# Fonction du facteur de choc thermique HSF2 dans les processus de prolifération, de survie et de différenciation au cours du développement du système nerveux central

Diane Trouillet

▶ **To cite this version:**

Diane Trouillet. Fonction du facteur de choc thermique HSF2 dans les processus de prolifération, de survie et de différenciation au cours du développement du système nerveux central. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : 2007PA066518 . tel-00811409

**HAL Id: tel-00811409**
**https://theses.hal.science/tel-00811409**

Submitted on 10 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 PIERRE & MARIE CURIE
LA SCIENCE A PARIS

**THÈSE DE DOCTORAT DE**
**L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

*Spécialité*
Biologie Moléculaire et Cellulaire

*Présentée par*
**Diane TROUILLET**

*Pour obtenir le grade de*
Docteur de l'université Pierre et Marie Curie

*Sujet de la thèse*

# Fonction du facteur de choc thermique HSF2 dans les processus de prolifération, de survie et de différenciation au cours du développement du système nerveux central

*Soutenue le 20 décembre 2007*

*Devant le jury composé de* :

| | |
|---|---|
| Mme Valérie MEZGER-LALLEMAND | *Directrice de thèse* |
| Mme Elisabeth CHRISTIANS | *Rapporteur* |
| Mme Alessandra PIERANI | *Rapporteur* |
| M. Michel MORANGE | *Examinateur* |
| M. Yann BASSAGLIA | *Examinateur* |
| M. Alain TREMBLEAU | *Président* |

# THÈSE de DOCTORAT

DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

**Diane TROUILLET**

---

# Fonction du facteur de choc thermique HSF2 dans les processus de prolifération, de survie et de différenciation au cours du développement du système nerveux central

---

*À mes parents, Axel, Line...*

*À Manolo.*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance et toute ma gratitude à Valérie Mezger, qui a eu la lourde tâche d'encadrer cette thèse et de relire mon manuscrit ; ses conseils avisés et ses critiques constructives m'ont été d'une grande aide dans la progression de mon travail. Sans compter tous ces moments agréables qui ont fait de ces années de travail un moment inoubliable.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Michel Morange qui a eu la gentillesse de m'accueillir dans son laboratoire.

Je remercie très vivement Alain Trembleau d'avoir accepté de présider ce jury, ainsi que Elisabeth Christians et Alessandra Pierani d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je les remercie ainsi que Yann Bassaglia d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Et bien sur, je remercie mes collaborateurs(trices) et amis(es) du département de Biologie, je leur suis redevable d'un point de vue humain et scientifique pour leur soutien, leur gentillesse, leurs conseils...

Merci à Sophie, ma coach préférée !

Un grand merci à toi, p'tit loup !

# Table des matières

**Introduction générale** **1**

**I Introduction** **5**

**1 Les facteurs de choc thermique, exemple de HSF2** **7**
1.1 Les facteurs de transcription de choc thermique . . . . . 7
1.1.1 Historique des HSF . . . . . 7
1.1.2 Les HSF des Vertébrés . . . . . 13
1.1.3 Structure des HSF . . . . . 16
1.2 HSF, régulateurs transcriptionnels . . . . . 24
1.2.1 Les séquences régulatrices HSE . . . . . 24
1.2.2 Régulation de l'activité des HSF . . . . . 27
1.2.3 L'activation des HSF . . . . . 31
1.2.4 Régulation transcriptionnelle . . . . . 33
1.3 Fonctions des HSF . . . . . 37
1.3.1 En condition de stress . . . . . 37
1.3.2 En conditions physiologiques . . . . . 39
1.4 HSF2 au cours de la formation du système nerveux . . . . . 49
1.4.1 Dans les stades précoces de développement . . . . . 49
1.4.2 Dans le système nerveux central . . . . . 50
1.5 Conclusion . . . . . 54

**2 Le développement du cortex cérébral** **57**
2.1 Formation et régionalisation du système nerveux central . . . . . 57
2.1.1 Formation et régionalisation du tube neural . . . . . 57
2.1.2 Régionalisation du télencéphale . . . . . 64
2.1.3 Régionalisation du cortex cérébral . . . . . 66
2.2 Prolifération des cellules corticales . . . . . 73
2.2.1 Les cellules souches neurales et les progéniteurs neuraux . . . . . 73
2.2.2 Les zones prolifératives du cortex des Mammifères . . . . . 76
2.2.3 Spécification des cellules corticales . . . . . 78
2.2.4 Mécanismes moléculaires de spécification . . . . . 83
2.3 La migration des neurones du cortex cérébral . . . . . 88
2.3.1 La migration radiaire . . . . . 89
2.3.2 La migration tangentielle . . . . . 91

2.3.3 Les défauts de migration radiaire . . . . . 91
2.4 Dynamique d'expression de HSF2 au cours de la corticogenèse . . . . . 101

**II Résultats 107**

**1 Analyse des souris *Knock-out* pour le gène *Hsf2* 111**
1.1 HSF2 intervient au cours de la migration des précurseurs corticaux . . . . 111
1.1.1 **Article 1 : Chang *et al.*, 2006** . . . . . 113
1.1.2 Discussion et perspectives . . . . . 115

**2 Analyse des embryons de poulet surexprimant le gène *Hsf2* murin 125**
2.1 Surexpression de HSF2 par électroporation *in ovo* . . . . . 125
2.1.1 Article 2, Trouillet *et la.*, manuscrit en révision à *Cell Stress and Chaperones* . . . . . 126
2.1.2 Discussion et perspectives . . . . . 127
2.2 HSF2 modulerait la prolifération dans le tube neural chez le poulet . . . . 131
2.2.1 Article 3 : Trouillet, Tully et Mezger, manuscrit en préparation . . . 131
2.2.2 Discussion et perspectives . . . . . 133

**3 Implication du facteur HSF2 dans la prolifération et la différenciation 135**
3.1 Article 4, Trouillet *et al.*, manuscrit en préparation . . . . . 136

**4 Recherche de nouveaux gènes cibles de HSF2 137**
4.1 Principe des puces à ADN et stratégie expérimentale . . . . . 137
4.2 Résultats préliminaires . . . . . 138
4.2.1 Gènes impliqués dans la neurogenèse et la gliogenèse . . . . . 139
4.2.2 Gènes impliqués dans la migration et la dynamique des microtubules 139
4.2.3 Gènes impliqués au cours du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN140
4.3 Autres données générées par des puces... . . . . 140
4.4 Limites et conclusion . . . . . 141

**III Discussion 143**
1 Intérêt des modèles utilisés et des stratégies employées . . . . . 145
1.1 Modèles . . . . . 145
1.2 Sévérité et variabilité du phénotype *Hsf2*$^{-/-}$ . . . . . 146
1.3 Stratégies . . . . . 148
2 HSF2 est impliqué au cours de la migration des neurones . . . . . 149
2.1 Origine des défauts de migration . . . . . 149
2.2 Le gène *p35* est une cible directe de HSF2 . . . . . 151
2.3 D'autres cibles ? . . . . . 153
2.4 Fonction potentielle de HSF2 dans la plaque corticale . . . . . 154
3 Fonction de HSF2 dans la prolifération, la survie et la différenciation des NSC/NP . . . . . 155
3.1 HSF2, marqueur d'une sous-population de NSC/NP ? . . . . . 155

3.2 HSF2 est impliqué dans la prolifération et la différenciation . . . . . 157
4 HSF et la spécification des neurones corticaux ? . . . . . 160

**Bibliographie** **163**

**A Cellules souches et progéniteurs neuraux du SNC** **207**
A.1 Définition d'une cellule souche . . . . . 207
A.2 Cellule souche, progéniteur, précurseur . . . . . 208
A.3 Concepts de déterminisme, de spécification et de différenciation cellulaire . 210

**B Revues** **213**

## Abréviations

ADN acide désoxyribonucléique
ADP, ATP *adenosine di/triphosphate*
A-P antéro-postérieur
ApoER Apolipoprotein E Receptor 2
ASPM *Abnormal Spindle Like Microcephaly Associated*
BLBP *Brain Lipid Binding Protein*
BMP *Bone Morphogenetic Protein*
BrdU *BromodésoxyUridine*
CBP *CREB Binding Protein*
CDK *Cyclin-Dependent Kinase*
ChIP *Chromatine Immunoprécipitation*
CNR *Cadherin Neural related*
CNTF *Ciliary Neurotrophic Factor*
CP plaque corticale
CTD *C-Terminal Domain*
CTR *Carboxy Terminal Region*
DAB1 *Disabled 1*
DBD *DNA Binding protein Domain*
DNMT *DNA Methyl Transferase*
D-V *dorso-ventral*
e.g. *exempli gratia*
EC cellules de carcinomes embryonnaires
EF-1$\alpha$ *Elongation Factor-1 alpha*
EGF *Epidermal Growth Factor*
EGL éminences ganglionnaires latérales
EGM éminences ganglionnaires médianes
EMSA *Electrophoretic Mobility Shift Assay*
ES cellules souches embryonnaires
et al. *et alii*
etc. *et cetera desunt*
FACS *Fluorescence Activated Cell Sorter*
FGF *Fibroblast Growth Factor*
GABA *Gamma-aminobutyric acid*
GDP, GTP guanosine di/triphosphate
GFAP *Glial Fibrillary Acidic Protein*
GFP *Green Fluorescent Protein*
GLAST *Glutamate Astrocytes Specific Transporter*
HAT *Histones AcetylTransferase*
HH Hamburger et Hamilton
HNF-3 *Hepatocyte Nuclear Factor-3*
HR *Hydrophobic Region*
HSE *Heat Shock Element*
HSF *Heat Shock Factor*

HSP *Heat Shock Protein*
HSR *Heat Shock Response*
HTH hélice tour hélice
i.e. *id est*
IGF *Insulin Growth Factor*
KO *knock-out*
MAP *Microtubules Associated Protein*
MEC Matrice extra-cellulaire
MTOC *Microtubule Organising Center*
MZ zone marginale
NGN Neurogenin
NLS *Nuclear Localisation Signal*
NP *Neural Progenitor*
NRSF REST *Neuron Restrictive Silencer Factor*
NSC *Neural Stem Cell*
NUDE *Nucleokinesis Defective*
NUDEL *Nucleokinesis Defect-Like*
PAF *Platelet Activating Factor*
PAX6 *Paired box gene 6*
PML *Pro Myelocytic Leukemia protein*
Pol II ARN Polymerase II
PrCP plaque Préchordal
RGC cellules ganglionnaires de la rétine
RT-PCR *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
SB *nuclear Stress Body*
SHH Sonic Hedghog
SNC système nerveux central
SP sous-plaque
SUMO *Small Ubiquitin-like Modifier*
SVZ zone sous ventriculaire
SWI/SNF *Switching/Sucrose Non Fermenting complex*
TUNEL *Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling*
VLDLR *Very Low Density Lipoprotein Receptor*
VZ zone ventriculaire
WNT Wingless/Int

# Avant-propos

Le facteur HSF2 (*Heat Shock Factor 2*) appartient à la famille des facteurs de transcription de choc thermique, famille historiquement impliquée dans la réponse au stress en activant la transcription des gènes de choc thermique *Hsp*. Cependant, lors d'un stress le facteur HSF2 est inactivé tandis qu'il est activé en conditions physiologiques, plus particulièrement au cours du développement du système nerveux central. Mais ses cibles et son mécanisme d'action restaient inconnus. Le travail présenté dans cette thèse tente d'élucider la fonction du facteur HSF2 au cours du développement du cortex cérébral chez la souris et au cours du développement du tube neural chez le poulet. En effet, nous avons démontré que HSF2 est nécessaire durant les processus de migration cellulaire des neurones du cortex cérébral en développement chez la souris. Le facteur HSF2 régule dans ce cas différentes cibles dont une cible directe *p35*, sous-unité activatrice de la CDK5 impliquée au cours de la dynamique du cytosquelette. De plus, le facteur HSF2 est impliqué au cours des processus de prolifération et de différenciation qui régissent les cellules souches neurales soit en modulant la dynamique du cytosquelette soit en modulant indirectement l'entrée/sortie du cycle cellulaire.

La première des idées-forces que l'on souhaiterait faire passer à travers les divers chapitres de ce document est que le facteur HSF2, de la famille des facteurs de choc thermique, participe au fonctionnement des cellules en conditions physiologiques. Chez les Eucaryotes, les principales fonctions ne peuvent s'accomplir sans tenir compte de l'environnement cellulaire. La fonction d'un facteur de choc thermique dans ces conditions est intriguante, pourrait-il servir de plate-forme de discussion entre fonction intégrée de la cellule et l'environnement ? La seconde idée est que HSF2 est impliqué au cours du développement embryonnaire. Pour évaluer la fonction du facteur HSF2, nous avons choisi d'étudier le système nerveux central en développement, où HSF2 est particulièrement exprimé et actif. Pour cela, nous avons utilisé différents modèles d'étude développés au laboratoire, chez la souris dont le gène *Hsf2* était inactivé par recombinaison homologue et chez le poulet en surexprimant HSF2 par électroporation *in ovo*.

Après avoir décrit le facteur HSF tant sur un plan biochimique que structural, le caractère multigénique de la famille HSF sera exposé à travers les différentes études menées afin d'élucider la fonction de tels facteurs en conditions physiologiques. Bien que le travail ne porte que sur le facteur HSF2, il est intéressant de resituer ce facteur dans un contexte plus large d'étude. Dans un second temps, sera présenté le développement du système nerveux central chez les Eucaryotes, en se polarisant sur les processus de spécification et de migration qui s'opèrent lors du développement du cortex cérébral. Par la suite, les travaux réalisés au cours de cette thèse seront exposés sous forme d'article où il s'agit d'explorer la fonction du facteur HSF2 au cours des processus de migration des neurones corticaux et de prolifération/différenciation des cellules souches et des progéniteurs neuraux. Ces résultats seront discutés dans le dernier chapitre dans lequel nous nous proposons de réfléchir sur la fonction biologique de HSF2 au cours du développement du système nerveux central.

# Première partie

# Introduction

# Chapitre 1

# Les facteurs de choc thermique, exemple de HSF2

Le facteur HSF2 appartient à la famille des facteurs de transcription de choc thermique HSF. Historiquement, les HSF sont impliqués dans la réponse au choc thermique (HSR) permettant la transcription des gènes *Hsp* en réponse à un stress. Après avoir détaillé la famille HSF, nous étudierons dans ce chapitre leurs mécanismes d'action ainsi que leurs fonctions en conditions de stress ou en conditions physiologiques. Enfin, l'accent sera mis sur l'étude de HSF2 dont la fonction restait inconnue en conditions physiologiques notamment au cours du développement du système nerveux central.

## 1.1 Les facteurs de transcription de choc thermique

### 1.1.1 Historique des HSF

Tout organisme est continuellement exposé à des variations de son environnement. L'adaptabilité de l'organisme face à ces contraintes extérieures, parfois délétères, ne sont pas anodines pour la survie de l'organisme. De plus, l'expression des génomes, l'adaptation ou l'évolution des organismes sont indissociables des contraintes environnementales (Welch, 1992). Différentes stratégies sont employées pour parvenir à une adaptation optimale face à une situation donnée. Il en découle une régulation spécifique et précise de l'expression des gènes afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, soit à court terme lors de stress, soit au long terme en conditions physiologiques. Cette observation repose sur différents mécanismes, parmi lesquels la réponse au choc thermique se distingue par sa remarquable conservation.

#### 1.1.1.1 La réponse au choc thermique

L'observation des chromosomes polytènes, chromosomes constitués d'une multitude de chromatides répliquées et soudées entre elles, contenues dans les glandes salivaires de Drosophile, a permis de mettre en évidence que, lors d'une augmentation de la température de croissance des larves de Drosophile, un processus intriguant avait lieu : l'apparition de *puffs* (boursouflures) (Ritossa, 1996). Ces *puffs* coïncident avec la synthèse d'ARN codant des protéines spécifiquement activées lors de choc thermique, d'où leur nom de protéines de choc thermique (HSP) (Tissières *et al.*, 1974). Cette réponse caractéristique a donc donné lieu aux premières études de la « réponse au choc thermique »(HSR). Cette réponse constitue un mécanisme universel observé chez tous les êtres vivants, des Archébactéries aux Eubactéries, des Plantes aux Animaux (Bardwell and Craig, 1984; Neidhardt *et al.*, 1984; Kültz, 2005).

D'autres *stimuli* que l'élévation de la température provoquent une réponse au choc thermique tels que l'arsénite de sodium, l'éthanol, l'anoxie et la fièvre. Du fait du caractère systématique de la réponse, le terme de réponse au choc thermique a été conservé quelque soit l'inducteur. Ainsi, cette réponse peut être considérée comme une réponse générale à une situation de stress. Les inducteurs de la réponse au stress peuvent être regroupés en différentes catégories comme ceux dit environnementaux ou physio-pathologiques (Morimoto, 1998) (Fig. 1.1).

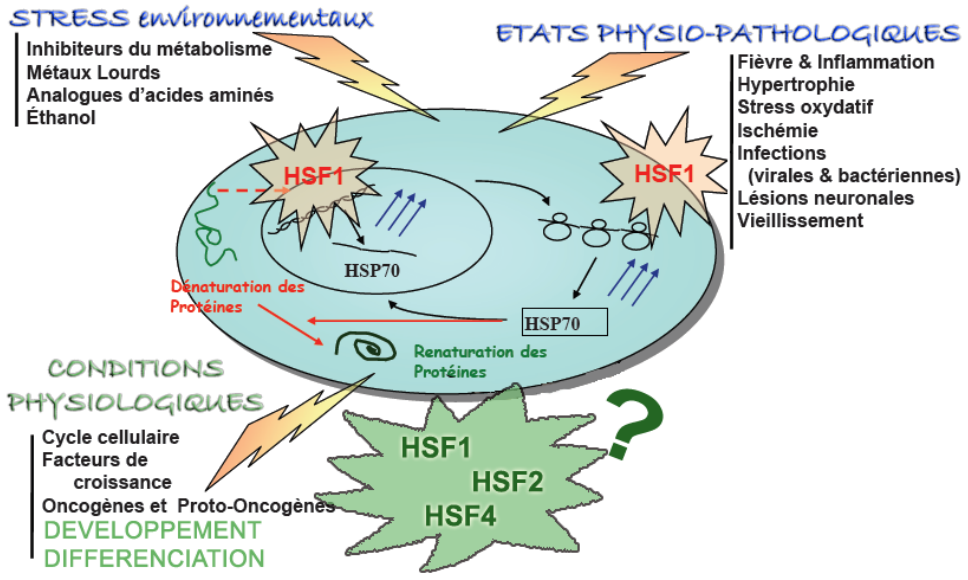



**Fig. 1.1 – Conditions conduisant à l'activation des facteurs de choc thermique chez les Mammifères.** En conditions de stress, la réponse au choc thermique est déclenchée, l'activation des facteurs de choc thermique (HSF) conduit à l'induction de l'expression de gènes de choc thermique (*Hsp*). En conditions physiologiques, la réponse déclenchée reste encore énigmatique mais conduit à l'activation des HSF. Adapté d'après Morimoto, 1998.

La réponse au stress permet aux cellules de passer outre les dommages provoqués par

un environnement délétère grâce notamment à l'induction de l'expression des protéines de choc thermique, les HSP (*Heat Shock Protein*). Certaines HSP ont une fonction de chaperons moléculaires qui permet d'assurer le bon repliement des protéines, leur assemblage ou encore leur engagement vers les voies de dégradation, empêchant l'accumulation cytotoxique de protéines mal repliées [1]. Généralement la réponse au stress entraîne un arrêt de la prolifération et un arrêt de la croissance, s'accompagnant de modifications de la morphologie des cellules (Welch, 1992). Les machineries transcriptionnelle et traductionnelle sont ralenties empêchant l'accumulation de protéines mal repliées. Parallèlement, les gènes de choc thermique sont transcrits et préférentiellement traduits. Ceci conduit à l'accumulation de protéines de choc thermique (HSP).

Le mécanisme de la réponse au choc thermique est rapide, adapté à la sévérité du stress, et varie d'un type cellulaire à un autre. Par exemple dans les cellules de Mammifères, la réponse HSR est déclenchée si l'organisme est confronté à une température qui excède la température de croissance d'au moins 5°C. Ce seuil varie d'un organisme à l'autre et dépend de la température de croissance initiale. Dans des cellules HeLa mises en culture à 35°C au lieu de 37°C, le choc thermique est déclenché à un seuil de température d'induction plus bas, 1°C en dessous de 42°C. De plus, des expériences de surexpression d'un HSF humain (hHSF) dans des cellules provenant de Drosophile dont la température de croissance est de 25°C, ont démontré que l'activation de ce hHSF était déclenchée à une température de 37°C au lieu de 42°C (Clos *et al.*, 1993). Mais l'activation des HSF ne dépend pas uniquement de l'environnement cellulaire mais aussi des caractéristiques du HSF. En effet, l'expression du HSF de Drosophile (dHSF) dans des cellules humaines, ne perturbe pas l'activité constitutive du dHSF (Clos *et al.*, 1993). Ainsi, chaque HSF semble permettre une réponse spécifique face au stress dans un contexte cellulaire donné.

Comme la réponse HSR est déclenchée lors de stress, ceci implique que la cellule ait des mécanismes capables de détecter ces stress. Pour que la réponse soit la plus adaptée possible, on peut supposer qu'il existe dans la cellule des capteurs de stress capables de déclencher la réponse HSR en fonction de l'intensité et du type de stress, en d'autres termes, des capteurs capables de coder une information provenant de l'extérieure et de la transmettre en utilisant les voies de signalisation moléculaire. La dénaturation des protéines, la fluidité des membranes, l'arrêt de la traduction, la libération d'ARN non codant et leur changement de conformation ainsi que l'effondrement du cytosquelette pourraient être constituer ces capteurs de stress et agiraient à différents niveaux de la voie d'activation des HSF, confirmant la finesse de la régulation de la réponse HSR.

Cette reconnaissance de la modification de l'environnement de type stress, n'est encore que mal comprise. Certaines études présentent l'accumulation de protéines dénaturées

[1] En 1989, Ellis et al. (Ellis and Hemmingsen, 1989) proposèrent que les chaperons moléculaires formaient une famille de protéines (incluant les HSP) ayant pour rôle d'assister l'assemblage de polypeptides et de prévenir leur formation incorrecte résultant de l'exposition transitoire de surfaces protéiques hydrophobes ou chargées, normalement impliquées dans des interactions entre chaînes polypeptiques. De tels phénomènes existent à la suite d'un stress ou au cours de la synthèse des polypeptides, leur transport à travers les membranes, ou les changements structurels au cours du fonctionnement normal de complexes protéiques.

comme le signal d'induction de la réponse HSR (Goff and Goldberg, 1985; Parsell and Sauer, 1989). En effet, à la suite d'un stress sévère, certaines protéines sont dénaturées et les polypeptides naissant n'adoptent pas une conformation fonctionnelle (Sarge *et al.*, 1993), la reconnaissance de ces protéines provoquent la réponse HSR. Cependant un stress plus modéré, ne provoquant pas de dénaturation des protéines, déclenche aussi la réponse HSR. Ceci suggère donc que d'autres mécanismes peuvent activer la réponse HSR. Le choc thermique a de multiples effets sur la cellule, modifiant les organites du cytoplasme (entraînant la fragmentation de l'appareil de Golgi, le gonflement des mitochondries), altérant l'architecture du cytosquelette (notamment les filaments intermédiaires contenant la vimentine s'écroulent et s'agrègent), et l'organisation du noyau est perturbée (apparition de corps d'inclusion nucléaire, d'altération des nucléoles) (Welch and Suhan, 1985). Ces altérations morphologiques peuvent être des signaux de déclenchement de la réponse HSR. Des études récentes suggèrent que d'autres modifications structurales de la cellule pourraient être le déclencheur de la réponse HSR. La modification de la fluidité des membranes a été proposée comme activateur des HSF (Balogh *et al.*, 2005; Vigh *et al.*, 2007). A la suite d'un stress, par exemple après hyperthermie, des microdomaines membranaires changent de perméabilité par réarrangement de leur constitution lipidique. Ce changement d'état physique, examiné dans les cellules K562, modifie la fluidité des membranes et les interactions des protéiques membranaires, activant des cascades de signalisation impliquées dans l'activation des HSF, comme c'est le cas de HSF1 activée par la voie Ras/Rac1 par exemple (Han *et al.*, 2001).

