ces variations peuvent se refléter dans la localisation médio-latérale de péricaryons contenant par exemple, la MCH.

La compréhension de ces données est nécessaire pour appréhender les enjeux du développement de l'hypothalamus dans un contexte plus général de développement du SNC. Ces notions d'anatomie comparée seront nécessaires pour la discussion du présent mémoire. C'est la raison pour laquelle ce système est décrit plus en détails chez différents vertébrés comme la lamproie, les poissons puis les tétrapodes.

4.2 Les cyclostomes, exemple des lamproies

Les vertébrés peuvent être séparés en deux superclasses, les agnathes et les gnathostomes. Les agnathes sont caractérisés par l'absence de mâchoire et les cyclostomes, dont font partie les lamproies, appartiennent à cette classe. Tous les poissons (cartilagineux, osseux) et les tétrapodes (amphibiens, reptiles, oiseaux, mammifères) sont regroupés dans la classe des gnathostomes.

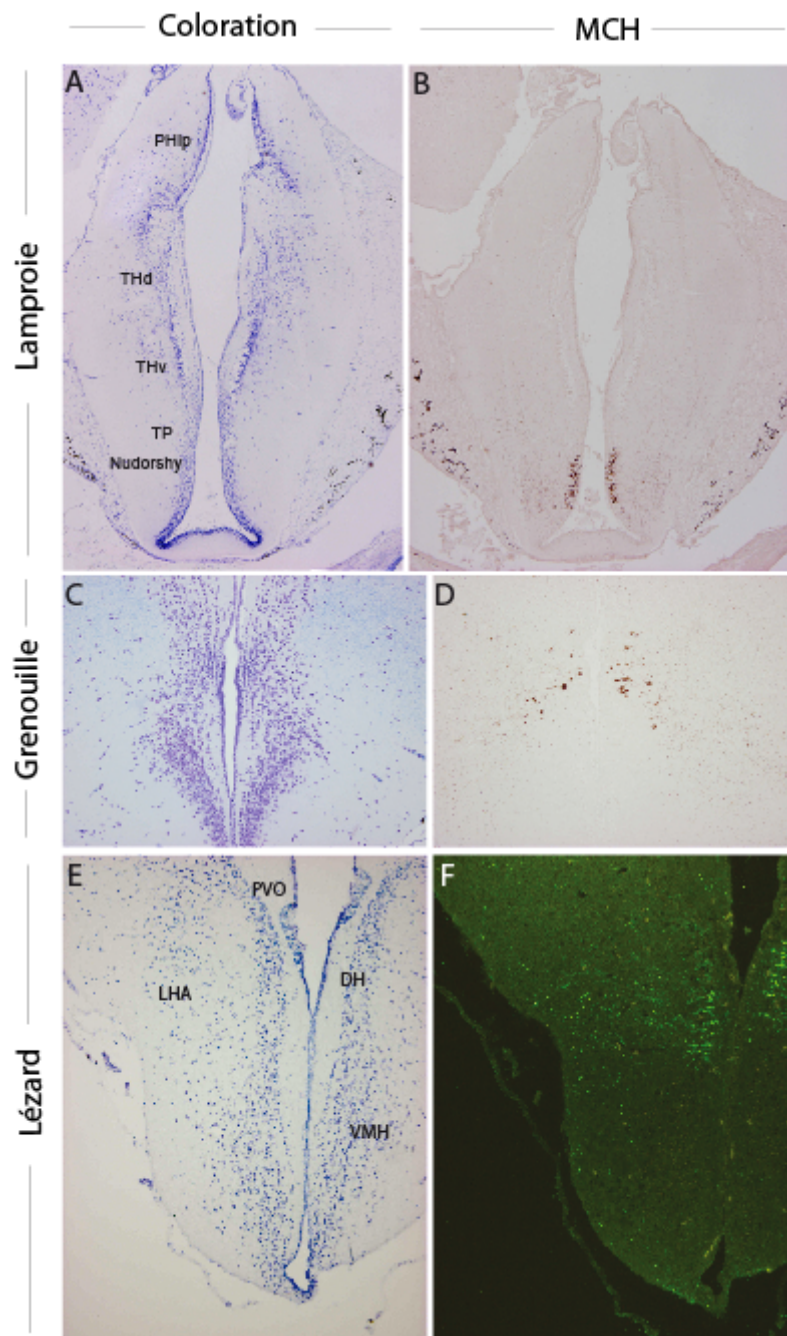
Les lamproies sont considérées comme les représentants vivants des vertébrés les plus primitifs et sont exclusivement aquatiques. Le cerveau des lamproies est de petite taille. L'hypothalamus occupe une grande partie du diencéphale. Il entoure la partie ventrale du troisième ventricule, il est au dessus du chiasma optique et est limité postérieurement par le tuberculum postérieur. Les neurones de l'hypothalamus des lamproies sont petits et concentrés dans une fine couche périventriculaire. Ils envoient une ou quelques dendrites dans

une zone fibreuse plus latérale, considérée comme de la substance blanche. La région antérieure de l'hypothalamus comprend entre autres, le noyau préoptique, formé de cellules compactes situées à distance de la surface ventriculaire. Ces structures contiennent des neurones magnocellulaires arginine vasotocine et des neurones à GnRH (Gonadotropin-releasing hormone), projetant abondamment sur la neurohypophyse. Des neurones dopaminergiques sont également présents dans les noyaux de l'hypothalamus postérieur et dans une région qui limite le diencephale et le mésencéphale appelée tuberculum postérieur. Il n'existe pas réellement de groupes de cellules dopaminergiques A8, A9 et A10 chez les cyclostomes. Les afférences des neurones striataux proviennent majoritairement des neurones dopaminergiques localisés dans le tuberculum postérieur. Les neurones à MCH sont donc situés juste en avant de ces neurones dans le noyau postérieur de l'hypothalamus en position périventriculaire (**Figure 2**) et sont adjacents aux neurones à histamine. Les axones à MCH suivent des trajets de fibres ascendantes et descendantes et projettent de manière diffuse sur l'ensemble du SNC. Un point intéressant est à noter chez l'espèce *Lampetra fluviatilis* où un nombre considérable de fibres MCH est présent dans la neurohypophyse. Chez cette espèce, au stade de larve (ammocoete), la distribution des fibres et des péricaryons MCH est similaire à celle retrouvée chez la lamproie adulte.

Figure 2 Microphotographies illustrant le marquage MCH sur des coupes frontales de cerveaux de lamproie (**A, B**), de grenouille (**C, D**) et de lézard (**E, F**) voisines de coupes colorées au bleu de toluidine.

Les neurones à MCH sont situés dans le noyau postérieur de l'hypothalamus en position périventriculaire des lamproies (**A, B**), des grenouilles (**C, D**) et des lézards (**E, F**).

DH : hypothalamus dorsal ; LHA : aire hypothalamique latérale ; Nudorshy: noyau dorsal de l'hypothalamus; PHip : parahippocampus ; PVO: organe paraventriculaire ; THd : thalamus dorsal ; THv: thalamus ventral ; TP: tuberculum postérieur; VMH : noyau ventro médian de l'hypothalamus.



4.3 Les poissons

Les poissons cartilagineux ou chondrichthyens ainsi que les poissons osseux appartiennent à la superclasse des gnathostomes. Le système MCH a été étudié chez plus d'une douzaine d'espèces, reflétant l'intérêt pour son action neuroendocrinienne. Ces caractères spécifiques observés chez les poissons osseux suggèrent que le système à MCH de ces animaux a évolué différemment de celui des tétrapodes.

Chez les chondrichthyens, représentants des poissons les plus primitifs, les structures hypothalamiques sont similaires à celles observées chez les cyclostomes. Les neurones à MCH sont localisés dans des territoires hypothalamiques homologues, c'est-à-dire dans l'hypothalamus postérieur dorsal en position périventriculaire et projettent de manière similaire. La classe des poissons osseux ou ostéichthyens, contient différentes sous-classes dont les brachiopterygiens, actinopterygiens et les dipnoi (dipneustes). Les actinopterygiens comprennent trois super-ordres, les chondrostéens, les holostéens et les téléostéens. Les chondrostéens sont considérés comme les plus anciens et les plus primitifs représentants de ces trois groupes. Chez ces espèces, l'hypothalamus occupe une vaste partie du diencéphale.

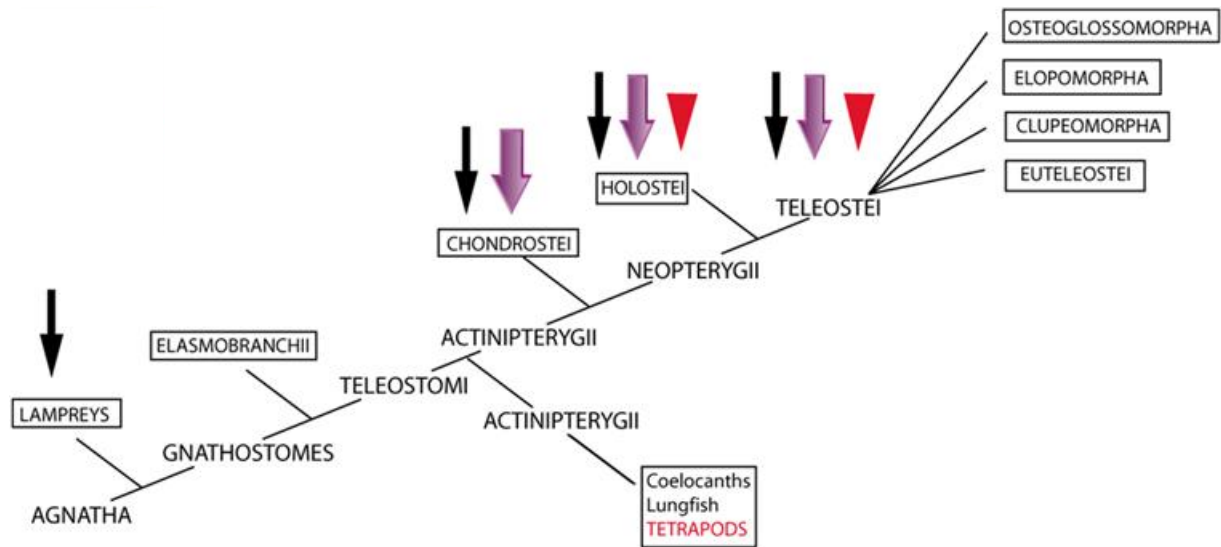


Figure 3 Schéma adapté de Baker et Bird (2002) proposant un modèle d'évolution des vertébrés depuis les agnathes.

Les fonctions de l'hormone de mélano-concentration sont indiquées par des flèches. Les flèches noires indiquent chez ces animaux une régulation adénohypophysaire, les flèches violettes indiquent une sécrétion dans la neurohypophyse et les têtes de flèches rouges indiquent une régulation des mélanophores.

Plus particulièrement, chez les poissons chondrostéens, la densité de cellules des aires périventriculaires augmente mais peu de neurones envahissent les aires latérales fibreuses. Chez les poissons holostéens et téléostéens, l'hypothalamus peut être divisé en trois zones longitudinales : une région périventriculaire compacte et riche en neurones n'ayant pas migrés, une région tubérale médiane, et une région latérale située dans les lobes inférieurs et constituée de neurones organisés en noyaux et de fibres. Chez les espèces de ces trois super-ordres, un groupe de neurones à MCH est toujours observé dans les régions périventriculaires de l'hypothalamus postérieur dorsal. De plus, un autre groupe, plus latéral, apparaît à partir des poissons holostéens dans le noyau latéral tubéral (NLT). Ces neurones présentent une taille plus importante. Chez les téléostéens, le nombre de neurones à MCH dans ce noyau devient plus important, ayant pour conséquence, l'augmentation de la fonction neuroendocrinienne via des projections sur la neurohypophyse. Les messagers des deux gènes pMCH1 et pMCH2 sont tous deux observés dans le NLT de poisson-zèbre. Plus précisément, pMCH2 et MCH2 sont exprimés dans le NLT latéral mais pas dans le NLT postérieur, médian et dorsalement au récessus latéral du troisième ventricule. Les neurones MCH ne peuvent être confondus de par leur distribution, avec les neurones magnocellulaires à vasotocine, ocytocine et les neurones à GnRH du noyau préoptique. Chez ces poissons, le mfb, faisceau complexe composé entre autres de fibres dopaminergiques, connecte différentes régions des aires ventrales télencéphaliques avec le thalamus, les régions dorsales de l'hypothalamus et les régions du tuberculum postérieur. Les neurones dopaminergiques ne sont pas réellement regroupés en noyaux A8-A10 et sont localisés à proximité des neurones à MCH. Un petit nombre de cellules histaminergiques est localisé dans l'hypothalamus postérieur de poissons téléostéens, autour du récessus postérieur (Inagaki et al. 1991; Ekstrom et al. 1995).

Peu de données sont disponibles sur le développement embryonnaire de ces neurones chez les poissons. Chez l'espèce *Cichlasoma dimerus* appartenant aux téléostéens, les péricaryons

MCH sont observés quatre jours après l'éclosion dans l'hypothalamus en développement (Pandolfi et al. 2003). Leur nombre augmente avec l'âge et trente jours après l'éclosion, leur distribution est similaire à celle observée dans le NLT d'adulte. Un autre groupe de neurones à MCH périventriculaire postérieur est également détecté. Ils sont de plus petite taille que les neurones à MCH du NLT et leur immunoréactivité n'est pas aussi intense. Leur nombre diminue avec l'âge pour ne plus être détectable 42 jours après l'éclosion. Chez l'espèce de poisson *Verasper moseri* (Téléostéen), aucun péricaryon MCH et aucune fibre n'est présent dans le cerveau le jour de l'éclosion (Amano et al. 2003). Les premiers péricaryons et les premières fibres, sont observés, respectivement dans l'hypothalamus et dans l'hypophyse, sept jours après l'éclosion. Leur distribution est similaire à celle de l'adulte, 35 à 42 jours après l'éclosion. Aucune donnée ne précise si ces populations de neurones à MCH, magnocellulaires pour l'une et postéro-dorsales pour l'autre, ont une origine embryonnaire commune.

4.4 Les tétrapodes

L'étude de l'anatomie neurochimique dans le cerveau de dipneustes est particulièrement intéressante car la plupart des caractéristiques qui les définissent les placent comme les représentants d'un ancêtre commun des vertébrés terrestres. Les dipneustes vivants présentent des caractéristiques anatomiques communes avec les amphibiens vivants, particulièrement les urodèles. Chez les dipneustes, les neurones à MCH sont situés en position périventriculaire de l'hypothalamus postérieur dorsal et ventral. Les tétrapodes, qui appartiennent à la super famille des gnathostomes, regroupent tous les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères.

4.4.1 Les amphibiens

Les amphibiens sont caractérisés par un stade larvaire aquatique et une vie adulte de prédateurs terrestres. Cette classe regroupe trois ordres : les urodèles (salamandre, triton), les anoures (grenouille) et les gymnophiones. L'étude du système MCH a exclusivement été réalisée chez des espèces d'anoures, telles que la grenouille, le xénope ou le crapaud et elle est, à ce jour, ignorée chez les urodèles. L'hypothalamus des anoures est organisé en deux régions, comme chez la lamproie, une région préoptique/antérieure et une région tubérale/postérieure séparées par le chiasma optique. La région préoptique ne contient que des noyaux périventriculaires tels que les noyaux préoptiques antérieur et postérieur. Ces deux aires sont intimement liées au complexe hypothalamo-hypophysaire. L'aire préoptique postérieure comprend le noyau préoptique magnocellulaire et le noyau suprachiasmatique. L'hypothalamus postérieur (hypothalamus infundibulaire) contient deux noyaux périventriculaires, les noyaux hypothalamiques ventraux et dorsaux et le noyau hypothalamique latéral. L'aire préoptique contient la majorité des neurones à vasotocine mais quelques uns parvocellulaires sont présents dans l'hypothalamus postérieur. Les neurones à MCH sont localisés dans les noyaux de l'hypothalamus postérieur en position périventriculaire (**Figure 2**). Les plus dorsaux sont observés dans le tuberculum postérieur (Lazar et al. 2002). Cette structure renferme également, en position postérieure, les neurones dopaminergiques à projections striatales. Les neurones à MCH projettent abondamment sur le télencéphale basal, l'hypothalamus et dans les cornes dorsales de la moelle épinière. En revanche, contrairement aux poissons, ces neurones n'innervent pas l'hypophyse postérieure et ne sont pas neuroendocriniens. L'ontogenèse des neurones à MCH a été réalisée chez des têtards *Rana temporaria* (Francis et Baker 1995). Les premiers péricaryons MCH sont observés au cours de la métamorphose dans les noyaux ventraux et dorsaux de l'hypothalamus postérieur. Lorsque la métamorphose est presque complète, le groupe de

cellules du noyau dorsal de l'hypothalamus postérieur augmente en nombre et s'étend rostralement chez l'animal adulte.

4.4.2 Les sauropsides

Les sauropsides regroupent les reptiles et les oiseaux. Ils forment avec les synapsides, auxquels appartiennent les mammifères, les amniotes. Ils se distinguent des amphibiens par leur capacité à se reproduire hors de l'eau. Ces animaux ont développé des comportements moteurs élaborés tels que la locomotion ou le vol, marqués par l'évolution des structures comme le télencéphale. L'hypothalamus des reptiles et des oiseaux est plus complexe que celui des espèces étudiées précédemment. Il est composé d'une région périventriculaire riche en cellules et d'une région latérale composée de plusieurs noyaux et de fibres. Chez beaucoup de sauropsides étudiés (lézards, tortues, oiseaux,...), les neurones à MCH sont observés dans l'hypothalamus postérieur en position périventriculaire mais un groupe de neurones est également présent dans des régions plus latérales de l'hypothalamus postérieur, par exemple chez la tortue (*Chrysemis scripta elegans*). Ce groupe n'est pas observé chez des espèces telles que le lézard des murailles (*Podarcis muralis*, **Figure 2**) ou le serpent (*Natrix natrix* et *Natrix maura*) (Cardot et al. 1994). Chez les oiseaux, ces deux groupes sont aussi présents. La distribution des fibres MCH est diffuse et similaire à celle observée chez les autres vertébrés.

4.5 Les synapsides

✓ *Distribution chez le rat*

Le rat est l'espèce pour laquelle l'anatomie du système à MCH a été la plus détaillée. La distribution du système MCH a aussi été étudiée chez diverses espèces de mammifères comme l'Homme, le singe, la souris, le chat ou le mouton (Bresson et al. 1989; Mouri et al.

1993; Tillet et al. 1996; Bittencourt et al. 1998; Torterolo et al. 2006; Croizier et al. 2010). D'après la littérature, la distribution de ce système apparaît similaire chez toutes ces espèces.

- Localisation des corps cellulaires

Chez le rat adulte, les péricaryons MCH sont majoritairement localisés dans le LHA. Pour autant, leur distribution ne se limite pas à cette structure : certains neurones à MCH sont également observés dans les régions de l'hypothalamus médian mais aussi périventriculaire. Enfin, un groupe important est présent dans les régions rostro-médianes de la *zona incerta*, anatomiquement rattachée au thalamus ventral.

Plus précisément, sur des coupes frontales de cerveau de rat, les neurones à MCH sont observés en position dorsomédiane dans la région comprenant l'hypothalamus antérieur dorsal et médian (partie postérieure du noyau antérieur de l'hypothalamus) et les territoires les plus rostromédians de la *zona incerta*. Ils s'appuient à la limite postérieure du noyau paraventriculaire sans jamais en faire partie. Dans l'hypothalamus tubéral, de nombreux neurones à MCH sont dans les aires les plus latérales, en position périfornicale ou adjacente au pédoncule cérébral. A ce niveau, beaucoup de neurones à MCH sont situés dans la *zona incerta* et aussi quelques uns dans le noyau dorsomédian ainsi que dans la capsule dorsomédiane du noyau ventromédian. Plus caudalement, à la jonction entre l'hypothalamus tubérale et mammillaire, des péricaryons du LHA sont observés dans les régions les plus dorso-latérales de cette structure, adjacents au noyau sous-thalamique (STN). Un petit groupe de neurones très restreint est retrouvé dans le noyau périventriculaire postérieur (PVp). Des études antérieures du laboratoire estiment à environ 10000 le nombre de neurones à MCH chez le rat. L'estimation du nombre de neurones à MCH présents dans chaque structure décrite n'a pas été réalisée.

Par ailleurs, l'existence de deux groupes de péricaryons MCH en dehors des structures diencéphaliques a été décrite (Bittencourt et al. 1992). Des neurones dispersés sont observés dans les tubercules olfactifs et d'autres dans le tegmentum pontique. Les deux groupes ont été révélés par immunohistochimie pour NEI et MCH mais aussi par hybridation *in situ* à l'aide de sondes s'hybridant à l'ARNm pMCH. Le niveau de marquage étant plus faible dans ces deux régions, un traitement préalable des rats par la colchicine a été nécessaire pour le marquage immunohistochimique et une exposition plus longue pour une détection optimale des autoradiogrammes pour le marquage HIS.

Enfin, chez des rates en lactation (entre 8 et 21 jours de lactation), des neurones à MCH ont été observés dans la partie rostrale du noyau paraventriculaire, dans le noyau périventriculaire préoptique et la partie médiane du noyau préoptique médian (MPO) (Knollema et al. 1992). Les neurones à MCH du MPO expriment l'enzyme de synthèse du GABA appelée GAD67. Ces neurones sont innervés par les neurones à AgRP (agouti-related protein), α -MSH, CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) provenant du noyau arqué. L'innervation des neurones à MCH de la partie ventrolatérale du noyau ventromédian et dans le noyau prémammillaire ventral est accrue chez des femelles en lactation (Rondini et al. 2010).

- **Sous-populations des neurones à MCH, influence du développement sur leur organisation anatomique**

Les neurones à MCH projettent de manière diffuse sur l'ensemble du SNC, des bulbes olfactifs à la moelle épinière (**Figure 4**) (Skofitsch et al. 1985; Zamir et al. 1986; Bittencourt et al. 1992). Les voies ascendantes et descendantes empruntent majoritairement le mfb. Les travaux plus anciens de l'équipe ont montré que les neurones à MCH sont organisés en au moins, deux sous-populations, caractérisées par leur date de naissance, leur projection et leur phénotype chimique (Brischoux et al. 2001; Brischoux et al. 2002; Cvetkovic et al. 2004).

Dans l'embryon, les neurones à MCH sont générés en un large pic allant du 10^{ème} au 16^{ème} jour de vie embryonnaire (E10 à E16). Ils se mettent en place selon un gradient latéro-médian, les premiers nés se situent latéralement au fornix et les seconds, médialement (Brischoux et al. 2001).

Combinant chez le rat injections de traceur rétrograde dans la moelle épinière ou dans le cortex cérébral et analyse par le BrdU, notre équipe a montré que les neurones de la première sous-population, de type A, naissent autour de E11 et projettent majoritairement sur la moelle épinière et ceux de la seconde sous-population, de type B, émettent principalement des projections ascendantes dans le cortex cérébral et naissent à E12-E13 (Brischoux et al. 2001; Brischoux et al. 2002). De plus, il apparaît que seuls ces derniers neurones expriment le peptide CART et le récepteur neurokinine-3 (NK3) (Brischoux et al. 2002; Cvetkovic et al. 2004). Les neurones à Hcrtr co-localisés dans les mêmes régions hypothalamiques, sont générés quant à eux, en un pic de genèse étroit à E12 (Figure 5) (Amiot et al. 2005). Les distributions exactes des projections de l'une et de l'autre sous-populations MCH ne sont pas encore clairement établies. Cependant, nous pouvons affirmer que les neurones à projections spinales n'innervent que très peu le télencéphale et que les projections MCH/CART se terminent pour les plus postérieures, massivement dans la partie dorsale du noyau paraventriculaire mais n'atteignent pas la moelle épinière (Cvetkovic et al. 2004).

L'existence de ces sous-populations n'a été montrée que chez le rat. Il n'a pas été possible à ce jour d'associer l'une ou l'autre de ces sous-populations à une fonction spécifique. Cependant, le fait que chacune d'entre elles soit générée à un stade embryonnaire différent suggère qu'il faut en analyser le développement afin de comprendre l'organisation morphofonctionnelle des neurones à MCH.

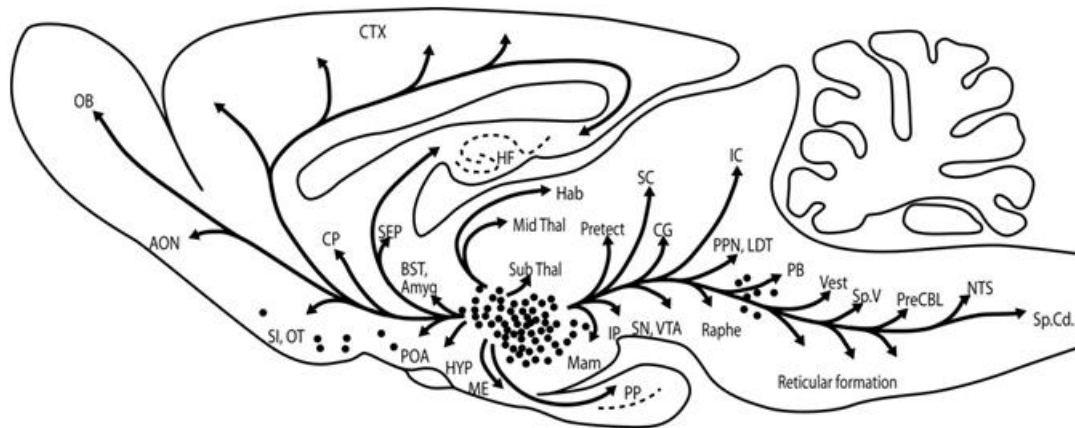


Figure 4 Localisation et projections des neurones à MCH sur une coupe parasagittale d'un cerveau de rat adulte.

Abréviations de Bittencourt et al. (1992) : Amyg, amygdale ; AON, noyau olfactif antérieur ; BST, noyau du lit de la strie terminale ; CG, substance grise ; CP, caudoputamen ; CTX, cortex cérébral ; Hab, habenula ; HF, formation hippocampale ; HYP, hypothalamus ; IC, colliculus inférieur ; IP, complexe nucléaire interpédonculaire ; LDT, noyau latéro-dorsal du tegmentum ; Mam, corps mamillaires ; ME, éminence médiane ; Mid Thal, noyaux thalamiques de la ligne médiane ; NTS, noyau du tractus solitaire ; OB, bulbe olfactif ; OT, tubercule olfactif ; PB, noyau parabrachial ; POA, aire préoptique ; PP, hypophyse postérieure ; PPN, noyau pédonculopontique ; PreCBL, noyaux précérébelleux ; Pretect, aire prétectale ; SC, colliculus supérieur ; SEP, région septale ; SI, substance innominée ; SN, substance noire ; Sp.Cd., moelle épinière ; Sp.V, noyau vestibulaire spinal ; Sub Thal, région subthalamique ; Vest, noyaux vestibulaires ; VTA, aire tegmentale ventrale.

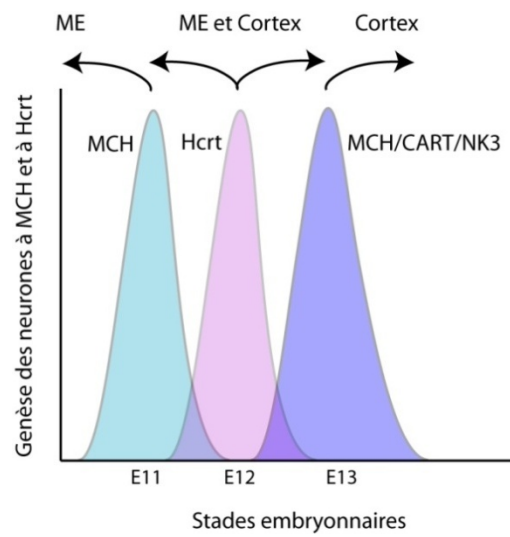


Figure 5 Schéma illustrant les pics successifs de genèse des sous-populations des neurones à MCH et des neurones à Hcrt, chez le rat.

La première sous-population de neurones à MCH à projections spinales naît à E11 (type A), les neurones à Hcrt naissent à E12 et projettent sur la moelle épinière et le cortex cérébral et la seconde sous-population de neurones à MCH à projections corticales naît à E13 (type B).

II. Données sur le développement de l'hypothalamus

1. Morphogenèse du prosencéphale

Le tissu nerveux dérive de la plaque neurale issue de l'ectoderme. Au cours de la neurulation, les marges latérales de la plaque neurale se soulèvent et se rejoignent puis fusionnent dans les directions rostrales et caudales. Les larges ouvertures aux deux extrémités de ce premier point de fusion sont appelées, respectivement, neuropores antérieur et postérieur. Après la fermeture du neuropore antérieur, la partie la plus rostrale du tube nerveux se divise en deux parties portant les noms d'archencéphale et de deutérencéphale. Aussitôt après la fermeture du tube nerveux, le cerveau primitif est composé de trois dilatations rostrocaudales appelées vésicules cérébrales primaires. Il s'agit du prosencéphale, issu de l'archencéphale, du mésencéphale et du rhombencéphale issus du deutérencéphale. Les liaisons entre les vésicules sont marquées par des faisceaux de fibres en développement orientés transversalement appelés commissures. Le prosencéphale et le rhombencéphale se différencient en deux parties. Le prosencéphale se divise en télencéphale (position rostrale) et en diencéphale (position caudale) ; le rhombencéphale donne rostralement, le métencéphale et caudalement, le myelencéphale se continuant plus tard par la moelle épinière (Huxley 1871). Le cerveau dit « à cinq vésicules » est obtenu. Ces structures vont ensuite présenter des sous-divisions. En ce qui concerne le diencéphale, quatre divisions longitudinales superposées les unes aux autres sont proposées d'après l'étude de sillons sur les parois latérales des ventricules, les sulci ; il s'agit dorsalement de l'épithalamus, puis du thalamus dorsal et ventral et enfin, ventralement de l'hypothalamus. Ces régions sont délimitées par le sulcus dorsal diencéphalique, par le sulcus médian diencéphalique et par le sulcus ventral diencéphalique séparant le thalamus ventral de l'hypothalamus. En 1893, selon His, ces sous-divisions longitudinales

diencephaliques sont le prolongement de sous-divisions longitudinales plus postérieures, séparées par le *sulcus limitans* (His 1893). Ce dernier sépare une partie basale (motrice) et une partie alar (sensorielle). Ces structures dérivent de régions du tube nerveux au cours des stades précoces du développement. En 1828, Von Baer a décrit que, durant certaines phases précoces du développement, les régions rhombencéphaliques de l'embryon de poulet formaient des bombements, reflétant une activité proliférative intense dans le neuroépithélium (Von Baer 1828). Ces régions segmentant le tube nerveux le long de son axe, sont appelés neuromères (Mihalkovicz 1877; Orr 1887). Le relief ventriculaire du cerveau en développement est en changement perpétuel. Les sulci résultant peuvent être des reliques de sillons neuromériques ou alors dus à la transformation des reliefs ventriculaires causée par des forces mécaniques exercées par un taux de développement différent entre les régions basale et dorsale. En effet, les reliefs ventriculaires sont intimement liés au neuromèrisme pendant les phases précoces du développement et subissent de profonds changements suite aux événements histogénétiques des parois du tube nerveux. L'évolution des neuromères et des sulci au cours du développement montre à quel point il est difficile d'établir une description exacte et juste de ceux-ci. Une divergence d'opinions concernant la place du *sulcus limitans* est encore d'actualité (Rubenstein et al. 1994; Alvarez-Bolado et al. 1995; Alvarez-Bolado et Swanson 1996; Diez-Roux et al. 2011; Moreno et Gonzalez 2011) mais le but de ce travail n'est pas de prendre partie mais seulement d'énoncer les problématiques que posent l'étude de ce sulcus. Une question se pose clairement, pouvons nous étendre la limite du *sulcus limitans* dans le diencephale, pouvons nous ainsi séparer cette région en une plaque basal (fonctions motrices) et une plaque alar (fonctions sensorielles)? Certains auteurs doutaient de son existence dans le diencephale alors que d'autres avaient des avis divergents quant aux régions où il se terminait (pour revue, Keyser 1979). En observant le relief ventriculaire, le sulcus diencephalique ventral apparaît comme le prolongement rostral du *sulcus limitans*. Le sulcus

diencephalique ventral se termine dans la vésicule optique aux stades précoces du développement. Tardivement, quand il fusionne avec le sulcus intraencéphalique antérieur, il bifurque : une branche continue dans le récessus préoptique et l'autre se courbe à travers le trou de Monro. La limite rostrale du *sulcus limitans* semble donc dépendre du stade embryonnaire auquel sont faites les observations.

Une autre incertitude persiste dans l'existence de certains neuromères et particulièrement les prosomères. D'après l'ouvrage de Nieuwenhuys et al. (1997), chez les vertébrés, la majeure partie du cerveau postérieur est probablement composée d'au moins six rhombomères individuels et consécutifs (R1 à R6), le mésencéphale est composé de deux mésomères (M1 et M2), la commissure postérieure séparant M1 et le premier prosomère (P1). Chez la plupart des vertébrés, le diencephale comporte trois neuromères (P1 à P3) appelés le synencéphale, le parencéphale postérieur et le parencéphale antérieur. Le premier est limité antérieurement par le fasciculus rétroflexus, le second par la *zona limitans intrathalamica* (*zli*). Le synencéphale dorsal et ventral seraient à l'origine, respectivement, du prétectum et du noyau du « faisceau longitudinal médian » (*mlf*), le parencéphale postérieur, de l'épithalamus et du thalamus dorsal et le parencéphale ventral, du thalamus ventral. Des incertitudes persistent quant à la division des régions les plus rostrales du tube nerveux (hypothalamus, aire préoptique, hémisphères télencéphaliques). Deux évaginations précoces dues au développement des deux hémisphères télencéphaliques ainsi que de la vésicule optique perturbent le patron classique de segmentation du tube nerveux. Selon Nieuwenhuys (1997), l'organisation de la partie la plus rostrale du tube nerveux n'est pas claire et n'offre aucune limite fiable pour une sous-division « naturelle » de cette région. De plus, selon lui, le télencéphale et l'hypothalamus dérivent probablement du même groupe de neuromères et la plaque basale ne serait pas impliquée dans la formation du télencéphale. Le télencéphale moyen (régions préoptiques) serait ainsi la continuité du diencephale. D'après certains neuroanatomistes comme Johnston

(1909), l'emplacement des divisions télodienéphaliques permet de penser que les régions préoptiques appartiennent au télencéphale. Dans un travail paru en 2000, Marin et al. ont montré que les cellules émanant de l'éminence ganglionique médiane (MGE) et des aires préoptiques/antopédonculaires antérieures (POa/AEP) migrent dans le striatum. Ces neurones naissent dans des territoires caractérisés par l'expression du facteur de transcription Nkx2.1. C'est le cas des neurones cholinergiques qui dérivent d'une région commune MGE/POa/AEP qui nécessite l'expression de Nkx2.1 (Marin et al. 2000).

Toutes ces données amènent l'idée que l'hypothalamus ne constituerait plus une entité ventrale mais rostrale au thalamus (Bergquist et Kallen 1953,1954). Jusqu'à très récemment et la publication de deux articles dans Nature Neurosciences et PlosBiology, les anatomistes et physiologistes de l'hypothalamus prenaient peu en compte ces travaux qui remettaient en question l'organisation anatomique du diencéphale (Shimogori et al. 2010; Diez-Roux et al. 2011).

Des auteurs segmentent tout de même le prosencéphale en prosomère se basant sur la distribution de facteurs de transcription. En 1994, Rubenstein et al. ont développé une théorie selon laquelle le prosencéphale est divisé en six segments transversaux, nommés P1 à P6. En 2003, Puelles et Rubenstein reviennent sur la description de leur modèle prosomérique en le faisant évoluer. Ce modèle est alors simplifié. Les prosomères P4 à P6 ne sont plus définis comme tels et sont remplacés par la description du prosencéphale secondaire qui est défini comme un protosegment complexe non divisé en prosomères. Cette aire est en effet, difficile à définir en raison des déformations que subissent ces régions à la suite de l'évagination du télencéphale et de la morphogenèse en général.

Ainsi chaque prosomère et le prosencéphale secondaire sont caractérisés par l'expression d'une combinaison spécifique de différents gènes du développement. Ces gènes peuvent appartenir à la superfamille des gènes à homéoboîte qui possèdent une séquence nucléotidique

portant ce nom. Celle-ci code pour une séquence de 60 acides aminés ou homéodomaine pouvant se lier à l'ADN. Ainsi, ces gènes codent pour des facteurs de transcription qui modulent l'expression de certains gènes impliqués dans la mise en place du SNC et plus précisément dans la différenciation cellulaire au cours du développement. Il existe également des facteurs de transcription qui possèdent un motif hélice-boucle-hélice (bHLH). Ces facteurs de transcription sont séparés généralement en deux classes basées sur la dépendance de Shh pour leur régulation. Les facteurs de transcription de classe I, comme Pax6, sont réprimés par un haut niveau d'expression de Shh, tandis que ceux de classe II, comme Nkx2.2, sont activés par un haut niveau d'expression de Shh (Briscoe et al. 2000 ; Pachikara et al. 2007). Selon ce modèle, les territoires du prosencéphale secondaire naissent d'une région caractérisée par l'expression de Shh, Nkx2.1 et Nkx2.2.

2. Données de biologie du développement

Entre les espèces, les étapes précoces du développement du SNC sont très bien conservées. Les précurseurs hypothalamiques dérivent de cellules de la ligne médiane ventrale en avant du plancher du tube nerveux. A l'heure actuelle, deux hypothèses peuvent expliquer comment, par action du tissu nerveux axial, les cellules de la ligne médiane ventrale se différencient en précurseurs hypothalamiques ou en cellules du plancher (Wilson et Houart 2004). La première propose que les signaux varient le long d'un axe antéro-postérieur et sont originaires du mésendoderme (plaque préchordale ou la notochorde), qui est localisé ventralement au tube nerveux. Ces signaux entraînent la différenciation cellulaire en précurseurs hypothalamiques ou en cellules du plancher (Dale et al. 1997; Dale et al. 1999). La seconde suggère que les signaux émis par la plaque préchordale ou la notochorde sont les mêmes tout le long de l'axe antéro-postérieur et que ce sont les capacités des cellules de la ligne médiane ventrale à répondre à ces signaux qui diffèrent. Plusieurs signaux candidats pour la différenciation de

l'hypothalamus sont d'ores et déjà connus, il s'agit de Sonic Hedgehog (Shh), Nodal, Bone Morphogenetic Proteins (BMP) et Wnt.

2.1 Rôles de SHH et BMP7 dans le devenir hypothalamique

Chez les vertébrés, le destin des progéniteurs cellulaires dans le tube nerveux peut être déterminé par leur position par rapport aux sources de signaux inducteurs sous-jacents. Des facteurs sont sécrétés tout le long du mésoderme axial. Précocement, les cellules de la ligne médiane ventrale sont soumises à l'influence d'une glycoprotéine sécrétée par le mésoderme axial (plaque préchordale et notochorde), appelée Shh. La perte de Shh entraîne une absence de la différenciation des cellules ventrales comme les cellules du plancher ou les motoneurons mais aussi une cyclopie et une perte des structures hypothalamiques (Chiang et al. 1996). Au contraire, la surexpression de Shh, chez les embryons de poissons zèbres, entraîne une expression ectopique de Nk2.1 dorsalement dans le diencéphale (Rohr et al. 2001). L'expression de Shh par les cellules de la plaque préchordale entraîne l'expression de HNF3 β par les précurseurs hypothalamiques ainsi que de Shh lui-même (Roelink et al. 1995; Ruiz i Altaba et al. 1995). Shh contrôle sa propre expression grâce à une boucle d'autorégulation par l'intermédiaire de HNF3 β (Muller et al. 2000). La restriction de l'expression de HNF3 β est concomitante avec la régulation positive de l'expression de BMP7 et d'un marqueur hypothalamique Nkx2.1, dans les cellules de la ligne médiane ventrale rostrale (Dale et al. 1997). BMP7 est également exprimé dans la plaque préchordale. Si l'expression de Shh est perdue dans la plaque préchordale, les cellules de la ligne médiane ventrale ne se différencient ni en précurseurs hypothalamiques, ni en cellules du plancher. En revanche, l'expression de BMP7 ajoutée à celle de Shh dans la plaque préchordale montre que BMP7 est requis pour imposer le caractère rostral aux cellules de la ligne médiane ventrale induite par Shh (Dale et al. 1997).

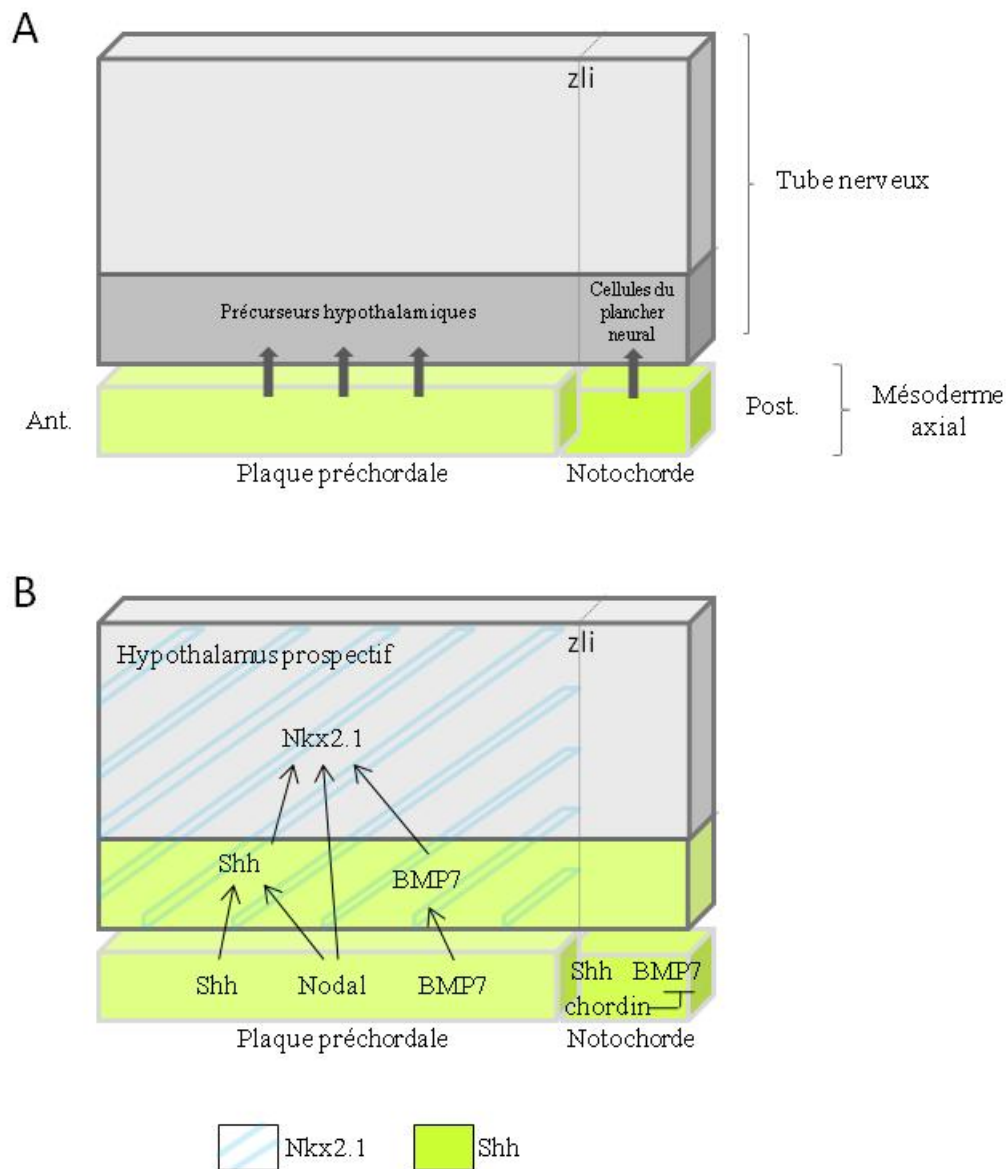


Figure 6 Schémas résumant l'action de certaines protéines dans la mise en place des précurseurs hypothalamiques à l'origine de l'hypothalamus caractérisé par l'expression de *Nkx2.1*.

(A) L'action coordonnée de *Shh*, *Bmp7* et *Chordin*, exprimées par la plaque préchordale et/ou la notochorde, est essentielle à l'induction des progéniteurs hypothalamiques qui expriment *Nkx2.1*. Les flèches indiquent l'action des voies de signalisation, mais ne reflètent pas forcément une interaction moléculaire directe.

(B) L'expression de *Nodal* est essentielle à celle de *Nkx2.1* dans le diencéphale ventral via l'action de *Shh*. Les flèches indiquent l'action des voies de signalisation, mais ne reflètent pas forcément une interaction moléculaire directe. *zli* : *zona limitans intrathalamica*.

Shh et BMP7 sont également exprimées par la notochorde est pourtant, cela ne conduit pas à la différenciation des cellules de la ligne médiane ventrale caudale en précurseurs hypothalamiques. Le blocage de l'action de BMP7 à l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre lui entraîne une induction préférentielle des cellules de la ligne médiane ventrale en cellules du plancher. Cette différence dans la capacité d'induction du mésoderme axial pourrait être due à une expression d'un inhibiteur de BMP7. Chordin est connue pour inhiber BMP7 et son expression diminue dans la plaque préchordale juste avant la différenciation des cellules de la ligne médiane ventrale en précurseurs hypothalamiques, alors qu'elle est maintenue caudalement dans la notochorde. Cette inhibition empêche les cellules de la ligne médiane ventrale de se différencier trop tôt en précurseurs hypothalamiques (lors de leur migration vers les régions plus rostrales). Chordin permet d'établir une limite, au niveau de la *zli*, entre les précurseurs hypothalamiques et les cellules du plancher, tout du moins chez l'embryon de poulet. En effet, les souris *chordin*^{-/-}; *noggin*^{+/-} présentent divers phénotypes allant de la cyclopie à l'holoprosencéphalie ou encore des réductions rostrales du cerveau (Bachiller et al. 2000; Anderson et al. 2002b). Ces phénotypes résultent d'une réduction du niveau d'expression d'antagonistes à l'activité des BMP. La production de Chordin et de Noggin est essentielle à l'activité rostrale de la plaque préchordale chez la souris. D'autres voies que celles des BMP jouent probablement un rôle dans la régionalisation antéro-postérieure des cellules hypothalamiques et des cellules du plancher.

2.2 Développement et migration des précurseurs hypothalamiques, rôle de NODAL

Nodal appartient à la superfamille des transforming growth factor-beta (TGFβ) et joue un rôle central dans la mise en place de l'embryon précocement au cours du développement et

particulièrement dans celle du mésoderme. Chez le poisson zèbre, des mutations de facteurs de la voie de signalisation impliquant Nodal conduisent à des atteintes sévères de l'axe ressemblant aux atteintes constatées chez des souris $Shh^{-/-}$ (Chiang et al. 1996; Schier et Shen 2000) telles que la cyclopie ou l'absence de tissu hypothalamique (Varlet et al. 1997). Nodal est requis pour l'expression de marqueurs hypothalamiques chez le poisson zèbre, tels que Nk2.1 et cette expression dépend de celle de la protéine Shh (Rohr et al. 2001). Shh n'est pas capable de restaurer le développement du diencephale ventral (apparition de marqueurs hypothalamiques tels que Nk2.1) chez des embryons ayant perdu l'activité Nodal, suggérant l'incapacité de Shh à agir seule pour permettre le développement de l'hypothalamus. La protéine Cyclop, transducteur du signal Nodal, joue un rôle primordial dans l'activation de l'expression de Shh dans le tube nerveux via Smad2 (Muller et al. 2000). De plus, le promoteur de Shh contient des éléments activateurs répondant à Cyclop, permettant l'expression de Shh dans le tube nerveux de poulet. L'expression de Shh est ainsi régulée par une voie de signalisation permettant l'initiation de son expression, celle incluant Nodal.

En plus de son rôle dans l'induction de l'expression de Shh, indispensable au devenir hypothalamique, Nodal est nécessaire à la migration postéro-antérieure des précurseurs hypothalamiques (Varga et al. 1999). En effet, chez des mutants pour Cyclop, ces précurseurs ne migrent pas antérieurement. Toutefois, les résultats de Mathieu et al (2002) vont à l'encontre de ceux précédemment énoncés. Leurs études impliquent des poissons-zèbres chimériques, dont les cellules de l'hypothalamus prospectif sont incapables de recevoir les signaux de Nodal. Des embryons de type sauvage ont été transplantés avec des cellules mutantes pour un médiateur de Nodal. L'étude de ces chimères a permis de montrer que les cellules de l'hypothalamus prospectif migrent vers les régions antérieures malgré leur incapacité à recevoir les signaux Nodal. Nodal pourrait ne pas être indispensable à la

migration des précurseurs hypothalamiques mais en revanche, être nécessaire à l'induction du devenir de l'hypothalamus.

2.3 L'inhibition de la voie de signalisation des Wnt est nécessaire au devenir hypothalamique

La famille des Wnt comprend de nombreux gènes encodant des glycoprotéines sécrétées riches en cystéine et impliquées dans la régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale selon un gradient d'activité élevé caudalement et plus faible rostralement. Ce gradient est associé à l'activité d'antagonistes de cette voie de signalisation (Yamaguchi 2001; Kapsimali et al. 2004).

L'étude de poissons zèbres *masterblind*, c'est-à-dire possédant une mutation pour l'*Axin1*, qui est un régulateur intracellulaire négatif de la voie de signalisation des Wnt, montre une expansion de la plaque du plancher prospectif ainsi qu'une réduction des tissus hypothalamiques présomptifs. L'expression du marqueur hypothalamique *Nk2.1* diminue de moitié le long de l'axe antéro-postérieur. En revanche, l'expression des marqueurs de plaque du plancher, *Foxa1* et *Foxa2*, est étendue dans le tube nerveux ventral. Chez ces poissons, il existe donc une régionalisation anormale du prosencéphale, sans cyclopie, due à une augmentation de l'activité de la voie de signalisation des Wnt. La greffe de cellules surexprimant *Axin1* dans les cellules du plancher de poissons *mb1* entraîne une expression ectopique de *Nk2.1* au sein de ces cellules. L'*Axin1* ainsi que d'autres modulateurs de la signalisation des Wnt réguleraient la réponse des cellules de la ligne médiane ventrale à des signaux comme *Shh* ou *Nodal* qui induisent l'identité ventrale du SNC, permettant aux cellules d'intégrer l'information concernant le patron d'expression de gènes dorso-ventral et antéro-postérieur.

De manière similaire, chez les souris mutantes pour Six3, une absence d'yeux, de nez mais aussi de la plupart des structures antérieures de la tête est observée (Lagutin et al. 2003). Six3 est un gène à homéoboîte codant pour un facteur de transcription à homéodomaine, il est exprimé dans la partie la plus antérieure de la plaque neurale en développement (Oliver et al. 1995). Six3 est requis pour le développement antérieur du prosencéphale des mammifères. Il entraîne la répression directe de l'expression de Wnt1 en se liant à son promoteur. L'absence de Six3 conduit à la perte ou à la réduction d'expression de marqueurs hypothalamiques comme Nkx2.1 et Shh. Six3 et Axin1 permettent donc l'inhibition de la signalisation de Wnt dans les régions les plus antérieures du prosencéphale permettant le développement correct des structures antérieures telles que l'hypothalamus.

3. Neurogenèse de l'hypothalamus

La neurogenèse de l'hypothalamus a été décrite ces dernières années, dans des études publiées par Altman et Bayer (1986) et par Markakis (1997; 2002). Lors de la neurogenèse, les précurseurs hypothalamiques se divisent dans le neuroépithélium germinatif en bordure du troisième ventricule puis migrent selon deux mécanismes possibles pour atteindre leur destination finale. Les neurones peuvent quitter la zone ventriculaire en migrant radialement c'est-à-dire tout droit en direction de la face externe du tube nerveux (zone du manteau) ou alors subir une migration tangentielle par rapport à la surface du tissu nerveux après être sortis du neuroépithélium germinatif. La migration neuronale s'effectue le long de guides formés par les cellules gliales radiales exprimées des régions ventriculaires aux régions plus latérales du manteau (**Figure 7**) (Arnold-Aldea et Cepko 1996).

Altman et Bayer ont développé la théorie selon laquelle les neurones de l'hypothalamus naissent en trois vagues successives (Altman et Bayer 1986). Ainsi, les premiers neurones générés dans le neuroépithélium germinatif quittent cette zone pour s'installer dans le

manteau naissant et former par la suite, les aires hypothalamiques latérales. Lors d'une deuxième vague de genèse, ce sont les neurones de l'hypothalamus médian qui naissent. Ces neurones s'installent dans le manteau selon un gradient latéro-médian. Enfin, lors d'une troisième vague, les neurones de la région périventriculaire se mettent en place. Selon eux, les neurones hypothalamiques naissent entre E12 et E15, avec cependant un pic à E13. Les travaux de Ifft, ont montré, toujours grâce à la technique classique de datation utilisant la thymidine tritiée que les neurones hypothalamiques naissent entre E12 et E16 avec un maximum de genèse à E14 (Ifft 1972). Markakis précise, par la méthode utilisant le BrdU, que neurones hypothalamiques non neuroendocrines naissent entre E11 et E17 (dernier stade étudié) alors que les neurones neuroendocrines naissent majoritairement entre E12 et E14 (Markakis et Swanson 1997; Markakis 2002).

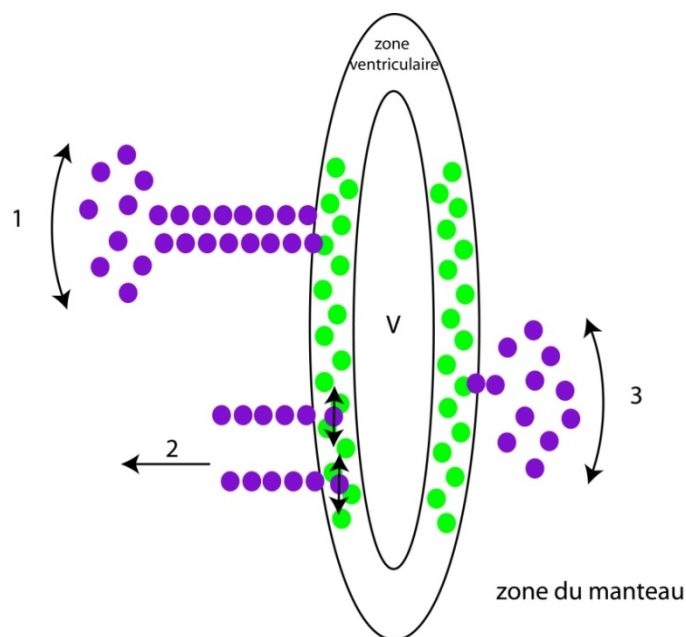


Figure 7 Les neurones hypothalamiques se mettent en place selon une migration radiale ou tangentielle.

1) La majorité des neurones migrent radialement après leur sortie de la zone ventriculaire. Les neurones peuvent ensuite se disperser dans le manteau. 2) Précocement, les progéniteurs peuvent migrer tangentiellement au sein du neuroépithélium germinatif et puis subir une migration radiale pour gagner la région du manteau. 3) Après la sortie de la zone ventriculaire, une minorité de neurones migrent tangentiellement. V : ventricule, Adapté de Arnold-Aldea et Cepko 1996.

III. Mise en place des tractus de fibres

Certains tractus de fibres se mettent en place précocement au cours du développement du cerveau embryonnaire. Les axones possèdent à leur extrémité des cônes de croissance capables de s'orienter finement et précisément, en réponse à des pressions environnementales dues à l'expression de protéines de guidage axonal sécrétées dans des régions et à un instant précis. Les pressions d'attraction et de répulsion émises permettent aux fibres d'emprunter une trajectoire imposée. L'étude des projections de populations neuronales dans différents modèles de souris invalidées pour des gènes codant des facteurs de transcription, nous renseigne sur leur importance dans la mise en place des tractus de fibres. De plus, les trajectoires erronées de ces fibres sont associées aux expressions ectopiques ou à l'absence d'expression de diverses protéines de guidage axonal indispensables au tracé correct de ces fibres lors du développement du cerveau.

Les axones portent à leurs extrémités des récepteurs à des protéines de guidage axonal. Ces protéines appartiennent à quatre grandes familles, celles des Nétrines, des Slits, des Sémaphorines et des Ephrines. Suivant leur liaison à un type de récepteur donné, ces protéines, majoritairement sécrétées, vont permettre l'orientation correcte du cône de croissance situé à l'extrémité de l'axone, par action répulsive ou attractive due à la réorganisation du cytosquelette de l'axone.

1. Mécanisme d'action des protéines de guidage du cône de croissance

Cent ans après la description du cône de croissance par Ramon y Cajal, de nombreuses études témoignent de la réorganisation du cytosquelette (actine, microtubule) à l'origine de la mobilité et du guidage des axones (Barallobre et al. 2005). Ce guidage nécessite des signaux

d'adhésion au substrat, comme les CAM (cell adhesion molecules) ou des protéines associées pour former la matrice extracellulaire, comme la laminine et la fibronectine et des molécules de chimiotropisme, comme les protéines des familles Nétrine ou Slit, qui permettent aux axones d'emprunter la direction déterminée. La mobilité du cône de croissance est associée à l'extension et à la rétraction des filopodes. L'activité chimioattractive de la Nétrine1 par exemple, nécessite l'expression de protéines de signalisation de la famille des Rho GTPases (guanine triphosphatases), activées en sa présence et de son récepteur DCC (Deleted in Colorectal Cancer), favorisant la formation des filopodes. La liaison des protéines de guidage axonal à leurs récepteurs déclenche des cascades de signalisation aboutissant à la réorganisation du cytosquelette dans le cône de croissance (Lowery et Van Vactor 2009). Le niveau de seconds messagers comme le Ca^{2+} , l'AMPc ou le GMPc peut réguler la réponse du cône de croissance à un signal particulier. Pour Nétrine1, un taux élevé d'AMPc conduit à l'attraction des axones spinaux du xénope et un taux faible d'AMPc, à leur répulsion. Plus précisément, l'attraction ou la répulsion de ces axones dépend du ratio AMPc/GMPc (Nishiyama et al. 2003). Nétrine1 a été impliquée dans le transport des transcrits β -actine vers le cône de croissance (Leung et al. 2006). De plus, il semblerait que Nétrine1 soit nécessaire à la traduction de cette protéine dans ce même cône de croissance puisqu'un inhibiteur de la traduction empêche l'augmentation de β -actine en présence de Nétrine1. Ainsi, la présence de signaux attractifs entraîne la synthèse de protéines nécessaires à la croissance des axones. En revanche, en présence de signaux répulsifs, la traduction de protéines nécessaires au désassemblage du cytosquelette est stimulée. En présence de Slit2, la protéine ADF/cofilin-1 est synthétisée afin de dépolymériser les filaments d'actine (Lin et Holt 2008).

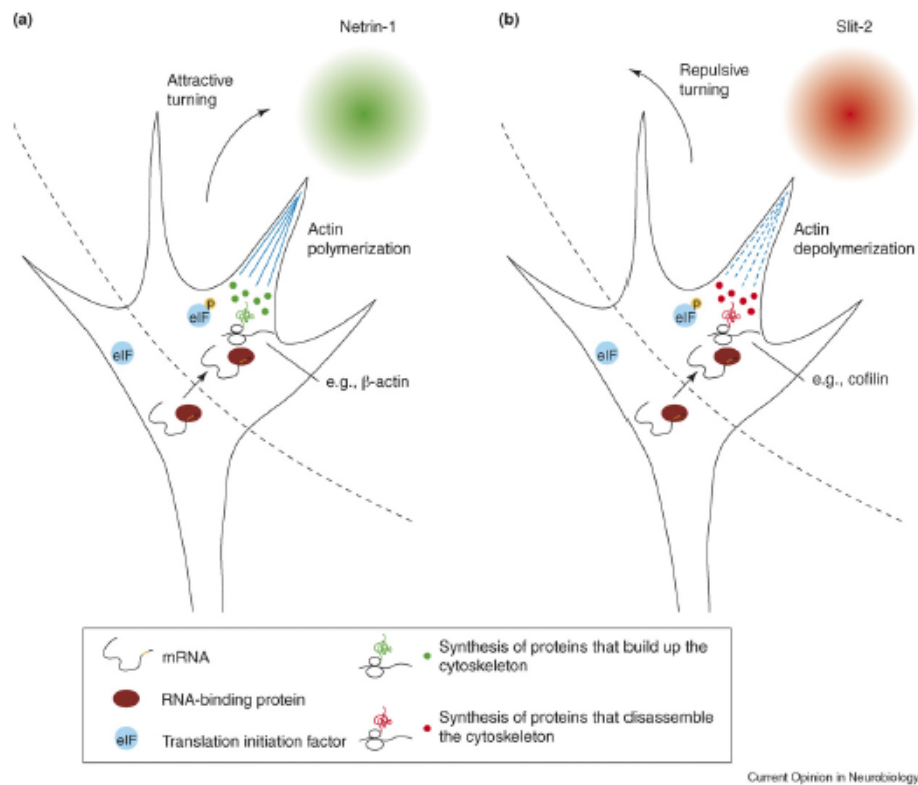


Figure 8 Schéma illustrant les réponses du cône de croissance aux signaux chimiques environnants, comme Nétrine1 ou Slit2 (Lin et Holt 2008).

En présence de protéines attractives, les filaments d'actine sont polymérisés, au contraire, ceux-ci sont dépolymérisés en présence de protéines répulsives, comme Slit2.

2. Mise en place du *tractus postopticus*

Chez les mammifères, la famille Slit comprend trois protéines Slit et trois récepteurs Robo (Roundabout) exclusivement impliqués dans la répulsion des axones (Brose et Tessier-Lavigne 2000). Ces protéines appartiennent à la famille des immunoglobulines. L'expression de ces protéines permet la mise en place du premier tractus longitudinal du cerveau : le *tractus postopticus* (*tpoc*) ou tractus de la commissure postoptique (*poc*). L'expression de différentes protéines de guidage axonal issues de familles distinctes est nécessaire à sa mise en place précoce.

L'étude de poissons zèbres mutants pour le gène *astray* (*Robo2*) signale que le *poc* est normal, suggérant que la présence du récepteur *Robo2* seul n'est pas nécessaire à la mise en place de ce tractus (Karlstrom et al. 1996). La signalisation *hedgehog* permet l'expression correcte de protéines de la famille *Slit*, contribuant ainsi, à la bonne trajectoire des axones du *poc* qui expriment les récepteurs *Robo1* à *3*. Les protéines *Slit2* et *3* sont exprimées de façon adjacente aux commissures permettant à ces dernières d'être fasciculées. L'expression de ces protéines est absente à l'endroit où les fibres croisent la ligne médiane (Barresi et al. 2005; Devine et Key 2008).

Le *tpoc* est formée à partir des cellules *Pax6* positives des régions chiasmatisques, son trajet est altéré chez des souris *Pax6*^{-/-}. La partie du tractus la plus éloignée de son origine présente le plus d'erreurs de trajectoire. Chez les souris sauvages, le *tpoc* franchit la limite entre le thalamus ventral et dorsal, traverse le mésencéphale et atteint la limite entre cette région et le rhombencéphale. En revanche, chez des souris *Pax6*^{-/-}, le nombre d'axones composant ce tractus est restreint, les projections sont moins longues, peu franchissent la limite entre le thalamus ventral et dorsal. Elles tournent dorsalement et longent cette limite. Les axones forment également des boucles le long de leur trajet. Toutes ces erreurs se situent dans des régions, qui, chez des souris sauvages, expriment *Pax6*. Ce facteur de transcription semble requit pour le guidage local des axones du *tpoc* (Mastick et al. 1997). Dans une seconde étude portant sur le trajet du *tpoc* chez des souris *Pax6*^{-/-}, les auteurs ont observé que les axones des neurones dopaminergiques du A13 projettent suivant le même trajet et en contact avec les axones du *tpoc* (Nural et Mastick 2004). Ainsi, les trajectoires des projections de ces deux populations de neurones présentent des erreurs chez des souris *Pax6*^{-/-}. Ces axones, au lieu de poursuivre leur trajet dans l'hypothalamus dorsal, tournent dorsalement et suivent la limite entre le thalamus dorsal et ventral. Ces erreurs de trajectoire semblent être dues à la perte de l'activation de la protéine d'adhésion R-Cadhérine par *Pax6*. En effet, la croissance du *tpoc*

est restaurée par l'ajout de R-Cadhérine dans des modèles d'embryons de souris Pax6^{-/-} en culture (Andrews et Mastick 2003).

3. Mise en place du faisceau médian du télencéphale

Les premières projections à composer le mfb sont celles des neurones à dopamine de la *pars compacta* de la SN et de la VTA qui projettent sur le striatum et le noyau accumbens, respectivement. Les fibres de ce faisceau sont longitudinales, passent dans l'hypothalamus puis bifurquent en direction des régions télencéphaliques. Le mfb représente une des voies ascendantes majeures du cerveau. Sa mise en place nécessite l'expression de diverses protéines de guidage axonal mais aussi de la protéine morphogène Shh.

La protéine Shh joue un rôle majeur dans la mosaïque d'expression des facteurs de transcription le long du tube nerveux mais elle joue aussi un rôle de chimioattractant pour les axones commissuraux de la moelle épinière (Charron et al. 2003; Bourikas et al. 2005; Domanitskaya et al. 2010). Récemment, la protéine Shh a été impliquée dans la chimioattraction des axones des neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral (Hammond et al. 2009). L'utilisation de souris Nestin-Cre; Smo flox/rec permet l'extinction du récepteur à Shh, Smoothed, dans les cellules exprimant Nestine. Dans ce modèle, seules les projections des neurones dopaminergiques mésencéphaliques médians sont touchées. Les axones de ces neurones médians sont attirés *in vitro* par des cellules surexprimant Shh.

L'étude des trajectoires de ce faisceau dans un modèle de souris Pax6^{-/-}, montre que les projections dopaminergiques sont détournées dorso-rostralement dans la zone de transition entre le prétectum et le thalamus dorsal. Ce détour est dû à l'expression ectopique de la protéine de guidage axonal Nétrine1 (Vitalis et al. 2000). Nétrine1 peut également entraîner la répulsion des axones dans le cas où le récepteur DCC recrute un co-récepteur UNC-5 (Barallobre et al. 2005). Des études *in vitro* ont par la suite montré un effet chimioattractif de

Nétrine1, via son récepteur DCC, sur les axones de neurones dopaminergiques en culture (Lin et al. 2005).

Slit2, quant à lui, inhibe la croissance de ces mêmes axones et exerce sur eux, un effet chimiorépulsif. Une étude récente a montré *in vivo* les effets de la protéine Slit2 et de ses récepteurs sur la mise en place des fibres dopaminergiques du mésencéphale ventral (Dugan et al. 2011). La protéine Slit2 est ainsi essentielle à la direction correcte des axones dopaminergiques dans le mfb, mais pas Slit1. Chez des embryons Slit1^{-/-} et Slit2^{-/-}, ces axones sont désorganisés, pénètrent dans le diencéphale ventral et errent dorsalement. Peu de projections longues jusqu'au groupe de neurones dopaminergiques A13 sont observées. En 2002, Marin et al, ont étudié ces fibres sur un modèle de souris Nkx2.1^{-/-}. Chez des embryons mutants, les neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral ont un développement normal mais les fibres dopaminergiques du mfb pénètrent anormalement dans l'hypothalamus, alors que chez des souris sauvages, ce faisceau atteint le télencéphale basal. L'entrée des fibres dopaminergiques dans l'hypothalamus est due à l'absence d'expression dans cette région, de la protéine chimiorépressive, Slit2 (Marin et al. 2002; Kawano et al. 2003).

D'autres études impliquent les protéines de guidage axonal des familles Sémaphorine et Ephrine dans la mise en place des fibres dopaminergiques du mésencéphale ventral. Diverses expériences ont impliqué ces deux familles dans le guidage des axones dopaminergiques formant le mfb. Elles entraînent l'attraction ou la répulsion des axones dopaminergiques du mésencéphale ventral. Dans certains modèles murins où l'expression de ces protéines est nulle, le mfb montre des atteintes sévères (Yue et al. 1999; Sieber et al. 2004; Hernandez-Montiel et al. 2008; Cooper et al. 2009; Deschamps et al. 2009; Kolk et al. 2009; Yamauchi et al. 2009; Torre et al. 2010).

IV. Hypothèses de travail et objectifs spécifiques

Les neurones à MCH sont localisés dans l'hypothalamus postérieur des mammifères et leur distribution ne respecte pas les divisions cytoarchitectoniques classiques (Brischoux et al. 2001; Brischoux et al. 2002). Ces neurones se répartissent chez le rat, en au moins deux sous-populations caractérisées par leur date de naissance, leur projection et leur phénotype chimique. Le rôle de ces deux sous-populations n'est pas connu et l'origine de leur différenciation nous échappe encore.

Le fait que la date de naissance des neurones apparaisse comme un critère d'appartenance à l'une ou l'autre des sous-populations indique clairement que l'étude fine de leur développement doit apporter les informations nécessaires à la compréhension des variations phénotypiques observées chez l'animal adulte. Des travaux préliminaires, qui seront rappelés dans la partie Résultats et qui avaient fait l'objet de la thèse de C. Amiot, ont confirmé ce sentiment sans fournir d'explications claires quant aux mécanismes impliqués. Les objectifs spécifiques des travaux que nous avons poursuivis et qui font l'objet de ce présent mémoire sont les suivants :

- Vérifier chez la souris, l'existence des deux sous-populations de neurones à MCH identifiés chez le rat puisqu'aucune donnée n'existe en ce sens chez la souris qui est un modèle de plus en plus utilisé,
- Etudier la prolifération le long du tube nerveux et la différenciation précoce du phénotype chimique des neurones à MCH et ce afin de comprendre l'environnement dans lequel les neurones de chacune des deux sous-populations se différencient,
- Comprendre comment les axones des neurones à MCH se mettent en place, pourquoi les premiers suivent le *tpoc* en direction des régions les plus postérieures du SNC et pourquoi les axones des neurones à MCH de type B, suivent le *mfb* vers les régions les

plus antérieures du SNC. Quelles sont certains des facteurs impliqués dans ces phénomènes, tels que l'expression spatio-temporelle des protéines de guidage axonal et de leurs récepteurs ?

S'agissant d'une population de neurones présents dans l'hypothalamus postérieur de tous les vertébrés, l'obtention de ces informations, notamment concernant la mise en évidence de processus fondamentaux de leur développement, doit apporter des informations utiles à la compréhension de l'évolution phylogénétique de ces régions et donc de leurs fonctions à travers les embranchements.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel d'étude

1. Animaux

Notre travail a été réalisé sur des rats de la souche « Long Evans » (Charles River, France), sur des souris de la souche Swiss CD1 sauvage (Janvier, France), sur des souris de la souche C57Bl/6 agouti hétérozygotes pour le gène *Shh*, fournies par C-c Hui, Toronto, Québec (St-Jacques et al. 1998) et sur des souris C57Bl/6 MCH-GFP fournies par le Dr. J.L. Nahon, Sophia Antipolis, France (Stanley et al. 2010). Les souris MCH-GFP ont été générées en utilisant la technologie BAC (bacterial artificial chromosome). Un fragment de 2,3 kb du gène de la MCH a été isolé et inséré dans un vecteur puis ce dernier a été intégré dans le MCH-BAC par recombinaison homologue dans des bactéries hôtes. Ce transgène a ensuite été injecté au pronoyau de souris C57Bl/6. Tous ces animaux ont été élevés dans des conditions standards d'éclairage : 12 heures de lumière/ 12 heures d'obscurité, avec boisson et nourriture à volonté.

1.1 Géotypage des souris

⇒ *Souris C57Bl/6 Shh*

Les enveloppes utérines de chaque embryon ont été récupérées puis l'ADN lysé dans 300 µL d'une solution de NaOH 100 mM pendant 10 minutes à 95°C. La réaction a alors été arrêtée par ajout de 100 µL de Tris-HCl 0,5M. Chaque tube a été mélangé à l'aide d'un vortex puis une PCR a été réalisée en utilisant les amorces suivantes : 5' gAAGAGATCAAaggCAAgCTCTggC 3' (« commune »); 5' ggACACCATTCTATgCAggg 3' (« mutant ») et 5' ATgCTggCTCgCCTggCTgTggAA 3' (« sauvage ») contenues dans le mix

de réaction suivant :

| |
|------------------------------------------------|
| 4 μ L de tampon 5X |
| 3 μ L de MgCl ₂ 25mM |
| 1 μ L de dNTP 10mM |
| 1U (0,2 μ L) de GOTaq polymérase (Promega) |
| 1 μ L d'amorce « commune » |
| 2 μ L d'amorce « mutant » |
| 3 μ L d'amorce « sauvage » |
| 2 μ L ADN lysé |
| 3,8 μ L eau PCR grade |

Le programme utilisé pour la PCR est le suivant (35 cycles) :

| |
|----------------------------------------------------------|
| Dénaturation initiale : 3 minutes à 94°C, |
| Dénaturation : 30 secondes à 94°C, |
| Hybridation : 45 secondes à 67°C, |
| Elongation : 1 minute à 72°C, |
| Elongation finale : 7 minutes à 72°C puis attente à 4°C. |

Afin de déterminer les profils génétiques de ces souris (Shh^{+/+}, ^{+/-} et ^{-/-}) les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose 1,5% puis une migration a été réalisée (**Figure 9**).

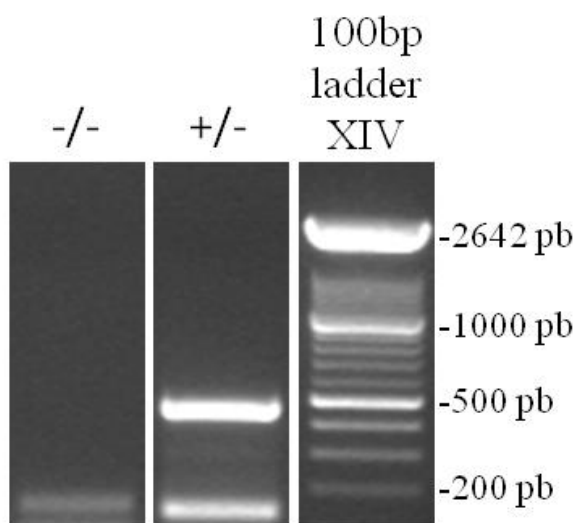


Figure 9 Photographie d'un gel d'agarose après migration des produits de PCR afin de génotyper les souris Shh^{+/+} et ^{-/-}.

De gauche à droite : dans le premier puits, la bande observée à 115 pb correspond à un profil génétique de souris Shh^{-/-} ; les bandes observées à 449 et 115 pb correspondent à une souris Shh^{+/-}. Des contrôles positifs (T+) pour des souris ^{+/-} et un contrôle négatif (T-) ont été réalisés.

Des coupes de cerveaux d'embryons $Shh^{-/-}$ et $Shh^{+/+}$ E13 ont été utilisées pour révéler le marquage immunohistochimique MCH et le signal pMCH par hybridation *in situ* (voir III et V). Les ARN totaux ont été extraits des têtes entières d'embryons $Shh^{-/-}$ et $Shh^{+/+}$ E13 afin de quantifier le taux relatif de pMCH par PCR en temps réel (voir VI.1.2.2).

1.2 Détermination des stades foetaux

Les études histologiques ont été effectuées sur des embryons de rats et de souris. Ces embryons ont été prélevés chez des femelles gestantes entre E10 et E19 pour les rats et entre E9 et E16 pour les souris. Les stades embryonnaires ont été déterminés par l'examen de frottis vaginaux pour les rates ou de bouchon pour les souris, réalisés le matin suivant la nuit au cours de laquelle les femelles ont été mises au contact du mâle. La présence de spermatozoïdes sur le frottis pour les rates ou d'un bouchon vaginal pour les souris permet de considérer les femelles comme gestantes, les embryons étant alors à leur premier jour de développement embryonnaire (E0). Lors de test négatif, les femelles ont été retirées puis mises en contact avec les mâles le soir suivant et les examens vaginaux ont à nouveau été effectués le lendemain.

2. Méthodes de fixation des cerveaux

2.1 Embryons

Les femelles gestantes rat et souris ont été anesthésiées par une injection intra-péritonéale (IP) d'hydrate de chloral* 7% à la dose létale de 1mg pour 200g de masse corporelle (* voir tampons et solutions). Après avoir été extraits des cornes utérines, les embryons entiers pour les stades précoces et seulement les têtes pour les stades plus tardifs ont été fixés par

immersion à 4°C pendant 24 heures dans une solution de paraformaldéhyde 1% ou 4% (PFA) dans du tampon phosphate 0,1M, pH 7,4* à 4°C pendant 24 heures.

2.2 Souris et rats adultes

Les cerveaux de souris et de rats adultes ont été fixés par perfusion intracardiaque. Les animaux ont été anesthésiés de la même manière que précédemment. La cage thoracique a été ensuite ouverte, le cœur dégagé et le ventricule gauche ainsi que l'oreillette droite ont été fendus. Une canule a alors été introduite par le ventricule jusqu'à l'aorte ascendante et le réseau vasculaire de l'animal a été rincé, à l'aide d'une pompe, par perfusion de 50 ou 150 ml d'une solution de NaCl 0,9%. Les tissus nerveux ont ensuite été fixés par 50 ou 150 ml d'une solution de PFA 1 ou 4%. Le cerveau est alors retiré de la boîte crânienne des animaux et post-fixé dans le même fixateur à 4°C pendant 24h.

3. Préparation du matériel histologique

3.1 Coupes au cryostat

Les embryons ainsi que les cerveaux d'adultes ont été placés pendant 24h au moins dans une solution cryoprotectrice de saccharose 15% dans du tampon phosphate 0,1M, pH 7,2* puis inclus dans un milieu d'enrobage (Tissue tek, Microm-Francheville) avant d'être congelés dans des vapeurs d'azote liquide ou dans la glace carbonique. Les cerveaux ont ensuite été débités au cryostat à -20°C en coupes sériées de 10, 12 ou 16µm d'épaisseur selon un plan de coupe proche de l'horizontal ou sagittal pour les embryons et frontal ou sagittal pour les cerveaux adultes. Les coupes ont été recueillies sur des lames gélatinées* et conservées à -45°C jusqu'à leur utilisation.

3.2 Coupes flottantes au slicer

Les cerveaux de souris ou de rats adultes fixés dans une solution de PFA 4% ont été congelés puis débités au slicer en, respectivement, deux ou quatre séries de coupes frontales de 30µm d'épaisseur. Les coupes ont été récupérées dans des boîtes alvéolées contenant une solution de PBS/glycérol/éthylène glycol (2v/1v/1v) permettant leur conservation à -20°C. Les coupes ont été lavées dans une solution de PBS* (phosphate buffer saline) avant leur utilisation.

3.3 Coupes à la paraffine

Après fixation, certains embryons de rat ont été déshydratés par des passages successifs d'une heure dans des bains d'éthanol (70%, 80%, 95% et 3 x 100%). Ce matériel a été plongé dans deux bains de butanol de la même durée, avant d'être inclus en paraffine (Paraplast, Sigma) selon des techniques usuelles de l'histologie. Ce matériel a ensuite été débité au microtome en coupes proches de l'horizontale de 5µm d'épaisseur, recueillies sur des lames gélatinées avec de l'eau gélatinée (Gélatine 0,5%), séchées à 56°C et conservées au sec à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

4. Coloration au bleu de toluidine 1%

Le bleu de toluidine* colore la chromatine, les nucléoles et les corps de Nissl. La coloration des coupes adjacentes aux coupes traitées en hybridation *in situ* (HIS) ou en immunohistochimie permet l'analyse de la chémoarchitecture du tissu et facilite ainsi la localisation des marquages.

Les coupes au cryostat ont été décongelées dans du PBS afin de dissoudre le milieu d'inclusion, puis rincées dans de l'eau distillée pour enlever les sels contenus dans le PBS et

enfin plongées entre 30 secondes et 2 minutes dans une solution de bleu de toluidine à 1%. Après rinçage dans de l'eau distillée, la coloration a été différenciée dans des bains d'éthanol 70% puis 95% contenant quelques gouttes d'acide acétique. La durée de ces deux bains est fixée par appréciation de visu de la différenciation : celle-ci est suffisante lorsque la myéline est décolorée et le fond des coupes est blanc. Les coupes sont alors déshydratées à température ambiante dans deux bains successifs d'éthanol absolu puis plongées dans trois bains de xylène avant d'être montées entre lame et lamelle de façon permanente dans une résine naturelle (baume du Canada).

5. Injection de 5-Bromo-2'-Désoxyuridine (BrdU)

Le BrdU est un analogue de la thymidine s'incorporant lors de la phase S du cycle cellulaire dans les trente minutes à deux heures suivant l'injection (Taupin, 2007). Les cellules dont les noyaux ont été marqués par immunohistochimie, sont considérées comme nées au moment de l'injection (Markakis & Swanson 1997).

Cette technique a été utilisée pour deux expériences : déterminer la date de genèse des neurones à MCH et Hcrt chez la souris et suivre les étapes précoces de prolifération et neurogenèse dans le diencéphale ventral du rat.

Afin de déterminer les dates de genèse des neurones à MCH, NK3 et Hcrt chez la souris, des animaux Swiss CD1 mâles adultes âgés de 45 à 60 jours, nés de femelles gestantes injectées par le 5'-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU) aux stades embryonnaires E9 à E14 ont été utilisés. Pour chaque stade, les comptages BrdU/MCH ont été effectués sur 6 à 9 séries prises sur 2 ou 3 cerveaux, BrdU/NK3 sur 2 à 5 séries sur 1 à 3 cerveaux et BrdU/Hcrt sur 5 à 11 séries sur 2 à 4 cerveaux.

Pour notre seconde série d'expériences, des rates gestantes aux stades E11 ou E12,5 correspondant aux deux pics de genèse des neurones à MCH ont reçu une injection IP unique d'une solution de BrdU préparée selon la méthode décrite par Markakis et Swanson en 1997 (150 mg de BrdU (Sigma) par Kg de poids corporel dissout dans une solution de NaOH 0,07 M chauffée 65°C) ou séquentielle, à savoir une injection (85mg/Kg) toutes les deux heures durant huit heures.

6. Injection de cyclopamine

La cyclopamine, inhibiteur de la voie de signalisation Shh via son récepteur Smoothed a été injectée à des souris gestantes à E11, à raison de 6mg/Kg. Les mères ont été sacrifiées deux jours plus tard et les embryons E13, prélevés. Les ARN totaux ont été extraits puis inversement transcrits (voir IV.1.1 et IV.1.2) L'ARNm pMCH a été quantifié par PCR en temps réel (voir VI.1.2.2) sur 4 têtes d'embryons E13 après injection de cyclopamine et de DMSO pour le contrôle.

II. Traçage des voies nerveuses

Le True Blue est un traceur rétrograde intra-axonal fluorescent, capté par les terminaisons axonales des neurones. Sa détection directe grâce à un microscope à épifluorescence permet de repérer les corps cellulaires des neurones projetant sur les régions où l'injection a été réalisée.

Trois souris adultes mâles (40 g) ont subi une injection du traceur rétrograde. Ces animaux ont été anesthésiés avec une injection intramusculaire d'une solution contenant un mélange de xylazine* et de kétamine* (1 mg/100 g de masse corporelle et 10 mg/100 g, respectivement). Environ 300 nL d'une solution de True Blue* 4% (Sigma) dans de l'eau distillée ont été

injectés à l'aide d'une microseringue Exmire (MS-N05, ITO corporation, Italie) dans le cortex cérébral médian pendant une période de 15 minutes. Quatre jours après l'injection du traceur, les animaux ont reçu une injection IP d'hydrate de chloral 7% et ont été perfusés comme décrit ci-dessus.

III. Techniques immunohistochimiques

Les coupes sorties du congélateur ont été immergées dans deux bains de 10 minutes de tampon PBS contenant 0,3% de Triton X-100 (PBS-Triton*).

Les coupes à la paraffine doivent être préalablement déparaffinées puis réhydratées. Les lames ont été plongées dans des bains successifs de 10 à 15 minutes chacun, de la façon suivante : 3 bains de xylène (solvant dans lequel la paraffine est solubilisée), 2 bains d'éthanol absolu, 1 bain d'éthanol 95% et un bain d'éthanol 70%. Les coupes ont ensuite été rincées dans plusieurs bains d'eau distillée puis perméabilisées deux fois 10 minutes dans du PBS-Triton*.

Un démasquage des sites antigéniques permet d'obtenir un meilleur marquage immunohistochimique, notamment pour l'anticorps anti-MCH. Une incubation 20 minutes à 80°C des coupes dans une solution commerciale (DAKO TRS) permet le démasquage des sites antigéniques.

1. Anticorps primaires utilisés

Les anticorps primaires utilisés pour nos études ainsi que leurs principales caractéristiques sont listés dans le Tableau 1.

La majorité des anticorps utilisés, qu'ils soient monoclonaux ou polyclonaux sont des anticorps commerciaux. Certains sont des immunosérums (IS) comme l'anticorps anti-MCH, qui ont été préparés au laboratoire par immunisation de lapins avec des peptides synthétiques. La spécificité de l'IS anti-MCH a été vérifiée par des tests d'inhibition en phase liquide, d'immunoaffinité et d'immunoblotting (Fellmann et al. 1987; Risold et al. 1992) ainsi que par double marquage immunohistochimie/hybridation *in situ* montrant que cet anticorps marque tous les neurones exprimant l'ARNm pMCH (Fellmann et al. 1989; Bugnon et al. 1991).

2. Méthode d'immunofluorescence indirecte

Les coupes ont été incubées toute la nuit en chambre humide à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les anticorps polyclonaux ont été préparés à une concentration appropriée (Tableau 1) dans une solution « diluant anticorps* » composé de PBS-Triton contenant 10% de lactoprotéines (Régilait), 1% de serum albumine bovine (BSA) et 0,01% d'azoture de sodium. Les anticorps monoclonaux anti-DCC, -CART, -parvalbumine, -Lim1/2, -Nkx2.2, -BrdU ont été dilués dans une solution composée uniquement de PBS-Triton (Tableau 1).

Le lendemain, après avoir été rincées deux fois dans du PBS-Triton, les coupes ont été incubées 1 heure à température ambiante avec un anticorps anti-immunoglobuline (IgG) de souris, de lapin ou de chèvre comme l'anticorps secondaire d'âne anti-IgG de souris conjugués à l'Alexa Fluor-555 (1:800, Invitrogen), de chèvre anti-IgG de lapin conjugués à l'Alexa Fluor-488 (1:800 or 1:1000, Invitrogen), d'âne anti-lapin conjugués à la Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA) ou de chèvre anti-souris conjugués au FITC (1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA). Ces anticorps secondaires

ont été dilués dans du PBS-Triton pour les anticorps anti IgG de souris et dans du « diluant anticorps » pour les autres.

Afin de repérer les structures anatomiques, un marquage des noyaux par le diamino-4',6-phénylindol-2dichlorhydrate (DAPI) a parfois été réalisé. Les coupes ont été incubées 10 minutes dans une solution de DAPI 3 µg/mL dans du PBS puis rincées dans du PBS.

Après trois rinçages dans du PBS-Triton, les coupes ont été montées entre lame et lamelle dans un milieu PBS-Triton/Glycérol (v/v). Les coupes ont été conservées à 4°C et peuvent être observées au microscope à fluorescence (VIII Observations, acquisition et traitement des images).

| Anticorps | Type | Antigènes | Origine | Dilution |
|-------------------------------|-------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| sMCH | polyclonal | MCH saumon | Laboratoire Histologie | 1/200-1/1000 |
| rMCH | polyclonal | MCH rat | Laboratoire d'Histologie | 1/200 |
| Orx A (chèvre) | polyclonal | Orx A humain | Santa Cruz Biotechnology, Inc | 1/1000 |
| CART (souris) | monoclonal | CART rat | Dr Clausen (Danemark) ^a | 1/1000 |
| CART (lapin) | polyclonal | CART (61-102) | Phoenix Pharmaceuticals, USA | 1/3000 |
| NK3 (lapin) | polyclonal | C-terminal rat | Dr Ciofi (Bordeaux) ^b | 1/700-1/2000 |
| NEI (lapin) | polyclonal | NEI rat | Laboratoire d'histologie | 1/200-1/2000 |
| β3-tubuline (TuJ1, souris) | monoclonal | B-tubuline de classe III, neurone spécifique | Covance, Inc | 1/5000 |
| Parvalbumine (souris) | monoclonal | Protéine humaine | Swant, Suisse | 1/5000 |
| DCC (AF-5, souris) | monoclonal | Domaine extracellulaire de la protéine DCC humaine | Calbiochem | 0,5µg/ml |
| TTF-1 (Nkx2.1, lapin) | polyclonal | C-Ter humaine | Santa Cruz Biotechnology, Inc | 1/200 |
| Nkx2.2 (souris) | monoclonal | Protéine de poulet | Hybridoma Bank | 1/10 |
| Pax6 (lapin) | polyclonal | C-Ter souris/purifié | Covance, Inc | 1/300 |

| | | | | |
|-----------------|------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Lim1/2 (souris) | monoclonal | Lim1/2 de rat | Hybridoma Bank | 1/20 |
| TH (lapin) | polyclonal | TH pure isolée de phéochromocytome de rat | Institut Jacques Boy | 1/1000 |
| BrdU (souris) | monoclonal | uridine | Becton Dickinson | 1/100 |
| Robo2 (lapin) | polyclonal | - | Dr Murakami (Andrews et al. 2006) | 0,5µg/ml |
| GFP (lapin) | polyclonal | GFP hautement purifiée de <i>Acquorrea victoria</i> | Millipore | 1/500 ou 1/3000 |

Tableau 1 Tableau des anticorps primaires utilisés dans cette étude.

^aDr J.T. Clausen, Department of Assay and Cell Technology, Novo Nordisk, Danemark.

^bDr P. Ciofi, INSERM U378, Institut François Magendie, Bordeaux, France.

Pour le traitement des coupes flottantes, le protocole précédent a été modifié. L'incubation des coupes flottantes avec l'anticorps primaire a été réalisée pendant 48h sous agitation. Elles ont ensuite été rincées plusieurs fois, puis incubées avec l'anticorps secondaire toute la nuit. Après lavage, les coupes ont été montées sur lames puis séchées à 37°C.

3. Méthode aux complexes peroxydases anti-peroxydase

Cette technique immunoenzymatique diffère de la précédente principalement dans le mode de révélation qui utilise les propriétés enzymatiques de la peroxydase incluse dans un complexe peroxydase anti-peroxydase (PAP).

Cette méthode comporte plusieurs étapes, la première étant identique à celle de la technique d'immunofluorescence indirecte. Une inhibition des peroxydases endogènes est cependant préalablement nécessaire et consiste en une incubation dans une solution d'H₂O₂ pendant 5 minutes. Après incubation avec l'anticorps primaire, les coupes ont été exposées 1 heure avec un anticorps anti-IgG spécifique non conjugué dilué entre 1/200 et 1/400 dans du PBS-Triton ou du « diluant anticorps ». Après plusieurs rinçages dans du PBS ne contenant pas de Triton X-100, les coupes ont été incubées 1 heure avec le complexe PAP (DAKO) dilué au 1/400 dans du « diluant anticorps » préparé sans Triton X-100. Cette incubation a été suivie de trois rinçages des coupes dans du PBS.

Pour finir, la révélation de la peroxydase fixée est obtenue par précipitation d'un dérivé oxydé de la diaminobenzidine (DAB) de couleur brune. Pour cela, les coupes ont été incubées de 3 à 10 minutes dans une solution de PBS contenant 0,04% de DAB et 0,02% d'H₂O₂, substrat de la peroxydase. La qualité de la réaction enzymatique par la DAB a été surveillée au microscope optique. Après estimation d'un marquage correcte, les coupes ont été rincées dans du PBS. Le marquage ainsi obtenu a pu alors être contrasté dans une solution de tétraoxyde

d'osmium (OsO_4) à 0,02% dans de l'eau distillée. Après plusieurs rinçages dans de l'eau distillée, les coupes ont été déshydratées dans des bains croissants d'éthanol (70%, 95%, 100%) de trois minutes chacun, puis plongées trois fois 3 minutes dans des bains de xylène et enfin montées entre lame et lamelle au baume du Canada.

4. Détection du BrdU

Le BrdU est nucléaire ce qui rend plus difficile son accès par les anticorps primaires spécifiques. Une étape de démasquage des sites antigéniques est donc nécessaire et indispensable à la visualisation du BrdU incorporé à l'ADN.

Les coupes de cerveaux embryonnaires ont subi une hydrolyse acide par une incubation dans deux bains successifs de 30 minutes chacun d'HCl 1M à température ambiante, alors que l'hydrolyse des coupes de cerveaux adultes nécessite deux bains de 20 minutes à la même température dans une solution d'HCl 2M. Les coupes ont ensuite été rincées rapidement dans du PBS puis pendant 10 minutes et perméabilisées dans du PBS-Triton pendant 30 minutes, avant d'être incubées avec l'anticorps anti-BrdU (1/100) et révélées en immunofluorescence indirecte avec un anticorps secondaire ou d'âne anti-IgG de souris conjugués à l'Alexa Fluor-555 (1/800).

Dans le cas de doubles marquages Hcrt/BrdU et MCH/BrdU, dans un premier temps, le marquage Hcrt a été réalisé par une technique classique d'immunofluorescence indirecte et le marquage MCH par une technique d'hybridation *in situ* (voir V, p101) puis ont suivi l'hydrolyse acide ainsi que la révélation du BrdU.

5. Méthodes de double marquage

La combinaison de deux techniques d'immunohistochimie permet de mettre en évidence des co-localisations de marquages différents au sein d'une même cellule ou de superposer des marquages différents dans une même région pour mettre en évidence deux populations de neurones par exemple.

5.1 Double immunofluorescence indirecte

Cette technique est utilisée dans le cas où des co-localisations ou des mosaïques d'expression de deux protéines différentes veulent être étudiées. Les deux antigènes d'intérêt ont été détectés successivement grâce à des anticorps primaires préparés chez des espèces animales différentes et qui ont été révélés par des anticorps secondaires conjugués à un fluorochrome différent.

5.2 Immunoenzymatique/Immunofluorescence

Cette technique a été utilisée pour détecter TH et MCH sur une même coupe de cerveau embryonnaire. Les anticorps discriminant ces deux protéines ont été générés chez la même espèce, le lapin. Le marquage MCH a tout d'abord été révélé par la technique PAP/DAB (III 3 Méthode aux complexes peroxydases anti-peroxydase) puis le marquage TH a été révélé par immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin conjugués à l'Alexa Fluor-488.

6. Méthodes de triple marquage

Cette technique a été utilisée pour la détection simultanée des marquages NK3, MCH et CART. Pour cela, le marquage *in situ* pMCH a été tout d'abord réalisé puis le récepteur NK3 et le peptide CART révélés par la technique par immunofluorescence indirecte suivant la même procédure décrite précédemment.

IV. Obtention des ribosomes

1. Obtention de la ribosome DCC

1.1 Extraction des ARN totaux

Des rats mâles adultes ont été sacrifiés par décapitation. Les cerveaux ont été disséqués puis 100 mg de tissu ont été broyés pour 1 ml de Trizol (Invitrogen). Le broyat a été incubé 5 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé pendant 10 minutes à 12000g à 4°C. Le surnageant a été prélevé et 0,2 ml de chloroforme pour 1 ml de Trizol ont été ajoutés. L'échantillon a vigoureusement été agité à la main pendant 10 secondes et incubé pendant 2 à 3 minutes à température ambiante et centrifugé 10 minutes à 12000g à 4°C. La phase aqueuse, d'environ 400 à 600 µL (pour 1mL de Trizol) a été prélevée, à laquelle a été ajouté un volume équivalent d'isopropanol. L'échantillon a été mélangé au vortex pendant 10 secondes à température ambiante et centrifugé 10 minutes à 12000g à 4°C. Le surnageant a alors été éliminé. Le culot a été rincé dans de l'éthanol 70% puis séché et repris dans un volume adapté d'eau ultra pure stérile. Les ARN totaux ont alors été dosés par mesure de l'absorbance à 260 nm puis leur intégrité a été vérifiée par électrophorèse capillaire sur Bioanalyzer Agilent 2100 (Figure 10).

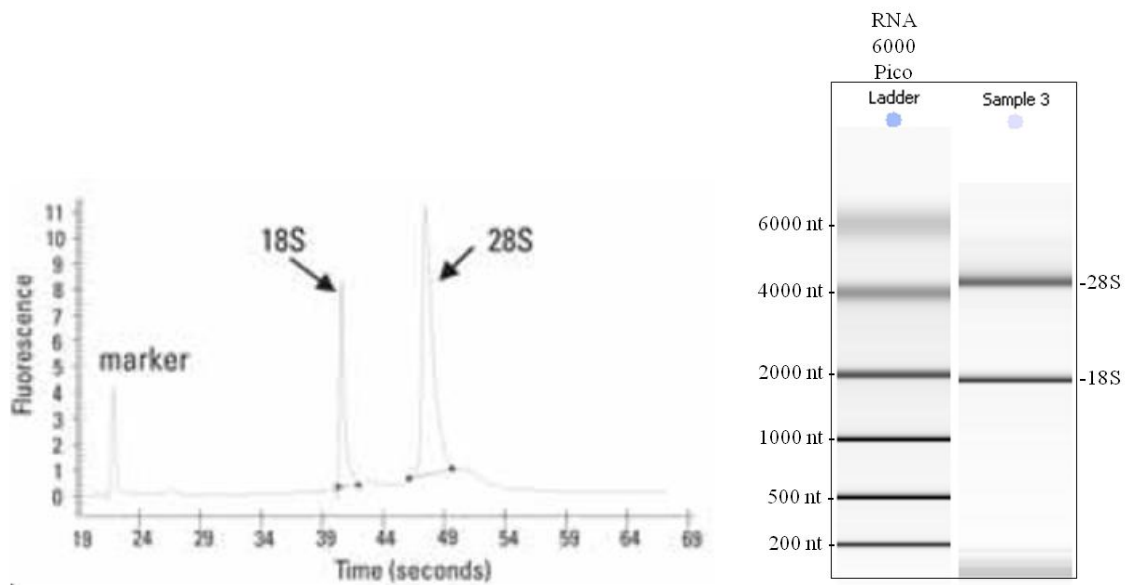


Figure 10 Graphique et gel témoin de l'intégrité des ARN totaux extraits grâce à la qualité des ARN ribosomiaux 18S et 28S.

Electrophorogramme et images de deux pistes du gel de migration témoin de la haute qualité des ARN totaux par la présence de deux bandes distinctes des sous-unités 18S et 28S. Le RNA Integrity Number (RIN) a une valeur de 10 pour l'échantillon 3 ; 10 étant le nombre reflétant une qualité maximale des ARN totaux.

1.2 Transcription inverse des ARN de rat (RT)

L'extraction des ARN totaux au Trizol est suivie d'une transcription inverse en ADNc permettant la réalisation d'une PCR. Les ARN (1µg) ont été dénaturés 10 minutes à 72°C. La transcription inverse a été réalisée dans le milieu réactionnel suivant :

- 1µg ARN dénaturé
- 4µL de tampon de réaction 5X (Promega)
- 1µL d'hexamères aléatoires (100µM)
- 1µL d'un mélange des 4 dNTP (25mM chacun)
- 1µL (40U) d'inhibiteur de ribonucléase (RNasin, Promega)
- 0,2µL (40U) de « Moloney Murine Leukemia Virus RNase H⁻ » (Promega)
- H₂O ultra pure qsp 20µL

La transcription inverse a été réalisée pendant une heure à 42°C, après que les hexamères aléatoires se soient hybridés aux ARN pendant 10 minutes à 23°C. Cette réaction a été stoppée par une étape de 5 minutes à 95°C entraînant l'inactivation de l'enzyme MMLV et la déshybridation des hétéroduplex ADNc/ARN.

1.3 Amplification enzymatique (PCR ou « Polymerase Chain Reaction »)

A l'aide d'amorces choisies (oligonucléotides de synthèse, Eurogentec), nous avons pu amplifier un fragment d'ADNc de 1053 pb correspondant aux nucléotides 2919-3971 (NM 012841) de l'ARNm de DCC de rat. Les amorces sont les suivantes :

- DCC sens : 5' AgCTgggCAgACAACCTCTgT 3'
- DCC antisens : 5' TgCCTCCTCggTATCTTgAC 3'

Les réactions de PCR ont été réalisées dans le milieu réactionnel suivant :

- 1 μ L de matrice (solution de RT obtenue ci-dessus)
- 2 μ L de tampon de réaction 10X (Roche)
- 3 μ L de MgCl₂ 50mM
- 1 μ L d'un mélange des 4 dNTP (2,5mM chacun)
- 1 μ L de mix d'amorce 50 μ M chacune
- 0,2 μ L d'ADN polymérase (2U/ μ l, DyNAzyme™ II, Ozyme)
- 11,8 μ L eau PCR grade.

L'amplification a été réalisée sur 35 cycles. Chaque cycle du programme d'amplification est constitué d'une phase de dénaturation (95°C, 30s), suivie des phases d'hybridation des amorces (60°C, 30s) et d'élongation (72°C, 1 minute). A l'issue des 35 cycles, les milieux réactionnels ont encore été laissés 7 minutes à 72°C pour une élongation finale.

Après vérification du résultat de l'amplification par migration sur gel d'agarose à 2% contenant du BET, nous avons choisi de purifier l'ADNc DCC en suivant le protocole du kit Qiagen Gel Extraction Kit. La concentration des produits purifiés est quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre Eppendorf.

1.4 Clonage des produits de PCR (ADNc DCC)

Le fragment purifié d'ADNc DCC de 1053pb obtenu a été inséré dans le plasmide pGemT easy (Promega), au niveau du site de multiclonaage.

Ce vecteur est flanqué des promoteurs des ARN polymérase T7 et SP6 de chaque côté du site de multiclonaage, permettant ainsi la synthèse d'ARN *in vitro*. Ce site se trouve dans la partie terminale du gène LacZ, codant la β -galactosidase. La présence d'un gène de résistance à l'ampicilline permet de sélectionner les colonies transformées par le plasmide. La présence de l'insert inhibe l'expression de ce gène et permet de différencier par une réaction colorée, les

colonies recombinantes (blanches) des colonies non recombinantes (bleues). Le séquençage de l'insert est facilité par la présence, dans le vecteur, d'amorces universelles.

Suivant les instructions du fournisseur du kit de clonage, nous avons effectué la réaction de ligature en respectant un rapport molaire insert/vecteur de 1,5/1 correspondant à 27ng d'ADNc DCC pour 50ng de plasmide, dans le milieu réactionnel suivant :

- 1 μ L du vecteur de clonage (50ng)
- 5 μ L de tampon de réaction 2X
- 3 μ L d'ADNc DCC issus de la PCR préparative
- 1 μ L de T4 DNA ligase

Le mélange a alors été incubé 1 heure à 23°C et placé à 4°C.

La transformation des bactéries compétentes DH5 (Invitrogen, Laboratoire de Bactériologie, EA 3186, Besançon) a été réalisée par choc thermique selon un protocole classique. Dans un tube stérile de 15 mL, préalablement refroidi à 4°C, 100 ng de plasmide recombinant ont été ajoutés à 100 μ L de bactéries compétentes. Ce mélange a été incubé 30 minutes dans la glace, la transformation se fait par choc thermique à 42°C pendant 55 secondes puis dans la glace pendant 2 minutes. Neuf cents microlitres de milieu de culture liquide MH (Biorad, Laboratoire de Bactériologie, Besançon) y ont été ajoutés. Les bactéries ont été incubées 1h30 à 37°C sous agitation, puis 100 μ L ont été étalés sur des boîtes de Pétri contenant une gélose MH AXI (Biorad, Laboratoire de Bactériologie), c'est-à-dire un milieu gélosé complétement par de l'ampicilline (100 μ g/mL), du 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside (X-gal, 40 μ g/mL) et de l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, 40 μ g/mL).

1.5 Sélection des bactéries recombinantes

Après une nuit d'incubation à 37°C, les colonies de bactéries recombinantes, dont le plasmide contient l'insert, ont été repérées par leur couleur blanche. Quelques unes de ces colonies ont été prélevées puis repiquées chacune sur un quart de boîte de Pétri contenant la gélose MH+ampi 100 et enfin mises en culture 24h à 37°C.

Le troisième jour, une partie de chacun des clones a été stockée séparément dans un milieu « cœur-cervelle » glycérolé (Becton Dickinson) à -80°C. Dans 10 mL de milieu de culture MH liquide contenant de l'ampicilline (100 µg/mL), chacun des clones a été ensemencé puis mis en culture une nuit à 37°C sous agitation.

1.6 Extraction de l'ADN plasmidique par « Miniprep »

Le lendemain, l'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée à partir de 5 mL du précédent liquide de culture bactérienne, à l'aide d'une trousse commerciale (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Le culot bactérien obtenu après centrifugation (5000g, 5 minutes) a été remis en suspension dans 250 µL de tampon P1 contenant de la ribonucléase A (RNase A). La lyse des bactéries a été réalisée en conditions alcalines (NaOH/SDS) à l'aide du même volume de tampon 2 (« lysis buffer »). Les tubes ont été agités par inversion puis placés sur de la glace. Le SDS (sodium dodecyl sulfate) solubilise les composants phospholipidiques et protéiques de la membrane cellulaire, ce qui conduit à la lyse des cellules et au relargage du contenu cellulaire, tandis que les conditions alcalines dénaturent les ADN plasmidiques et chromosomaux ainsi que les protéines. La neutralisation de la réaction a été réalisée par ajout de 350 µL de tampon N3 (« neutralization buffer »), les tubes ont de nouveau été agités par inversion. La forte concentration en sel de cette solution permet la précipitation de l'ADN chromosomal, des protéines dénaturées, des débris cellulaires et du

SDS, tandis que l'ADN plasmidique reste en solution. Après centrifugation (17000g, 10 minutes à 4°C), le surnageant a donc été récupéré puis appliqué sur une minicolonne fournie dans le kit. Celle-ci est centrifugée (17000g, 1 minute à 4°C), l'ADN plasmidique étant retenu par une membrane. Après lavage par 750 µL de tampon PE, l'ADN plasmidique a été élué avec 60 µL d'eau distillée, quantifié à 260 nm et stocké à -40°C.

1.7 Linéarisation du plasmide

Le plasmide a été linéarisé par l'enzyme de restriction Nco1 (Roche), selon les données du fournisseur, de sorte que la transcription se termine juste après l'insert. La réaction de digestion enzymatique a été réalisée à 37°C pendant 2 heures dans le mélange réactionnel suivant :

- 10 µg d'ADN plasmidique
- 20 µL de tampon H 10X
- 1 µL (10 U) de Nco1
- Eau PCR grade qsp 200 µL

Dix réactions de 20 µL ont ainsi été obtenues. Le résultat de la digestion enzymatique a été vérifié par migration en gel d'agarose 1%.

L'ADN plasmidique linéarisé a ensuite été purifié par une extraction phénol/chloroforme/isoamylalcool classique (49,5/49,5/1) et précipité dans l'éthanol absolu (2,5 volumes) 30 minutes à -40°C puis centrifugé 20 minutes à 18000g, rincé à l'éthanol 70%, centrifugé 3 minutes à 18000g puis le surnageant a été éliminé. Le plasmide linéarisé ainsi purifié a été repris dans de l'eau ultra pure et dosé à 260 nm.

1.8 Transcription *in vitro*

L'insert d'intérêt est situé dans le site de polyclonage du vecteur. La synthèse de la ribosonde marquée à la digoxigénine est réalisée par transcription *in vitro* à l'aide du kit de transcription (Roche).

La réaction se fait pendant 2 heures à 37°C dans le mélange réactionnel suivant :

- 1 µg d'ADN plasmidique linéarisé
- 2 µL d'ARN polymérase SP6 (20 U/µL)
- 2 µL de tampon de transcription 10X
- 2 µL de NTP (10 mM contenant 3,5 mM de DIG-11-UTP)
- 1 µL d'inhibiteur de RNase (20 U/µL)
- H₂O PCR grade qsp 20 µL

L'ADN plasmidique a ensuite été digéré 20 minutes à 37°C en présence de 40 U de DNase I.

La réaction a alors été arrêtée par l'ajout de 2 µL d'EDTA 0,2M, pH8.

1.9 Purification du produit de transcription

La purification du produit de transcription a été réalisée grâce au Kit RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen) selon les instructions des fournisseurs. La qualité de la transcription et l'intégrité de la ribosonde ont été vérifiées par migration sur gel d'agarose 1,5% d'1 µL de sonde après dénaturation à 80°C pendant 5 minutes.

1.10 Obtention des autres ribosondes

Les ribosondes Nértrine1, Slit2, Robo2, Lhx6, Lhx7, Lhx9, Shh, MCH ont été obtenues selon le même procédé mais à partir de vecteurs, d'enzyme de restriction et d'ARN polymérases différentes. Tous les plasmides permettant l'obtention de ces ribosondes, sauf MCH (synthétisée au laboratoire), nous ont été fournis sous forme déshydratée sur papier

Whatmann respectivement, par les Dr H. Takahashi (Funato et al. 2000), Dr A. Chédotal (Marillat et al. 2002), Dr J.P. Burbach (Asbreuk et al. 2002), Dr S. Rétaux (Retaux et al. 1999), Dr C.C. Hui (Nieuwenhuis et al. 2007) et Dr M. Wassef (Fernandez et al. 1998). Une étape de réhydratation grâce à 40 μ L d'eau ultra pure pendant une nuit a donc été nécessaire. Le lendemain, après centrifugation, le surnageant a été récupéré, dosé à 260 nm puis stocké à -20°C . Pour la synthèse de toutes ces sondes, les étapes à partir de la transformation des bactéries, sont identiques à celles décrites précédemment pour la ribosonde DCC.

V. Hybridation *in situ*

1. Préparation des coupes de cerveaux de rat

Les coupes au cryostat ont été sorties du congélateur et laissées à température ambiante 1 heure avant d'être post-fixées 10 minutes dans du PFA 4% en PBS pH 7,4, préparé extemporanément.

2. Pré-hybridation et hybridation

Seules les coupes de cerveaux adultes ont été déprotéinisées par incubation 15 minutes à 37°C dans une solution de protéinase K* (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) puis ont été postfixées 5 minutes dans de la PFA 4%. Ces coupes ont ensuite été incubées à température ambiante dans une solution de triéthanolamine (TEA) 0,1M pH 8. L'étape suivante a consisté en une acétylation de 10 minutes à température ambiante, pour bloquer les charges positives sur le tissu, induites par la digestion de la protéinase K, réduisant de ce fait l'hybridation non spécifique de la sonde. Les coupes ont été plongées dans une solution contenant du TEA 0,1M et de l'acide acétique anhydride. Les coupes de cerveaux adultes et embryonnaires ont ensuite été rincées

rapidement dans du PBS à température ambiante puis 15 minutes dans du tampon SSC 5X*. Ensuite, 150 µL de tampon d'hybridation* préchauffés à 56°C ont été déposés par lame. Celles-ci ont ensuite été recouvertes de parafilm et placées en milieu humide à 56°C, sans agitation, pendant 2 heures.

Cinquante microlitres de tampon d'hybridation contenant 50 ou 100 ng de sonde marquée par la DIG, préalablement dénaturée 5 minutes à 80°C, ont été déposés. Afin d'éviter l'évaporation de la sonde, une lamelle a été scellée à chaque lame avec de la colle « rubbercement » (Royal Talens). Les coupes ont ensuite été placées une nuit en chambre humide, à 56°C pour Lhx9, MCH, Robo2, 60°C pour Shh, DCC, Nétrine1, 70°C pour Slit2, Lhx6 et 7.

3. Post-hybridation et révélation enzymatique

Après une nuit d'hybridation, le rubbercement et les lamelles ont été enlevés. Les coupes ont ensuite été soumises à une série de lavages de stringence croissante destinés à éliminer les hybrides non spécifiques : 30 minutes dans du SSC 2X à température ambiante, une heure dans du SSC 2X à 56°C et une heure dans du SSC 0,1X à 56°C. Les coupes ont été rincées dans du tampon 1* puis incubées 2 heures à température ambiante en présence d'un anticorps anti-DIG conjugué à la phosphatase alcaline (Roche), diluée au 1/1300ème dans du tampon 1 additionné de 0,5% de réactif de blocage des sites aspécifiques (Blocking Reagent, 1096176, Roche). Les coupes ont ensuite subi une série de lavages dans du tampon 1* puis dans du tampon 3 pH 9,5*.

La révélation du marquage a été réalisée à température ambiante en incubant les coupes à l'abri de la lumière pendant une nuit avec 200 µL d'une solution de substrat de la phosphatase alcaline contenant du nitro-blue tetrazolium chloride (NBT 4,5 µL/mL de tampon 3 pH 9*), du 5-bromo-4-chloro-3- indolylphosphate p-toluidine salt (BCIP 3,5 µL/mL de tampon 3 pH

9), 5% de polyvinyl alcool (PVA) et 5mM de MgCl₂. Le PVA et le MgCl₂ ont seulement été utilisés pour les coupes d'embryons. Le marquage sur les coupes de cerveaux adultes a été révélé par un mélange NBT/BCIP dans du tampon 3. La réaction enzymatique a été arrêtée par un bain de 15 minutes dans du tampon TE*. Les coupes ont ensuite été rincées dans du PBS, puis montées entre lame et lamelle dans un mélange constitué de PBS/glycérol (v/v).

4. Couplage hybridation *in situ*/immunohistochimie

Cette technique a été utilisée pour révéler les marquages DCC ou Robo2 (HIS)/MCH (immunohistochimie) mais aussi pour les marquages MCH/BrdU ou MCH/NK3/CART. Elle comporte les mêmes étapes que l'hybridation décrite précédemment. Après révélation du marquage HIS, les coupes ont été post-fixées 10 minutes dans du PFA 4% et ont ensuite été incubées une nuit avec un anticorps primaire et ont subi une hydrolyse acide pour le marquage BrdU (voir III.4 Détection du BrdU). La suite de cette technique est la même que celle décrite pour l'immunohistochimie indirecte.

5. Hybridation sur embryons entiers (whole mount)

Le marquage des ARNm sur des embryons entiers permet d'avoir un aperçu général de sa localisation. Cette technique a été utilisée pour révéler les marquages Shh et Nétrine1 sur des embryons entiers de souris au stade E9.

Cette technique nécessite un traitement préalable des tissus. Les embryons et les cerveaux ont été fixés dans du PFA 4% dans du PBS à 4°C pendant une nuit puis rincés dans du PBT* pendant 5 minutes. Les embryons et les cerveaux ont ensuite été déshydratés dans des bains croissants de 30 minutes chacun, de méthanol/PBT (25%, 50%, 75%, 100% méthanol) puis stockés à -20°C dans du méthanol pur.

5.1 Pré-hybridation et hybridation

Les tissus ont été réhydratés dans des bains décroissants de 30 minutes, de méthanol/PBT puis rincés deux fois 5 minutes dans du PBT. Les tissus ont ensuite été blanchis pendant 1h30 dans une solution de H₂O₂ 6% dans du PBT sous agitation modérée et rincés dans du PBT. Afin de rendre plus accessible les ARNm, un traitement à la protéinase K (10 µg/mL) est nécessaire. Les embryons E9 ont été incubés dans cette solution pendant 10 minutes. Un bain de 10 minutes dans une solution de glycine (2mg/mL) permet de bloquer l'action de la protéinase K. Après avoir été rincés, les tissus ont été post-fixés 20 minutes dans du PFA 4%/glutaraldéhyde 0,2%. Après deux bains de rinçage dans du PBT, les embryons ont été incubés 10 minutes dans une solution d'hybridation*/PBT (v/v) puis dans une solution d'hybridation à 60°C pendant 1 heure. Cette solution a ensuite été remplacée pour la nuit par du tampon d'hybridation contenant 200 ng de ribosonde préalablement dénaturée. L'hybridation avec les ribosondes Shh et Nértrine1 a été réalisée à 60°C.

5.2 Post-hybridation et révélation enzymatique

Le lendemain matin, les embryons ont été rincés trois fois 30 minutes dans la solution I* puis dans la solution III* préalablement chauffées à 60°C. Après rinçages dans du TBST*, les tissus ont été incubés 1h30 dans une solution de TBST contenant 0,1% de Blocking Reagent (Roche). Ceux-ci ont alors incubés toute la nuit à 4°C avec un anticorps anti-DIG (1/2000, Roche).

Les embryons ont alors été rincés trois fois 5 minutes puis cinq fois 1h30 et enfin une nuit à 4°C dans du TBST.

Le lendemain matin, les embryons ont été rincés trois fois 10 minutes dans du NTMT*. La révélation du marquage a été réalisée à température ambiante à l'abri de la lumière en présence d'une solution contenant 125 µg/mL de NBT et 250 µg/mL de BCIP dans du NTMT. L'apparition du marquage a été suivie régulièrement. Une fois celui-ci jugé satisfaisant, la réaction a été bloquée avec du PBT. Les embryons ont été post-fixés dans du PFA 4%/glutaraldéhyde 0,1% pendant 10 minutes puis rincés trois fois dans du PBS.

VI. Etudes *in vitro*

1. Cultures organotypiques

Le principe de cette technique est de maintenir l'intégrité structurale des tissus lors de leur mise en culture sur des inserts.

1.1 Co-cultures d'explants hypothalamiques avec des explants embryonnaires issus de télencéphale et de mésencéphale.

Cette étude a été entreprise afin de mettre en évidence le potentiel attracteur des divers explants embryonnaires (éminence de pallidum, mésencéphale ventral (SN/VTA présomptive) et tectum) pris à différents stades sur les fibres des neurones à MCH. Pour cela, les fibres MCH pénétrant dans chaque explant embryonnaire ont été comptabilisées.

La technique de culture statique sur filtres décrite par Stoppini et al. (1991) a été adaptée au laboratoire à la culture de tranches d'hypothalamus de rat par Bayer et al. (1999), à la culture de tranches de septum et d'hippocampe (Charriere et al. 2010). Nous avons appliqué ce principe à la co-culture de tranches d'hypothalamus de jeunes souris et de tranches de pallidum, de SN/VTA ou de tectum issus d'embryons de souris à différents stades.

Toutes les manipulations ont été effectuées stérilement sous une hotte à flux laminaire. Les cerveaux de souris âgées de 3 à 5 jours ont été prélevés rapidement, puis débités en coupes frontales de 300 μm d'épaisseur à l'aide d'un trancheur motorisé (MacIlwain). Les tranches ont été séparées sous loupe binoculaire dans du milieu de base de Eagle (BME) additionné de glucose (6,5g/L). La « zone à MCH » a été récupérée après avoir repéré dorsalement, le faisceau mamillothalamique, antérieurement, la région du noyau paraventriculaire, postérieurement, les corps mamillaires et latéralement, le pédoncule cérébral. La localisation du fornix dans l'hypothalamus renseigne également sur la position de la « zone à MCH ».

Après avoir été récupérés, les cerveaux issus des embryons aux stades E11 à E14 ont été disséqués sous loupe binoculaire dans une solution de Kreb's*. Ils ont ensuite été inclus dans de l'agarose 3% (low melting fusion) puis débités en tranches horizontales de 400 μm à l'aide d'un vibratome. Les régions correspondant à l'éminence du pallidum, le mésencéphale ventral (SN/VTA) ou le tectum ont été prélevées.

Trois tranches hypothalamiques ont été déposées par membrane microporeuse stérile de 30 mm de diamètre (Milicell CM, pore 0,4 μm , Millipore) à l'aide d'une spatule. Pour chaque tranche d'hypothalamus, une tranche de pallidum et une tranche de mésencéphale ventral ont été déposées de part et d'autre de cet explant de manière à ce que les différents explants soient en contact. De la même manière, sur des autres membranes, les explants hypothalamiques ont été mis en contact des explants embryonnaires issus de tectum. Ces manipulations ont été répétées pour les stades embryonnaires E11 à E14. Chaque membrane a été placée dans une boîte de Pétri (33 mm de diamètre) contenant 1 mL de milieu de culture stérile. Les boîtes de Pétri ont ensuite été mises en culture pendant 48 heures dans un incubateur à 37°C sous atmosphère enrichi à 5% de CO₂. Les tranches se trouvent donc à l'interface air/liquide et la diffusion du milieu de culture à travers la membrane permet d'assurer la survie du tissu. Le

milieu de culture est composé de 50% de BME, 25% de sérum de cheval, 25% de solution saline équilibrée de Hank's, 1mM de glutamine, 6,5 g/l de glucose, et de 50 µg/mL de streptomycine/pénicilline/néomycine. Pour chaque stade et pour chaque culture, l'étude a été réalisée sur 2 ou 3 séries de 4 à 8 souriceaux.

1.2 Cultures de tranches horizontales passant par la « zone à MCH »

Afin de visualiser l'effet du blocage de la signalisation Shh par la cyclopamine (qui se lie au récepteur smoothened), des moitiés de cerveaux embryonnaires E11, ont été déposées, face ventriculaire au contact des membranes microporeuses et mises en culture comme précédemment décrit, pendant 48 heures. 20 µM de cyclopamine ou le volume correspondant de DMSO comme contrôle ont été ajoutés au milieu de culture.

1.2.1 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits et les ARNm inversement transcrits comme cela est décrit dans le paragraphe IV.1.2 Transcription inverse des ARN de rat (RT). Les ARN totaux ont ensuite subi un traitement à la DNase en suivant les instructions du fournisseur (Fermentas).

1.2.2 Dosage des ARNm par PCR en temps réel

Le mélange réactionnel est composé de 1 µL de cDNA dilué au 1/10, 10 µL de Mix 2X (MasterMix SYBR Green, Applied), 1 µL d'amorces sens 10 µM, 1 µL d'amorces réverses 10 µM et 7 µL d'eau ultra pure stérile. La PCR a été réalisée à l'aide des amorces pMCH utilisées dans le travail de Pissios et al. (2007) et des amorces β-actine suivantes :

Amorce sens : ' TggTgggAATgggTCAgAAg '

Amorce réverse : 5'TCCATgTCgTCCCAgTTggT 3'.

Le programme d'amplification est le suivant :

- Dénaturation initiale et activation de la polymérase : 95°C pendant 10 minutes,
- Amplification : 95°C pendant 15 secondes, 57°C pendant 20 secondes (40 cycles)

20 µL ont été déposés par puits d'une plaque 48 puits de manière à ce que chaque échantillon soit analysé en triplicat.

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification d'un fragment d'ADN) avec pour différence une amplification mesurée tout au long de la réaction, donc en temps réel. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés au cours de la réaction.

La technologie basée sur le SYBR Green (fluorochrome) est utilisée pour ces études. Lors de la réaction d'amplification par PCR, le SYBR Green libre en solution fluoresce peu. Durant l'étape d'élongation, la fluorescence associée à la quantité de SYBR Green se fixant à l'ADN double brin naissant augmente. L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil (Applied Biosystems, StepOne).

Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C afin de dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée jusqu'à la température d'hybridation ce qui provoque la réhybridation des deux brins d'ADN. La température est alors lentement élevée jusqu'à 95°C. La fluorescence est lue tous les 0,3°C durant cette montée. Tant que le SYBR Green est incorporée à l'ADN double brin, il fluoresce. Lors de l'augmentation de la température, l'ADN double brin se dissocie, relargant du SYBR Green, la fluorescence

diminue. La température à laquelle 50% de l'ADN double brin sont dissociés est appelée température de fusion du produit synthétisé. La température de fusion est obtenue en traçant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température : elle correspond au maximum de la courbe (**Figure 11**). Cette courbe permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié. En effet, si plusieurs pics sont obtenus à des températures différentes ou des pics décalés par rapport au T_m attendu, cela signifie que nous sommes en présence d'amplicons ayant une taille différente. Dans ce cas, le produit de PCR doit être déposé sur gel afin de vérifier la spécificité de l'amplification.

Le concept du Threshold cycle (C_t) est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR (Figure 12).

Méthode de calculs utilisée :

Normalisation par le contrôle endogène (β -actine)

$$\begin{aligned} Ct \text{ gène cible}^{\text{Ech. traité}} - Ct \text{ gène endogène}^{\text{Ech. traité}} &= \Delta Ct^{\text{Ech. traité}} \\ Ct \text{ gène cible}^{\text{Ech. contrôle}} - Ct \text{ gène endogène}^{\text{Ech. contrôle}} &= \Delta Ct^{\text{Ech. contrôle}} \end{aligned}$$

Normalisation par le contrôle de l'expérience (DMSO)

$$\Delta Ct^{\text{Ech. traité}} - \Delta Ct^{\text{Ech. contrôle}} = \Delta \Delta Ct$$

Puis utilisation de la formule : $2^{-\Delta \Delta Ct}$

Les calculs ont été réalisés par le logiciel Step One Software (version 2.1) sur la base de ces équations en tenant compte de l'efficacité de chaque couple d'amorces.

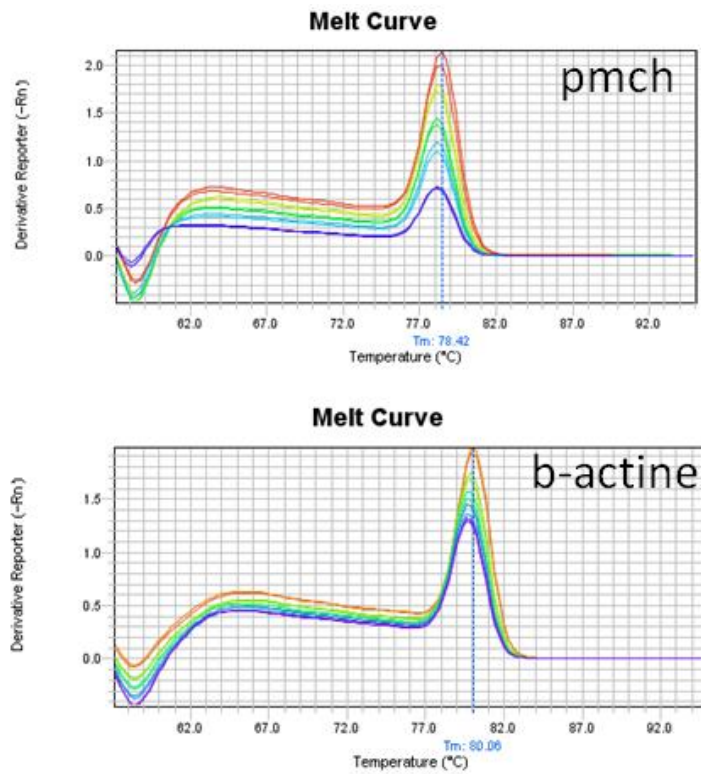


Figure 11 Détermination de la température de fusion

Les courbes obtenues montrent un pic dont le maximum correspond à la température de fusion du brin amplifié (T_m). Le fait de n'avoir qu'un seul pic permet de s'assurer de la présence d'un seul produit d'amplification. La technologie ROX™ dye normalise les variations de fluorescence liées à tout ce qui n'est pas issu de la PCR. ΔR_n représente la fluorescence mesurée normalisée. Les courbes représentent ΔR_n en fonction de la température.

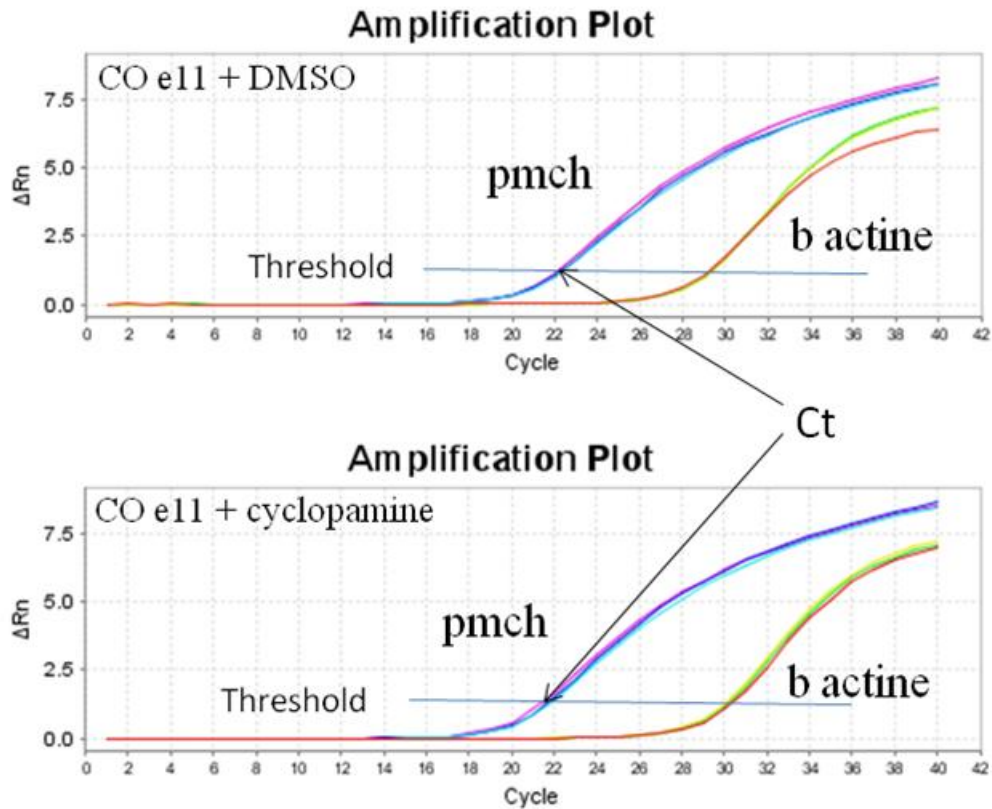


Figure 12 Détermination du Ct.

La fluorescence est mesurée à chaque cycle d'amplification. La technologie ROX™ dye normalise les variations de fluorescence liées à tout ce qui n'est pas issu de la PCR. ΔRn représente la fluorescence mesurée normalisée. Les courbes représentent le ΔRn en fonction du nombre de cycles.

L'efficacité de la PCR est calculée pour chaque couple d'amorces en déterminant la pente de la droite représentant le nombre de cycles en fonction du logarithme de la concentration. Une pente de -3,32 équivaut à une efficacité de 100% (**Figure 13**).

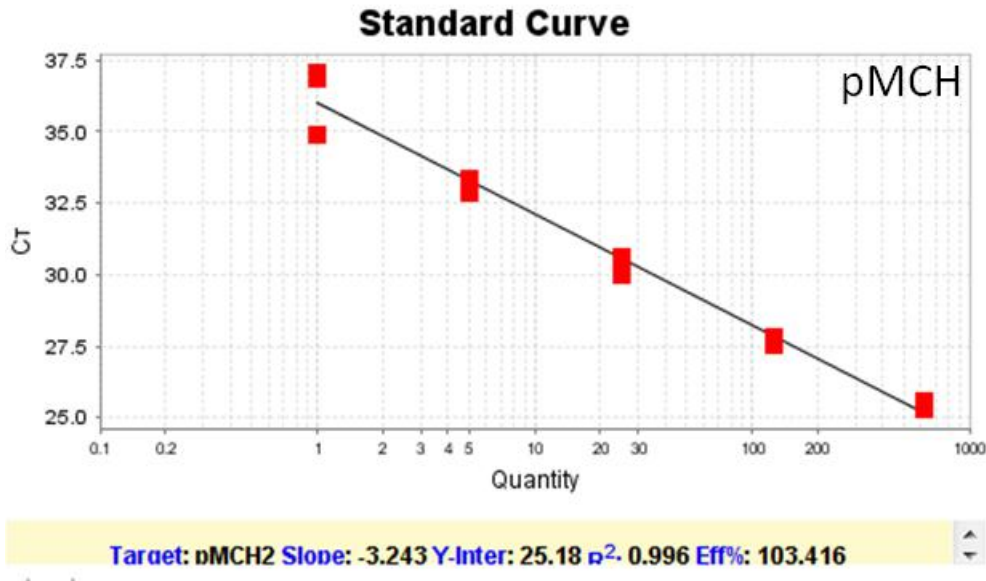


Figure 13 Détermination de l'efficacité du couple d'amorces pMCH

L'efficacité calculée est de 103,416% car la pente a une valeur de -3,243. La formule utilisée pour ce calcul est : $\text{Efficacité} = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$.

2. Cultures tridimensionnelles

2.1 Lignée de cellules HEK 293

Les cellules HEK 293 transfectées de façon stable par un vecteur recombinant exprimant Nétrine1 marquée par l'épitope-C-MYC (composé de 12 résidus GCEQKLISEEDL) dans la partie C-terminale ont été fournies par le Dr E. Soriano (Espagne). Cet épitope est reconnu par un anticorps monoclonal 9E10 (Serafini et coll. 1991). L'expression de Nétrine1 dans les clones stables a été vérifiée par des expériences de western blotting (non illustré).

Les cellules HEK 293 ont également été transfectées de façon stable par un vecteur pCS2-Slit-GFP codant une protéine GFP fusionnée dans sa partie C-Terminale à la protéine Slit2. Les clones stables ont été sélectionnés grâce à leur résistance à la généticine (G418).

L'expression de la protéine de fusion Slit2-GFP dans les clones stables a été vérifiée par des expériences de western blotting à l'aide d'un anticorps anti-GFP (Croizier et al. soumis)

Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO₂ en présence d'un milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF), de 2 mM de L-Glutamine, d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine), de 250 µg/mL d'amphotéricine B et d'antibiotiques pour la sélection des vecteurs : 200 µg/mL d'hygromycine et 250 µg/mL de G418 pour les cellules surexprimant Nétrine1 et 200 µg/mL de G418 pour Slit2.

Les cellules HEK 293 ont été sous-cultivées une fois par semaine etensemencées à raison de 10000 cellules/cm² dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre dans du milieu complet frais. Le milieu a été remplacé par du milieu complet frais tous les deux ou trois jours. Les cellules HEK 293 sont adhérentes et leur décollement du support nécessite une incubation de 5 minutes dans 2 mL de trypsine. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 4 mL de milieu complet. Les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 800g, le culot cellulaire a été repris dans 10 mL de milieu et la quantité de cellules nécessaires ajoutée dans une nouvelle boîte.

2.2 Agrégat cellulaire

Lorsqu'elles ont été utilisées pour une expérience, les cellules HEK 293 surexprimant ou non Nétrine1 ou Slit2 ont été utilisées sous forme d'agrégat de cellules. Afin d'obtenir ces agrégats, des gouttes de 20 µL contenant environ 50000 cellules ont été déposées sur l'envers d'un couvercle d'une boîte de Pétri qui a ensuite été replacé à l'endroit sur la boîte contenant 4 mL de milieu pour maintenir un environnement humide. Ces boîtes ont alors été placées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO₂ pour une durée d'au moins

12 heures. Le lendemain, grâce à la gravité, un agrégat de cellules était présent dans chaque goutte.

2.3 Culture tridimensionnelle d'hypothalamus postérieur

Pour ces expériences, des embryons de souris Swiss à E16 et des embryons de souris MCH-GFP à E15 ont été utilisés. Après dissection des cerveaux dans une solution saline équilibrée de Gey*, les deux vésicules télencéphaliques ont été retirées. Les cerveaux ont alors été placés sur la face dorsale et ouverts par la ligne médiane ventrale. La « zone à MCH » a été récupérée et sectionnée en petits fragments arrondis d'environ 200 µm de diamètre.

Les agrégats ont été coupés en quatre régions et chaque région a été déposée dans une goutte de 20 µL de plasma de poulet (Sigma) préalablement déposée sur une lamelle de verre dégraissée de 22 ou 24 mm de côté. Un quart de l'agrégat de cellules, quatre à six explants hypothalamiques ont été ajoutés ainsi que 20 µL de thrombine (Sigma). Après mélange du tout, les explants ont rapidement été placés tout autour de l'agrégat à une distance d'environ 200 µm. Après 45 minutes de coagulation, 2 mL de milieu ont été ajoutés de manière à recouvrir le gel de plasma-thrombine contenant l'agrégat et les explants hypothalamiques. Le milieu de culture de base contient du milieu Neurobasal, 2% de B27, 6,5g/L de glucose et 50 µg/mL de streptomycine/pénicilline/néomycine. Ensuite pour chaque condition de culture et de contrôle, certaines IgG ont été ou pas ajoutées au milieu.

- Pour les cultures en présence de cellules surexprimant Nérine1 ou contrôles
 - contrôle + IgG : milieu de base + 0,5 µg/mL d'IgG souris
 - anti-DCC : milieu de base + 0,5 µg/mL d'anticorps anti-DCC (clone AF-5)
- Pour les cultures en présence de cellules surexprimant Slit2 ou contrôles
 - contrôle + IgG : milieu de base + 0,5 µg/mL d'IgG lapin

- anti-Robo2 : milieu de base + 0,5 µg/mL d'anticorps anti-Robo2 (Dr Murakami, Japon)

Les boîtes de 33 mm de diamètre ont alors été mises en culture dans un incubateur à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO₂ pendant 48 heures.

2.4 Révélation des axones, acquisition des images et comptage

La culture des explants hypothalamiques E16 issus de souris Swiss CD1 a été réalisée en présence d'agrégats de cellules surexprimant Nétrine1 ou de cellules contrôles et les axones ont été révélés grâce à un anticorps anti β 3-tubuline (Tableau 1). Les cultures d'explants issus d'embryons E15 de souris MCH-GFP ont été réalisées en présence de cellules surexprimant Nétrine1 ou Slit2 ainsi que leurs contrôles et les axones ont été révélés grâce à un anticorps anti-GFP. En effet, la détection de la GFP seule était trop faible et son exposition à la fluorescence la rendait rapidement non détectable. Après deux jours de culture, la croissance axonale observée est suffisante pour être mesurée. Les cultures ont alors été fixées par immersion dans du PFA 4% / sucrose 3% pendant 30 minutes. Après rinçage dans du PBS-Triton, celles-ci ont été incubées toute la nuit avec un anticorps anti β 3-tubuline (clone TUJ1) dilué au 1/5000 dans du PBS-Triton ou avec un anticorps anti-GFP (1/3000) dilué dans du diluant lait. Après révélation de β 3-tubuline par incubation dans de la cyanine souris diluée au 1/1400 ou de GFP dans l'Alexa 488, les images des axones en croissance ont été acquises après observation au microscope à fluorescence. Plusieurs photos ont été réalisées par explants hypothalamiques de façon à observer tous les axones ayant poussé dans différents plans. En plus, quelques explants issus des cultures d'embryons Swiss CD1 E16 ont été immunomarqués par Nkx2.1 ou MCH pour confirmer l'identité des explants d'hypothalamus postérieur.

Pour chaque explant hypothalamique, tous les axones rayonnant autour de l'explant hypothalamique ont été dessinés par transparence à partir des photos. Chaque explant a été divisé en quatre quadrants et les axones ont été comptés à une distance de 60 μm des explants dans les quadrants proximal (en regard de l'agrégat) et distal. Un ratio entre le nombre d'axones proximaux et distaux (p/d) a été calculé (**Figure 14**). Les données ($\pm\text{SEM}$) ont été obtenues à partir de 5 à 7 expériences indépendantes et entre 11 et 26 explants d'embryons E16 de souris Swiss CD1 et de 3 à 5 expériences indépendantes et entre 6 et 16 explants hypothalamiques d'embryons E15 MCH-GFP. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test de Mann Whitney.