Cependant, ce mécanisme n'explique pas à lui seul l'activation des HSF. En effet, l'activation rapide de HSF1 lors d'un stress (<30 secondes) ne peut être expliquée par une simple diffusion, le temps de réaction nécessaire à la trimérisation de HSF1 ne correspond pas à une durée d'une réaction passive, l'activation de HSF1 nécessite forcément des partenaires supplémentaires accélérant la réaction. Quelques partenaires auxiliaires ont été identifiés notamment EF-1$\alpha$ (*Elongation Factor-1 alpha*) et un ARN non codant (lncHSR ou HSR1 *heat shock RNA-1* dans la littérature) (Shamovsky and Gershon, 2004; Shamovsky *et al.*, 2006). Il a été démontré que la fonction de EF-1$\alpha$ en tant que facteur d'élongation de la traduction est dépendante de la température. En effet à 43°C, la liaison de EF-1$\alpha$ à HSF1 est requise pour l'activation du facteur de choc thermique. Ceci suggère que la traduction serait alors un mécanisme sensible au stress et son arrêt, provoqué par le choc thermique, serait un signal d'activation de HSF1. De plus, la fixation de EF-1$\alpha$ à HSF1 nécessite la fixation du lncHSR, ARN essentiel à la réponse au choc thermique chez les Mammifères. Après choc thermique, la conformation de cette ARN non codant est modifiée, suggérant que cet ARN pourrait servir de détecteur de la température, capable du recrutement d'autres protéines auxiliaires permettant l'activation de HSF1 ou simplement servir de plate-forme d'assemblage en trimères HSF1.

Différents capteurs ont d'ores et déjà été identifiés, mais l'existence d'autres capteurs reste envisageable compte-tenu de la variété de stress déclenchant la réponse HSR et de la multiplicité des HSF chez les Eucaryotes. Cette multitude de capteurs et d'effecteurs laisse percevoir la complexité de la réponse au choc thermique.

#### 1.1.1.2 Les gènes de choc thermique, exemple de *Hsp90* et *Hsp70*

La réponse au stress a été le premier modèle d'étude de la régulation de l'expression des gènes. Son universalité repose sur son effet transcriptionnel retrouvé chez tous les organismes, puisque la réponse au choc thermique (HSR) provoque une modification de l'expression des gènes, dont certains, les gènes de choc thermique *Hsp*, sont fortement exprimés après stress. Les protéines de choc thermique (*Heat Shock Protein*) HSP sont regroupées en différentes familles très conservées au cours de l'évolution.

En conditions physiologiques ou à la suite d'un stress, les protéines HSP remplissent des fonctions essentielles pour la cellule. Les HSP assurent pour la plupart un rôle de chaperons moléculaires, permettant le repliement, l'adressage et l'assemblage des chaînes polypeptidiques. Certaines sont capables de prévenir l'agrégation des protéines à la suite d'un stress, de réparer leurs mauvaises conformations ou lorsque cela est impossible, d'engager les protéines mal repliées vers les voies de dégradation, processus essentiels à la survie de l'organisme (Lindquist, 1986; Lindquist and Craig, 1988). Les HSP sont classées en 11 familles multigéniques en fonction de leur poids moléculaire (Lindquist and Craig, 1988; Morimoto *et al.*, 1997). Chez les Eucaryotes, les différents organites intracellulaires possèdent d'autres protéines apparentées aux HSP cytosoliques (Nollen and Morimoto, 2002). Nous ne décrirons ici, que deux des familles de HSP cytosoliques, HSP90 et HSP70, lesquelles sont exprimées majoritairement au cours du développement du cerveau embryonnaire (Walsh *et al.*, 1997a; Loones *et al.*, 2000) et dont nous aurons besoin pour comprendre les démarches expérimentales détaillées dans la partie Résultats.

**HSP90**

Les protéines de la famille des HSP90 ont une taille variable de 81 à 108kDa, elles sont fortement exprimées en conditions normales (1% des protéines totales) et après stress. Elles sont capables de lier l'ATP, possèdant une capacité d'autophosphorylation. Chez les Vertébrés, deux HSP90 cytosoliques sont exprimées constitutivement, HSP90$\beta$ et HSP90$\alpha$, mais à la suite d'un stress, HSP90$\alpha$ est la forme la plus fortement exprimée. La présence de protéines HSP90 est nécessaire à la viabilité de la cellule en conditions physiologiques. En effet, les HSP90 ont une fonction de chaperons moléculaires *in vivo*, puisque en s'associant à d'autres protéines, elles facilitent l'assemblage, le transport et l'activité de protéines (Smith *et al.*, 1993; Loones *et al.*, 1997; Richter and Buchner, 2001; Young *et al.*, 2001; Wirth *et al.*, 2002; Calderwood *et al.*, 2007).

Au cours du développement du rat, HSP90 est exprimée dans le neuroectoderme en fonction du cycle cellulaire surtout pendant la phase G0 (Walsh *et al.*, 1997b). Le *knock-out* du gène *Hsp90*$\beta$ est létal pour certains embryons vers E9,5 [2] (Voss *et al.*, 2000). HSP90 est une protéine multifonctionnelle impliquée dans différents processus notamment la migration cellulaire dans le système nerveux (Sidera *et al.*, 2004). Au cours du développement du cerveau murin, l'expression de HSP90 apparaît à E15,5 dans les

[2]Le stade de développement de l'embryon est déterminé en fonction du nombre de jours *post-coïtum* (E).

cellules neuronales (D'Souza and Brown, 1998). En effet, HSP90 aurait un effet neuroprotecteur, parant l'agrégation et la dénaturation des protéines (Wirth *et al.*, 2002; Calderwood *et al.*, 2007). De plus, avec la coopération de HSP70, HSP90 peut réguler la voie de transduction du signal Ras/Raf, voie importante dans différents processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose, essentiels au cours du développement (Campbell *et al.*, 1998; Kolch, 2002). HSP90 est de plus, impliquée dans des voies de signalisation essentielles comme celles passant pas les récepteurs nucléaires et les protéines kinases, où HSP90 est capable de moduler leurs affinités pour leurs ligands. Il a été suggéré par l'équipe de Lindquist, que HSP90 pouvait avoir une fonction supplémentaire de tampon atténuant les conséquences d'une accumulation de mutations. Lorsque le gène *Hsp90* est invalidé ou inactivé chez la Drosophile ou chez *Arabidopsis thaliana* (Rutherford and Lindquist, 1998; Morange, 2000; Queitsch *et al.*, 2002; Calderwood *et al.*, 2007), ceci conduit à l'apparition de variants différents modifiant les processus de développement. Lorsque l'expression de HSP90 est restaurée, l'expression de variants persiste. De plus, lors d'un stress, une apparition similaire de variants est observée. Il a donc été suggéré que HSP90 avait un rôle essentiel au cours des mécanismes de l'évolution. Les organismes accumuleraient des mutations selon un certain rythme, les protéines variantes produites resteraient silencieuses car elles interagiraient avec HSP90. Lors d'un changement d'environnement ou un stress, HSP90 est déviée de cette fonction pour assurer un rôle de protection. Des fonctions maintenues silencieuses sont ainsi révélées permettant une meilleure adaptation de l'organisme à son environnement.

### HSP70

La famille HSP70 est fortement exprimée en condition normale et en condition de stress (Luft and Dix, 1999; Wirth *et al.*, 2002; Calderwood *et al.*, 2007). Cette famille multigénique est composée chez la souris, de HSC70 (*heat shock gognate* 70) qui est une forme constitutivement exprimée, et de deux formes inductibles HSP70.1 et HSP70.3 faiblement exprimées en condition normale, HSP70.2 est spécifiquement exprimée dans les testicules. Les HSP70 sont essentielles à la biogenèse des protéines et à leur translocation dans les différents organites. Leur capacité ATPasique est activée lors d'interaction avec les chaperons moléculaires HSP40 et HSP35, ceci favorise alors l'interaction avec d'autres protéines (Nollen and Morimoto, 2002). De plus, elles sont impliquées dans l'apoptose et la progression cellulaire, la neurodégérération, *etc* (Sherman and Goldberg, 2001; Richter-Landsberg and Goldbaum, 2003; Calderwood *et al.*, 2007). Les protéines HSP70 interviennent également dans la résistance au stress des cellules et dans les mécanismes de thermotolérance (Nguyen *et al.*, 1989; Wirth *et al.*, 2002). Cette thermotolérance correspond à l'adaptation de la cellule et à sa résistance à un deuxième choc thermique (Li and Werb, 1982). Cet état permet à la cellule non seulement de se protéger d'un choc thermique mais aussi d'être moins susceptible à d'autres facteurs de stress, notamment à des facteurs pro-apoptotiques (Li and Werb, 1982).

Dans le cerveau en développement, à partir de E15,5, HSC70 est exprimée majoritairement dans les neurones tandis que HSP70 l'est majoritairement dans les cellules gliales (Rajdev *et al.*, 2000; Giffard *et al.*, 2004; Calderwood *et al.*, 2007; Brown, 2007).

En conditions physiologiques, HSP70 pourrait être impliquée dans la réorganisation du cytosquelette et du transport axonal. Ainsi un rôle dans la maturation et la migration des cellules du cerveau lui a été attribuée. L'activité constitutive de HSP70 n'est pas anodine en terme de résistance au stress. Une surexpression de HSP70 réduit l'ischémie[3] et protège les neurones et la glie (Rajdev *et al.*, 2000; Giffard *et al.*, 2004). L'action protectrice de HSP70 inclus la prévention de l'agrégation des protéines, la bonne conformation des protéines dénaturée, la réduction de la réponse inflammatoire et l'inhibition des voies apoptotiques (Hoehn *et al.*, 2001; Wirth *et al.*, 2002; Mosser and Morimoto, 2004). De plus, il a été démontré que les HSP peuvent être transférées entre les types cellulaires du système nerveux (Tytell *et al.*, 1986; Tytell, 2005; Calderwood *et al.*, 2007; Brown, 2007). Le choc thermique induit notamment la synthèse de HSP70 dans les cellules gliales qui est rapidement transportée vers un axone adjacent. Ce transfert des cellules gliales vers les neurones assure la neuroprotection par HSP70 des structures neuronales distantes des corps cellulaires comme par exemple les synapses (Brown, 2007). De plus, ce mécanisme permet de maintenir la viabilité des neurones même en cas de lésions. La thermotolérance des neurones ne serait donc pas uniquement dépendante de leurs HSP mais pourrait aussi dépendre de protéines HSP additionnelles transférées par les cellules gliales adjacentes.

L'expression des gènes *Hsp* est contrôlé par les HSF en réponse en stress, mais en conditions physiologiques la régulation de leur expression n'est pas encore clairement identifiée.

### 1.1.2 Les HSF des Vertébrés

Les facteurs HSF sont caractérisés, en particulier par leur capacité à reconnaître directement une séquence spécifique de l'ADN nommée HSE pour élément de choc thermique (*Heat Shock Element*). Cette région fixée par les HSF a historiquement été identifiée dans les régions régulatrices en amont des promoteurs des gènes *Hsp* (Wu, 1995; Nover and Scharf, 1997). Cet élément, de par sa localisation dans le génome, sa distance par rapport au promoteur ainsi que sa séquence, permet aux HSF de moduler l'expression de gènes cibles. Il émane de l'analyse complexe de cette séquence une série de questions que nous aborderons dans les chapitres suivants.

Les travaux de Wu (Wu, 1984) sont les premiers à montrer l'existence de facteurs accrochés à l'ADN après choc thermique. Chez les Eucaryotes, la réponse au choc thermique est régulée principalement au niveau transcriptionnel par les facteurs de transcription HSF (*Heat Shock Factors*). Plus d'une vingtaine de gènes codant les HSF ont été depuis, identifiés dans le règne végétal (Baniwal *et al.*, 2004), moins dans le règne animal. Chez certains Eucaryotes, un gène unique code le facteur HSF, c'est le cas chez les Insectes (*Drosophila melanogaster*), les Nématodes (*C. elegans*) et les Champignons (exemple

[3]L'ischémie consiste en une diminution du flux sanguin provoquant une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments

de *S. cerevisiae*) (Sorger and Pelham, 1988; Wiederrecht *et al.*, 1988; Clos *et al.*, 1990; Garigan *et al.*, 2002). En revanche, les HSF constituent une famille multigénique chez les Vertébrés. HSF1 est ubiquitaire et est responsable de la réponse au choc thermique chez les Mammifères. Chez la Souris et l'Homme deux autres facteurs existent, HSF2 et HSF4 (Fig. 1.2). HSF4 contribue à la régulation de gènes dont les gènes *Hsp* en conditions physiologiques ou après stress. De même, HSF2 est non seulement un facteur de réponse au stress mais aussi un facteur impliqué au cours du développement (Pirkkala *et al.*, 2001; Akerfelt *et al.*, 2007), ceci a été démontré notamment grâce aux travaux menés au laboratoire. Récemment, l'expression de HSF1 et HSF2 ont été caractérisés chez les Poissons (Yeh *et al.*, 2006), mais aussi chez d'autres espèces comme le Xénope (Hilgarth *et al.*, 2004). Chez les Oiseaux, trois HSF ont été découverts, HSF1, HSF2 et HSF3 dont lequel aucun homologue n'a été identifié chez les Mammifères. D'une façon générale les facteurs HSF sont fortement conservées au cours de l'évolution (Fig. 1.2).

Chaque HSF possède certaines fonctions spécifiques ainsi que des caractéristiques biochimiques et cellulaires différentes (Fig. 1.2). HSF1 est un paradigme des HSF de Mammifères, il semble être le facteur indispensable à la réponse au stress. Il est maintenu à l'état inactif monomérique dans la cellule en condition normale. Sous l'effet d'un stress, celui-ci se trimérise et acquiert la capacité de lier l'ADN sur des sites HSE (*Heat Shock Element*) très conservés, situés dans les régions régulatrices des gènes des protéines de choc thermique *Hsp*. Puis, HSF1 est capable d'activer leur transcription (Wu, 1995; Cotto and Morimoto, 1999; Nakai, 1999; Pirkkala *et al.*, 2001; Akerfelt *et al.*, 2007). Les études des souris mutantes pour le gène *Hsf1* ont montrées qu'elles étaient sensibles au stress, et aucune thermotolérance ni induction des gènes *Hsp* après choc thermique n'est observée (McMillan *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002). Ceci démontre bien qu'aucun autre HSF ne peut compenser la fonction de HSF1 au cours de la réponse au choc thermique chez les Mammifères. En conditions physiologiques, HSF1 est impliquée notamment au cours du développement précoce, comme nous le verrons par la suite.

Chez les Aviaires, la réponse au choc thermique déclenche l'activation de HSF1 et HSF3. HSF3 partage plusieurs caractéristiques communes avec HSF1, néanmoins sa forme latente semble dimérique et non monomérique comme celle de HSF1. De plus, le seuil d'activation des deux facteurs ne semble pas être le même puisque HSF1 est activé rapidement lors de stress même modérés (41°C), tandis que HSF3 est induit seulement lors de stress sévères (45°C) (Tanabe *et al.*, 1998; Nakai, 1999; Kawazoe *et al.*, 1999; Inouye *et al.*, 2003). Ceci suggère que chaque HSF ait une action différente en fonction du stress. Lorsque HSF3 est inactivée dans des cellules de Poulet, la réponse au choc thermique est fortement réduite malgré l'expression de HSF1. Ceci indique que HSF3 est un facteur dominant dans la réponse au choc thermique et permet avec HSF1, l'expression des gènes *Hsp* (Tanabe *et al.*, 1998; Kawazoe *et al.*, 1999).

HSF4 est un facteur qui reste encore très énigmatique car sa fonction n'est pas encore bien comprise. Le niveau d'expression de HSF4 est relativement faible excepté dans certains tissus comme le cerveau adulte (Tanabe *et al.*, 1999). Ce facteur, dépourvu d'un domaine inhibant l'oligomérisation des HSF (HR-C, comme nous le détaillerons par

la suite), est trimérique et possède une activité constitutive de liaison à l'ADN lorsque qu'il est surexprimé (Nakai *et al.*, 1997; Tanabe *et al.*, 1999). Ces expériences suggèrent donc un rôle de HSF4 en conditions physiologiques. Son activité transcriptionnelle semble dépendre de l'expression d'isoformes spécifiques aux effets antagonistes qui restent à élucider. Sa fonction est actuellement mieux comprise, HSF4 pourrait être impliquée dans la réponse au choc thermique (Nakai *et al.*, 1997; Frejtag *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001) mais aussi en conditions physiologiques, dans les processus de croissance et de différenciation au cours du développement notamment des organes sensoriels (Nakai, 1999; Fujimoto *et al.*, 2004; Bu *et al.*, 2002; Takaki *et al.*, 2006).

Nous attacherons une plus grande importance au facteur HSF2, sur lequel porte le travail présenté ici. Lorsque HSF2 est surexprimée dans une souche de Levure mutée pour le gène *yHSF*, celui-ci est capable de restaurer la fonction constitutive du yHSF, la protéine est capable de se trimériser et de fixer l'ADN (Liu *et al.*, 1997). Bien que des études récentes suggèrent qu'il puisse moduler la réponse au stress contrôlée par HSF1, aucune évidence de l'activation de HSF2 lors de choc thermique n'a été décelée, celui-ci semble plutôt inactif. Ainsi d'autres fonctions lui ont donc été attribuées au cours du développement et de la différenciation (Wu, 1995; Pirkkala *et al.*, 2001; Akerfelt *et al.*, 2007). Comme nous l'aborderons dans les chapitres suivants, HSF2 est exprimé et actif au cours du développement, notamment dans le système nerveux central dans lequel son activité perdure jusqu'à la fin de la gestation chez la souris (Rallu *et al.*, 1997; Kallio *et al.*, 2002; Akerfelt *et al.*, 2007).

| | HSF1 | HSF2 | HSF3 | HSF4 |
|---|---|---|---|---|
| Organismes | Homme<br>Souris<br>Poulet | Homme<br>Souris<br>Poulet | Poulet | Homme<br>Souris |
| Homologies protéiques | 92% | 92% | | 86% |
| Conditions pour un HSF actif | après stress (*i.e.* choc thermique métaux lourds, stress osmotique... ) et au cours du développement | au cours de la différenciation des K562 (isoforme α) au cours du développement (isoforme β) | après stress sévère (*i.e.* choc thermique) | constitutivement ACTIF<br>tissu -spécifique (coeur, muscle squelettique et cerveau) |
| Effet transcriptionel | généralement activateur | activateur ou répresseur selon les études | activateur | isoforme b activateur<br>isoforme a répresseur |

**Fig. 1.2 – Caractéristiques des HSF chez les Vertébrés.** Adapté d'après Morimoto, 1998 et Nakai, 1999.

Cette vue d'ensemble de la famille HSF démontre une certaine diversité de ces facteurs retrouvés chez les Vertébrés. Cette diversité a pu être sélectionnée positivement pour différentes raisons, et leur capacité de déclencher une réponse la plus adaptée face à un environnement donné procure un avantage. En effet, pour une réponse adaptée,

une finesse de régulation est nécessaire, la diversité des HSF pourraient apporter une telle finesse par leurs fonctions différentes en fonction d'une situation particulière. Nous verrons par la suite, que la complexité des régulations effectuées par les HSF est dépendante de l'action coopérative entre HSF. Ceci reste une hypothèse nécessitant une meilleure connaissance de la fonction biologique des différents HSF et de leurs interactions. Outre leur grande homologie de séquence, les HSF présentent un certain nombre de similitudes structurales, notamment une organisation en domaines fonctionnels fortement conservée.

### 1.1.3 Structure des HSF

Différents domaines fonctionnels ont été identifiés dans les protéines HSF, ils sont organisés de façon très similaires. Dans un souci de synthèse, nous décrierons un facteur HSF général, et détaillerons uniquement les divergent des HSF. En position N-terminale, se situe le domaine permettant la liaison du facteur à l'ADN (*DNA-binding protein*, DBD), c'est le domaine le plus conservé. Puis un domaine d'oligomérisation adjacent au DBD permet au facteur de se trimériser. Dans la région C-terminale, est présent un domaine de régulation de la trimérisation du facteur, qui précède un domaine d'activation de la transcription (Fig. 1.3).

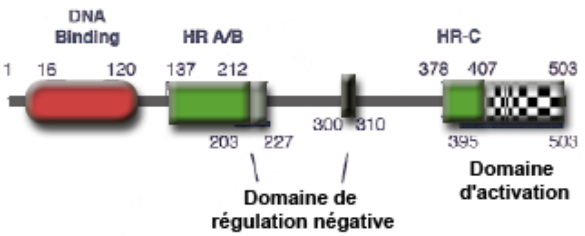



**Fig. 1.3 – Organisation schématique des domaines fonctionnels des HSF .** En N-terminal, se trouve le domaine de liaison à l'ADN (*DNA Binding*, DBD) (en rouge) puis le domaine d'oligomérisation (en vert) séparé du domaine d'activation de la transcription (en damier) par une région régulatrice de l'activation du facteur. Le domaine HR-A/B est un domaine d'oligomérisation nécessaire à la trimérisation tandis que HR-C est un domaine de régulation négatif de la trimérisation. D'après Morimoto, 1998.

#### 1.1.3.1 Domaine de liaison à l'ADN

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) possède une topologie établie à partir de la cristallographie du domaine HSF de Levure et de Drosophile (Vuister *et al.*, 1994). Le DBD est constitué de trois hélices $\alpha$ et quatre feuillets $\beta$ dont le troisième et le quatrième sont séparés d'une boucle (*loop*) de quelques acides aminés. L'hélice $\alpha 2$ et l'hélice $\alpha 3$ forment un motif de type hélice-tour-hélice (HTH). La topologie du facteur HSF est caractéristique de la sous-famille des facteurs de transcription *Winged-Helix* (Fig. 1.4).

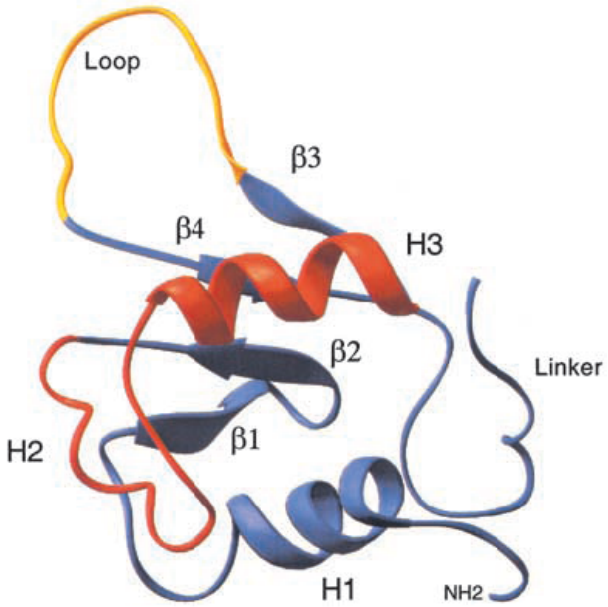



**Fig. 1.4 – Structure du domaine *Winged-Helix* de liaison de l'ADN des HSF**. Le motif central hélice-tour-hélice est représenté en rouge. Il se compose de l'hélice $\alpha 2$ (H2) et de l'hélice $\alpha 3$ (H3) impliquée dans la reconnaissance à l'ADN, ainsi qu'une boucle (*loop* en jaune) caractéristiques des facteurs *Winged-Helix*. Ce modèle se base sur la structure RMN du HSF de Drosophile. D'après Ahn *et al.*, 2001.

La caractérisation de la sous famille *Winged-Helix* a débutée avec l'étude fonctionnelle du facteur *Hepatocyte Nuclear Factor-3* (HNF-3), un facteur de transcription spécifique du foie (Gajiwala and Burley, 2000). Par rapport aux facteurs classiques HTH, les facteurs *Winged-Helix* ont une boucle adjacente au motif HTH de longueur très variable. Cette boucle connecte deux feuillets anti-parallèles ($\beta 3$ et $\beta 4$) et forme une aile (*wing*) liant l'ADN (Littlefield and Nelson, 1999) (Fig. 1.4). La boucle permettrait alors la coopérativité entre le DBD des différents HSF (Ahn *et al.*, 2001) et serait responsable de l'affinité des HSF pour leurs cibles. Elle contient des motifs de modifications post-traductionnelles par SUMO, mais seul le facteur HSF2 est sumoylé dans cette région (Goodson *et al.*, 2001; Anckar *et al.*, 2006). Certains résidus sont très conservés dans le motif DBD, principalement au niveau de l'hélice $\alpha 3$ et du tour entre l'hélice $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (Hubl *et al.*, 1994; Wu, 1995), et sembleraient être importants dans la structure du motif et dans son interaction avec l'ADN. Selon le modèle, l'hélice $\alpha 3$ interagit avec l'ADN après reconnaissance du HSE (Fig. 1.4).

Les facteurs HSF se distinguent des facteurs HTH classiques qui agissent en général sous forme de monomères (comme HNF3) ou dimères. En effet, les HSF se lient à l'ADN sous forme de trimère (Fig. 1.5) dans le grand sillon de l'hélice d'ADN (Wu, 1995). Le domaine *Winged-Helix* ressemble beaucoup aux structures « *winged-helix* »des histones H1 et H5. De plus, il faut remarquer que les facteurs de la famille de HNF-3 (la famille *Forkhead*) sont généralement tissu-spécifiques et ne sont pas uniquement des facteurs régulant la transcription (Yan *et al.*, 2006). En effet, certains restent fixés sur la chromatine

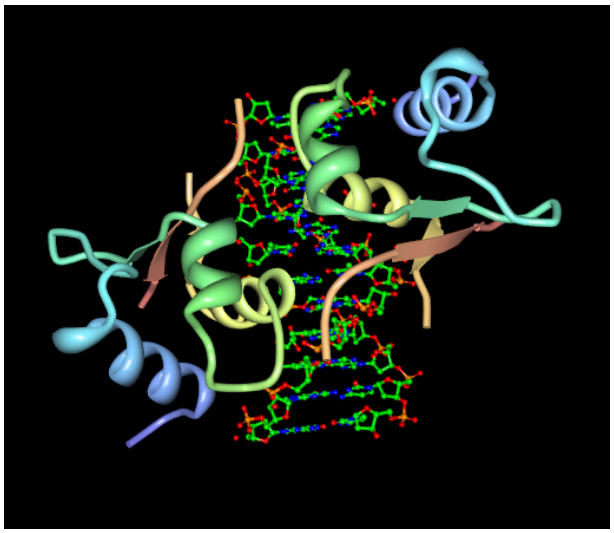


**Fig. 1.5 – Représentation de la fixation de HSF sur l'ADN.** L'hélice $\alpha 3$ représentée ici en jaune est positionnée dans le grand sillon de l'ADN. Représentation 3D issue de *Protein Data Bank* réalisée à la suite de la cristallographie du HSF de Drosophile.

condensée pendant la mitose (cas de FoxI1 chez le poisson zèbre) et remodèlent de façon stable la structure chromatinienne (Yan *et al.*, 2006). Ceci n'est pas sans rappeler les études sur le mécanisme d'action d'HSF2 que nous détaillerons plus loin (Xing *et al.*, 2005; Sarge and Park-Sarge, 2005).

#### 1.1.3.2 Domaine d'oligomérisation

Le DBD est suivie de 80 résidus hydrophobes, essentiels à la trimérisation du facteur (Liu and Thiele, 1999). Ce domaine d'oligomérisation se caractérise par une succession de trois motifs de répétition en heptade HR (*Hydrophobic Region*), regroupés en HR-A et HR-B. La principale particularité de ces motifs est la prédominance d'acides aminés leucine (isoleucine ou valine) en position $d$[4] de la répétition en heptade. Ceci est caractéristique du motif *leucine zipper*, motif structural qui crée des forces d'adhésion au moyen d'hélice alpha anti-parallèles. Ce motif a été le premier identifié par alignement de séquence de certains facteurs de transcription, lesquels présentaient un profil commun ponctué de leucines tous les 7 acides aminés. Ces leucines forment en fait un noyau hydrophobe permettant un super enroulement d'hélices, *coiled-coil*. Chaque demi *leucine zipper* consiste en une hélice alpha, où chaque résidu leucine rentre en contact direct avec sa voisine du brin antiparallèle.

Les protéines à motif *leucine zipper* s'associent classiquement en dimère. D'une façon surprenante, les HSF se trimérisent *via* ce domaine. Il a donc été proposé pour le HSF,

[4]Les hélices $\alpha$ ont une séquence pseudo-répétitive de 7 résidus (*a, b, c, d, e, f, g*) dans lesquels les résidus *a* et *d* sont hydrophobes permettant ainsi la dimérisation.

une conformation très stable et superenroulée telle une corde à trois brins (Zuo *et al.*, 1994). Par contre, les protéines à motif *leucine zipper* sont capables de s'associer sous la forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Actuellement, aucun hétérotrimère HSF n'a été encore caractérisé, mais d'un point de vue structurel, cela semblerait possible. Ainsi pour un trimère HSF, où l'ordre d'arrangement de chaque monomère n'a pas d'importance, il y a 10 possibilités de faire un hétérotrimère différent ($C_5^3 = 10$). Par contre si l'ordre d'arrangement est important, il y a 27 possibilités d'hétérotrimères différents ($3^3 = 27$). Cette combinatoire de facteur ajouterait ainsi une subtilité supplémentaire dans les régulations transcriptionnelles exercées par les HSF.

Après un stress, le HSF inactif monomérique peut être facilement activé *in vitro* et se trimériser. Cela implique que la protéine est capable de changer de conformation pour acquérir un état thermodynamique plus stable (Rabindran *et al.*, 1993). Ceci suggère, que la trimérisation se ferait par une levée d'inhibition plutôt qu'une induction directe du facteur. Après activation, certains HSF comme HSF2 ont été détectés comme passant d'une forme dimérique à une forme de trimère (Sistonen *et al.*, 1994). Par contre, il n'est pas exclu que HSF2 soit associé à une autre protéine inconnue permettant la trimérisation du facteur, car d'un point de vue thermodynamique la transition d'une forme dimère à une forme trimère est difficile. De plus, HSF2 lie constitutivement l'ADN dans différents systèmes cellulaires *in vivo* et *in vitro* (Sarge and Maxwell, 1991; Schuetz *et al.*, 1991), laissant supposer que les régulations conformationnelles entre HSF1 et HSF2 sont différentes, puisque HSF1 n'est actif qu'après un stress. Ces HSF sont fortement homologues, il est donc possible que la trimérisation des HSF requière des co-facteurs de façon cellule et condition-spécifiques. D'autre part, les HSF pourraient s'assembler en hétérotrimère de HSF. C'est ce que suggère les expériences de FACS-FRET présentées par Lea Sistonen (Congrès CSSI, 2007).

Deux régions de la protéine ont été identifiées comme régulant la capacité de trimérisation des facteurs HSF. Lors de mutations de ces régions, les facteurs se trimérisent spontanément et se lient à l'ADN. La trimérisation est donc soumise à une régulation négative par la présence en C-terminal d'un élément de type *leucine-zipper* appelé HR-C (Rabindran *et al.*, 1993). Cet élément est retrouvé chez les espèces où les HSF sont inductibles, c'est le cas chez les Mammifères et la Drosophile, pas chez la Levure dont le HSF possède une activité constitutive. Le facteur HSF4 se distingue des autres HSF par une absence de domaine de régulation HR-C (Nakai *et al.*, 1997)(Fig. 1.3). HSF4 est alors trimérique et son activité de liaison à l'ADN est constitutive (Fujimoto *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2004; Somasundaram and Bhat, 2004). HR-C module donc la capacité de trimérisation des facteurs HSF par des interactions intramoléculaires, influençant ainsi leur capacité de liaison à l'ADN. Tous les motifs *leucine zipper* sont nécessaires au maintien de l'état monomérique du facteur (Zuo *et al.*, 1994). D'après le modèle proposé par Westwood (Westwood and Wu, 1993), HR-C serait capable d'interagir avec HR-A/B formant une structure ramassée sur elle-même en forme d'épingle à cheveux, verrouillant les sites de trimérisations empêchant ainsi les interactions intermoléculaires, la forme HSF est inactive. Il existerait un autre domaine de régulation du domaine d'oligomérisation, le CTR (*Carboxy Terminal Region*) elle aussi en C-terminal. L'importance de ce motif

n'est pas clairement établie (Saltsman *et al.*, 1998).

En conclusion, le domaine d'oligomérisation HR-A/B est essentiel pour que les facteurs HSF se trimérisent et acquièrent une capacité de liaison à l'ADN. L'oligomérisation du facteur est soumise à une régulation intra-moléculaire par interaction d'un domaine HR-C qui se lie à HR-A/B, empêchant toute trimérisation. Une fois trimérisé et fixé sur l'ADN, le HSF est capable d'activer la transcription de ses gènes cibles.

#### 1.1.3.3 Domaine de transactivation

Dans la région carboxy-terminale de la protéine HSF eucaryote, se trouve un domaine de transactivation qui confère à la protéine son activité transcriptionnelle. Ce domaine est composé d'éléments redondants mais synergiques. Ce domaine est très peu conservé entre les espèces et se distingue d'un HSF à l'autre (Wu, 1995; Pirkkala *et al.*, 2001). Néanmoins, la région N-terminale semble responsable de l'augmentation de l'activité lors d'un stress, tandis que la région en C-terminale de ce domaine permettrait le maintien de l'activité lors d'un stress prolongé (Sorger, 1990). Ce domaine est souvent hydrophobe et possède de courts motifs AHA constitués notamment par des acides aminés aromatiques. Le motif AHA, essentiel à la fonction de la région activatrice de la transcription, est retrouvé chez d'autres facteurs de transcription (*i.e.* p53, Fos, Jun *etc.*). Ces motifs semblent nécessaires pour la capacité de transactivation des HSF en rentrant en contact avec les sous-unités du complexe basal de transcription (Nover and Scharf, 1997).

La trimérisation et l'acquisition de l'activité de liaison à l'ADN des HSF ne sont pas suffisants pour induire l'activité transcriptionnelle (Jurivich *et al.*, 1995; Newton *et al.*, 1996). Il a été montré que l'activité transcriptionnelle de HSF1 en réponse au stress, dépendait d'une région de régulation située entre le domaine HR-A/B et le domaine de transactivation de la protéine sensible à l'élévation de température (Newton *et al.*, 1996). Cette région diffère d'un facteur à l'autre modulant ainsi l'activité transcriptionnelle de façon variable pour chaque HSF. La phosphorylation des résidus sérine de ce site a une incidence sur la régulation du facteur HSF (Kline and Morimoto, 1997; Pirkkala *et al.*, 2001) (Fig. 1.6), comme nous le verrons plus loin. En absence d'activation, le domaine de transactivation semble régulé négativement par d'autres régions de la protéine HSF notamment par ce domaine central (Liu and Thiele, 1999).

Différentes expériences ont évalué la capacité transactivatrice des HSF. La fusion GAL4-DBD du HSF4 humain montre que celui-ci active moins la transcription d'un rapporteur luciférase que HSF1 (Tanabe *et al.*, 1999). De plus, la capacité de transactivation de HSF2 d'un rapporteur Luciférase sous contrôle des séquences régulatrices de *Hsp70* montre qu'elle est plus réduite de celle de HSF1 (He *et al.*, 2003). D'autre part, selon les gènes régulés, les HSF n'ont pas le même effet activateur ou répresseur, par exemple HSF1 et HSF4 ont des effets opposés sur la transcription du gène *Fgf7* (Fujimoto *et al.*, 2004). Par ailleurs, HSF1 et HSF2 coopèrent *via* la formation d'hétérocomplexes (He *et al.*, 2003; Loison *et al.*, 2006; Ostling *et al.*, 2007) permettant une régulation modulable des gènes

*Hsp*. La régulation de la transcription par les HSF semble s'accomplir par différents mécanismes comme le recrutement de facteurs affectant l'état chromatinien ou encore par la modulation de la machinerie de transcription basale.

#### 1.1.3.4 Séquence de localisation cellulaire

La plupart des facteurs de transcription sont, après synthèse, localisés dans le noyau. Ce n'est pas le cas des HSF inductibles qui, lorsqu'ils sont inactifs, sont retrouvés dans le cytoplasme. En effet, les HSF sont soumis à différents types de régulations. Comme nous le verrons, la séquestration dans le cytoplasme dépend d'interaction protéine-HSF et de modifications post-traductionnelles ont tendance à activer le HSF.

La translocation des protéines du cytoplasme vers le noyau dépend d'une séquence d'adressage nucléaire NLS (*Nuclear Localisation Signal*). Il existe différents types de NLS, cependant ils sont souvent constitués de plusieurs acides aminés basiques. Le NLS des HSF est dit bipartite puisqu'il est constitué de deux motifs basiques (K/R) K/R1 et K/R2. Le premier est situé dans le domaine de liaison à l'ADN, le second dans le domaine activateur du HSF. Les séquences NLS sont reconnues par des importines qui servent de transporteur à travers les pores de la membrane nucléaire. Une fois à l'intérieur du noyau, l'importine est dissociée du complexe protéine-NLS par le Ran-GTP. L'exportine liée à Ran-GTP dans le noyau, interagit alors avec l'importine et la dissocie de la protéine-NLS. Celle-ci est alors libérée dans le nucléoplasme. L'importine et l'exportine sont par la suite dissociées dans le cytoplasme. Les deux séquences NLS du hHSF2 sont nécessaires à la translocation de la protéine du cytoplasme vers le noyau (Sheldon and Kingston, 1993; Nover and Scharf, 1997). Le facteur HSF1 possède aussi deux NLS identifiés par analogie, mais il semblerait que seule la première séquence soit efficace pour permettre la localisation nucléaire du facteur (Zuo *et al.*, 1995). La localisation cytoplasmique du facteur HSF1 inactif n'est en fait pas aussi figée. En conditions physiologiques, HSF1 est détecté dans le noyau des cellules où il est inactif mais susceptible d'être activé rapidement après le stress (Vujanac *et al.*, 2005). L'étude de la localisation d'une protéine HSF1 fusionnée à la GFP et exprimée dans des cellules HeLa, a montré que HSF1 circulait entre le cytoplasme le noyau. Par contre, lors d'un stress, HSF1 est localisé dans le noyau, l'export de la protéine est inhibé. Cette étude apporte de nouvelles données sur la mobilité de HSF1 dans la cellule en conditions physiologiques ou non.

De plus, la dynamique des HSF dépend de l'état de la protéine. Il a été démontré que la mutation/délétion des séquences N-terminal du domaine de trimérisation entraîne la localisation nucléaire de HSF2 de façon constitutive (Sheldon and Kingston, 1993). En effet, pour être actifs, les HSF doivent se trimériser au préalable. Le compartiment cellulaire dans lequel les HSF se trimérisent reste encore inconnu. En revanche, la séquestration du facteur HSF dans le cytoplasme est due à l'adoption d'une conformation particulière, masquant les sites NLS.

Ainsi, la localisation nucléaire des HSF est fonction de son activation, les formes

trimériques actives sont retrouvées dans le compartiment nucléaire, tandis que les formes non trimériques inactives seraient localisées dans le cytoplasmes (Morimoto, 1998) et dans le noyau (Vujanac *et al.*, 2005). Certaines expériences d'immunolocalisation confirment ces données pour certains HSF. Mais toutes les données ne convergent pas, et ce modèle ne peut se généraliser à tous les HSF. Ainsi, la dynamique des HSF reste à élucider, et nécessite de nouvelles explorations. Les observations en temps réel des facteurs HSF pourraient apporter de nouvelles informations sur la dynamique des HSF en fonction de l'environnement, du cycle cellulaire, de la différenciation...

#### 1.1.3.5 Des transcrits différents issus d'épissages alternatifs

Chez les Mammifères, les HSF sont transcrits puis épissés de façon différentielle. Ceci génère différents transcrits, au moins deux pour chaque HSF chez les Mammifères. Aucune donnée n'est disponible en ce qui concerne HSF3.

Le facteur HSF2 est exprimé sous deux isoformes (Fig. 1.6), dont l'une, HSF2$\alpha$, est un meilleur activateur *ex vivo* que l'autre isoforme, HSF2$\beta$ (Schuetz *et al.*, 1991; Goodson and Sarge, 1995; Manuel *et al.*, 1999). Ceci est montré par des expériences de transfection transitoire dans les cellules NIH3T3, et l'efficacité de transfection est évaluée au moyen d'un rapporteur promoteur *Hsp70*-luciférase. De plus, HSF2$\beta$ a été suggéré comme influençant négativement l'activité de HSF2$\alpha$ sur le gène *Hsp70* au cours de la différenciation des cellules K562 après traitement à l'hémine (Leppa *et al.*, 1997). L'épissage alternatif de l'exon 11 du gène *Hsf2* conduit à insérer 18 acides aminés en aval du domaine HR-C dans l'isoforme HSF2$\alpha$, HSF2$\beta$ en est dépourvue (Fiorenza *et al.*, 1995; Goodson and Sarge, 1995). Cette insertion semble donc modifier la capacité de transactivation de HSF2$\alpha$ par rapport à HSF2$\beta$, suggérant que cette séquence pourrait favoriser le recrutement de la machinerie de transcription. Chaque isoforme de HSF2 est exprimée de façon tissu-spécifique, par exemple les cellules humaines K562 expriment majoritairement la forme HSF2$\alpha$ (Leppa *et al.*, 1997). Tandis que dans le cerveau embryonnaire de souris, la forme HSF2$\beta$ est exprimée de façon prédominante.

Le facteur HSF1 est exprimé sous deux isoformes, HSF1$\alpha$ possède 66 pb dans l'exon 11 codant pour le motif *leucine zipper* que ne possède pas HSF1$\beta$ (Rabindran *et al.*, 1991; Fiorenza *et al.*, 1995; Goodson and Sarge, 1995). Cette insertion est à proximité du motif *Leucine zipper* en C-terminal (HR-C) impliqué dans le maintien de HSF1 dans une forme latente (Fig. 1.6). De plus, chez la souris, le taux d'expression des deux isoformes HSF1 varie selon les tissus et les stades, le cerveau adulte par exemple exprime plus la forme $\alpha$. Mais la fonction de chacun des isoformes de HSF1 reste à élucider.

Le facteur HSF4 est exprimé sous deux isoformes, HSF4a et HSF4b (Nakai *et al.*, 1997). Les deux isoformes sont dépourvues du domaine HR-C, elles sont alors constitutivement trimériques et actives (Nakai, 1999). L'isoforme HSF4b possède un potentiel d'activation différent de celui de l'isoforme HSF4a (Nakai *et al.*, 1997; Tanabe *et al.*, 1999; Frejtag *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). En effet, l'expression de HSF4a dans des cellules

humaines montre une expression des *Hsp* plus réduites (Nakai *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001). De plus, Hsf4a interagit avec le facteur de transcription basal TFIIF dans les systèmes *in vitro*, suggérant un mécanisme potentiel de répression transcriptionnelle par cette isoforme (Frejtag *et al.*, 2001). En revanche, HSF4b peut compléter les défauts de croissance de souche de Levure mutée pour leur HSF (Tanabe *et al.*, 1999) et il a été démontré que Hsf4b est capable d'interagir avec Bgr1 du complexe SWI/SNF pendant la phase G1 pour permettre l'expression des *Hsp* (Tu *et al.*, 2006a) en conditions physiologiques. Ainsi les deux isoformes ont un profil d'expression différents ainsi que des actions transcriptionnelles inverses, reflétant des régulations complexes de leurs cibles (Fig. 1.6). La fonction d'un tel HSF est, à l'heure actuelle, peu comprise mais plusieurs études montrent une interaction possible entre HSF4 et HSF1 dans les organes sensoriels (Fujimoto *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2006a) en conditions physiologiques.

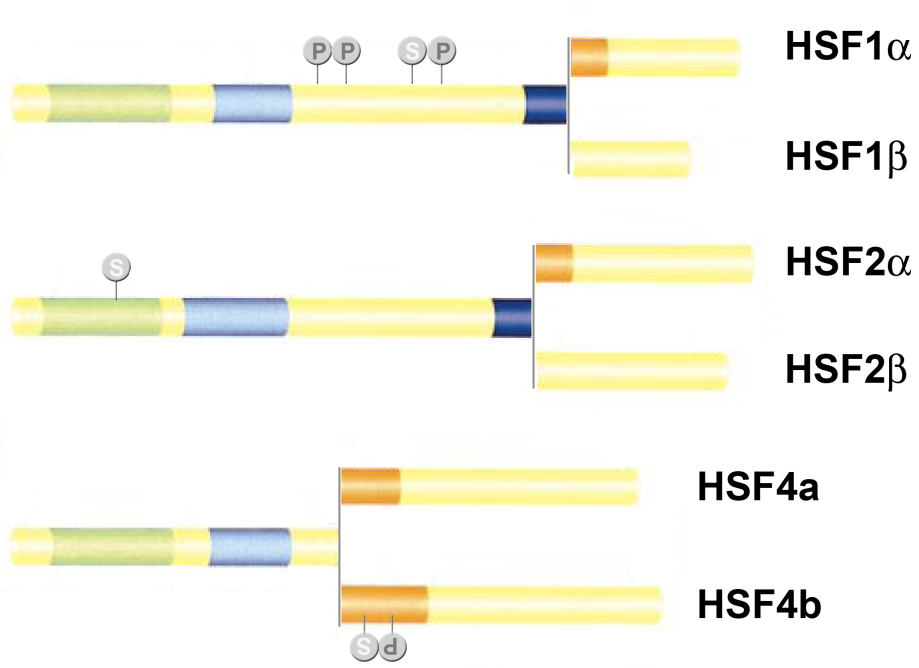



**Fig. 1.6 – Représentation des différents isoformes des HSF chez les Mammifères.** Sont indiqués, le DBD en vert, les régions HR-A/B en bleu, la région HR-C en bleu foncé. La région spécifique de chaque isoforme est représentée en orange. Certains sites de modifications post-traductionnels sont indiqués. Adapté d'après Pirkala *et al.,* 2001.

Le fait qu'une cellule puisse exprimer un même facteur sous différentes formes aux potentialités transactivatrices distinctes, laisse présager des régulations d'expression génique complexes. L'activité globale du trimère HSF pourrait être modifiée selon la combinatoire d'isoformes composant le trimère, une même cible serait alors modulée de façon différente. Cela reste encore difficile à démontrer à l'heure actuelle, en effet, l'analyse fonctionnelle est limitée par le manque d'anticorps spécifique de chaque isoforme.

## 1.2 HSF, régulateurs transcriptionnels

Chez les Eucaryotes supérieurs, les HSF assurent le rôle de régulateurs transcriptionnels des gènes *Hsp* et d'autres gènes distincts des *Hsp*. L'activation des HSF peut se décomposer en différentes étapes pendant lesquels le HSF se trimérise et se fixent sur des séquences régulatrices en amont de leurs gènes cibles, les HSE pour *Heat Shock Element*. Par la suite, le HSF acquière une activité transactivatrice régulée de différente façon et il recrute le complexe de transcription basal ou/et modifie la dynamique épigénétique des séquences en amont de leurs gènes cibles.

### 1.2.1 Les séquences régulatrices HSE

Les HSF activent la transcription de leurs cibles après reconnaissance et fixation de séquences spécifiques, les éléments de choc thermique (*Heat Shock Element*, HSE). Les HSE ont originellement été découverts par l'analyse des séquences en amont des gènes *Hsp* de Drosophile. Initialement définies par une séquence consensus de 14 nucléotides 5'-CTGGAATnTTCTAGA-3' (Pelham and Bienz, 1982; Lindquist, 1986; Xiao and Lis, 1988), les HSE se caractérisent actuellement plutôt par une répétition pentamérique de motifs ou bloques GAA arrangées de façon inversées (Amin *et al.*, 1988; Xiao and Lis, 1988; Xiao *et al.*, 1991; Kroeger *et al.*, 1993)(Fig. 1.7).

#### Les HSF reconnaissent parfois les mêmes HSE *ex vivo* et *in vivo*

.