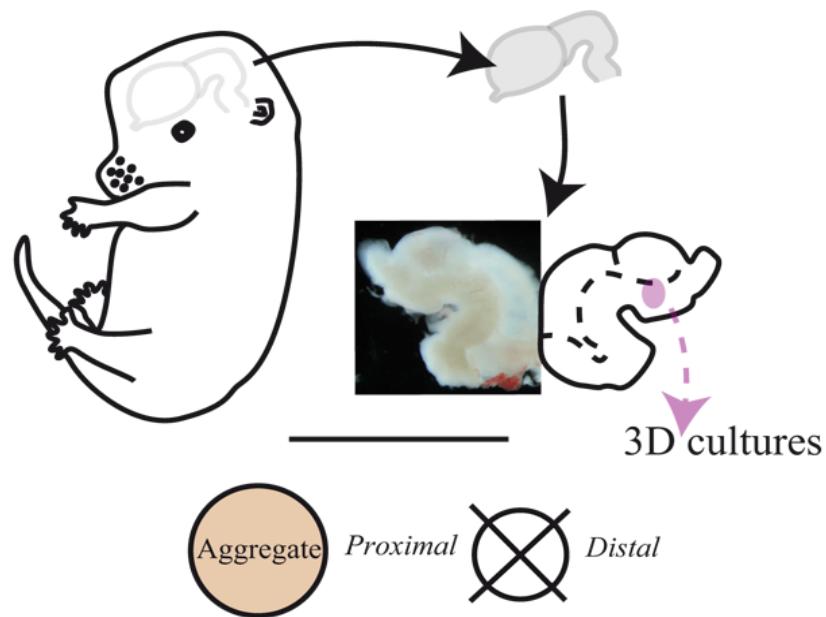


Figure 14 Schéma représentant le mode opératoire pour la culture tridimensionnelle d'explants hypothalamiques, ainsi que le mode de calcul des axones en croissance.

VII. Implant de cristal de DiI dans l'hypothalamus postérieur d'embryons de souris

Les cerveaux ont été disséqués à partir d'embryons de souris Swiss CD1 aux stades E11 et E14. Après une fixation de 30 minutes dans une solution de PFA 4%, un cristal de DiI a été appliqué dans l'hypothalamus postérieur de ces cerveaux. Ceux-ci ont ensuite été placés dans du PFA 4% durant 24 heures dans une étuve à 37°C. L'observation et l'acquisition des images ont été réalisées sur les cerveaux entiers E11 et sur des coupes de cerveaux E14 sur une loupe ou un microscope à fluorescence. En effet, les principaux tractus observés (*tpoc* et *mfb*) ne sont pas dans le même plan et la coupe de ces cerveaux au cryostat après congélation permettait d'obtenir de meilleures images.

VIII. Observations, acquisition et traitement des images

Les observations ont été réalisées avec un microscope à fluorescence Olympus BX51 ou confocal Olympus IX81. La nomenclature utilisée pour les régions, noyaux et aires du cerveau est celle définie par Swanson (1992). L'acquisition des images a été effectuée respectivement, avec une caméra Olympus DP50 et le logiciel AnalySIS 3.1 (Soft Imaging System) ou une caméra DP75 et le logiciel Fluoview FV 1000. Les images ont été importées dans le logiciel Adobe Photoshop CS3 pour le traitement des images et dans le logiciel Adobe Illustrator CS3 pour réaliser les cartographies.

TAMPONS ET SOLUTIONS

I. TAMPONS

Tampon phosphate 0,2 M :

| | |
|--------------------------------------------------------|---------|
| Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O | 71,62 g |
| KH ₂ PO ₄ | 27,20 g |
| Eau distillée | 1000 mL |

Ajuster le pH à 7,2-7,4

Tampon phosphate 0,1M – saccharose 15% :

| | |
|------------------------|--------|
| sucrose | 150 g |
| tampon phosphate 0,2 M | 500 mL |
| eau distillée | 500 mL |

Tampon phosphate salin (PBS) :

| | |
|----------------------------------------------------|---------|
| Na ₂ HPO, 2H ₂ O | 1,42 g |
| KH ₂ PO ₄ , H ₂ O | 0,27 g |
| NaCl | 8,76 g |
| Eau distillée qsp | 1000 mL |

Ajuster le pH à 7,2-7,4

Tampon PBS-Triton :

Tampon PBS additionné 0,3% de triton X-100

« Diluant anticorps » :

Tampon PBS-Triton, 1% d'albumine sérique bovine (BSA), 10% de lactoprotéines et 0,01% d'azoture de sodium.

II. FIXATIONS ET PERFUSIONS

Hydrate de chloral 7% :

| | |
|--------------------|--------|
| hydrate de chloral | 7 g |
| eau distillée | 100 mL |

Fixateur paraformaldéhyde (PFA) 1% ou 4% dans un tampon phosphate 0,1M :

1) Solution A : PFA 2% ou 8%

PFA 20 g ou 80 g

eau distillée 1000 mL

Dissoudre à 60°C au bain-marie et ajouter quelques gouttes de NaOH 1 N pour éclaircir la solution. Filtrer.

2) Solution B : tampon phosphate 0,2 M

Au moment de l'emploi, mélanger les solutions A et B, volume à volume.

III. TRACAGE DES VOIES NERVEUSES

Solution de xylassine-kétamine :

xylassine (Rompun ; Bayer) solution à 2%

kétamine (Parker Davis) 50 mg/mL

True Blue : 4% dans de l'eau distillée

IV. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Gélatine (pour lames gélatinées) :

gélatine 5 g

eau distillée 1000 mL

Chauffer 30 min à 60°C puis refroidir à 45°C.

alun de chrome 4 g

Laisser refroidir à température ambiante.

azide de sodium 500 mg

Filtrer. Plonger les lames 10 min dans cette solution puis les sécher dans une étuve à 37°C.

Bleu de toluidine :

tétraborate de sodium 0,5 g

bleu de toluidine 1 g

eau distillée 100 mL

Filtrer avant utilisation.

V. HYBRIDATION *IN SITU* ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

Tampon de la protéinase K (pH 7,5)

Trizma hydrochloride 20 mM
 CaCl₂ 2 mM
 Eau distillée qsp 1000 mL

TE 10X (pH 8) à autoclaver

| | |
|---------------------------|---------|
| Tris base 10 mM, | 12,11 g |
| EDTA 1 mM, | 3,72 g |
| eau distillée qsp 1000 mL | |

SSC 10X

| | |
|---------------------------|---------|
| NaCl | 87,65 g |
| Citrate de sodium | 44,10 g |
| eau distillée qsp 1000 mL | |

Ajuster le pH à 7 avec quelques gouttes de NaOH 10N. Autoclaver.

Solution de Denhardt 100X

| | |
|--------------------------|----|
| Sérum albumine bovine | 2g |
| Polyvinyl pyrrolidone | 2g |
| Ficoll | 2g |
| eau distillée qsp 100 mL | |

Tampon d'hybridation (hybridation *in situ*)

Formamide désionisé 50%
 SSC 10X 50%
 ADN de sperme de saumon 200µg/mL
 Denhardt 5%

Tampon 1 :

| | |
|---------------------------|---------|
| Tris HCl 100 mM | 12,11 g |
| NaCl 150 mM | 8,76 g |
| Eau distillée qsp 1000 mL | |

Ajuster le pH à 7,5 avec une solution de NaOH 5N.

Tampon 3 :

| | |
|-------------------------|---------|
| Tris base 100 mM | 12,11 g |
| NaCl 100 mM | 5,84 g |
| MgCl ₂ 50 mM | 10,16g |
| Eau distillée qsp | 1000 mL |

Ajuster le pH à 9,5 avec une solution d'HCl 1N ou pH 9 s'il est utilisé en présence de 5% de PVA (embryons).

Tampon de blocage "Blocking Reagent"

| | |
|--------------------|-------|
| Tampon 1 filtré | 4 mL |
| Réactif Boehringer | 20 mg |

Hybridation sur embryon entier :

Solution I

Formamide 50%
 SCC 5X, pH 4,5
 SDS 1%

Solution III

Formamide 50%
 SSC 2X, pH 4,5

TBS 10X

NaCl 80g
 KCl 2g
 Tris-HCl 1M, pH 7,5 250 mL
 Qsp eau distillée 1000 mL

TBST

TBS 1X
 Tween 1%
 Levamisole 2mM

NTMT

NaCl 100mM
 Tris-HCl 100mM, pH 9,5
 MgCl₂ 50mM
 Tween 1%
 Levamisole 2mM

PBT

1X PBS + 1% Tween-20

Solution d'hybridation (whole mount)

50% de formamide
 5X SSC, pH 4,5
 1% SDS
 50 µg/mL tRNA de levure
 10 µL/mL d'héparine

VI. TECHNIQUES DE CULTURE

Solution de Gey's

| | |
|---------------------------------------|--------|
| NaCl | 8g |
| KCl | 0,37g |
| CaCl ₂ | 0,17g |
| MgCl ₂ , 2H ₂ O | 0,21g |
| Na ₂ HPO ₄ | 0,15g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,03g |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O | 0,142g |
| Glucose | 1g |

Qsp 1L eau distillée

Autoclaver

Bicarbonate de sodium

0,23g

Qsp 100 mL d'eau distillée

Autoclaver

Ajouter le bicarbonate de sodium juste avant l'emploi

Solution de Kreb's 10X

| | |
|-----------------------------------------------------|-------|
| NaCl | 73,6g |
| KCl | 1,87g |
| Na ₂ HPO ₄ , H ₂ O | 1,66g |
| MgCl ₂ , 6H ₂ O | 2,44g |
| CaCl ₂ , 2H ₂ O | 3,68g |

Qsp 1L d'eau distillée.

Autoclaver

PARTIE I
RESULTATS

I. Différences morphofonctionnelles du système à MCH entre deux espèces de rongeurs : le rat et la souris

Le système à MCH a été décrit essentiellement chez le rat (Skofitsch et al. 1985; Zamir et al. 1986; Bittencourt et al. 1992). Cependant, les fonctions associées aux projections de ces neurones ou au peptide lui-même sont aujourd'hui beaucoup étudiées dans des modèles de souris génétiquement modifiées. Il est généralement implicitement admis que le système à MCH est semblable entre le rat et la souris bien qu'aucune étude comparative n'ait été entreprise. Il était nécessaire de le vérifier. Plus spécifiquement, un des objectifs essentiels de notre travail concerne l'étude fine du développement de ces neurones afin de déterminer l'origine des sous-populations caractérisées chez le rat. Ces travaux nous ont aussi conduits à utiliser des modèles souris, cependant aucune donnée ne permettait de conclure sur l'existence de sous-populations, leur nombre ou leur organisation chez cette espèce. Ainsi, la distribution des neurones et des fibres MCH a été comparée entre ces deux espèces de rongeurs mais aussi leur phénotype chimique et leur genèse, accompagnée de celle des neurones à Hcr1 qui sont co-localisés avec dans l'hypothalamus postérieur.

1. Cytoarchitecture de l'hypothalamus

Le rat a été le modèle essentiellement utilisé par notre équipe et le 'Brain Map' de L.W. Swanson (Swanson 1998) a été la référence à partir de laquelle toutes nos études anatomiques ont été interprétées. Cependant, cet atlas n'ayant pas été adapté au cerveau de souris, une étape préliminaire de notre travail a été de vérifier que toutes les divisions cytoarchitectoniques de l'hypothalamus décrites chez le rat par Swanson, pouvaient être également reconnues chez la souris. Nous avons comparé la cytoarchitecture hypothalamique entre ces deux espèces de rongeur après coloration de Nissl ou marquage des noyaux au DAPI

sur des coupes au cryostat. Les divisions cytoarchitectoniques du cerveau de rat et de souris sont proches et plus précisément, toutes les structures indispensables à l'analyse topographique des neurones à MCH ont été retrouvées : le noyau paraventriculaire, le noyau antérieur de l'hypothalamus, les noyaux dorso- et ventromédian, le noyau périventriculaire postérieur, la *zona incerta*, la capsule du noyau ventromédian, le noyau postérieur de l'hypothalamus et les aires hypothalamiques latérales (LHA).

2. Distribution des péricaryons MCH chez la souris, comparaison avec le rat

La distribution des péricaryons MCH a été étudiée chez huit souris adultes par hybridation *in situ* et immunohistochimie grâce à des immunosérums anti-NEI, anti-sMCH et anti-rMCH. La distribution de ces neurones est similaire quelque soit le marqueur utilisé.

Sur des coupes frontales de cerveau de souris, les neurones les plus rostraux sont ventraux au noyau paraventriculaire (PVN), autour et dans le noyau antérieur de l'hypothalamus (AHN) (Figure 15). Plus postérieurement, dans l'hypothalamus tubéral, la majorité des neurones est proche du pédoncule cérébral, dans les régions périfornicales du LHA et dans la *zona incerta*. Un petit nombre est visible dans la capsule dorsomédiane du noyau ventromédian (VMH). Le patron de distribution de ces neurones est très similaire à celui observé et décrit chez le rat (Skofitsch et al. 1985; Zamir et al. 1986; Bittencourt et al. 1992). Cependant, il existe une différence majeure dans cette distribution. En effet, chez le rat, un petit groupe compact de neurones à MCH est observé dans des régions plus caudales de l'hypothalamus et plus précisément dans le noyau périventriculaire postérieur (PVp) (Figure 16). Un groupe similaire de neurones est absent chez la souris, seul un ou deux neurones y sont présents.

L'étude de Bittencourt et al. (1992) a signalé la présence de neurones exprimant la MCH dans les tubercules olfactifs et dans la tegmentum pontique, ceux-ci n'ont pas été observés sur des

coupes frontales de cerveaux de souris adultes après révélation du messager pMCH par hybridation *in situ*

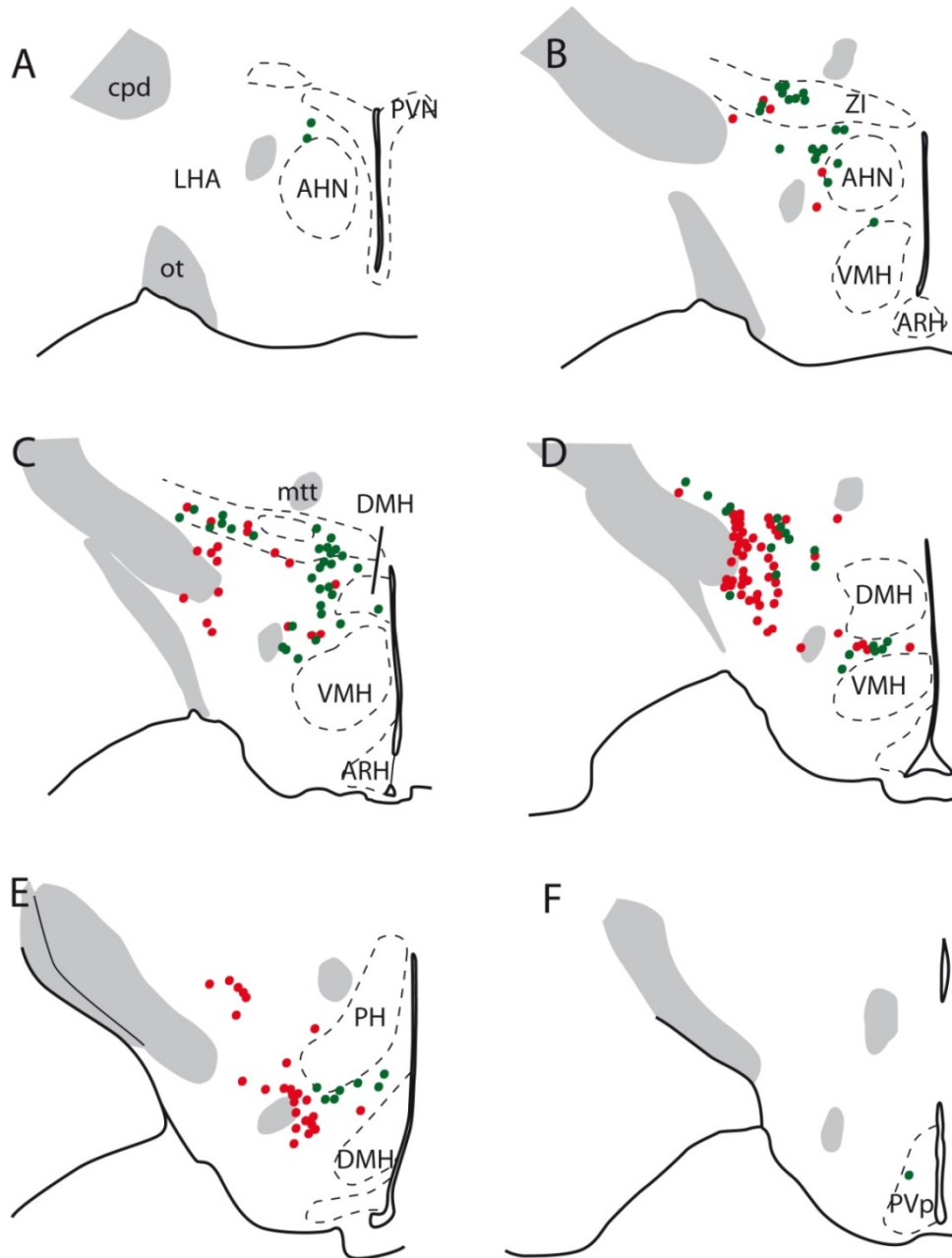


Figure 15 Distribution des péricaryons MCH dans l'hypothalamus de souris adulte.

Distribution des neurones MCH/CART positifs (ronds verts) et MCH/CART négatifs (ronds rouges) sur une série de dessins de coupes frontales de cerveau de souris adulte, du niveau le plus rostral (A) au plus caudal (F).

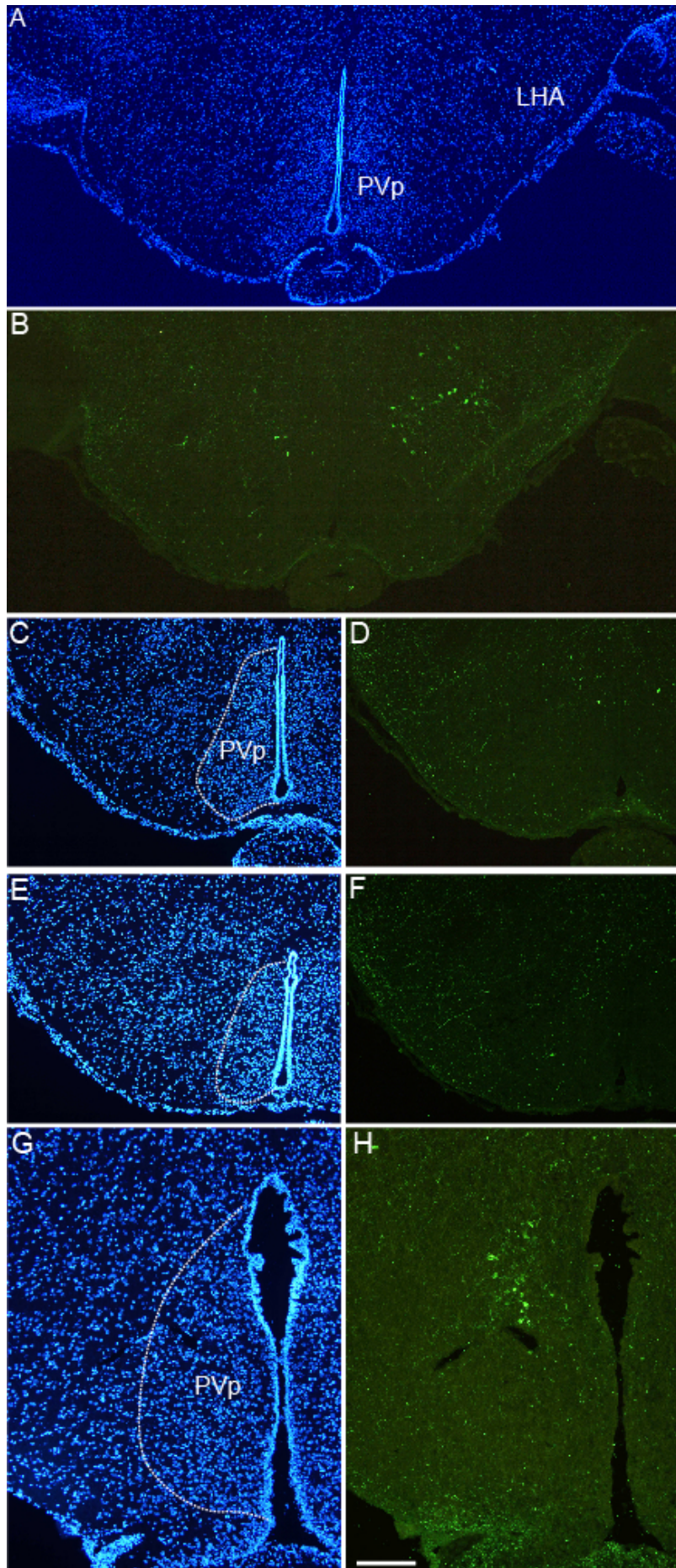
AHN : noyau antérieur de l'hypothalamus ; ARH : noyau arqué ; cpd : pédoncule cérébral ; DMH : noyau dorsomédian de l'hypothalamus ; LHA : aire hypothalamique latérale ; ot : tractus optique ; PH : noyau postérieur de l'hypothalamus ; PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; PVp : noyau périvericulaire postérieur de l'hypothalamus ; VMH : noyau ventromédian de l'hypothalamus ; mtt : faisceau mammillothalamique ; ZI : *zona incerta*.

Figure 16 Marquage immunohistochimique sMCH et coloration des noyaux par le DAPI, illustrant la distribution des péricaryons MCH dans le noyau périventriculaire postérieur de l'hypothalamus (PVp).

(**A-F**) Microphotographies du marquage immunohistochimique sMCH et de coloration des noyaux au DAPI sur des coupes frontales de 10 µm d'épaisseur d'un cerveau adulte de souris obtenues au cryostat. Un ou deux neurones sont présents dans le noyau périventriculaire postérieur de l'hypothalamus (**B**).

(**G-H**) Microphotographies de marquage sMCH et DAPI sur des coupes frontales d'un cerveau adulte de rat de 10 µm d'épaisseur obtenues au cryostat. Un groupe compact de neurones à MCH est observé dans le PVp (**H**).

LHA : aire hypothalamique latérale



3. Co-expressions de CART, NK3 dans les péricaryons à MCH

Des précédentes études réalisées dans notre laboratoire ont montré que 68% des neurones à MCH de rat expriment le peptide CART et que ces neurones expriment également le récepteur NK3 (Brischoux et al. 2002; Cvetkovic et al. 2004). Grâce à un double marquage utilisant des immunsérums anti-NEI ou anti-sMCH et un anticorps anti-CART, chez la souris, 44,5% des neurones à MCH exprimaient CART (Tableau 2). Par des approches de triples marquages obtenus par hybridation *in situ* pour MCH et par immunohistochimie pour CART et NK3, nous avons constaté que tous les neurones à MCH immunoréactifs pour CART, l'étaient aussi pour NK3 (Figure 17). Dans les régions les plus rostrales de la « zone à MCH », ces neurones sont majoritairement localisés dans la partie médiane de l'hypothalamus par rapport au fornix et dans la *zona incerta*. La plupart des neurones à MCH des aires latérales n'expriment ni CART ni NK3. Dans les régions les plus caudales de la « zone à MCH », peu de neurones à MCH exprimant CART et NK3 sont observés, ils sont exclusivement médians. Cette ségrégation est similaire à celle retrouvée chez le rat (Cvetkovic et al. 2004). Nos études récentes ont permis de compléter ces données. Les neurones en position périventriculaire, dans le PVp n'expriment pas tous NK3 ou CART (non illustré).

| Moyenne du nombre de neurones MCH ou NEI | % de neurones MCH ou NEI- CART/MCH ou NEI |
|------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 706 ± 110 | 44,49 ± 5,05 |

Tableau 2 Expression du peptide CART dans les neurones à MCH de souris.

Proportion de neurones MCH contenant le peptide CART dans le diencéphale de cinq souris adultes. Les comptages ont été réalisés sur une et trois séries pour chaque souris. Moyenne ±SD.

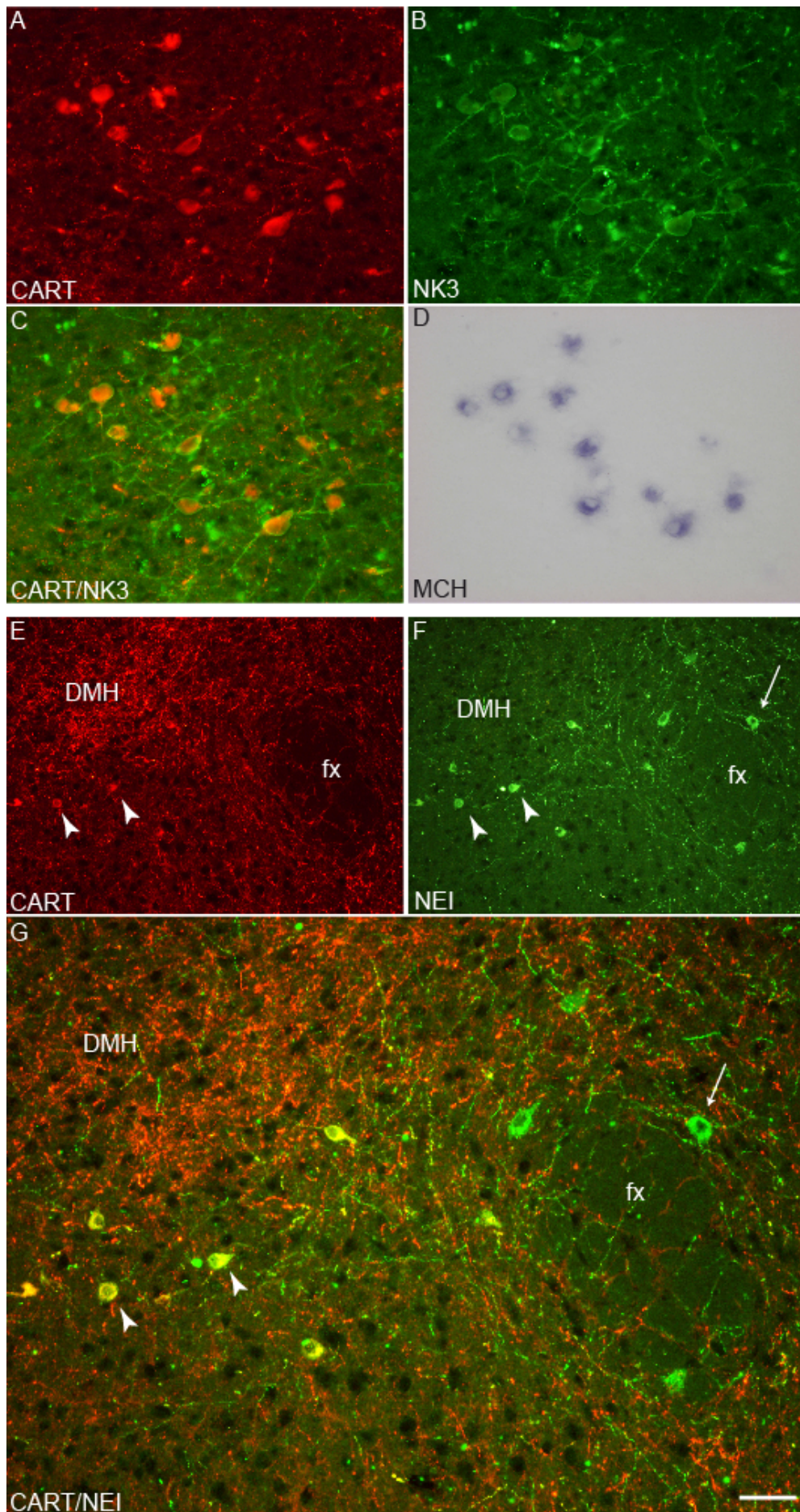
Figure 17 Photographies illustrant les co-expressions MCH/NEI, CART et NK3 sur des coupes frontales de cerveaux de souris adultes

(A-D) Microphotographies de triple marquage MCH/NK3/CART obtenus par hybridation *in situ* (HIS pour pMCH) et immunofluorescence indirecte (NK3-Alexa 488 vert et CART-Alexa 555 rouge). Les marquages immunohistochimiques CART et NK3 ont tout d'abord été obtenus (**A** et **B**, respectivement), puis la présence dans ces mêmes cellules du messenger pMCH a été vérifiée par HIS (**D**). Tous les neurones à MCH contenant CART contiennent aussi NK3.

(E-G) Microphotographies de marquages immunohistochimiques montrant la localisation dans l'hypothalamus des neurones NEI exprimant (tête de flèche) ou non (flèche) le peptide CART. La majorité des neurones NEI/CART sont localisés en position médiane par rapport au fornix (à gauche du fornix sur l'illustration) et peu sont observés en position latérale.

DMH : noyau dorsomédian de l'hypothalamus

fx : fornix



4. Origine des projections corticales à MCH chez la souris

Les sites d'injection du traceur rétrograde True Blue (TB) étaient volontairement larges afin d'impliquer le plus possible de projections MCH. Le traceur a été injecté dans le cortex cérébral dorso-médian (aires cingulaires dorsales et aires motrices) de trois souris. Le corps calleux n'était pas affecté par les sites d'injection du traceur (**Figure 19**). Chez le rat, une étude similaire avait montré que plus de 85% des neurones à MCH à projections corticales exprimaient CART (Brischoux et al. 2002; Cvetkovic et al. 2004). Après injection de traceur dans les aires corticales décrites chez la souris, des neurones TB positifs sont présents majoritairement du côté ipsilatéral à l'injection et quelques uns du côté controlatéral. Ces neurones sont principalement présents dans le LHA, à proximité du fornix et dans la *zona incerta*. Après double marquage immunohistochimique afin de révéler CART et MCH, il apparaît, chez la souris, que 60% des neurones à MCH à projections corticales expriment CART (**Tableau 3**). Nous avons utilisé des IS dirigés contre les peptides NEI ou MCH. Les deux anticorps fournissent un marquage ainsi qu'une distribution des corps cellulaires et des fibres similaires, toutefois, l'anticorps anti-NEI fournit un marquage plus intense sur notre matériel souris. C'est pour ces raisons que l'IS anti-NEI a beaucoup été utilisé dans ce travail. Après double marquage CART/MCH-NEI dans le cortex cérébral, nous avons constaté que les axones MCH-non CART sont plus nombreux que les axones MCH/CART (**Figure 18**) alors que chez le rat les axones MCH-non CART sont rares (Cvetkovic et al. 2004). La co-détection des deux peptides dans les mêmes axones est plus difficile chez la souris. La même observation a été effectuée dans l'ensemble du télencéphale en utilisant deux anticorps anti-CART. Ces deux IS fournissent le même marquage. Par ailleurs, des axones CART-positifs/MCH-négatifs ont aussi été observés fréquemment dans ces structures chez la souris,

ce qui est rarement le cas dans le cortex cérébral de rat (Cvetkovic et al. 2004). L'origine de cette innervation CART-non MCH n'a pas été vérifiée.

Chez le rat, peu de neurones à MCH à projections spinales exprimaient CART (Cvetkovic et al. 2004). L'étude de coupes de moelle épinière de souris co-marquées pour les deux peptides, amène à la constatation que très peu de fibres immunoréactives pour MCH le sont aussi pour CART, suggérant qu'un nombre extrêmement limité de neurones MCH/CART projettent sur les parties les plus postérieures du système nerveux central. Il serait, cependant, nécessaire d'entreprendre des injections de TB dans la moelle épinière de souris pour confirmer quels neurones à MCH (sous-populations) projettent sur ces territoires.

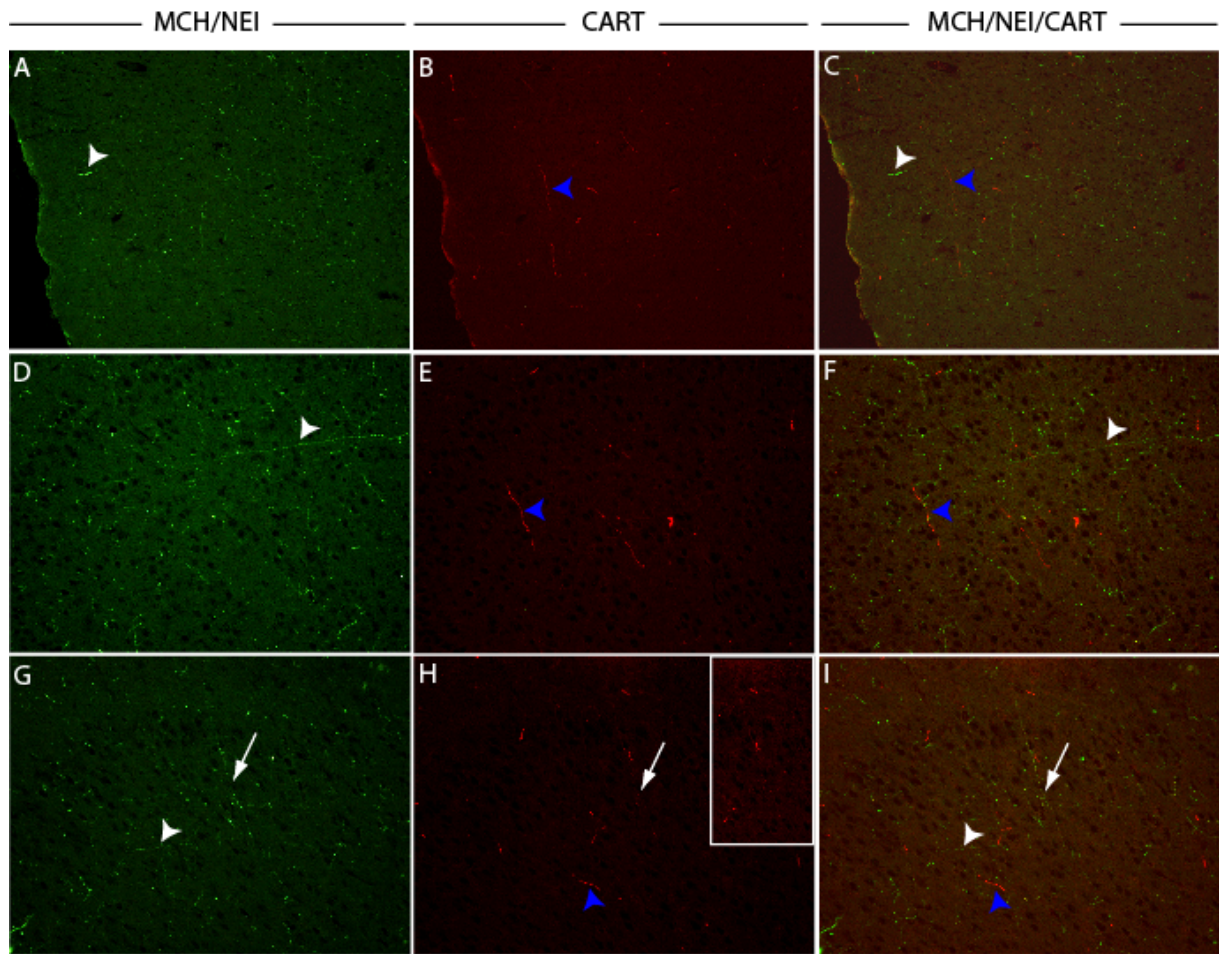


Figure 18 Microphotographies de coupes frontales de cerveaux de souris illustrant les axones corticaux MCH-positifs exprimant ou non CART et illustrant les axones corticaux CART-positifs et MCH-négatifs.

(A, D, G) Microphotographies illustrant les axones corticaux immunoréactifs pour MCH ou NEI.

(B, E, H) Immunohistochimie révélant le marquage cortical CART. Dans l'encadré en H, fort grossissement de la fibre CART non NEI/MCH.

(C, F, I) Double immunohistochimie MCH/NEI et CART révélant ou non des axones doublement marqués. Les têtes de flèches blanches indiquent des axones MCH ou NEI-non CART, les têtes de flèches bleues, des axones CART-non MCH/NEI et des flèches blanches, un axone MCH/CART-positif.

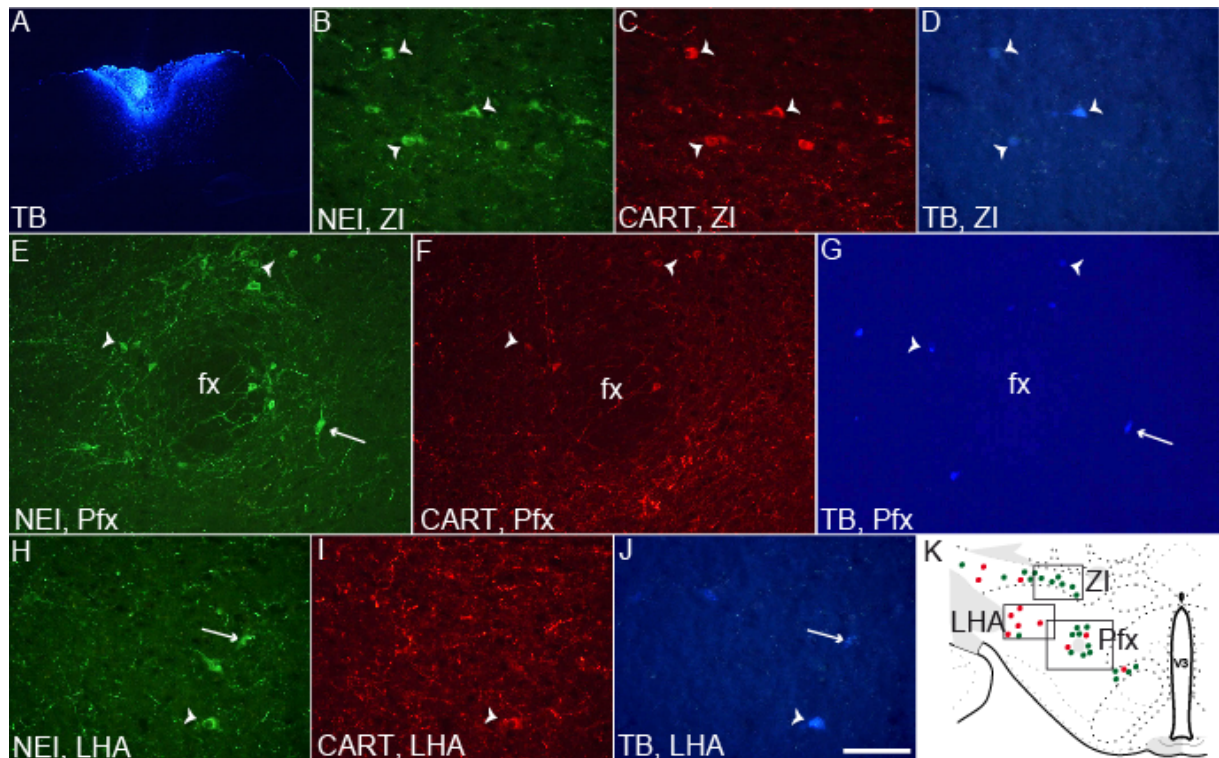


Figure 19 Origine des projections MCH sur le cortex cérébral de souris

(A) Microphotographies illustrant le site d'injection de True Blue (TB) dans le cortex cérébral médian d'une souris adulte.

(B-J) Doubles marquages immunohistochimiques illustrant des neurones NEI/CART contenant du TB (tête de flèche) et des neurones NEI/TB ne contenant pas le peptide CART (flèche). Les cellules triplement marquées sont plus abondantes dans la *zona incerta* (ZI) et dans les régions périfornicales (Pfx), et les neurones NEI/TB sont majoritairement observés dans les aires hypothalamiques latérales (LHA).

(K) Schéma résumant la distribution des neurones NEI/CART/TB ou NEI/TB dans trois régions de l'hypothalamus de souris adulte (ZI, Pfx et LHA). V3 : 3^{ème} ventricule.

| Souris | Nombre de neurones MCH-TB positifs | Neurones MCH/TB et CART positifs | | Neurones MCH/TB et CART négatifs | |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|
| | | nombre | % | nombre | % |
| | 76 | 46 | 60,5 | 30 | 39,5 |
| #31 | 64 | 34 | 53,1 | 30 | 46,9 |
| | 80 | 54 | 67,5 | 26 | 32,5 |
| Moyenne | | | 60,4 | | 39,6 |
| #32 | 81 | 42 | 51,9 | 39 | 48,1 |
| | 121 | 86 | 71,1 | 35 | 28,9 |
| Moyenne | | | 61,5 | | 38,5 |
| #33 | 60 | 39 | 65 | 21 | 35 |
| | 46 | 32 | 69,6 | 14 | 30,4 |
| | 40 | 19 | 47,5 | 21 | 52,5 |
| Moyenne | | | 60,7 | | 39,3 |
| Moyenne générale (cortex cérébral médián) | | | 60,9 | | 39,1 |

Tableau 3 Neurones MCH projetant sur le cortex cérébral de souris adulte.

Nombre de neurones MCH rétrogradement marqués après injection de True Blue (TB) dans le cortex cérébral médian de souris adulte. Parmi ceux-ci, le pourcentage de neurones MCH/CART rétrogradement marqués. Deux séries de lames ont été comptabilisées dans le cas de la souris #31 et trois séries pour les souris #32 et #33.

5. Distribution comparée des fibres MCH

Les projections MCH de souris sont retrouvées dans l'ensemble du SNC adulte, des bulbes olfactifs jusqu'à la moelle épinière. Cette distribution rappelle celle observée chez le rat (Bittencourt et al. 1992) (**Figure 4**). Il existe cependant des différences notables dans l'innervation de certaines structures hypothalamiques et télencéphaliques entre ces deux espèces de rongeurs. Seules seront décrites les différences majeures observées dans l'innervation des régions cérébrales par les fibres MCH, à savoir lorsqu'une structure est innervée chez une espèce mais pas chez l'autre. Aucune étude quantitative n'a été effectuée.

Ainsi chez le rat, d'abondantes fibres MCH sont présentes dans les régions antéropostérieures dorsales du cortex piriforme, juste en position dorsale par rapport au tractus olfactif latéral (lot) (Figure 20). Chez la souris, une telle innervation n'est pas observée. Si quelques axones reconnus par l'anticorps sont visibles, ce n'est en rien comparable à l'innervation dense observée chez le rat, essentiellement dans les couches 1 et 2 de cette aire corticale.

Une seconde différence majeure concerne le pallidum (Figure 21). Le globus pallidus est composé d'une région latérale caractérisée par l'expression de cellules immunoréactives pour parvalbumine et une partie médiane, pauvre en cellules parvalbumine-positives et riches en cellules cholinergiques (Gerfen et Wilson 1996). Chez le rat, seule la partie médiane et ventrale du globus pallidus à proximité de la capsule interne est innervée par des fibres MCH. La partie externe contient majoritairement des fibres de passage en direction des aires corticales latérales (Cvetkovic 2003). Les fibres MCH sont à proximité des péricaryons choline acétyltransférase (ChAT)-positifs, suggérant une innervation des neurones cholinergiques de cette structure. Chez la souris, les régions médiane et latérale du globus

pallidus contiennent une dense innervation par les fibres MCH. Après double immunohistochimie et observations au microscope confocal, les axones MCH sont observés à proximité immédiate de cellules parvalbumine-positives, évoquant des contacts synaptiques axosomatiques. Le noyau sous-thalamique (STN), anatomiquement lié au globus pallidus (GP) est intensément innervé par les axones MCH chez le rat comme chez la souris.

La différence la plus évidente et la plus marquante est celle observée dans l'hypothalamus, plus particulièrement le noyau arqué (ARH) et l'éminence médiane (**Figure 22**). Chez le rat, l'innervation de la partie ventrale du noyau arqué est abondante. Un double marquage CART/MCH a permis de mettre en évidence une innervation des neurones à proopiomélanocortine (POMC) du noyau arqué, par des terminaisons nerveuses à MCH dont peu exprimaient CART (Figure 23). Un nombre important de fibres MCH est également présent dans l'éminence médiane et dans la tige hypophysaire. Chez la souris, ces fibres ne sont pas présentes dans le noyau arqué.

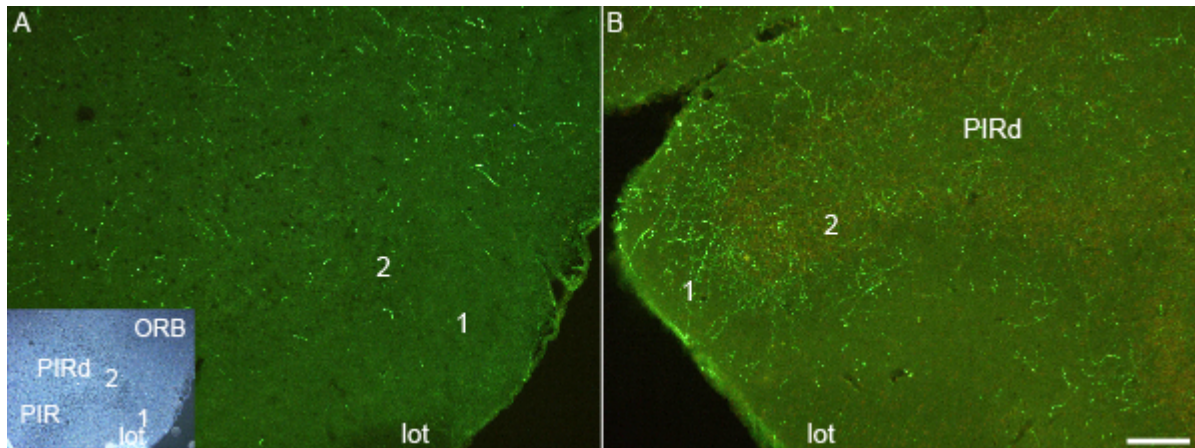


Figure 20 Microphotographies illustrant l'innervation du cortex piriforme de souris et de rat par les axones MCH.

Marquage obtenu par immunohistochimie (MCH, Alexa 488) sur des coupes de cerveau de souris (**A**) ou de rat (**B**) passant par le cortex piriforme (PIR).

La photographie insérée en **A**, est une vue en fond noir du cortex piriforme de la même coupe afin de mieux mettre en évidence la cytoarchitecture. Les couches 1 et 2 sont visibles ainsi que le tractus optique latéral (lot). Chez le rat (**B**), des axones MCH sont observés dans les couches 1 et 2 des aires du cortex piriforme dorsal (PIRd), alors que peu sont présents chez la souris (**A**).

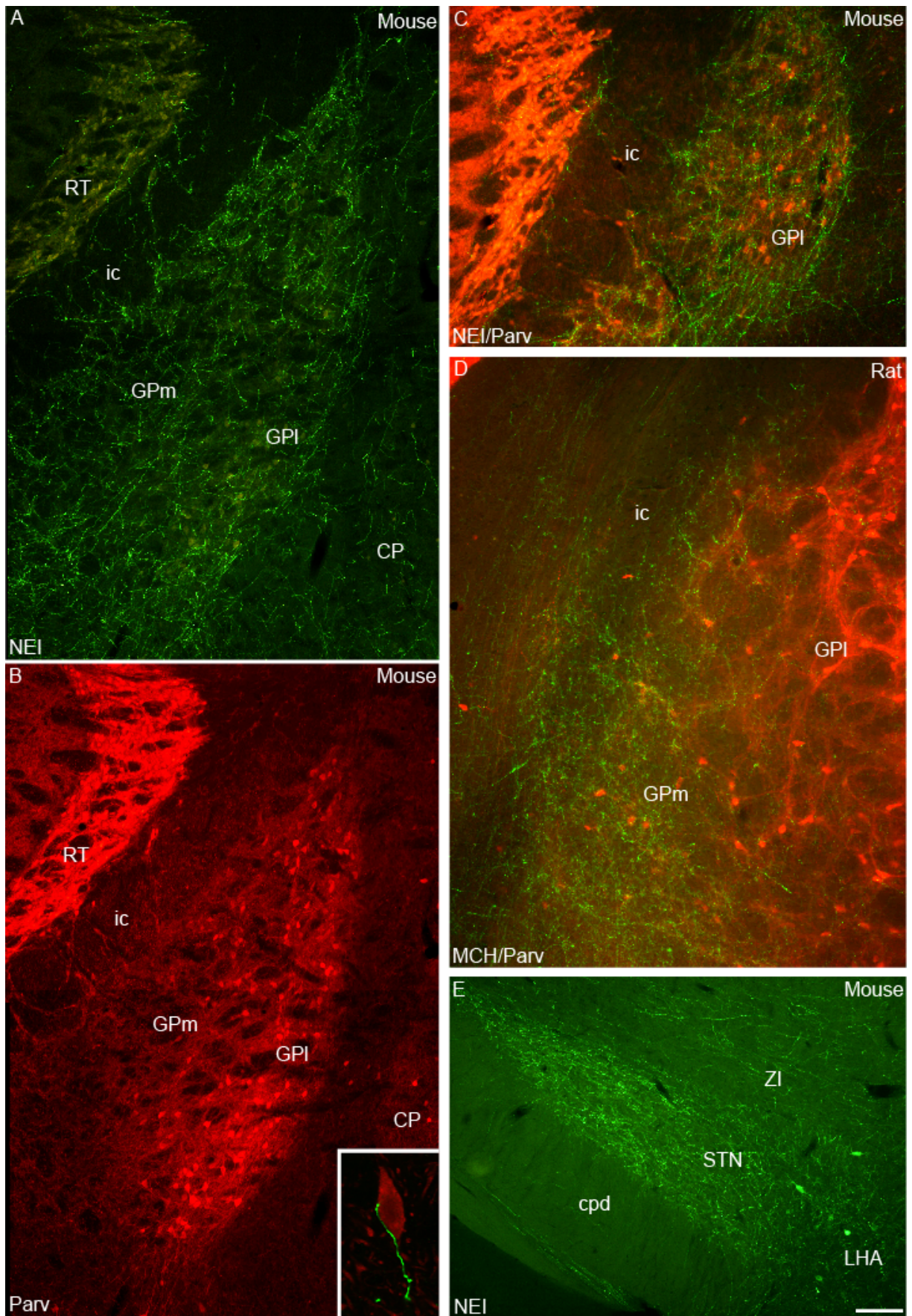
Figure 21 Marquages immunohistochimiques des axones MCH ou NEI et des neurones Parvalbumine dans le globus pallidus de rat et de souris.

(A-C) Marquage immunohistochimique (A) NEI (Alexa 488), (B) Parvalbumine (Alexa 555) ou les deux (C) sur des coupes de cerveau de souris passant par le globus pallidus (GP). Des axones NEI sont présents dans les parties médianes (GPM) et latérales du GP (GPI). Le GPM contient peu de neurones Parvalbumine alors qu'ils sont nombreux dans le GPI. Les axones NEI sont retrouvés à proximité de ces neurones et l'insert en B, illustre une image obtenue par microscopie confocale, d'un axone MCH innervant un péricaryon Parvalbumine.

(D) Double immunohistochimie illustrant les marquages MCH et Parvalbumine dans le GP de rat. Seules les régions médianes du GP de rat sont innervées par les axones MCH.

(E) Photographie montrant l'intense innervation du noyau sous-thalamique (STN) de souris par les axones NEI.

CP : caudoputamen ; cpd : pédoncule cérébral ; ic : capsule interne ; LHA : hypothalamus latéral ; Parv : parvalbumine ; RT : noyau réticulé du thalamus ; ZI : *zona incerta*.



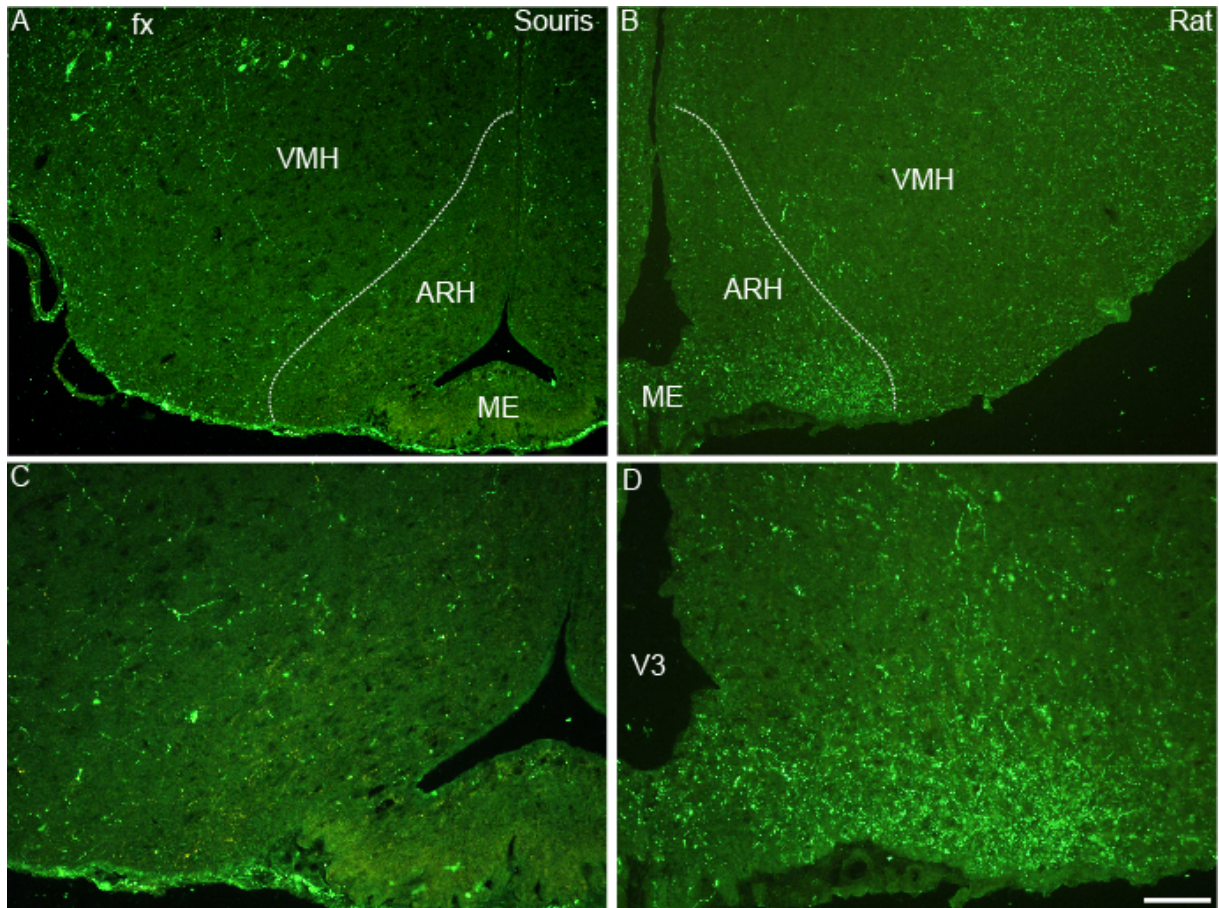


Figure 22 Photographies illustrant le marquage immunohistochimique MCH dans le noyau arqué de souris en comparaison du rat.

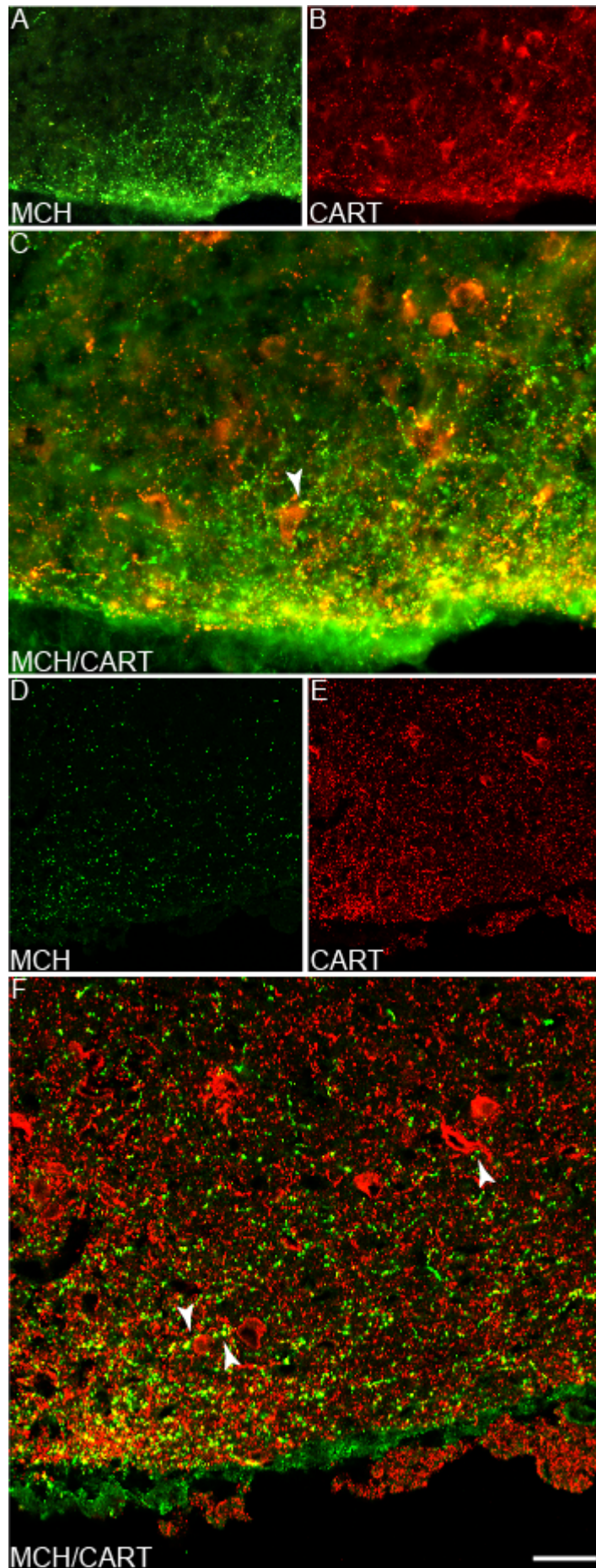
(A, C) Sur des coupes frontales d'hypothalamus de souris, peu de fibres MCH (Alexa 488) sont observées dans le noyau arqué (ARH) et l'éminence médiane (ME).

(B, D) Une dense innervation des axones MCH est présente dans la partie ventrale de l'ARH de rat.

Figure 23 Photographies illustrant l'innervation des neurones à proopimélanocortine (POMC) par les axones MCH dans le noyau arqué (ARH)

(A-C) Double marquage immunohistochimique MCH (Alexa 488)/CART (Alexa 555) dans la partie ventrale de l'ARH de rat. L'observation a été réalisée au microscope à épifluorescence. Les axones MCH semblent former des contacts synaptiques avec les neurones à POMC marqués par l'anticorps anti-CART.

(D-F) Le même marquage, observé au microscope confocal permet de mieux illustrer des boutons MCH-positifs/CART-négatifs au contact de péricaryons à POMC révélé par l'IS anti-CART.



II. Genèse des neurones à MCH et à Hcrtr chez la souris

Cette étude constituait également le pendant de celle déjà effectuée et publiée chez le rat et nécessaire à la caractérisation des sous-populations MCH. La même procédure a donc été suivie. Seules les coupes frontales passant par l'hypothalamus ont été analysées. Des noyaux immunoréactifs pour le BrdU sont observés sur tout notre matériel. Seuls des mâles issus des mères gestantes injectées par le BrdU entre le 9^{ème} et le 14^{ème} jour de vie embryonnaire (E9 et E14) ont été utilisés. L'intensité du marquage BrdU localisé dans le noyau cellulaire est variable selon les cellules, en effet, les noyaux peuvent être pleinement et intensément marqués ou montrer un marquage fragmenté et plus faible en intensité. Le BrdU est un analogue de la thymidine s'incorporant lors de la phase S du cycle cellulaire et ce, dans les trente minutes à deux heures suivant l'injection (Taupin 2007). Les cellules dont les noyaux sont intensément marqués sont considérées comme nées au moment de l'injection (Markakis et Swanson 1997), seules ces cellules sont comptabilisées.

Chez la souris, la plupart des neurones générés précocement (E9/E10) sont localisés dans le LHA, ceux nés plus tardivement (à partir de E11/E12) sont localisés dans l'hypothalamus médian, périventriculaire et dans la *zona incerta*. Chez le rat, des études avaient montré que la neurogenèse hypothalamique suit un gradient latéral à médian (Altman et Bayer 1978a,b,1986; Markakis et Swanson 1997).

1. Genèse des neurones à MCH

Chez le rat, l'étude de la genèse des neurones à MCH a montré que ces neurones sont produits tout au long de la mise en place de l'hypothalamus (E10 à E16) (**Figure 24**). Les premiers neurones naissent autour de E11 et projettent majoritairement sur la moelle épinière et les

seconds naissent à E12/E13, expriment CART/NK3 et projettent massivement sur le cortex cérébral.

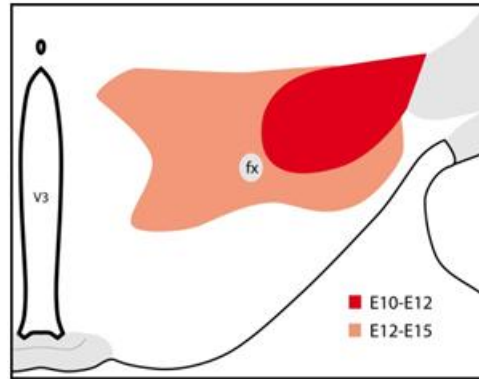


Figure 24 Schéma illustrant la localisation des péricaryons MCH/BrdU positifs après injection de BrdU à des femelles gestantes entre E10-E12 (rouge) et E12-E15 (orange) sur une coupe frontale d'hypothalamus de rat adulte.

Les péricaryons générés précocement sont en position latérale et ceux nés plus tardivement sont en position plus médiane (Brischoux et al. 2001).

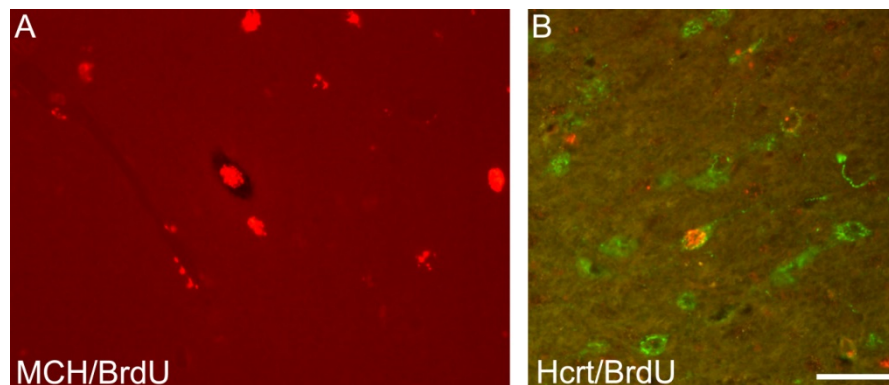


Figure 25 Photographies illustrant les doubles marquages MCH/BrdU et Hcrt/BrdU chez la souris.

(A) MCH (hybridation *in situ*) et BrdU (immunohistochimie, Alexa 555) et (B) Hcrt/BrdU (immunohistochimie, Alexa 488 et 555). Seuls les noyaux intensément marqués par le BrdU ont été comptabilisés.

Chez la souris, des péricaryons doublement marqués MCH/BrdU sont observés à tous les stades embryonnaires auxquelles les mères ont été injectées (E9-E14) (**Figure 25**, Figure 26). La mise en place de ces neurones suit également un gradient latéro-médian de sorte que les neurones générés le plus précocement (E9/E10) sont majoritairement latéraux et que ceux nés plus tardivement sont médians.

Nous avons, par ailleurs, étudié la genèse des neurones MCH/NK3 dans l'hypothalamus tubéral. Ces neurones sont représentatifs des neurones MCH/NK3/CART. Un double marquage BrdU/CART n'était pas possible car l'anticorps anti-BrdU est aussi un anticorps monoclonal de souris. En revanche, l'anticorps anti-NK3 est polyclonal et pouvait tout à fait être couplé au marquage BrdU. De plus, l'expression de NK3 dans le LHA est associée à celle des neurones à MCH car il n'existe pas ou très peu de neurones NK3 seul. Des neurones doublement marqués pour NK3 et BrdU ont été observés à E11 et E12 uniquement, suggérant que les neurones à MCH exprimant CART/NK3 naissent à ces stades (Figure 26).

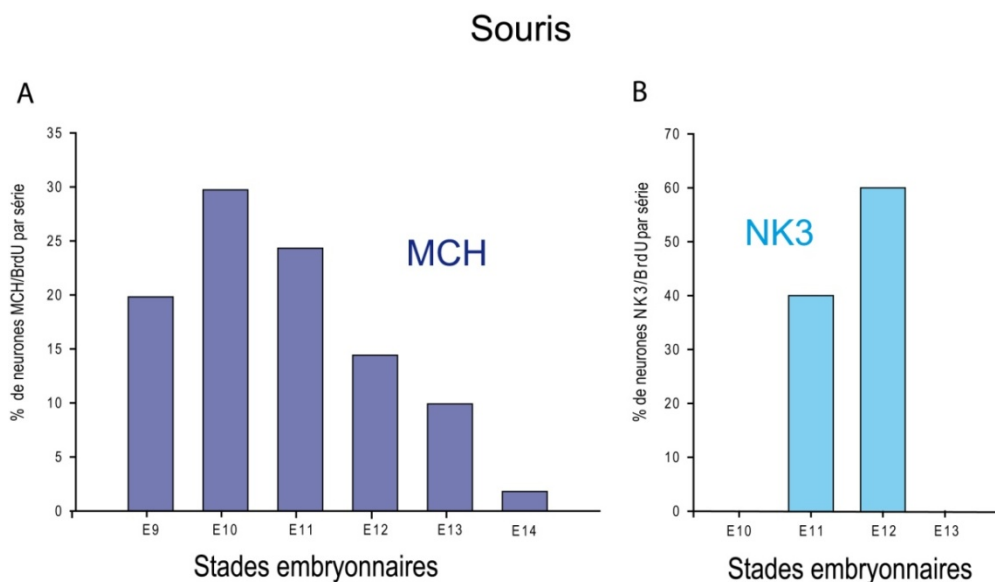


Figure 26 Graphiques résumant la genèse des neurones à MCH et des neurones NK3 chez la souris.

(A) Les neurones à MCH sont générés de E9 à E14 avec un pic précoce à E10. (B) Les neurones NK3, représentant la sous-population de type B des neurones à MCH naissent entre E11 et E12.

2. Genèse des neurones à hypocretine

Les neurones à Hcrt sont co-localisés avec les neurones à MCH dans l'hypothalamus postérieur de rat et de souris (Steininger et al. 2004; Hahn 2010). Des études de neurogenèse réalisées par notre équipe ont montré que ces neurones naissent chez le rat, entre E11 et E14 avec un pic à E12 (Amiot et al. 2005). Le pic étroit de genèse de ces neurones est entre les pics de genèse des neurones à MCH de type A à projections spinales et les neurones de type B à projections corticales. Ainsi, nous avons vérifié chez la souris si les neurones à Hcrt étaient générés selon le même profil et donc, si nous pouvions comparer la genèse des neurones à MCH à celle de ces neurones comme chez le rat. Le matériel a été le même que celui utilisé pour la genèse des neurones à MCH (**Figure 25**). Seules les coupes passant par l'hypothalamus ont été étudiées. 80% des neurones doublement marqués Hcrt/BrdU ont été observés après injection à E10 et seulement quelques uns après injection à E11 (**Figure 27**). Comme pour le rat, aucun gradient concernant la mise en place de ces neurones n'a été observé. La signification de ce résultat est interprétée dans la discussion (p164).

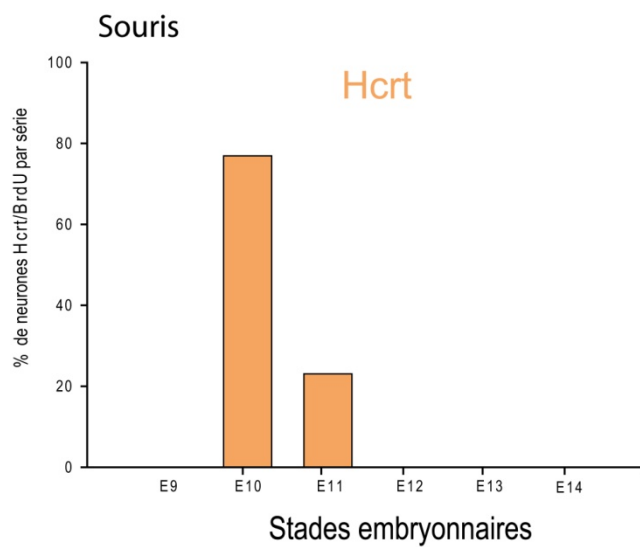


Figure 27 Graphique illustrant la genèse des neurones à Hcrt dans l’hypothalamus de souris.

Les neurones à Hcrt naissent en un pic étroit entre E10 et E11. Environ 80% des neurones à Hcrt sont générés à E10.

DISCUSSION

Cette étude comparative était destinée à caractériser dans le modèle de souris, les sous-populations de neurones à MCH identifiées chez le rat. Cependant, ce qui n'aurait pu être qu'un préambule à notre projet principal, nous a conduits à identifier des différences dans l'organisation morphofonctionnelle du système à MCH entre ces deux espèces. Ces différences nous ont semblé significatives et de ce fait, méritaient d'être approfondies.

I. Distribution comparée des péricaryons MCH chez le rat et la souris

La grande ressemblance des hypothalami rat et souris est évidente. Néanmoins, il nous a fallu lever une première difficulté mineure puisque historiquement, nous utilisons, dans notre équipe l'atlas 'Brain Maps' de L.W. Swanson dans lequel des divisions cytoarchitectoniques de rat ne sont pas reconnues par G. Paxinos, auteur du plus récent atlas du cerveau de souris (Paxinos et Franklin 1997; Swanson 1998). Nous nous sommes donc assurés par l'examen de coupes frontales d'hypothalamus de souris et rat colorées par la méthode de Nissl ou par le DAPI que la nomenclature et les divisions cytoarchitectoniques de L.W. Swanson pouvaient s'appliquer aux deux espèces, notamment pour les structures riches en neurones à MCH. Ces divisions différaient essentiellement au niveau du PVp, qui pour G. Paxinos appartient pour partie au noyau arqué et l'autre au noyau dorsomédian.