De part la grande homologie de leur domaine de liaison à l'ADN, les HSF peuvent reconnaître un même HSE (Kroeger and Morimoto, 1994; Manuel *et al.*, 2002). C'est le cas par exemple, des séquences régulatrices localisées en amont du gène *hHsp70*, où les HSE sont composés de 5 motifs de liaisons arrangés de façon adjacente et inversée, plus ou moins parfaits et fixés par HSF1 et HSF2 (Ostling *et al.*, 2007; He *et al.*, 2003; Trinklein *et al.*, 2004a). Ceci suggère une coopération des facteurs HSF dont nous parlerons plus loin. Cependant, les HSE ne sont pas fixés avec la même affinité par tous les facteurs HSF. D'une part, il semblerait que les propriétés de liaison à l'ADN des facteurs HSF dépendent de l'environnement cellulaire dans lequel ils sont synthétisés. C'est le cas d'HSF2, puisque le facteur purifié issu de lignée cellulaire embryonnaire a des propriétés de liaison différentes de celui synthétisé *in vitro* (Kroeger and Morimoto, 1994; Yoshima *et al.*, 1998; Manuel *et al.*, 2002). D'autres part, l'affinité des HSF pour leurs cibles dépend de l'environnement cellulaire *in vivo*. Dans les K562, hHSF1 a plus d'affinité pour ses cibles que hHSF2 après choc thermique. Inversement, après traitement par l'hémine, qui en déclenchant la différenciation des K562, active plus HSF2 que HSF1 (Trinklein *et al.*, 2004a). De plus, lorsque HSF2 est exprimé dans la levure, celui-ci a un spectre de cibles préférentielles différent de celui du yHSF (Liu *et al.*, 1997). Ceci suggère que l'interaction HSF-HSE est plus complexe qu'une simple reconnaissance de séquence,

et d'autres facteurs mécanistiques sont capables de modifier l'affinité des HSF pour leurs cibles.

**Les HSF ont une affinité variable pour leur HSE.**

Des expériences de protection à la DNase et d'EMSA ont montrées que HSF1 et HSF2 se fixaient différemment sur les HSE. En effet, mHSF1 fixerait 4 à 5 motifs tandis que mHSF2 n'en fixerait que 1 à 3 (Kroeger and Morimoto, 1994; Manuel *et al.*, 2002). Les deux HSF peuvent se fixer sur les mêmes séquences mais leur affinité est très différente. L'étude par SELEX utilisant une banque de nucléotides semi-aléatoires, a montré que le facteur mHSF2 capable de se fixer à l'ADN en conditions physiologiques, requiert une séquence optimale de liaison contenant le 8-mer palindromique 5'-TTCTAGAA-3' (Manuel *et al.*, 2002). Remarquons que le choix des oligonucléotides testés par SELEX est contraint, ils doivent contenir deux GAA inversés, réduisant les combinaisons de HSE fixés. Par ailleurs, l'ensemble des analyses *in vitro* ne peuvent tenir compte de l'action de modulateurs potentiels de la fixation des HSF, modifiant leur affinité sur les sites HSE ou régulant l'accessibilité des motifs des HSE.

**La reconnaissance des HSE par les HSF est particulièrement flexible.**

Les travaux de Trinklein *et al.* en combinant différentes approches de *Chip* [5] et de *ChIP on Chip* [6], démontrent que non seulement la fixation de mHSF1 sur certains HSE est corrélée à la transcription de ces gènes après stress, mais aussi que quelques gènes dont le HSE est fixé par mHSF1 ne sont pas transcrits. Ceci démontre que HSF1 a d'autres cibles que celles de la réponse au stress. De plus, certains gènes sont transcrits après stress sans être fixés par mHSF1 suggérant une voie parallèle à la réponse au choc thermique (Trinklein *et al.*, 2004b). HSF1 se fixe à beaucoup de HSE mais pas à tous, même si leur séquence est identique ou que leur position relative par rapport au démarrage de la transcription est similaire. La conformation chromatinienne, le positionnement des facteurs de transcription environnants ou l'architecture du génome doit donc influencer la fixation de HSF1 sur ses cibles. L'analyse des HSE fixés par HSF1 montre une grande variabilité suggérant une certaine flexibilité des HSF par rapport à leurs HSE (Xiao *et al.*, 1991; Trinklein *et al.*, 2004b)(Fig. 1.7). Cette variabilité est retrouvée chez la Levure (Yamamoto *et al.*, 2007; Sakurai and Takemori, 2007). En effet, différents types de HSE ont été identifiés : les HSE dit parfaits (*perfect-HSE*) composés de 3 à 4 répétitions inversées du motif GAA ; les HSE contenant un intervalle entre leur motifs GAA (*gap-type HSE*) (nTTnnGAAn(5pb)nGAAn), les HSE contenant un pas plus important entre les motifs GAA (*step-type HSE*) (nTTCn(5pb)nTTCn(5pb)nTTCn) et les HSE directs (nGAAnnnTTCnGAAnnnnnGAA-nGAAn) où seul le premier et le troisième motifs sont

[5]La technique de *Chip* ou puce à ADN ou *microarrays* consiste en une analyse globale du transcriptome permettant de quantifier le niveau d'expression des gènes dans une cellule donnée dans des conditions données. Cette technique est décrite dans la partie Résulats.

[6]La méthode de Chromatin ImmunoPrécipitation *on Chip* permet l'étude des protéines interagissant avec l'ADN. Il s'agit d'une combinaison de la technique de Chromatin Immunoprécipitation (voir note suivante) avec la méthode des puces à ADN. Elle est en général utilisée pour repérer des sites de fixation de facteurs de transcription sur des gènes cibles.

nécessaires et suffisants pour la fixation de yHSF les autres pouvant intervenir dans la stabilisation de l'interaction HSE-HSF. Dans ces expériences, la protéine hHSF1 est fusionnée au C-terminal de hHSF2 ou à celui de yHSF pour permettre la complémentation fonctionnelle chez la Levure. Par ChIP [7] et d'EMSA [8], il a été démontré que hHSF1 pouvait se lier aux HSE de type 3 ou 4-mer parfaits mais pas à ceux discontinus possédant des intervalles importants entre leurs motifs GAA. En revanche *in vitro*, la protéine en est capable (Sakurai and Takemori, 2007). Ceci suggère que le hHSF1 peut fixer *in vivo* différents HSE composé d'au moins trois motifs agencés de façon continue. D'après l'ensemble des études, la séquence optimale reconnue par HSF1 semblerait donc être nnCnnGAAnnTTCn (Trinklein *et al.*, 2004a), où le résidu guanine est requis en première position et l'adénine en troisième position du motif GAA (Xiao and Lis, 1988; Kroeger and Morimoto, 1994; Trinklein *et al.*, 2004a). Néanmoins, d'autres éléments de séquence pourraient de plus, stabiliser la fixation du HSF sur ses cibles. C'est le cas chez *Caenorhabditis elegans*, où un second motif associé au choc thermique (5' GGGTGTC 3') semble coopérer avec les HSE dans l'induction des gènes de choc thermique (GuhaThakurta *et al.*, 2002). Une telle séquence n'a pas été retrouvée dans le génome humain mais, en regard de la description des HSE, nous pouvons formuler l'hypothèse que d'autres séquences régulatrices existeraient chez les Eucaryotes.

**Fig. 1.7 – Composition du site HSE.** Représentation de l'ensemble des séquences HSE en fonction de leur occurence. Le site HSE se caractérise à l'heure actuelle, par une succession de motif GAA en tandem inversé, où la position de la guanine en première position est nécessaire et l'adénine en troisième position semble requise, un faible espacement de deux nucléotides est observé entre les motifs chez les Mammifères. D'après Trinklein *et al.,* 2004.

### Certains HSF reconnaissent particulièrement un HSE.

Malgré la caractéristique similaire des séquences HSE et la flexibilité des HSF, certains gènes semblent régulés spécifiquement par un HSF. *In vivo*, chez les Mammifères, ont été identifiés pour l'instant les gènes suivants : l'interleukine 6 *Il-6* est une cible de HSF1 (Inouye *et al.*, 2004), la $\gamma$ F-cristalline *Crygf* de HSF4 (Fujimoto *et al.*, 2004) et *p35* de HSF2 (Chang *et al.*, 2006). Des études plus poussées sont nécessaires pour confirmer ce lien spécifique entre un certain HSF et un unique HSE. La particularité de ces HSE

[7] Cette technique permet d'immunoprécipiter la chromatine fixée spécifiquement par une protéine.

[8] L'*Electrophoretic Mobility Shift Assay* ou technique de gel retard permet de tester la capacité de fixation d'une protéine sur un duplexe d'oligonucléotides court, visualisé par un retard de migration dans un gel natif de polyacrylamide.

identifiés pour chacun de ces gènes cibles possèdent un agencement de motifs GAA qui leurs sont propres, et certains de leurs motifs sont imparfaits. La spécificité de régulation des gènes cibles des HSF réside donc en une affinité variable des HSF pour leur HSE qui dépend en partie de la séquence du HSE et d'un contexte cellulaire particulier. La variabilité observée dans l'agencement des motifs GAA des HSE remet en question leur définition trop réductrice. La diversité des séquences isolées indique que les HSF sont des protéines flexibles tolérant des variations de séquences de leurs éléments de reconnaissance sur l'ADN. Cette variabilité de séquences liées par les HSF est intéressante mais ambiguë. Pour exemple, le génome humain pourrait contenir approximativement 10 000 à 12 000 copies de séquences consensus à motif trimérique parfait (5' GAAnnTTCnnGAA 3'), d'autant plus pour les imparfaits ou une séquences consensus plus réduite. De plus, certains HSE fixés par les HSF sont localisées dans des séquences introniques, c'est le cas de HSE présent dans l'exon1 des gènes *Hsp27* et *Hsp90* fixés par HSF1 dans les cellules K562 (Trinklein *et al.*, 2004a), suggérant de nouvelles régulations transcriptionnelles par les HSF. La grande variabilité des HSE et leur localisation nous amène à nous demander si de telles séquences sont biologiquement significatives. De plus, comment rechercher dans un génome un motif avec une telle occurrence sans erreurs ? La recherche de gène cible passe donc dans des approches diverses complémentaires telle celle adoptée par Trinklein *et al.* de *ChIP on Chip*. La spécificité de fixation d'un HSF sur un HSE donné pourrait de plus, dépendre de régulations cellule-spécifiques, de la disponibilité du facteur (séquestré ou non dans un compartiment cellulaire) et de l'accessibilité des HSE. Nous en discuterons dans la partie Résultats.

### 1.2.2 Régulation de l'activité des HSF

L'activité des HSF est régulée à différents niveaux. Le premier niveau de régulation réside dans la régulation de l'expression des HSF, pour HSF2 de façon tissu-spécifique au cours du développement, de même pour HSF4 de façon cellule-spécifique. Puis les modifications post-traductionnelles des HSF modulent leur activité. Comme nous l'avons vu précédemment, la conformation du facteur selon l'interaction de différents domaines intramoléculaires (HR-A/B et HR-C, séquences NLS masquées...) semble aussi être un niveau de régulation important. Par ailleurs, la séquestration du facteur HSF dans le cytoplasme est aussi un moyen de réguler son activité, puisque celui-ci est maintenu dans un état inactif. Ceci est possible grâce à l'interaction de différents facteurs. Enfin, l'interaction potentielle entre les différents HSF pourrait permettre une modulation globale de l'activité HSF dans une situation donnée.

#### 1.2.2.1 Modifications post-traductionnelles

Différentes modifications post-traductionnelles peuvent entraîner un changement de l'activité d'une protéine, que ce soit au niveau de son action, de sa demie-vie, ou de sa localisation cellulaire. Peu de données sont à l'heure actuelle disponible sur les modifi-

cations post-traductionnelles de HSF2. Nous détaillerons les principales décrites pour les HSF, leur phosphorylation et leur sumoylation.

- **La phosphorylation** de HSF1 n'est pas sans conséquence sur son activité de transactivation (Cotto *et al.*, 1996). Après stress, HSF1 est hyperphosphorylée, ceci conduit à la désactivation du facteur dont l'activation est toujours transitoire même en cas de stress soutenu (Kline and Morimoto, 1997). La reconnaissance des sites HSE de liaison à l'ADN de HSF1 ne semble pas dépendre de son état de phosphorylation. Par contre, son état de phosphorylation semble moduler la capacité transactivatrice du facteur. De nombreux sites de phosphorylation sont présents sur la protéine (Fig. 1.6). La phosphorylation de deux serines $S^{303}$ et $S^{307}$ semble particulièrement importante pour la capacité de HSF1 à détecter le choc thermique et à être inactivée en absence de stress. En effet, le remplacement des serines par des alanines déclenche une activité transcriptionnelle permanente de HSF1 (Kline and Morimoto, 1997; Knauf *et al.*, 1996). D'autres sites de phosphorylation ont été identifiés, notamment les serines $S^{230}$ et $S^{236}$ paraissent être nécessaires à l'activité du facteur de façon dépendante du stress (Guettouche *et al.*, 2005) : ces phosphorylations semblent augmenter la capacité transactivatrice de hHSF1. Différentes kinases ont été identifiées comme responsable de la phosphorylation des diverses serines, la GSK-3b (glycogen synthase kinase 3b), ERK1 et la kinase JNK sont impliquées dans ces phénomènes (Chu *et al.*, 1996; He *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1997; Knauf *et al.*, 1996; Dai *et al.*, 2000). HSF4b est phosphorylée *in vitro* (serine$^{299}$) ERK1/2 (*extracellular signal regulated protein kinase 1/2*), et cette phosphorylation coincide avec l'accumulation de HSF4 dans les cellules et une capacité accrue de fixer les HSE (Hu and Mivechi, 2006).
- **La sumoylation** de HSF1 sur la lysine $K^{298}$ a des effets controversés (Fig. 1.6), l'ajout d'un groupe SUMO ne semble pas modifier la capacité du facteur à fixer l'ADN (Hietakangas *et al.*, 2003; Hilgarth *et al.*, 2003). La sumoylation du facteur dépend de sa phosphorylation au préalable du résidu $S^{303}$ (Hietakangas *et al.*, 2003). Comme HSF1, HSF4b est phosphorylé d'une façon dépendante de SUMO qui a pour conséquence de réprimer le potentiel transactivateur du facteur. A la différence de HSF1, HSF4b est constitutivement sumoylée ($K^{294}$) (Hietakangas *et al.*, 2006)(Fig. 1.6). HSF2 aussi est sumoylée ($K^{82}$), ceci pourrait modifier l'affinité des trimères pour l'ADN. (Goodson *et al.*, 2001; Hilgarth *et al.*, 2004; Le Goff *et al.*, 2004).

Ainsi, les HSF sont phosphorylés et sumoylés. Les HSF sont façonnés post-traductionnellement en fonction du stress (Cotto *et al.*, 1996), modifiant l'affinité du facteur pour ses sites HSE et l'activité transcriptionnelle de celui-ci par interaction facilitée avec la machinerie de transcription. D'autres modifications pourrait moduler l'activité des HSF comme l'ubiquitination ou l'acétylation des facteurs.

#### 1.2.2.2 Interaction avec des co-facteurs

Outre la sumoylation, d'autres protéines et un ARN non codant modifient l'activation des HSF.

- **Les chaperons moléculaires**
  HSP70 a été la première protéine identifiée comme régulant négativement HSF1. HSP70 s'associe directement au trimère HSF1 en interagissant avec le domaine de transactivation de HSF1. Cette interaction réprime la transcription des gènes *Hsp* par séquestration du facteur de transcription dans le cytoplasme inhibant son activation. HSP70 n'est cependant pas suffisante pour bloquer la trimérisation de HSF1. HSP90 aussi est capable de s'associer à HSF1. Par injection d'anticorps bloquant la protéine HSP90 dans des ovocytes de Xénope, il a été démontré que HSP90 est capable de réguler de façon négative la trimérisation de HSF1. D'autres protéines semblent être impliquées comme HipHop, p23, FKBP52, RalBP1 (Bharadwaj *et al.*, 1999; Hu and Mivechi, 2003). Cette boucle de régulation dynamique permet d'adapter la réponse au choc thermique en fonction du taux de *Hsp* (Morimoto, 1998) grâce à la séquestration de HSF1 par les chaperons moléculaires sous une forme latente inactive mais capable de s'activer rapidement.
- **Les facteurs auxiliaires activatrices de l'activité des HSF**
  Par exemple, la protéine DAXX (*Death domain-associated protein 6*), régulateur anti-apoptotique et répresseur de la transcription de certains gènes, modifie la compétence transactivatrice de HSF1 en s'associant avec le multicomplexe de chaperons. En effet, lorsque DAXX est surexprimée dans des cellules humaines, HSF1 est actif en conditions physiologiques. En revanche lorsque DAXX n'est pas exprimée, la réponse au stress n'a pas lieu (Boellmann *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2007). D'autres facteurs auxiliaires ont été identifiés sur la base de cette observation : dans les cerveaux de rats âgés de 36 mois, la réponse au choc thermique n'est pas déclenché tandis qu'à 6 mois, la réponse a lieu. Pourtant les cerveaux expriment un niveau protéique similaire de HSF1. La présence de facteurs auxiliaires modulant l'activité de HSF1 a alors été démontré à l'aide de constructions fusionnées à la GST, couplée à une identification par MALDI-TOF (Shamovsky and Gershon, 2004; Shamovsky *et al.*, 2006). HSR-1 (*non coding RNA-1*) et EF-1$\alpha$ (*Elongation Factor-1 alpha*) facilitent la trimérisation de HSF1 en formant un complexe activateur de HSF1 (Shamovsky and Gershon, 2004; Shamovsky *et al.*, 2006).
- **Les facteurs auxiliaires répressives de l'activité des HSF**
  Identifiée par la technique de double hybride, différentes protéines inhibent l'activité des HSF. HSBP1 ( *Heat shock factor binding protein 1*) interagit avec la région HR-A/B de HSF1. Localisée dans le noyau, HSBP1 module la liaison à l'ADN de HSF1 (Morimoto, 1998). Après un stress, HSBP1 associée à HSP70 promeut l'inactivation de HSF1, permettant la transition d'un état trimérique vers un état monomérique. C'est donc un régulateur négatif de la réponse au choc thermique. Par exemple, la nucléoporine p62 et HSF2BP (*Heat shock Factor 2 Binding Pro-*

*tein*) module l'activité de HSF2 (Yoshima *et al.*, 1998). L'absence de p62 pourrait faciliter l'entrée de HSF2 dans le noyau (Sarge *et al.*, 1994) et HSF2BP, protéine exprimée spécifiquement dans les testicules, lie le domaine de trimérisation de HSF2, modulant ainsi potentiellement l'activité de HSF2 dans le testicule. Aucun facteur auxiliaire de HSF2 n'a été pour l'instant identifié dans le cerveau.

#### 1.2.2.3 Hétérocomplexes et hérérotrimères de HSF

Le schéma classique de régulation des gènes présentant des effets tout ou rien, n'explique pas toutes la finesse des mécanismes de transcription des gènes. En effet, il est aisé d'imaginer que la cellule dans une situation donnée, est soumis à une régulation précise de l'expression de ses gènes afin de s'adapter au mieux à son environnement.

Différentes expériences présentent des interactions possibles entre HSF. Dans les cellules K562 traitées à la fois par l'hémine et par un choc thermique, HSF1 et HSF2 sont activées simultanément. Ceci conduit à l'induction synergique de la transcription du gène *Hsp70* (Sistonen *et al.*, 1994). HSF1 et HSF2 sont retrouvées par immunoprécipitation de la chromatine, fixées sur les promoteurs des *Hsp* après choc thermique ou traitement par l'hémine (He *et al.*, 2003; Trinklein *et al.*, 2004a; Ostling *et al.*, 2007). Ces données suggèrent la présence d'hétérocomplexes HSF1/2 fixés sur les HSE des gènes *Hsp*. De plus, HSF2 semble moduler l'expression de certains *Hsp* induite par HSF1, suggérant une coopération entre les deux facteurs. Ainsi, HSF1 et HSF2 interagissent sur des cibles communes lors d'une élévation de la température ou une induction à l'hémine. Il s'avère que c'est aussi le cas après inhibition du protéasome activant HSF1 et HSF2 (Loison *et al.*, 2006). Il a été démontré par ChIP, que HSF1 et HSF2 interagissaient pendant l'inhibition du protéasome liant le promoteur de la *Clusterine* (Loison *et al.*, 2006), confirmant la formation d'hétérocomplexes. Cette dernière étude est intrigante puisque une unique séquence HSE est retrouvée en amont du gène de la *Clusterine*. On peut donc supposer que des hétérotrimères pourraient se former, comme le suggère les derniers travaux de l'équipe de Lea Sistonen (communication Congrès CSSI 2007).

Ainsi, HSF1 et HSF2 peuvent coopérer sur une même cible formant des hétérocomplexes de trimères HSF ou des hétérotrimères de HSF qui restent encore à mettre en évidence. Cette perspective de coopération des HSF capables de réguler différemment de mêmes gènes cibles puisque chaque HSF possède une activité transcriptionnelle différente comme nous l'avons vu, amène une dimension supplémentaire à la finesse de la régulation des gènes pendant la réponse au choc thermique. Ceci expliquerait l'adaptabilité de la réponse HSR en fonction de l'intensité et du type de stress que subit la cellule.

### 1.2.3 L'activation des HSF

Comme aucun modèle d'activation de HSF2 n'est à l'heure actuelle décrit, en s'appuyant sur l'homologie entre HSF1 et HSF2, le mécanisme d'action détaillé dans ce chapitre est celui de HSF1. A la suite d'un stimulus tel que le choc thermique, le facteur HSF est capable de transactivation déclenchant l'expression des *Hsp*. Ce mécanisme se caractérise par une succession d'étapes (Fig. 1.8).

- En absence de stimuli, les monomères de HSF ne fixe les HSE qu'avec un poids moléculaire très élevé. La protéine HSF latente, est séquestrée dans le cytoplasme et la trimérisation du facteur est empêchée par liaison avec des protéines inhibitrices, les chaperons moléculaires et d'autres facteurs auxiliaires pour HSF1. Le déclenchement de la réponse au stress est alors d'autant plus véloce que le facteur est disponible sans synthèse *de novo*, synthèse difficile en condition de stress.
- Après un stress, par exemple une exposition à des températures plus élevées (*i.e.* 41-43°C pour les cellules mammifères), différents évènements moléculaires se produisent. Les protéines sont dénaturées, les filaments d'actine sont désassemblés. La traduction s'arrête libérant EF-1$\alpha$. lnHSR (ARN non codant), détecteur de température (par changement de conformation), permet l'assemblage des HSF1 monomériques avec Ef-1$\alpha$. Ce complexe rapproche les HSF1 les uns des autres permettant d'établir la trimérisation rapide du facteur. La trimérisation du facteur permet l'acquisition de l'activité de liaison à l'ADN (Abravaya *et al.*, 1991). D'une part, le niveau de l'activité de liaison est proportionnelle au taux d'oligomérisation (Sarge *et al.*, 1993), et d'autre part l'affinité du facteur trimérique pour sa cible augmente considérablement.
- Ce trimère, pris en charge par les importines, est transporté alors du cytoplasme vers le noyau afin d'assurer sa fonction (Sarge *et al.*, 1993; Sistonen *et al.*, 1994). Une fois dans le noyau, le HSF trimérique se fixe sur les HSE et forme une structure intermédiaire incapable d'initier la transcription.
- Une fois trimérisé et fixé à ses cibles, le facteur HSF acquière une activité de transcription par changement de conformation. Il interagit avec la machinerie de transcription qui transcrit alors les gènes cibles du HSF, notamment les *Hsp*.
- Puis, les complexes HSF-ADN sont dissociés. Les HSF reviennent dans le cytoplasme. Les chaperons moléculaires engagent HSF1 vers une conformation latente inactive dissociée de lnHSR et EF-1$\alpha$. Les HSF sont ainsi de nouveau séquestrés dans le cytoplasme ou recyclés.