Tout comme chez le rat, les neurones à MCH de souris sont observés en grand nombre dans l'hypothalamus latéral, proche du pédoncule cérébral. Certains sont également présents dans les régions hypothalamiques antérieures, comme ventralement au PVN mais aussi dans la *zona incerta*. La différence la plus nette entre les deux espèces a concerné la quasi absence de corps neuronaux dans le PVp. Seulement un ou deux péricaryons sont présents dans cette structure. Cette distribution des neurones à MCH dans l'hypothalamus de rat a été détaillée

avec plus de précisions par Hahn (2010). Cet auteur a particulièrement bien décrit le groupe de neurones dans le PVp. Ces derniers semblent plus petits que ceux en position plus latérale (Skofitsch et al. 1985; Zamir et al. 1986; Bittencourt et al. 1992; Hahn 2010). Il est cependant à noter que Hahn signalait quelques péricaryons à l'intérieur de la frontière dorsomédiane du VMH. Nous sommes en désaccord sur ce point de détail. En effet, sur notre matériel de rat, ces péricaryons sont à la limite externe de cette frontière. Chez la souris, aucun péricaryon n'a été observé dans le VMH. Cette analyse de la distribution comparée des neurones à MCH ne concerne que la localisation des corps cellulaires par rapport aux frontières cytoarchitectoniques. Aucune quantification n'a été effectuée car elle n'était pas indispensable à la poursuite de nos travaux. Il est évident qu'une telle analyse quantitative serait nécessaire afin de compléter cette étude comparative. Cependant, il nous a semblé lors de ce travail, que les neurones médians (région rostro-médiane de la ZI, capsule du VMH, hypothalamus postérieur) étaient proportionnellement moins nombreux chez la souris.

Deux sous-populations distinctes basées sur la co-expression de MCH avec le peptide CART et le récepteur tachyninergique NK3 peuvent aussi être distinguées mais en proportion différente de chez le rat. Chez la souris, seulement 44,5% des neurones à MCH expriment le peptide CART contre 68% chez le rat. Les neurones à MCH/CART expriment également NK3. Ces cellules sont observées comme chez le rat préférentiellement dans l'hypothalamus rostral médian et dans la *zona incerta* (Cvetkovic et al. 2004). Latéralement, peu de neurones MCH sont CART.

II. Distribution comparée des projections MCH chez la souris et le rat

La distribution des projections MCH est très similaire entre le rat et la souris. Cependant, des différences notables ont été observées lorsqu'elle est analysée en détails. En effet, des dissemblances dans l'innervation du cortex piriforme, du globus pallidus et de l'hypothalamus ventromédian sont incontestables. Ces variations suggèrent l'intégration de ces neurones dans des voies nerveuses télencéphaliques et hypothalamiques distinctes.

1. Innervation du noyau arqué

La différence d'innervation de la partie ventrale de l'ARH entre le rat et la souris nous a semblé être particulièrement intéressante par égard aux implications fonctionnelles des neurones à MCH. L'ARH est impliqué dans le contrôle de la balance énergétique. La littérature est riche en publications concernant les neurones à MCH dans ce domaine (pour revue, Griffond et Risold 2009). La partie ventrale de l'ARH incluant les neurones à POMC/CART est intensément innervée par les axones MCH chez le rat. Ces neurones, avec ceux contenant le neuropeptide Y (NPY) de la région plus dorsale de l'ARH jouent un rôle majeur dans le contrôle de la balance énergétique. En 2003, des études ont suggéré que l'effet orexigène de MCH pouvait s'effectuer par un contrôle direct des neurones POMC (Abbott et al. 2003). En effet, une injection de MCH dans l'ARH de rat entraîne une augmentation de la prise alimentaire. Cependant, l'absence d'une intense innervation de l'ARH de souris par les axones MCH indique que cette hormone ne peut pas être impliquée dans les mêmes circuits de contrôle des neurones à POMC.

L'origine de cette innervation est inconnue chez le rat, il est cependant tentant de corréler l'absence d'axones MCH dans l'ARH à l'absence de péricaryons MCH dans le PVp chez la souris. Chez le rat, des études de traçage antérograde de voies nerveuses dans le LHA (Hahn et Swanson 2010), dans la partie rostromédiane de la *zona incerta* (Sita et al. 2007) et dans le noyau dorsomédian (Thompson et al. 1996) n'ont jamais reporté une innervation de l'ARH. Tandis que des études de traçage antérograde dans la région ventrale prémammillaire montrent que des neurones de cette région projettent abondamment sur le noyau arqué (Canteras et al. 1992). Certaines parties du PVp sont considérées comme appartenant à l'ARH par Paxinos renforçant l'idée que des relations anatomiques existent entre le PVp et l'ARH.

2. Innervation du globus pallidus

Chez la souris comme chez le rat, les neurones à MCH innervent le globus pallidus. Les fibres MCH atteignent ces structures télencéphaliques en suivant le mfb. Elles peuvent aussi, pour les plus latérales, rejoindre le télencéphale par *l'ansa peduncularis* ou encore suivre le pédoncule cérébral et la capsule interne. Chez le rat, ces fibres innervent en passant la partie médiane et ventrale du pallidum dorsal ou globus pallidus, au voisinage immédiat de la capsule interne ; la partie externe de cette structure ne contient que des fibres de passage en direction des aires corticales latérales. Ainsi chez le rat, ce territoire d'innervation correspond à la distribution des neurones cholinergiques mais épargne les aires latérales, riches en neurones parvalbumine (Cvetkovic 2003). En revanche, chez la souris, la région latérale du globus pallidus est aussi intensément innervée par les fibres MCH et des contacts ont été observés avec les neurones parvalbumine-positifs nombreux dans cette structure.

Il est difficile d'évaluer la signification fonctionnelle de cette observation sans données expérimentales. La distribution des axones MCH suggère que ce peptide peut être impliqué dans le circuit de la récompense. Différentes structures cérébrales tout le long du mfb incluant

l'aire tegmentale ventrale, le globus pallidus, le noyau accumbens, le LHA, le septum et le cortex préfrontal sont impliquées dans cette réponse. Ce circuit est lié à la motivation nécessaire à la réalisation de comportements adaptés tels que la recherche de nourriture ou encore la reproduction.

Plus spécifiquement, les neurones parvalbumine-positifs du globus pallidus sont directement innervés par les afférences GABAergiques et enképhalinergiques du striatum qui sont inhibitrices et par les afférences excitatrices du noyau sous-thalamique (Gerfen et Wilson 1996). Ils projettent par voie descendante sur le noyau sous-thalamique et le noyau entopédonculaire mais aussi sur la substance noire.

Ces projections MCH chez la souris, suggèrent également l'implication plus importante des neurones correspondants dans les comportements moteurs volontaires. En effet, les structures associées aux noyaux de la base sont connues pour être impliquées de manière cruciale dans le contrôle des mouvements et la coordination sensori-motrice, avec le noyau sous-thalamique et la substance noire. L'implication du peptide MCH et de son récepteur MCH-R1 dans de telles fonctions locomotrices est suggérée par l'augmentation de l'activité physique et locomotrice des souris MCH^{-/-} et MCH-R1^{-/-} (Shimada et al. 1998; Chen et al. 2002; Marsh et al. 2002).

3. Innervation du cortex piriforme

Chez la souris, le cortex piriforme n'est pas innervé par les axones MCH contrairement au rat. Chez le rat, cette innervation est abondante dans les régions dorsales de ce champ cortical, suggérant d'ailleurs une divergence fonctionnelle d'avec les champs ventraux. Incidemment, des études récentes concernant l'appétitivité et la réalimentation réalisées dans notre laboratoire, révèlent une activité c-fos variable selon le champ cortical du cortex piriforme

(communication personnelle de Sandrine Chometton et du Dr Nadège Morand). L'absence d'innervation MCH de ces champs corticaux chez la souris, suggère implicitement que le peptide MCH n'intervient pas dans la médiation du message olfactif dans cette structure.

4. Innervation du cortex cérébral

Contrairement aux observations faites chez le rat indiquant que la quasi-totalité des axones télencéphaliques expriment CART (Cvetkovic et al. 2004), nous avons constaté, sans toutefois le quantifier, la présence de peu de fibres MCH/CART dans les régions corticales de cerveau de souris.

L'existence de nombreuses fibres CART-non MCH laisse penser à une source CART autre que celle des neurones du LHA. Chez le rat, très peu de fibres CART-non MCH dans le cortex cérébral ont été observées. La distribution des fibres CART corticales ne fait pas penser à une origine locale (cortico-corticales) bien que l'ARNm CART ait été identifié par hybridation *in situ* dans le cortex cérébral de souris. Les fibres CART sont présentes dans toutes les couches et sont longues. Elles pourraient provenir de régions du télencéphale basal. Peu de littérature existe sur la distribution du peptide CART ou de son messager chez la souris et l'origine de ces projections reste inconnue.

L'observation de nombreuses fibres MCH-non CART peut s'expliquer par la plus faible proportion de neurones MCH/CART projetant sur le cortex cérébral de souris. En effet, 60% des neurones MCH à projections corticales sont MCH/CART contre 85% chez le rat (Brischoux et al. 2002).

Un niveau d'expression de CART plus faible dans ces fibres peut encore s'expliquer par une mauvaise détection de l'immunomarquage CART chez la souris. Cependant, deux immunosérums ont été utilisés et ont fourni les mêmes images.

Contrairement à l'étude entreprise chez le rat, nous n'avons pas effectué d'injection de traceur rétrograde dans la moelle épinière des souris. L'invalidité et la souffrance engendrées aux souris n'étaient ni indispensables, ni essentielles dans cette étude.

III. Genèse comparée des neurones à MCH

Afin de déterminer la genèse des neurones à MCH chez la souris, la technique de datation par le BrdU a été utilisée. L'étude du marquage BrdU révèle un gradient latéro-médian de neurogenèse hypothalamique déjà décrit par Altman et Bayer (1978a; 1978b; 1986) et Brischoux et al. (2001). L'ensemble de la population MCH est généré en un pic évasé, s'étalant sur plusieurs jours (E9 à E14). Ce résultat est tout à fait similaire à ce qui a été décrit chez le rat. Par comparaison, les neurones à Hcrt sont générés en un pic autour de E10 coïncidant avec celui de genèse des neurones à MCH. Cependant, ce pic est plus étroit que celui des neurones à MCH puisque ces neurones ne sont produits que de E10 à E11. Associées à l'observation du gradient de neurogenèse latéro-médian décrit dans l'hypothalamus, ces observations sont cohérentes avec l'aire de distribution de ces neurones dans l'hypothalamus adulte. Les neurones à Hcrt ont une aire de distribution plus réduite que celle des neurones à MCH, restreinte à l'aire périfornicale.

Dans notre étude, nous avons couplé cette technique à la détection du récepteur NK3, présent dans les neurones à MCH appartenant à la seconde sous-population. Les neurones NK3 naissent à E12 indiquant qu'aux stades précédents (entre E9 et E12), sont générés essentiellement des neurones à MCH-non CART/NK3. Comparés au pic de genèse des neurones à Hcrt, les neurones MCH/CART/NK3 sont générés plus tardivement, comme chez le rat. Ainsi, chez la souris, deux sous-populations de neurones à MCH existent et sont similaires à celles observées chez le rat. Une première sous-population de neurones naît

précocement et les neurones la composant n'expriment ni CART, ni NK3. La seconde est composée de neurones naissant plus tardivement et exprimant CART et NK3. Ces neurones sont plus médians et participent majoritairement aux projections corticales. Des différences importantes existent tout de même puisqu'une large proportion de projections MCH dans le cortex cérébral est originaire des neurones MCH-non CART. Ce déficit en afférence CART fournie par une des sous-populations MCH dans le cortex cérébral, pourrait être compensé par des afférences d'origines différentes, à identifier chez la souris. Il reste également à déterminer si ces afférences MCH-non CART dans le cortex cérébral sont des collatérales des projections spinales chez cette espèce.

IV. Conclusions de la première partie

Chez la souris, le pic de genèse des neurones à Hcrtr est coïncident avec celui des neurones à MCH-non CART. Ceci peut être corrélé à l'observation que les neurones à MCH/CART médians sont moins abondants mais aussi à l'absence de neurones périventriculaires dans le PVp. En effet, ce groupe de neurones à MCH du PVp naît à la fin du pic de genèse chez le rat (Brischoux et al. 2001). Chez la souris, il semble que la genèse du système à MCH diminue fortement avant la production des neurones de l'hypothalamus périventriculaire expliquant le nombre restreint de neurones MCH médians et périventriculaires mais aussi l'absence de projections MCH sur le noyau arqué. Il semble, ainsi, que le système à MCH subit une 'latéralisation' dans son organisation chez la souris. L'innervation des régions latérales du globus pallidus est peut être aussi une conséquence de ce phénomène. La variation des projections des neurones à MCH entre la souris et le rat semble donc être le reflet de la distribution des péricaryons dans l'hypothalamus et ainsi du développement de ce système. Chez le rat et la souris, il semblerait que ce système soit impliqué dans des fonctions utilisant

des mécanismes similaires (ex : contrôle du cycle veille/sommeil par des liens avec la réticulée), ou au contraire distincts (ex : comportements alimentaires avec des connexions différentes avec le noyau arqué et le cortex olfactif).

L'objectif de cette première partie était de caractériser les sous-populations MCH chez la souris. Ces sous-populations existent et la souris peut ainsi être utilisée comme modèle dans notre étude. Cependant, certaines différences font que ces sous-populations sont mieux différenciées chez le rat et il sera nécessaire d'entamer des études complémentaires chez la souris afin de mieux les caractériser et ainsi de vérifier l'existence de neurones MCH-non CART à projections corticales mais ne projetant pas dans la moelle épinière. Pour cette étude, certains travaux seront préférentiellement réalisés chez le rat, notamment l'analyse de la différenciation des neurones au cours du développement après injection de BrdU pendant les pics de genèse des neurones à MCH à projections spinales ou corticales.

PARTIE II
RESULTATS

L'objectif essentiel de mon travail était de comprendre les conditions dans lesquelles les neurones à MCH se différencient afin d'expliquer l'existence des sous-populations caractérisées chez le rat et la souris. Cette étude a été abordée sous trois angles :

- L'étude fine de la neurogenèse et de la différenciation des neurones à MCH chez l'embryon,
- La confrontation des distributions de différents facteurs de transcription et de MCH et l'étude de l'effet de Shh. Ces travaux s'inscrivent à la suite de ceux entrepris lors d'une précédente thèse réalisée dans notre équipe par C. Amiot.
- L'étude de la différenciation des projections des neurones à MCH et de l'implication de protéines de guidage axonal ainsi que de leurs récepteurs spécifiques.

I. Différenciation du système MCH dans l'hypothalamus postérieur de l'embryon de souris

1. Définition de l'axe de l'embryon

Afin de faciliter la description de la distribution des différents gènes du développement et d'autres marqueurs, il était nécessaire de définir les grands axes du cerveau de rat ou de souris au cours du développement. En effet, la présence de la courbure céphalique chez les embryons entraîne une confusion dans la définition de ces axes, notamment horizontal et transversal. Ceux-ci sont, en principe définis, selon l'axe antéropostérieur du tube nerveux. Cet axe correspond à celui du *sulcus limitans* dans les régions postérieures du tube séparant la plaque alar de la plaque basale mais il n'existe pas de consensus dans les régions antérieures, prosencéphaliques (Nieuwenhuys et al. 1997). Nous avons défini l'axe horizontal

embryonnaire de la même manière qu'il l'est chez l'adulte. Au cours du développement, ce plan se rapproche de celui de l'adulte. Nous avons ainsi défini arbitrairement, un axe rostro-caudal et dorso-ventral (**Figure 28**).

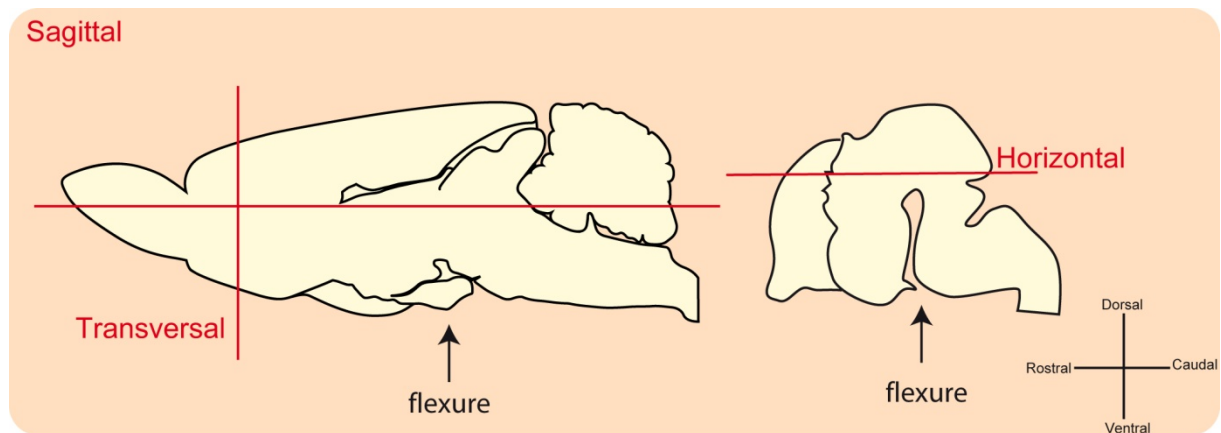


Figure 28 Plan de coupe de cerveau adulte ou embryonnaire de rat utilisé dans cette étude (Amiot 2006).

2. Le système à MCH chez les embryons de souris de type sauvage et MCH-GFP

Plusieurs lignées de souris ont été utilisées au cours de notre étude. Des données concernant la différenciation des neurones à MCH ont été obtenues pour chacune d'entre elles et sont rassemblées dans le paragraphe ci-dessous. Les informations les plus abondantes et aussi les plus significatives ont été obtenues chez des souris Swiss CD1 mais aussi avec des souris C57Bl/6 MCH-GFP. Des données fragmentaires ont concerné des embryons de souris *Shh*^{-/-}.

Les premiers neurones à MCH détectés par hybridation *in situ* ou immunohistochimie, sont en position très latérale dans le manteau de l'hypothalamus postérieur d'embryons E11 (Figure 29 et Figure 30). Ce stade est caractérisé par l'épaississement du manteau, il va de paire avec la différenciation des structures, telles que les régions rétrochiasmiques et des tractus de fibres, comme le *tpoc* (Partie II, III.1 Traçage des tractus pionniers par le DiI, p200 et III.2 Immunohistochimie GFP, p204). A partir du stade E12, ces neurones sont toujours observés dans une fine zone du LHA présomptif mais le nombre de péricaryons augmente. Quelques neurones sont observés plus médialement mais forment un amas moins compact. La distribution adulte est reconnue au stade E16.

L'étude immunohistochimique met en évidence les changements morphologiques des neurones à MCH caractéristiques de leur maturation. Aux stades précoces (E11-E13), les neurones à MCH conservent un aspect neuroblastique, avec un noyau volumineux et une fine couche cytoplasmique perinucléaire. Pendant les stades suivants, l'arborisation dendritique proximale est mieux mise en évidence par le marquage immunohistochimique et le cytoplasme des corps cellulaires semble plus abondant.

Les premiers axones sont observés avec l'apparition des premiers neurones à E11. A E14, le nombre de fibres immunoréactives pour MCH augmente et ces fibres sont déjà observées en direction des régions les plus postérieures du SNC. Des fibres marquées, dirigées vers les régions antérieures sont présentes. Elles sont trouvées dans le mfb (Immunohistochimie GFP, p204) mais ne pénètrent pas encore le télencéphale. Cependant, l'immunohistochimie MCH ou NEI ne permet pas d'en observer un grand nombre pendant le développement. En fait, l'utilisation d'un modèle de souris MCH-GFP s'est avérée indispensable car la détection immunohistochimique de la protéine GFP est beaucoup plus sensible sur les coupes que celle de MCH.

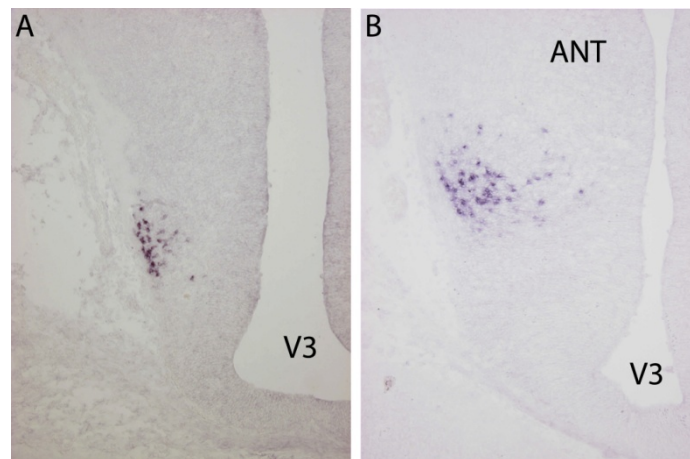


Figure 29 Distribution des péricaryons MCH marqués par hybridation *in situ* chez l'embryon de souris.

(A) Les premiers neurones MCH sont observés par hybridation *in situ* à E11 en position latérale dans le manteau de l'hypothalamus postérieur.

(B) A E14, le nombre de péricaryons marqués augmente et certains sont retrouvés en position médiane.

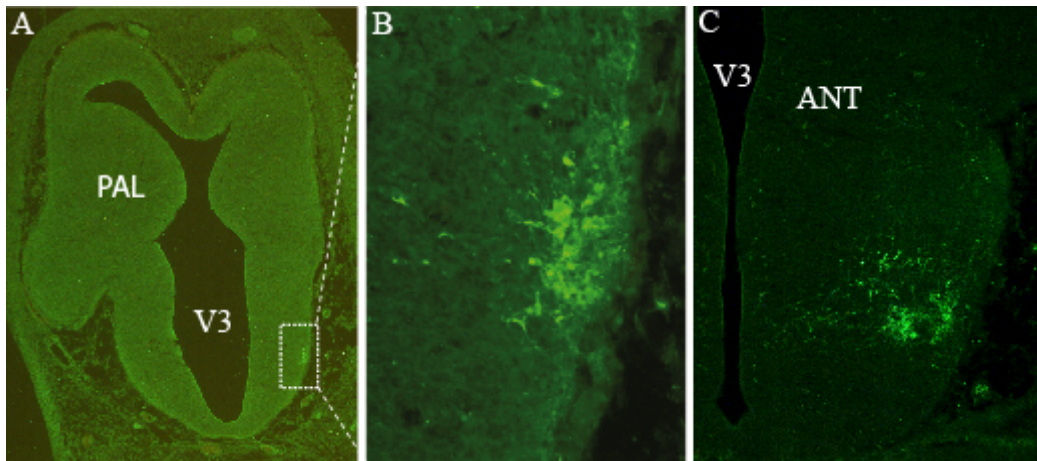


Figure 30 Distribution des péricaryons MCH marqués par immunohistochimie chez l'embryon de souris.

(A-B) Les premiers neurones immunomarqués par MCH sont également observés à E11 en position latérale dans l'hypothalamus postérieur de souris. Les premiers axones sont observés à ce stade.

(C) Plus tardivement, à E14, le nombre de péricaryons immunomarqués augmente et certains sont présents dans les régions médianes de l'hypothalamus postérieur.

Comme sur les embryons de souris Swiss CD1, les neurones à MCH-GFP sont détectés grâce à des anticorps anti-GFP, dans l'hypothalamus postérieur d'embryons E11, en position très latérale dans le manteau naissant (Figure 31). La distribution obtenue par immunohistochimie et par hybridation *in situ* pour pMCH est semblable. Ces neurones immunoréactifs pour GFP sont peu nombreux et ne montrent pas de profil de migration. A E12, le nombre de péricaryons GFP-positifs latéraux augmente et des neurones en position plus médianes et présentant un profil de migration sont observés (Figure 31). Les péricaryons se situent dans l'épaisseur du neuroépithélium germinatif et montrent des dendrites orientées selon la direction de la migration. Les péricaryons présentent un marquage immunohistochimique anti-GFP moins intense que les plus latéraux, suggérant qu'ils acquièrent leur phénotype chimique au cours de leur migration et de l'épaississement du manteau. A E14, un neurone GFP-positif envoyant un axone radialement dans toute l'épaisseur du manteau a été observé juste après sa sortie du neuroépithélium germinatif (**Figure 32**). Ce profil de distribution des péricaryons GFP-positifs est identique au stade E15 avec un nombre de péricaryons et de fibres MCH plus important.

Parce que l'étude de la différenciation des projections MCH est en fait, un des objectifs des travaux de la seconde partie de ce mémoire, la description de la croissance des axones MCH sera détaillée dans le paragraphe III.2 Immunohistochimie GFP.

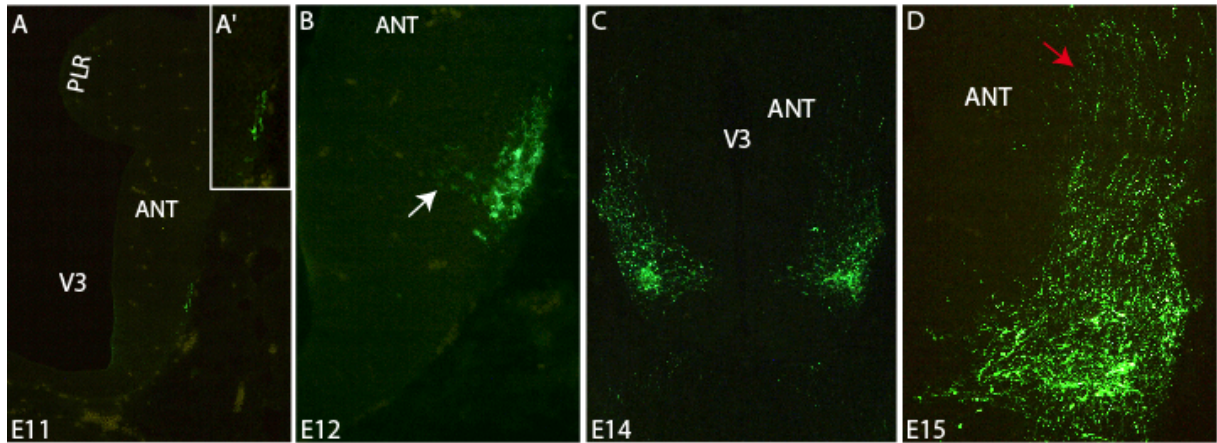


Figure 31 Microphotographies de marquages immunohistochimiques illustrant l'ontogenèse de neurones GFP-MCH sur des coupes horizontales de cerveaux d'embryons de souris.

(A) Les premiers neurones immunomarqués par GFP sont observés à E11 dans l'hypothalamus postérieur latéral. A ce stade, seuls quelques péricaryons sont observés. Les premières fibres sont aussi présentes à ce stade (A').

(B) A E12, le nombre de péricaryons immunomarqués augmente et certains sont observés dans les régions médianes de l'hypothalamus (flèche blanche) avec toutefois, une intensité de marquage plus faible. Beaucoup plus de fibres GFP-positives sont détectées à proximité des péricaryons.

(C-D) A E14 et à E15, le nombre de péricaryons immunoréactifs pour GFP augmente fortement, de même que celui des fibres. Des péricaryons GFP-positifs sont observés dans les régions latérales et médianes de l'hypothalamus postérieur. Les fibres GFP-positives se dirigent en grande nombre vers les régions antérieures du cerveau (flèche rouge).

ANT : aire hypothalamique antérieure ; PLR : éminence du pallidum ; V3 : troisième ventricule.

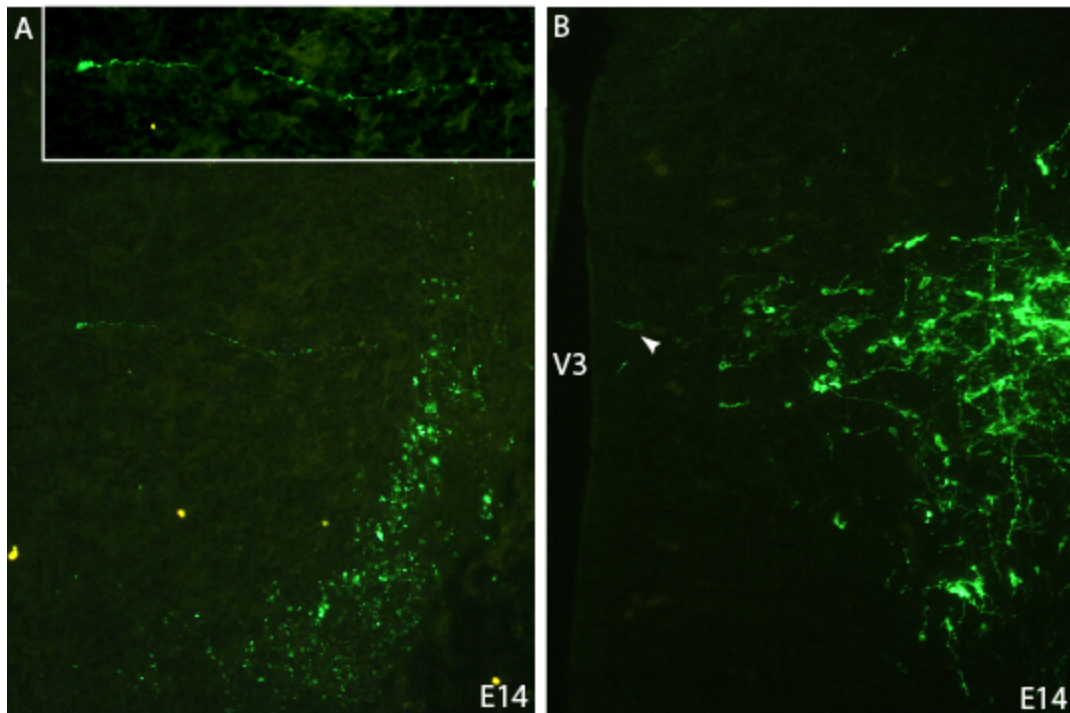


Figure 32 Microphotographies illustrant le profil de 'migration' des neurones GFP-MCH.

(A) Microphotographies illustrant un axone GFP dans l'épaisseur du manteau de l'hypothalamus postérieur à E14 et dont le corps cellulaire se situe à la frontière du neuroépithélium germinatif. Un grossissement de ce neurone est observé dans l'encadré.

(B) Les neurones GFP-MCH positifs sont présents dans toute l'épaisseur du manteau mais certains sont aussi observés dans le neuroépithélium germinatif bien que l'intensité du marquage GFP soit plus faible (tête de flèche). Les neurones GFP-positifs montrent un profil de 'migration' radiale.

V3 : troisième ventricule.

II. Prolifération cellulaire dans le neuroépithélium germinatif prosencéphalique et mésencéphalique

Ce travail a été initié chez le rat car les pics des sous-populations des neurones à MCH y sont mieux définis. Les embryons ont été prélevés séquentiellement après 2, 6, 10h et 1, 2, 3, 4

jours après injection de BrdU à E11 et 24, 48 et 96h après injection à E12,5. Ces injections de BrdU ont été effectuées à des femelles gestantes aux stades E11 et E12,5 correspondant à chacun des deux pics de genèse des sous-populations de types A et B des neurones à MCH chez le rat. La distribution du BrdU a ensuite été analysée sur des coupes en paraffine ou au cryostat des embryons.

1. Distribution du marquage BrdU

Au stade E11, le neuropore antérieur est fermé et les cinq vésicules cérébrales télencéphalique, diencéphalique, mésencéphalique, métencéphalique et myélencéphalique sont formées. Il n'y a pas encore de couche de manteau dans le tube nerveux qui n'est donc formé que d'un épithélium pseudostratifié.

L'étude du marquage BrdU, 2, 6 et 10h après l'injection à E11, indique que la prolifération est active tout le long du tube nerveux (Figure 33). En effet, le marquage BrdU est uniforme dans toute la longueur du neuroépithélium germinatif du tube nerveux, des régions les plus antérieures du SNC vers les régions les plus postérieures. Aucune régionalisation n'est détectée. Cependant, des différences de localisation des noyaux intensément marqués par le BrdU sont observées dans l'épaisseur du neuroépithélium germinatif. Ainsi, deux heures après l'injection de BrdU à E11, les noyaux BrdU-positifs sont localisés dans la partie basale du neuroépithélium ; six heures après l'injection, ces noyaux sont observés dans toute l'épaisseur du neuroépithélium et après dix heures, des noyaux intensément marqués se trouvent accolés à la surface ventriculaire. Ce profil correspond aux mouvements 'interkinetic' des noyaux dans l'épaisseur du neuroépithélium : les noyaux oscillent entre les phases G1, S, G2 et la mitose (Figure 33 A-D). Les noyaux situés en position externe du neuroépithélium sont en phase S et viennent d'incorporer le BrdU, 2 heures après injection ; ceux dans l'épaisseur du

neuroépithélium, 6h après injection sont entrés en phase G2 et 10 heures après injection, les cellules marquées sont observées à la surface ventriculaire sont en mitose.

C'est seulement un jour après l'injection, c'est-à-dire au stade E12 que les premiers noyaux intensément marqués par le BrdU sont observés dans la couche du manteau (Figure 33 E). Aux stades E13 et E14, des noyaux BrdU-positifs sont présents tout le long d'une bande allant des régions chiasmatisques au mésencéphale ventral (Figure 33 F-J). Sur des coupes horizontales passant dorsalement à l'hypothalamus, des noyaux intensément marqués par le BrdU sont observés dans les régions hypothalamiques antérieures et dans le télencéphale basal. Plus ventralement, les régions préoptiques sont aussi marquées. Aucune autre région du manteau n'a incorporé le BrdU à ce stade.

2. Expression de MCH dans les neurones BrdU-positifs

Le phénotype MCH apparaît à E13 chez le rat mais seuls quelques neurones sont détectés (Brischoux et al. 2001). Les doubles marquages MCH/BrdU ont donc été effectués à E14, soit 72 heures après l'injection (Figure 34; Tableau 4). Les neurones doublement marqués étaient cependant peu nombreux. Afin d'augmenter le nombre de neurones MCH/BrdU positifs, les mères gestantes (E11 et E12,5), ont reçu une injection de BrdU toutes les deux heures pendant huit heures. Nous avons par la suite révélé les marquages MCH/BrdU et nous avons compté le nombre de neurones doublement marqués. Après injection à E11, 42,8% des neurones à MCH à E14 sont immunoréactifs pour le BrdU. Seuls les neurones contenant un noyau intensément marqué pour le BrdU ont été comptabilisés (Tableau 4).

Après injection à E12,5, correspondant au pic de genèse des neurones à MCH de type B à projections corticales, la distribution des noyaux intensément marqués par le BrdU est complémentaire à celle observée après injection à E11 (Figure 34).

Les noyaux BrdU, après injection à E11, sont regroupés latéralement alors que les cellules ayant incorporé le BrdU à E12,5 semblent se localiser à la périphérie médiane de cet amas latéral sur nos coupes horizontales. A l'exception du faible nombre de noyaux BrdU-positifs après injection à E12,5 dans les territoires correspondant au marquage après injection E11, aucune régionalisation claire des noyaux E14 n'était observée. Ces noyaux se distribuent dans l'ensemble des aires diencéphaliques différenciées à E14. Après injections multiples de BrdU à E12,5, 15,5% de neurones à MCH contiennent un marquage BrdU. Ces résultats suggèrent que des neurones à MCH générés à E11 ont différencié leur phénotype chimique à E14 et que peu de neurones issus du second pic l'ont fait. Le nombre de neurones à MCH comptabilisé après injections multiples de BrdU était très inférieur à celui obtenu après injection simple, signifiant que le BrdU perturbe l'activité mitotique des progéniteurs des neurones à MCH.

Figure 33 Analyse séquentielle du marquage BrdU

(A-C) Microphotographies illustrant les noyaux marqués par le DAPI et le BrdU après injection à E11. Ces photographies montrent les mouvements ‘interkinetic’ des noyaux dans le neuroépithélium germinatif sur des coupes d’embryons sacrifiés seulement 2, 6 ou 10 heures après l’injection de BrdU.

(A) Deux heures après l’injection de BrdU, les noyaux marqués se situent dans la partie basale du neuroépithélium germinatif, suggérant que les cellules marquées sont en phase S du cycle cellulaire.

(B) Six heures après l’injection, les noyaux BrdU-positifs sont observés dans toute l’épaisseur du neuroépithélium, ces cellules sont en phase G2.

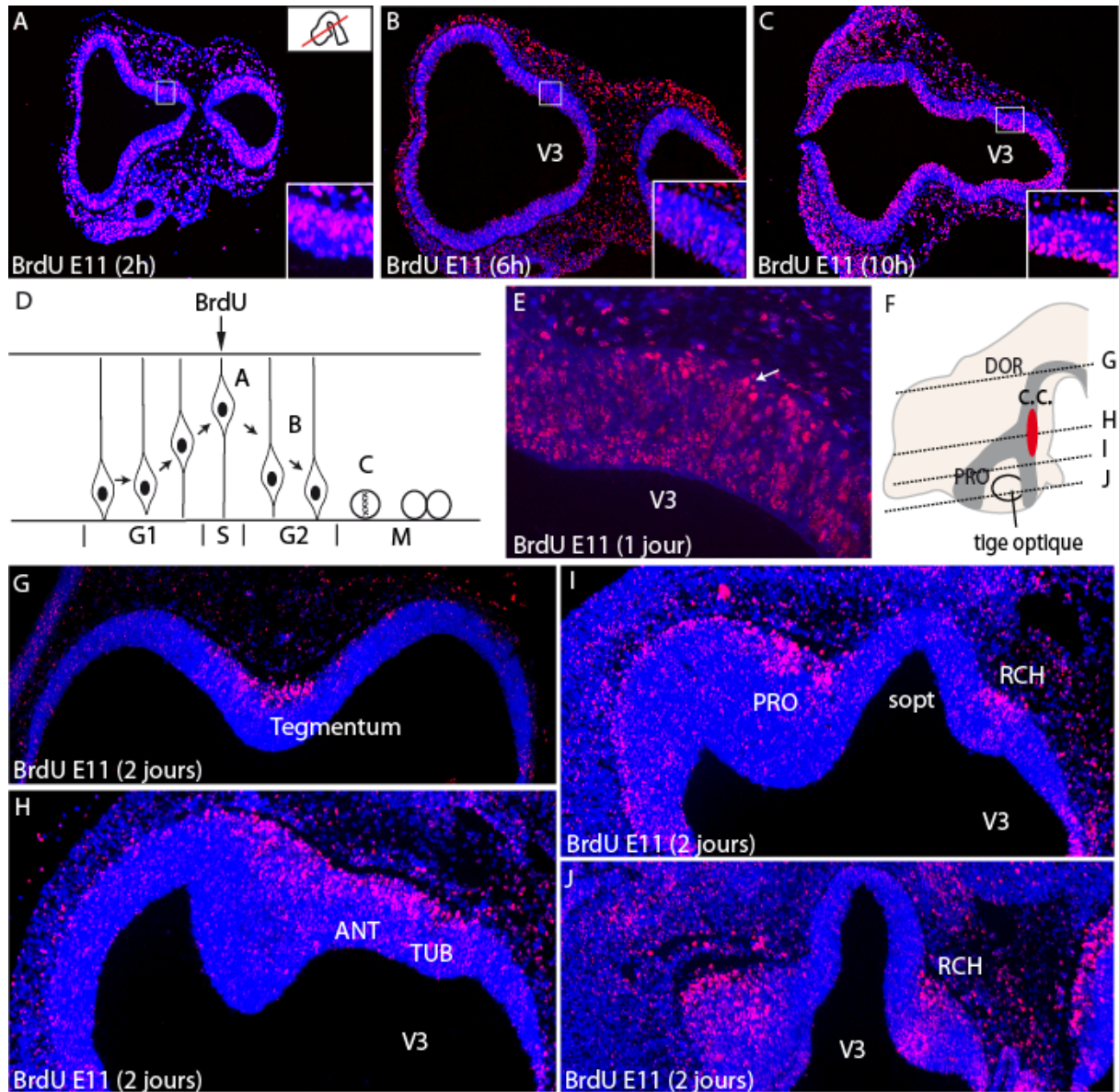
(C) Dix heures après l’injection de BrdU, le marquage BrdU intense et ponctiforme à la surface ventriculaire suggère que les cellules sont en mitose.

(D) Schéma illustrant les mouvements ‘interkinetic’ des noyaux dans l’épaisseur du neuroépithélium germinatif (Takahashi et al. 1996).

(E) Un jour après l’injection de BrdU, les noyaux BrdU-positifs sont observés en dehors du neuroépithélium germinatif et envahissent le manteau en formation de l’hypothalamus dorsal.

(G-J) Photographies montrant le marquage BrdU et DAPI sur des coupes horizontales de cerveau de rat à E13 après injection de BrdU à E11. La distribution des noyaux BrdU-positifs est schématisée en F. Les coupes sont disposées des plus dorsales aux plus ventrales. Les noyaux BrdU-positifs sont observés dans une bande longitudinale allant des régions chiasmatiques aux régions du mésencéphale ventral. De très nombreux noyaux BrdU-positifs sont aussi présents dans les régions préoptiques.

ANT: aire hypothalamique antérieure; cc : cell cord; DOR : thalamus dorsal ; PRO : hypothalamus préoptique ; TUB : hypothalamus tubéral ; RCH : aire rétrochiasmatique ; V3: troisième ventricule.



| | Stade d'injection du BrdU | Nombre de neurones MCH | Nombre de neurones MCH/BrdU positifs | % MCH/BrdU vs MCH |
|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------|----------------------|
| Injection simple de BrdU | E11 | 362 | ND | ND |
| | E12,5 | 388 | ND | ND |
| Injections multiples | E11 à E11,5 | 271 | 116 | 42,8 |
| | E12,5 à E13 | 263 | 41 | 15,5 |

Tableau 4 Nombre de neurones à MCH et proportion de neurones MCH/BrdU positifs comparés au nombre de neurones MCH après injection de BrdU à E11 ou E12,5 et sacrifice à E14.

Le nombre de neurones à MCH diminue après injections multiples de BrdU comparé à une injection simple. La majorité des neurones présents à E14 sont nés à E11

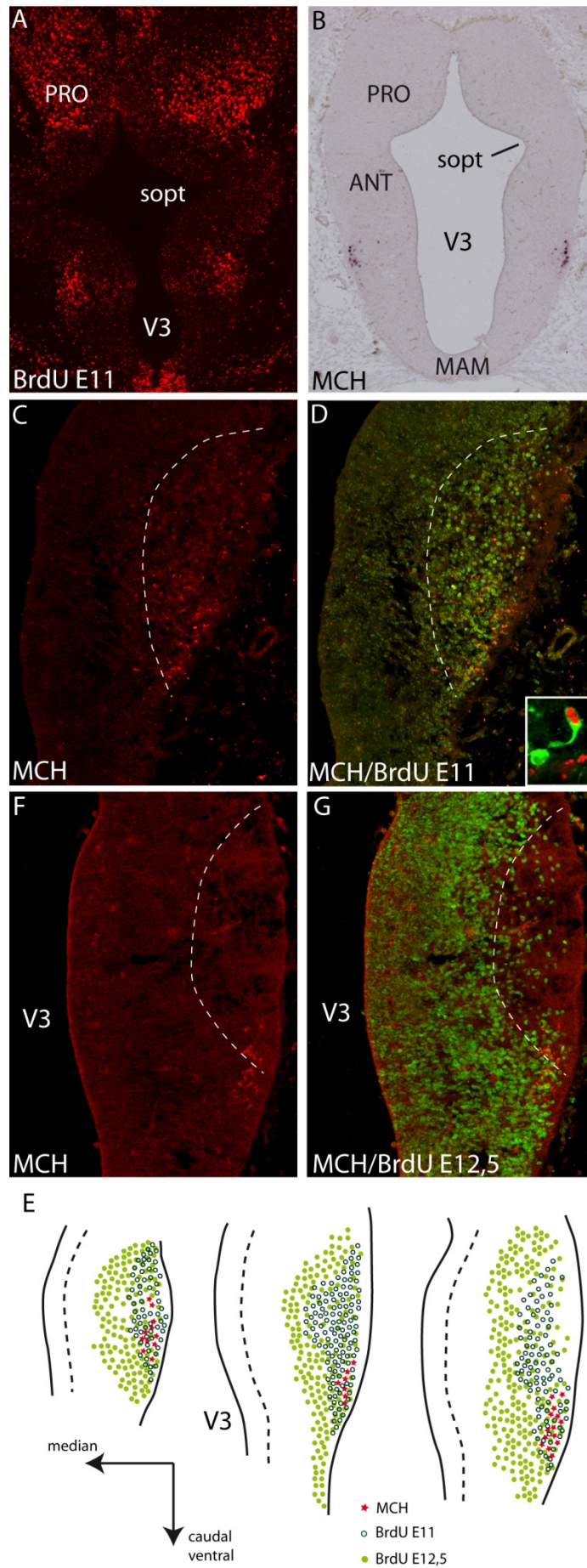
Figure 34 Genèse des neurones à MCH chez le rat

(A) Distribution des noyaux BrdU-positifs dans le manteau de l'hypothalamus postérieur de rat sur une coupe horizontale de cerveau de rat à E13 après injection de BrdU à E11.

(B) Distribution du signal pMCH obtenu par hybridation *in situ* sur une coupe horizontale de cerveau de rat à E14. Les neurones à MCH sont observés dans une région restreinte de la couche du manteau de l'hypothalamus postérieur.

(C-F) Distribution des neurones à MCH (rouge) et des noyaux BrdU-positifs (vert) après injections multiples de BrdU entre E11 et E11,5 (C-D) et entre E12,5 et E13 (E-F). Les profils du marquage BrdU sont complémentaires. L'encadré en D illustre un fort grossissement d'une image prise en microscopie confocale d'un neurone MCH dont le noyau a incorporé le BrdU à E11. Pour des raisons esthétiques, le BrdU est révélé en rouge et les neurones à MCH en vert.

ANT: hypothalamus antérieur; MAM: hypothalamus mammillaire; PRO: hypothalamus préoptique; RCH: aire rétrochiasmatique; sopt : sulcus optique; V3: troisième ventricule.



3. Expression de gènes du développement dans l'hypothalamus

Les données obtenues au laboratoire lors de la thèse de C. Amiot ont été ajoutées en **Annexe 1** car elles n'ont pas fait l'objet de publication dans des revues à comité de lecture. Elles sont aussi résumées dans la **Figure 35**. Au cours de ma thèse, nous avons complété ces données par l'étude de l'expression d'autres gènes connus pour être exprimés dans l'hypothalamus entre autres régions. L'expression de l'ARNm de Shh dans l'hypothalamus postérieur a été étudiée de même que l'expression de gènes appartenant à la famille des LIM comme Lhx6, Lhx7, Lim1/2 ou Lhx1 et Lhx5. Leurs profils d'expression sont bien décrits dans la littérature et c'est pour ces raisons que nous nous attacherons à seulement les décrire par rapport à la « zone à MCH ».

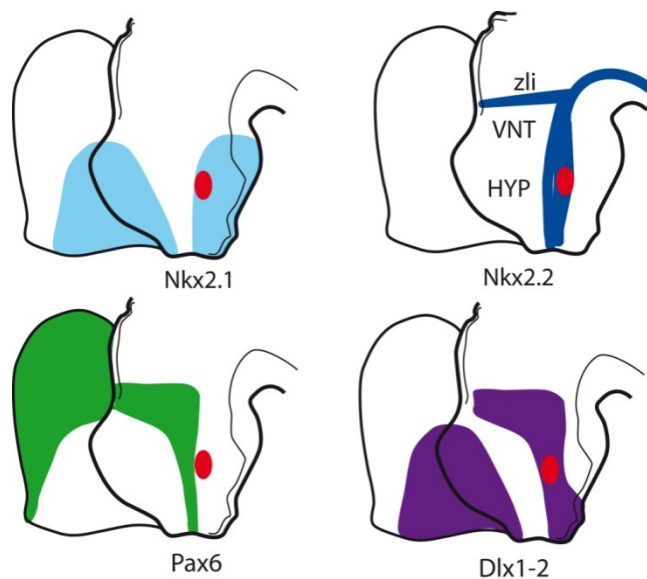


Figure 35 Schéma récapitulatif de la distribution de Nkx2.1, Nkx2/2-Shh, Pax6 et Dlx1/2 dans le cerveau embryonnaire de rat.

Les neurones à MCH naissent le long d'une bande caractérisée par l'expression de Nkx2.1, Nkx2.2, Dlx1/2 et à la limite postérieure du territoire d'expression de Pax6.

3.1 Shh

L'intérêt de l'étude de Shh est soulevé par l'expression de gènes de la famille Nkx par les neurones à MCH. La protéine morphogène Shh est exprimée le long d'une bande longitudinale parallèle et adjacente au domaine d'expression de Nkx2.2, allant des régions ventrales du diencephale jusqu'à la moelle épinière. L'hybridation *in situ* sur embryon entier de souris à E9 permet de visualiser dans son ensemble, la distribution longitudinale de ce marquage (Figure 36). En plus de cette bande d'expression, Shh est observé dans le télencéphale basal et dans la *zona limitans intrathalamica (zli)*. L'expression de Shh dans la *zli* ainsi que dans l'éminence ganglionique médiane débute à E9,5-E10, (Shimamura et al. 1995). Shh est uniquement exprimé dans le neuroépithélium germinatif confronté à la distribution de MCH, les neurones producteurs de ce peptide occupent une région du manteau latérale au domaine Shh. Cette bande longitudinale s'élargit antéropostérieurement au cours du développement cérébral. L'expression des membres de la famille Nkx est connue pour être régulée par Shh dans le cerveau en développement. Les neurones à MCH expriment également Nkx2.1 (Figure 37) mais aussi, de manière transitoire, Nkx2.2, suggérant l'implication de Shh dans la différenciation du phénotype MCH (Annexe 1).

Figure 36 Photographies sur des coupes horizontales voisines de cerveaux embryonnaires E9, E11, E14 et E15 illustrant les signaux *in situ* pour Shh, pMCH et immunohistochimiques pour Nkx2.2 et Nkx2.1

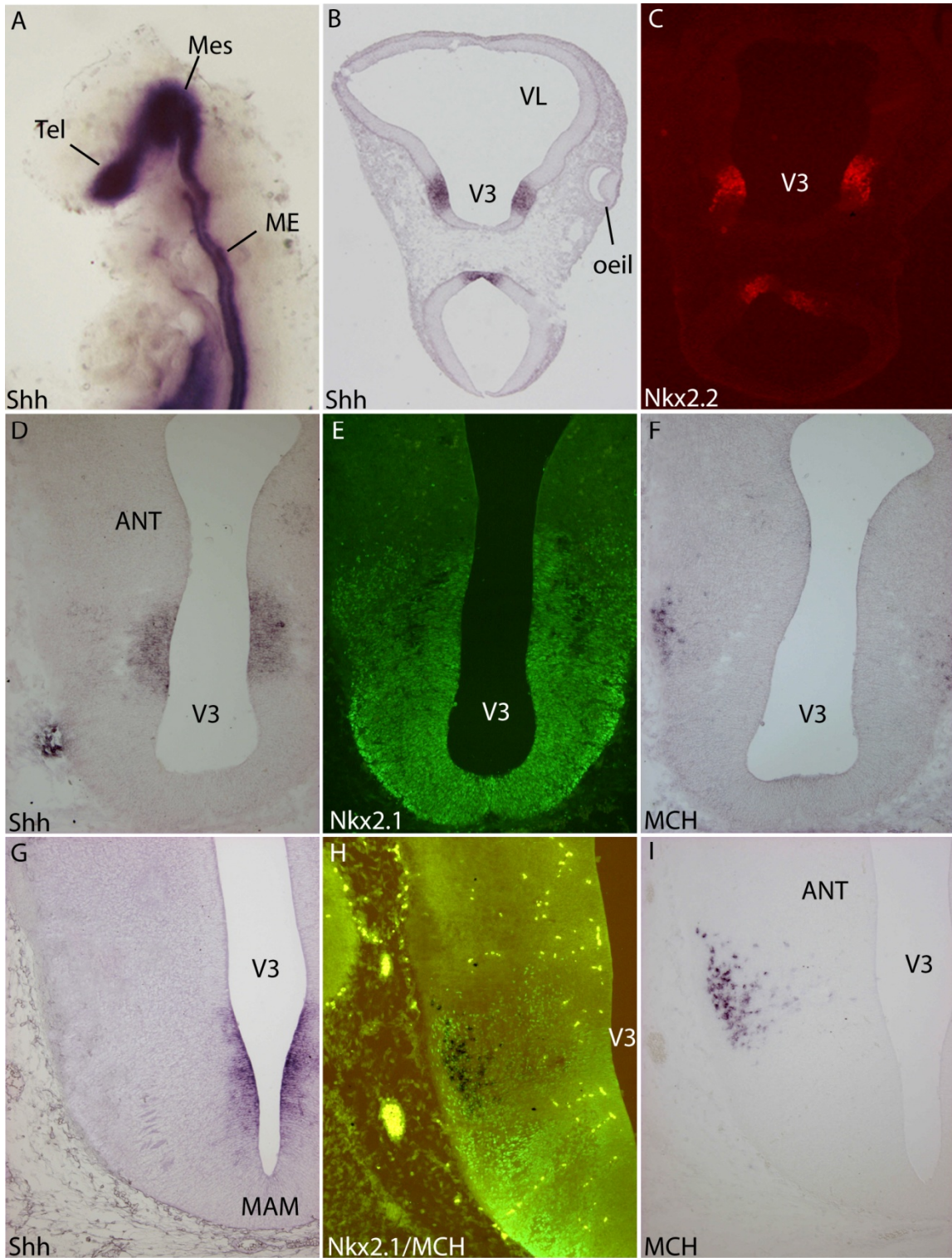
(A) Détection de Shh par hybridation *in situ* sur un embryon entier de souris E9. A ce stade, le signal Shh est observé dans le télencéphale basal (Tel) et le long d'une bande longitudinale passant par le mésencéphale (Mes) et allant jusqu'aux régions postérieures du système nerveux central. Le marquage Shh est présent dans la plaque du plancher du tube nerveux mais aussi dans la notochorde.

(B-C) Marquages Shh **(B)** et Nkx2.2 **(C)** sur coupes horizontales voisines de cerveau de rat E11. Shh et Nkx2.2 sont exprimés suivant un profil similaire.

(D-F) Photographies illustrant les marquages Shh **(D)** et MCH **(F)** obtenus par hybridation *in situ* et par immunohistochimie pour Nkx2.1 **(E)** sur des coupes horizontales voisines de cerveau de rat E14. Shh est exprimé dans le neuroépithélium germinatif de l'hypothalamus dorsal en regard de la « zone à MCH » où le facteur de transcription Nkx2.1 est exprimé.

(G-I) Photographies montrant les marquages *in situ* Shh **(G)** et MCH **(I)** et les doubles marquages MCH/Nkx2.1 **(H)** obtenu par un couplage des techniques d'hybridation *in situ* et immunohistochimie sur des coupes horizontales voisines de cerveau de rat E15. A ce stade, Shh est toujours exprimé dans le neuroépithélium germinatif de l'hypothalamus postérieur en regard de la « zone à MCH » où Nkx2.1 est toujours exprimé.

ANT : aire hypothalamique antérieure ; MAM : région mammillaire de l'hypothalamus ; ME : moelle épinière ; VL : ventricule latéral ; V3 : troisième ventricule.



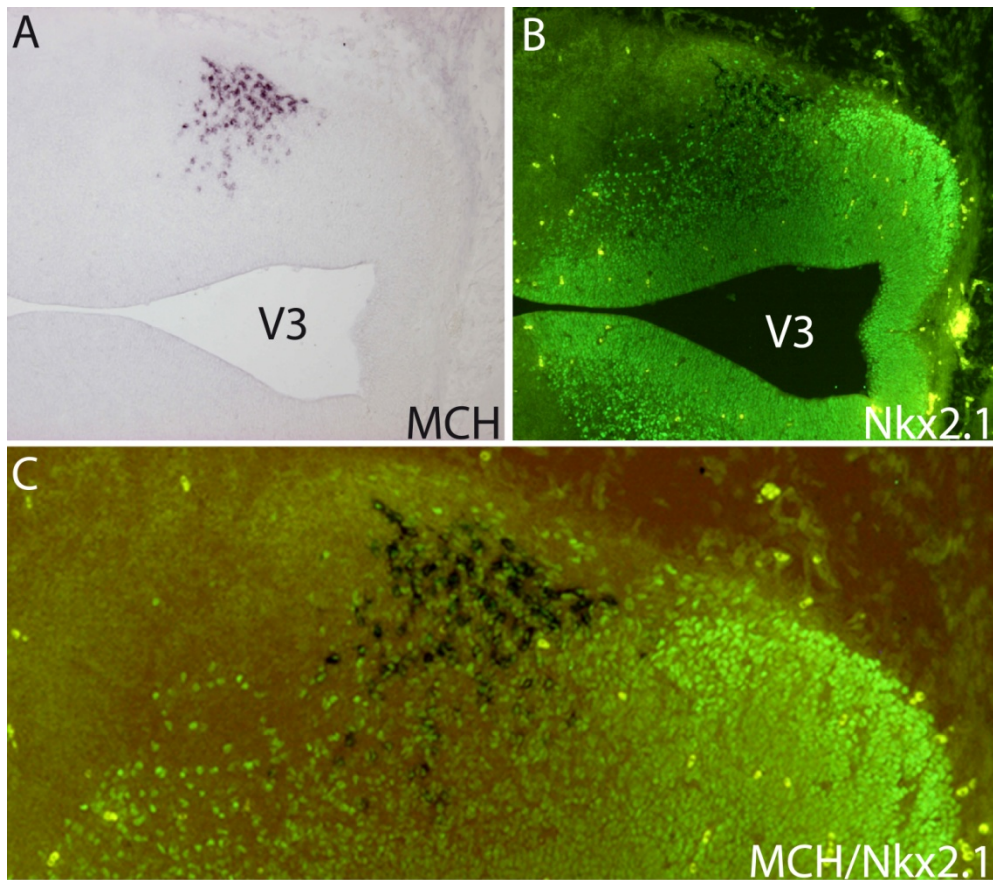


Figure 37 Photographies illustrant le double marquage MCH (HIS) et Nkx2.1 (immunohistochimie) sur des coupes horizontales de cerveaux embryonnaires E14 de rat

(A-B) Les neurones à MCH sont exprimés dans un territoire caractérisé par l'expression du facteur de transcription Nkx2.1 dans l'hypothalamus postérieur de rat.

(C) Les neurones à MCH expriment Nkx2.1 à ce stade embryonnaire.

V3 : troisième ventricule.

Nous avons vérifié l'effet de Shh sur l'apparition du phénotype MCH. Ce travail a été réalisé sur des souris puisque nous avons en notre possession des modèles de souris $Shh^{-/-}$.

Deux approches ont été utilisées pour vérifier l'influence de Shh sur le phénotype MCH. Tout d'abord, le taux d'expression des ARNm pMCH a été étudié sur un modèle de souris $Shh^{-/-}$ puis des expériences *in vitro* en présence de cyclopamine, inhibiteur de la voie de signalisation Shh ont été mises en œuvre. Les embryons $Shh^{-/-}$ ne sont pas viables et ne naissent pas (**Figure 38**). Nous avons cependant réussi à collecter quelques embryons homozygotes mutants à E13. En absence de cette protéine, les structures diencephaliques ne sont pas maintenues.

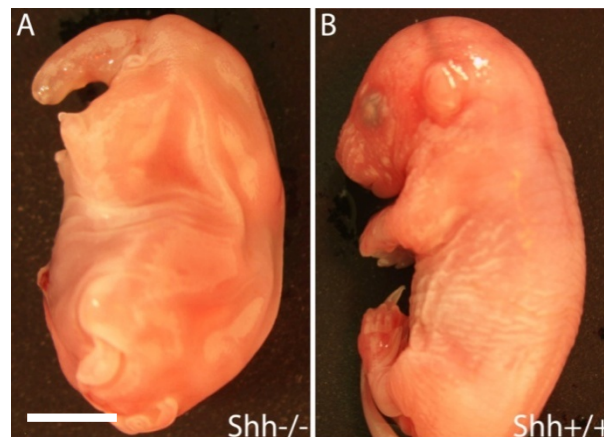


Figure 38 Photographies illustrant deux embryons E18 de souris $Shh^{-/-}$ (A) et $Shh^{+/+}$ (B).

Les embryons $Shh^{-/-}$ ne sont pas viables. Ceci est dû à des malformations multiples, notamment cardiaques et du système nerveux central. Barre d'échelle : 0,15 cm en A et 0,4 cm en B.

Nous avons vérifié par hybridation *in situ* et immunohistochimie l'expression de pMCH et du peptide, respectivement. Chez les souris sauvages, l'ARNm pMCH et le peptide MCH sont observés pour la première fois à E11 dans l'hypothalamus. Sur des coupes de cerveau embryonnaire de souris mutantes pour Shh, aux stades E11 et E12, nous n'avons observé aucun marquage pMCH par hybridation *in situ* et aucun marquage MCH par

immunohistochimie. Nous avons ensuite dosé par PCR en temps réel le taux d'expression relatif des ARNm pMCH, après extraction des ARN totaux à partir de têtes d'embryons E13 de souris sauvages ou mutantes, de têtes d'embryons E13 issus de mères gestantes injectées à E11 par un inhibiteur de la voie de signalisation Shh appelé cyclopamine ou de moitiés de cerveaux embryonnaires E11 cultivées ou non en présence de cyclopamine (**Figure 39**). Dans les trois expériences, le taux d'expression de pMCH a diminué. Il est 85% plus faible chez les embryons mutés en comparaison des sauvages. En présence de cyclopamine, ce taux diminue de 90% dans la seconde expérience et de plus de moitié (55%) dans la dernière, en comparaison des contrôles.

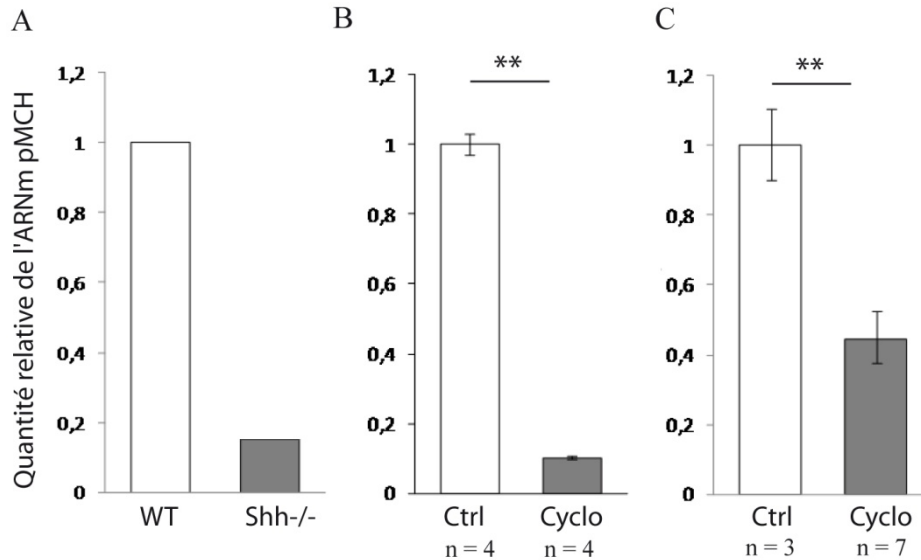


Figure 39 Taux d'expression de l'ARNm pMCH dans différents modèles de souris et après différentes conditions expérimentales de culture.

(A) Le taux d'expression de l'ARNm pMCH a été évalué par RT-qPCR chez des embryons E13 Shh^{+/+} et ^{-/-}. Le taux d'expression de pMCH est 85% plus bas chez les souris Shh^{-/-} comparé à celui obtenu chez des embryons de souris sauvages (WT).

(B) Le taux d'expression de l'ARNm pMCH est aussi diminué de 90% chez des embryons E13 prélevés deux jours après injection d'un inhibiteur de la voie de signalisation Shh (cyclopamine - cyclo) à des mères gestantes (E11) comparé à des embryons contrôles dont la mère a été injectée par du DMSO (ctrl).

(C) Le taux d'expression de pMCH est diminué de 55% dans des moitiés de cerveaux embryonnaires E11 cultivées en présence de cyclopamine comparé à celles cultivées en présence de DMSO. Les données indiquent la moyenne \pm SD, **: $p \leq 0.01$, Kruskal Wallis's test.

3.2 Autres gènes du développement

La littérature est riche en publications relatant des patrons de distribution des gènes du développement dans l'ensemble du SNC. Nous nous limiterons donc à les décrire dans la « zone à MCH ».

Le marquage Lhx6 est observé par hybridation *in situ* pour la première fois à E13, le long du tube nerveux et en particulier, dans les régions hypothalamiques (non illustré). A E14, le nombre de neurones marqués augmente. A ce stade, Lhx6 est exprimé dans un territoire médian aux neurones à MCH. A E15, en confrontant les marquages Lhx6 à Nkx2.1 sur des coupes de cerveau voisines, nous observons que leurs distributions se superposent. Lhx6 est à la limite antérieure de la zone d'expression de Nkx2.1. L'étude du double marquage Lhx6 (HIS)/ MCH (immunohistochimie) ne nous a pas permis de conclure sur leur co-expression. En effet, la qualité de l'immunohistochimie MCH après hybridation *in situ* est moindre, de plus, le niveau d'expression du peptide aux stades précoces du développement (E14, E15) est faible. Il aurait été nécessaire de réaliser cette étude à des stades embryonnaires plus avancés ou sur des nouveau-nés.

Lhx7 est détecté la première fois dans l'hypothalamus également à E13, il est exprimé dans une très fine bande médiane en partie au même niveau que le marquage Lhx6 le plus ventral mais aussi plus ventralement, en dessous de la tige optique. La distribution de Lhx7 se superpose également à celle de Nkx2.1 dans sa limite antérieure. Les neurones à MCH sont exprimés en position plus latérale et plus dorsale dans le manteau par rapport aux cellules exprimant ce facteur de transcription, même si les neurones à MCH les plus ventraux sont observés sur les mêmes coupes que le marquage Lhx7 le plus dorsal (non illustré).

Lhx9 est observé dans l'hypothalamus initialement à E13. Au cours du développement (E14, E15), un plus grand nombre de neurones est reconnu et l'intensité du marquage augmente (**Figure 40**). Lhx9 est exprimé au niveau hypothalamique, juste caudalement à Lhx6 et

dorsalement à Lhx7. A un stade plus tardif, E19, nous avons réalisé des doubles marquages Lhx9 (HIS) et Hcrt (immunohistochimie) et nous avons constaté que les neurones à Hcrt expriment le messenger Lhx9 (non illustré).

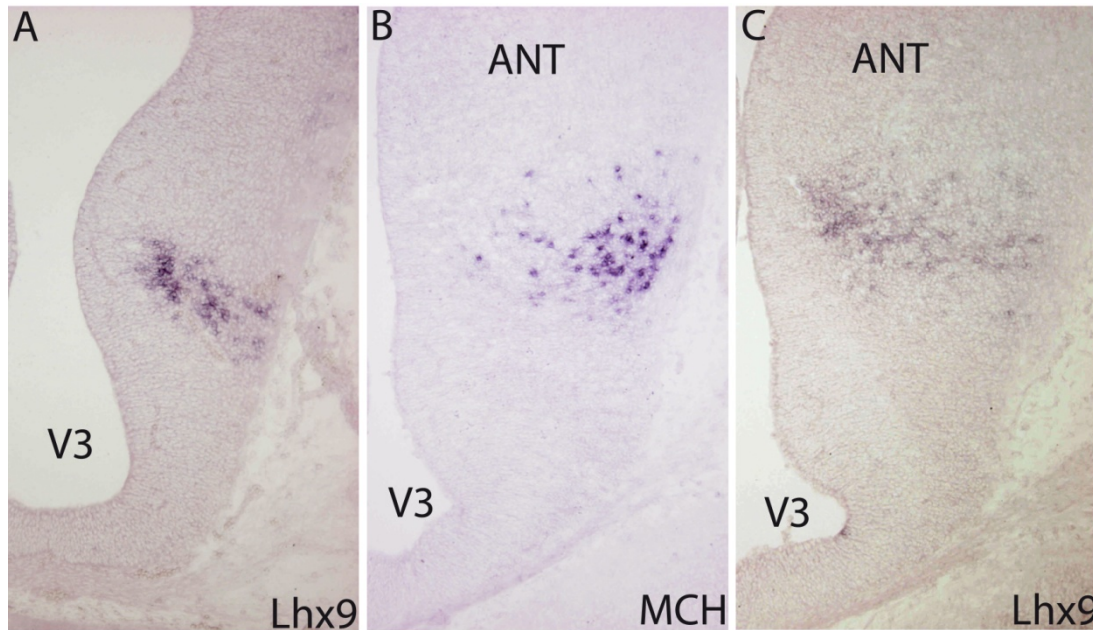


Figure 40 Photographies illustrant le signal HIS de Lhx9 et de MCH sur des coupes horizontales de cerveaux embryonnaires (E14) de rat

(A) Lhx9 est exprimé dans les régions hypothalamiques en position médiane, quelques cellules sont observées plus latéralement dans le manteau.

(B-C) Marquages *in situ* pour pMCH et Lhx9 sur des coupes voisines de cerveau d'embryon de rat E14. Les cellules marquées par Lhx9 sont en position plus médiane que les neurones à MCH exprimés latéralement dans le manteau à ce stade.

V3 : troisième ventricule, ANT : hypothalamus antérieur.

L'expression de Lim1/2 ou Lhx1/5 est observée à un stade de développement précoce. En effet, à E11, les cellules du neuroépithélium germinatif de l'hypothalamus présomptif sont immunoréactives pour Lim1/2. Cette distribution forme une bande le long du tube nerveux dans les régions de l'hypothalamus prospectif. A E12, le double marquage Lim1/2-Nkx2.1 montre que la distribution de ces protéines dans le neuroépithélium germinatif se superpose dans les régions hypothalamiques. Les cellules Lim1/2 positives expriment aussi Nkx2.1. Lim1/2 ne dépasse pas les limites rostrales du marquage Nkx2.1. Ventralement à des coupes horizontales passant par la tige optique, l'expression de Lim1/2 est exclusivement présente dans les cellules du manteau de l'hypothalamus postérieur, des régions préoptiques et rétrochiasmatisques. Ces cellules sont doublement marquées par Lim1/2 et Nkx2.1. A E14, les neurones MCH expriment Lim1/2. A ce niveau, un grand nombre de cellules Lim1/2 positives sont présentes dans le manteau mais aussi dans le neuroépithélium germinatif juste en arrière du sulcus hypothalamicus. A E15, le marquage Lim1/2 devient ubiquitaire dans les régions hypothalamiques. Les neurones MCH sont toujours immunoréactifs pour Lim1/2.

La confrontation de l'expression des facteurs de transcription étudiés et de MCH ne permet pas d'établir une explication de l'existence de deux sous-populations de neurones à MCH.

L'expression de ces facteurs de transcription est schématisée dans la **Figure 41**.

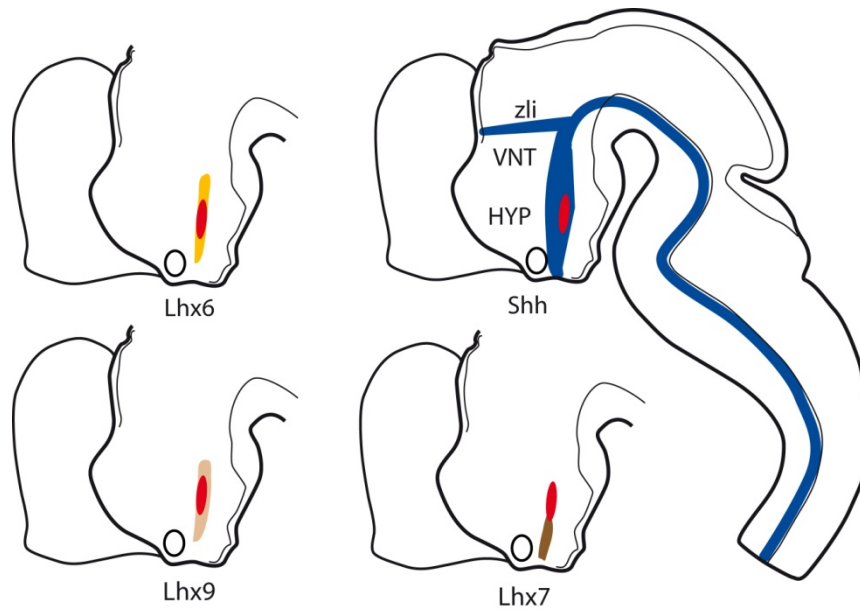


Figure 41 Schéma illustrant la distribution des facteurs de transcription de la famille des LIM dans l'hypothalamus embryonnaire de rat par comparaison à l'expression MCH (en rouge).

Les neurones à MCH sont exprimés dans un territoire caractérisé par l'expression de Lhx6 et Lhx9. Lhx7 est exprimé en position plus médiane. De plus, Shh est exprimé dans le neuroépithélium germinatif à l'origine de la « zone à MCH ».

III. Différenciation des tractus de fibres

L'étude de la différenciation des tractus de fibres a été réalisée en majeure partie sur le modèle de souris. Nous avons en notre possession des souris MCH-GFP créées par l'équipe de J. Friedman (Stanley et al. 2010) et fournies par le Dr J-L. Nahon. Ce modèle permettait une meilleure détection des corps cellulaires et des fibres MCH sur coupes histologiques ou dans des explants tissulaires *in vitro*.

1. Traçage des tractus pionniers par le DiI

Chez la souris, les premiers tractus de fibres décrits sont le *tractus postopticus (tpoc)* et le tractus supraoptique (sot) (Mastick et Easter 1996). Le *tpoc* suit un trajet longitudinal et parallèle aux bandes d'expression Nkx2.2/Shh depuis les régions chiasmiques jusqu'au mésencéphale (Shimamura et al. 1995). Chez l'animal adulte, la « zone à MCH » est traversée par le faisceau médian du télencéphale (mfb) qui connecte le tronc cérébral au télencéphale. A notre connaissance, aucune donnée n'existe dans la littérature permettant de comprendre la transition entre ces deux plans d'organisation hodologiques qui intéressent particulièrement l'hypothalamus postérieur. Afin de caractériser ces tractus passant par l'hypothalamus postérieur à différents stades, un cristal de DiI a été implanté à des embryons de souris fixés et prélevés à E11, E12 et E14. Nous avons également effectué des dépôts contrôles de DiI dans le mésencéphale ventral, le thalamus et les régions chiasmiques.

- E11 :

Après dépôt d'un cristal de DiI dans l'hypothalamus postérieur d'embryons E11, seul le *tpoc* est tracé (Figure 42). Le DiI étant un marqueur lipophile fluorescent, nous détectons les fibres fluorescentes formant le *tpoc* en direction de la flexure céphalique et des fibres

rejoignant l'origine du *tpoc* (régions rétrochiasmiques). Si le cristal est déposé dans les régions chiasmiques, alors le *tpoc* est tracé mais également le *sot* (non illustré). Après dépôt d'un cristal dans le mésencéphale ventral, nous observons des fibres marquées en direction des régions dorsales du tegmentum, le faisceau longitudinal médian (mlf) et le *tpoc* (Figure 42).

- **E12 :**

Le dépôt d'un cristal dans l'hypothalamus postérieur, permet également de visualiser les fibres formant le *tpoc* mais aussi quelques fibres qui partent en direction du télencéphale basal. Il s'agit des fibres du mfb qui commencent à se mettre en place ou celles qui remontent le *sot* (non illustré).

- **E14 :**

A ce stade, le dépôt du cristal de DiI a été effectué sur les cerveaux entiers qui ont ensuite été coupés au cryostat afin d'être étudiés au microscope à épifluorescence puis photographiés. Les fibres marquées après dépôt d'un cristal de DiI dans l'hypothalamus postérieur, dessinent le *tpoc* en direction des régions postérieures du SNC mais aussi le mfb, qui est alors formé (Figure 42). Des hybridations *in situ* révélant la pMCH sur des coupes issues des cerveaux où un cristal de DiI a été placé, permettent de confirmer que les cristaux placés dans l'hypothalamus postérieur sont bien situés dans la « zone à MCH » (Figure 42). Le cristal contrôle déposé dans la SN/VTA permet la détection de plusieurs tractus ascendants, descendants et dorsaux, comme le fasciculus retroflexus, le mfb, le *tpoc*, le mlf, ce qui contraste avec les deux seuls tractus observés après dépôt d'un cristal dans la « zone à MCH ». A aucun moment, nous ne détectons, après dépôt d'un cristal dans l'hypothalamus postérieur, la *zli* ou la strie médullaire. Ces observations amènent à la conclusion que seul le

tpoc, tractus passant par l'hypothalamus postérieur, est présent à E11 puis au cours du développement, le mfb se met en place et joint les régions mésencéphaliques ventrales aux régions du télencéphale basal, en passant par l'hypothalamus postérieur.

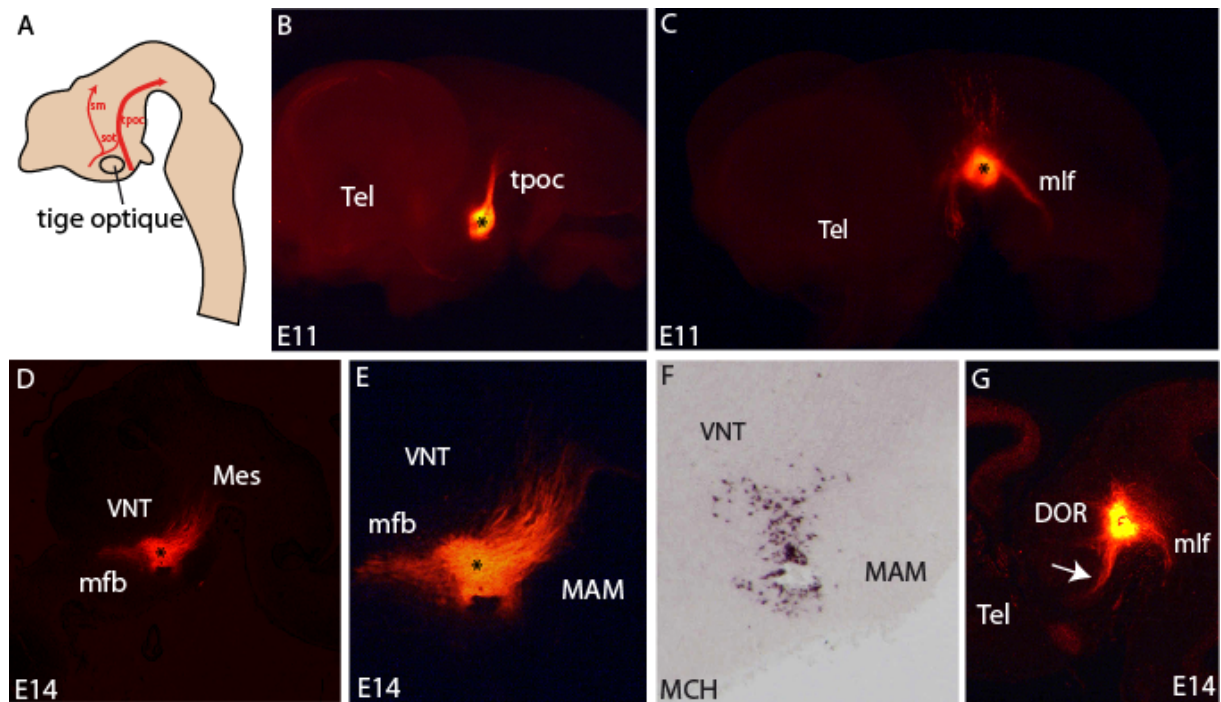


Figure 42 Schéma et photographies illustrant les tractus de fibres pionniers du cerveau embryonnaire de souris.

(A) Représentation schématique d'une coupe sagittale d'embryon au stade précoce du développement résumant la position et la direction du *tractus postopticus* (*tpoc*, large flèche rouge), du tractus supraoptique (*sot*) et de la strie médullaire (*sm*).

(B) Un cristal de DiI a été déposé dans l'hypothalamus postérieur d'un cerveau E11 de souris, seul le *tpoc* est tracé.

(C) Le dépôt d'un cristal de DiI dans le mésencéphale ventral fait office de contrôle. En effet, le *tpoc*, le faisceau longitudinal médian (*mlf*) mais aussi des fibres allant vers les régions dorsales du mésencéphale sont marqués.

(D) Un cristal est déposé dans l'hypothalamus postérieur d'un cerveau de souris E14. Après coupe au cryostat, la fluorescence révèle des fibres en direction du télencéphale basal et d'autres qui 'remontent' en direction du mésencéphale ventral, formant le faisceau médian du télencéphale (*mfb*).

(E-F) Photographies à plus fort grossissement de la fluorescence émise par le DiI (E) et HIS pMCH (F) sur la même coupe pour préciser la localisation exacte de dépôt du cristal de DiI.

(G) Le dépôt d'un cristal contrôle dans le mésencéphale ventral révèle d'autres faisceaux de fibres en plus du *mfb* (flèche), comme le fasciculus rétroflexus ou le *mlf*.

2. Immunohistochimie GFP

Au stade d'apparition des premiers neurones et fibres MCH, c'est-à-dire E11 chez la souris, les neurones GFP-positifs sont à proximité du *tpoc*. Des axones MCH-GFP sont visibles à proximité des péricaryons mais ne sont pas détectés au-delà de cette région. A E12, les fibres GFP-positives sont plus nombreuses et se dirigent vers le mésencéphale ventral sur des coupes sagittales (Figure 43). Les fibres suivant le *tpoc* sont visibles sur de longues distances jusque dans les régions de la SN/VTA. D'autres sont visibles jusque dans les régions les plus postérieures du SNC (non illustré). Des axones GFP-positifs, jamais détectés par MCH remontent également le *tpoc* jusqu'à son origine dans les régions chiasmatisques. Ces fibres sont peu nombreuses à E12. A E14 et E15, le nombre de neurones GFP-positifs augmente (**Figure 44**). Le nombre de fibres immunoréactives pour GFP est de plus en plus important, en particulier vers les régions antérieures du SNC. A E14, un grand nombre de fibres GFP remonte le *tpoc* et emprunte la décussation du *poc*. A E15, le marquage de fibres GFP en direction du télencéphale basal devient plus important que celui observé pour les axones commissuraux, comme si au cours du développement, les axones MCH se réorientaient pour innervier les régions antérieures du SNC. L'immunohistochimie MCH ne permet pas d'obtenir de tels résultats.

En comparant sur des coupes voisines immunomarquées à l'aide d'un anticorps anti-TH, les fibres GFP-positives dirigées vers l'avant suivent le trajet du mfb composés de fibres dopaminergiques issues de la SN/VTA (**Figure 44**). Sur une même coupe, le double marquage GFP (immunofluorescence) et TH (PAP) confirme que ces fibres suivent le même trajet vers les régions antérieures du cerveau (non illustré). Des résultats concernant la mise en place des fibres dopaminergiques ont été obtenus lors de la thèse de C. Amiot (Annexe 2).

L'utilisation d'un anticorps anti-GFP sur des coupes au cryostat de cerveaux embryonnaires de souris a permis de détecter un grand nombre d'axones qui n'était pas détectés par l'anticorps anti-MCH.

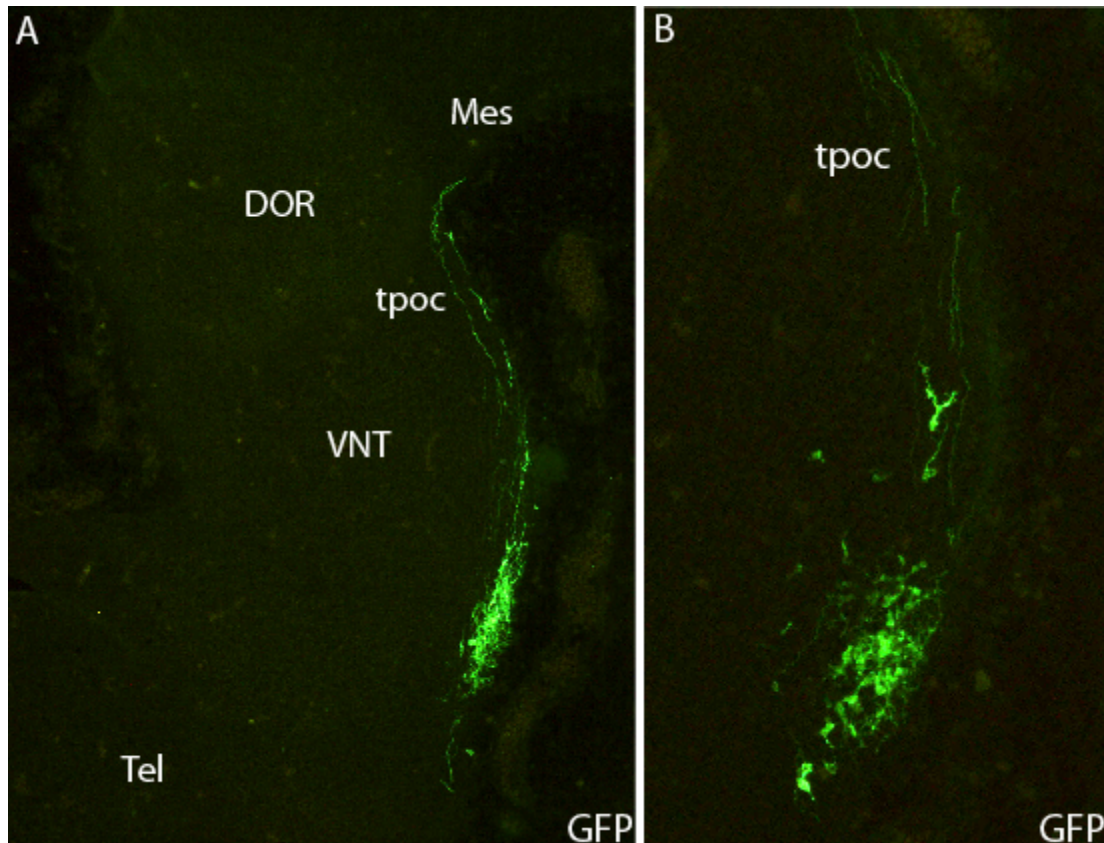


Figure 43 Microphotographies illustrant les projections GFP-MCH sur coupes sagittales de cerveau embryonnaire E12 en direction des régions postérieures du système nerveux central.

(A et B) A E12, les péricaryons immunomarqués par GFP, révélant le peptide MCH, sont observés dans les régions hypothalamiques. Ces neurones projettent d'ores et déjà sur les régions les plus postérieures du système nerveux central, le long du *tractus postopticus* (*tpoc*).

DOR : thalamus dorsal ; Mes : mésencéphale, Tel : Télocéphale ; VNT : thalamus ventral.

Figure 44 Microphotographies illustrant la différenciation des projections des neurones à MCH

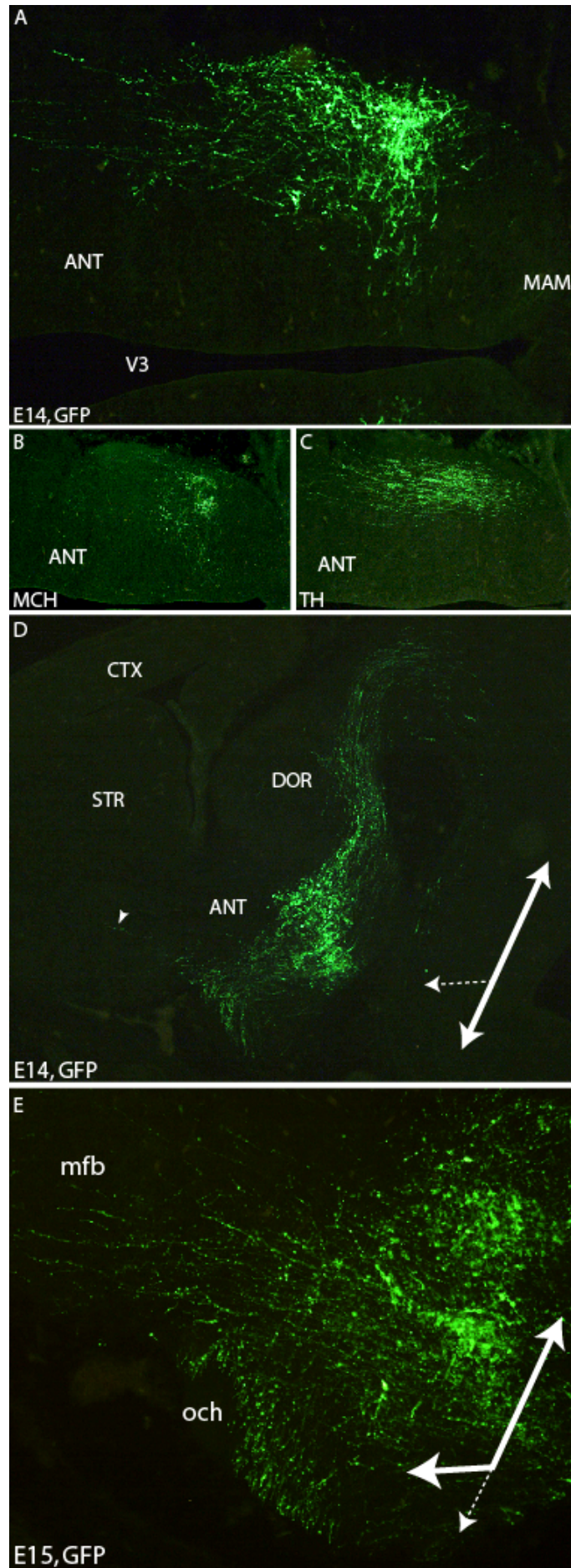
(A) Photographies illustrant les fibres des neurones à MCH, GFP-positives à E14 sur des coupes horizontales de cerveau. Un grand nombre de fibres est observé en direction des régions antérieures du cerveau.

(B-C) Photographies montrant des immunomarquages MCH (B) ou TH (C) sur des coupes adjacentes à celle utilisée en A. L'immunodétection de MCH est moins sensible que celle obtenue avec l'anticorps anti-GFP. Les péricaryons et les fibres MCH ont une intensité plus faible que ceux GFP-positifs. La détection de TH permet d'observer que les fibres MCH ou GFP-positives suivent le trajet des fibres dopaminergiques formant le mfb.

(D) Sur une coupe sagittale de cerveau embryonnaire E14, un nombre important de neurones GFP-MCH positifs est détecté dans l'hypothalamus postérieur. Des fibres suivent une direction rostrale à travers le télencéphale et d'autres 'remontent' le *tpoc* jusqu'à son origine (flèches blanches).

(E) A E15, sur des coupes sagittales de cerveau, l'immunohistochimie GFP révèle que de plus en plus de fibres GFP-positives partent en direction rostrale au dépend des fibres commissurales (flèches blanches).

ANT: région hypothalamique antérieure; DOR: thalamus dorsal; MAM : région hypothalamique mammillaire; Mes: mésencéphale; PLR: éminence du pallidum; Tel: télencéphale; V3: troisième ventricule; VNT: thalamus ventral ; STR : striatum ; och : chiasma optique.



3. Influence du télencéphale et du mésencéphale sur la direction des fibres MCH

Les résultats obtenus par dépôt d'un cristal de DiI dans l'hypothalamus postérieur à des stades différents ainsi que nos observations concernant le développement des projections MCH, laissent supposer que le télencéphale basal attire les fibres de l'hypothalamus postérieur après le mésencéphale, à partir de E12. Afin de vérifier la capacité d'attraction du mésencéphale ventral et du télencéphale basal sur les fibres issues de neurones de l'hypothalamus postérieur et plus précisément des neurones à MCH, des explants d'éminence du pallidum, de mésencéphale ventral et de tectum prélevés à différents stades embryonnaires (E11 à E14) ont été mis en culture en présence d'explants hypothalamiques et plus précisément de « zone à MCH » issus de jeunes souris Swiss CD1 (**Figure 45**). Le tectum a été choisi en tant que contrôle car les axones MCH n'innervent que très tardivement (après la naissance) cette région. Les explants hypothalamiques ont été placés aléatoirement à côté des explants embryonnaires. Après deux jours de culture, les fibres MCH ont été révélées grâce à un anticorps anti-MCH puis comptées dans chaque explant embryonnaire. Les axones MCH étaient parfaitement détectables avec un anticorps anti-sMCH sur les explants hypothalamiques prélevés après la naissance.

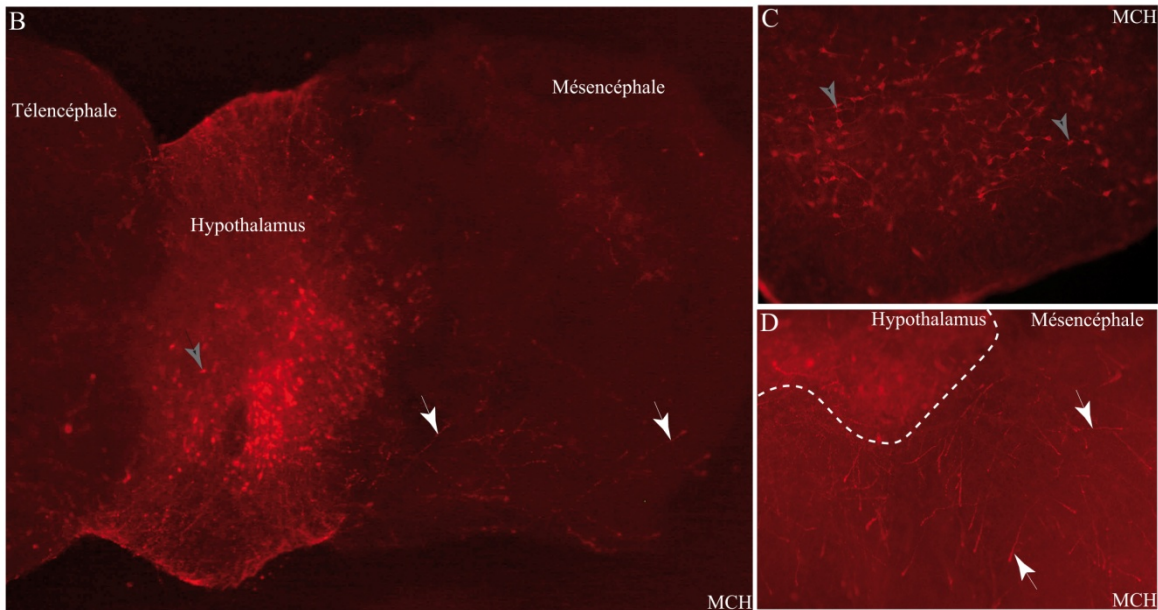
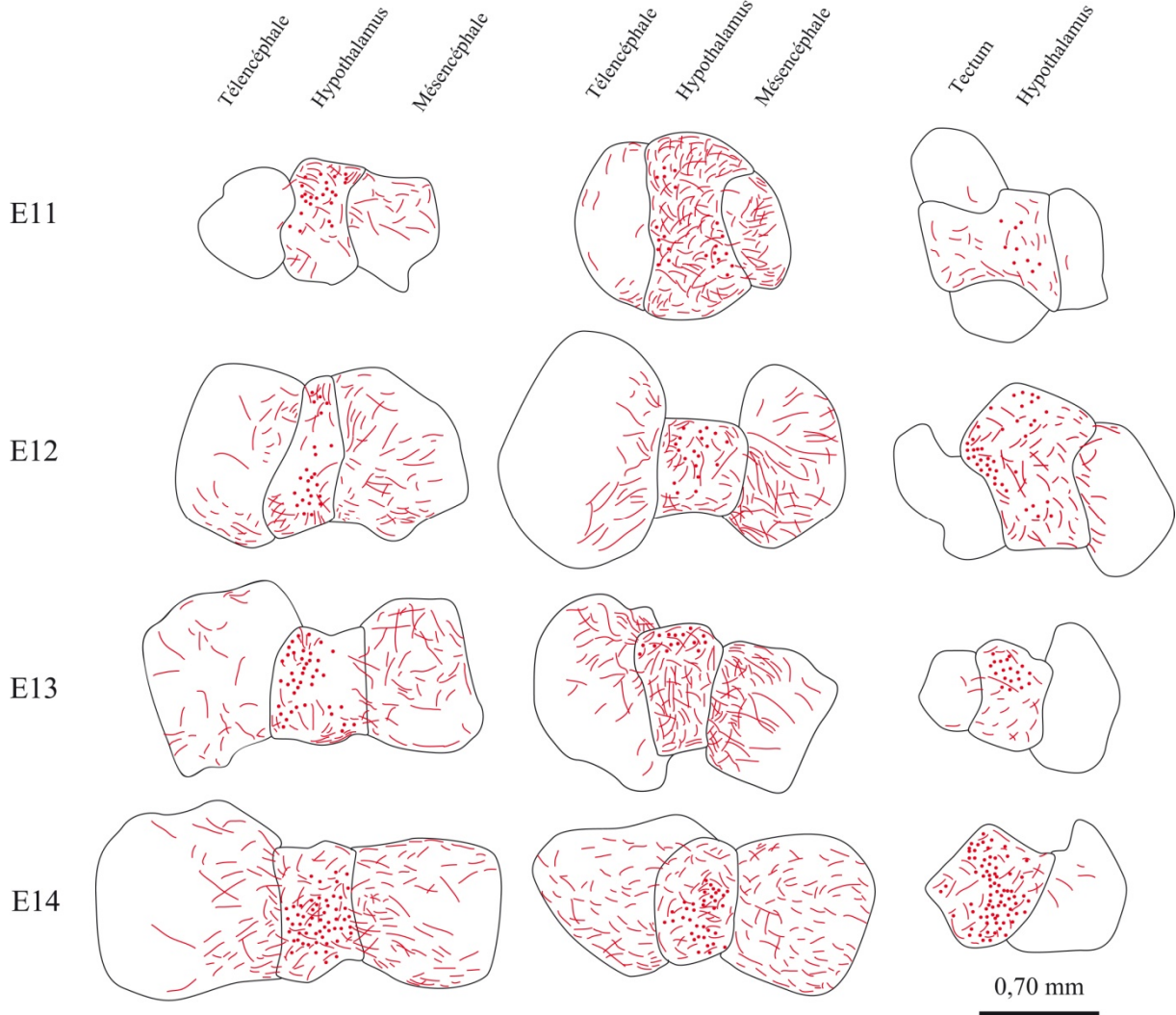
Les fibres MCH sont abondantes dans les explants mésencéphaliques quelque soit le stade embryonnaire. Entre 25 et 55 fibres MCH ont été comptabilisées dans ces explants entre E11 et E14 (**Figure 46**). Le nombre de fibres MCH augmente entre E11 et E12 pour rester quasiment stable jusqu'à E14. Au contraire, la quantité de fibres MCH recensée dans les explants télencéphaliques varie considérablement entre E11 et E14. Au stade le plus précoce, le nombre de fibres MCH n'est pas significativement différent de celui observé dans le tectum, qui sert de contrôle.

Figure 45 Cartographies et photographies montrant l'influence du mésencéphale ventral ou du télencéphale basal sur la croissance des axones MCH.

(A) Séries de cartographies illustrant les expériences de co-cultures. Les ronds rouges dans les explants hypothalamiques représentent les corps cellulaires des neurones à MCH et les lignes rouges, les fibres MCH révélées par immunofluorescence.

(B-D) Photographies des explants issus de nouveau-nés et d'embryons après deux jours de culture *in vitro* et immunodétection de MCH. Faible (B) et fort (C-D) grossissements pour illustrer la survie des neurones à MCH et la qualité de la détection de ce peptide dans les corps cellulaires comme les axones permettant une comptabilisation facile de ces derniers.

A



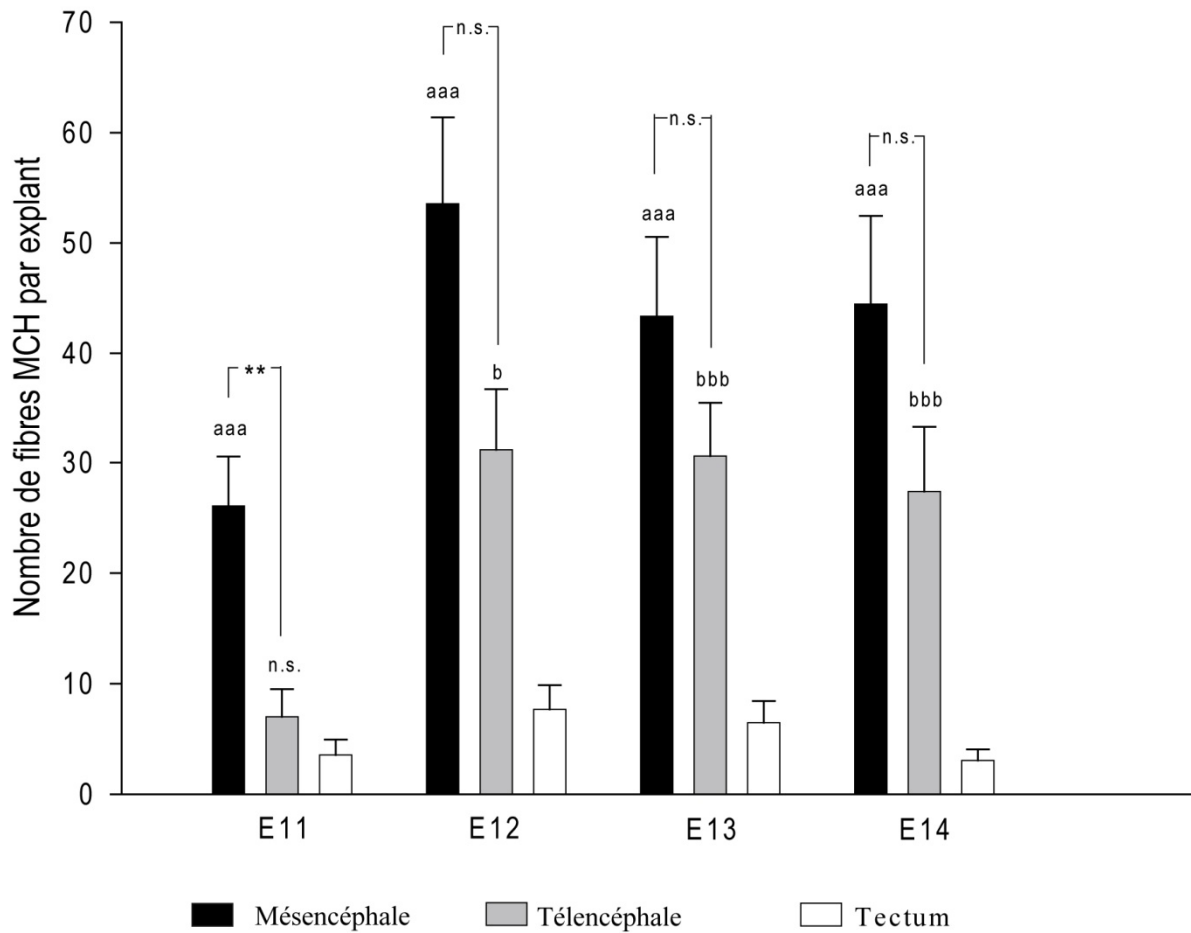


Figure 46 Histogrammes illustrant le nombre d'axones MCH compté par explant embryonnaire après culture.

Des explants d'hypothalamus caudal issus nouveau-nés de souris ont été co-cultivés avec des explants embryonnaires E11 à E14 de mésencéphale ventral et de télencéphale basal. Les données ont été obtenues de trois expérimentations différentes pour chaque stade. 12 à 19 explants mésencéphaliques ou télencéphaliques ont été analysés par stade et 9 à 17 explants issus de tectum ont été utilisés comme contrôle. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. aaa: $p \leq 0,001$ mésencéphale vs tectum; bbb: $p \leq 0,001$; b: $p \leq 0,05$ télencéphale vs tectum; **: $p \leq 0,01$ mésencéphale vs télencéphale; n.s.: non significatif, Kruskal Wallis's test.

C'est à partir de E12 que les fibres envahissent de manière significative le télencéphale et ce, jusqu'à E14. Dans les conditions utilisées dans notre étude, le nombre de fibres MCH n'augmente jamais dans le tectum. Les cartographies illustrant des co-cultures d'hypothalamus et d'explants embryonnaires issus de différentes régions du cerveau indiquent que la position et le nombre des péricaryons MCH n'influent pas sur l'innervation des explants embryonnaires télencéphaliques ou mésencéphaliques. En effet, aux stades précoces, les péricaryons MCH sont proches de l'explant de pallidum mais leurs fibres n'envahissent pas pour autant cet explant. De même pour les contrôles, la présence de péricaryons MCH en bordure d'explant n'incite pas les fibres MCH à pénétrer dans le tectum.

4. Recherche de l'effet de protéines de guidage axonal

Les phénomènes d'attraction peuvent agir à distance des péricaryons. L'attraction des axones MCH est probablement exercée par l'expression d'une protéine de guidage axonal. Celle-ci doit ou non être présente dans ces différentes régions au cours du développement. En effet, cette protéine doit être exprimée précocement dans le mésencéphale ventral, puis dans le pallidum à partir du stade E12 mais jamais exprimée dans le tectum à ces mêmes stades.

La mise en place des tractus nécessite l'expression spatio-temporelle précise de protéines de guidage axonal. Celles-ci doivent exprimer les récepteurs spécifiquement impliqués dans la réponse à ces gradients de protéines. Les familles Slit et Nétrine comprennent un grand nombre de protéines de guidage axonal.

4.1 Expression de Nétrine1

La protéine Nétrine1 est la plus étudiée de sa famille. Elle interagit avec différents récepteurs impliquant une chimioattraction ou une chimiorépulsion à courte ou longue distance des axones qui les expriment (Barallobre et al. 2005). Nétrine1 est connue pour être impliquée

dans la mise en place des afférences diencéphalospinales mais aussi des axones dopaminergiques issus de la SN/VTA formant le mfb (Vitalis et al. 2000; Lin et al. 2005; Kasthuber et al. 2009). Pour vérifier notre hypothèse, selon laquelle une protéine de guidage axonal doit être exprimée selon une distribution spatiotemporelle compatible avec la direction des axones MCH, nous devons étudier la distribution de Nétrine1.

L'étude de l'expression de l'ARNm de Nétrine1 a été réalisée par hybridation *in situ* grâce à une ribosonde spécifique, sur des coupes de cerveaux embryonnaires de souris ou de rat ou sur embryons entiers de souris (Figure 47). Sur un embryon entier de souris au stade E9, nous observons que l'ARNm Nétrine1 est exprimé le long du tube nerveux depuis le mésencéphale ventral jusqu'aux régions les plus postérieures. En revanche, aucune expression de Nétrine1 n'est présente dans les régions télencéphaliques. Sur des coupes, au stade E11, l'ARNm Nétrine1 est toujours détecté par hybridation *in situ* dans le neuroépithélium du mésencéphale ventral et dans la région ventrale du tube nerveux dans le diencéphale mais n'est pas observée dans les régions antérieures. À partir d'E12, en plus d'être exprimé dans les cellules de la ligne médiane ventrale du tube nerveux comprenant celui de l'hypothalamus caudal, un signal Nétrine1 est observé dans les régions antérieures du cerveau plus précisément dans le neuroépithélium germinatif de l'éminence du pallidum. A ce stade, les régions du télencéphale basal se développent. Au cours de cette maturation, l'expression de Nétrine1 augmente dans le neuroépithélium germinatif de l'éminence du pallidum mais aussi dans le manteau du caudoputamen (E14). Malgré la maturation des structures postérieures, Nétrine1 n'est jamais exprimé dans le tectum aux stades étudiés, c'est-à-dire de E11 à E14.

4.2 Expression de Slit2

La protéine Slit2 a été étudiée car elle permet la trajectoire correcte des afférences diencéphalospinales ainsi que du *tpoc*. De plus, cette protéine est exprimée dans le

diencéphale ventral et permet la trajectoire correcte des axones dopaminergiques, les contraignant à ne pas pénétrer dans l'hypothalamus pour envahir le télencéphale basal (Marin et al. 2002; Barresi et al. 2005; Kasthuber et al. 2009). Slit2 appartient à la famille de protéines de guidage axonal Slit. L'étude de l'expression de l'ARNm Slit2 a été réalisée par hybridation *in situ* sur des coupes de cerveaux embryonnaires de rat. Comme pour Nétrine1, nous observons que l'ARNm Slit2 est exprimé par les cellules de la ligne médiane ventrale de la moelle épinière aux stades les plus précoces (à partir de E11) (Figure 47). A E13, Slit2 est toujours exprimé dans les régions ventrales du tube nerveux, en particulier dans l'hypothalamus caudal. Slit2 est aussi exprimé dans la pointe du septum en développement et dans le neuroépithélium germinatif des régions préoptiques.

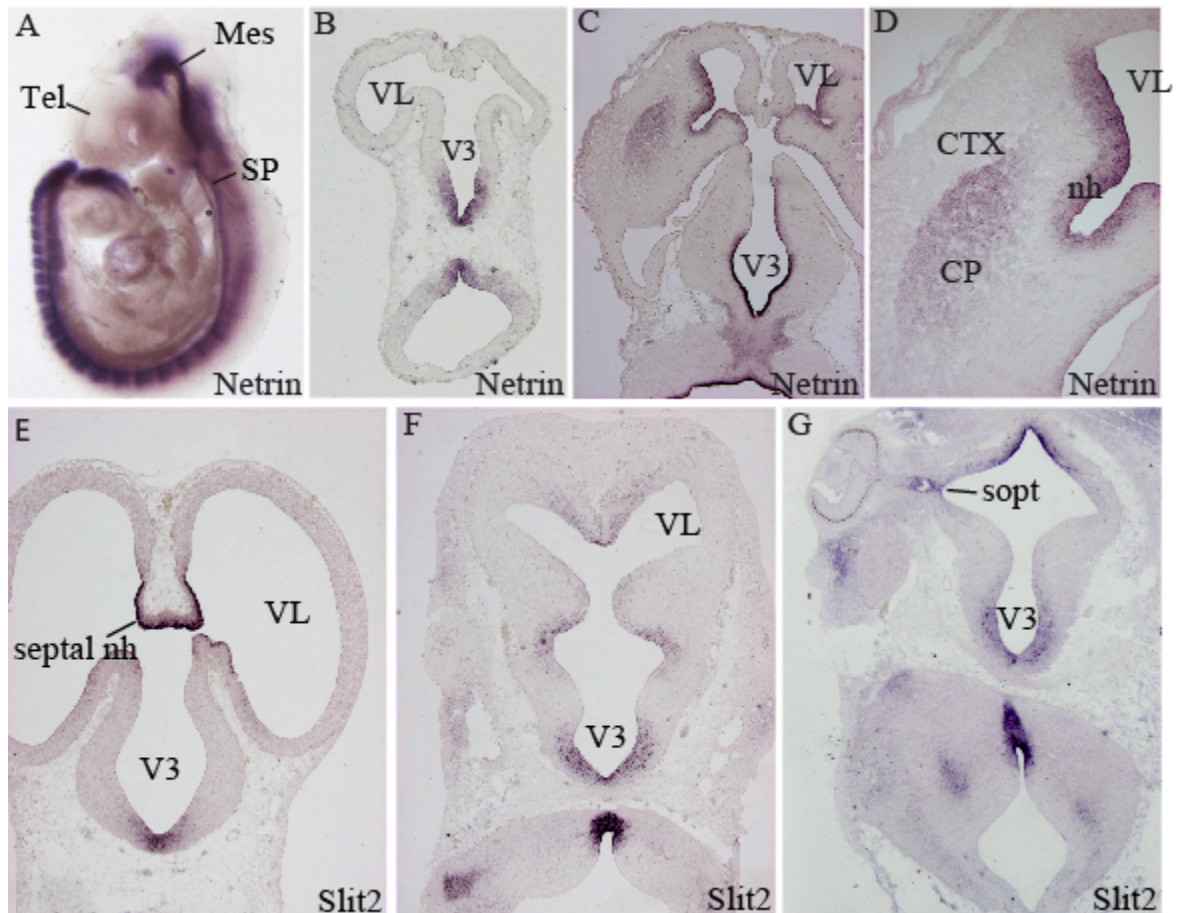


Figure 47 Microphotographies illustrant le signal *in situ* de Nértrine1 et Slit2 à différents stades embryonnaires.

(A) Détection de Nértrine1 par hybridation *in situ* sur un embryon entier de souris E9. Nértrine1 est exprimé le long du tube nerveux ainsi que dans les somites. Aucun signal n'est observé dans les régions télencéphaliques (Tel).

(B-D) Photographies montrant le marquage Nértrine1 obtenu par hybridation *in situ* sur des coupes horizontales de cerveau de souris E11 (B) et E14 (C-D). Nértrine1 est détecté dans le télencéphale des embryons E14 mais pas dans cette région au stade E11.

(E-G) Microphotographies illustrant le marquage HIS Slit2 sur des coupes horizontales de cerveau d'embryons de rat E13 (E, F) et E14 (G). Slit2 est exprimé dans les régions antérieures comme la pointe du septum (E) mais aussi dans les régions germinatives de l'hypothalamus à l'origine de la « zone à MCH ».

CP: caudoputamen; CTX: cortex cérébral; DOR: thalamus dorsal; MAM: hypothalamus mammillaire; Mes: mésencéphale; nh: neuroépithelium germinatif; sopt : sulcus optique; SP: moelle épinière; Tel: télencéphale; V3 : troisième ventricule ; VNT: thalamus ventral; VL: ventricule latéral.

4.3 Expression des récepteurs DCC et Robo2

Les pics de genèse des sous-populations de neurones à MCH sont bien définis chez le rat. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'étudier l'expression des récepteurs DCC et Robo2 chez cette espèce. Ces récepteurs lient spécifiquement Nétrine1 et Slit2, respectivement. Le profil d'expression du récepteur DCC est bien connu au cours du développement (Gad et al. 1997). Précocement, DCC est exprimé majoritairement dans les cellules postmitotiques du SNC. A E9,5 chez la souris, DCC est tout d'abord détecté dans le rhombencéphale mais pas dans le prosencéphale, le mésencéphale et la moelle épinière. En revanche, à E11,5 il est présent dans toutes ces régions. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature.

Dans cette étude, nous décrirons plus particulièrement la distribution des récepteurs DCC et Robo2 dans la « zone à MCH ». Nous avons étudié le profil d'expression de ces récepteurs à partir de E12, stade précédent l'apparition des premiers neurones ainsi que des premières fibres MCH. DCC est présent seulement dans les régions postérieures du tube nerveux. A E13, DCC est observé dans les régions du manteau naissant dans la « zone à MCH » (**Figure 48**). Le récepteur DCC est un récepteur à la protéine de guidage Nétrine1 pouvant être impliqué dans l'attraction des axones qui l'expriment (Barallobre et al. 2005). DCC est toujours exprimé à E14 et à E15 dans ces régions. DCC est révélé dans les régions du manteau de l'hypothalamus mais jamais dans les cellules constituant le neuroépithélium germinatif (Deiner et Sretavan 1999). Des marquages MCH sur les lames voisines confirment que DCC est détecté dans la même région que les neurones à MCH (**Figure 48**). Nous avons réalisé des doubles marquages DCC par hybridation *in situ* et MCH par immunohistochimie aux stades E14 et E15. Certains neurones à MCH exprimaient DCC. Ces observations ont été réalisées par microscopie mais l'acquisition d'images n'a pas permis de les retranscrire

correctement. En effet, le marquage MCH est déjà faible sur du tissu embryonnaire et la révélation enzymatique de la sonde DCC rend encore plus compliquée sa détection. Nous avons alors tenté de mettre au point l'hybridation *in situ* révélant DCC chez les souris MCH-GFP puisque l'anticorps anti-GFP permet une meilleure détection des cellules MCH. Malheureusement, l'hybridation *in situ* n'a pas été probante. Nous avons également tenté de cultiver des neurones à MCH issus de souris mais il semblait qu'à chaque expérience, la quantité de cellules issues des hypothalami (« zone à MCH ») n'était pas suffisante et le manque de temps nous a conduits à arrêter ces mises au point. Des doubles immunohistochimies DCC/MCH ont aussi été réalisées mais n'ont pas pu permettre une meilleure co-détection de ce récepteur et de MCH. Néanmoins, l'observation de certaines coupes nous ont permis d'observer sans équivoque la co-expression de DCC avec MCH (**Figure 48**)

Le récepteur Robo2 est un récepteur de la protéine de guidage axonal Slit2, exclusivement impliqué dans la répulsion des axones. Robo2 est exprimé par les cellules postmitotiques du système nerveux central. Sur nos coupes, nous avons constaté qu'à E13, les régions rétéchiasmatiques étaient marquées et qu'au stade E14, les régions latérales de l'hypothalamus tubéral l'étaient aussi, correspondant à la « zone à MCH » (**Figure 48**). En revanche, dans cette étude, un intense marquage était détecté à E15 dans diverses régions du thalamus dorsal et ventral. Nous avons observé ce marquage à partir du premier stade étudié, E13. Tout comme dans cette étude, nous avons remarqué à E15, la présence de Robo2 dans des régions antérieures du télencéphale basal comme le globus pallidus, le striatum ou le cortex (Marillat et al. 2002). Nous avons réalisé des doubles marquages Robo2 (HIS)/ MCH (immunohistochimie) qui ne nous ont pas une fois encore clairement permis de conclure sur l'expression de ce récepteur par les neurones à MCH. Nous avons observé au microscope

certaines neurones MCH exprimant ce récepteur mais les acquisitions n'étaient pas probantes (**Figure 48**). L'utilisation d'un anticorps anti-Robo2 fournit par le Dr Murakami n'a pas permis d'obtenir un marquage suffisamment intense pour le coupler à un second révélant MCH (Andrews et al. 2006). Néanmoins, à l'instar de DCC, la co-détection de Robo2 et de MCH a clairement été observée dans certains neurones.

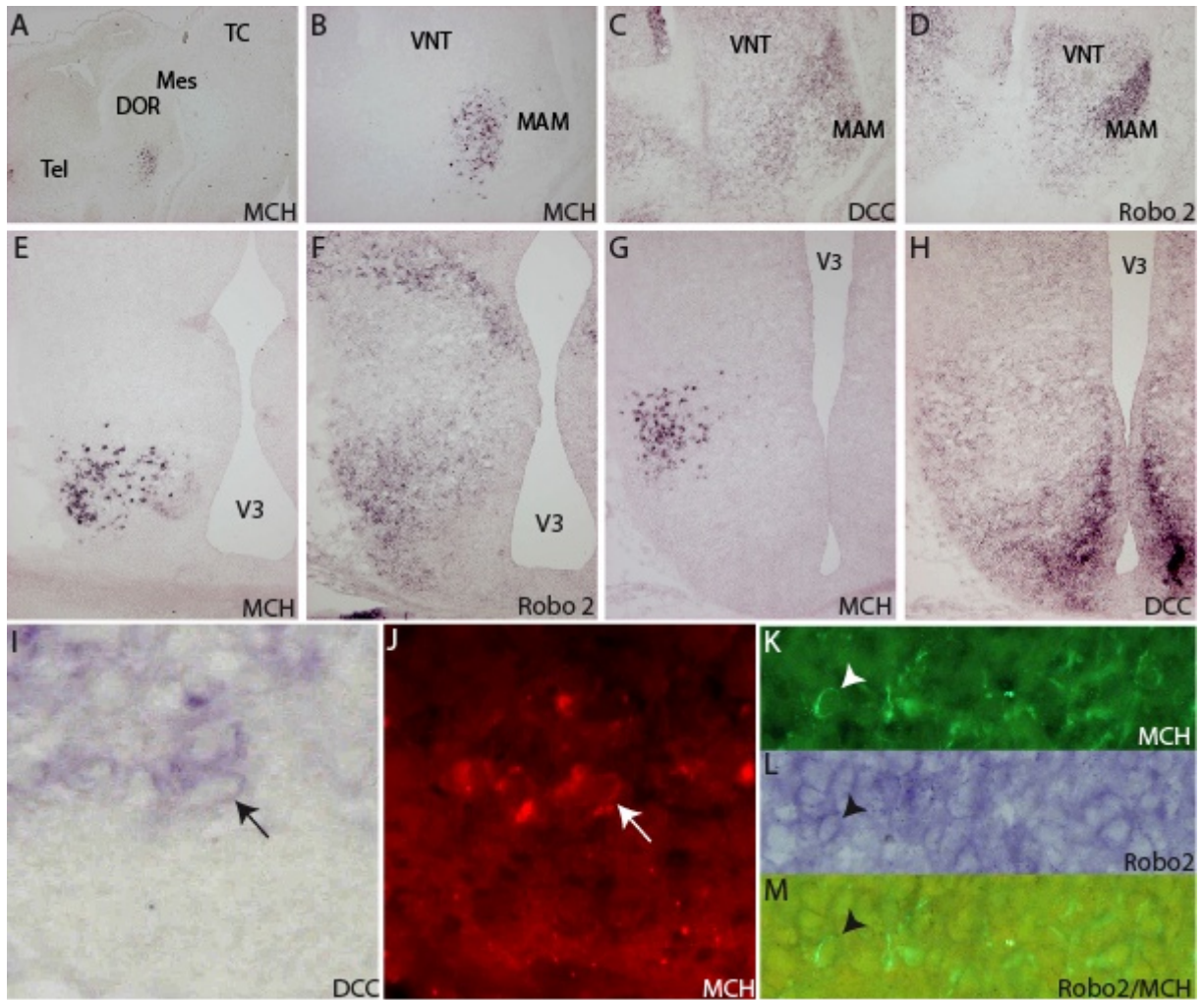


Figure 48 Microphotographies illustrant les marquages DCC et Robo2 obtenus par hybridation *in situ* et immunohistochimie sur des coupes de cerveau de rat.

(A-H) Signaux *in situ* révélant MCH, DCC et Robo2 sur des coupes sagittales (A-D) ou horizontales (E-H) passant par l'hypothalamus de cerveau de rat E15. Les récepteurs DCC et Robo2 sont exprimés dans la même région que les neurones à MCH.

(I-J) Double marquage DCC (HIS)/ MCH (immunohistochimie) montrant que certains neurones à MCH expriment DCC.

(K-M) Double marquage Robo2 (HIS)/ MCH (immunohistochimie) révélant que certains neurones à MCH expriment aussi Robo2 sur des coupes de cerveau de rat E15.

DOR: thalamus dorsal; MAM: région hypothalamique mammillaire; Mes: mésencéphale; Tel: télencéphale; V3 : troisième ventricule ; VNT: thalamus ventral; VL: ventricule latéral.

4.4 Influence de Nétrine1 sur l'attraction des axones des neurones à MCH

La liaison de Nétrine1 à DCC peut conduire à l'attraction comme à la répulsion des axones exprimant ce récepteur. Ces effets sont dépendants du récepteur auquel cette protéine va se fixer. Nos observations laissaient entrevoir qu'un gradient de concentration de Nétrine1 influençait la direction des axones MCH. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps, réalisé des co-cultures tridimensionnelles d'explants embryonnaires (E16) d'hypothalamus postérieur en présence d'agrégats de cellules surexprimant ou non Nétrine1 (**Figure 49**). La surexpression de cette protéine a été vérifiée par western blotting après révélation avec un anticorps anti-c-myc puisque l'expression de Nétrine1 est couplée avec ce peptide dans les lignées utilisées (non illustré). Ces co-cultures ont été réalisées dans un gel de plasma/thrombine coagulé ; ce modèle permet aux fibres de croître dans tous les plans. Après deux jours de culture, les axones sont révélés par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti- $\beta 3$ tubuline. Les axones poussent radialement tout autour de l'explant. Après comptage, le nombre d'axones immunomarqués est significativement plus important du côté de l'agrégat de cellules surexprimant Nétrine1 (côté proximal) que du côté distal, ce qui n'est pas le cas en présence d'un agrégat de cellules contrôle. Le ratio du nombre d'axones du côté proximal par rapport au côté distal (p/d) avoisine 2, cela signifie qu'environ deux fois plus d'axones $\beta 3$ -tubuline positifs sont présents du côté proximal des explants hypothalamiques. Ces résultats suggèrent que les axones de l'hypothalamus postérieur sont attirés par Nétrine1. Dans le but de vérifier la spécificité de l'attraction de Nétrine1 via le récepteur DCC, des co-cultures ont été réalisées en présence d'un anticorps anti-DCC afin de bloquer l'action de ce récepteur. Sa présence annule l'effet attracteur exercé par Nétrine1 sur les axones $\beta 3$ -tubuline positifs. Des contrôles ont été faits pour écarter tout effet provenant de la molécule d'IgG elle-même mais

aussi en présence de cellules contrôles. Dans tous ces cas, les axones β 3-tubuline positifs poussent tout autant du côté proximal que distal de l'explant.

Afin d'affiner ces résultats, nous avons cultivé des explants embryonnaires (E15) de « zone à MCH » issus de souris MCH-GFP. En effet, l'utilisation de souris Swiss CD1 ne nous permettait pas de détecter la MCH dans les axones en croissance dans le gel de plasma-thrombine. Le tag « GFP » augmente la sensibilité de détection du peptide MCH. Ces co-cultures ont été réalisées de la même manière que celles décrites précédemment. Après deux jours de cultures, les axones MCH ont été révélés grâce à un anticorps anti-GFP. De la même manière, les axones GFP-positifs sont attirés par l'agrégat de cellules surexprimant Nétrine1 par rapport au contrôle (Figure 50). Le ratio p/d s'approche de 1,4. Le blocage du récepteur DCC annule cet effet d'attraction de Nétrine1 sur les axones GFP-positifs. Les mêmes contrôles sont réalisés et cette fois encore, ces axones poussent radialement autour de l'explant hypothalamique.

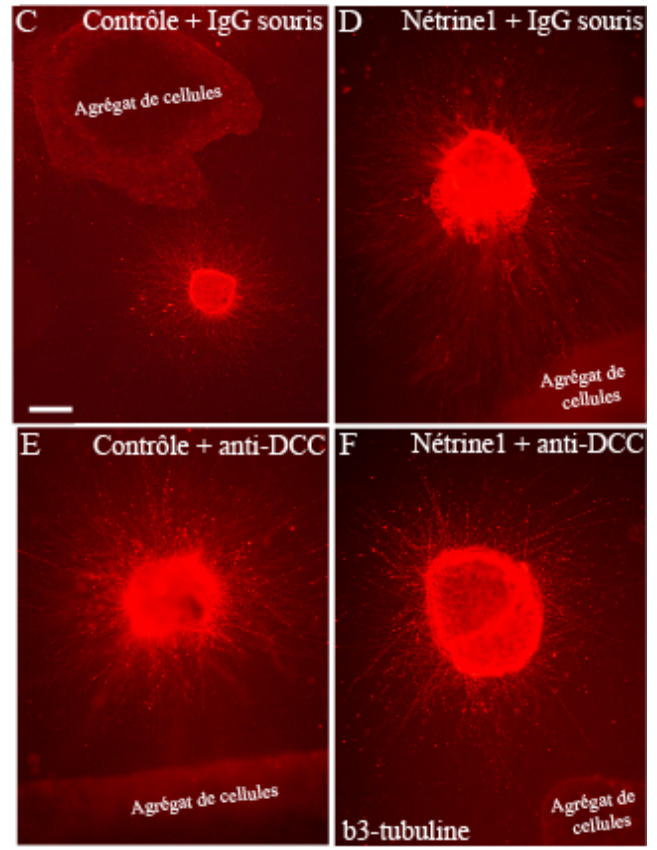
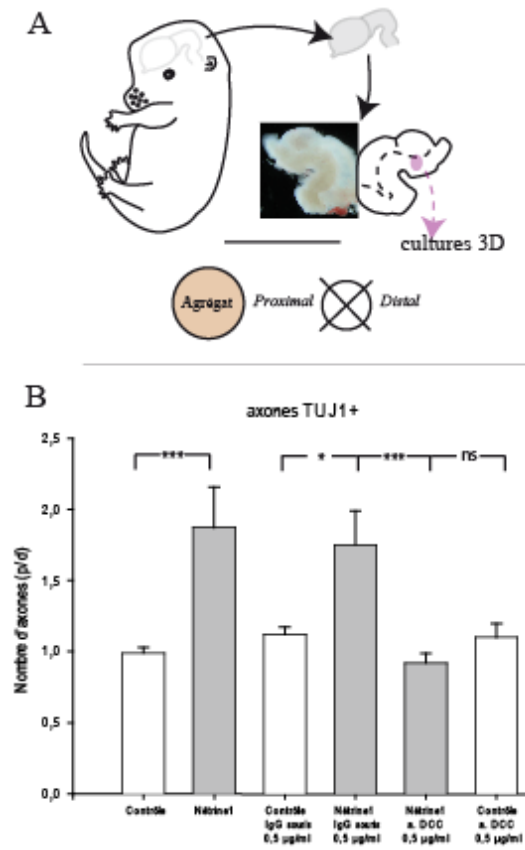
Figure 49 Cultures tridimensionnelles d'explants issus d'hypothalamus postérieur de souris E16 mettant en évidence l'attraction de Nétrine1 sur les axones des neurones hypothalamiques révélés par β 3-tubuline.

(A) Grandes étapes de la mise en culture tridimensionnelle d'explants d'hypothalamus postérieur d'embryons de souris. Les cerveaux sont disséqués, la « zone à MCH » extraite, les explants sectionnés en pièces de 200 μ m de diamètre et mis en culture dans un gel de plasma/thrombine. Après deux jours *in vitro*, les axones, révélés par β 3-tubuline ou GFP sont comptés du côté distal et proximal de l'explant par rapport à l'agrégat de cellules. Le ratio entre ces axones est calculé pour chaque explant.

(B) L'analyse statistique de la croissance de axones β 3-tubuline-positifs montre qu'ils sont attirés de manière significative par les cellules surexprimant Nétrine1 mais pas par les cellules contrôles. L'addition d'un anticorps anti-DCC bloque cet effet.

(C-F) Photographies de la croissance des axones révélés par une immunohistochimie β 3-tubuline. Les axones issus des explants hypothalamiques poussent tout autour de l'explant en présence de cellules contrôles et d'IgG de souris **(C)**. En présence de ces mêmes IgG mais de cellules surexprimant Nétrine1, les axones poussent plus du côté de l'agrégat que du côté distal **(D)**. La croissance des axones est radiale en présence de cellules contrôles et d'anticorps anti-DCC **(E)** de même qu'en présence de cellules surexprimant Nétrine1 et d'anticorps anti-DCC **(F)**. Nétrine1 attire les axones de l'hypothalamus postérieur.

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. *** : $p \leq 0,001$; * : $p \leq 0,05$; ns : non significatif, test de Mann Whitney.



4.5 Influence de Slit2 sur les axones des neurones à MCH

Les neurones à MCH et le récepteur Robo2 sont exprimés dans les mêmes territoires. Ce récepteur à Slit2 est exclusivement impliqué dans la répulsion des axones et nous avons étudié l'influence de cette protéine sur la croissance des axones MCH. Nous avons, pour cette expérience, également utilisé des embryons (E15) issus de souris MCH-GFP (**Figure 51**). La mise en culture et les conditions de culture restent les mêmes qu'énoncées précédemment, sauf que les explants sont cette fois-ci cultivés en présence d'agrégats de cellules surexprimant Slit2. L'expression de cette protéine est couplée à celle de la GFP ; afin de vérifier si les cellules exprimaient bien cette protéine, une simple observation en microscopie à épifluorescence était suffisante. Les co-cultures en présence de cellules surexprimant Slit2 entraînent la répulsion des axones GFP-positifs. En effet, le ratio du nombre d'axones p/d vaut 0,5. En d'autres termes, les axones comptés du côté distal sont plus nombreux que du côté proximal. L'effet de Slit2 est bloqué par l'ajout d'un anticorps anti-Robo2 car autant d'axones GFP-positifs poussent d'un côté de l'explant que de l'autre. Des contrôles sont faits pour écarter tout effet provenant de la molécule d'IgG de lapin elle-même mais aussi en présence de cellules contrôles. La croissance des axones GFP positifs est radiale dans ces conditions.

Figure 50 Photographies et données graphiques illustrant l'influence de Nétrine1 sur la croissance des axones des neurones à MCH

(A-D) Photographies des explants hypothalamiques après deux jours de culture en présence de cellules contrôles ou surexprimant Nétrine1 et en présence d'IgG de souris ou d'anticorps anti-DCC. Les axones MCH ont été révélés par immunohistochimie GFP. **(A)** En présence de cellules contrôles, les axones GFP-MCH-positifs poussent tout autour de l'explant. **(B)** La protéine Nétrine1 attire les axones MCH-GFP. En présence de cellules contrôles seules **(C)** ou en présence de cellules surexprimant Nétrine1 et d'anticorps anti DCC, les axones MCH-GFP poussent radialement tout autour de l'explant hypothalamique.

(E) Nétrine1 attire significativement les axones MCH-GFP positifs de même qu'en présence d'IgG de souris. En revanche, l'ajout d'anticorps anti-DCC lors de la culture bloque l'effet de Nétrine1.

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. * : $p \leq 0,05$; ns : non significatif, test de Mann Whitney.

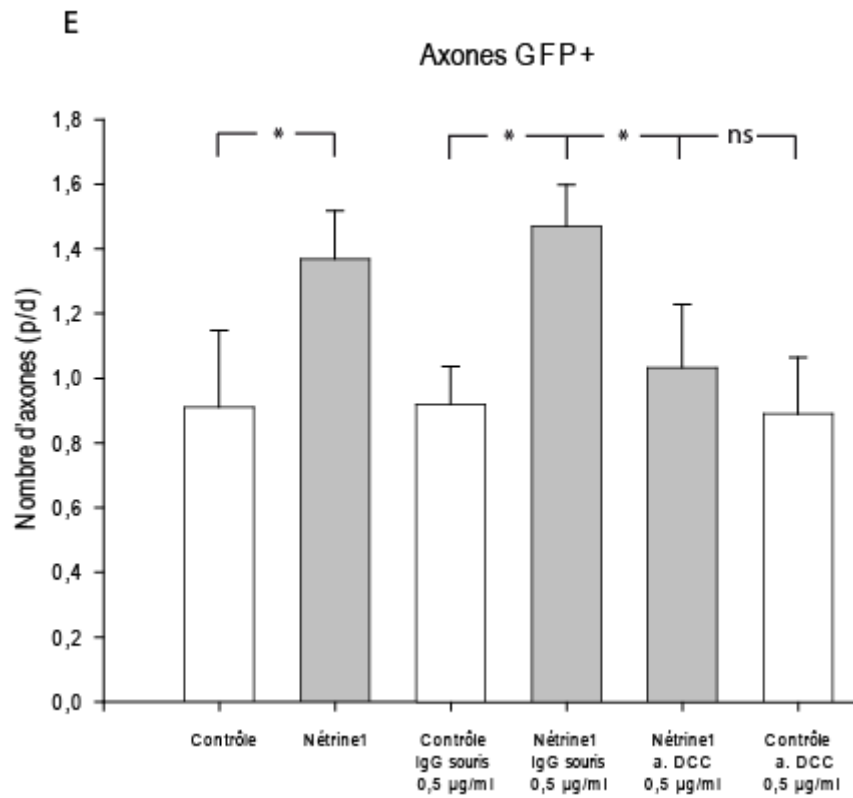
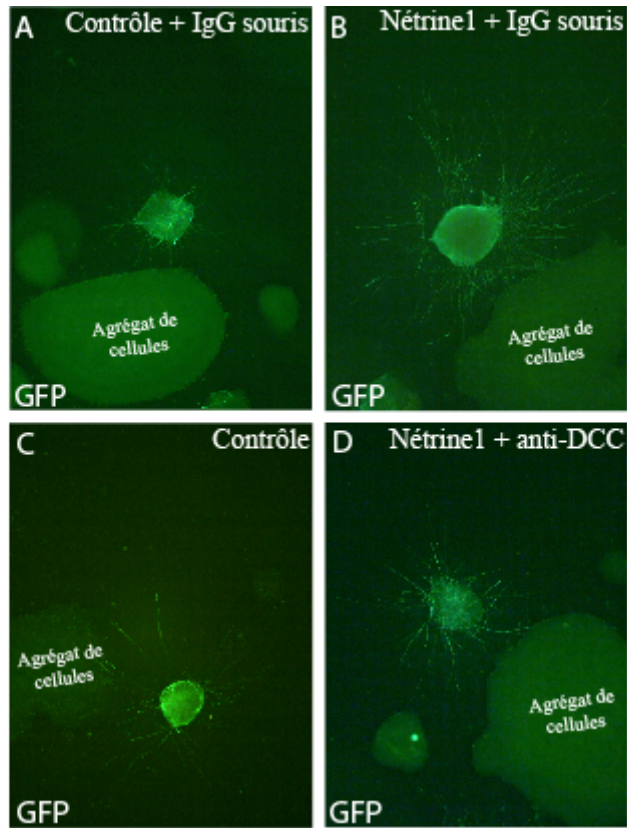
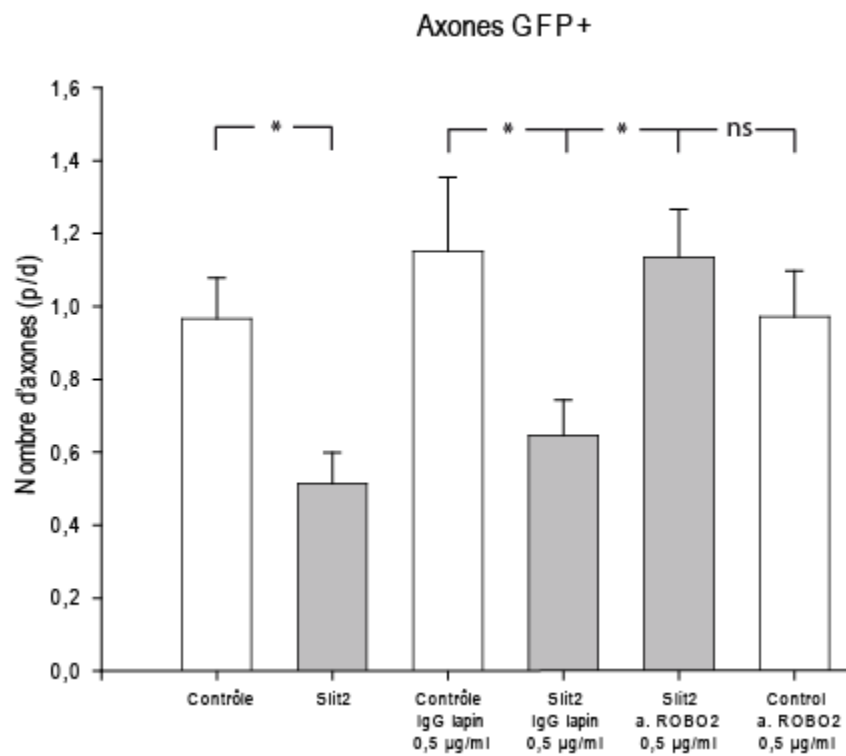
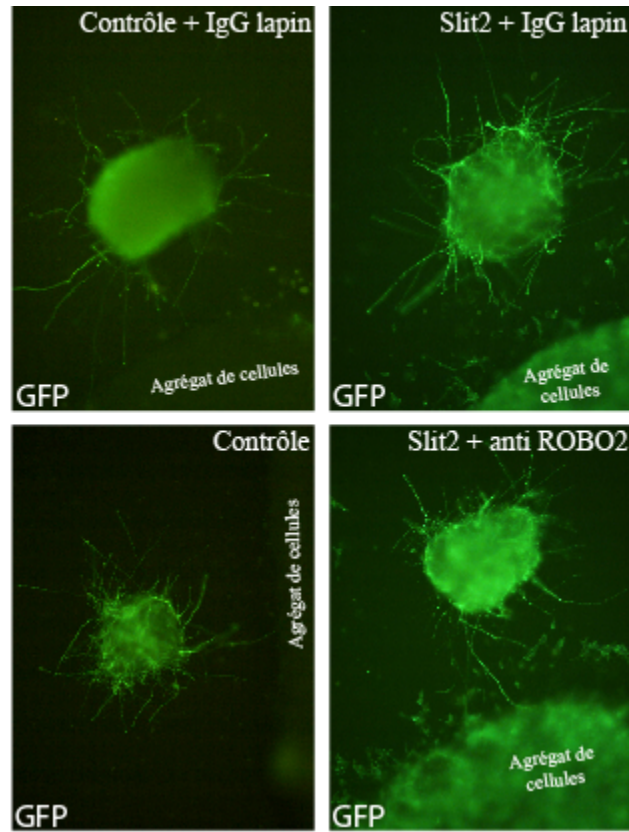


Figure 51 Photographies et données graphiques illustrant l'influence de Slit2 sur la croissance des axones des neurones à MCH.