Chacune de ces étapes peut être soumise à une régulation indépendante. En effet, les cellules érythroleucémiques murines (MEL) sont incapables d'induire la transcription du gène *Hsp70* lors d'un stress pourtant l'activité de liaison des HSF est détectée (Hensold *et al.*, 1990). Le yHSF est lié de façon constitutif à l'ADN, pourtant la transcription de toutes ses cibles n'a pas lieu en conditions physiologiques (Jakobsen and Pelham, 1988; Trinklein *et al.*, 2004a). Le salicylate de sodium induit la liaison à l'ADN par HSF sans déclencher la transcription des gènes *Hsp* dans les cellules HeLa (Jurivich *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995). Ces études suggèrent donc que les différentes étapes d'activation des HSF, se produisent peut être de façon ordonnée mais l'une n'implique pas l'autre. La

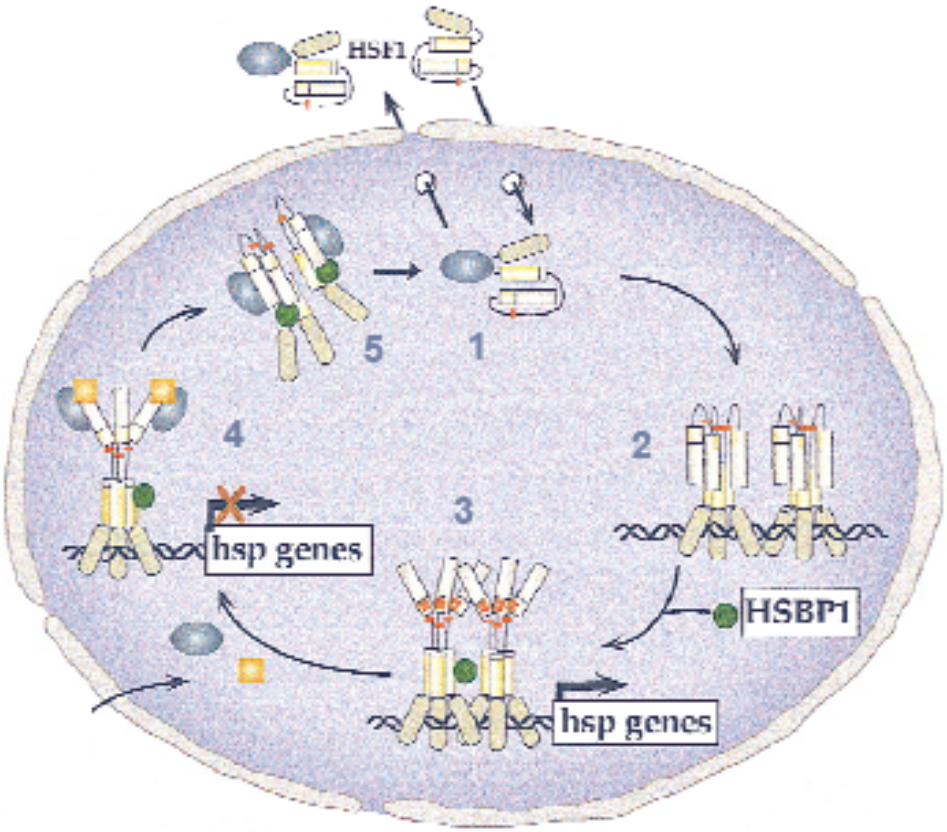



**Fig. 1.8 – Cycle d'activation de HSF1 lors d'un choc thermique.** (1) : Le facteur HSF1 inactif est sous forme monomérique compacte dans le cytoplasme et le noyau. (2) : Lors d'un stress, HSF1 est localisé dans le noyau, se trimérise et acquière la capacité de lier l'ADN sur les HSE. (3) : Après phosphorylation, le facteur adopte une conformation transcriptionnellement active qui induit l'expression des *Hsp*. (4) : Lors de l'atténuation de la réponse au choc thermique, l'activité transcriptionnelle de HSF1 est réprimée par interaction directe avec HSP70 et d'autres partenaires comme HSBP1. (5) : Ces interactions protéine-protéine entraînent la dissociation des trimères HSF1, le facteur retrouve sa conformation initiale inactive. D'après Morimoto, 1998

régulation des HSF est donc raffinée par le découplement de leur capacité à se fixer sur l'ADN et de leur capacité transactivatrice.

### 1.2.4 Régulation transcriptionnelle

Classiquement, les facteurs de transcription HSF sont nécessaires et suffisants pour la régulation de l'expression de gènes en se fixant directement sur les régions contenant les HSE. Les HSF modulent la transcription de leur gènes cibles en recrutant le complexe transcriptionnel basal et/ou en modifiant la structure chromatinienne en amont des promoteurs de leurs gènes cibles favorisant la fixation d'autre facteurs. Le mécanisme d'action du facteur HSF2 est encore loin d'être compris, mais des études récentes montre qu'il serait impliqué au cours du *bookmarking* du gène *Hsp70* (). La fixation de HSF1 stimule indirectement l'assemblage du complexe ARN polymérase. Mais ceci n'est pas clair pour tous les HSF (Fig. 1.9). De plus, lors d'un stress, HSF1 pourrait être impliqué non seulement dans l'expression des *Hsp* en recrutant la machinerie de transcription mais pourrait, de plus, être un facteur qui en s'associant à la Simplekine, protéine qui interagit avec les facteurs de polyadénylation, stimulerait la polyadénylation des transcrits *Hsp70* (Xing *et al.*, 2004).

#### Mécanisme de *pausing* de l'ARN polymérase II

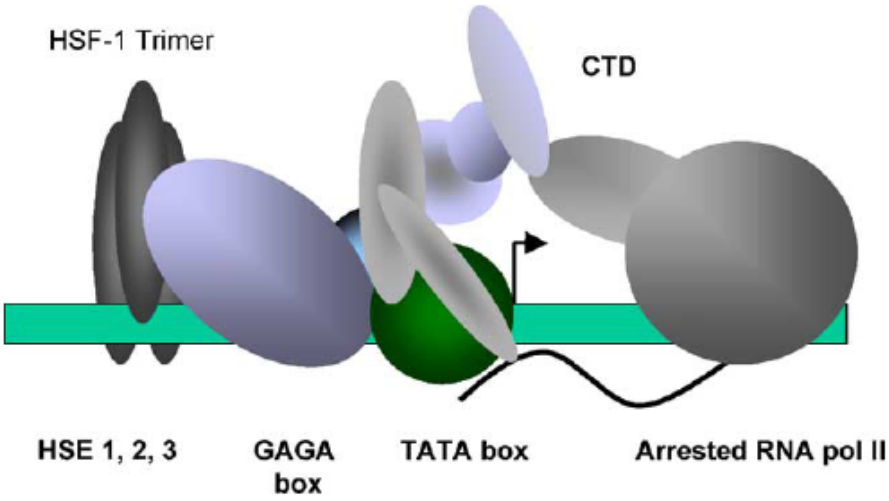



**Fig. 1.9 – Schéma des principaux complexes impliqués dans la transcription des gènes *Hsp*.** Les HSF, les complexes de la GAGA box, de la TATA box et de l'ARN polymérase sont représentés interconnectés, et plus d'une soixantaine de protéines sont impliquées dans les quatre blocs schématisés. Les séquences les plus en amont du promoteur contiennent les sites HSE fixés par le trimère HSF1. En aval, les complexes protéiques fixés sur la GAGA box et la TATA box forment un complexe « médiateur »qui amarre le complexe de l'ARN polymérase permettant l'initiation de la transcription en réponse au stress. D'après Shamovsky *et al.,* 2004.

L'inhibition de l'élongation de la transcription est une étape importante de la régulation de l'expression des gènes eucaryotes. De nombreux gènes, dont les gènes de choc thermique (Rougvie and Lis, 1990; Lis and Wu, 1993; Lis, 1998), *c-fos* et *c-myc* (Krumm *et al.*, 1992; Plet *et al.*, 1995; Pinaud and Mirkovitch, 1998), présentent une régulation spécifique du complexe RNA polymerase II. En effet, l'ARN plymérase II (Pol II) marque une pause (mécanisme de *pausing*) dans les régions proximales du promoteur de ces gènes. D'une façon intéressante, le fait que la Pol II marque une telle pause est étroitement lié à la phase d'élongation de la polymérase. Le *pausing* de la Pol II dans les régions proximales du gène *Hsp70* est bien caractérisé chez la Drosophile en absence de stress (Rasmussen and Lis, 1995) et environ 20% des gènes sont en état de pause (Law *et al.*, 1998). La transcription du gène est activée par le HSF qui stimule le complexe transcriptionnel pour l'étape d'élongation. Des expériences *in vitro* ont montré que la liaison de HSF sur l'ADN est inhibée fortement lorsque les HSE sont assemblés dans les nucléosomes (Taylor *et al.*, 1991). *In vivo*, les HSE du gène *Hsp70* sont libérés de tout nucléosome, rendant cette zone rapidement accessible pour le HSF. Cet accès facilité dépend notamment de l'architecture du promoteur définit par les facteurs GAGA, les facteurs généraux de la transcription TFIID et par les sites de fixation de la Pol II.

La Pol II durant la transcription est fortement phosphorylé sur son CTD (domaine C-terminal de la Pol II) (Komarnitsky *et al.*, 2000). Lorsqu'elle marque une pause en amont du gène *Hsp70* en absence de choc thermique, celle-ci est dans un état non phosphorylé (O'Brien *et al.*, 1994). L'hyperphosphorylation du CTD de la Pol II semble donc couplée à l'arrêt de la pause de la Pol II, associé de plus, à des modification des Histones (Ivaldi *et al.*, 2007). HSF pourrait permettre l'arrêt de la pause marquée par la Pol II en promouvant la dissociation de facteurs qui inhibent la phosphorylation du CTD tel NELF (*negative elongation factor*), ne permettant pas l'élongation de la Pol II (Wu *et al.*, 2003). De plus, HSF serait capable de s'associer à des médiateurs de la phosphorylation du CTD de la Pol II (Park *et al.*, 2001).

D'après ces études, le HSF activerait donc la transcription des gènes *Hsp* en interagissant avec différents complexes protéiques notamment ceux nécessaires au démarrage de l'ARN pol II. Mais le mécanisme d'action des autres HSF dont HSF2 reste encore inconnu. La transcription chez les Eucaryotes, est un réseau de régulation entrelaçant facteur de transcription et complexes modifiant la chromatine (Kadonaga, 1998). Il semble donc difficile de comprendre les régulations transcriptionnelles qui s'opèrent sur les gènes sans prendre en compte les modifications de la chromatine.

Comme nous allons le voir, les HSF sont capables de moduler la conformation chromatinienne de régions particulières au moyen de différents mécanismes. Les granules de stress s'assemblent dans une région péricentromérique composé d'hétérochromatine contenant l'ADN Sat III. En réponse au stress, ce domaine change de conformation chromatinienne (devient de l'euchromatine) et est transcrit en ARN qui s'associent dans les granules de stress (Valgardsdottir *et al.*, 2005). La fonction des HSF dans le changement de l'état chromatinien reste à élucider, mais ceux-ci se retrouvent dans ces gra-

nules à la suite d'un stress. De plus, d'une façon intéressante lors d'un stress, l'état chromatinien des régions régulatrices du gène *Hsp70* est modifié. Le choc thermique s'accompagne de l'acétylation de l'histone H4 tandis que l'exposition à l'arsénite entraîne non seulement l'acétylation de l'histone H4 mais aussi la phosphorylation de l'histone H3 (Thomson *et al.*, 2004; Dyson *et al.*, 2005). L'analyse des souris dont le gène *Hsf1* a été inactivé a permis de démontrer que HSF1 était responsable du ciblage de l'acétylation de l'Histone H4 uniquement après un choc thermique (McMillan *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 2004). La fixation du facteur est suffisante pour induire la modification des histones, c'est le cas après exposition au salicylate de sodium, permettant ainsi d'ouvrir la chromatine favorisant la transcription du gène *Hsp70*.

### Le complexe SWI/SNF et HSF1, HSF4

HSF1 et HSF4 sont capables de s'associer avec Brg1 et permettraient son recrutement sur le promoteur de *Hsp70* (Brown and Kingston, 1997; Sullivan *et al.*, 2001; Tu *et al.*, 2006b). Cette interaction semble dépendre du cycle cellulaire, puisque le complexe Brg1/HSF4 n'est détecté qu'en phase G1, et non pendant la phase G2/M (Tanikawa *et al.*, 2000; O'Callaghan-Sunol and Sherman, 2006). Ceci peut s'expliquer par la phosphorylation de Brg1, qui recrute alors d'autres facteurs lorsque sa phosphorylation diminue en phase G1. Brg1 appartient au complexe SWI/SNF, *switching/sucrose non-fermenting*, complexe protéique impliqué dans le remodelage de la chromatine qui utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour augmenter l'accessibilité de l'ADN associé aux histones. Il est indispensable au développement normal de l'embryon, la différenciation, le maintien de la stabilité génétique et une dérégulation de l'expression de certaines des sous-unités SWI/SNF affecte le cycle cellulaire et peut conduire à la formation de tumeurs (Dunaief *et al.*, 1994; Muchardt and Yaniv, 2001).

### *Bookmarking* par HSF2

Par des expériences de double hybride et d'immunoprécipitation, il a été démontré que HSF2 était capable d'interagir avec la sous unité CAP-G de la condensine, protéine nécessaire à la compaction de l'ADN (Xing *et al.*, 2005; Sarge and Park-Sarge, 2005). La condensine est nécessaire à l'organisation structurelle et fonctionnelle des chromosomes méiotiques, puisque le complexe synaptonémal ne s'assemble pas correctement chez le mutant pour la condensine, présentant des défauts d'appariements et des cassures double brins (Yu and Koshland, 2003). En parallèle, PP2A, indispensable pour le *check point* G2/M interagit avec HSF2 (Xing *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2007). PP2A et la condensine interagissent avec HSF2 d'une façon accrue dans les cellules en mitose, la condensine est alors inhibée. Des expériences de ChIP ont montré que PP2A se fixait sur la même région promotrice de *Hsp70* que HSF2. HSF2 ne semble pas avoir d'action directe sur la condensine *in vivo*, l'inhibition est réalisée par PP2A. Ainsi il est démontré que HSF2 serait impliqué dans le *bookmarking* du gène *Hsp70* au cours du cycle cellulaire. Le *bookmarking* de gène est un mécanisme épigénétique qui consiste à transmettre durant la mitose, le profil des gènes activés ou potentiellement activables aux cellules filles. Différents mécanismes sont alors mis en jeu : modifications des histones, recrutement de TFIID, Polycomb et

Trithorax... Le complexe HSF2/PP2A serait donc capable de réaliser un *bookmarking* sur le promoteur du gène *Hsp70*, cette région est alors laissée plus accessible aux facteurs de transcription lorsque la mitose est terminée (Fig. 1.10). L'effet des différents isoformes de HSF2 sur le mécanisme de *bookmarking* n'est pas abordé par cette étude. D'autre part, dans son étude l'équipe de Sarge (Xing *et al.*, 2005) omet de montrer que la condensine et HSF2 se retrouvent fixés en même temps sur les séquences régulatrices de *Hsp70*. Même si elles interagissent (décelé par des expériences d'immunoprécipitation et de double hybride) rien ne montre une interaction fonctionnelle. D'ailleurs l'activité de la condensine ne semble pas clairement affectée par la présence de HSF2 fixé sur ses HSE, des expériences de protection à l'Dnase auraient été intéressantes. Enfin, l'action de HSF1 sur les mêmes sites HSE est très peu abordée. Au vue des données sur la coopération entre HSF1 et HSF2, il est pourtant instructif de comprendre si HSF1 est un facteur lui aussi capable de *bookmarking*. Cette étude reste pourtant originale, un nouveau rôle pour HSF2 a été découvert. Récemment, l'équipe de Sarge montre que HSF2 serait fixé aux HSE respectifs des gènes *Hsp90*, *Hsp27* et *c-Fos* dans les cellules en mitose (Wilkerson *et al.*, 2007). Cette étude suggère que HSF2 pourrait avoir un rôle au cours de la prolifération des cellules.

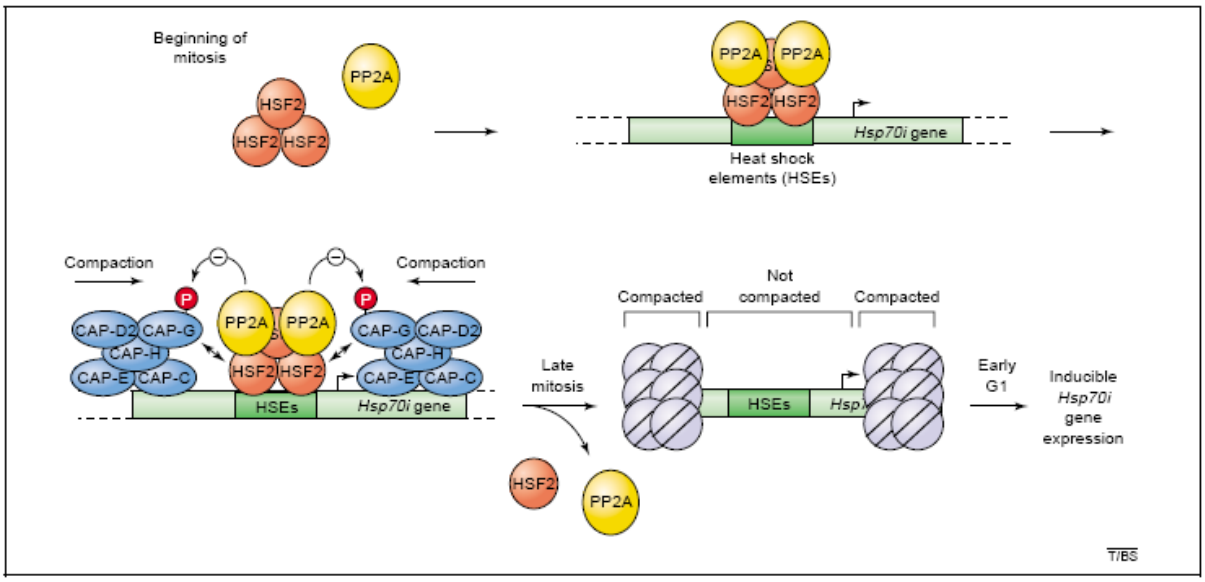



**Fig. 1.10 – Mécanisme de *boormarking* du promoteur de *Hsp70* pendant la mitose.** La condensine est un complexe protéique nécessaire à l'assemblage des chromosomes et leur ségrégation. Ce complexe est constituée de différentes sous-unités : deux membres de la famille des protéines de maintenance de la structure des chromosomes (CAP-C et CAP-E) et trois autres sous-unités dont CAP-G. Dans les cellules en fin de mitose, HSF2 se lie au HSE du gène *Hsp70* et recrute la phosphatase PP2A, qui phosphoryle les sous-unité CAP-C de la condensine. Il en résulte une plus faible compaction de la chromatine en amont du gène *Hsp70*, le site est accessible à d'autres facteurs de transcription. Ce mécanisme permet l'induction de l'expression de *Hsp70* de façon rapide lors d'un stress. D'après *Xing et al.,* 2005.

En conclusion, le mécanisme d'action des HSF semblerait différent selon les

HSF et les conditions d'étude (type de cellules, conditions physiologiques ou stress...). L'ensemble de ses données suggère que les HSF sont capables de réguler la transcription de leurs gènes cibles, en recrutant la machinerie de transcription ou/et en remodelant la structure chromatinienne.

## 1.3 Fonctions des HSF

En réponse au stress, HSF1 et HSF3 sont activés et permettent la transcription des *Hsp*, ces facteurs sont des facteurs classiques de réponse au stress. En revanche, la fonction de HSF2 et HSF4 au cours de la réponse au choc thermique est plus énigmatique, celle de HSF2 semble passer surtout par une modulation de l'activité de HSF1. En parallèle, plusieurs études ont montré que les HSF étaient impliqués dans des processus cellulaires en conditions physiologiques. L'action de ces facteurs de stress restent encore à approfondir.

Dans ce chapitre nous détaillerons la fonction potentielle de HSF2 en réponse au stress, puis nous intéresseront à sa fonction en conditions physiologiques après avoir recenser rapidement les différentes fonctions des HSF découverte à l'heure actuelle.

### 1.3.1 En condition de stress

Lorsque le gène *Hsf1* est inactivé chez les souris, aucune résistance au stress, ni thermotholérance ne sont observées, la transcription des gènes *Hsp* est fortement réduite après stress, d'une façon intéressante, les niveaux constitutifs ne le sont pas (McMillan *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002). Ceci confirme que HSF1 est le facteur majeur de la réponse au stress chez les Mammifères. Pourtant, son activation est dépendante de l'activité de HSF2 comme nous allons le voir.

La fonction de HSF2 est restée longtemps inconnue, et ce facteur était considéré comme fonctionnellement différent de HSF1 puisqu'il ne semblait pas impliqué dans la réponse au choc thermique (Sistonen *et al.*, 1992; Sarge *et al.*, 1993; Sistonen *et al.*, 1994). En effet, les études *in vitro* montraient que le choc thermique inhibait l'activité de liaison de HSF2 (Sarge and Maxwell, 1991; Sheldon and Kingston, 1993). La protéine HSF2 synthétisée *in vitro* dans des lysats de réticulocytes possède, comme HSF4, la capacité de lier les séquences HSE de façon constitutive (Schuetz *et al.*, 1991; Sarge and Maxwell, 1991; Nakai and Morimoto, 1993). Cette activité de liaison est perdue dès que les lysats sont soumis à une élévation de la température. Parallèlement à cette perte de liaison de HSF2, le facteur HSF1 est rapidement activé (Sarge and Maxwell, 1991). De plus, la capacité

de HSF2 à activer la transcription des gènes *Hsp* était controversée. Différentes études montraient que l'augmentation de la protéine HSF2 ainsi que l'augmentation de sa liaison à l'ADN au cours de la différenciation des cellules myeloprogéniteurs K562 était corrélées à l'augmentation de la transcription de *Hsp70* (Sistonen *et al.*, 1992; Sistonen *et al.*, 1994). Par contre, au cours du développement embryonnaire ou dans les cellules issues de corps embryonnaires, l'expression importante de HSF2 n'entraînait pas l'expression des gènes *Hsp* (Murphy *et al.*, 1994; Rallu *et al.*, 1997). Ces divergences d'observations peuvent s'expliquer par le fait que ces différents modèles cellulaires n'expriment pas le même isoforme de HSF2. L'isoforme HSF2$\alpha$ est majoritairement exprimée dans les cellules K562, tandis que l'isoforme HSF2$\beta$ est fortement exprimée au cours du développement. Mais la fonction de HSF2 n'en était pas plus explicite que cela soit en conditions physiologiques ou en réponse au stress.

Pourtant, on ne peut plus exclure l'implication de HSF2 au cours de la réponse au choc thermique et différentes équipes le démontrent. D'une part, après stress, déclenché par le traitement par des analogues d'acides aminés (tel que l'azétidine) ou par des inhibiteurs du protéasomes (tel que MG132), l'activité de liaison de HSF1 et de HSF2 augmente (Mathew *et al.*, 2001; McMillan *et al.*, 2002). La surexpression de HSF2 dans les cellules HeLa soumises au choc thermique montre une translocation de la protéine HSF2 dans les granules de stress (nSB) où HSF2 interagit avec HSF1, elle aussi localisée dans les nSB (Sheldon and Kingston, 1993; Cotto *et al.*, 1997; Jolly *et al.*, 2002; Biamonti, 2004; Alastalo *et al.*, 2003; He *et al.*, 2003). Les *nuclear stress body* nSB contribuent à la subcompartimentalisation du noyau comme le nucléole, les corps de Cajal (*Cajal bodies*) et les corps nucléaires PML (*ProMyelocytic Leukemia protein*). Il a été montré qu'en réponse au stress thermique et chimique, certains domaines péricentromériques d'hétérochromatine du génome humain, changeaient de status épigénétique pour acquérir une structure d'euchromatine (Jolly *et al.*, 2004). Ces régions, en principe silencieuses du chromosome 9 (9q12) sont localisées après stress, dans les granules de stress. De plus, le stress entraîne la transcription de ces régions, produisant des ARN issus des séquences répétées satellites III (sat III). Les transcrits sat III sont de taille variable et s'associent à des facteurs d'épissage, leur rôle pourrait intervenir dans l'épissage (Jolly *et al.*, 2002). Le facteur HSF1 est capable d'activer transitoirement les séquences sat III au niveau de la région 9q12 et s'y fixe directement par interaction ADN-protéine avec les nucléosomes contenant les transcrits des sat III dans les fibroblastes humains (Jolly *et al.*, 2002; Jolly *et al.*, 2004). En réponse au stress, l'activation de la transcription des ARN sat III par HSF1 qui semble recruter les *histones acetyltransferases* (HAT) et la *CREB-binding protein* (CBP), permettrait l'auto-organisation des corps nucléaires par recrutement des protéines d'épissage des ARN (Biamonti, 2004; Valgardsdottir *et al.*, 2005). Dans les granules de stress, le recrutement de HSF1 est assisté par l'activité de HSF2 (Alastalo *et al.*, 2003).