(A-D) Photographies des explants hypothalamiques après deux jours de culture en présence de cellules contrôles ou surexprimant Slit2 et en présence d'IgG de souris ou d'anticorps anti-Robo2. Les axones MCH ont été révélés par immunohistochimie GFP. (A) En présence de cellules contrôles (C) et d'IgG lapin (A), les axones GFP-MCH-positifs poussent tout autour de l'explant. (B) La protéine Slit2 repousse les axones MCH-GFP. Cet effet est bloqué par l'ajout d'anticorps anti-Robo2.

(E) Slit2 repousse significativement les axones MCH-GFP positifs de même qu'en présence d'IgG de lapin. En revanche, l'ajout d'anticorps anti-Robo2 lors de la culture bloque l'effet de Slit2.

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. * : $p \leq 0,05$; ns : non significatif, test de Mann Whitney.



DISCUSSION

La deuxième partie de notre travail avait pour but de comprendre le développement des neurones à MCH et son influence sur la différenciation des deux sous-populations MCH ; la compréhension des mécanismes impliqués devant apporter un éclairage nouveau sur l'organisation morphofonctionnelle de ces neurones et des territoires de l'hypothalamus postérieur. Deux approches complémentaires ont été mises en œuvre : nous avons cherché à définir chez l'embryon le territoire du tube nerveux dans lequel ces neurones sont générés et nous avons analysé en détails les étapes initiales de leur différenciation dans ces régions. Dans un second temps, nous avons voulu comprendre les mécanismes à l'origine des projections de ces deux sous-populations dirigées, respectivement, vers les extrémités postérieures et antérieures du SNC.

Les sous-populations MCH ont été initialement décrites chez le rat et certaines investigations ont été préférablement conduites chez cette espèce. Nous avons également montré qu'elles existaient, avec des différences, chez la souris, et des modèles de souris génétiquement modifiées ont aussi été utilisés. Parce que très peu de données concernant l'ontogenèse des neurones à MCH chez la souris existent dans la littérature, les distributions du peptide MCH et de l'ARNm correspondant ont aussi été analysées dans l'embryon de cette espèce.

I. La différenciation précoce du phénotype MCH en fait un modèle de choix

Les travaux antérieurs de l'équipe ont montré l'expression embryonnaire très précoce du peptide MCH chez le rat (E13), cette détection précoce étant indispensable à nos travaux. Chez la souris, l'ARNm pMCH et le peptide lui-même sont mis en évidence dès E11. Ces neurones différencient leur phénotype chimique aussi précocement chez l'une ou l'autre espèce considérant leurs durées de gestation respectives (21 ou 18 jours). Dans le modèle de souris MCH-GFP, nous n'avons observé aucune différence dans l'apparition des premiers

neurones immunoréactifs pour la GFP, indiquant que cette modification génétique n'entraînait pas de modification de la différenciation du phénotype MCH.

Chez la souris, très peu de données publiées concernant l'ontogenèse des systèmes peptidergiques hypothalamiques sont disponibles. Il est donc difficile de comparer l'ontogenèse des neurones à MCH avec celle d'autres neurones. Chez le rat, espèce pour laquelle de plus abondantes informations sont disponibles, Brischoux et al. (2001) ont noté qu'à E13, les neurones à MCH étaient parmi les premiers à exprimer leur phénotype peptidergique dans l'hypothalamus. Une autre étude a relaté l'expression du messager pMCH et du peptide MCH chez des embryons tardifs mais aussi chez des nouveau-nés de rats (Steininger et al. 2004). Les auteurs ont observé une expression ectopique transitoire de MCH à partir de E16, dans le noyau genouillé ventro-latéral du thalamus, et à partir de E20 dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et dans le septum latéral. Ils ne les ont plus observés quelques jours après la naissance. Nous n'avons jamais observé ces neurones sur aucun de nos matériels.

Chez la souris comme chez le rat, les neurones voisins à Hcrtn ne sont détectables qu'au environ de la naissance (Steininger et al. 2004). Cette différence dans l'apparition des expressions peptidiques pour deux populations co-localisées dans la même région adulte et générées en même temps pose la question d'une fonction éventuelle liée à cette expression précoce de MCH, et suggère que ce peptide pourrait jouer un rôle pendant le développement. Des résultats publiés dans plusieurs études étayaient cette hypothèse pour MCH (Cotta-Grand et al. 2009) mais aussi pour NEI (Kistler-Heer et al. 1998).

D'autres populations peptidergiques sont générées aussi précocement dans l'hypothalamus du rat : les neurones parvocellulaires à corticotropin releasing hormone (CRH), à growth hormone releasing hormone (GRH), à somatostatine (SS), à tyrosine hydroxylase (TH), à

thyrotropin releasing hormone (TRH) ont des pics de genèse à E12 ou E13 chez le rat (Markakis 2002). Ces neurones sont présents dans la partie parvocellulaire du PVN (CRH, TRH), dans le noyau périventriculaire (SS) ou dans l'ARH (GRH, TH).

La distribution spatio-temporelle de l'expression MCH dans l'hypothalamus postérieur présomptif est très similaire chez la souris par rapport au rat. Cependant, l'utilisation du modèle MCH-GFP a permis d'effectuer des observations complémentaires. Les neurones immunoréactifs MCH-GFP sont observés dans le neuroépithélium germinatif et présentent un profil de migration : ils possèdent des corps cellulaires et des dendrites orientés radialement. Ces données témoignent d'une neurogenèse locale.

Cette étape préliminaire de l'étude de la différenciation de l'expression somatique de MCH a donc confirmé que ces neurones se mettent en place aussi précocement chez le rat que chez la souris, constituant un bon modèle pour l'étude du développement des régions hypothalamiques postérieures chez les deux espèces

II. Différenciation MCH et prolifération cellulaire

Cette partie de notre travail a été effectuée chez le rat en raison d'une meilleure caractérisation des pics de genèse des deux sous-populations à projections spinales ou corticales (Brischoux et al. 2001; Cvetkovic et al. 2004; Risold et al. 2009). Des injections de BrdU aux rates au 11^{ème} ou 12,5^{ème} jour de gestation ont été réalisées afin d'identifier des neurones appartenant, respectivement à l'une ou l'autre des deux sous-populations sur nos coupes d'embryons.

Le neuroépithélium germinatif est le siège d'une intense activité proliférative pendant les premiers stades de neurogenèse et le marquage BrdU révélé, 2, 6 et 10 heures après injection

au stade E11 montre que des cellules ont incorporé ce marqueur de la prolifération cellulaire dans l'ensemble du tube nerveux. En 1979, les travaux de Keyser chez l'embryon du cochon d'Inde, décrivaient une matrice (couche maternelle) ou zone de prolifération active dans le neuroépithélium germinatif correspondant aux cellules germinales. Cette matrice évolue au cours du temps, formant des patrons caractéristiques des stades embryonnaires dans le tube nerveux. Nos observations effectuées uniquement à E11 ne nous ont pas permis de décrire des zones pouvant correspondre à la matrice telle que décrite par cet auteur, le marquage nous semblant homogène dans tout le neuroépithélium germinatif quelques heures après injection. Cependant, l'analyse du marquage dans l'épaisseur du neuroépithélium germinatif 2 à 10 heures après injection a clairement mis en évidence les mouvements 'interkinétique' des noyaux des cellules pendant le cycle cellulaire. Les premiers noyaux BrdU positifs dans des neuroblastes ont été observés à E12, soit 24 heures après l'injection du BrdU. Cette observation est importante car elle montre qu'un laps de temps (jusqu'à 24h) existe entre l'incorporation du BrdU, lorsque la cellule est en phase S du cycle et l'implantation du neuroblaste dans la couche du manteau. Ainsi, lorsqu'il est dit de manière courante dans la littérature (et en particulier par nous-mêmes) que les neurones sont nés au moment de l'injection du BrdU, en réalité les neuroblastes apparaissent dans le manteau 24 heures plus tard, soit à E12 chez le rat pour des neurones qui sont nés (incorporent le BrdU) à E11 (**Figure 55**). Cette observation est importante afin d'analyser en détails les phénomènes liés à la différenciation des sous-populations de neurones à MCH.

Nous n'avons pu mettre en évidence de matrice telle que décrite par Keyser mais en revanche, nous avons clairement constaté que les premiers neurones à MCH se mettent en place dans une bande longitudinale de neuroblastes résultant d'une neurogenèse précoce décrite par ce même auteur et nommée 'cell cord'. Cette bande s'étend des régions chiasmatisques jusqu'au mésencéphale ventral en passant par l'hypothalamus postérieur (Keyser 1972; Keyser 1979) (**Figure 52**). Une divergence entre nos observations et celles de Keyser concerne les régions préoptiques dans lesquelles nous avons observé une neurogenèse précoce contrairement à ce qui avait été précédemment décrit chez le cochon d'Inde.

Development of the Hypothalamus in Mammals

107

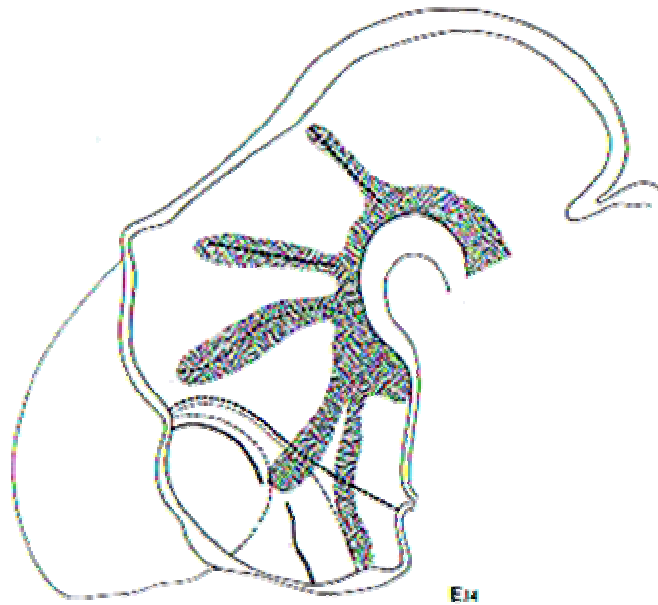


Figure 23 Schematic representation of the zones of early progressive differentiation within the diencephalon. (From Keyser, 1972.)

Figure 52 Schéma représentant les zones de différenciation du diencephale de l'embryon E14 de Hamster (Keyser 1979)

A E14, ces zones de différenciation sont observées du mésencéphale ventral jusque dans les régions rétrochiasmatisques. Cette 'cell cord' définit les régions diencephaliques.

Cette 'cell cord' a clairement été mise en évidence par la distribution des noyaux BrdU sur des coupes d'embryons prélevés deux ou trois jours (E13-E14) après l'injection à E11. Par double marquage, de nombreux neurones à MCH (autour de 45%) possèdent un noyau BrdU positif à E14. Après injection de BrdU à E12,5, la distribution du marquage est très différente : la 'cell cord' mise en évidence après injection à E11 ne contient que peu de noyaux marqués, ceux-ci sont abondants autour de cette zone mais aucune autre régionalisation n'est clairement discernable.

Par double marquage MCH/BrdU à E14, les neurones à MCH sont localisés dans la 'cell cord' à la limite de la zone riche en noyaux BrdU-positifs après injection E12,5 (p186) et seulement 14,5% présentent un noyau marqué. Cette disposition illustre le gradient latéral à médian de mise en place des neurones à MCH décrit dans la Partie I. Ainsi à E14, la majorité des cellules sont détectées très latéralement dans le manteau et correspondent aux neurones produits les plus précocement, puis ceux générés plus tardivement se différencient en position plus médiane.

D'autres travaux du développement de l'hypothalamus de rat (Altman et Bayer 1986) décrivent une neurogenèse hypothalamique en trois vagues successives : les neurones du LHA naissent entre E12 et E15 avec un pic de genèse à E13 (hypothalamus réticulé). L'hypothalamus contenant les noyaux médians (préoptique, antérieur, ventromédian et le corps mammillaire) puis les aires périventriculaires sont générées tardivement, de E14 à E17. Ni nos observations présentes ou passées concernant la genèse de populations neuronales co-localisées avec les neurones à MCH (Legagneux et al. 2009; Risold et al. 2009), ni les données de l'ontogenèse des neurones parvo- et magnocellulaires rappelées plus haut et appartenant à la région périventriculaire ne sont en faveur de cette théorie de neurogenèse en trois vagues successives. Cette théorie suggère par ailleurs que l'ensemble des aires hypothalamiques latérales (préoptique, antérieure, tubérale et postérieure) sont produites en

mêmes temps, mais ni la distribution des noyaux BrdU dans la 'cell cord' après injection à E11, ni l'analyse discutée ci-dessous du rôle et de la distribution des gènes du développement dans l'hypothalamus ne corroborent cette hypothèse. D'après nos observations, l'hypothalamus se différencie suivant un schéma plus complexe. Certes, un gradient latéro-médian semble évident mais il ne correspond pas à des vagues à proprement parler. Il apparaît que l'hypothalamus au niveau et en arrière du sulcus opticus débute sa neurogenèse (E10/12) par la formation de la 'cell cord'. Celle-ci donne naissance au LHA qui contient les premiers neurones à MCH et à la région rétrochiasmatique en position médiane, entre autre. Peu après (E12/14), des neurones plus médians sont générés mais incluent des neurones à MCH dans le LHA (ex : neurones périfornicaux ou ZI) ou des neurones neuroendocriniens parvo- et magnocellulaires (voir plus haut) dont la localisation périventriculaire constitue la caractéristique fonctionnelle de cette zone longitudinale de l'hypothalamus. Enfin (E14/16), des neurones à projections intra-hypothalamiques se mettent en place mais il semble que cette dernière étape soit sujette à de grandes différences interspécifiques si l'on considère les divergences observées entre la distribution des neurones MCH dans le PVp du rat et de la souris. Pour terminer, la région préoptique adopte un mode de développement complètement différent qui correspond à celui des aires télencéphaliques ventrales (pallidum) avec la formation initiale d'une zone sub-ventriculaire (observations personnelles).

III. Différenciation MCH et expression génique dans l'hypothalamus

La caractérisation de la région du neuroépithélium germinatif où naissent les neurones à MCH a été entreprise au cours de la thèse de C. Amiot. Ces travaux permettent de conclure que ces neurones naissent en un même territoire restreint caractérisé par l'expression de Nkx2.1 et Nkx2.2 dans le neuroépithélium germinatif et de ces mêmes facteurs de transcription ainsi que Dlx1/2 dans le manteau. Cette région est bordée antérieurement par l'expression de Pax6.

Les travaux que nous avons poursuivis ces dernières années ont eu pour but de compléter ces premières données, ceci en étudiant la distribution d'autres gènes du développement connus pour être exprimés dans le diencephale. Nous avons également amorcé l'analyse des mécanismes impliqués dans la différenciation de ces neurones.

1. Expression génique dans l'hypothalamus

Nos propres observations ont concerné un nombre limité de gènes. Nous ne reviendrons pas sur leur distribution chez l'embryon, en effet, elle est identique à celle décrite dans de nombreux articles et ces données ont été abordées dans l'introduction, amplement discutées dans la thèse de C Amiot ainsi que dans de nombreuses revues (Puelles et Rubenstein 1993; Rubenstein et al. 1994; Shimamura et al. 1995; Briscoe et al. 1999; Retaux et al. 1999; Puelles et Rubenstein 2003; Shimogori et al. 2010; Diez-Roux et al. 2011). Il n'est pas indispensable de revenir sur ce point ici. Il nous semble beaucoup plus informatif de limiter notre discussion dans le cadre de deux études récentes rapportant la distribution comparée de plusieurs milliers de gènes dans l'hypothalamus et aboutissant à d'intéressantes conclusions quant à la signification anatomique et à un schéma de développement hypothalamique

différent (Shimogori et al. 2010; Diez-Roux et al. 2011). Tous les gènes que nous avons étudiés sont parmi ceux impliqués dans ces deux études.

Dans une première étude remarquable (Shimogori et al. 2010), une analyse détaillée par hybridation *in situ* et par microarray de l'expression de 1045 gènes a été réalisée sur douze stades développementaux distincts. Ces résultats ont conduit les auteurs à observer que ces gènes étaient exprimés de manière dynamique au cours de la neurogenèse hypothalamique, c'est à dire que leur expression était variable selon le stade du développement et la région étudiés.

Ces gènes sont classés par fonction : par exemple, ceux qui interviennent dans le cycle cellulaire ou dans la différenciation cellulaire. Ceux appartenant au premier groupe cité, sont exprimés précocement au cours de la neurogenèse hypothalamique, entre E10 et E14 chez la souris. Les gènes impliqués dans la différenciation des cellules sont exprimés un peu plus tard, une fois que les premiers neurones sont nés, entre E12 et E15 avec un pic d'expression entre E12 et E14. Il s'agit de gènes comme *Sim1* ou *Sim2*, connus pour être impliqués dans la différenciation des neurones magnocellulaires du PVN et du SON (Michaud et al. 1998; Xu et Fan 2007). Pour conclure, les gènes impliqués dans la différenciation terminale de phénotypes chimiques sont exprimés plus tardivement, à partir du stade E16. Il s'agit de marqueurs neuronaux comme galanine, hypocréatine, *Gad67* qui est une des enzymes de synthèse du GABA. Les études réalisées par hybridation *in situ* ont pour but de confirmer l'expression dynamique de ces gènes au cours du développement de l'hypothalamus. Les auteurs ont cherché à identifier des marqueurs moléculaires délimitant des régions spécifiques du neuroépithélium germinatif hypothalamique au cours de son développement. Ils utilisent un axe selon lequel, le corps mamillaire est en position ventrale et l'hypothalamus antérieur au thalamus. Ils ont défini une bande nommée diagonale intrahypothalamica (ID, **Figure 53**), caractérisée par l'expression de plusieurs gènes, codant souvent des facteurs de transcription,

parallèle à la bande d'expression de *Shh*. L'expression de gènes tels que *Nkx2.1*, *Lhx6* caractérise l'ID.

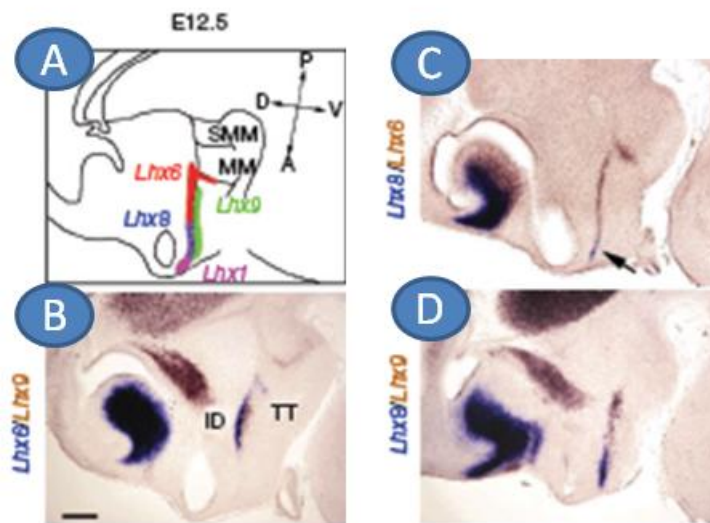


Figure 53 Schéma récapitulatif de la distribution de facteurs de transcription dans l'hypothalamus de souris E12 (selon nos critères de datation) et microphotographies sur coupes sagittales illustrant leur distribution par hybridation *in situ* (Shimogori et al. 2010).

Les membres de la famille *Lhx* délimitent les régions hypothalamiques au cours du développement.

(A) Schéma récapitulatif de la distribution de *Lhx6*, *Lhx7* (*Lhx8*) et *Lhx9*. L'axe d'orientation de l'embryon est fourni dans ce schéma.

(B) Photographies illustrant les co-expressions des ARNm *Lhx6* et *Lhx9* sur des coupes sagittales de cerveaux d'embryons de souris E12,5. *Lhx6* est exprimé dans la diagonale intrahypothalamica (ID) plus rostralement à *Lhx9*.

(C) *Lhx7* (*Lhx8*) est exprimé ventralement à *Lhx6*.

(D) *Lhx7* est exprimé rostralement et ventralement à *Lhx9*.

TT : tuberomammillary terminal ; MM : noyau mammillaire ; SMM : noyau supramammillaire.

Une autre étude, tout aussi complète, a récemment été publiée dans le journal *Plos Biology* (Diez-Roux et al. 2011). Elle concerne l'analyse de l'expression de 18000 gènes au stade embryonnaire de souris E14,5. Plus de 1000 gènes tissu-spécifiques apparaissent comme des marqueurs de 37 structures anatomiques différentes dont certaines régions cérébrales. Sur la base de la distribution de ces gènes, les auteurs ont proposé une nouvelle organisation de

l'hypothalamus. Selon l'expression des gènes caractéristiques de la plaque basale ou alar, les auteurs ont classé l'hypothalamus tubéromammillaire, incluant la neurohypophyse, l'hypothalamus antérieur et les régions suprachiasmiques comme dérivant de la plaque alar. En se basant également sur la distribution de différents gènes du développement, la théorie prosomérique développée par Puelles et Rubenstein décrivait ces mêmes régions comme dérivant de la plaque basale. Ces régions, incluant l'ARH et la neurohypophyse naissaient d'un territoire caractérisé par l'expression de Shh et de Nkx2.1 (Rubenstein et al. 1994; Puelles et Rubenstein 2003). Dans l'étude de 2011, les auteurs justifient ce changement par le fait que l'activité de Shh est différente suivant sa source, ligne médiane ventrale ou *zli* (Vieira et Martinez 2006) et que ceci est probablement dû à la nature basale ou alar de ces régions. En tous les cas, cette étude remet à nouveau en cause la place du *sulcus limitans* dans les régions prosencéphaliques.

Notre attention s'est portée sur l'expression de gènes dans la « zone à MCH ». Le territoire dans lequel ces neurones émergent est caractérisé par l'expression de Shh, Nkx2.1, Nkx2.2, Lim1/2 et Dlx1/2. Il est aussi le site spécifique d'expression de Lhx9 dans l'hypothalamus. Il correspond donc à l'ID décrit par Shimogori et al. (2010) et nous avons d'ailleurs noté l'organisation longitudinal de l'expression Shh et Nkx2.2. Nos résultats complètent cette étude sur au moins deux points : le premier intéresse l'apparition des marqueurs neuronaux qui n'est pas systématiquement tardive. Nous avons vu que MCH est un exemple d'expression très précoce. Ainsi, nous avons montré, en accord avec le travail de Keyser, que la neurogenèse ne débute pas de manière homogène dans l'hypothalamus. Les premiers neuroblastes sont observés dans des territoires très restreints de la 'cell cord' dont la distribution correspond à l'ID : nous avons montré la correspondance des domaines hypothalamiques d'expression de ces gènes avec le marquage BrdU injecté à E11. Le

deuxième point concerne le caractère ‘hypothalamique’ de l’ID. Les domaines d’expression de Nkx2.2 et de Shh s’étendent dans les régions ventrales du tube nerveux jusque dans la moelle épinière. Ce caractère montre un lien entre l’ID et des structures ventrales plus postérieures à l’hypothalamus. Cette ressemblance est renforcée par l’observation que la ‘cell cord’ est une bande de tissu où la différenciation neuronale est précoce et qui s’étend dans le mésencéphale ventral. A noter alors la contradiction avec les conclusions du travail de Diez-Roux (2011) qui assimile les territoires correspondant à l’ID ou à la ‘cell cord’ à de la plaque alar, c'est-à-dire à du tube nerveux dorsal qui dans le reste du tube nerveux développe une couche du manteau après la plaque basale (**Figure 54**).

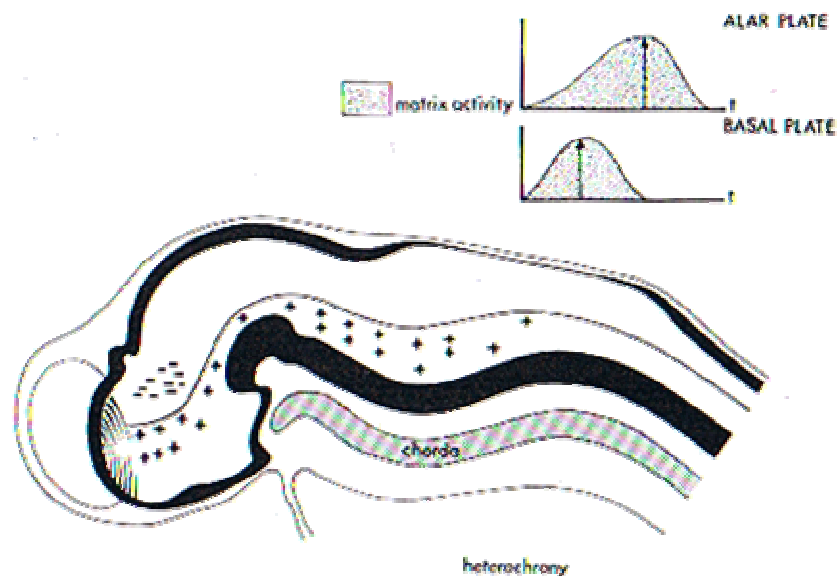


Figure 17 Schematic representation of the structural plan of the brain based on heterochrony phenomena. (After Kahle, 1951, 1956.)

Figure 54 Représentation schématique du plan d’organisation du cerveau de Hamster suivant la date de genèse des différentes structures (Keyser 1979)

La plaque basale est générée avant la plaque alar.

Toutefois, ni l'un ni l'autre de ces deux récents travaux ne semblent établir de lien entre cette bande de tissu hypothalamique et les régions plus postérieures. D'après Diez-Roux (2011), la *zli* aurait une influence particulière sur le développement de ces régions qui exprimeraient ainsi des caractères d'expression génique de la plaque basale. Cependant, nous avons vu sur notre matériel et dans la littérature que l'expression très précoce de Shh ou Nkx2.2 s'étend dans tout le tube nerveux ventral jusque dans la région de la tige optique avant que n'apparaisse le marquage de la *zli*. D'ailleurs cette structure n'existe pas à ces stades très précoces avant ou juste après la fermeture du neuropore antérieur et son apparition est liée à l'expression ventrale de Shh (Vieira et Martinez 2006). Les expressions de Shh et Nkx2.2 sont donc déjà visibles avant la formation de la *zli* dans les territoires présomptifs de l'hypothalamus postérieur ainsi qu'une très fine bande de co-expression Nkx2.1/2.2 d'où sont générés les neurones à MCH immédiatement après la fermeture du tube nerveux.

2. Différenciation du phénotype MCH

Peu de données existent dans la littérature concernant les facteurs impliqués dans la différenciation du phénotype MCH pendant le développement. Il n'entrait pas dans nos objectifs initiaux d'identifier ces mécanismes mais considérant la discussion ci-dessus, il était indispensable d'avoir quelques informations notamment à propos du rôle de Shh.

La protéine morphogène Shh est impliquée dans la mise en place des structures du télencéphale basal et de l'hypothalamus (Chiang et al. 1996). En effet, chez les souris dont le gène Shh est invalidé, les structures hypothalamiques sont absentes. Nos expériences sur les embryons Shh^{-/-} ou après des approches *in vitro* indiquent clairement que la différenciation du phénotype MCH est Shh-dépendante. Shh est une protéine sécrétée et il aurait été tout aussi important, si ce n'est plus, de comprendre quelles sont les cellules capables de répondre à ce signal. Pour cela, il aurait été nécessaire d'analyser l'expression de ses récepteurs

(Smoothened, Patched) et des Gli, facteurs de transcription impliqués dans la cascade de signalisation de Shh. Cela n'a pas été réalisé car, alors que nous acquérions nos données, une étude portant sur la différenciation de l'hypothalamus, stipulait que l'apparition du phénotype MCH ou la genèse de ces neurones était Shh-dépendante (Szabo et al. 2009). Nos propres résultats étaient donc confirmés et cela n'aurait pas apporté d'enseignements pour l'existence des deux sous-populations de neurones à MCH que de poursuivre dans cette direction.

La même équipe, dans une étude de devenir cellulaire, a décrit des neurones à MCH naissant de territoires du thalamus ventral, caractérisés par l'expression de Fox1b (Zhao et al. 2008). Ce facteur de transcription est exprimé dans le neuroépithélium germinatif, le long du tube nerveux entre les régions caudales et rostrales du diencéphale (dorsales à ventrales selon notre définition de l'axe embryonnaire), ce qui en fait, selon les auteurs, un marqueur de migration de ces régions dorsales dans l'hypothalamus. Les neurones à MCH migreraient ensuite tangentiellement le long des axones thalamo-hypothalamiques pour envahir le diencéphale ventral en les aires latérales de l'hypothalamus, entre autres. Cependant, cette expression de Fox1b débute très précocement et à ces stades, thalamus ventral et hypothalamus postérieur présomptif sont adjacents ; il pourrait donc s'agir, d'après les auteurs eux-mêmes, d'une migration apparente plutôt que d'une migration réelle de ces cellules. Les premiers neurones à MCH naissent dans un territoire qui exprime probablement aussi Fox1b et qui est extrêmement proche du thalamus ventral à ce moment du développement puis les tissus s'épaississant, le marquage donne l'apparence d'une migration, expliquant la présence de Fox1b dans certaines cellules hypothalamiques dans les modèles de souris permettant le traçage du devenir cellulaire. Nos observations sur les souris MCH-GFP laissent clairement entrevoir une migration radiale depuis le neuroépithélium germinatif dans l'hypothalamus postérieur, du moins aux stades E12, E14 et E15. Néanmoins, cette expression de Fox1b démasquerait-elle une sous-population à MCH ? Ce point reste à éclaircir. L'expression de

Nkx2.1 ainsi que celle de Nkx2.2 sont Shh-dépendantes. Ces deux facteurs de transcription ont été observés dans des noyaux des neurones à MCH. Tous les neurones hypothalamiques à MCH étaient aussi marqués pour Nkx2.1 mais le rôle de ces deux gènes dans la spécification du phénotype MCH n'est pas connu. Néanmoins, des motifs de liaison à l'ADN de Nkx2.1 ont été identifiés sur le gène MCH en utilisant le logiciel TESS (NC_005106 and M62641 (Schug 1997; Schug J 2003).

La différenciation de la « zone à MCH » implique d'autres gènes qui appartiennent à la famille LIM, comme Lhx8 ou Lhx7 et Lim 1/2 ou Lhx1 et Lhx5. Lhx7 est exprimé dans le noyau dorsomédian de l'hypothalamus. Les neurones à MCH ne l'expriment pas, ils sont en position beaucoup plus latérale dans le manteau.

Les neurones à MCH expriment Lim1/2 encore appelé Lhx1/5. Ces deux facteurs de transcription sont exprimés dans le prosencéphale rostral en développement de souris et du poulet. Ils sont observés selon des patrons similaires dans le septum, les régions préoptiques, dans le télencéphale basal comme l'amygdale. Dans le septum, l'expression de ces protéines permet la différenciation de neurones glutamaergiques. Ces protéines permettent l'expression des phénotypes GABAergique, glutamaergique et cholinergique des neurones des régions préoptiques et du télencéphale basal. Ces facteurs de transcription sont également exprimés dans différentes régions hypothalamiques (Abellan et al. 2010a; Abellan et al. 2010b). L'expression de Lim1/2 par les neurones à MCH pourrait permettre la différenciation de leur phénotype GABAergique. C'est également le cas de Dlx1/2 qui est aussi exprimé par ces neurones. Dlx1/2 est connu pour son implication dans la différenciation des cellules prosencéphaliques et précisément des neurones GABAergiques. L'expression des gènes Dlx est associée à l'expression de GABA dans les neurones du prosencéphale rostral. Des méthodes d'électroporation sur tranches en culture permettant l'expression ectopique de

protéine Dlx2 et Dlx5 provoquent l'apparition des enzymes GAD de manière ectopique, enzymes intervenant dans la synthèse du GABA.

D'autres gènes de la famille LIM ont été analysés dans l'étude de Shimogori et al. (2010) et ont été comparés à différents types neuronaux hypothalamiques. Ainsi, Lhx6 est co-exprimé avec l'ARNm CART dans des cellules des régions latérales et dorsomédianes de l'hypothalamus. Le messenger CART et le peptide sont présents dans différentes régions hypothalamiques comme le noyau paraventriculaire, le noyau supraoptique, l'hypothalamus latéral, le noyau dorsomédian, le noyau arqué... (Elias et al. 2001). Ainsi, les neurones exprimant CART dans l'étude de Shimogori (2010) correspondent à la seconde sous-population de neurones à MCH de type B. Nous avons observé que Lhx6 à E15 chez le rat est exprimé en position médiane par rapport aux neurones à MCH à ce même stade. Comme l'hypothalamus se met en place selon un gradient latéro-médian (Altman et Bayer 1978b,1986; Brischoux et al. 2001), nous pouvons penser que les neurones Lhx6-positifs observés à E15 à côté des neurones à MCH latéraux, sont peut-être des neurones à MCH de type B n'ayant pas encore différenciés leur phénotype MCH et CART. Chez le rat, le peptide CART n'est exprimé dans ces neurones qu'à E18 (Brischoux et al. 2001), c'est-à-dire peu avant la naissance.

Shimogori et al (2010) ont aussi montré que Lhx9 est co-exprimé avec Hcrt dans certains neurones et avec galanine dans des neurones latéraux mais est absent des neurones pMCH-positifs dans ces mêmes régions. Au cours du développement, nous avons également montré que les neurones à MCH n'expriment pas Lhx9 mais qu'à E19, les neurones à Hcrt expriment ce facteur de transcription. Ce dernier apparaît à partir de E12/E13 dans la « zone à MCH » présomptive, or les neurones à Hcrt naissent en un pic étroit à E12. En effet, ils sont exprimés dans le LHA au voisinage des neurones à MCH et nous pouvons ainsi penser que ces

neurones naissent dans un même territoire du neuroépithélium germinatif que les neurones à MCH.

En conclusion à cette partie, des informations commencent à émerger concernant les facteurs impliqués dans la différenciation des neurones à MCH. Certains d'entre eux pourraient jouer un rôle dans la spécification des sous-populations de ces neurones, comme *Lhx6* ou *Fox1b* mais beaucoup reste à faire dans ce domaine encore peu exploré.

IV. Développement des projections

1. Les premières projections suivent le *tractus postopticus*

Les projections MCH précoces issues des premiers neurones générés, suivent le trajet du *tpoc* vers les régions postérieures du SNC. Certaines suivent aussi le *tpoc* jusqu'à son origine dans les régions chiasmiques et croisent la ligne médiane avec les fibres commissurales postoptiques. L'immunohistochimie MCH n'avait jamais permis de détecter ces fibres commissurales. L'utilisation des souris MCH-GFP et la détection de la protéine GFP a pour la première fois permis d'obtenir une telle finesse de détection des fibres issues des neurones MCH chez l'embryon. En 1996, Mastick et Easter ont décrit l'organisation des tractus pionniers du cerveau embryonnaire. Le *tpoc* commence à apparaître à E9 chez la souris (selon nos critères de datation). Les axones marqués par un anticorps anti- β 3 tubuline (clone TuJ1) se dirigent vers les régions caudales et sont originaires de la base de la tige optique, des cellules du noyau antéobasal (Easter et al. 1993), appelée ici, suivant l'atlas de Alvarez-Bolado et Swanson, région rétrochiasmique (Alvarez-Bolado et Swanson 1996). A E10, ces axones s'étendent caudalement jusqu'à la flexure céphalique. Après dépôt d'un cristal de DiI dans l'hypothalamus postérieur, des fibres fluorescentes sont observées en direction de la

région rétrochiasmatic et d'autres, plus nombreuses, se dirigent vers la flexure céphalique. A ce stade, le *tpoc* est le seul tractus présent dans les régions hypothalamiques postérieures. Le tractus issu de cellules à la base de la tige optique possède des homologues chez *Xénopus* (Easter et Taylor 1989) sous le nom de tractus de la commissure postoptique et chez le poisson zèbre (Chitnis et Kuwada 1990). Tous ces tractus possèdent la même origine ainsi que le même trajet. Peu d'informations sont connues quant au phénotype chimique des axones composant le *tpoc*. En 2004, une étude a rapporté l'expression de PSA-NCAM dans les axones formant le *tpoc* (Chung et al. 2004). Une protéine de la famille de molécules d'adhésion cellulaire N-CAM, appelée NOC-1 est exprimée par les axones du *tpoc* dans sa région ventrale chez *Xénopus* (Anderson et Key 1996). Un marquage TH sur des coupes sagittales de cerveau de rat a montré l'expression de cette enzyme, précocement, le long du trajet du *tpoc* (thèse C. Amiot (Amiot 2006) et observations personnelles). Le fait que nous ne détectons pas les premiers axones GFP à E11 alors que les premières fibres du *tpoc* sont décrites à E9 indique que les axones MCH suivent ces projections mais ne sont pas elles-mêmes pionnières.

Chez l'animal adulte, ces projections descendantes correspondent à celles des neurones à MCH-non CART ; elles forment dans le cerveau du rat adulte, un tractus assez dense qui court initialement entre la *zona incerta* et le pédoncule cérébral puis longe la *pars compacta* de la substance noire (Cvetkovic et al. 2004).

2. Les projections tardives suivent le faisceau médian du télencéphale

Chez le rat aux stades E14 à E16 ou la souris sauvage aux stades E13 à E15, des axones détectés par des IS anti-MCH ou anti-NEI sont repérés mais en nombre souvent insuffisant pour en permettre l'illustration. L'analyse des coupes d'embryons de souris MCH-GFP de

E11 à E15 grâce à des anticorps anti-GFP, nous a permis de suivre en détails l'organisation des projections descendantes et ascendantes. Au stade E12, les axones MCH-GFP suivent le *tpoc* comme indiqué précédemment mais un nombre important, non détecté par nos IS anti-MCH ou NEI, est dirigé ventralement et emprunte la commissure post-optique. Visibles à E14, des axones quittent l'axe du *tpoc* et sont orientés rostralement à la tige optique. Un co-marquage avec l'IS anti-TH qui révèle les projections mésotélencéphaliques, montre que ces axones MCH-GFP suivent le *mf*. Ces projections ascendantes sont nombreuses à E15, alors qu'il semble que celles commissurales sont moins abondantes. A partir de ces observations, il est tentant d'émettre l'hypothèse que les projections ascendantes MCH se mettent en place suite à un changement d'orientation de projections empruntant ou dirigées initialement vers la commissure post-optique. Ce changement d'orientation pourrait s'expliquer par deux phénomènes concomitants. Les neurones se différencient suivant un gradient latéral à médian, ainsi les axones issus des cellules générées plus tardivement seraient physiquement plus éloignés du *tpoc* qui est très latéral dans le manteau, alors que ceux issus des premiers neurones générés sont adjacents à ce tractus. Par ailleurs, des facteurs attractifs pourraient être émis par le télencéphale, à l'origine du changement d'orientation des fibres MCH mais aussi impliqués dans le guidage des axones dopaminergiques du tractus mésotélencéphalique.

3. Le mésencéphale et télencéphale attirent les axones MCH à des stades différents

Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de co-cultures organotypiques ont été mises en œuvre. Les résultats obtenus montrent que des explants hypothalamiques de souriceaux âgés de quelques jours émettent des axones MCH qui croissent et envahissent des explants embryonnaires de mésencéphale prélevés dès E11. Une telle croissance dans les explants télencéphaliques ou ceux contrôles du tectum au même stade n'est pas observée. Des

projections MCH significativement plus abondantes que dans les explants contrôles sont observées dans les explants télencéphaliques pris à partir de E12 et ne sont pas en nombre significativement différent de celles observées dans les explants mésencéphaliques quand ils sont prélevés aux stades E13-14.

Ainsi, l'absence de différenciation de projections MCH dans les explants contrôles du tectum, indique que le développement des axones MCH dans les explants télencéphaliques n'est pas seulement lié à l'état de maturation de ces explants, c'est-à-dire seulement au fait qu'ils soient, aux stades tardifs, formés majoritairement de neurones différenciés plutôt que de cellules de l'épithélium germinatif. A stade de développement comparable, le télencéphale attire significativement plus les axones MCH que le tectum. Ces résultats suggèrent donc clairement que des facteurs émis par des cellules mésencéphaliques puis télencéphaliques mais pas tectales, attirent les axones MCH.

4. Expressions de Nétrine1 et Slit2

Il a été rappelé dans l'introduction que plusieurs familles de protéines sont impliquées dans le guidage axonal, notamment du *tpoc* et du *mfb*. Plus particulièrement, l'expression spatio-temporelle de cette protéine de guidage dans le cerveau semble apporter des réponses quant aux directions empruntées par les projections MCH. Ainsi, lorsque le *tpoc* se met en place, seule une expression postérieure à l'hypothalamus de Nétrine1 est observée. Chez des embryons E12,5 de souris, l'ARNm de Nétrine1 est présent dans les régions ventriculaires du télencéphale basal mais aussi dans quelques cellules du manteau. A E13,5, le signal est très intense dans les régions latérales et de plus en plus de cellules du manteau expriment Nétrine1. En revanche, le marquage présent dans le neuroépithélium s'affine (Metin et al. 1997). A notre connaissance, il n'existe pas de données dans la littérature décrivant aussi précisément cette expression spatio-temporelle de Nétrine1, bien que son expression et son

rôle dans les phénomènes de guidage dans le SNC aient été très largement documentés (voir Introduction III).

La protéine Nétrine1 a été signalée dans la littérature comme jouant un rôle dans des phénomènes d'attraction des fibres innervant le cortex cérébral. Les récepteurs à Nétrine1 impliqués dans des phénomènes d'attraction, DCC et Néogénine, sont par exemple exprimés dans les cellules du thalamus dorsal et des auteurs suggèrent un effet différent de Nétrine1 suivant un axe rostro-caudal dans le thalamus dorsal (Braisted et al. 2000). La partie rostro-médiane exprime fortement les récepteurs DCC par rapport à la partie caudo-latérale et inversement pour les récepteurs Unc5A-C, impliqués dans la répulsion des axones sous l'effet de Nétrine1. DCC est ainsi requis pour l'attraction des axones du thalamus rostro-dorsal par Nétrine1 qui est exprimée dans le télencéphale ventral et les récepteurs Unc5A-C et DCC pour la répulsion des axones caudo-latéraux du thalamus dorsal (Braisted et al. 2000).

Dans les rappels bibliographiques introductifs, nous avons signalé le rôle de protéines de la famille Slit dans le guidage des axones du *tpoc* et du *mfb* et notamment de Slit2. Nous n'avons pas observé de variations de cette expression qui est déjà détectée dans la ligne médiane des territoires mésencéphaliques, diencéphaliques et télencéphaliques dès le stade de genèse des premiers neurones à MCH. Ainsi, un effet répulsif de Slit2 dans nos expériences de co-cultures des explants télencéphaliques n'est peut-être pas à écarter mais n'a pas été investigué.

5. Rôles de Nétrine1 et Slit2 dans le guidage des axones des neurones à MCH

Par des techniques de marquages multiples, nous avons confirmé l'expression, dans le territoire de localisation des neurones à MCH, des récepteurs DCC et Robo2, responsables des

effets respectivement d'attraction et de répulsion des deux protéines Nétrine1 et Slit2. La co-expression de MCH et de ces récepteurs a été tentée. Nous avons obtenu des images qui nous ont permis d'observer leurs co-expressions mais il est vrai qu'elles étaient de médiocre qualité due aux difficultés liées au travail sur matériel embryonnaire.

Enfin, les expériences de co-cultures tridimensionnelles ont permis de montrer que les axones de l'hypothalamus postérieur et en particulier les axones à MCH répondent à l'effet attracteur de Nétrine1 par l'intermédiaire du récepteur DCC et à l'effet répulsif de Slit2 via le récepteur Robo2. Ces expériences étaient indispensables afin de démontrer que ces protéines peuvent intervenir dans le guidage des axones MCH. Les effets que nous avons constatés (attraction et répulsion d'un rapport de 1,37/1 et 0,51/1) sont tout à fait dans les normes des résultats généralement obtenus dans la littérature (Guijarro et al. 2006).

Peu de données sont disponibles concernant la mise en place des projections des neurones hypothalamiques. Les neurones magnocellulaires du PVN et SON projettent sur la neurohypophyse. Leurs projections ne sortent pas de l'hypothalamus et prennent une direction ventrale. Ces axones sont localement dirigés par la protéine Nétrine1, exprimée par les cellules de la ligne médiane ventrale mais les neurones magnocellulaires n'expriment pas les récepteurs Robo et ne sont ainsi pas sujets à l'effet répulsif des protéines Slit (Xu et Fan 2008). Ces projections n'ont ainsi pas la capacité de 'sortir' de l'hypothalamus et sont contraintes à rejoindre la neurohypophyse.

La capacité de répondre à Slit2 semble essentielle aux projections des neurones hypothalamiques pour quitter le diencephale ventral. L'expression normale de Slit2 dans le diencephale ventral empêche les axones des neurones dopaminergiques de la SN/VTA d'envahir l'hypothalamus (Marin et al. 2002). Slit2 pourrait ainsi permettre la sortie des axones MCH de l'hypothalamus. En effet, selon nos résultats, ces axones sont capables, *in*

vitro, d'être repoussés par Slit2. Ils sont ensuite influencés par Nétrine1 pour atteindre et innervier les régions télencéphaliques comme le septum médian ou le cortex cérébral. La mise en place des axones dopaminergiques mésotélencéphaliques dépend aussi de l'expression d'autres protéines de guidage axonal appartenant à diverses familles, telles que les sémaphorines ou encore de protéines morphogènes comme Shh (Yue et al. 1999; Sieber et al. 2004; Hernandez-Montiel et al. 2008; Cooper et al. 2009; Deschamps et al. 2009; Yamauchi et al. 2009; Torre et al. 2010) (voir Introduction III). Il est aussi probable que les axones à MCH soient, comme ceux des neurones dopaminergiques, influencés par d'autres familles de protéines de guidage axonal.

V. Schéma de la différenciation des neurones à MCH

Grâce aux résultats obtenus ces dernières années, il est possible d'établir une chronologie des événements qui conduisent à la différenciation des neurones à MCH et en particulier aux deux sous-populations MCH caractérisées chez les rongeurs. Tous les neurones à MCH de l'hypothalamus postérieur se différencient dans un territoire restreint du diencephale. Cependant les deux sous-populations s'établissent successivement dans un environnement très différent (**Figure 55**). Nous avons vu que l'estimation de la date de naissance des neurones par l'injection du BrdU était à prendre avec précaution car la cytodièrese, caractérisant la naissance effective du neuroblaste qui va donner le neurone à MCH, s'effectue plusieurs heures après l'injection de BrdU. De plus, les premiers neuroblastes hors de la couche germinative ont été observés 24h après injection du BrdU chez le rat. Ainsi, si chez cette espèce la naissance des premiers neurones à projections spinales est signalée à E11, les neuroblastes correspondant se différencient dans le manteau à partir de E12. En suivant le même raisonnement, ceux à projections corticales se différencient donc dans le manteau à

partir de E13,5.

Nos résultats sur le modèle de souris MCH-GFP confortent l'hypothèse d'une migration radiale de ces neurones depuis la zone germinative. Certains auteurs suggèrent une origine thalamique ventrale pour certains d'entre eux notamment Fox1b. Ceux-ci migreraient tangentiellement pour atteindre leur territoire d'expression. Nous n'avons pas étudié l'expression de ce gène dans notre travail, cependant nous avons montré que l'expression de MCH est Shh-dépendante, confirmant d'autres données du même groupe. Par ailleurs, l'étude de C. Amiot, également confirmée et complétée par nos propres observations, ont montré que les neurones à MCH se différencient dans un territoire caractérisé par l'expression de Nkx2.1, Nkx2.2, Dlx1/2 et plusieurs gènes de la famille des LIM. Le rôle de ces facteurs de transcription dans la différenciation du phénotype MCH n'est pas connu. Cependant, par double marquage, nous avons observé Nkx2.1 dans le noyau de tous les neurones détectés pour MCH aux stades E14/15. Nkx2.1 n'étant pas exprimé dans le thalamus ventral, soit les neurones issus de cette région expriment ce gène une fois installés dans le LHA présomptif ou bien ces neurones subissent une migration apparente, comme indiqué plus haut.

Les neurones migrant radialement naissent dans une région du neuroépithélium germinatif co-exprimant Nkx2.1 et Nkx2.2. Le domaine d'expression dans la zone germinative de ces deux gènes s'étend au cours du développement. Néanmoins sa largeur reste coïncidente à celle de la zone où se différencient les neurones à MCH. Comme déjà noté par C. Amiot, l'expression de ces facteurs ne nous permet pas de détecter de différences liées à la genèse de sous-populations, ni même de populations neuronales différentes à partir de cette même région du neuroépithélium germinatif (par exemple concernant les neurones à Hcrt).

Chez le rat, les neurones MCH à projections spinales naissent précocement, n'expriment pas CART et sont minoritaires par rapport aux neurones à MCH exprimant CART, projetant dans le télencéphale et générés plus tardivement. Chez la souris, les seconds ont été retrouvés mais ils ne sont pas majoritaires et de nombreux neurones à MCH-non CART à projections corticales sont observés.

Ainsi, la 'latéralisation' décrite précédemment du système à MCH chez la souris, semble être une conséquence d'une neurogenèse MCH hypothalamique plus précoce chez cette espèce. Même si les sous-populations semblent moins clairement distinctes, l'organisation de base semble être similaire et les mécanismes gouvernant l'établissement des projections ascendantes et descendantes ont été étudiés chez cette espèce.

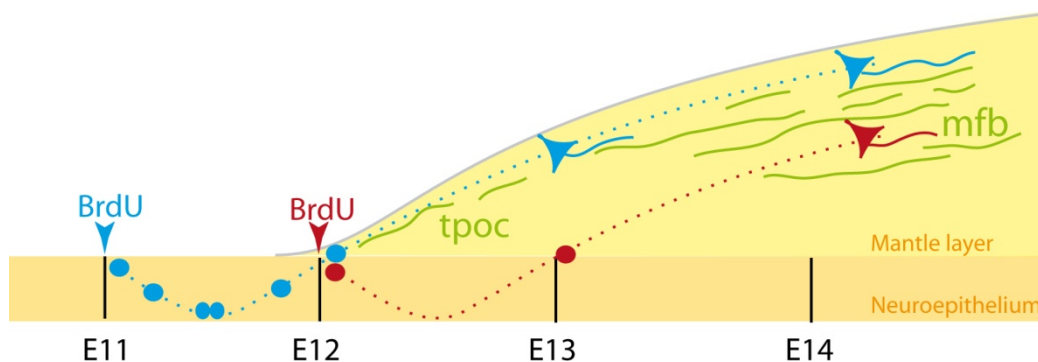


Figure 55 Schéma illustrant la différenciation du système MCH précocement au cours du développement embryonnaire

Les progéniteurs incorporent le BrdU à E11 au cours de la phase S du cycle cellulaire mais c'est seulement 24 heures plus tard que les premiers neuroblastes sont observés dans le manteau. Les premiers neurones à MCH sont observés à E13 et les premiers axones courent le long du *tractus postopticus* (*tpoc*). Les neurones à MCH nés de progéniteurs ayant incorporé le BrdU à E12,5 sont observés dans le manteau à E14-E15, se différencient le long du faisceau médian du télencéphale (*mf*) et projettent avec les fibres dopaminergiques de ce tractus.

Les premiers neurones à MCH se mettent en place au tout début de l'épaississement de la couche du manteau. Ces neurones sont CART-négatifs chez l'animal adulte, projettent massivement sur les régions postérieures du SNC le long du *tpoc* et l'établissement de ces projections est corrélé à une expression de Nétrine1 dans le mésencéphale ventral (**Figure 56**). Des axones au même stade empruntent la commissure post-optique (poc). Au cours des stades suivant, des axones MCH en direction du poc paraissent se réorienter pour se diriger vers les régions du télencéphale basal. Cette réorientation est concomitante au développement des structures télencéphaliques, de certaines de leurs afférences notamment issues du mésencéphale ventral et de l'expression télencéphalique de Nétrine1. Nous avons montré que les axones MCH répondent à l'effet d'attraction de cette protéine. D'autre part, des données de la littérature indiquent que la protéine Slit2 joue aussi un rôle important dans le guidage des axones du *tpoc* ou mésotélencéphaliques. Cette protéine influence la direction de croissance des axones MCH et peut ainsi être impliquée afin de pousser ces axones à quitter l'hypothalamus initialement en suivant le *tpoc*, tractus pionnier et plus tardivement, le mfb.

| Stade embryonnaire | Télencéphale basal | Hypothalamus | Mésencéphale |
|--------------------|--------------------|--------------|--------------|
| E9 | | | |
| E10 | | | |
| E11 | | | |
| E12 | | | |
| E13 | | | |
| E14 | | | |

Figure 56 Schéma récapitulatif de la distribution spatio-temporelle de Nétrine1 dans le cerveau embryonnaire de souris.

Nétrine1 est exprimé précocement (E9) dans le mésencéphale ventral puis son expression diminue à partir de E13. A E13, Nétrine1 est fortement exprimé dans le télencéphale basal alors qu'aucune expression n'est présente à E9 et E10. L'expression de Nétrine1 dans l'hypothalamus n'est pas précoce.

Différenciation des phénotypes CART et NK3

Les neurones à MCH de la seconde sous-population projetant sur les régions télencéphaliques expriment CART et NK3. Ces phénotypes chimiques apparaissent tardivement au cours du développement d'embryons de rat, à E18 pour CART et NK3 entre P0 et P5 (Brischoux et al. 2001). Chez le rat, le marquage MCH n'est observé dans des axones des régions télencéphaliques qu'à partir de E18 (Brischoux et al. 2001). C'est seulement quelques jours après la naissance qu'un grand nombre d'axones immunoréactifs pour MCH est présent dans ces régions. Nous n'avons entamé aucune investigation dans ce travail concernant ce point particulier. L'une des hypothèses concernant la différenciation du phénotype chimique des neurones de la seconde sous-population pourrait être en rapport direct avec les cibles d'innervation de ces neurones. En effet, il peut exister une corrélation entre le phénotype chimique d'un neurone et la cible qu'il innerve (ex dans la périphérie, Horgan et van der Kooy 1992; Anderson et al. 2002a). Cependant chez la souris de nombreux neurones à MCH non-CART projettent sur le cortex cérébral, indiquant que la différenciation du phénotype CART répond à d'autres signaux. La différenciation du phénotype chimique d'un neurone peut être également la conséquence d'une activité électrique spontanée à travers la régulation de l'expression de facteurs de transcription. C'est le cas des neurones sérotoninergiques du noyau du raphé et de Lmx1b (Demarque et Spitzer 2010). La perturbation de l'activité de ces neurones conduit à une variation du nombre de cellules immunoréactives pour Lmx1b et pour la tryptophane hydroxylase (enzyme permettant la synthèse de 5-HT) mais pas de celui de ces cellules Nkx2.2-positives. L'augmentation des potentiels d'action entraîne une diminution du nombre de ces cellules et inversement. Cette variation n'est pas due à une modification de la prolifération cellulaire mais à une altération de la différenciation de Lmx1b. En effet, son absence d'expression entraîne une réduction du nombre de neurones exprimant la tryptophane

hydroxylase.

Les neurones à MCH de type B expriment Lhx6 chez la souris (Shimogori et al. 2010). Leur phénotype chimique est peut être du à l'expression de ce facteur de transcription. Ainsi chez cette espèce Lhx6 semble corrélér au phénotype CART mais pas à la direction des projections. Le fait que ces neurones expriment très précocement Lhx6 et qu'ils différencient leur phénotype chimique plus tard n'est pas incompatible avec cette corrélation. En effet, les neurones à Hcrt naissent à E12 chez le rat et ne différencient leur phénotype chimique qu'à E18 (Amiot et al. 2005), alors qu'ils expriment probablement Lhx9 depuis E13, date d'apparition de ce facteur de transcription dans cette région.

VI. Signification de ces données pour le développement du prosencéphale

Le territoire embryonnaire dans lequel les neurones à MCH se développent, se singularise dans le diencephale ventral par une neurogenèse très précoce et un patron d'expression de facteurs de transcription particulier (**Figure 57**). Ainsi, alors que d'autres régions de l'hypothalamus présomptif sont identifiées par les structures adultes correspondantes, ce territoire chez l'embryon a été plusieurs fois reconnu comme faisant partie d'une structure propre à l'embryon : c'est la 'cell cord' de Keyser (1972; 1979) ou l'ID de Shimogori et al. (2010). Par ailleurs, malgré la disposition particulière que lui confère Diez-Roux et al. (2011), cette région a été le plus souvent perçue comme un prolongement prosencéphalique d'une région ventrale du tube nerveux, définie tout le long de son axe par l'expression précoce de Nkx2.2 et de la protéine morphogène Shh. Le patron d'expression de ces protéines suggère que des mécanismes développementaux sont communs à toutes les structures se développant de cette bande de tissu, même si parallèlement des signaux spécifiques de sa position antéro-

postérieure sont aussi exprimés. Cette hypothèse a été développée par certains auteurs qui avaient notamment mis en avant la très grande conservation de ce patron d'expression retrouvé pour des gènes orthologues chez tous les animaux passant par une étape embryonnaire de symétrie bilatérale. La théorie de l'évolution du développement, plus connue sous le nom de théorie 'évo-dévo' qui a émergé de ces études, permet de comprendre la complexité morphologique d'un organisme en étudiant le développement et l'expression de gènes s'y rapportant. Cette théorie est basée sur l'embryologie, la génétique et l'évolution. L'an 2000 est considéré comme l'année de naissance de cette discipline mais l'année 1977 comme celle de sa conception (Gilbert 2003). L'évo-dévo permet de comparer la conséquence de la mosaïque d'expression de gènes impliqués dans le développement embryonnaire tel que par exemple Pax6 qui est impliqué dans la mise en place des yeux d'arthropodes, des mollusques et des vertébrés. Il permet de comparer des régions structurellement différentes mais impliquées dans les mêmes fonctions. Le développement d'organismes phylogénétiquement très éloignés utilise des gènes orthologues.

Dans une revue d'Arendt et Nübler-Jung (1999), il est mentionné que la distribution médio-latérale des cellules de type neuronal des vertébrés reflète et dépend de l'expression de gènes impliqués dans la régionalisation le long de bandes longitudinales. L'expression spécifique de facteurs de transcription le long de ces bandes dans le tube nerveux permet la description de trois colonnes neurogéniques longitudinales chez la drosophile et les vertébrés : les colonnes médiane, intermédiaire et latérale. Chez les vertébrés, la plaque neurale se referme pour former le tube nerveux. La colonne médiane, caractérisée par l'expression de Nkx2.2, se trouve dans la plaque basale. Les deux autres colonnes sont plus dorsales et expriment d'autres gènes. Chez toutes les espèces, cette colonne médiane est aussi caractérisée par une neurogenèse précoce donnant naissance à des neurones primordiaux qui envoient des axones pour établir un échafaudage de fibres pionnières indispensables à l'établissement des tractus

de fibres de l'adulte. Initialement, ces échafaudages sont similaires entre les insectes et les vertébrés (Arendt et Nubler-Jung 1996). La distribution des neurones le long de l'axe antéro-postérieur est contrôlée par l'activité de gènes de régionalisation. Chez les vertébrés, les motoneurones dérivent des régions médianes de la plaque neurale et les neurones sensoriels des régions latérales (Hartenstein 1993). Les interneurones proviennent, quant à eux, de tous les niveaux médio-latéraux du tube nerveux. Chez les embryons de vertébrés, les cellules Nkx2.2 positives de la colonne médiane fournissent des interneurones ou des motoneurones qui ont un patron de projection similaire à celui des insectes. Chez la souris mais aussi chez la grenouille et le poisson, les cellules de la bande longitudinale Nkx2.2 sont corrélées avec le trajet longitudinal du faisceau médian longitudinal (mlf) qui est précoce. Chez les insectes et les vertébrés, parmi les neurones émergeant de la colonne médiane Nkx2.2 positive, les neurones sérotoninergiques envoient des projections ascendantes et descendantes qui atteignent le télencéphale ou la moelle épinière dans les modèles vertébrés, mais modulent l'activité locomotrice volontaire/spontanée chez toutes les espèces (Arendt et Nubler-Jung 1999; Pattyn et al. 2003). Chez l'annelide, *Platynereis dumerilii*, le même type de neurones sérotoninergiques (marqués par l'enzyme tryptophane hydroxylase) émergent de cette colonne médiane Nk2.2+ et leurs axones suivent les tractus pionniers (Denes et al. 2007).

Nous avons vu dans l'introduction que les neurones à MCH sont retrouvés dans l'hypothalamus postérieur de tous les vertébrés. Cette donnée concernant la très grande conservation de cette localisation hypothalamique de MCH associée à nos résultats, suggère l'hypothèse que les neurones à MCH sont issus de la colonne neurogénique médiane dans le prosencéphale lui-même caractérisé par le gène de régionalisation Nkx2.1 (**Figure 57**). Les premiers axones MCH suivent le tractus de la commissure postoptique ou *tpoc*, premier tractus prosencéphalique longitudinal (Mastick et Easter 1996). Il est initialement issu des neurones à la base de la tige optique et court caudalement en direction de la flexure

céphalique parallèlement aux bandes longitudinales d'expression de Nkx2.2 et Shh. Ce tractus rejoint le mlf dans le mésencéphale (Shimamura et al. 1995; Vokes et al. 2007). Les mécanismes guidant la croissance des axones longitudinaux peuvent être régulés par l'arrangement des domaines neuroépithéliaux caractérisés par exemple, par l'expression de Nkx2.2. Les régions antérieures du SNC peuvent être perçues comme une extension rostrale des régions plus postérieures. Il est à noter ici, le parallèle qui peut être fait avec la perception du LHA par le passé comme étant un prolongement des structures réticulées plus postérieures, d'une part, et les similarités des systèmes sérotoninergiques et MCH adultes dans la distribution ubiquitaire de leur projection et leur intervention dans de nombreux processus centraux, d'autre part.

Figure 57 Schéma illustrant que le développement des neurones à MCH met en évidence un changement dans l'organisation précoce du prosencéphale de rongeur

(a) La colonne neurogénique médiane (mnc) est caractérisée par l'expression de Nkx2.2 et s'étend des régions antérieures à postérieures de la plaque neurale. Des populations de neurones sont générées à partir de cette colonne, il s'agit des neurones sérotoninergiques (ronds roses) du rhombencéphale présomptif et des neurones à MCH (ronds bleus) du prosencéphale présomptif.

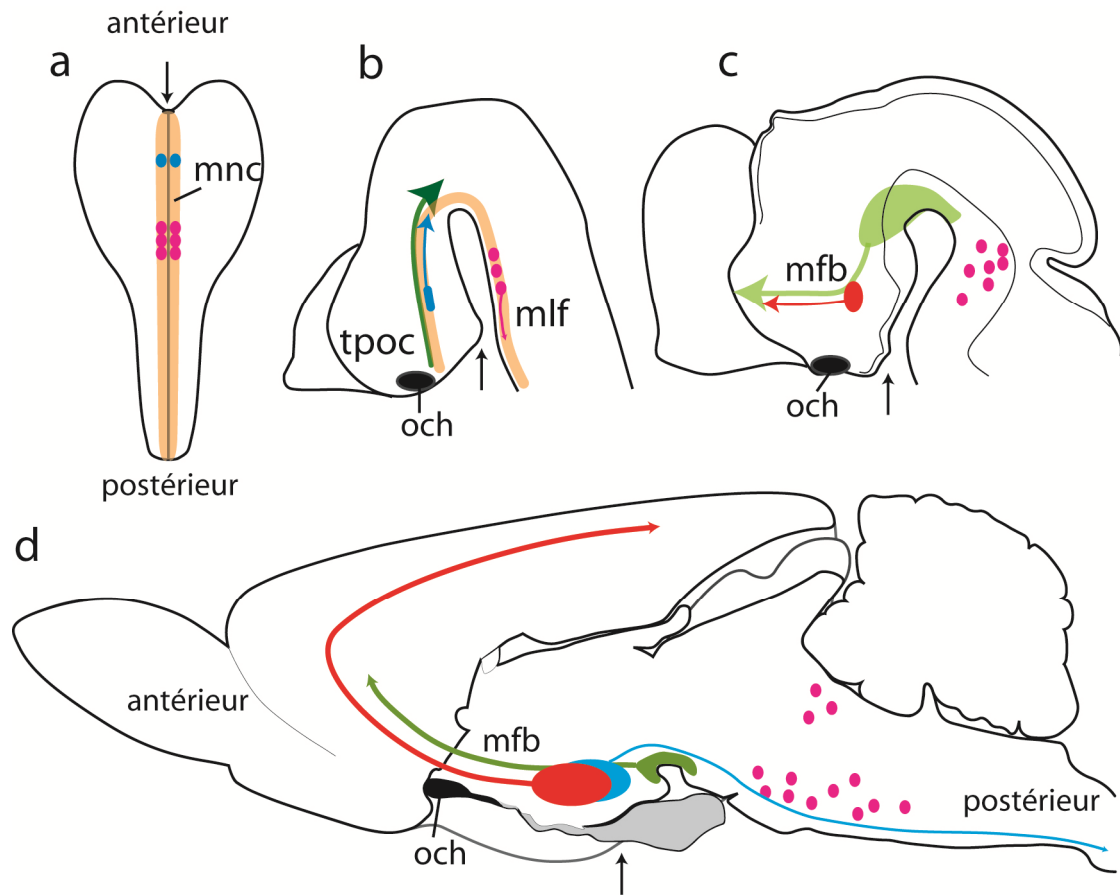
(b) Après la fermeture du tube nerveux, les neuroblastes MCH sont générés et envoient des axones (bleus) le long du *tractus postopticus* (*tpoc*) qui court le long de la bande d'expression longitudinale Nkx2.2. Les neurones sérotoninergiques sont également générés le long de cette même bande d'expression et envoient des axones le long du faisceau longitudinal médian (mlf).

(c) Plus tard, la neurogenèse dans le télencéphale commence et les neurones à MCH envoient des axones (rouges) dans cette structure. Au même stade, les neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral projettent sur les mêmes structures avec les neurones à MCH formant le faisceau médian du télencéphale ou mfb.

(d) Chez l'animal adulte, le mfb est le faisceau longitudinal majeur du diencéphale, connectant le tronc cérébral au télencéphale et définissant l'axe antéropostérieur du cerveau adulte.

La flèche noire signale l'hypophyse présomptive (a, b) et la position finale de cette structure (c, d) qui est localisée antérieurement précocement mais à la surface ventral du cerveau adulte.

och : chiasma optique



Plus tardivement au cours du développement, l'axe d'organisation des projections MCH change. Concomitamment au développement des aires antérieures (télencéphale) et donc à l'apparition de facteurs impliqués dans le développement et dans la croissance axonale, les projections issues des neurones du diencéphale envahissent ces régions, que ce soit depuis le thalamus ou l'hypothalamus postérieur (**Figure 57**). Les neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral naissent et émettent également leurs projections vers le télencéphale aux mêmes stades. Il est intéressant de constater que ces neurones se différencient à partir du segment mésencéphalique du domaine d'expression *Nkx2.2* et sous l'influence de *Shh*. Ainsi, la différenciation de la sous-population MCH à projections télencéphaliques semble directement corrélée au développement des structures télencéphaliques.

Les neurones à MCH sont observés dans l'hypothalamus postérieur chez tous les vertébrés. Cet arrangement découle de la conservation des patrons initiaux d'expression des facteurs de transcription gouvernant la genèse de ces régions (Moreno et Gonzalez 2011). Cependant, chez les poissons, des neurones MCH en position latéroventral dans l'hypothalamus tubéral projettent sur la neurohypophyse faisant d'eux des neurones neuroendocriniens régulant l'éclaircissement des téguments. A partir des tétrapodes, les animaux développent certains comportements moteurs inhérents à une vie terrestre. Ceci implique des bouleversements structurels du SNC comme le développement du mfb, faisceau ascendant majeur reliant le tronc cérébral au cortex cérébral, et du mésencéphale ventral qui projette par le mfb. Des lamproies aux poissons et aux amphibiens, les neurones à MCH sont exprimés dans une région adjacente au tuberculum postérieur, siège de l'expression des neurones dopaminergiques. Cependant, chez les tétrapodes, le développement des structures impliquées dans les comportements moteurs comme la SN/VTA ou les corps mammillaires, gérant

l'orientation de la tête (Vann et Aggleton 2004), accompagne la différenciation médiolatérale des neurones à MCH (Figure 58).