Dans les cellules humaines K562, l'induction de l'activité de HSF2 par l'hémine ne suffit pas pour que HSF2 induise la transcription de *Hsp70* (Sistonen *et al.*, 1994; He *et al.*, 2003). Par contre, la combinaison d'une exposition à l'hémine et d'un choc thermique, se traduit par l'augmentation de la traduction de *Hsp70*, suggérant que l'augmenta-

tion de HSF2$\alpha$ synergise la réponse au stress (Sistonen *et al.*, 1994; He *et al.*, 2003). Après surexpression de HSF2$\alpha$, l'activité transcriptionnelle de HSF1 est augmentée lors d'un choc thermique (He *et al.*, 2003). Par ChIP, HSF1 et HSF2 sont détectées comme étant fixées sur les HSE en amont du promoteur du gène *Hsp70B* après choc thermique mais aussi après un traitement à l'hémine (Ostling *et al.*, 2007) à l'inverse des études antérieures (Sistonen *et al.*, 1992; Sistonen *et al.*, 1994; Mathew *et al.*, 2001; Alastalo *et al.*, 2003; Trinklein *et al.*, 2004a). En conclusion, HSF1 et HSF2 interagissent directement sur le promoteur du gène *Hsp70* et leur niveau d'activité est interdépendant (Ostling *et al.*, 2007). HSF2$\alpha$ semble donc potentialiser l'activation de la transcription par HSF1 dans les cellules humaines, la stoechiométrie des complexes formés reste à élucider ainsi que la forme de ces complexes (homocomplexe/hétérocomplexe et homotrimère/hétérotrimere). Par ailleurs, HSF1 et HSF2 interagissent aussi après inhibition du protéasome et les deux facteurs sont détectés comme étant liés sur un HSE en amont du promoteur de la *Clusterine* (Loison *et al.*, 2006). Ce HSE n'est constitué que de trois blocs GAA, suggérant l'occupation d'un HSF trimérique seulement donc potentiellement d'un hétérotrimère HSF1/HSF2 comme nous l'avons vu.

Dans les cellules murines, l'absence de HSF2 semble altérer la réponse au choc thermique (Paslaru *et al.*, 2003; Ostling *et al.*, 2007). Il faut remarquer que les MEFs utilisées (Ostling *et al.*, 2007) sont immortalisées d'où une expression importante en condition normale des deux isoformes de HSF2, et aucune autre analyse ne permet de comprendre si HSF2$\beta$ est, elle aussi, impliquée dans la réponse au choc thermique. HSF2$\beta$ est fortement exprimée au cours du développement et l'expression constitutive des gènes *Hsp* n'est pas coordonnée ni dans leur régulation ni dans leur profil d'expression par le niveau ou la localisation de HSF2 (Loones *et al.*, 1997; Rallu *et al.*, 1997; Brown and Rush, 1999). Ceci suggère que HSF2 pourrait avoir des cibles différentes des *Hsp* et que le facteur aurait d'autres fonctions que celle qu'on lui accorde au cours de la réponse au choc thermique. C'est le cas aussi pour les autres HSF, comme nous allons le voir.

### 1.3.2 En conditions physiologiques

Les HSF sont nécessaires à la mise en place de la réponse au stress, mais ils ne sont pas restreints à cette seule fonction. Les HSF sont impliquées dans différentes fonctions en conditions physiologiques. D'une part, l'expression des *Hsp*, cibles des HSF, étaient exprimées en conditions dites physiologiques pendant le développement et la différenciation (Loones *et al.*, 1997; Richter-Landsberg and Goldbaum, 2003). Certaines sont constitutivement exprimées dans le système nerveux central et assure la protection des cellules gliales et nerveuses (Yenari *et al.*, 1999; Ohtsuka and Suzuki, 2000). D'autre part, certains HSF montraient une expression régulée pendant le développement, c'était le cas de HSF2 dont le profil d'expression est détaillé dans le chapitre suivant. L'idée d'une fonction des HSF en conditions physiologiques a été renforcée avec l'étude des mutants obtenus par inactivation du gène par recombinaison homologue chez la souris.

Le clonage des HSF de mammifères a permis de découvrir une famille multigénique (Nakai *et al.*, 1997; Sarge and Maxwell, 1991). Ceci a suscité un certain nombre de questions (Christians and Benjamin, 2006). D'un point de vue évolutif quel est le rôle d'une pluralité de HSF ? Ont-ils des rôles redondants, synergiques, complémentaires ou simplement différents ? Y a-t-il de nouvelles fonctions assurées par ces HSF de vertébrés ou se partagent-ils les fonctions du HSF unique des Invertébrés ?

Ce chapitre suivant énumère les différentes fonctions des HSF en conditions physiologiques. En effet, les HSF sont impliqués au cours des processus développementaux, au cours de la gamétogenèse, au cours de la réponse immunitaire, de la prolifération, du maintien des organes sensoriels et de la neurogenèse. Mon travail a consister à élucider la fonction de HSF2 en conditions physiologiques, c'est pourquoi il est intéressant de s'attarder sur les fonctions déjà étudiées pour les autres HSF. Par contre, leurs cibles, en conditions physiologiques, sont souvent différentes des *Hsp* et sont en cours d'identification.

#### 1.3.2.1 La gamétogenèse

Beaucoup de données décrivent l'implication des HSF au cours de la gamétogenèse, plus particulièrement au cours de la spermatogenèse.

Chez la drosophile, le facteur dHSF est significativement moins exprimé dans les testicules que dans les autres tissus comme ceux de la tête. Mais son expression est spécifique dans certaines cellules germinales *cyst cell* ovariennes, les cellules pigmentaires épithéliales et les spermatogonies et spermatides mais pas dans les spermatocytes primaires. dHSF semble réguler l'expression des *Hsp* de façon cellule-spécifiques en intervenant dans le fonctionnement des gonades mâles (Michaud *et al.*, 1997). Au cours de l'ovogenèse, dHSF est redistribué du noyau au cytoplasme et simultanément l'expression de *Hsp70* est perdue au stade 10 (Wang and Lindquist, 1998). Lorsque le gène *dHsf* est muté, l'ovogenèse est perturbée (Jedlicka *et al.*, 1997), cette étude est la première a suggérer que la fonction de HSF pourrait réguler des cibles différentes des *Hsp* en conditions physiologiques.

Chez les Mammifères, le facteur HSF2 semble impliqué dans la régulation de la spermatogenèse (Alastalo *et al.*, 1998), mais son rôle au cours de l'ovogenèse n'est rapportée que par une seule étude (Kallio *et al.*, 2002; Christians *et al.*, 2000; Nakai *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Izu *et al.*, 2004). Les mâles $Hsf2^{-/-}$ ne sont pas stériles (Kallio *et al.*, 2002; McMillan *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003) mais certaines études présentent que ceux-ci auraient des défauts de spermatogenèse et donc de fertilité (Kallio *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Leurs testicules ont une taille plus réduites par rapport aux sauvages, les tubes séminifères le sont aussi, lesquels présentent une forte vacuolisation. Il a été observé une interruption de la spermatogenèse, avec beaucoup de cellules en dégénérescence et une réduction de spermatocytes et spermatides (Kallio *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Une forte mortalité cellulaire est observée surtout en fin de phase pachytène (prophase de méiose). En effet, chez les mâles $Hsf2^{-/-}$ trois fois plus de cellules

sont positives pour l'annexine V, marqueur des phosphatidylsérines membranaires exhibés par les cellules apoptotiques et nécrotiques. De plus, des expériences de TUNEL[9] montrent un taux plus élevé de mort cellulaire. La structure du complexe synaptonémal des spermatocytes pachytène est souvent plus désorganisée (17% contre 4% $p<0.05$) provoquant un mauvais appariement des paires de chromosomes homologues (Fig. 1.11)(Kallio *et al.*, 2002). Le rôle et les cibles de HSF2 au cours de la spermatogenèse restent encore controversés. Certaines études démontre que HSF2 ne régulerait pas l'expression de *Hsp70.2* (Sarge *et al.*, 1994; McMillan *et al.*, 2002). Il apparaît alors que HSF2 pourrait avoir un rôle moins important mais associé à celui de HSF1 au cours de la spermatogenèse (Christians, 2003).

Le facteur HSF1 est exprimé au cours de la spermatogenèse et régule l'expression des chaperons moléculaires (Sarge *et al.*, 1995; Rockett *et al.*, 2001; Christians, 2003). Les souris dont le gène *Hsf1* est inactivé, ont une spermatogenèse normale et aucune infertilité n'est observée (Izu *et al.*, 2004). En revanche, la surexpression d'une forme constitutivement active de hHSF1 par transgenèse chez la souris, affecte la taille des testicules (réduction de 50%) et les tubes séminifères sont moins larges. La spermatogenèse est perturbée chez ces souris transgéniques par rapport aux sauvages et un taux élevé de spermatocytes (en phase pachytène) rentrent en apoptose (Nakai *et al.*, 2000). Le stade pachytène des spermatocytes est un *checkpoint* important de la différentiation des cellules germinales, qui lors de défauts, engage les cellules vers l'apoptose. Après choc thermique, les spermatides au stade pachytène, sont engagés vers la voie apoptotique lorsque le hHSF1 est surexprimé de façon constitutive ou lorsque le gène *mHsf1* est muté (Nakai *et al.*, 2000; Izu *et al.*, 2004). Ainsi, HSF1 semble impliquée dans la régulation de la balance entre facteurs pro- et anti-apoptotiques. En effet, des expériences de puces à ADN ont révélées que *Tdag51* était exprimé de façon plus importante dans les fibroblastes embryonnaires de souris exposés au choc thermique (Inouye *et al.*, 2004). L'expression du gène *Tdag51* (*T-cell death associated gene 51*) induit l'apoptose notamment dans les cellules neuronales et est requis pour l'induction de gène pro-apoptotiques comme *Fas* dans des hybridomes de lymphocytes T. Il a donc été proposé que, HSF1 avait non seulement un rôle de protection des cellules par l'activation des *Hsp* mais de plus, pouvait promouvoir l'activation de gènes pro-apoptotiques comme *Tdag51* qui a été démontrée comme étant une cible directe de HSF1 par ChIP (Hayashida *et al.*, 2006). A la suite d'un stress, HSF1 influencerait donc la destiné des cellules entre réparation et mort cellulaire.

En revanche, l'étude de la souris dont les gènes *Hsf1* et *Hsf2* sont inactivés, présente un phénotype plus sévère, les animaux sont stériles, les tubules sont vides et aucun spermatozoïde n'est produit, suggérant que les deux facteurs sont nécessaires et coopèrent au cours de la spermatogenèse (Wang *et al.*, 2004). Ainsi, HSF1 et HSF2 pourrait avoir une fonction complémentaire *in vivo* au cours de la spermatogenèse.La coopération entre ses deux facteurs restent encore à démontrer dans ce système d'étude, où le stade pachytène,

[9]La technique du TUNEL(*Terminal deoxynucleodityl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling*) utilise le fait que l'apoptose s'accompagne d'une fragmentation de l'ADN. Cette méthode consiste à ajouter aux extrémités 3'-OH, un nucléotide marqué, puis le signal est amplifié grâce à une peroxydase. Cette méthode marque aussi les cellules en nécrose.

pendant lequel les chromosomes s'assemblent, semble une étape clé de la régulation par les HSF.

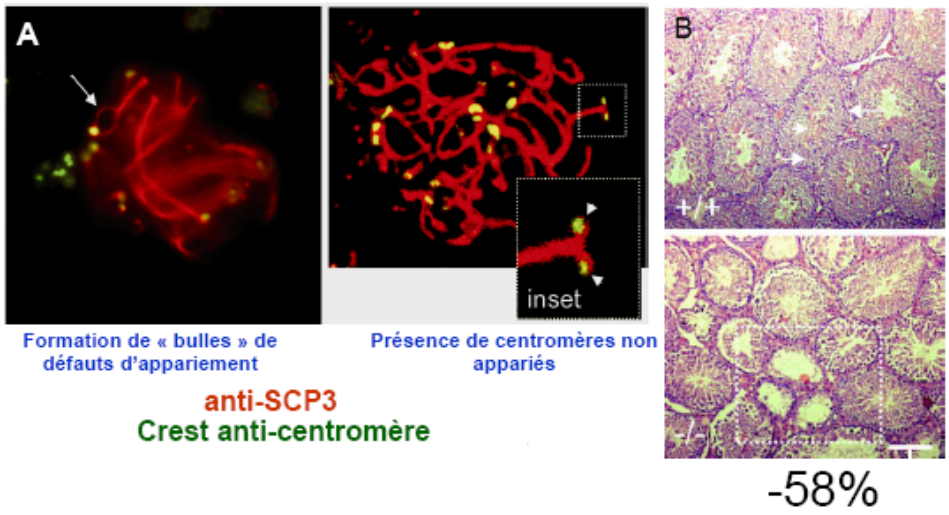



**Fig. 1.11 – Défauts de spermatogenèse des souris $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$.** (A) La structure du complexe synaptonémal des spermatocytes au stade pachytène est souvent plus désorganisée, les centromères sont visualisés par l'anticorps anti-Crest et l'anticorps anti-SCP3 marque une protéine du complexe synaptonémal. (B) De plus, une réduction de la taille des testicules associée à une réduction de la production de spermatozoïdes de l'ordre de 58% est observée chez les souris $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$ par rapport au sauvage. D'après Kallio *et al.,* 2002.

Certaines études montrent de plus, que les HSF seraient impliqués au cours de l'ovogenèse. L'absence de HSF1 perturbe l'ovogenèse et la fertilisation de la gamète femelle (Christians *et al.*, 2000; Christians, 2003). Tandis que les défauts des femelles $Hsf2^{-/-}$ se caractérisent par une hypofertilité, avec une réduction de production d'œufs (0.6% contre 4.9%, $p<0.05$). Ces défauts ne sont pas dus à des problèmes d'établissement de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien chez les jeunes femelles, puisqu'un traitement provoquant la superovulation [10] restaure un nombre d'œufs normal. Par contre, ceci sont anormaux et beaucoup d'entre eux ne sont pas capables de passer au stade 2-cellules. L'ovaire adulte ne montre pas d'expression notable de HSF2 (en tout cas par expression du gène rapporter codant la $\beta$galactosidase) au contraire de l'ovaire embryonnaire. Nous avons donc supposé au vu des stigmates ovariens des femelles $Hsf2^{-/-}$, très semblables à ceux présents dans les mutations de gènes méiotiques et au vu des problèmes de fragmentation ou d'expulsion de globules polaires des œufs $Hsf2^{-/-}$, qu'une partie des défauts de fertilité des femelles $Hsf2^{-/-}$ pourrait découler de problèmes ayant lieu au cours de la première prophase méiotique qui a lieu au stade embryonnaire. Chez les femelles plus âgées, sans doute en raison des problèmes ovairiens dus à l'existence d'ovocytes non ovulés (piégés dans des kystes hémorragiques) des problèmes hormonaux se greffent sur ces problèmes méiotiques (Kallio *et al.*, 2002).

[10] gonadotrophines FSH(*Follicle Stimulating Hormone*)-LH(*Luteinizing hormone*))

#### 1.3.2.2 la réponse immunitaire

Les souris *Hsf1*$^{-/-}$ présentent une diminution de la réponse des lymphocytes B [11], au cours de la réponse médiée par les lymphocytes T [12] (Inouye *et al.*, 2004). Dans le foie, HSF1 fixe directement le gène *IL6* codant pour une cytokine pro-inflammatoire sécrété par les cellules T, qui affecte la croissance et la différenciation de diverses cellules hématopoïétiques (Heinrich *et al.*, 2003; Singh and Aballay, 2006; Hsu *et al.*, 2003; Morley and Morimoto, 2004). La production en immunoglobuline IgG est moindre chez la souris *Hsf1*$^{-/-}$ et la prolifération est plus réduite dans le foie. L'expression de l'interleukine IL6 et de la chémiokine CCL5 (médiant la chémiotaxie pour les leucocytes et régulant leur adhésivité) sont significativement diminuées. HSF1 est donc impliquée dans la réponse immune ainsi qu'au cours de l'inflammation (Inouye *et al.*, 2004). HSF1 inhibe l'expression de TNF-$\alpha$ et de IL-1$\beta$ par liaison directe du promoteur TNF-$\alpha$ ou physiquement par interaction avec NF-IL6 un activateur du gène IL-1$\beta$ (Singh *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2002). Après addition de lipopolysaccharides(LPS) [13], les cellules du foie, les macrophages, les fibroblastes embryonnaires synthétisent plus de IL6 d'une façon dépendant du niveau de HSF1 (Singh *et al.*, 2002; Inouye *et al.*, 2004; Inouye *et al.*, 2007). Sans stress, quelques trimères HSF1 se fixent sur le promoteur de IL6, impliquant une régulation par HSF1 en conditions physiologiques. L'équipe de A. Nakai (Inouye *et al.*, 2007) démontre que non seulement HSF1 recrute des facteurs régulant la transcription mais aussi est capable de modifier la structure chromatinienne d'un site précis. En effet, HSF1 est requis pour la fixation de *activating transcription factor 3* ATF3 et p65 (composant de NK-$\kappa$B) sur le promoteur de IL6 *in vivo* en conditions physiologiques. En utilisant des inhibiteurs des histones déacetylases et des DNA méthyltransférases (tricostatine A et 5-aza-2'-deoxycytidine respectivement), une augmentation de l'expression de Il6 est observée dans les cellules mutées pour le gène *Hsf1*. Le taux d'acétylation de l'histone H3 est moindre lorsque HSF1 est absent, les histones H3 acétylés sont associés au recrutement de CBP histone déacétylase et BRG1, une ATPase du complexe de remodelage SWI/SNF. Ceci suggère que HSF1 est impliqué dans les mécanismes épigénétiques qui réprime la transcription du gène *Il6*. Enfin, des expériences d'accessibilité enzymatique montrent que le promoteur de IL6 est moins facilement digéré en absence de HSF1 en condition normale ou après stimulation LPS. HSF1 est nécessaire pour le maintien partiel de la chromatine en état « ouvert »en condition basale ou après stimulation LPS, permettant ainsi l'accessibilité du promoteur à d'autres facteurs comme ATF3 et NF-$\kappa$B.

[11] Les cellules B se développant dans la moelle osseuse et exprimant des anticorps membranaires.

[12] Les cellules T sont maturées dans le thymus et expriment des récepteurs spécifiques différents des cellules B.

[13] Oligomère de lipide et de carbohydrate qui constitue l'endotoxine des bactéries gram-négatives. Le LPS intervient comme activateur polyclonal des cellules B, induisant leur division et leur différenciation en plasmocytes producteurs d'anticorps.

#### 1.3.2.3 La prolifération et la migration cellulaire

A l'heure actuelle aucune fonction n'a été attribuée à HSF2 au cours des processus de prolifération et de migration cellulaire. Dans ce chapitre est abordé les différentes études qui suggèrent que les HSF seraient impliqués dans de tels mécanismes.

En effet, les HSF semblent impliqués dans la régulation de processus liés au cycle cellulaire, des expériences de synchronisation de fibroblastes embryonnaires où les différents HSF sont mutés présentent des variations d'entrée dans les différentes phases du cycle cellulaire (Tu *et al.*, 2006a). HSF1 est activé pour sa liaison à l'ADN durant la phase G1 (Bruce *et al.*, 1999), ce facteur influence le cycle cellulaire et la régulation de la ploïdie dans les cellules malignes (Wang *et al.*, 2004) et joue un rôle dans la croissance et la protection contre l'apoptose (Khaleque *et al.*, 2005).

HSF2 se lie au promoteur du gène *Hsp70* dans les cellules mitotiques, prévenant la compaction de celui-ci par interaction avec la condensine (Xing *et al.*, 2005). Cette fonction de *bookmarking* permet à des gènes particuliers d'être activés très tôt dans la phase G1 du cycle cellulaire. Si le processus de *bookmarking* est perturbé, les cellules ne peuvent transcrire ces gènes et le cycle cellulaire est retardé (Sarge and Park-Sarge, 2005; Xing *et al.*, 2005). D'une façon différente HSF3 est impliquée dans le cycle cellulaire en permettant la transition G1/S. En effet, HSF3 interagit directement avec le proto-oncogène c-Myb, lequel est induit pendant la phase de transition G1/S et est nécessaire dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose. De plus, l'interaction entre HSF3 et p53 inhibe c-Myb activé (Tanikawa *et al.*, 2000; Nakai and Ishikawa, 2001). Un autre mécanisme de régulation du cycle cellulaire engage l'activation de HSF1 et HSF4. HSF1 est capable de s'associer au complexe Brg1, participant au complexe SWI/SNF qui est responsable du remodelage de la chromatine au cours du cycle cellulaire (Sullivan *et al.*, 2001). Le recrutement par HSF1 de ces complexes modifierait les étapes d'initiation et d'élongation de la transcription. D'une façon intéressante, HSF4b interagit aussi avec le complexe Bgr1 pendant la phase G1 lorsque la chromatine est présumée être la plus accessible aux facteurs de transcription (Tu *et al.*, 2006a). L'association de HSF4b et Brg1 est régulée par ERK1/2. Brg1 est aussi une cible des MAP qui l'hyperphosphoryle et l'inactive pendant la phase G2/M du cycle cellulaire. La capacité de HSF4 à lier Brg1 est augmentée en absence de HSF1 et HSF2 (Tu *et al.*, 2006a). Ainsi, pendant la phase G1, les HSF participent à différents mécanismes de régulation de la structure chromatinienne des *Hsp*.

L'implication des HSF dans les processus d'engagement des cellules vers la mort cellulaire n'est pas encore bien comprise. Comme nous l'avons vu précédemment, au cours de la spermatogenèse HSF1 pourrait réguler le niveau en facteurs pro- et anti-apoptotiques dans les spermatocytes au stade pachytène (Hayashida *et al.*, 2006).

Enfin, les facteurs HSF sont impliqués dans différents mécanismes modifiant la dynamique du cytosquelette modifiant ainsi la migration des cellules. Les fibroblastes embryonnaires dont le gène *Hsf1* est muté, ont une migration plus réduite même après stimulation

par l'EGF. L'*epithermal growth factor* EGF est un facteur de croissance contrôlant la progression du cycle cellulaire. Comme sa fonction promeut la survie et l'activité mitotique des cellules, ce facteur de croissance facilite aussi l'invasion et la migration des cellules tumorales. Dans certaines tumeurs, HSF1 est surexprimée et semble faciliter la progression de la mitose et le développement d'un état aneuploïde qui influence positivement la progression maligne (Wang *et al.*, 2004). L'Héréguline, un ligand de certains récepteurs à l'EGF (erbB3 et erbB4), induit l'expression de *Hsp* grâce à l'activation de HSF1 (Khaleque *et al.*, 2005). Il a donc été attribué à HSF1 une fonction dans le développement des cancers et des métastases. La migration induite par la voie de signalisation EGF, dépend de l'activation des voies de signalisation ERK et JNK qui elles aussi sont réduites dans les fibroblastes embryonnaires *Hsf1*$^{-/-}$ (O'Callaghan-Sunol and Sherman, 2006). D'autre part, les souris dont le gène *Hsf1* est inactivé, ont une probabilité de formation de tumeurs beaucoup plus réduite que les sauvages, l'absence de HSF1 semble protéger les souris de tumeurs induites par la mutation de l'oncogène *Ras* ou du suppresseur de tumeur *p53* (Dai *et al.*, 2007). Ceci suggère que HSF1 aurait un rôle dans la capacité des cellules à s'adapter lors de stress environnementaux, lors de stress oncogèniques et lorsque les cellules adoptent un état de cellule maligne.