Il devient alors tentant d'imaginer que les neurones à MCH suivent une évolution convergente dans la différenciation latéromédiane de leur distribution dans l'hypothalamus tubéral, mais qu'ils suivent des schémas évolutifs divergents chez les poissons et les tétrapodes, reflétant l'état d'organisation du prosencéphale et notamment la différenciation du télencéphale chez les tétrapodes.

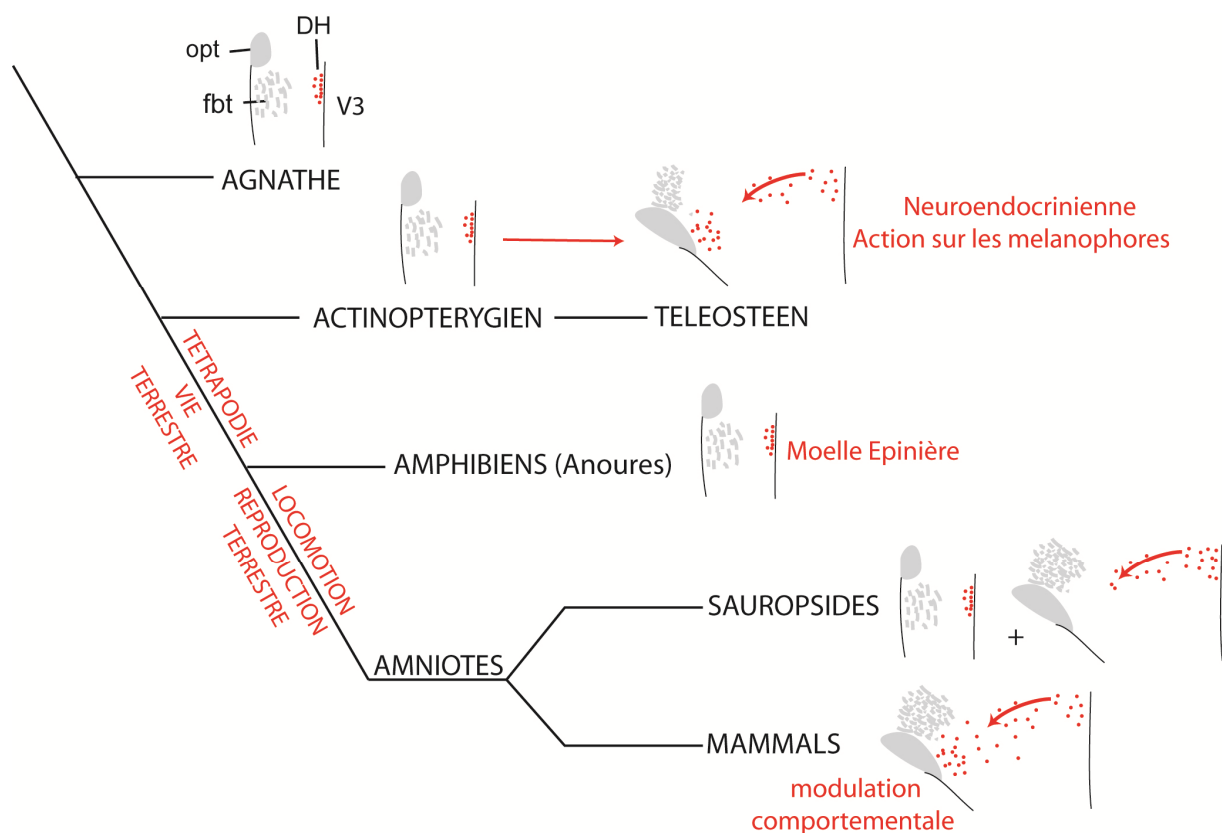


Figure 58 Schéma proposant un modèle d'évolution du système MCH des vertébrés depuis les agnathes jusqu'aux mammifères

Les neurones à MCH sont observés dans les régions périventriculaires de l'hypothalamus postérieur chez les lamproies, les poissons, les amphibiens et chez certains amniotes. Le développement de certains comportements moteurs bouleverse les structures cérébrales. Chez les tortues et les mammifères, les neurones à MCH envahissent les aires latérales de l'hypothalamus. DH : hypothalamus dorsal ; fbt : fasciculus basalis telencephali ; opt : tractus optique ; V3 : troisième ventricule.

VII.Perspectives

Plusieurs grands points concernant le développement du système à MCH restent à éclaircir, notamment la cascade génique impliquée dans l'apparition du phénotype MCH. Des études impliquent peut être les facteurs de transcription Fox1b et Lhx6 mais certainement la protéine morphogène Shh. Des investigations doivent être menées quant à l'implication de Nkx2.1 ou Nkx2.2 dans la différenciation du phénotype MCH, ces deux protéines étant exprimées par les neurones à MCH.

D'autres études doivent être développées afin d'expliquer l'apparition du phénotype CART dans les neurones de la sous-population de type B, projetant spécifiquement sur les régions antérieures du SNC. L'expression de CART pourrait être due à l'innervation spécifique des neurones sur des structures télencéphaliques.

Un autre point concerne l'étude du système à MCH chez d'autres espèces de vertébrés, comme le poisson où les neurones à MCH sont neuroendocriniens. Il serait intéressant de comprendre les mécanismes impliqués dans la détermination des projections neuroendocriniennes de ces neurones chez cette espèce alors qu'ils ne le sont pas chez les mammifères. Des études ont signalé l'absence d'expression des récepteurs Robo sur les axones des neurones magnocellulaires, projetant sur la neurohypophyse. Peut-être les neurones à MCH de poissons n'expriment-ils pas ce récepteur et ne sont pas contraints à quitter les territoires hypothalamiques ? L'étude de l'expression de ces récepteurs doit être menée plus avant, afin de comprendre les mécanismes en jeu dans l'établissement de ces projections neuroendocriniennes.

Enfin, il serait intéressant d'étudier le rôle des peptides MCH, NEI ou NGE eux-mêmes sur la croissance neuritique. Des études préliminaires obtenues au laboratoire signalent que le

récepteur MCH-R1 est exprimé précocement dans le thalamus, le striatum et le cortex cérébral (communication du Dr Said El Messari).

BIBLIOGRAPHIE

ABBOTT CR, KENNEDY AR, WREN AM, ROSSI M, MURPHY KG, SEAL LJ, TODD JF, GHATEI MA, SMALL CJ, BLOOM SR

Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin concentrating hormone.

Endocrinology 2003; 144: 3943-9.

ABELLAN A, MENUET A, DEHAY C, MEDINA L, RETAUX S

Differential expression of LIM-homeodomain factors in Cajal-Retzius cells of primates, rodents, and birds.

Cereb Cortex 2010a; 20: 1788-98.

ABELLAN A, VERNIER B, RETAUX S, MEDINA L

Similarities and differences in the forebrain expression of Lhx1 and Lhx5 between chicken and mouse: Insights for understanding telencephalic development and evolution.

J Comp Neurol 2010b; 518: 3512-28.

AIZAKI Y, MARUYAMA K, NAKANO-TETSUKA M, SAITO Y

Distinct roles of the DRY motif in rat melanin-concentrating hormone receptor 1 in signaling control.

Peptides 2009; 30: 974-81.

ALBERTO CO, TRASK RB, QUINLAN ME, HIRASAWA M

Bidirectional dopaminergic modulation of excitatory synaptic transmission in orexin neurons.

J Neurosci 2006; 26: 10043-50.

ALTMAN J, BAYER SA

Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus.

J Comp Neurol 1978a; 182: 945-71.

ALTMAN J, BAYER SA

Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons.

J Comp Neurol 1978b; 182: 973-93.

ALTMAN J, BAYER SA

The development of the rat hypothalamus.

Adv Anat Embryol Cell Biol 1986; 100: 1-178.

ALVAREZ-BOLADO G, ROSENFELD MG, SWANSON LW

Model of forebrain regionalization based on spatiotemporal patterns of POU-III homeobox gene expression, birthdates, and morphological features.

J Comp Neurol 1995; 355: 237-95.

ALVAREZ-BOLADO G, SWANSON L Developmental brain maps: structure of the embryonic rat brain. 1996.

AMANO M, TAKAHASHI A, OKA Y, YAMANOME T, KAWAUCHI H, YAMAMORI K

Immunocytochemical localization and ontogenic development of melanin-concentrating hormone in the brain of a pleuronectiform fish, the barfin flounder.

Cell Tissue Res 2003; 311: 71-7.

AMIOT C

Contribution à l'étude de la structuration du diencephale ventral de rat au cours du développement.
Thèse : Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Franche-Comté 2006: 197.

AMIOT C, BRISCHOUX F, COLARD C, LA ROCHE A, FELLMANN D, RISOLD PY

Hypocretin/orexin-containing neurons are produced in one sharp peak in the developing ventral diencephalon.

Eur J Neurosci 2005; 22: 531-4.

ANDERSON CR, PENKETHMAN SL, BERGNER AJ, MCALLEN RM, MURPHY SM

Control of postganglionic neurone phenotype by the rat pineal gland.

Neuroscience 2002a; 109: 329-37.

ANDERSON RB, KEY B

Expression of a novel N-CAM glycoform (NOC-1) on axon tracts in embryonic *Xenopus* brain.

Dev Dyn 1996; 207: 263-9.

ANDERSON RM, LAWRENCE AR, STOTTMANN RW, BACHILLER D, KLINGENSMITH J

Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse.

Development 2002b; 129: 4975-87.

ANDREWS GL, MASTICK GS

R-cadherin is a Pax6-regulated, growth-promoting cue for pioneer axons.

J Neurosci 2003; 23: 9873-80.

ANDREWS W, LIAPI A, PLACHEZ C, CAMURRI L, ZHANG J, MORI S, MURAKAMI F, PARNAVELAS JG, SUNDARESAN V, RICHARDS LJ

Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain.

Development 2006; 133: 2243-52.

ARENDE D, NUBLER-JUNG K

Common ground plans in early brain development in mice and flies.

Bioessays 1996; 18: 255-9.

ARENDE D, NUBLER-JUNG K

Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates.

Development 1999; 126: 2309-25.

ARNOLD-ALDEA SA, CEPKO CL

Dispersion patterns of clonally related cells during development of the hypothalamus.

Dev Biol 1996; 173: 148-61.

ASBREUK CH, VAN SCHAICK HS, COX JJ, KROMKAMP M, SMIDT MP, BURBACH JP

The homeobox genes *Lhx7* and *Gbx1* are expressed in the basal forebrain cholinergic system.

Neuroscience 2002; 109: 287-98.

BACHILLER D, KLINGENSMITH J, KEMP C, BELO JA, ANDERSON RM, MAY SR, MCMAHON JA, MCMAHON AP, HARLAND RM, ROSSANT J, DE ROBERTIS EM

The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development.

Nature 2000; 403: 658-61.

BAKER BI, BIRD DJ

Neuronal organization of the melanin-concentrating hormone system in primitive actinopterygians: evolutionary changes leading to teleosts.

J Comp Neurol 2002; 442: 99-114.

BAKER BI, EBERLE AN, BAUMANN JB, SIEGRIST W, GIRARD J

Effect of melanin concentrating hormone on pigment and adrenal cells in vitro.
Peptides 1985; 6: 1125-30.

BAKER BI, RANCE TA

Further observations on the distribution and properties of teleost melanin concentrating hormone.
Gen Comp Endocrinol 1983; 50: 423-31.

BARALLOBRE MJ, PASCUAL M, DEL RIO JA, SORIANO E

The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling.
Brain Res Brain Res Rev 2005; 49: 22-47.

BARRESI MJF, HUTSON LD, CHIEN C-B, KARLSTROM RO

Hedgehog regulated slit expression determines commissure and glial cell position in the zebrafish forebrain.
Development 2005; 132: 3643-3656.

BAYER L, RISOLD PY, GRIFFOND B, FELLMANN D

Rat diencephalic neurons producing melanin-concentrating hormone are influenced by ascending cholinergic projections.
Neuroscience 1999; 91: 1087-101.

BERGQUIST H, KALLEN B

Studies on the topography of the migration areas in the vertebrate brain.
Acta Anat (Basel) 1953; 17: 353-369.

BERGQUIST H, KALLEN B

Notes on the early histogenesis and morphogenesis of the central nervous system in vertebrates.
J Comp Neurol 1954; 100: 627-59.

BITTENCOURT JC, FRIGO L, RISSMAN RA, CASATTI CA, NAHON JL, BAUER JA

The distribution of melanin-concentrating hormone in the monkey brain (*Cebus apella*).
Brain Res 1998; 804: 140-3.

BITTENCOURT JC, PRESSE F, ARIAS C, PETO C, VAUGHAN J, NAHON JL, VALE W, SAWCHENKO PE

The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization.
J Comp Neurol 1992; 319: 218-45.

BOURIKAS D, PEKARIK V, BAERISWYL T, GRUNDITZ A, SADHU R, NARDO M, STOECKLI ET

Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord.
Nat Neurosci 2005; 8: 297-304.

BRAISTED JE, CATALANO SM, STIMAC R, KENNEDY TE, TESSIER-LAVIGNE M, SHATZ CJ, O'LEARY DD

Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection.
J Neurosci 2000; 20: 5792-801.

BRESSON JL, CLAVEQUIN MC, FELLMANN D, BUGNON C

Human hypothalamic neuronal system revealed with a salmon melanin-concentrating hormone (MCH) antiserum.
Neurosci Lett 1989; 102: 39-43.

BRETON C, PRESSE F, HERVIEU G, NAHON JL

Structure and regulation of the mouse melanin-concentrating hormone mRNA and gene.
Mol Cell Neurosci 1993a; 4: 271-84.

BRETON C, SCHORPP M, NAHON JL

Isolation and characterization of the human melanin-concentrating hormone gene and a variant gene.
Brain Res Mol Brain Res 1993b; 18: 297-310.

BRISCHOUX F, CVETKOVIC V, GRIFFOND B, FELLMANN D, RISOLD PY

Time of genesis determines projection and neurokinin-3 expression patterns of diencephalic neurons containing melanin-concentrating hormone.
Eur J Neurosci 2002; 16: 1672-80.

BRISCHOUX F, FELLMANN D, RISOLD PY

Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic 'MCH area' hypothesis.
Eur J Neurosci 2001; 13: 1733-44.

BRISCOE J, SUSSEL L, SERUP P, HARTIGAN-O'CONNOR D, JESSELL TM, RUBENSTEIN JL, ERICSON J

Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling.
Nature 1999; 398: 622-7.

BROSE K, TESSIER-LAVIGNE M

Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration.
Curr Opin Neurobiol 2000; 10: 95-102.

BUGNON C, BAHJAOU M, FELLMANN D

A simple method for coupling in situ hybridization and immunocytochemistry: application to the study of peptidergic neurons.
J Histochem Cytochem 1991; 39: 859-62.

CANTERAS NS, SIMERLY RB, SWANSON LW

Projections of the ventral premammillary nucleus.
J Comp Neurol 1992; 324: 195-212.

CARDOT J, FELLMANN D, BUGNON C

Melanin-concentrating hormone-producing neurons in reptiles.
Gen Comp Endocrinol 1994; 94: 23-32.

CHARRIERE K, RISOLD PY, FELLMANN D

In vitro interactions between bone marrow stromal cells and hippocampal slice cultures.
C R Biol 2010; 333: 582-90.

CHARRON, STEIN E., JEONG J., MCMAHON A.P., TESSIER-LAVIGNE M.

The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance.
Cell 2003; 113: 11-23.

CHEN Y, HU C, HSU CK, ZHANG Q, BI C, ASNICAR M, HSIUNG HM, FOX N, SLIEKER LJ, YANG DD, HEIMAN ML, SHI Y

Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity.
Endocrinology 2002; 143: 2469-77.

CHIANG C, LITINGTUNG Y, LEE E, YOUNG KE, CORDEN JL, WESTPHAL H, BEACHY PA

Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function.
Nature 1996; 383: 407-13.

CHITNIS AB, KUWADA JY

Axonogenesis in the brain of zebrafish embryos.
J Neurosci 1990; 10: 1892-905.

CHUNG KY, LEUNG KM, LIN CC, TAM KC, HAO YL, TAYLOR JS, CHAN SO

Regionally specific expression of L1 and sialylated NCAM in the retinofugal pathway of mouse embryos.
J Comp Neurol 2004; 471: 482-98.

CHUNG S, HOPF FW, NAGASAKI H, LI CY, BELLUZZI JD, BONCI A, CIVELLI O

The melanin-concentrating hormone system modulates cocaine reward.
Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 6772-7.

CONDUCTIER G, NAHON JL, GUYON A

Dopamine depresses melanin concentrating hormone neuronal activity through multiple effects on alpha2-noradrenergic, D1 and D2-like dopaminergic receptors.
Neuroscience 2011; 178: 89-100.

COOK LB, DELORME-AXFORD EB, ROBINSON K

Caveolae as potential mediators of MCH-signaling pathways.
Biochem Biophys Res Commun 2008; 375: 592-5.

COOPER MA, KOBAYASHI K, ZHOU R

Ephrin-A5 regulates the formation of the ascending midbrain dopaminergic pathways.
Dev Neurobiol 2009; 69: 36-46.

COTTA-GRAND N, ROVERE C, GUYON A, CERVANTES A, BRAU F, NAHON JL

Melanin-concentrating hormone induces neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells through p53 and MAPKinase signaling pathways.
Peptides 2009; 30: 2014-24.

CROIZIER S, FRANCHI-BERNARD G, COLARD C, PONCET F, LA ROCHE A, RISOLD PY

A comparative analysis shows morphofunctional differences between the rat and mouse melanin concentrating hormone systems.
PLoS One 2010; 5: e15471.

CROSBY EC, WOODBURNE RT

The comparative anatomy of the preoptic area and the hypothalamus.
Assoc Res Nerv Ment Dis 1940; 20: 52-169.

CVETKOVIC V

Contribution à l'étude des neurones producteurs de l'hormone de mélanino-concentration (MCH) dans le diencephale ventral de rat.
Thèse : Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Franche-Comté 2003: 246.

CVETKOVIC V, BRISCHOUX F, JACQUEMARD C, FELLMANN D, GRIFFOND B, RISOLD PY

Characterization of subpopulations of neurons producing melanin-concentrating hormone in the rat ventral diencephalon.

J Neurochem 2004; 91: 911-9.

DALE JK, VESQUE C, LINTS TJ, SAMPATH TK, FURLEY A, DODD J, PLACZEK M

Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm.

Cell 1997; 90: 257-69.

DALE K, SATTAR N, HEEMSKERK J, CLARKE JD, PLACZEK M, DODD J

Differential patterning of ventral midline cells by axial mesoderm is regulated by BMP7 and chordin.

Development 1999; 126: 397-408.

DEINER MS, SRETAVAN DW

Altered midline axon pathways and ectopic neurons in the developing hypothalamus of netrin-1- and DCC-deficient mice.

J Neurosci 1999; 19: 9900-12.

DEMARQUE M, SPITZER NC

Activity-dependent expression of Lmx1b regulates specification of serotonergic neurons modulating swimming behavior.

Neuron 2010; 67: 321-34.

DENES AS, JEKELY G, STEINMETZ PR, RAIBLE F, SNYMAN H, PRUD'HOMME B, FERRIER DE, BALAVOINE G, ARENDT D

Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria.

Cell 2007; 129: 277-88.

DERAY A, GRIFFOND B, COLARD C, JACQUEMARD C, BUGNON C, FELLMANN D

Activation of the rat melanin-concentrating hormone neurons by ventromedial hypothalamic lesions.

Neuropeptides 1994; 27: 185-94.

DESCHAMPS C, FAIDEAU M, JABER M, GAILLARD A, PRESTOZ L

Expression of ephrinA5 during development and potential involvement in the guidance of the mesostriatal pathway.

Exp Neurol 2009; 219: 466-80.

DEVINE CA, KEY B

Robo-Slit interactions regulate longitudinal axon pathfinding in the embryonic vertebrate brain.

Dev Biol 2008; 313: 371-83.

DIEZ-ROUX G, BANFI S, SULTAN M, GEFFERS L, ANAND S, ROZADO D, MAGEN A, CANIDIO E, PAGANI M, PELUSO I, LIN-MARQ N, KOCH M, BILIO M, CANTIELLO I, VERDE R, DE MASI C, BIANCHI SA, CICCHINI J, PERROUD E, MEHMETI S, DAGAND E, SCHRINNER S, NURNBERGER A, SCHMIDT K, METZ K, ZWINGMANN C, BRIESKE N, SPRINGER C, HERNANDEZ AM, HERZOG S, GRABBE F, SIEVERDING C, FISCHER B, SCHRADER K, BROCKMEYER M, DETTMER S, HELBIG C, ALUNNI V, BATTAINI MA, MURA C, HENRICHSEN CN, GARCIA-LOPEZ R, ECHEVARRIA D, PUELLES E, GARCIA-CALERO E, KRUSE S, UHR M, KAUCK C, FENG G, MILYAEV N, ONG CK, KUMAR L, LAM M, SEMPLE CA, GYENESEI A, MUNDLOS S, RADELOF U, LEHRACH H, SARMIENTOS P, REYMOND A, DAVIDSON DR, DOLLE P, ANTONARAKIS SE, YASPO ML, MARTINEZ S, BALDOCK RA, EICHELE G, BALLABIO A

A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo.

PLoS Biol 2011; 9: e1000582.

DOMANITSKAYA E, WACKER A, MAUTI O, BAERISWYL T, ESTEVE P, BOVOLENTA P, STOECKLI ET

Sonic hedgehog guides post-crossing commissural axons both directly and indirectly by regulating Wnt activity.

J Neurosci 2010; 30: 11167-76.

DUGAN JP, STRATTON A, RILEY HP, FARMER WT, MASTICK GS

Midbrain dopaminergic axons are guided longitudinally through the diencephalon by Slit/Robo signals.

Mol Cell Neurosci 2011; 46: 347-56.

EASTER SS, JR., ROSS LS, FRANKFURTER A

Initial tract formation in the mouse brain.

J Neurosci 1993; 13: 285-99.

EASTER SS, JR., TAYLOR JS

The development of the Xenopus retinofugal pathway: optic fibers join a pre-existing tract.

Development 1989; 107: 553-73.

EBERLE AN, MILD G, SCHLUMBERGER S, DROZDZ R, HINTERMANN E, ZUMSTEG U

Expression and characterization of melanin-concentrating hormone receptors on mammalian cell lines.

Peptides 2004; 25: 1585-95.

EKSTROM P, HOLMQVIST BI, PANULA P

Histamine-immunoreactive neurons in the brain of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. Correlation with hypothalamic tyrosine hydroxylase- and serotonin-immunoreactive neurons.

J Chem Neuroanat 1995; 8: 75-85.

ELIAS CF, LEE CE, KELLY JF, AHIMA RS, KUCHAR M, SAPER CB, ELMQUIST JK

Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus.

J Comp Neurol 2001; 432: 1-19.

ENAMI M

Melanophore-contracting hormone (MCH) of possible hypothalamic origin in the catfish, *Parasilurus*.

Science 1955; 121: 36-7.

FELLMANN D, BRESSON JL, BRETON C, BAHJAOUI M, ROUILLON A, GOUGET A, BUGNON C

Cloning of cDNAs encoding a rat neuropeptide immunologically related to salmon melanin concentrating hormone.

Neurosci Lett 1989; 106: 23-8.

FELLMANN D, BUGNON C, RISOLD PY

Unrelated peptide immunoreactivities coexist in neurons of the rat lateral dorsal hypothalamus: human growth hormone-releasing factor1-37-, salmon melanin-concentrating hormone- and alpha melanotropin-like substances.

Neurosci Lett 1987; 74: 275-80.

FERNANDEZ AS, PIEAU C, REPERANT J, BONCINELLI E, WASSEF M

Expression of the Emx-1 and Dlx-1 homeobox genes define three molecularly distinct domains in the telencephalon of mouse, chick, turtle and frog embryos: implications for the evolution of telencephalic subdivisions in amniotes.

Development 1998; 125: 2099-111.

FRANCIS K, BAKER BI

Developmental changes in melanin-concentrating hormone in *Rana temporaria*.

Gen Comp Endocrinol 1995; 98: 157-65.

FUNATO H, SAITO-NAKAZATO Y, TAKAHASHI H

Axonal growth from the habenular nucleus along the neuromere boundary region of the diencephalon is regulated by semaphorin 3F and netrin-1.

Mol Cell Neurosci 2000; 16: 206-20.

GAD JM, KEELING SL, WILKS AF, TAN SS, COOPER HM

The expression patterns of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis.

Dev Biol 1997; 192: 258-73.

GEORGESCU D, SEARS RM, HOMMEL JD, BARROT M, BOLANOS CA, MARSH DJ, BEDNAREK MA, BIBB JA, MARATOS-FLIER E, NESTLER EJ, DILEONE RJ

The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance.

J Neurosci 2005; 25: 2933-40.

GERFEN C, WILSON C The basal ganglia. Handbook of chemical neuroanatomy Integrated systems of the CNS, Part III. Swanson L, Björklund A and Hökfelt T.1996. **12**: 371-468.

GILBERT SF

The morphogenesis of evolutionary developmental biology.

Int J Dev Biol 2003; 47: 467-77.

GRIFFOND B, DERAY A, NGUYEN NU, COLARD C, FELLMANN D

The synthesis of melanin-concentrating hormone is stimulated by ventromedial hypothalamic lesions in the rat lateral hypothalamus: a time-course study.

Neuropeptides 1995; 28: 267-75.

GRIFFOND B, RISOLD PY

MCH and feeding behavior-interaction with peptidic network.

Peptides 2009; 30: 2045-51.

GUAN JL, UEHARA K, LU S, WANG QP, FUNAHASHI H, SAKURAI T, YANAGIZAWA M, SHIODA S

Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation.

Int J Obes Relat Metab Disord 2002; 26: 1523-32.

GUESDON B, PARADIS E, SAMSON P, RICHARD D

Effects of intracerebroventricular and intra-accumbens melanin-concentrating hormone agonism on food intake and energy expenditure.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2009; 296: R469-75.

GUIJARRO P, SIMO S, PASCUAL M, ABASOLO I, DEL RIO JA, SORIANO E

Netrin1 exerts a chemorepulsive effect on migrating cerebellar interneurons in a Dcc-independent way.

Mol Cell Neurosci 2006; 33: 389-400.

HAHN JD

Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin peptide expression patterns in a current parcelling scheme of the lateral hypothalamic zone.

Neurosci Lett 2010; 468: 12-7.

HAHN JD, SWANSON LW

Distinct patterns of neuronal inputs and outputs of the juxtaparaventricular and supraforaminal regions of the lateral hypothalamic area in the male rat.

Brain Res Rev 2010; 64: 14-103.

HAMMOND R, BLAESS S, ABELIOVICH A

Sonic hedgehog is a chemoattractant for midbrain dopaminergic axons.

PLoS One 2009; 4: e7007.

HARTENSTEIN V

Early pattern of neuronal differentiation in the *Xenopus* embryonic brainstem and spinal cord.

J Comp Neurol 1993; 328: 213-31.

HASSANI OK, LEE MG, JONES BE

Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle.

Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 2418-22.

HAWES BE, KIL E, GREEN B, O'NEILL K, FRIED S, GRAZIANO MP

The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways.

Endocrinology 2000; 141: 4524-32.

HERNANDEZ-MONTIEL HL, TAMARIZ E, SANDOVAL-MINERO MT, VARELA-ECHAVARRIA A

Semaphorins 3A, 3C, and 3F in mesencephalic dopaminergic axon pathfinding.

J Comp Neurol 2008; 506: 387-97.

HERVIEU G

Melanin-concentrating hormone functions in the nervous system: food intake and stress.

Expert Opin Ther Targets 2003; 7: 495-511.

HERVIEU GJ, CLUDERAY JE, HARRISON D, MEAKIN J, MAYCOX P, NASIR S, LESLIE RA

The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, *slc-1*, in the central nervous system of the rat.

Eur J Neurosci 2000; 12: 1194-216.

HILL J, DUCKWORTH M, MURDOCK P, RENNIE G, SABIDO-DAVID C, AMES RS, SZEKERES P, WILSON S, BERGSMA DJ, GLOGER IS, LEVY DS, CHAMBERS JK, MUIR AI

Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor.
J Biol Chem 2001; 276: 20125-9.

HIS W

Vorschläge zur Einteilung des Gehirns.
Arch. Anat. Entwicklungsgesch (Leipzig) 1893; 17: 172-179.

HORGAN K, VAN DER KOOY D

Visceral targets specify calcitonin gene-related peptide and substance P enrichment in trigeminal afferent projections.
J Neurosci 1992; 12: 1135-43.

HUXLEY TH The anatomy of vertebrated animals 1871.

IFFT JD

An autoradiographic study of the time of final division of neurons in rat hypothalamic nuclei.
J Comp Neurol 1972; 144: 193-204.

IKEMOTO S

Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex.
Brain Res Rev 2007; 56: 27-78.

IMAI K

Extraction of melanophore concentrating hormone (MCH) from the pituitary of fishes.
Endocr J 1958; 5: 34-48.

INAGAKI N, PANULA P, YAMATODANI A, WADA H

Organization of the histaminergic system in the brain of the teleost, *Trachurus trachurus*.
J Comp Neurol 1991; 310: 94-102.

KAPSIMALI M, CANEPARO L, HOUART C, WILSON SW

Inhibition of Wnt/Axin/beta-catenin pathway activity promotes ventral CNS midline tissue to adopt hypothalamic rather than floorplate identity.
Development 2004; 131: 5923-33.

KARLSTROM RO, TROWE T, KLOSTERMANN S, BAIER H, BRAND M, CRAWFORD AD, GRUNEWALD B, HAFFTER P, HOFFMANN H, MEYER SU, MULLER BK, RICHTER S, VAN EEDEN FJ, NUSSLEIN-VOLHARD C, BONHOEFFER F

Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding.
Development 1996; 123: 427-38.

KASTENHUBER E, KERN U, BONKOWSKY JL, CHIEN CB, DRIEVER W, SCHWEITZER J

Netrin-DCC, Robo-Slit, and heparan sulfate proteoglycans coordinate lateral positioning of longitudinal dopaminergic diencephalospinal axons.
J Neurosci 2009; 29: 8914-26.

KAWANO H, HORIE M, HONMA S, KAWAMURA K, TAKEUCHI K, KIMURA S

Aberrant trajectory of ascending dopaminergic pathway in mice lacking *Nkx2.1*.
Exp Neurol 2003; 182: 103-12.

KAWAUCHI H, BAKER BI

Melanin-concentrating hormone signaling systems in fish.
Peptides 2004; 25: 1577-84.

KAWAUCHI H, KAWAZOE I, TSUBOKAWA M, KISHIDA M, BAKER BI

Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries.
Nature 1983; 305: 321-3.

KEYSER A

The development of the diencephalon of the Chinese hamster. An investigation of the validity of the criteria of subdivision of the brain.

Acta Anat Suppl (Basel) 1972; 59: 1-178.

KEYSER A Development of the hypothalamus in mammals, An investigation into its morphological position during ontogenesis. Handbook of the hypothalamus. Anatomy of the hypothalamus. Morgane PJ and Pankseep J. 1979 New York, Marcel Dekker. **1**: 65-136.

KILDUFF TS, DE LECEA L

Mapping of the mRNAs for the hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone receptors: networks of overlapping peptide systems.

J Comp Neurol 2001; 435: 1-5.

KISTLER-HEER V, SCHLUMPF M, LICHTENSTEIGER W

Melanocortin and MCH precursor-derived NEI effects on striatum-midbrain co-cultures.

Peptides 1998; 19: 1317-27.

KNOLLEMA S, BROWN E, VALE W, SAWCHENKO PE

Novel hypothalamic and preoptic sites of prepro-melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid and peptide expression in lactating rats.

J Neuroendocrinol 1992; 4: 709-717.

KOKKOTOU EG, TRITOS NA, MASTAITIS JW, SLIEKER L, MARATOS-FLIER E

Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain.

Endocrinology 2001; 142: 680-6.

KOLAKOWSKI LF, JR., JUNG BP, NGUYEN T, JOHNSON MP, LYNCH KR, CHENG R, HENG HH, GEORGE SR, O'DOWD BF

Characterization of a human gene related to genes encoding somatostatin receptors.

FEBS Lett 1996; 398: 253-8.

KOLK SM, GUNPUT RA, TRAN TS, VAN DEN HEUVEL DM, PRASAD AA, HELLEMONS AJ, ADOLFS Y, GINTY DD, KOLODKIN AL, BURBACH JP, SMIDT MP, PASTERKAMP RJ

Semaphorin 3F is a bifunctional guidance cue for dopaminergic axons and controls their fasciculation, channeling, rostral growth, and intracortical targeting.

J Neurosci 2009; 29: 12542-57.

LAGUTIN OV, ZHU CC, KOBAYASHI D, TOPCZEWSKI J, SHIMAMURA K, PUELLES L, RUSSELL HR, MCKINNON PJ, SOLNICA-KREZEL L, OLIVER G

Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development.

Genes Dev 2003; 17: 368-79.

LAKAYE B, MINET A, ZORZI W, GRISAR T

Cloning of the rat brain cDNA encoding for the SLC-1 G protein-coupled receptor reveals the presence of an intron in the gene.
Biochim Biophys Acta 1998; 1401: 216-20.

LAZAR G, MADERDRUT JL, MERCHENTHALER I

Distribution of melanin-concentrating hormone-like immunoreactivity in the central nervous system of *Rana esculenta*.
Brain Res Bull 2002; 57: 401-7.

LEGAGNEUX K, BERNARD-FRANCHI G, PONCET F, LA ROCHE A, COLARD C, FELLMANN D, PRALONG F, RISOLD PY

Distribution and genesis of the RFRP-producing neurons in the rat brain: comparison with melanin concentrating hormone- and hypocretin-containing neurons.
Neuropeptides 2009; 43: 13-9.

LEGROS CLARK WE Morphological aspects of the hypothalamus. The hypothalamus. Morphological, functional, clinical and surgical aspects. LEGROS CLARK WE BJ, RIDDOCH G, DOTT NM, Eds. 1938 Edinburgh 1-68.

LEUNG KM, VAN HORCK FP, LIN AC, ALLISON R, STANDART N, HOLT CE

Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1.
Nat Neurosci 2006; 9: 1247-56.

LIN AC, HOLT CE

Function and regulation of local axonal translation.
Curr Opin Neurobiol 2008; 18: 60-8.

LIN L, RAO Y, ISACSON O

Netrin-1 and slit-2 regulate and direct neurite growth of ventral midbrain dopaminergic neurons.
Mol Cell Neurosci 2005; 28: 547-55.

LOWERY LA, VAN VACTOR D

The trip of the tip: understanding the growth cone machinery.
Nat Rev Mol Cell Biol 2009; 10: 332-43.

MARILLAT V, CASES O, NGUYEN-BA-CHARVET KT, TESSIER-LAVIGNE M, SOTELO C, CHEDOTAL A

Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain.
J Comp Neurol 2002; 442: 130-55.

MARIN O, ANDERSON SA, RUBENSTEIN JL

Origin and molecular specification of striatal interneurons.
J Neurosci 2000; 20: 6063-76.

MARIN O, BAKER J, PUELLES L, RUBENSTEIN JL

Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections.
Development 2002; 129: 761-73.

MARKAKIS EA

Development of the neuroendocrine hypothalamus.
Front Neuroendocrinol 2002; 23: 257-91.

MARKAKIS EA, SWANSON LW

Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system.
Brain Res Brain Res Rev 1997; 24: 255-91.

MARSH DJ, WEINGARTH DT, NOVI DE, CHEN HY, TRUMBAUER ME, CHEN AS, GUAN XM, JIANG MM, FENG Y, CAMACHO RE, SHEN Z, FRAZIER EG, YU H, METZGER JM, KUCA SJ, SHEARMAN LP, GOPAL-TRUTER S, MACNEIL DJ, STRACK AM, MACINTYRE DE, VAN DER PLOEG LH, QIAN S

Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism.

Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 3240-5.

MASTICK GS, DAVIS NM, ANDREW GL, EASTER SS, JR.

Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain.

Development 1997; 124: 1985-97.

MASTICK GS, EASTER SS, JR.

Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain.

Dev Biol 1996; 173: 79-94.

MATHIEU J, BARTH A, ROSA FM, WILSON SW, PEYRIERAS N

Distinct and cooperative roles for Nodal and Hedgehog signals during hypothalamic development.

Development 2002; 129: 3055-65.

METIN C, DELEGLISE D, SERAFINI T, KENNEDY TE, TESSIER-LAVIGNE M

A role for netrin-1 in the guidance of cortical efferents.

Development 1997; 124: 5063-74.

MICHAUD JL, ROSENQUIST T, MAY NR, FAN CM

Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1.

Genes Dev 1998; 12: 3264-75.

MIHALKOVICZ VV

Entwicklungsgeschichte des Gehirns.

Leipzig 1877.

MORENO N, GONZALEZ A

The non-evaginated secondary prosencephalon of vertebrates.

Front Neuroanat 2011; 5: 12.

MOURI T, TAKAHASHI K, KAWAUCHI H, SONE M, TOTSUNE K, MURAKAMI O, ITOI K, OHNEDA M, SASANO H, SASANO N

Melanin-concentrating hormone in the human brain.

Peptides 1993; 14: 643-6.

MULLER F, ALBERT S, BLADER P, FISCHER N, HALLONET M, STRAHLE U

Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS.

Development 2000; 127: 3889-97.

NAHON JL

The melanin-concentrating hormone: from the peptide to the gene.

Crit Rev Neurobiol 1994; 8: 221-62.

- NAHON JL, PRESSE F, BITTENCOURT JC, SAWCHENKO PE, VALE W**
The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus.
Endocrinology 1989; 125: 2056-65.
- NAITO N, KAWAZOE I, NAKAI Y, KAWAUCHI H, HIRANO T**
Melanin-concentrating hormone-like immunoreactivity in the rat hypothalamus.
Zool Sci 1985; 2: 990.
- NAITO N, KAWAZOE I, NAKAI Y, KAWAUCHI H, HIRANO T**
Coexistence of immunoreactivity for melanin-concentrating hormone and alpha-melanocyte stimulating hormone in the hypothalamus of the rat.
Neurosci Lett 1986; 70: 81-5.
- NESTLER EJ, CARLEZON WA, JR.**
The mesolimbic dopamine reward circuit in depression.
Biol Psychiatry 2006; 59: 1151-9.
- NIEUWENHUIS E, BARNFIELD PC, MAKINO S, HUI CC**
Epidermal hyperplasia and expansion of the interfollicular stem cell compartment in mutant mice with a C-terminal truncation of Patched1.
Dev Biol 2007; 308: 547-60.
- NIEUWENHUIJS R, DONKELAAR H, NICHOLSON C** Morphogenesis and general structure.
The central nervous system of vertebrates
Springer-Verlag. 1997 Berlin. **1**: 158-228.
- NISHIYAMA M, HOSHINO A, TSAI L, HENLEY JR, GOSHIMA Y, TESSIER-LAVIGNE M, POO MM, HONG K**
Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning.
Nature 2003; 423: 990-5.
- NURAL HF, MASTICK GS**
Pax6 guides a relay of pioneer longitudinal axons in the embryonic mouse forebrain.
J Comp Neurol 2004; 479: 399-409.
- OLIVER G, MAILHOS A, WEHR R, COPELAND NG, JENKINS NA, GRUSS P**
Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development.
Development 1995; 121: 4045-55.
- ORR HA**
Contributions to the embryology of the lizard.
J. Morphol. 1887; 1: 311-372.
- PANDOLFI M, CANEPA MM, RAVAGLIA MA, MAGGESE MC, PAZ DA, VISSIO PG**
Melanin-concentrating hormone system in the brain and skin of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: anatomical localization, ontogeny and distribution in comparison to alpha-melanocyte-stimulating hormone-expressing cells.
Cell Tissue Res 2003; 311: 61-9.

PARKES D, VALE W

Secretion of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-EI from cultured rat hypothalamic cells.

Endocrinology 1992; 131: 1826-31.

PATTYN A, VALLSTEDT A, DIAS JM, SAMAD OA, KRUMLAUF R, RIJLI FM, BRUNET JF, ERICSON J

Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors.

Genes Dev 2003; 17: 729-37.

PAXINOS G, FRANKLIN KBJ, Eds. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Deluxe Edition), Second Edition San Diego.1997.

PHILLIPSON OT, GRIFFITHS AC

The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat.

Neuroscience 1985; 16: 275-96.

PISSIOS P, OZCAN U, KOKKOTOU E, OKADA T, LIEW CW, LIU S, PETERS JN, DAHLGREN G, KARAMCHANDANI J, KUDVA YC, KURPAD AJ, KENNEDY RT, MARATOS-FLIER E, KULKARNI RN

Melanin concentrating hormone is a novel regulator of islet function and growth.

Diabetes 2007; 56: 311-9.

PRESSE F, NAHON JL, FISCHER WH, VALE W

Structure of the human melanin concentrating hormone mRNA.

Mol Endocrinol 1990; 4: 632-37.

PUELLES L, RUBENSTEIN JL

Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization.

Trends Neurosci 1993; 16: 472-9.

PUELLES L, RUBENSTEIN JL

Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model.

Trends Neurosci 2003; 26: 469-76.

QU D, LUDWIG DS, GAMMELTOFT S, PIPER M, PELLEYMOUNTER MA, CULLEN MJ, MATHES WF, PRZYPEK R, KANAREK R, MARATOS-FLIER E

A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour.

Nature 1996; 380: 243-7.

RETAUX S, ROGARD M, BACH I, FAILLI V, BESSON MJ

Lhx9: a novel LIM-homeodomain gene expressed in the developing forebrain.

J Neurosci 1999; 19: 783-93.

RISOLD PY, CROIZIER S, LEGAGNEUX K, BRISCHOUX F, FELLMANN D, GRIFFOND B

The development of the MCH system.

Peptides 2009; 30: 1969-72.

RISOLD PY, FELLMANN D, LENYS D, BUGNON C

Coexistence of acetylcholinesterase-, human growth hormone-releasing factor(1-37)-, alpha melanotropin- and melanin-concentrating hormone-like immunoreactivities in neurons of the rat hypothalamus: a light and electron microscope study.

Neurosci Lett 1989; 100: 23-8.

RISOLD PY, FELLMANN D, RIVIER J, VALE W, BUGNON C

Immunoreactivities for antisera to three putative neuropeptides of the rat melanin-concentrating hormone precursor are coexpressed in neurons of the rat lateral dorsal hypothalamus.
Neurosci Lett 1992; 136: 145-9.

ROELINK H, PORTER JA, CHIANG C, TANABE Y, CHANG DT, BEACHY PA, JESSELL TM

Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis.
Cell 1995; 81: 445-55.

ROHR KB, BARTH KA, VARGA ZM, WILSON SW

The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity.
Neuron 2001; 29: 341-51.

RONDINI TA, DONATO J, JR., RODRIGUES BDE C, BITTENCOURT JC, ELIAS CF

Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin-concentrating hormone during lactation.
J Chem Neuroanat 2010; 39: 51-62.

ROVERE C, VIALE A, NAHON J, KITABGI P

Impaired processing of brain proneurotensin and promelanin-concentrating hormone in obese fat/fat mice.
Endocrinology 1996; 137: 2954-8.

RUBENSTEIN JL, MARTINEZ S, SHIMAMURA K, PUELLES L

The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model.
Science 1994; 266: 578-80.

RUIZ I ALTABA A, PLACZEK M, BALDASSARE M, DODD J, JESSELL TM

Early stages of notochord and floor plate development in the chick embryo defined by normal and induced expression of HNF-3 beta.
Dev Biol 1995; 170: 299-313.

SAITO Y, CHENG M, LESLIE FM, CIVELLI O

Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain.
J Comp Neurol 2001; 435: 26-40.

SAITO Y, NOTHACKER HP, CIVELLI O

Melanin-concentrating hormone receptor: an orphan receptor fits the key.
Trends Endocrinol Metab 2000; 11: 299-303.

SAITO Y, TETSUKA M, LI Y, KUROSE H, MARUYAMA K

Properties of rat melanin-concentrating hormone receptor 1 internalization.
Peptides 2004; 25: 1597-604.

SAITO Y, TETSUKA M, YUE L, KAWAMURA Y, MARUYAMA K

Functional role of N-linked glycosylation on the rat melanin-concentrating hormone receptor 1.
FEBS Lett 2003; 533: 29-34.

SANCHEZ M, BAKER BI, CELIS M

Melanin-concentrating hormone (MCH) antagonizes the effects of alpha-MSH and neuropeptide E-I on grooming and locomotor activities in the rat.
Peptides 1997; 18: 393-6.

SAPIN EMILIE

Etude anatomique des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation du sommeil paradoxal chez le rat.

Thèse : Neurosciences : Lyon I 2009: 210 p.

SCHIER AF, SHEN MM

Nodal signalling in vertebrate development.

Nature 2000; 403: 385-9.

SCHUG J Using TESS to predict transcription factor binding sites in DNA sequence. Current protocols in bioinformatics Baxevanis AD E.2003.

SCHUG JO, G.C.

TESS: transcription element search system on the WWW. Computational Biology and Informatics Laboratory, School of Medicine, University of Pennsylvania.

URL: <http://www.cbil.upenn.edu/tess>. 1997.

SEGAL-LIEBERMAN G, BRADLEY RL, KOKKOTOU E, CARLSON M, TROMBLY DJ, WANG X, BATES S, MYERS MG, JR., FLIER JS, MARATOS-FLIER E

Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype.

Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 10085-90.

SHIMADA M, TRITOS NA, LOWELL BB, FLIER JS, MARATOS-FLIER E

Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean.

Nature 1998; 396: 670-4.

SHIMAMURA K, HARTIGAN DJ, MARTINEZ S, PUELLES L, RUBENSTEIN JL

Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube.

Development 1995; 121: 3923-33.

SHIMOGORI T, LEE DA, MIRANDA-ANGULO A, YANG Y, WANG H, JIANG L, YOSHIDA AC, KATAOKA A, MASHIKO H, AVETISYAN M, QI L, QIAN J, BLACKSHAW S

A genomic atlas of mouse hypothalamic development.

Nat Neurosci 2010; 13: 767-75.

SIEBER BA, KUZMIN A, CANALS JM, DANIELSSON A, PARATCHA G, ARENAS E, ALBERCH J, OGREN SO, IBANEZ CF

Disruption of EphA/ephrin-a signaling in the nigrostriatal system reduces dopaminergic innervations and dissociates behavioral responses to amphetamine and cocaine.

Mol Cell Neurosci 2004; 26: 418-28.

SITA LV, ELIAS CF, BITTENCOURT JC

Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system.

Neuroscience 2007; 148: 949-69.

SKOFITSCH G, JACOBOWITZ DM, ZAMIR N

Immunohistochemical localization of melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain.

Brain Res Bull 1985; 15: 635-649.

STANLEY S, PINTO S, SEGAL J, PEREZ CA, VIALE A, DEFALCO J, CAI X, HEISLER LK, FRIEDMAN JM

Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically.

Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 7024-9.

STEININGER TL, KILDUFF TS, BEHAN M, BENCA RM, LANDRY CF

Comparison of hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone neurons and axonal projections in the embryonic and postnatal rat brain.
J Chem Neuroanat 2004; 27: 165-81.

STOPPINI L, BUCHS PA, MULLER D

A simple method for organotypic cultures of nervous tissue.
J Neurosci Methods 1991; 37: 173-82.

SWANSON LW The hypothalamus. Handbook of chemical neuroanatomy, Vol 5 : Integrated systems of the CNS, Part I. BJÖRKLUND A HT, SWANSON LW, Eds.1987 Amsterdam: 1-124.

SWANSON LW Brain Maps: Structure of the Rat Brain Second Revised Edition, Elsevier Science B.V. 1998.

SWANSON LW, SANCHEZ-WATTS G, WATTS AG

Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parcelling scheme of the lateral hypothalamic zone.
Neurosci Lett 2005; 387: 80-4.

SZABO NE, ZHAO T, CANKAYA M, THEIL T, ZHOU X, ALVAREZ-BOLADO G

Role of neuroepithelial Sonic hedgehog in hypothalamic patterning.
J Neurosci 2009; 29: 6989-7002.

TAKAHASHI T, NOWAKOWSKI RS, CAVINESS VS, JR.

Interkinetic and migratory behavior of a cohort of neocortical neurons arising in the early embryonic murine cerebral wall.
J Neurosci 1996; 16: 5762-76.

TAUPIN P

BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation.
Brain Res Rev 2007; 53: 198-214.

THOMPSON RH, CANTERAS NS, SWANSON LW

Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat.
J Comp Neurol 1996; 376: 143-73.

TILLET Y, BATAILLER M, FELLMANN D

Distribution of melanin-concentrating hormone (MCH)-like immunoreactivity in neurons of the diencephalon of sheep.
J Chem Neuroanat 1996; 12: 135-45.

TORRE ER, GUTEKUNST CA, GROSS RE

Expression by midbrain dopamine neurons of Sema3A and 3F receptors is associated with chemorepulsion in vitro but a mild in vivo phenotype.
Mol Cell Neurosci 2010; 44: 135-53.

TORTEROLO P, SAMPOGNA S, MORALES FR, CHASE MH

MCH-containing neurons in the hypothalamus of the cat: searching for a role in the control of sleep and wakefulness.
Brain Res 2006; 1119: 101-14.

VANN SD, AGGLETON JP

The mammillary bodies: two memory systems in one?
Nat Rev Neurosci 2004; 5: 35-44.

VARGA ZM, WEGNER J, WESTERFIELD M

Anterior movement of ventral diencephalic precursors separates the primordial eye field in the neural plate and requires cyclops.
Development 1999; 126: 5533-46.

VARLET I, COLLIGNON J, ROBERTSON EJ

nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation.
Development 1997; 124: 1033-44.

VAUGHAN JM, FISCHER WH, HOEGER C, RIVIER J, VALE W

Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus.
Endocrinology 1989; 125: 1660-5.

VERRET L, GOUTAGNY R, FORT P, CAGNON L, SALVERT D, LEGER L, BOISSARD R, SALIN P, PEYRON C, LUPPI PH

A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep.
BMC Neurosci 2003; 4: 19.

VIEIRA C, MARTINEZ S

Sonic hedgehog from the basal plate and the zona limitans intrathalamica exhibits differential activity on diencephalic molecular regionalization and nuclear structure.
Neuroscience 2006; 143: 129-40.

VITALIS T, CASES O, ENGELKAMP D, VERNEY C, PRICE DJ

Defect of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor Pax6.
J Neurosci 2000; 20: 6501-16.

VOKES SA, JI H, MCCUINE S, TENZEN T, GILES S, ZHONG S, LONGABAUGH WJ, DAVIDSON EH, WONG WH, MCMAHON AP

Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning.
Development 2007; 134: 1977-89.

VON BAER KE

Ueber die Entwicklungsgeschichte der Thiere.
Bd 1-3, Königsberg 1828.

WATSON SJ, AKIL H

The presence of two alpha-MSH positive cell groups in rat hypothalamus.
Eur J Pharmacol 1979; 58: 101-3.

WILSON SW, HOUART C

Early steps in the development of the forebrain.
Dev Cell 2004; 6: 167-81.

XU C, FAN CM

Allocation of paraventricular and supraoptic neurons requires Sim1 function: a role for a Sim1 downstream gene PlexinC1.
Mol Endocrinol 2007; 21: 1234-45.

XU C, FAN CM

Expression of Robo/Slit and Semaphorin/Plexin/Neuropilin family members in the developing hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei.
Gene Expr Patterns 2008; 8: 502-7.

YAMAGUCHI TP

Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning.
Curr Biol 2001; 11: R713-24.

YAMANAKA A, MURAKI Y, ICHIKI K, TSUJINO N, KILDUFF TS, GOTO K, SAKURAI T

Orexin neurons are directly and indirectly regulated by catecholamines in a complex manner.
J Neurophysiol 2006; 96: 284-98.

YAMANAKA A, MURAKI Y, TSUJINO N, GOTO K, SAKURAI T

Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems.
Biochem Biophys Res Commun 2003; 303: 120-9.

YAMAUCHI K, MIZUSHIMA S, TAMADA A, YAMAMOTO N, TAKASHIMA S, MURAKAMI F

FGF8 signaling regulates growth of midbrain dopaminergic axons by inducing semaphorin 3F.
J Neurosci 2009; 29: 4044-55.

YUE Y, WIDMER DA, HALLADAY AK, CERRETTI DP, WAGNER GC, DREYER JL, ZHOU R

Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrin-B2.
J Neurosci 1999; 19: 2090-101.

ZAMIR N, SKOFITSCH G, JACOBOWITZ DM

Distribution of immunoreactive melanin-concentrating hormone in the central nervous system of the rat.
Brain Res 1986; 373: 240-245.

ZHAO T, SZABO N, MA J, LUO L, ZHOU X, ALVAREZ-BOLADO G

Genetic mapping of Foxb1-cell lineage shows migration from caudal diencephalon to telencephalon and lateral hypothalamus.
Eur J Neurosci 2008; 28: 1941-55.

ANNEXES

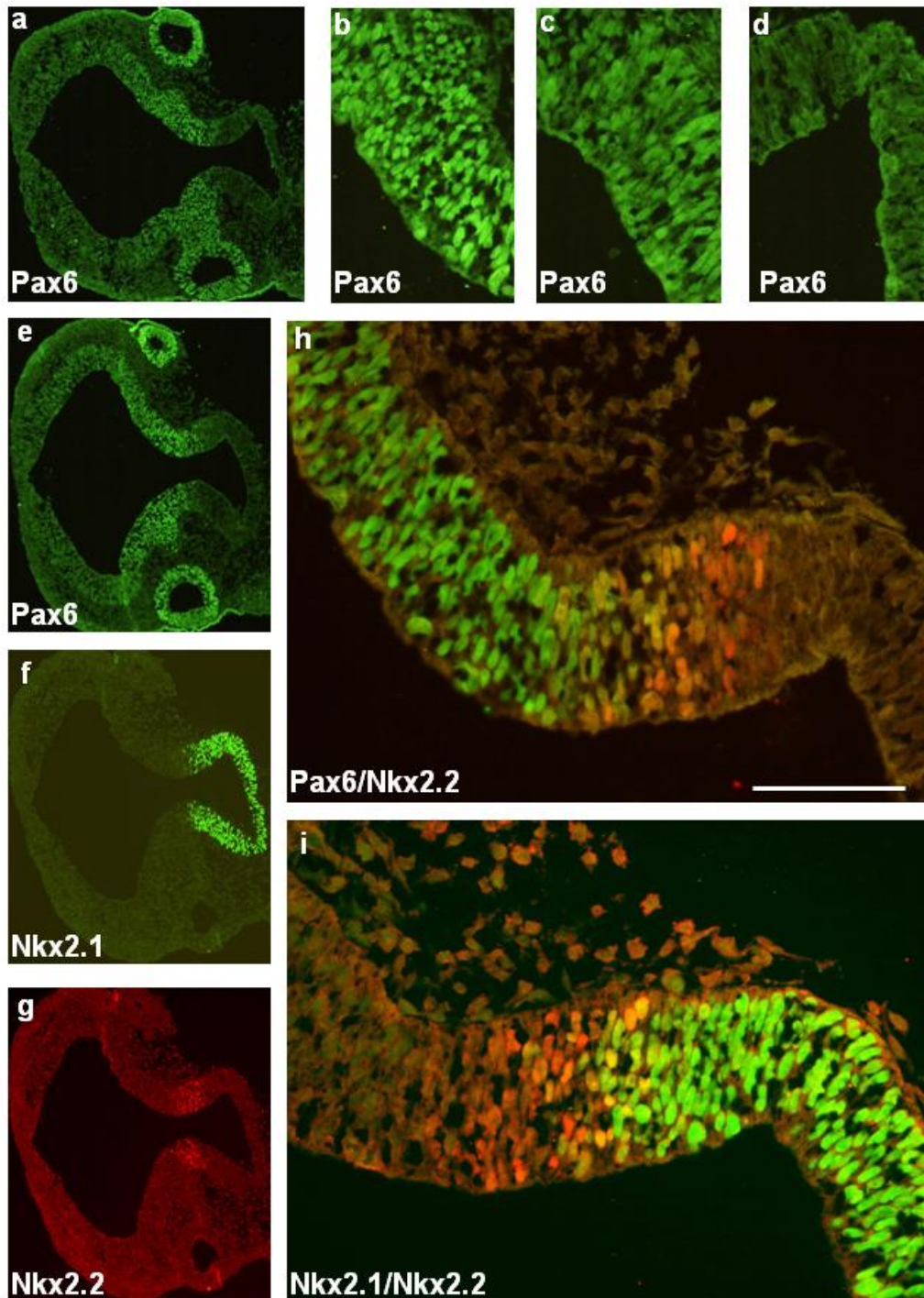


Fig. 15 : Microphotographies illustrant la distribution de Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2 par immunohistochimie sur des coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E10. **a-d.** Distribution de Pax6 sur une coupe passant par l'hypothalamus. **b** illustre une intensité élevée du marquage Pax6, **c** une intensité faible et **d** l'absence de marquage Pax6 dans l'hypothalamus. **e-i.** Distributions comparées de Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2 sur des coupes voisines à faible (**e-g**) ou à fort (**h, i**) grossissements. Barre d'échelle : (a-g) 500 μ m, (h-i) 75 μ m.

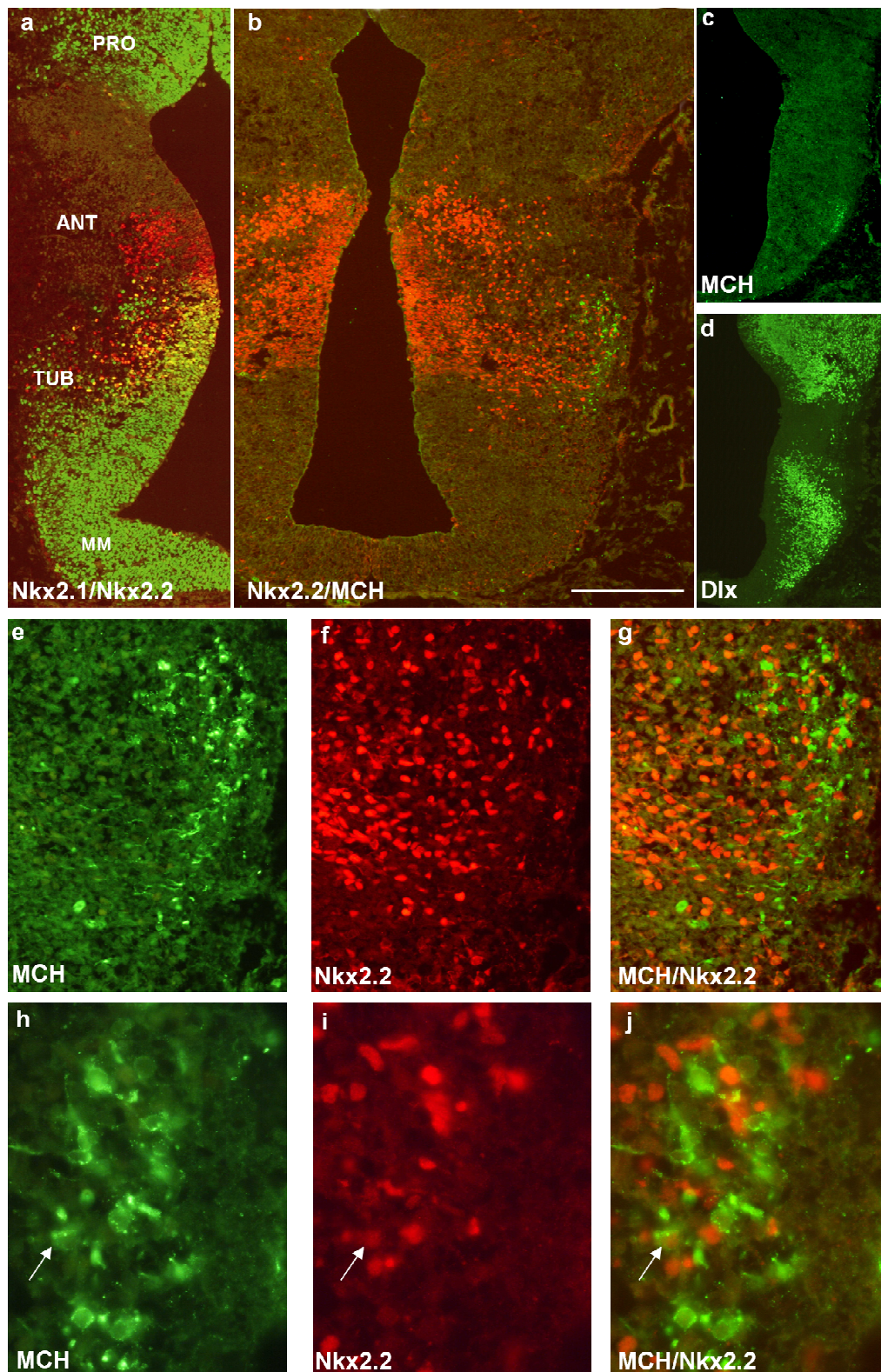
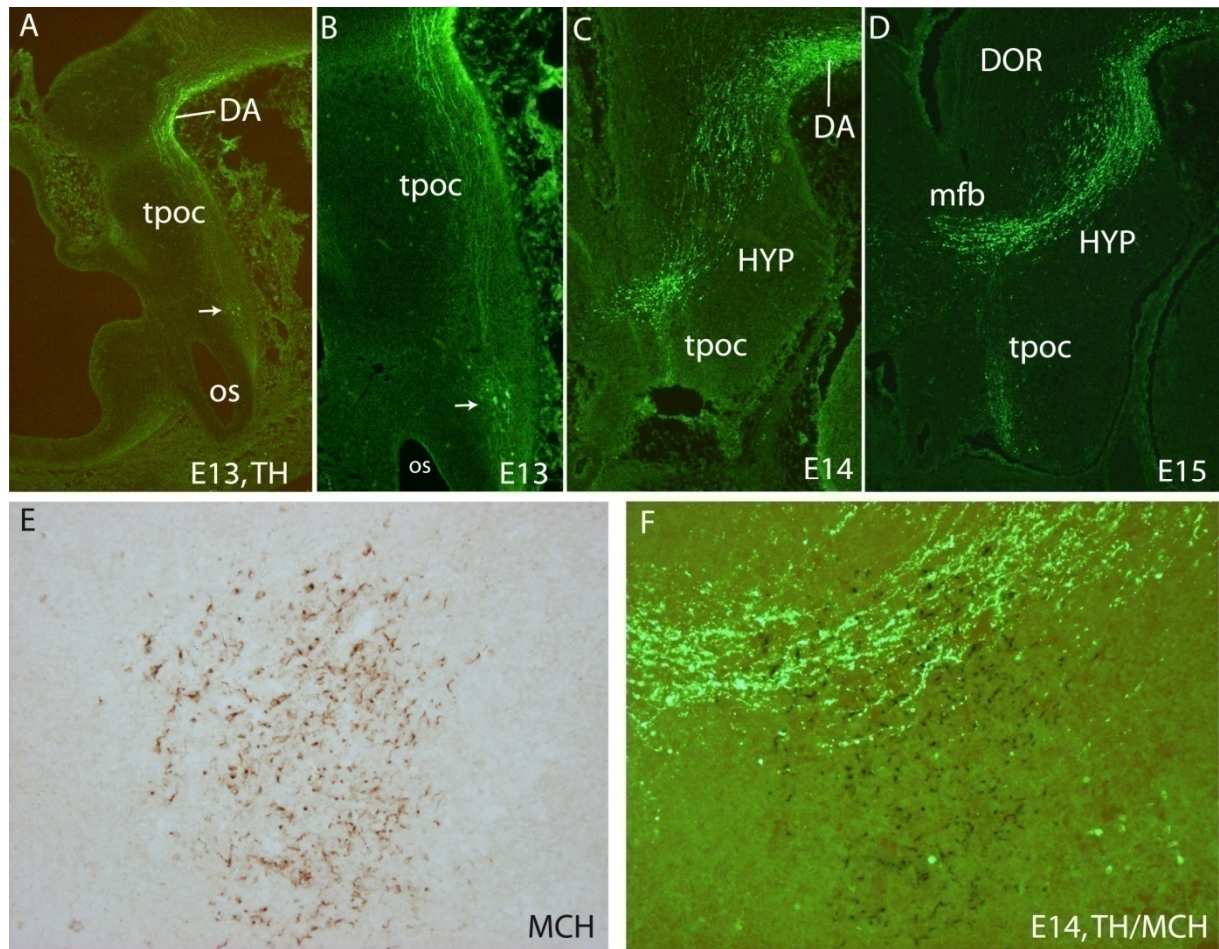


Fig. 30 : Microphotographies de coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E14. **a-d.** Distribution en immunohistochimie de Nkx2.1, Nkx2.2, MCH et Dlx. **e-j.** Doubles marquages immunohistochimiques MCH/Nkx2.2 à fort grossissement. La flèche pointe un péricaryon doublement marqué (**h-j**). Barre d'échelle : (**a-b**) 1 mm, (**c-d**) 250 μm, (**e-g**) 50 μm, (**h-j**) 30 μm.

Annexe 1 Territoires de genèse des neurones à MCH

Une partie de l'étude de C. Amiot visait à analyser les profils d'expression de cinq gènes du développement impliqués dans la mise en place du diencephale (Pax6, Nkx2.1, Nkx2.2, Dlx1/2 et Olf1) et de les comparer à la distribution des neurones à MCH ainsi qu'aux premiers tractus de fibres. Par immunohistochimie et hybridation *in situ*, il a été observé que la « zone à MCH » naît et se différencie dans un territoire caractérisé par l'expression d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription. Ainsi dès la naissance des premières cellules du manteau, au moins trois des gènes étudiés sont clairement exprimés dans ce territoire : il s'agit de Nkx2.1, Nkx2.2 et Dlx1/2. La région du neuroépithélium d'où sont générés ces neurones co-exprime Nkx2.2 et Nkx2.1. Un tel territoire de co-expression des deux gènes est observé avant la formation du manteau à E10 mais il est alors très peu épais (Amiot 2006).



Annexe 2 Photographies illustrant le trajet des fibres dopaminergiques sur des coupes parasagittales de cerveau embryonnaire de rat

Microphotographies de coupes para-sagittales de cerveau embryonnaire de rat passant par le diencéphale à E13 (**A, B**), E14 (**C**) et E15 (**D**), illustrant le marquage tyrosine hydroxylase (TH).

(**A, B**) A E13, des cellules immunoréactives pour TH sont observées caudalement à la tige optique (os, flèches blanches). Les axones TH-positifs suivent le *tractus postopticus* (*tpoc*) en direction du mésencéphale. Quelques cellules sont observées dans le mésencéphale ventral (DA) mais à ce stade le tractus mésotélencéphalique n'est pas présent.

(**C, D**) Des cellules et les axones TH-positifs sont observés dans les régions rétrochiasmatisques mais les axones formant le faisceau médian du télencéphale (*mfb*) sont majoritaires. Ce tractus suit le *tpoc* pour tourner rostralement au niveau de l'hypothalamus postérieur (HYP).

(**E, F**) Double marquage MCH (PAP)/TH (immunofluorescence) sur une coupe horizontale de d'embryon E14 de rat. Les fibres TH-positives passent à proximité des neurones à MCH.

DOR : thalamus dorsal

La distribution des projections TH-positives dans l'embryon du rat a été analysée par C. Amiot sur des coupes sagittales d'embryons de rat des stades E11 à E15. A E11, des neurones TH-positifs dans la région rétrochiasmatique projettent par le *tpoc*. Le tractus mésotélencéphalique n'est reconnu qu'à partir des stades plus tardifs. A noter chez le rat la localisation des neurones à MCH sur le parcours des fibres TH-positives (Amiot 2006).

Annexe 3 : Publication

A Comparative Analysis Shows Morphofunctional Differences between the Rat and Mouse Melanin-Concentrating Hormone Systems

Sophie Croizier, Gabrielle Franchi-Bernard, Claude Colard, Fabrice Poncet, Annie La Roche, Pierre-Yves Risold

PLoS One 2010 ; 5 : e15471

A Comparative Analysis Shows Morphofunctional Differences between the Rat and Mouse Melanin-Concentrating Hormone Systems

Sophie Croizier, Gabrielle Franchi-Bernard, Claude Colard, Fabrice Poncet, Annie La Roche, Pierre-Yves Risold*

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Franche-Comté, Besançon, France

Abstract

Sub-populations of neurons producing melanin-concentrating hormone (MCH) are characterized by distinct projection patterns, birthdates and CART/NK3 expression in rat. Evidence for such sub-populations has not been reported in other species. However, given that genetically engineered mouse lines are now commonly used as experimental models, a better characterization of the anatomy and morphofunctional organization of MCH system in this species is then necessary. Combining multiple immunohistochemistry experiments with *in situ* hybridization, tract tracing or BrdU injections, evidence supporting the hypothesis that rat and mouse MCH systems are not identical was obtained: sub-populations of MCH neurons also exist in mouse, but their relative abundance is different. Furthermore, divergences in the distribution of MCH axons were observed, in particular in the ventromedial hypothalamus. These differences suggest that rat and mouse MCH neurons are differentially involved in anatomical networks that control feeding and the sleep/wake cycle.