La fonction des HSF au cours de la prolifération et de la migration n'est pas encore bien caractérisée. Les HSF sont impliqués dans ces processus par deux mécanismes indépendants, soit par interaction avec différents partenaires de remodelage de la chromatine influençant indirectement la progression du cycle cellulaire, soit en modulant des partenaires qui modifient la dynamique du cytosquelette.

#### 1.3.2.4 Les organes sensoriels

Les HSF sont impliquées dans le développement de certains organes sensoriels, plus particulièrement au cours de la formation et du maintien du cristallin et l'épithélium olfactif. Ces structures dérivent de tissus neuraux en partie d'où en partie l'intérêt que nous y portons ici. De plus, les études des HSF réalisées dans ces tissus démontrent un mécanisme original d'interaction fonctionnelle entre HSF.

La mutation de HSF4 dans son domaine de liaison à l'ADN est associée à une cataracte héréditaire chez l'homme (Bu *et al.*, 2002), ceci suggère une fonction unique de HSF4 pendant le développement du cristallin. L'inactivation du gène *Hsf4* chez la souris démontre que HSF4 est requis pour la prolifération et la différenciation des **cellules épithéliales** du cristallin en régulant les *cytokines*, les *Fgf*, les $\gamma$-*cristallines* et certaines *Hsp* (Fujimoto *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2004).

L'analyse morphologique des souris $Hsf4^{-/-}$ révèle des défauts de formation du cristallin en post-natal sans défauts majeurs de fertilité ou de formation du cerveau. Le cristallin des souris $Hsf4^{-/-}$ est plus petit que celui des sauvages contenant des inclusions dans les structures probablement dues à une agrégation protéique, et certaines souris développent des cataractes. L'absence de HSF4 ne perturbe pas l'expression des facteurs HSF1 et HSF2, en revanche, l'expression de certaines HSP est augmentée dans les cristallins des souris $Hsf4^{-/-}$. De plus, l'expression des membres de la famille des $\gamma$- cristallines notamment, $\gamma$F-crystallin, est fortement diminuée lorsque HSF4 n'est pas exprimée. En effet, la $\gamma$F-crystallin est une cible directe de HSF4 puisque par ChIP, il a été montré que HSF4 se fixe sur les régions régulatrices de ce gène et non HSF1. Pourtant, les souris $Hsf1^{-/-}$ exprime moins de $\gamma$-cristallines sans développer de cataractes (Fujimoto *et al.*, 2004), les cellules épithéliales et le cristallin ont une morphologie normale. Par ailleurs, les souris $Hsf1^{-/-}Hsf4^{-/-}$ présentent des défauts morphologiques plus sévères que ceux observés chez les souris $Hsf4^{-/-}$, puisque des cataractes importantes sont observées ainsi qu'une rupture de la capsule cristalline postérieure et une extrusion du cristallin. Cette observation pourrait expliquer le fait que HSF1 et HSF4 agissent en tant qu'activateur des gènes des $\gamma$-crystallin, suggérant une coopération potentielle de HSF1 et HSF4 dans les **cellules fibreuses** du cristallin (Fujimoto *et al.*, 2004). Les **cellules épithéliales** qui composent le cristallin sont organisées en colonne chez les souris $Hsf4^{-/-}$ au lieu d'être cuboïdales, leur nombre augmente dès la naissance et le taux de BrdU dénote d'une prolifération accrue à partir de E18.5. Le FGF (*fibroblast growth factor*) régule la croissance et la différenciation des cellules du cristallin, et en période néonatal, les cellules du cristallin des souris $Hsf4^{-/-}$ expriment fortement certaines FGF, notamment FGF7 (Fujimoto *et al.*, 2004). Par contre, l'expression de FGF7 est diminuée dans les cristallins des souris $Hsf1^{-/-}$. Les souris dont les gènes *Hsf1* et *Hsf4* sont inactivés, ne présentent pas de tels défauts. En effet, la morphologie des cellules épithéliales du cristallin ainsi que leur nombre sont normaux, et le niveau d'expression des FGF et des HSP est identique à celui des sauvages. Par ailleurs, HSF1 et HSF4 sont détectées comme étant fixées sur le promoteur de *Fgf7* par ChIP. HSF1 et HSF4 pourraient rentrer en compétition sur certaines cibles, HSF1 aurait une action d'activation de la transcription de *Fgf7*, tandis que HSF4

serait plutôt un inhibiteur transcriptionnel de ce gène (Fujimoto *et al.*, 2004) dans les cellules épithéliales du cristallin. Cette dualité d'action est essentielle à la croissance et à la différenciation des cellules épithéliales du cristallin. En conclusion, HSF1 et HSF4 n'ont pas les mêmes effets transcriptionnels et les mêmes cibles selon les types cellulaires constituant le cristallin.

Cette étude est la première à démontrer *in vivo* la dualité des facteurs HSF : un même HSF peut réguler de façon différente divers gènes cibles (exemple d'HSF4 sur les *Hsp* et les $\gamma$-cristallines). De plus, les HSF peuvent rentrer en compétition ou en coopération sur un gène cible donné dans un contexte cellulaire donné, leurs actions transcriptionnelles modulerairent d'une façon globale l'expression du gène cible (exemple de HSF1 et HSF4).

Une orchestration similaire de l'activité des HSF est observée au cours du développement de l'épithélium olfactif. Les souris dont le gène *Hsf1* est inactivé, montrent des défauts de battement des cils de l'épithélium olfactif dus à une diminution de l'expression de la tubuline constituant ces cils (Takaki *et al.*, 2007). De plus, ces souris présentent des défauts de maintien de la cavité nasale avec une atrophie de l'épithélium olfactif après la naissance (Takaki *et al.*, 2006). Les cellules épithéliales prolifèrent moins comme le montrent les expériences d'incorporation de BrdU (Bromo-désoxyUridine) et le taux d'apoptose des neurones olfactifs qui composent l'épithélium olfactif, est plus élevé chez les souris $Hsf1^{-/-}$ par rapport aux sauvages comme le montrent les expériences de TUNEL (Takaki *et al.*, 2006). Ces défauts morphologiques sont corrélés à la diminution de l'expression de certains chaperons moléculaires et à l'augmentation de l'expression de LIF (Takaki *et al.*, 2006). L'épithélium olfactif des souris dont les gène *Hsf1* et *Hsf4* sont inactivés, ne présente pas de défauts, indiquant que HSF1 et HSF4 pourraient avoir des effets antagonistes notamment sur la régulation de l'expression du gène *Lif* comme pour le gène *Fgf7* dans le cristallin (Fujimoto *et al.*, 2004). HSF1 fixe les régions régulatrices de LIF, par contre aucune expérience ne montre que HSF4 en est capable. Les souris $Hsf4^{-/-}$ ne présentent pas de défauts de l'épithélium olfactif et aucune altération de l'expression de *Lif* n'est détectée. Par contre, la surexpression de HSF4 dans des fibroblastes embryonnaires montrent une augmentation de l'expression de *Lif*. Il a donc été proposé que HSF1 inhibe directement l'expression de *Lif*, parallèlement HSF4 est capable d'activer l'expression de *Lif*, modifiant la balance des signaux prolifératifs/apoptotiques. Dans cette étude, le facteur HSF2 n'est pas étudié, son expression est faible au stade adulte considéré, pourtant il serait interessant de s'attarder sur son rôle dans la formation du cristallin à des stades plus précoces, pour évaluer si un mécanisme d'action similiaire s'opère entre HSF.

D'autres travaux montrent que l'activité de HSF1 et HSF2 est régulée de façon cellule-spécifique et en fonction de l'environnement (Sistonen *et al.*, 1994; Morrison *et al.*, 2000). L'inactivation de HSF1 chez le poisson zèbre par l'utilisation de morpholinos, a démontré que celui-ci était nécessaire au cours du développement. Le phénotype se caractérise par des yeux plus petits, le cristallin est immature et la structure rétinienne est désorganisée. L'utilisation de morpholinos contre HSF2 ne montre pas ce phénotype de façon significative (Evans *et al.*, 2007). Chez le rat adulte en absence de stress, HSF1 est

exprimée dans la plupart des couches de la rétine, fortement dans les cellules ganglionnaires de la rétine (RGC) et les cellules photoréceptrices tandis que HSF2 est exprimée majoritairement dans les RGC (Kwong *et al.*, 2006). L'expression de deux HSF dans les cellules RGC suggère que les HSF pourraient coopérer en fonction d'un stimuli à l'expression des gènes *Hsp*, mais ce mécanisme reste à élucider.

En conclusion, HSF1 et HSF4 ont des effets transcriptionnels et des cibles cellule-dépendants. Ces deux facteurs sont capables de rentrer en compétition sur les sites de fixation HSE, affinant la régulation transcriptionnelle de leurs gènes cibles en conditions physiologiques. La fonction *in vivo* de HSF2 et sa coopération avec d'autres HSF n'est pas démontrée au cours du développement des organes sensoriels. Nous avons détecté une expression de HSF2 dans l'épithélium olfactif au cous du développement tardif (E17,5) et une collaboration a été établie avec l'équipe de Akira Nakai (Japon) pour étudier la fonction de HSF2 dans l'épithelium olfactif.

De plus, ces HSF sont requis pour l'expression précise des *Hsp* et des cytokines, gènes essentiels pour le maintien de l'épithélium olfactif et du cristallin qui sont des organes continuellement exposés aux stress environnementaux (UV, olfactants...). Les HSF permettraient donc le développement et le maintien des structures sensorielles soumises directement à l'environnement.

#### 1.3.2.5 L'embryogenèse précoce

Au cours de l'embryogenèse précoce, il a été démontré que HSF1 était requis. Chez la souris, HSF1 est exprimé et actif dans le noyau de l'oeuf dès le stade une cellule, lorsque la transcription est encore spontanée (Christians *et al.*, 1997), permettant une forte transcription du le gène *Hsp70α* lors de l'activation du génome zygotique. L'inactivation du gène *Hsf1* chez la souris démontre que HSF1 est non seulement le transactivateur majeur des gènes induits par le stress, mais est, de plus, requis dans le développement des structures extra-embryonnaires (McMillan *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999), sur fond mixte des problèmes placentaires sont observés. Mais sur fond C57BL/6J, on a une totale stérilité des femelles due à une incapacité des embryons *Hsf1*$^{-/-}$ à se développer au delà du stade blastocyste. L'expression des gènes de choc thermique *Hsp70* qui avait été montrée comme dépendante de HSF1 et qui est très élevée au moment de l'activation du génome zygotique n'est pas significativement responsable de ce défaut, et des données récentes d'Elisabeth Christians mentionnés à Budapest (World Stress Congress, 2007) font état de problème prenant leur origine au cours de l'ovogenèse et impliquant d'autre HSP. La mutation du gène *Hsf1* provoque des défauts d'une façon indépendante du génotype des mâles et est donc une mutation à effet maternel (Christians *et al.*, 2000; Christians, 2003). Ainsi, le développement précoce requière l'expression de HSF1.

HSF1 a donc une action pléïotropique, puisqu'il est nécessaire au cours de la reproduction, du développement, dans les fonctions physiologiques et au cours du stress chez l'adulte (McMillan *et al.*, 1998; Brown and Rush, 1999; Christians and Benjamin,

2005). Ceci rappelle l'action du facteur HSF de Drosophile, qui est requis au cours de l'ovogenèse, du développement larvaire précoce et indépendante de l'expression des HSP. Tandis que lors d'un stress, le facteur dHSF est impliqué dans l'induction des gènes *Hsp* (Jedlicka *et al.*, 1997). Remarquons que le nombre de sites des chromosomes polytènes liés par HSF, excède le nombre de gènes de choc thermiques connus (identifiés comme des *heat shock puff*). Les HSF ont donc des fonctions en conditions dite physiologiques, au delà de la classique induction des gènes de choc thermique (Westwood *et al.*, 1991). Mais d'une façon générale, ces fonctions sont difficilement généralisables comme l'est la réponse au choc thermique. La compréhension des mécanismes et leurs gènes cibles reste alors encore à élucider. C'est le cas pour HSF2, qui en conditions physiologiques, semble avoir des gènes cibles autres que les *Hsp* (Wang *et al.*, 2003).

## 1.4 HSF2 au cours de la formation du système nerveux

### 1.4.1 Dans les stades précoces de développement

HSF2 est constitutivement actif dans les cellules de carcinomes embryonnaires de souris (EC) et dans les cellules souches embryonnaires (ES) issues de la masse interne du blastocyste (Mezger *et al.*, 1989; Mezger *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1994). Les cellules EC sont des cellules souches multipotentes, isolées de tératocarcinomes. C'est pourquoi les cellules EC et ES ont en commun leur capacité à s'auto-renouveler et à se différencier en différents types cellulaires, elles partagent un certains nombres de caractéristiques communes tant cellulaires que biochimiques et immunologiques. Ces études suggéraient donc que HSF2 pourrait être impliqué dans les processus régissant les cellules souches.

Le facteur HSF2 est un facteur embryonnaire, dont la synthèse démarre après activation zygotique du génome et augmente jusqu'à l'implantation (Christians *et al.*, 1997). Son activité de liaison apparaît au stade 8-cellules (*morula*) (Mezger *et al.*, 1994). A l'inverse de HSF1, HSF2 n'est pas un facteur maternel, il n'est pas transcrit dans l'ovocyte. En effet, les transcrits sont détectés à partir du stade 2 cellules, puis son expression augmente jusqu'à la fin de la période pré-implantatoire. *In vitro*, l'activité constitutive de fixation des HSE par HSF2 est détectée à partir du stade 8-cellules (*morula*). Après implantation, l'activité atteint un pic à dix jours et demi de gestation puis diminue progressivement. A ce stade, HSF2 est exprimée de façon ubiquitaire à l'exception du tronc mésenchymateux (Rallu *et al.*, 1997; Kallio *et al.*, 2002). Au cours du développement, l'activité de liaison à l'ADN diminue progressivement dans l'ensemble des structures embryonnaires au jour E15.5 à l'exception du système nerveux central où elle est maintenue à un niveau élevé. Une corrélation importante entre activité de liaison, niveaux d'ARN et niveau protéique est observée au cours du développement, leurs dynamiques suivent les mêmes fluctuations au cours du temps. Ceci suggère que l'activation du facteur HSF2 est majoritairement dépendante de l'activation transcriptionnelle de son gène. Il existe toute-

fois un léger décalage entre le pic d'expression protéique à E9,5 et le pic d'activité à E10. Ce délai suggère qu'un seuil protéique est peut être nécessaire pour qu'il y ait une activité de liaison effective, de plus, on ne peut exclure que d'autres mécanismes de régulation post-traductionnelle entrent en jeu au cours de l'embryogenèse. D'après ce profil d'expression et d'activité, il a été suggéré que HSF2 puisse être impliqué au cours des processus de développement et particulièrement du système nerveux central (Mezger *et al.*, 1994; Christians *et al.*, 1997; Rallu *et al.*, 1997; Kallio *et al.*, 2002).

### 1.4.2 Dans le système nerveux central

Historiquement, les données rapportant l'expression de HSF dans le cerveau adulte résultent d'expériences d'ischémie et d'hyperthermie ou de diverses conditions pathologiques induisant l'expression des chaperons moléculaires. Ces données ont été complétées par la suite, par l'analyse de l'expression et de l'activité des HSF dans le cerveau en développement en conditions physiologiques puis grâce à l'analyse des souris *knock-out*, notamment pour le gène *Hsf2*.

#### 1.4.2.1 HSF2 dans le cerveau néonatal et post-natal

D'une façon intéressante, le profil d'expression de HSF2 se distingue de celui de HSF1 dans le cerveau néonatal. Comme nous l'avons vu, la formation possible d'hétérocomplexe de HSF nous inscite à prendre en considération l'expression de tous les HSF dans une même structure. L'ensemble des travaux étudient la fonction de ces facteurs en conditions de stress, et peu de données ne s'attardent sur une fonction potentielle en conditions physiologiques. Pourtant, certaines cellules du cerveau montrent une localisation nucléaire et une activité de liaison à l'ADN des facteurs HSF en absence de stress, notamment pour HSF2. Le sens biologique d'une telle observation reste à élucider.

**Expression de HSF1 et HSF2 dans le cerveau post-natal**

HSF1 et HSF2 sont exprimées de façon distincte selon les régions cérébrales chez le rat pendant la période néonatal. HSF2 est nucléaire dans les neurones corticaux et dans les neurones du tronc cérébral au $2^e$ jour post-natal (P2). Dans le cerveau adulte, la protéine HSF2 est délocalisée du noyau vers le cytoplasme après P2 (Brown and Rush, 1999). Ce profil d'expression subcellulaire n'a pas été corrélée aux processus régissant l'architecture du cerveau chez l'adulte . Malheureusement, aucune donnée sur les sous-types neuronaux exprimant les HSF n'est disponible à l'heure actuelle. De plus, les localisations subcellulaires ont été réalisées sans co-marquage ni analyses confocales, ce qui diminue la pertinance de ces résultats. Le niveau d'expression de HSF1 augmente chez le jeune adulte (P30) dans le cervelet et le cortex cérébral. Par contre, le niveau d'expression de HSF2 décline à partir de ce stade et reste relativement faible. Dans le cervelet et le tronc cérébral, HSF1 est détectée par immunohistochimie comme

étant nucléaire dans les cellules neuronales et gliales en conditions physiologiques. Par contre, HSF2 est plus faiblement exprimée dans le cytoplasme des neurones de Purkinje du cervelet, dans les neurones du tronc cérébral (Nishimura and Dwyer, 1996; Brown and Rush, 1999), et dans le cortex en fin de gestation (Rallu *et al.*, 1997).

Dans l'hippocampe de rat, les cellules gliales expriment HSF1 et HSF2, tandis que les neurones expriment exclusivement HSF2. Après hyperthermie, les cellules gliales déclenchent une activation de HSF1 vue par l'augmentation de son activité de liaison. Par contre, les neurones montrent une activité de liaison due à l'activation de HSF2 en conditions physiologiques. D'une façon inattendue, cette activité de liaison augmente après choc thermique, mais elle n'est pas suffisante pour induire l'expression de *Hsp70* suggérant une activation de HSF2 indirecte par le stress dans les neurones de l'hippocampe (Marcuccilli *et al.*, 1996). La technique utilisée pour cultiver les neurones de l'hippocampe ne peut se faire en absence de glie (environ 4% de contamination cellulaire), on ne peut donc pas exclure que le choc thermique ait des effets cellules non-autonomes sur les neurones. De plus, ceci suggère que l'activation de HSF2 semble être régulée différemment lorsque HSF1 n'est pas exprimée, suggérant une intéraction possible (Marcuccilli *et al.*, 1996).

Dans la moelle épinière du rat adulte, HSF1 est exprimée majoritairement par rapport à HSF2. HSF1 est localisée dans le cytoplasme des motoneurones mais est nucléaire dans les cellules de la glie. Tandis que la localisation de HSF2 est nucléaire et cytoplasmique dans les motoneurones et nucléaire dans les cellules gliales (Stacchiotti *et al.*, 1999; Batulan *et al.*, 2003).

### Analyse des souris dont les gènes *Hsf1* et *Hsf2* sont inactivés.

L'analyse des souris dont le gène *Hsf1* est inactivé par recombinaison homologue, indique une démyelination et une astrogliose importante dans la moelle épinière et le cerveau des animaux adultes. Aucune réduction du nombre de neurones et d'oligodentrocytes, responsable de la myelination des axones, n'est observée. En revanche, une accumulation de protéines ubiquitinées est détectée dans les fibroblastes embryonnaires et les cerveaux $Hsf1^{-/-}$, signe de neudégénération des structures (Homma *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que dans la moelle épinière, un phénotype plus sévère est décrit pour les souris $Hsf1^{-/-}$ et $Hsf2^{-/-}$, suggérant que les deux facteurs pourraient être impliqués au cours du développement du système nerveux de façon séquentielle et/ou superposée (Homma *et al.*, 2007). Le fait que les deux HSF soient nucléaires dans les cellules gliales (Stacchiotti *et al.*, 1999; Batulan *et al.*, 2003) suggère une coopération possibles qui permettrait notamment d'induire rapidement *Hsp70* en réponse au stress contrairement à certains neurones. Ainsi, les HSF seraient requis pour le maintien de l'homéostasie du système nerveux central et pareraient les évenements associées aux neurodégénérations (Homma *et al.*, 2007). En conditions physiologiques, l'expression basale des *Hsp* est influencée par HSF1 dans le système nerveux central (Santos and Saraiva, 2004). Les souris $Hsf1^{-/-}$ et $Hsf2^{-/-}$ montrent un phénotype du système nerveux variable pendant le développement néonatal (Kallio *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Santos and Saraiva, 2004) avec des ventricules latéraux élargis, résultant probablement

d'une atrophie du parenchyme cérébral ou à une insuffisance de croissance du cerveau pour les souris *Hsf1*$^{-/-}$ ou d'une légère hydrocéphalie prenant sans doute origine plutôt après la naissance (déficience du plexus choroïde ? déficience des cils qui bordent le ventricule et qui sont aussi gérés par la dynamique des microtubules ?) pour les souris *Hsf2*$^{-/-}$. La possibilité de défauts de circulation du liquide céphalorachidien lié à une hydrocéphalie ne peut donc pas être écartée. La neurodégénération et la spongiolyse est évidente chez les mutants *Hsf1*$^{-/-}$ (Santos and Saraiva, 2004; Homma *et al.*, 2007), elle l'est moins chez les mutants *Hsf2*$^{-/-}$ faute de données. Parallèlement, une réduction de l'expression de HSF1 et des HSP est observée dans de multiples régions de la souris $SOD2^{-/-}$, une souris modèle pour les maladies neurodégénératives (Lynn *et al.*, 2005), laissant présager une implication des HSF contre la neurodégénération. Et il a été démontré que HSF1 est capable de supprimer la toxicité liée à l'agrégation des protéines polyglutamine (Fujimoto *et al.*, 2005) en agissant sur différentes cibles autres que les HSP. Enfin, les cerveaux des mutants *Hsf1*$^{-/-}$ KO surexpriment la GFAP (marqueur astrocytaire) tandis qu'une dimution de l'expression est observée chez les mutants *Hsf2*$^{-/-}$ (Chang *et al.*, 2006). Les cellules astrocytaires sont responsables de la protection des neurones contre les lésions et procurent une défense antioxydante (Blakemore and Franklin, 1991; Lamigeon *et al.*, 2001). Ceci implique que les HSF pourraient avoir des effets antagonistes dans les processus de neuroprotection chez l'adulte.

L'ensemble de ces résultats montre que l'expression des HSF varie au cours du temps et selon les types cellulaires différenciées. HSF1 est exprimée majoritairement par les cellules gliales, où elle permet l'activation rapide des *Hsp* en réponse au stress et régule peut être d'autre gènes autres que les *Hsp*. Par contre, HSF2 est exprimée préférentiellement par les neurones, dont le seuil de réponse au stress est nettement plus élevé. HSF2 pourrait donc être responsable du niveau du seuil d'activation à la suite d'un stress. De plus, HSF2 pourrait moduler d'autres gènes impliqués dans la réponse au stress ou en conditions physiologiques (Rallu *et al.*, 1997; Kallio *et al.*, 2002). La fonction de HSF2 dans le cerveau néonatal reste encore à élucider.

#### 1.4.2.2 Analyses des souris *knock-out* pour le gène *Hsf2*

Trois stratégies différentes d'inactivation génique par recombinaison homologue ont été entreprises pour générer des souris mutantes pour le gène *Hsf2* par trois équipes différentes : notre équipe (Kallio *et al.*, 2002), l'équipe de I. Benjamin et E. Christians (McMillan *et al.*, 2002), et l'équipe de NF. Mievechi (Wang *et al.*, 2003). Puisque HSF2 semblait être un facteur important au cours du développement (Sistonen *et al.*, 1992; Rallu *et al.*, 1997), l'obtention de souris *knock-out* pour le gène *Hsf2* était une perspective attrayante pour comprendre la fonction de ce facteur de transcription. L'analyse des phénotypes des mutants obtenus n'est pas sans biais expérimentaux (stratégie d'inactivation génique, pénétrance de la mutation, fond génétique...), mais leur comparaison aux souris sauvages non mutantes apporte de nouveaux indices sur la fonction du facteur dans un contexte donné. De ces trois publications, ressort une fonction controversée de HSF2 au cours du développement du système nerveux central (Christians and Benjamin, 2005).