Citation: Croizier S, Franchi-Bernard G, Colard C, Poncet F, La Roche A, et al. (2010) A Comparative Analysis Shows Morphofunctional Differences between the Rat and Mouse Melanin-Concentrating Hormone Systems. PLoS ONE 5(11): e15471. doi:10.1371/journal.pone.0015471

Editor: Georges Chapouthier, Université Pierre et Marie Curie, France

Received: August 25, 2010; **Accepted:** September 27, 2010; **Published:** November 17, 2010

Copyright: © 2010 Croizier, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Research French Ministry. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pierre-yves.risold@univ-fcomte.fr

Introduction

The melanin-concentrating hormone (MCH) acts as a neurotransmitter/neuromodulator in the mammalian brain and is involved in various responses related to energy homeostasis, reproduction, sleep/wake cycle and reward [1–6]. Neurons producing this peptide are situated in the caudal hypothalamus and adjacent *zona incerta*. They project throughout the brain, from the olfactory bulb to the spinal cord [7]. Anatomy of the MCH system has been detailed in *Rattus norvegicus* [7],[8–10]. However, with the development of genetically engineered models, many experimental works are now done in *Mus musculus* [1],[2],[11]. It is often assumed that rat and mouse MCH systems are alike, but no true comparative studies have been performed to date. In rat, at least two sub-populations of MCH neurons exist, characterized by their birthdates, chemical phenotypes (cocaine- and amphetamine-regulated transcript, CART and neurokinin-3, NK3 co-expression) and projection patterns [10],[12–14]. However, the fine anatomy of the mouse MCH system is not known and little information exists on the CART expression and existence of sub-populations in murine MCH neurons. Such information is needed to provide sound interpretations of experimental studies in mouse models.

Because the brain cytoarchitectonic parcellations of the rat or mouse are very close, a comparative distribution of MCH cell bodies and axons is possible. In this work, MCH distribution was carefully analyzed in the mouse telencephalon and hypothalamus, and compared to rat MCH neuron distribution. We only considered obvious, undisputable divergences that may reveal

interspecific functional particularities. We also verified the existence of sub-populations in the mouse MCH system, combining retrograde tract tracing, BrdU and multiple immunohistochemical experiments. We observed that these interspecific differences correlated with the pace of MCH genesis.

Results

MCH cell body and MCH fiber distributions were analyzed by *in situ* hybridization and immunohistochemistry using three antisera (AS) raised against salmon MCH (sMCH), rat MCH (rMCH) and NEI. A DAPI counterstain or a Nissl stain of adjacent sections was also performed for cytoarchitectonic purposes. MCH perikarya were plotted on line drawings made from counterstained or Nissl stained sections (Figure 1A).

MCH projections were analyzed on rat and mouse coronal sections of the telencephalon and hypothalamus. Structures that were obviously and unambiguously differentially innervated by MCH axons were identified and observations verified on at least four brains in each species, using alternatively the sMCH-, rMCH- and NEI-AS. Obvious and unambiguous differences signify that structures were innervated in one species but not in the other with each of the three antibodies. More subjective differences were not considered since they were not supported by an adequate quantitative analysis.

Distribution of MCH perikarya in mice and rats

On coronal sections, the rostral-most cell bodies were observed at the level of the caudal paraventricular nucleus (PVH), around and

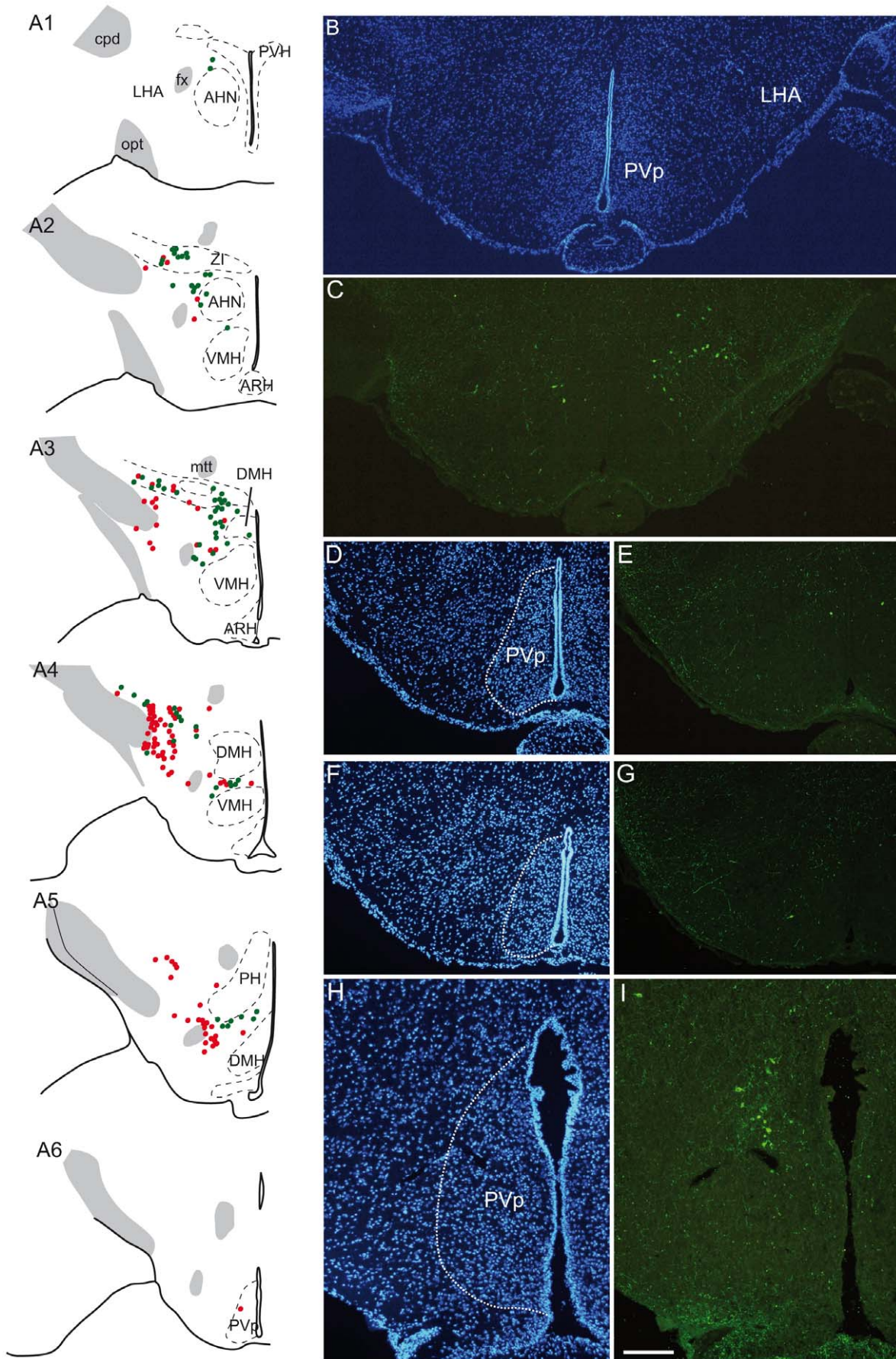


Figure 1. Distribution of MCH perikarya in the mouse hypothalamus. (A) Distribution of MCH/CART-positive and MCH-positive/CART-negative neurons, (respectively represented by green and red dots) on a series of line drawings of coronal sections through the mouse hypothalamus and arranged from rostral to caudal (A1 to A6). (B–G) Photomicrographs to illustrate the distribution of caudal-most MCH perikarya labeled by the sMCH-AS (C, E, G) at the level of the posterior periventricular nucleus (PVp). Sections were counterstained with DAPI to precisely identify cytoarchitectonic borders of the nucleus (B, D, F). Very few MCH perikarya are seen within this nucleus. (H–I) By contrast in rat, a group of MCH perikarya is labeled within the borders of the PVp. These neurons form a clear cell condensation. AHN: anterior hypothalamic nucleus, ARH: arcuate nucleus hypothalamus, cpd: cerebral peduncle, DMH: dorsomedial nucleus hypothalamus, fx: fornix, LHA: lateral hypothalamic area, mtt: mammillothalamic tract, opt: optic tract, PH: posterior hypothalamic nucleus, PVH: paraventricular nucleus hypothalamus, PVp: posterior periventricular nucleus hypothalamus, VMH: ventromedial nucleus hypothalamus, V3: third ventricle, ZI: *zona incerta*. doi:10.1371/journal.pone.0015471.g001

within the borders of the posterior part of the anterior hypothalamic nucleus using *in situ* hybridization or immunohistochemistry (Figure 1A). Caudal to PVH levels, corresponding to the tuberal hypothalamus, neurons were numerous close to the cerebral peduncle and in the perifornical region of the lateral hypothalamic area (LHA) as well as in the adjacent *zona incerta*. A few were seen in the dorsomedial capsule of the ventromedial nucleus. This general pattern of distribution is very similar to the MCH pattern described in rat [7],[15]. However, an interesting difference between the rat and mouse distribution was obvious at preamillary levels: while a dense group of MCH cell bodies is seen within the borders of the rat posterior periventricular nucleus (PVp), just ventral to the dorsal tuberomammillary nucleus [15], a similar group of neurons within the borders of the same nucleus could not be found in mouse. One or two perikarya could be seen in this nucleus, but they did not form a cell condensation as described in rat (Figure 1B–I) [see Figure 1 Atlas levels 32 and 33 of Hahn [15]].

In addition, perikarya in the olfactory tubercle like the ones described by Bittencourt et al. [7] in the rat, were not found in the mouse material (not illustrated).

Hypothalamic MCH, CART and NK3 co-expressions and origin of cortical projections

CART is expressed in 66% of all hypothalamic MCH cell bodies in rat hypothalamus [10]. These neurons also express the NK3 receptor [13]. Using a dual immunohistochemical approach on cryostat cut sections, perikarya labeled by the sMCH- or NEI-AS were also labeled by CART monoclonal antibodies (Figure 2E–G). These neurons represented 44.5% of the whole population as compared to 66% in rat (Table 1). By detecting CART, NK3 (immunohistochemistry) and MCH (*in situ* hybridization) on the same sections, all MCH/CART neurons were found to also express NK3, as in rat (Figure 2A–D). No other CART or NK3 neurons could be observed in the caudal LHA. Most of the rostral MCH neurons in the *zona incerta* or medial to the fornix expressed CART/NK3, but most of the lateral and caudal MCH neurons did not. A similar segregation of the two sub-populations was reported in the rat [10].

80% of cortically projecting MCH neurons expressed CART in rat [13]. A retrograde tract tracing experiment was conducted to verify that MCH/CART neurons project in the cerebral cortex in mouse as well. True blue was injected in the dorso-medial cortex (dorsal cingulate/motor fields) of three mice (Figure 3). As expected, many retrogradely labeled neurons were found in the lateral hypothalamus and *zona incerta*. Using dual immunohistochemistry staining on these sections, we found that 60% of retrogradely labeled MCH neurons expressed CART (Table 2). Then, the MCH/CART sub-population takes a larger part of the whole of MCH cortical projections: these neurons represent only 44.5% of the population but 60% of cortically projecting MCH cells. However, the MCH-only cortical projection is not marginal and the balance of MCH (40%) vs MCH/CART (60%) cortical inputs is more equilibrated in mouse than in rat (20% and 80% respectively). Observation of MCH and CART expression in

cortical axons corroborated this result (not illustrated). MCH axons not labeled by the CART antibodies were abundant, while in rat these axons are rare. Furthermore, many CART axons not labeled by MCH- or NEI-AS were observed in mouse. In rat cerebral cortex, CART-positive/MCH-negative axons were very rare [see 10], suggesting an additional origin for the innervations by CART axons in mouse cerebral cortex.

In rat, most spinally projecting MCH cells do not contain CART [10]. Similarly in mouse, double labeled MCH/CART axons in sections through the spinal cord were very rare, suggesting that, as in rat, spinal projections arise mostly from MCH perikarya that do not express CART (not illustrated in mouse), (see 10 for the rat data).

MCH genesis

Past data obtained in rat showed that the whole MCH population is generated over several gestational stages (from embryonic day 10 (E10) to E16, with a peak at E12/E13) (Figure 4A) [12]. This pattern of MCH genesis was compared to the production of the hypocretin/orexin (Hcrt)-containing neurons; these cells co-localize with MCH neurons, project with a similar pattern throughout the brain and are involved in similar functions [6],[16],[17]. In contrast to MCH, these cells are generated in one sharp peak at E12 in the rat [18]. With regard to MCH sub-populations, it seems that MCH, Hcrt and MCH/CART cell bodies are generated in successive waves: the first wave gives rise to spinally projecting MCH neurons at E11, then Hcrt neurons are generated at E12, and MCH/CART neurons are produced slightly later at E12/E13 [12],[14],[18].

A similar BrdU experiment was done in mice to verify if MCH, Hcrt and MCH/CART neurons were generated through a similar pattern. Double labeled MCH/BrdU perikarya were observed in E9 to E14 BrdU injected embryonic sections, but their production peaks at E10 (Figure 4B–D). The distribution of these neurons broadly followed a lateral-to-medial gradient, as already described in rat [12],[19–21]; the overwhelming majority of neurons born before or on E10 were located lateral to an arbitrary vertical line passing through the fornix on coronal sections, while most of those generated later were located medially in the hypothalamus and *zona incerta*. NK3/BrdU double labeled neurons were counted in the tuberal LHA; these cells were generated between E11 and E12, indicating that MCH/CART/NK3 co-expressing neurons are generated later than most MCH only neurons (Figure 4E).

On the same mouse material, close to 80% of all the double labeled Hcrt/BrdU neurons were observed in the E10 material with only a few in E11 animals (Figure 4F).

Differences in the distribution of MCH axons in mouse and rat

In mouse, MCH axons are observed throughout the brain, from the olfactory bulb to the spinal cord, recalling MCH distribution in many species including rat [7]. However, three very clear differences were found compared to the latter species.

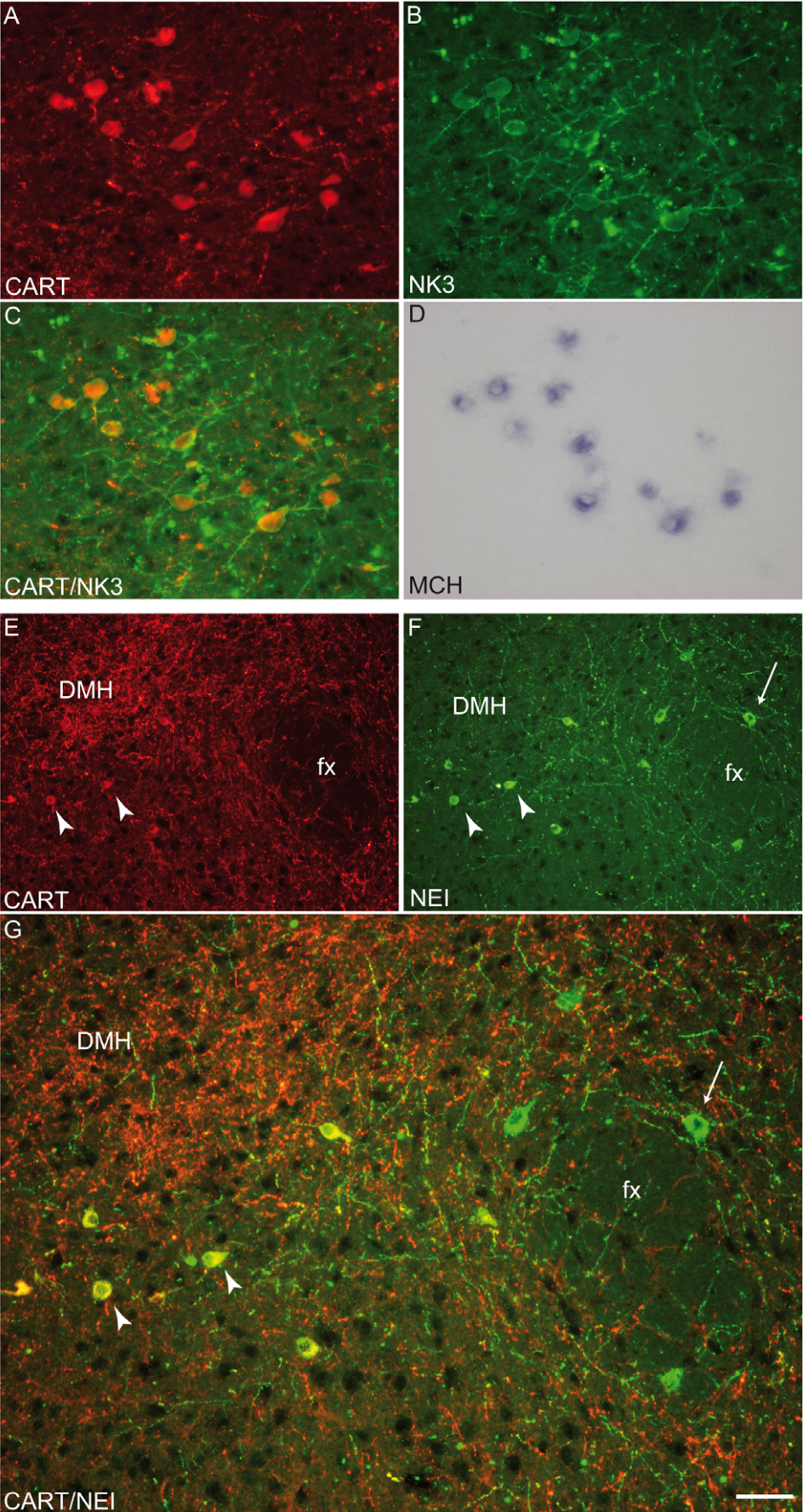


Figure 2. Co-expression of MCH/NEI, CART and NK3. (A–D) Photomicrographs to illustrate the co-expression of NK3 receptor and CART peptide by immunohistochemistry as well as the preproMCH (ppMCH) mRNA using *in situ* hybridization. CART and NK3 were first detected by immunofluorescence (A and B respectively, C). Then, the presence of the ppMCH mRNA in the same cell bodies was verified by *in situ* hybridization (D). All MCH positive neurons that expressed CART also contained NK3. (E–G) Photomicrographs showing NEI/CART (arrowheads) or NEI (arrows) labeled neurons. Most NEI-positive neurons localized medially to the fornix expressed CART. NEI and CART co-expression was less frequent lateral to the fornix (G). DMH: dorsomedial nucleus hypothalamus, fx: fornix. doi:10.1371/journal.pone.0015471.g002

Table 1. CART expression in MCH neurons.

| Mean of number of MCH or NEI cell bodies | % MCH- or NEI-CART/MCH or NEI |
|------------------------------------------|-------------------------------|
| 706 ± 110 | 44,49 ± 5,05 |

Proportion of MCH neurons containing CART in the diencephalon of five mice. Between one and three series were counted for each mouse. Mean ± SD. doi:10.1371/journal.pone.0015471.t001

The most obvious and striking difference concerned the hypothalamus. In the rat, abundant innervations of the ventral part of the arcuate nucleus is found (Figures 5 and 6) [7]. Using dual immunocytochemistry and confocal microscopy, MCH axons appeared to synapse on proopimelanocortin (POMC) cells that were labeled by the CART-AS. Numerous MCH axons were also seen in the adjacent median eminence and pituitary stalk. On our mouse material, a dense terminal field in the arcuate nucleus was never found and the ventromedial hypothalamus as a whole contained only a few axons (Figure 5).

In the pallidum, both medial and lateral parts of the globus pallidus contained a dense MCH innervation in the mouse brain (Figure 7). The lateral part is characterized by the presence of parvalbumin-containing cell bodies in contrast to the medial globus pallidus, which is poor in parvalbumin-expressing cells

Table 2. MCH cells projecting in the mouse cerebral cortex.

| Mice | Mean of MCH-TB neurons ± SD | % MCH+TB neurons which were CART-positive ± SD |
|---------|-----------------------------|------------------------------------------------|
| #31 | 73,33 ± 8,33 | 60,4 ± 7,2 |
| #32 | 101 ± 28,28 | 61,5 ± 13,58 |
| #33 | 48,67 ± 10,26 | 60,7 ± 11,66 |
| % total | - | 60,9 |

Number of MCH neurons retrogradely labeled after true blue injection in the cerebral cortex and, among them, percentage of MCH/CART-positive neurons retrogradely labeled. Two series of section were counted in case 32, and three in cases 31 and 33. doi:10.1371/journal.pone.0015471.t002

[22]. Using a double immunocytochemical approach, MCH axons were observed in the immediate vicinity of parvalbumin cells, suggesting axosomatic synaptic contacts (Figure 7A–C). On the rat material, although both pallidal compartments exist, only the very medial globus pallidus contained a dense MCH input, while lateral parts of the nucleus contained only sparse passing MCH axons (Figure 7D). The subthalamic nucleus, which is anatomically related to the globus pallidus, was intensely innervated by MCH axons in both rat and mouse (Figure 7E).

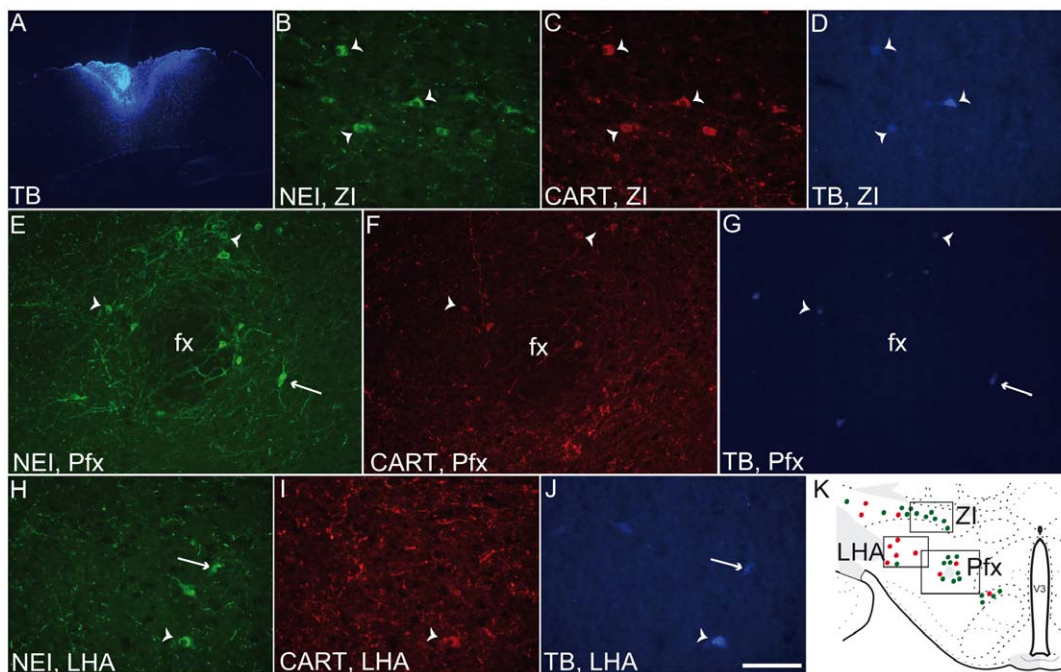


Figure 3. Origin of MCH projections in the mouse cortex. (A) Photomicrograph illustrating a true blue (TB) injection site in the mouse medial cerebral cortex. (B–J) Photomicrographs showing NEI/CART labeled neurons containing true blue (arrowheads) or neurons containing both NEI and true blue but not CART (arrows). Triple labeled cells were abundant in the *zona incerta* (ZI) and medial perifornical regions (Pfx), while double labeled cells were mostly found in the lateral hypothalamic area (LHA). The schem in K shows the localization of the three regions and a schematic distribution of NEI/CART and NEI positive/CART negative neurons represented by green and red dots respectively. fx: fornix, V3: third ventricle. doi:10.1371/journal.pone.0015471.g003

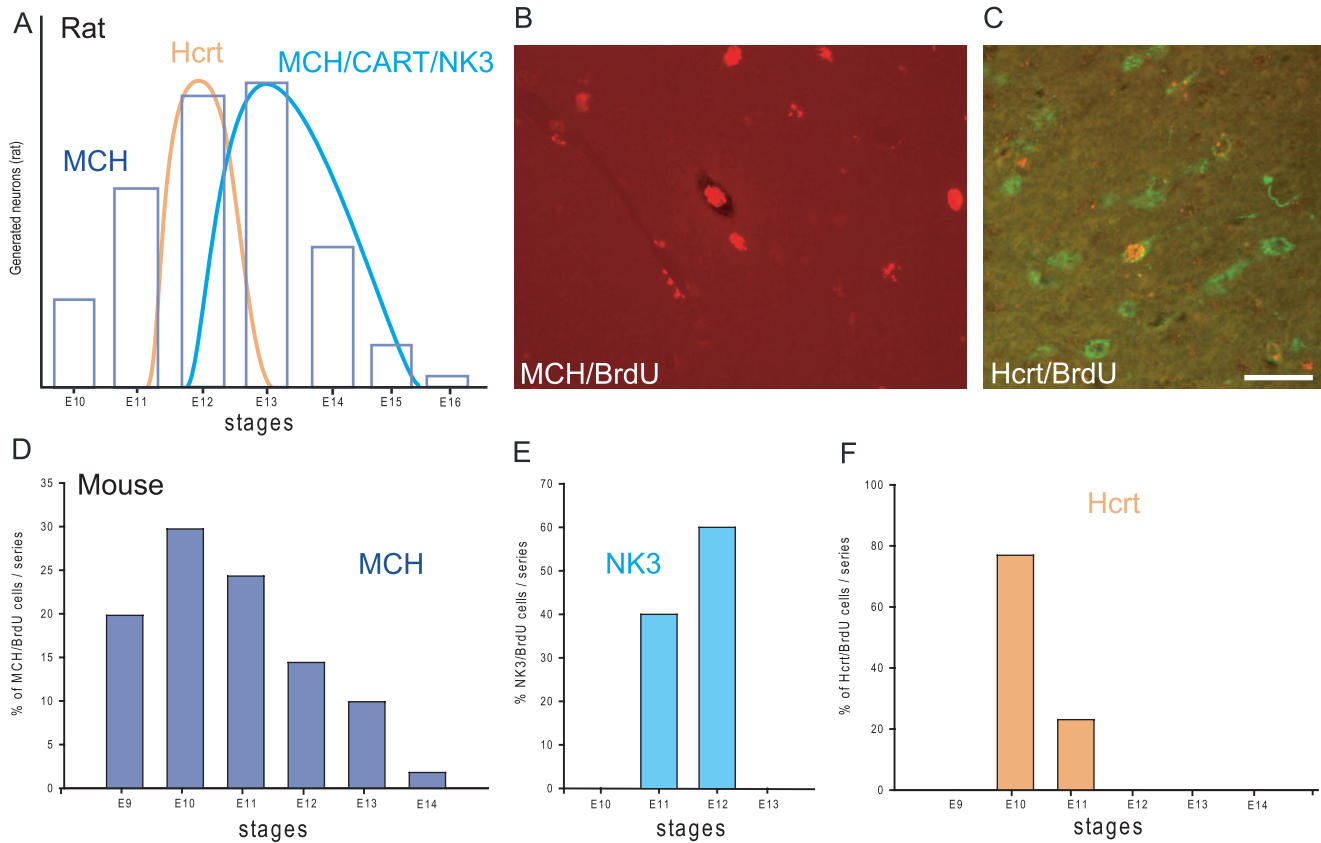


Figure 4. MCH neuron genesis in the mouse hypothalamus. (A) Histogram summarizing precedent findings in the rat concerning the genesis of MCH, MCH/CART/NK3 and Hcrt neurons in the hypothalamus [12],[18]. (B–F) A similar study combining BrdU, immunohistochemistry and *in situ* hybridization was conducted in mouse to compare the birthdates of MCH and Hcrt neurons. (B) Photomicrograph illustrating a neuron double-labeled for BrdU (red immunohistochemistry) and MCH (*in situ* hybridization). (C) Dual immunofluorescence to identify Hcrt (green) and BrdU in the same neurons. Only neurons displaying a densely BrdU-labeled nucleus were taken into consideration. (D–F) Histograms of MCH/BrdU, NK3/BrdU and Hcrt/BrdU neurons. MCH/BrdU positive neurons are seen from E9 to E14, with a peak at E10 (D). NK3/BrdU positive cells in the *zona incerta*/LHA were observed only at E11 and E12 (E). On the same material, double labeled Hcrt/BrdU perikarya were observed mainly at E10 (F). LHA: lateral hypothalamic area. doi:10.1371/journal.pone.0015471.g004

A very abundant MCH projection is especially dense in the dorsal region of the piriform cortex, just dorsal to the lateral olfactory tract. In this region, layer 2 makes an indentation on coronal sections and is thus easy to recognize. In the mouse, a region of the piriform cortex with similar characteristics was identified, but did not contain a MCH terminal field (Figure 8).

Discussion

In both rat and mouse, many MCH cell bodies are observed in the lateral hypothalamic area. These neurons send their axons throughout the brain from the cerebral cortex to the spinal cord [7],[15]. In rat, two MCH sub-populations were described based on CART and NK3 expressions, projection patterns and birthdates [10],[12–14],[23]. In mouse, we find again evidence for the existence of two similar sub-populations: MCH/CART/NK3 cell bodies were observed and these neurons are generated after MCH-only cell bodies (E12 vs E10). However, clear differences were also noticed. In rats MCH/CART/NK3 neurons represent 2/3 of the whole MCH population [12], while in mouse they made up only 44.5% of all MCH neurons. In this latter species, 60% (against 80% in rat; [13]) of MCH cortical projections arise from MCH/CART neurons. Other differences between the rat and mouse MCH systems concerned specific projections in the piriform cortex, globus pallidus and ventromedial hypothalamus.

These anatomical inter-specific particularities indicate that MCH neurons are involved in distinct telencephalic and hypothalamic

networks, which may reflect important functional differences. For example, regardless of the two cell types, we observed in mice a significant innervation of the external part of the globus pallidus and particularly of the lateral pallidal parvalbumin-containing neurons. A similar projection does not exist in rat [7]. Pallidal parvalbumin neurons receive a strong enkephalinerigic striatal input and project to the entopeduncular nucleus and substantia nigra as well as the subthalamic nucleus also innervated by MCH axons in both rat and mouse [22]. These observations suggest that, in addition to its well described action in motivation through connections with ventral striatal circuits and particularly the accumbens nucleus (well described in the literature, [5],[24],[25]), MCH may also be involved in cognitive components of volitional motor behavior in mouse. This may be related to the important locomotor increase reported in MCH^{-/-} and MCHR1^{-/-} mice [1],[26],[27].

Given the strong literature support for a role for MCH in energy homeostasis [3],[28–30], the divergent innervations by MCH axons of the rat and mouse piriform cortex, and, more obviously, of the hypothalamic ventral arcuate nucleus, is important to consider. This part of the arcuate nucleus is rich in POMC/CART neurons that play a key role in feeding [31–33]. This region, including POMC neurons, is intensely innervated by MCH axons in the rat. The latter results suggest a direct control of POMC neurons that may in part account for the recognized orexigenic role of MCH in this species [34]. However, the absence of a clear terminal field in the mouse arcuate nucleus indicates that MCH may not participate in the same way in the control of

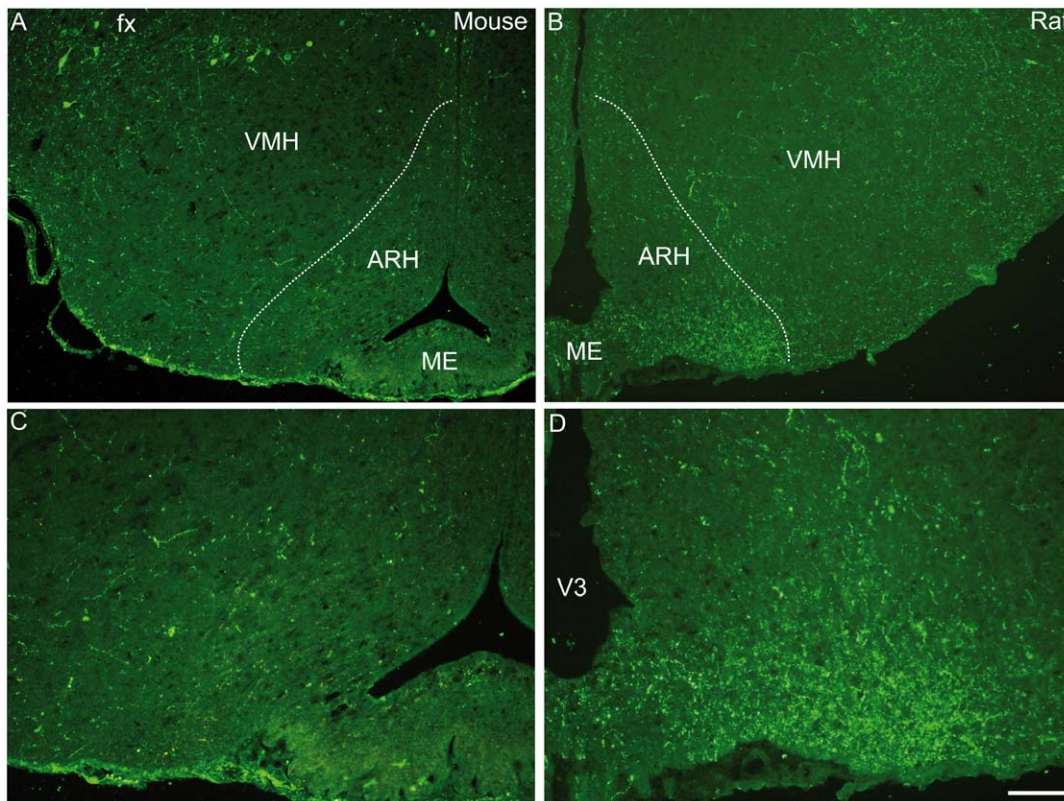


Figure 5. MCH axons in the arcuate nucleus. Photomicrographs illustrating the MCH labeling in the arcuate nucleus (ARH) in mouse (A and B) or rat (C and D) hypothalamus. In mouse, few MCH fibers were observed in the ARH whereas a dense MCH inputs were present in a ventral part of the rat ARH.

doi:10.1371/journal.pone.0015471.g005

POMC neurons in this species. It is very tempting to correlate the absence of MCH arcuate projections with the lack of MCH cell bodies in the PVp. In the rat, dense arcuate projections were never reported after anterograde tract tracing from the LHA [35], rostromedial *zona incerta* [36] and dorsomedial nucleus [37], where MCH neurons are located. Therefore, the PVp appears to be a good candidate because this nucleus is part of the periventricular zone of the hypothalamus, like the arcuate nucleus. Furthermore, the ventral pre-mammillary region sends very dense projections to the arcuate nucleus [38]. Unfortunately, in absence of comparative experimental studies, it is very difficult to draw more definitive conclusions about the functional significance of these inter-specific differences [however see as well 33].

Without any doubt, dissimilarities between rat and mouse MCH systems are related to divergences in their developmental differentiation (Figure 9). In agreement with classical birthdating studies, we observed that neurons settle in the hypothalamus following a lateral to medial gradient in mouse as in rat; first-wave generated neurons lay close to the cerebral peduncle, and lastly produced cells are periventricular [19–21]. In rat, the peak of MCH genesis correlates with the production of MCH/CART/NK3 cell bodies, and is slightly late compared to the peak of Hcrt neuron genesis. In mice we observed that both MCH and Hcrt peaks coincided, but that MCH/CART/NK3 neuron production is still later than Hcrt genesis. We can conclude that compared to Hcrt genesis, the peak of MCH production is a little more precocious in mouse than in rat and MCH/CART neurons are less abundant. A slightly more precocious MCH production could also explain the absence of MCH neurons in the PVp. We know that these neurons are produced last in the rat [12]; maybe MCH

neuron production in mice ends before the differentiation of a MCH cell group in this periventricular nucleus. In the past, we used a specific nomenclature in the rat to identify MCH neuron sub-populations [23]: MCH type A neurons for spinally MCH projecting cells, and MCH type B neurons for MCH/CART cortically projecting cells [13],[14],[23]. We also suspected that, in the rat, the latest produced cells (including those in the PVp), which are never labeled after retrograde injections in the cerebral cortex nor the spinal cord, could be grouped into a MCH type C sub-population [14]. In rat, MCH type B neurons are prominent. In mouse, MCH type A neurons are more abundant, and as their production peak is coincident with the Hcrt peak, they may also project with these neurons in the cerebral cortex. With an early peak of MCH genesis, fewer cells are observed medial to the fornix and MCH type C neurons are rare in this species, with very few MCH projections in the arcuate nucleus.

To conclude, the rat and mouse MCH systems are not identical. Differences exist in the distribution of cell bodies and fibers. Therefore, these neurons are involved through species specific mechanisms in the control of feeding behavior and sleep/wake cycle, and pace of genesis may explain these differences.

Materials and Methods

Animals

All animal use and care protocols were in accordance with institutional guidelines (all protocols were approved and investigators authorized). Long Evans rats ($n = 4$) were obtained from Charles River Laboratories, L'Arbresle, France, Swiss mice ($n = 34$) from Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France.

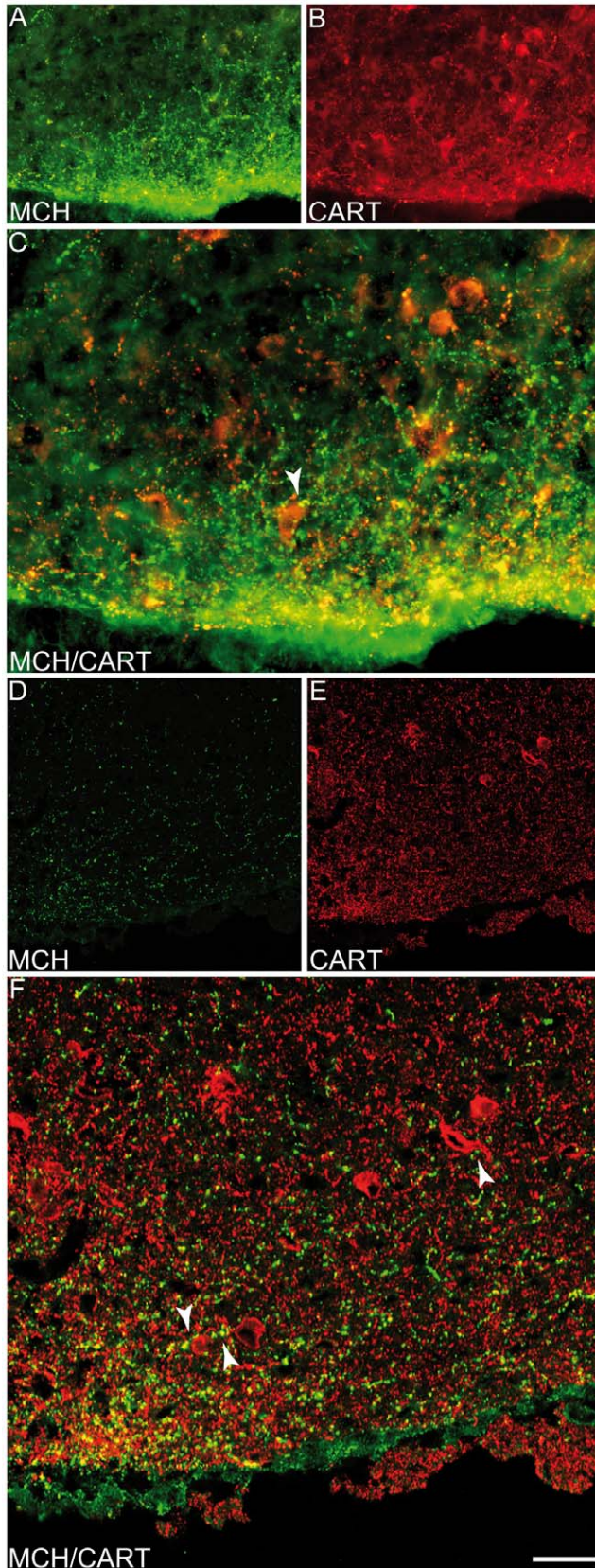


Figure 6. Innervation of POMC neurons by MCH axons. Standard immunofluorescence (A–C) or confocal microscopy (D–F) to illustrate double labeling for CART and MCH in the rat ventral ARH. MCH axons appeared to make synaptic contacts on POMC cells that were labeled by the CART-AS.

doi:10.1371/journal.pone.0015471.g006

Comparative expression of sMCH/rMCH/NEI, CART and NK3

Adult male rats ($n=4$) and mice ($n=10$) were perfused as previously described [12] with NaCl 0.9% followed by ice-cold 1% or 4% paraformaldehyde (PFA) fixative in 0,1 M phosphate buffer. The brains were removed, post-fixed in the same fixative for several hours at 4°C, immersed overnight at 4°C in a 15% sucrose solution, and then quickly frozen. Brains of rats or mice perfused with PFA 1% were serially cut into 10 μ m coronal sections on a cryostat-microtome, mounted on gelatinated slides and stored at -40°C until treatment. Those perfused with PFA 4% were cut in five (rat) and four (mouse) series of 30 μ m coronal thick sections, collected in a cryoprotector solution (1:1:2 glycerol/ethylene glycol/phosphate buffered saline or PBS) and stored at -20°C .

Immunohistochemistry

After rinsing in PBS+0.3% Triton X100, sections were incubated with the primary antiserum (AS), at the appropriate dilution, overnight or during 24 h at room temperature for cryostat sections and free-floating sections, respectively (see Table 3; [39]). The labeling was then revealed with secondary donkey anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor-555 (1/800 or 1/1000, Invitrogen) or a goat anti-rabbit IgG conjugated Alexa Fluor-488 (1/800 or 1/1000, Invitrogen) for 1 h at room temperature. All antisera were diluted in PBS containing 0.3% Triton X100, 1% bovine serum albumine, 10% lactoproteins and 0.01% sodium azide except for monoclonal antibodies which were diluted only in a PBS-Triton solution [10].

In situ hybridization

The preproMCH (ppMCH) RNA probe was made in our laboratory [12]. The rat MCH cDNA was obtained by reverse transcription/polymerase chain reaction from total RNA of adult rat brain following a protocol described by Brischox et al. [12]. The antisense (complementary to cellular mRNA) and control sense (identical to cellular mRNA) probes were produced by using the RNA transcription kit (Roche) and were digoxigenin (DIG)-UTP-labeled.

Standard *in situ* hybridization: frozen sections were post-fixed in 4% paraformaldehyde in 0,1 M phosphate buffer and digested with proteinase K (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Roche) for 30 min at 37°C. Slides were incubated for 8 min in 0.1 M triethanolamine (TEA), pH 8.0, and then for 5 min at room temperature in 100 mL 0.1 M triethanolamine (TEA)+500 μL acetic anhydride followed by a decarboxylation in active diethyl pyrocarbonate (DEPC).

Sections were then rinsed briefly with $5\times$ SSC (standard citrate sodium buffer) then incubated for 2 h in prehybridization buffer at 56°C. After rinsing in $0,2\times$ SSC, the sections were incubated overnight at 56°C for MCH, in humid chambers, with 50 μL hybridization buffer containing 5% Denhardt's and 50 ng labeled RNA probes. After rinsing with $5\times$ SSC, sections were incubated successively in $0,2\times$ SSC at 56°C (1 h30) and $0,2\times$ at room temperature (5 min). They were incubated in anti-DIG Fab fragments conjugated to alkaline phosphatase (1/1300, overnight) and revealed with enzyme substrate NBT-BCIP (overnight, at room temperature).

Control hybridization, including hybridization with sense DIG-labeled riboprobes was realized.

Co-detection of CART, NK3 or Parvalbumin (Parv) and MCH or NEI. A regular double indirect immunofluorescence with different fluorochroms was performed for co-detection of CART/sMCH or NEI, parvalbumine/sMCH or NEI. Sections

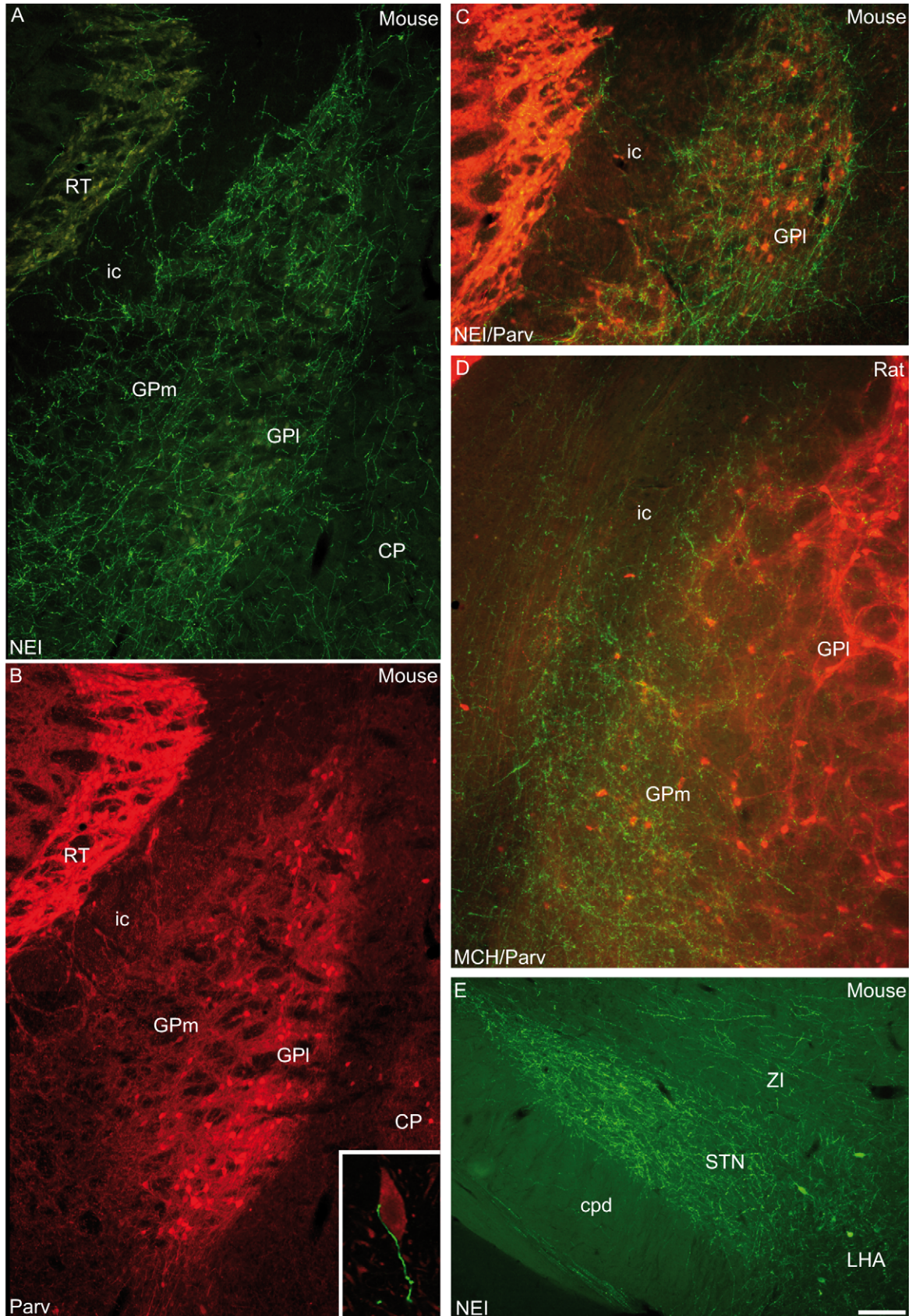


Figure 7. MCH axons in the Globus Pallidus. (A–C) Photomicrographs to illustrate the MCH innervation of the mouse globus pallidus (GP). MCH axons labeled by the NEI-AS (A) or sMCH-AS (C, green labeling) are observed throughout the nucleus. Medial (GPm) and lateral (GPI) parts are innervated. GPm contains few parvalbumine (Parv)-containing cell bodies, while GPI contains many such neurons (B, red labeling in C). MCH axons are seen close to Parv neurons in the GPI; insert in B is a confocal image showing a MCH axon (green) innervating a Parv perikarya (red). (D) Double labeling for MCH/Parv in rat globus pallidus. Only medial regions of the GP were innervated by MCH fibers, while lateral parts of the nucleus do not contain a MCH innervation. (E) Photomicrograph showing intense NEI innervations of the mouse subthalamic nucleus (STN). doi:10.1371/journal.pone.0015471.g007

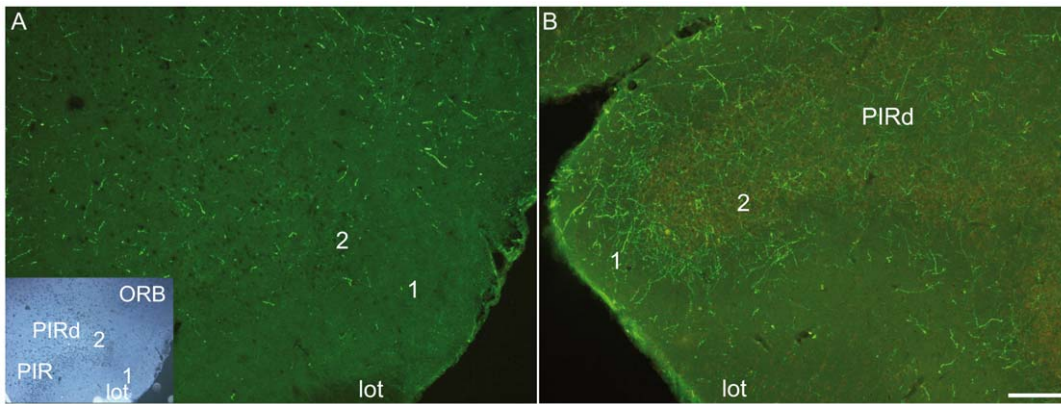


Figure 8. MCH axons in the piriform cortex. Photomicrographs illustrating the MCH innervation of the piriform cortex (PIR) in mouse (A) and in rat (B). Insert in A is a darkfield view of the same section for cytoarchitectonic purposes. The indentation of this cortical field just dorsal to the lateral olfactory tract (lot) is very clear. In rat, many MCH fibers are observed in layers 1 and 2 of the dorsal piriform area, whereas very few are seen in mouse. PIR: piriform cortical field, PIRd: dorsal region of the piriform area, ORB: orbital area.
doi:10.1371/journal.pone.0015471.g008

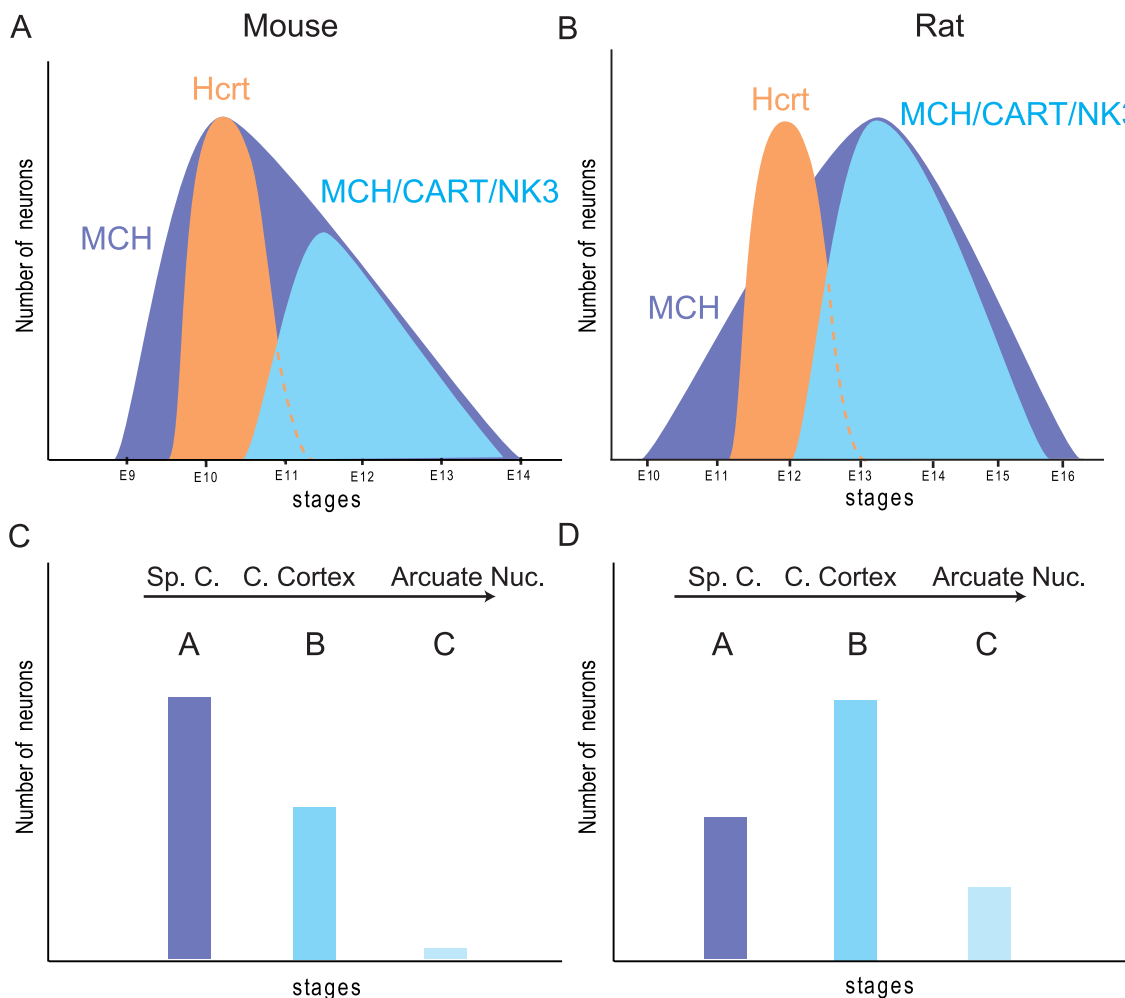


Figure 9. Diagrams summarizing differences between rat and mouse MCH systems. Summary diagrams to compare the genesis of MCH, Hcrt neuron populations and MCH/CART/NK3 sub-population. In mouse (A), both peaks of MCH and Hcrt production are at E10. MCH/CART/NK3 neurons are generated after E10 and constitute less than half of the whole MCH population. In rat (B), the peak of MCH production is late compared to the peak of Hcrt genesis, and in this species MCH/CART/NK3 neurons form 2/3 of the whole MCH population. It can be hypothesized that these different patterns of genesis have an impact on the organization of the MCH neuron system in the two species: in mouse (C), MCH type A neurons are preminent compared to MCH type B neurons. On the contrary, MCH type B neurons are better represented in rat (D), and a group of lastly generated cells with a periventricular distribution and projections in the arcuate nucleus (MCH type C neurons) can be observed. This last group is lacking in mouse.
doi:10.1371/journal.pone.0015471.g009

Table 3. Antibodies used for immunohistochemistry.

| Antibodies | Species | Antigen | Source | Dilution (cryostat sections) | Dilution (free-floating sections) |
|-------------|---------|-------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| sMCH | Rabbit | Salmon MCH | EA3922 [39] | 1/200 | 1/2000 |
| rMCH | Rabbit | Rat MCH | EA3922 [39] | 1/200 | - |
| NEI | Rabbit | Rat NEI | EA3922 [39] | 1/200 | 1/2000 |
| CART | Mouse | Rat CART | Dr Clausen, Denmark | 1/1000 | 1/4000 |
| CART | Rabbit | CART (61–102) | Phoenix Pharmaceuticals, USA | 1/3000 | - |
| Parvalbumin | Mouse | Human parvalbumin | Swant, Suisse | 1/5000 | 1/10000 |

The specificity of the salmon MCH-AS was verified by liquid phase inhibition, dot blot, and immuno-affinity [42],[39] as well as by immunohistochemistry/*in situ* hybridization double labeling [43],[44]. The monoclonal CART-AS was generously provided by Dr Clausen (see acknowledgements).
doi:10.1371/journal.pone.0015471.t003

were first incubated with the first primary antibody and revealed following the same conditions as described earlier, and then incubated with the second primary antibody and revealed with a secondary antibody (goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor-488 (1/800, Invitrogen) for MCH and NEI and with a secondary goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor-488 (1/800, Invitrogen) for CART and Parv). Double labeled MCH or NEI/CART neurons were counted on 1 to 3 series per brain of 5 brains.

A triple labeling was performed for the detection of NK3/CART/MCH, through the following procedures. CART and NK3 neurons were detected both by indirect immunofluorescence using, respectively, a secondary donkey anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor-555 and a secondary goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor-488, then MCH was detected by *in situ* hybridization (see above).

Tracer injections

Mouse adult male (40 g, n = 3) were anaesthetized with an intraperitoneal (IP) injection of a mixture of xylazine and ketamine (1 mg/100 g of body weight and 10 mg/100 g, respectively) and placed in a stereotaxic instrument. About 300 nL of a 4% true blue (Sigma) solution in distilled water was injected with a Exmire microsyringe (MS-N05, ITO corporation, Italy) into medial cerebral cortical fields over a period of 15 min. Four days after the true blue injections, animals received an intraperitoneal injection (IP) of 7% chloral hydrate and were perfused as described above.

BrdU injections

Six pregnant Swiss mice (at stages E9 to E14) were given an IP injection of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU; Sigma, France; 100 mg/kg body weight, dissolved in 0.07 M NaOH and warmed to 65°C, [40]). Young adult male offspring (n = 21) of the BrdU-injected females were anaesthetized with an IP of 7% chloral hydrate (1 ml per 200 g body weight, Prolabo). They were then perfused with 1% PFA as described above.

For the combined detection of BrdU and MCH, Hcrt or NK3, an acid hydrolysis was first performed. Double immunofluorescence staining was then done as previously described [12]. This

study was accomplished by combining BrdU immunohistochemistry and MCH *in situ* hybridization or Hcrt immunohistochemistry. The *in situ* hybridization was done first as described followed by the BrdU detection. Double labeled MCH/BrdU neurons were counted on 6 to 9 series per brain of 2 or 3 brains per stage, double labeled Hcrt/BrdU neurons were counted on 5 to 11 series per brain of 2 to 4 brains per stage and double labeled NK3/BrdU neurons were counted on 2 to 5 series per brain of 1 to 3 brains per stage.

Cytoarchitecture and nomenclature

Sections were analyzed on an Olympus fluorescence microscope BX51 or an Olympus confocal microscope Fluoview FV1000 BX configuration. Images were obtained through a DP50 or DP75 numeric camera (Olympus, France), using the analySIS software or Fluoview FV1000 (Olympus, France).

Anatomical structures were identified according to Swanson [41]. Hahn [15] provided the most detailed description of the rat MCH perikarya distribution in the hypothalamus yet. Bittencourt et al. [7] provided the best description of MCH projections. We are making frequent references to these works. We choose to use a matching hypothalamic divisions and nomenclature in both rat and mouse. A careful examination of Nissl stained sections of mouse hypothalami corroborated that the Swanson's 1998 nomenclature could apply to the division of mouse hypothalamus, particularly at caudal hypothalamic levels for the identification of the posterior periventricular nucleus (PVP) [41].

Acknowledgments

The authors thank Dr Clausen for the gift of monoclonal anti-CART antibodies. We also thank Dr Nicole Legrand for her valuable editorial corrections.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SC PYR. Performed the experiments: SC GFB FP CC ALR. Analyzed the data: SC PYR. Contributed reagents/materials/analysis tools: SC GFB FP CC ALR. Wrote the paper: SC PYR.

References

- Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E (1998) Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396: 670–674.
- Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, et al. (2001) Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 107: 379–386.
- Griffond B, Baker BI (2002) Cell and molecular cell biology of melanin-concentrating hormone. *Int Rev Cytol* 213: 233–277.
- Hanriot L, Camargo N, Courau AC, Leger L, Luppi PH, et al. (2007) Characterization of the melanin-concentrating hormone neurons activated during paradoxical sleep hypersomnia in rats. *J Comp Neurol* 505: 147–157.

5. Chung S, Hopf FW, Nagasaki H, Li CY, Belluzzi JD, et al. (2009) The melanin-concentrating hormone system modulates cocaine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6772–6777.
6. Hassani OK, Lee MG, Jones BE (2009) Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2418–2422.
7. Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, et al. (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 319: 218–245.
8. Skofitsch G, Jacobowitz DM, Zamir N (1985) Immunohistochemical localization of melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain Res Bull* 15: 635–649.
9. Zamir N, Skofitsch G, Bannon MJ, Jacobowitz DM (1986) Melanin-concentrating hormone: unique peptide neuronal system in the rat brain and pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 1528–1531.
10. Cvetkovic V, Brischoux F, Jacquemard C, Fellmann D, Griffond B, et al. (2004) Characterization of subpopulations of neurons producing melanin-concentrating hormone in the rat ventral diencephalon. *J Neurochem* 91: 911–919.
11. Rao Y, Lu M, Ge F, Marsh DJ, Qian S, et al. (2008) Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. *J Neurosci* 28: 9101–9110.
12. Brischoux F, Fellmann D, Risold PY (2001) Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic ‘MCH area’ hypothesis. *Eur J Neurosci* 13: 1733–1744.
13. Brischoux F, Cvetkovic V, Griffond B, Fellmann D, Risold PY (2002) Time of genesis determines projection and neurokinin-3 expression patterns of diencephalic neurons containing melanin-concentrating hormone. *Eur J Neurosci* 16: 1672–1680.
14. Risold PY, Croizier S, Legagneux K, Brischoux F, Fellmann D, et al. (2009) The development of the MCH system. *Peptides* 30: 1969–1972.
15. Hahn JD (2010) Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin peptide expression patterns in a current parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci Lett* 468: 12–17.
16. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, et al. (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18: 9996–10015.
17. Swanson LW, Sanchez-Watts G, Watts AG (2005) Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci Lett* 387: 80–84.
18. Amiot C, Brischoux F, Colard C, La Roche A, Fellmann D, et al. (2005) Hypocretin/orexin-containing neurons are produced in one sharp peak in the developing ventral diencephalon. *Eur J Neurosci* 22: 531–534.
19. Altman J, Bayer SA (1978a) Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J Comp Neurol* 182: 973–993.
20. Altman J, Bayer SA (1978b) Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 182: 945–971.
21. Altman J, Bayer SA (1986) The development of the rat hypothalamus. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 100: 1–178.
22. Gerfen C, Wilson C (1996) The basal ganglia. In: *Handbook of chemical neuroanatomy Integrated systems of the CNS, Part III*. Swanson L, Björklund A, Hökfelt T, eds. Elsevier Science B.V. ed. pp 371–468.
23. Cvetkovic V, Brischoux F, Griffond B, Bernard G, Jacquemard C, et al. (2003) Evidence of melanin-concentrating hormone-containing neurons supplying both cortical and neuroendocrine projections. *Neuroscience* 116: 31–35.
24. Smith DG, Tzavara ET, Shaw J, Luecke S, Wade M, et al. (2005) Mesolimbic dopamine super-sensitivity in melanin-concentrating hormone-1 receptor-deficient mice. *J Neurosci* 25: 914–922.
25. Marsteller DA, Gerald CP, Kong R, Cajina M, Craig DA, et al. (2009) The MCH1 receptor antagonist SNAP 94847 induces sensitivity to dopamine D2/D3 receptor agonists in rats and mice. *Eur J Pharmacol* 602: 66–72.
26. Chen Y, Hu C, Hsu CK, Zhang Q, Bi C, et al. (2002) Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology* 143: 2469–2477.
27. Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, et al. (2002) Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3240–3245.
28. van den Pol AN, Acuna-Goycolea C, Clark KR, Ghosh PK (2004) Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron* 42: 635–652.
29. Li Y, van den Pol AN (2009) Enhanced excitatory input to melanin concentrating hormone neurons during developmental period of high food intake is mediated by GABA. *J Neurosci* 29: 15195–15204.
30. Pissios P (2009) Animals models of MCH function and what they can tell us about its role in energy balance. *Peptides* 30: 2040–2044.
31. Broberger C (1999) Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* 848: 101–113.
32. Vrang N, Larsen PJ, Clausen JT, Kristensen P (1999) Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci* 19: RC5.
33. Griffond B, Risold PY (2009) MCH and feeding behavior-interaction with peptidic network. *Peptides* 30: 2045–2051.
34. Abbott CR, Kennedy AR, Wren AM, Rossi M, Murphy KG, et al. (2003) Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. *Endocrinology* 144: 3943–3949.
35. Hahn JD, Swanson LW (2010) Distinct patterns of neuronal inputs and outputs of the juxtavaricellar and suprafontal regions of the lateral hypothalamic area in the male rat. *Brain Res Rev* 64: 14–103.
36. Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC (2007) Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. *Neuroscience* 148: 949–969.
37. Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW (1996) Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 376: 143–173.
38. Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1992) Projections of the ventral premammillary nucleus. *J Comp Neurol* 324: 195–212.
39. Risold PY, Fellmann D, Rivier J, Vale W, Bugnon C (1992) Immunoreactivities for antisera to three putative neuropeptides of the rat melanin-concentrating hormone precursor are coexpressed in neurons of the rat lateral dorsal hypothalamus. *Neurosci Lett* 136: 145–149.
40. Markakis EA, Swanson LW (1997) Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system. *Brain Res Brain Res Rev* 24: 255–291.
41. Swanson LW (1998) *Brain Maps: Structure of the Rat Brain Second Revised Edition*: Elsevier Science B.V.
42. Fellmann D, Bugnon C, Risold PY (1987) Unrelated peptide immunoreactivities coexist in neurons of the rat lateral dorsal hypothalamus: human growth hormone-releasing factor1-37-, salmon melanin-concentrating hormone- and alpha-melanotropin-like substances. *Neurosci Lett* 74: 275–280.
43. Fellmann D, Bresson JL, Breton C, Bahjaoui M, Rouillon A, et al. (1989) Cloning of cDNAs encoding a rat neuropeptide immunologically related to salmon melanin-concentrating hormone. *Neurosci Lett* 106: 23–28.
44. Bugnon C, Bahjaoui M, Fellmann D (1991) A simple method for coupling in situ hybridization and immunocytochemistry: application to the study of peptidergic neurons. *J Histochem Cytochem* 39: 859–862.

Neurons expressing melanin-concentrating hormone (MCH) are observed in the vertebrate posterior hypothalamus, from lampreys to humans. These neurons are involved in various functions such as sleep / wake cycle or food intake. They form a non-homogeneous population and at least two sub-populations are identified in the rat. The first sub-population is composed of neurons born on the 11th embryonic day (E11) that project heavily on posterior regions of the central nervous system. The second is characterized by neurons born at E12/E13, projecting in anterior regions of the brain and expressing the peptide CART (cocaine and amphetamine Regulated transcript) and the NK 3 receptor (neurokinin). The aim of this study was to understand the origin of these two sub-populations. For this, we used histological, molecular and *in vitro* approaches. MCH neurons are among the first neurons to be born and to differentiate their chemical phenotype along a longitudinal region defined by intense proliferation and called 'cell cord' by Keyser in 1972. This longitudinal band is characterized by the expression of genes such as Sonic Hedgehog (Shh), Nkx2.1, Nkx2.2 and was recently named 'diagonal intrahypothalamica' or ID. Differentiation of MCH neurons depends on expression of the morphogenetic factor Shh and these neurons express Nkx2.1 and Nkx2.2, transcription factors upregulated by Shh. The neurons of the first sub-population send projections along the *tractus postopticus* (*tpoc*), which is the first longitudinal tract to develop. Neurons of the second sub-population differentiate concomitantly to the development of the basal forebrain and their projections innervate anterior brain regions. Our results obtained *in vitro* showed that Netrin1 attracts MCH axons and that this response is mediated by DCC. Slit2 repulses MCH axons and this response is mediated by the Robo2 receptor. Overall, our study of the development of the MCH system shed light on an organizational change in the longitudinal axis of the forebrain during early development: a primary longitudinal organization characterized by the longitudinal expression of Shh and Nkx2.2 and the path of the *tractus postopticus* in the diencephalon and mesencephalon. MCH neurons of the first sub-population develop during this stage. Then, as the basal telencephalon extends and expresses Netrin1, the medial forebrain bundle differentiates, inducing a change in the main axis of the forebrain; meanwhile MCH neurons of the second sub-population appear. MCH sub-populations reflect distinct developmental stages of the forebrain.

Les neurones exprimant l'hormone de mélano-concentration (MCH) sont observés dans l'hypothalamus postérieur de tous les vertébrés, de la lamproie à l'Homme. Ces neurones sont impliqués dans diverses fonctions comme le cycle veille/sommeil ou la prise alimentaire. Ils forment une population non homogène et au moins deux sous-populations sont reconnues, chez le rat. La première sous-population est composée de neurones nés au 11^{ème} jour de vie embryonnaire (E11) qui projettent massivement sur les régions les plus postérieures du système nerveux central. La seconde est générée à E12/E13 et les neurones la caractérisant projettent sur les régions les plus antérieures du cerveau et expriment le peptide CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) et le récepteur NK3 (neurokinine). L'objectif de notre travail était de comprendre l'origine de ces deux sous-populations. Pour cela, nous avons utilisé des approches histologiques, moléculaires et *in vitro*. Les neurones à MCH sont parmi les premiers neurones à naître et à différencier leur phénotype chimique le long d'une région longitudinale définie par une prolifération intense, appelée 'cell cord' par Keyser en 1972. Cette bande longitudinale est caractérisée par l'expression de gènes comme Sonic Hedgehog (Shh), Nkx2.1, Nkx2.2 et a été récemment renommée 'diagonale intrahypothalamica' ou ID. La différenciation des neurones à MCH dépend de l'expression du facteur morphogène Shh et ces neurones expriment Nkx2.1 et Nkx2.2, facteurs de transcription régulés positivement par Shh. Les neurones de la première sous-population envoient des projections le long du premier tractus longitudinal à se mettre en place, le *tractus postopticus* (*tpoc*). Ceux issus de la deuxième sous-population se différencient concomitamment au développement des régions télencéphaliques et leurs projections changent de direction pour innervier les régions antérieures du cerveau sous la dépendance de protéines de guidage axonal, Nértrine1 et Slit2. Nértrine1 permet d'attirer les axones MCH exprimant le récepteur DCC précocement vers la moelle épinière et plus tardivement vers le télencéphale alors que Slit2 contraint les axones MCH exprimant le récepteur Robo2 à sortir de l'hypothalamus. L'étude du modèle 'MCH' permet de mettre en lumière un changement d'organisation précocement au cours du développement dans l'axe longitudinal du prosencéphale. La bande longitudinale d'expression des facteurs de transcription Shh, Nkx2.2 peut être perçue comme une extension rostrale de la colonne neurogénique médiane déjà décrite chez des espèces d'invertébrés possédant une symétrie bilatérale. Les neurones générés le long de cette colonne le sont très tôt au cours du développement.