Cependant deux études démontrent un phénotype où le système nerveux central présente des anomalies (Kallio *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003).

La stratégie d'ingénierie génétique est très différente selon les équipes, mais d'une façon générale la mutation du gène *Hsf2* n'est pas létale. L'analyse des souris $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$ générée au laboratoire, obtenues par *knock-in* du gène chimère *LacZ* et du gène de résistance à la néomycine, inséré en phase dans l'exon 5 du gène *Hsf2*, ont une répartition de leur progéniture en fonction du phénotype qui suit les lois mendelliennes, aucune mortalité n'est observée. Les cerveaux adultes présentent des défauts structuraux, le ventricule latéral et le troisième ventricule sont élargis et l'hippocampe et le striatum et le cortex sont réduits (Kallio *et al.*, 2002)(Fig. 1.12), ce phénotype est totalement pénétrant sur fond C57Bl/6N (fond utilisé dans Chang *et al.,* 2006). Il était déjà très pénétrant sur font C57Bl/6N x 129 Sv (Fond utilisé dans Kallio *et al.,* 2002).

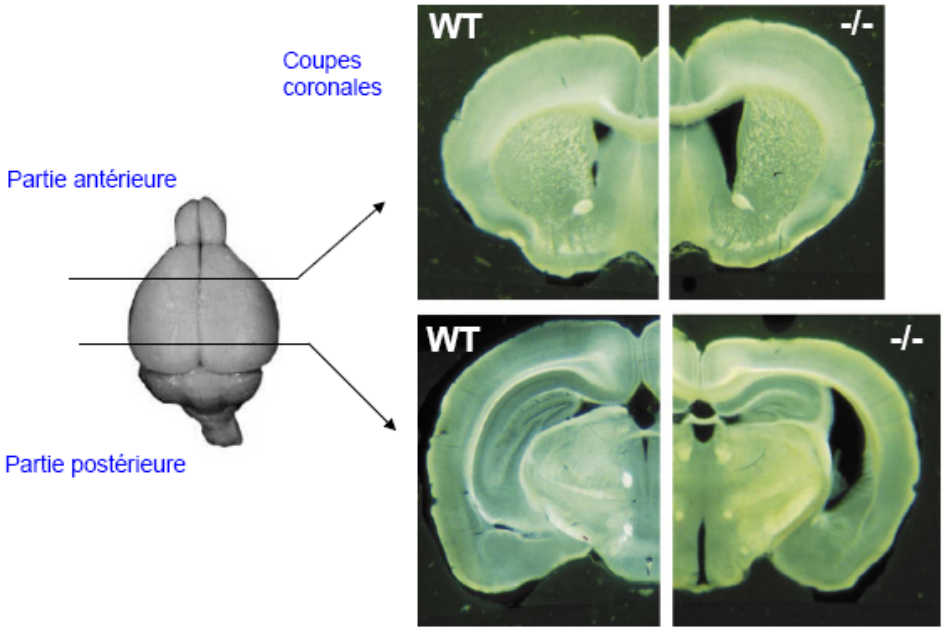



**Fig. 1.12 – Défauts du télencéphale des souris adultes $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$.** L'analyse des mutants $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$ a montré que les adultes présentaient un amincissement du cortex, des ventricules élargis et une réduction de l'hippocampe vue sur ses coupes coronales de cerveaux adultes $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$. Ce phénotype est plus modéré chez les souris $Hsf2^{gfp/gfp}$ (Wang *et al.,* 2003) et non observé chez les souris $Hsf2^{neo/neo}$ (McMillan *et al.,* 2002). D'après Kallio *et al.,* 2002.

Les souris $Hsf2^{gfp/gfp}$ sont générées par *knock-in* du transgène codant pour la GFP/neo dans l'exon1 (nucléotides 1-49) du gène *Hsf2* sur fond génétique C57Bl6J (Wang *et al.*, 2003). Pour éviter toute potentielle interférence avec la néomycine, les souris sont croisées avec des souris exprimant le gène de la Cre pour enlever le marqueur de sélection. Mais l'expression de la cre recombinase n'est pas sans problème, une toxicité liée au site d'insertion de la Cre ou à son activité sur certains sites critiques existant dans le génome est possible. Contrairement aux souris $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$, une augmentation de la létalité est

remarquée entre E7.5 et la naissance dans la progéniture des souris $Hsf2^{gfp/gfp}$. Mais les profils des gènes rapporteurs suivent bien l'expression de la protéine HSF2 dans les deux études. Les embryons $Hsf2^{gfp/gfp}$ montrent de plus, des défauts dans le système ventriculaire, et des hémorragies cérébrales sont observées avec une fréquence de 5 pour 20. Certains embryons mutants ont des défauts de fermeture de la partie postérieure du tube neural à E9.5. Ces défauts peuvent résulter d'un retard de la neurulation, ce n'est donc pas forcément un défaut irréversible. Par contre, l'étude ne donne pas la fréquence à laquelle sont observés de tels défauts. Dans la suite du développement des mutants $Hsf2^{gfp/gfp}$, les anomalies sont retrouvées avec une plus faible incidence mais le pourcentage de mortalité est plus important après la naissance. Les adultes $Hsf2^{gfp/gfp}$ ne présentent pas de majeures altérations du comportement ou de la morphologie. Par contre, des anomalies du système nerveux sont observées puisque 33% des adultes $Hsf2^{gfp/gfp}$ ont le ventricule latéral et troisième ventricule élargis, entrainant la compression de l'hippocampe, du thalamus, du cervelet. A la différence de l'étude des souris $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$, les observations sont quantifiées, le phénotype semble toutefois plus modéré que celui des souris $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$. Wang *et al.* supposent que ces anomalies pourraient découler de défauts plus précoces durant la gestation puisque la mutation du gène *Hsf2* est létale pour certains embryons à partir de E7,5 et que des défauts de formation du tube neural sont observés à E9,5.

La troisième stratégie consistait en l'insertion d'une cassette néomycine insérée dans le premier exon (McMillan *et al.*, 2002). L'analyse des mutants $Hsf2^{neo/neo}$ ne montrent pas de différences avec les souris sauvages, ni au niveau morphologique ni au niveau comportemental sur fond génétique C57Bl/6J. Cette équipe est, à l'heure actuelle, la seule à avoir réalisé une étude du comportement des souris mutantes pour le gène *Hsf2*.

En conclusion, l'analyse des souris KO pour le gène *Hsf2* montre une grande divergence de phénotype. De tels résultats ne sont pourtant pas si étonnants puisque les stratégies de *knock-out* sont différentes. Mais surtout, le fond génétique des souris, différent dans ces études et connu pour influencer le phénotype, comme la variabilité des facteurs environnementaux (alimentation, parasites...) pourraient expliquer les différentes analyses des souris $Hsf2^{-/-}$ (McMillan *et al.*, 2002), nous le discuterons dans la partie Résultats. Par contre, l'expression des *Hsp* n'est pas affectée chez les mutants $Hsf2^{-/-}$ et les expériences de puces à ADN (Wang *et al.*, 2003) montrent que, dans le système nerveux en développement, HSF2 a des cibles distinctes des *Hsp*.

## 1.5 Conclusion

Un certain nombre d'observations soutiennent l'hypothèse que HSF2 pourrait être impliqué au cours du développement du système nerveux. De part son profil d'expression et d'activité, HSF2 est présent dans les structures neurales au cours du développement chez les Mammifères, mais aussi chez le poisson zèbre et le poulet (Kawazoe *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 2006). HSF2 est exprimée dans les zones prolifératives du tube neural, du cerveau en développement (Rallu *et al.*, 1997; Kallio *et al.*, 2002). La protéine est exprimée et active au

stade blastocyste, dans les cellules totipotentes ES comme dans les cellules de carcinomes embryonnaires (EC) activement prolifératives (Mezger *et al.*, 1994; Mezger *et al.*, 1994). Chez l'adulte, l'activité constitutive de HSF2 disparaît. Cette diminution de l'expression de HSF2 peut être rapprochée à celle observée lors de la différenciation des fibroblastes par exemple. Il a donc été supposé que HSF2 pouvait être impliqué dans les processus de prolifération, survie ou différenciation cellulaire. Mais le rôle et les mécanismes d'action de HSF2 restaient à élucider.

# Chapitre 2

# Le développement du cortex cérébral

Le système nerveux représente l'ensemble des structures neurales mises en connexion dans l'organisme. Il coordonne l'activité des muscles, contrôle les organes, mais aussi transmet ou stoppe les informations sensorielles et motrices. Classiquement se distingue le système nerveux central (intégration et traitement de l'information) du système nerveux périphérique (acquisition de l'information et transmission de la réponse). Le système nerveux central (SNC) se compose du cerveau et de la moelle spinale (ou moelle épinière).

Le développement du SNC se déroule en trois grandes périodes. La première période est définie par une phase d'individualisation de la plaque neurale formant le tube neural, qui se régionalise dans sa partie antérieure pour constituer le cerveau. Puis une période de prolifération des cellules associée à une expansion des structures par migration cellulaire façonne notamment le télencéphale. Finalement, s'opère la différenciation des neurones en place, l'axogenèse, la dendritogenèse, la synaptogenèse, *etc.* Nous nous focaliserons sur le développement du tube neural puis du cortex cérébral, cadre de notre étude.

## 2.1 Formation et régionalisation du système nerveux central

### 2.1.1 Formation et régionalisation du tube neural

#### 2.1.1.1 Neurulation

Chez les Vertébrés, après gastrulation, l'organisation de l'embryon aboutit à trois feuillets : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. L'ectoderme (ou ectoblaste) décrit un territoire présomptif particulier. En effet, ce feuillet le plus externe, donnera l'épiderme et ses dérivés comme les placodes sensorielles (ébauches des organes sensoriels) et sera à

l'origine du système nerveux. La neurulation est le processus qui permet la formation du tube neural chez l'embryon. Pour les Chordés, seule la partie dorsale par rapport au tube digestif et à la chorde donnera le système nerveux. En effet, cette partie de l'ectoderme dorsal va devenir l'ectoderme neural puis ses cellules seront distinguées par leur apparence en colonnes. La formation du tube neural se déroule selon deux processus : la neurulation primaire va donner les régions cervico-thoraciques de la moelle épinière et la neurulation secondaire par cavitation va donner les régions lombaires et sacrées (Douarin *et al.*, 1998).

Au cours de la neurulation primaire, la plaque neurale subit une succession d'évènements morphogénétiques qui l'amène à se replier pour former le tube neural (Colas and Schoenwolf, 2001)(Fig.2.1). Il existe cependant des variations dans les processus de neurulation des Vertébrés. La fermeture du tube neural des Anmiotes n'a pas lieu de façon simultanée le long de l'axe antéropostérieur de l'embryon comme chez les Amphibiens et les Téléostéens. Au cours de l'embryogenèse des Oiseaux, la neurulation débute dans la région du mésencéphale (partie antérieure du tube) puis progresse rostralement et caudalement. Cette chronologie de fermeture du tube neural asynchrone permet d'observer sur un même embryon différentes étapes. Par exemple, au stade 10HH de l'embryon de poulet (Hamburger and Hamilton, 1992) les états plaque neurale, gouttière neurale et tube neural coexistent le long de l'axe antéropostérieur. Cet embryon constitue de ce fait un modèle de choix pour l'étude des mécanismes qui régissent les phases précoces de la maturation de la moelle épinière. Tandis qu'au cours du développement des Mammifères, la fermeture du tube est initiée en différents points le long de l'axe antéro-postérieur et progresse de la même façon.

#### 2.1.1.2 Développement du tube neural

Le tube neural se renfle d'avant en arrière et forme trois vésicules primaires (Fig. 2.2) : le prosencéphale (*forebrain*), le mésencéphale (*midbrain*) et le rhombencéphale (*hindbrain*).

Ces vésicules subissent une inclinaison vers l'avant (à concavité ventrale) due à deux sillons qui déterminent une courbure mésencéphalique et une courbure cervicale (entre la moelle et le rhombencéphale)(Fig. 2.3). Ces trois vésicules cérébrales primaires sont à l'origine du SNC à l'exception de la moelle épinière. Les organes sensoriels proviennent de différentes évaginations du tube neural. Les vésicules optiques s'évaginent à partir de l'épithélium neural du prosencéphale et induisent les placodes cristallines dans l'ectoblaste. Les placodes olfactives sont induites par le mésoblaste adjacent, puis par deux évaginations de l'épithélium neural (les bulbes olfactifs) de la région du prosencéphale. Les vésicules otiques, se développent dans l'ectoblaste adjacent au rhombencéphale, par évagination de placodes otiques induites par l'épithélium neural du myélencéphale.

Par la suite, le prosencéphale se subdivise dans la partie antérieure en télencéphale et en diencéphale plus caudal (Fig. 2.2). Le télencéphale est formé ensuite par les hémisphères cérébraux et le diencéphale par le thalamus et les régions hypothalamiques. Alors que

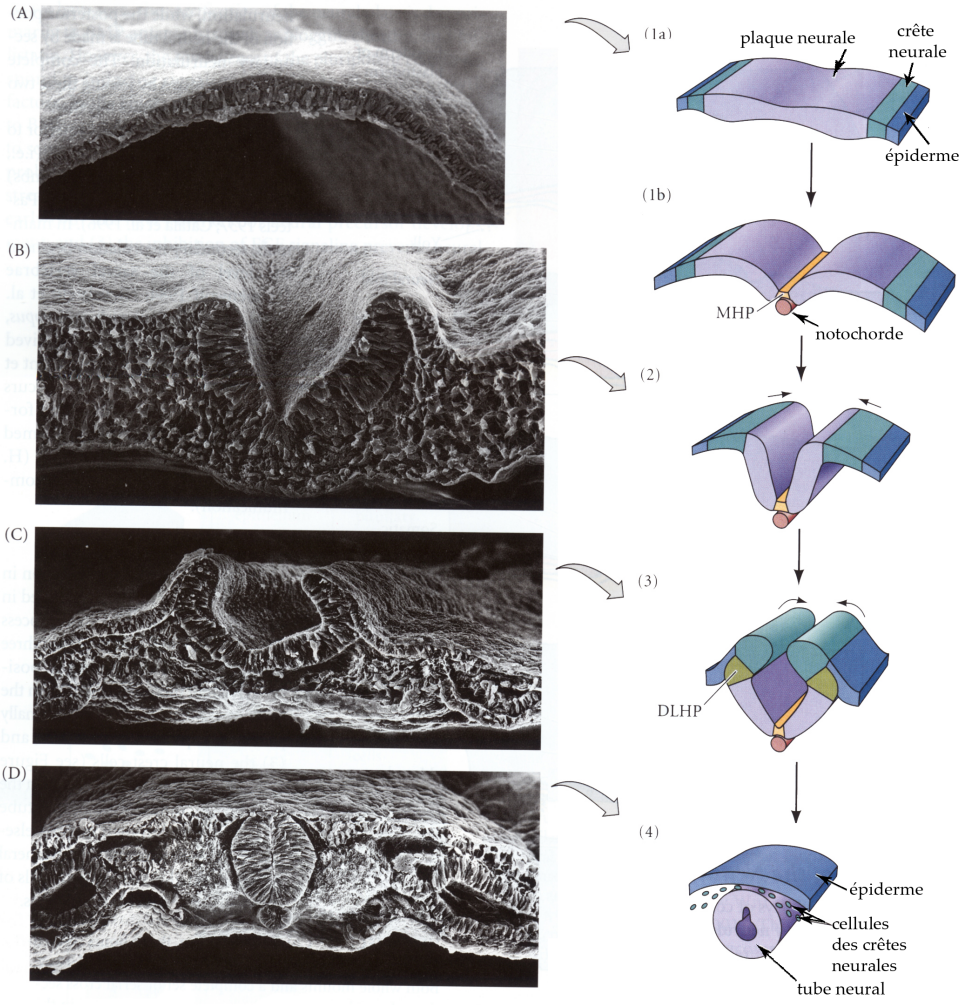



**Fig. 2.1 – Principales étapes de la neurulation chez le Poulet.** La plaque neurale se forme à partir de la partie médiane dorsale de l'ectoderme (A) et (1a), qui se plie au niveau d'un point charnière MHP (*medial neural hinge point*) situé au dessus de la notochorde (1b). A la suite de processus d'invagination, la plaque se creuse progressivement et les bourrelets neuraux se soulèvent (B) et (2). La fermeture complète par fusion des bourrelets neuraux (C) et (3), mène à la formation du tube neural (D) et (4). Lorsque les bourrelets neuraux convergent, les crêtes neurales se forment puis se dispersent, laissant le tube neural séparé de l'épiderme. *D'après Developmental Biology, Gilbert, Edition7.*

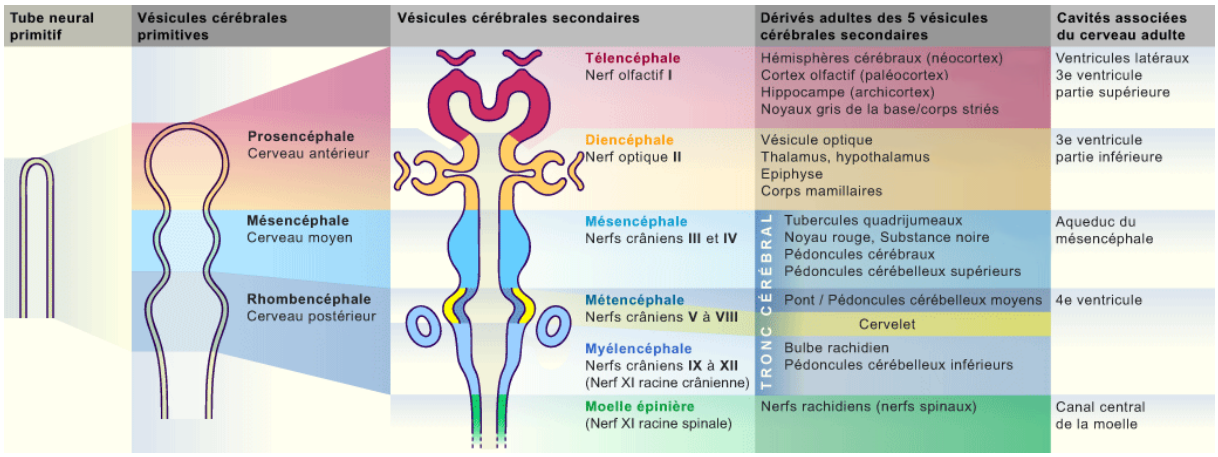



**Fig. 2.2 – Formation du système nerveux central.** Au cours de l'embryogenèse, le tube neural se renfle pour former trois vésicules primitives comme schématisé à gauche, dont certaines, par la suite, se subdivisent pour former cinq vésicules cérébrales secondaires. Les dérivés adultes de chaque structure sont décrites à droite. D'après *http ://www.embryology.ch*

le rhombencéphale se divise pour former le métencéphale et le myélencéphale. Seul le mésencéphale ne se divise pas. La partie antérieure du tube est alors constituée de 5 vésicules secondaires (Fig. 2.2). Les courbures mésencéphalique et cervicale s'accentuent et une courbure pontique dorsale se dessine entre le myélencéphale et le métencéphale.

La segmentation du rhombencéphale et de la moelle épinière ne conduit pas à la formation de ventricules comme dans les régions antérieures du tube neural mais à de multiples structures spécialisées. Notamment les cellules du métencéphale et du myélencéphale dérivent des crêtes neurales qui s'agrègent en huit segments distincts, appelés rhombomères (Fig. 2.3). La segmentation des ces structures est en relation avec l'expression des gènes homéotiques responsables du plan d'organisation de l'organisme.

### 2.1.1.3 Mécanismes moléculaires d'induction du tube neural

L'induction de la neurulation se fait sous l'influence du centre organisateur, le nœud de Hensen chez les Mammifères et les Sauropsidés (centre de Spemann chez les Amphibiens)(Sherbet and Lakshmi, 1967; Beddington, 1994). Cette structure est capable et suffisante pour induire le tissu neural (Stern, 2005). En effet, il stimule l'expression de gènes antériorisants requis pour le développement normal de la tête précoce, comme Noggin et Chordin, ainsi que Follistatin et inhibe les *Bone morphogenetic proteins* (BMP), responsables de la différenciation épidermique au dépens du destin neural (Stern, 2005).

La plaque neurale, une fois initiée, acquiert des caractéristiques différentes se subdivisant en territoires qui définiront les structures fonctionnelles futures du SNC (Rubenstein *et al.*, 1998; Kiecker and Lumsden, 2005). Cette organisation dépend des axes longitudinal et transversal qui façonnent l'embryon et qui s'établissent dès la régression du

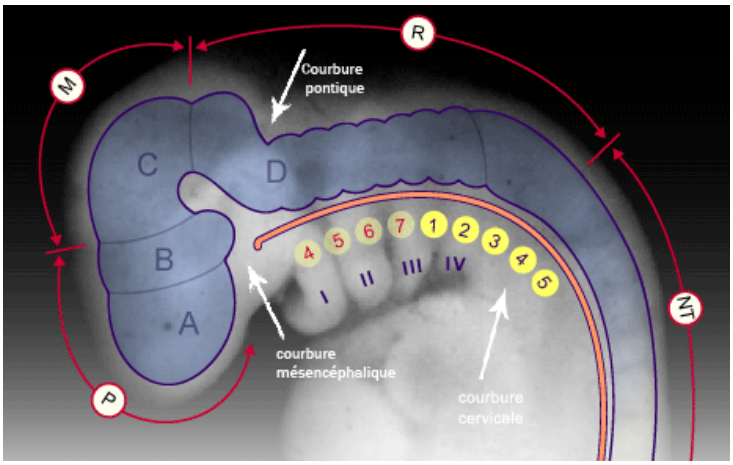



**Fig. 2.3 – Segmentation transitoire du SNC**. La partie rostrale du tube neural montre des signes de segmentation transitoire (neuromères ou prosomères : A, B, C, D). Ces neuromères appelés rhombomères dans le rhombencéphale (D) contiennent des unités de neurones spécifiés quant à leur futur organe cible. La chorde est schématisée en orange. 4-7 : somitomères ; 1-5 : somites 1 à 5 (à ce stade 14, les 30 somites sont formés) ; I - IV arcs branchiaux ; P :prosencéphale ; M : mésencéphale ; R : rhombencéphale ; NT :tube neural ; ABCD : neuromères. D'après *http ://www.embryology.ch*

nœud de Hensen. L'association d'un profil spécifique antéropostérieur (A/P) à un patron dorsoventral (D/V) spécifie une identité unique pour chaque structure. Les mécanismes généraux de la mise en place de l'axe dorso-ventral D/V dépendent du gradient d'expression SHH (*Sonic Hedgehog*) dans la partie ventrale et de la source dorsale des BMP (Shimamura and Rubenstein, 1997). Dans le prosencéphale, SHH est exprimé depuis la plaque préchordale (PrCP). La PrCP est un dérivé mésodermique du nœud qui constitue l'axe antérieur du mésoderme axial et la plaque neurale. D'autres observations suggèrent qu'il existerait d'autres signaux non identifiés. Un signal postériorisant du tube neural serait transmis par l'acide rétinoïque et la signalisation *Wingless/Int* WNT (Niederreither *et al.*, 2000; Rallu *et al.*, 2002; Begemann *et al.*, 2004) et le *Fibroblast Growth Factor* FGF (Doniach, 1995; Dubrulle and Pourquié, 2004) . Par la suite, l'expression de gènes homéotiques comme LIM1 et OTX2 sont essentielles au développement des structures antérieures (Ang *et al.*, 1994).

Trois mécanismes assurent l'identité du télencéphale, l'expression localisée de signaux inducteurs de l'identité rostrale, leur inhibition localisée et la mise à l'écart des signaux caudalisants (Wilson and Houart, 2004). En effet, la mise en place de barrières de signalisation permet de préserver le cerveau antérieur des signaux postériorisants (Beddington and Robertson, 1998).

#### 2.1.1.4 Organisation du tube neural

Le tube neural se compose d'un neuroépithélium pseudo-stratifié, où chaque cellule s'étend sur toute l'épaisseur de cette structure(Fig. 2.1, 1D). Les cellules au sein du neuroépithélium en prolifération, définissent la zone ventriculaire. Les noyaux de ces cellules effectuent une migration le long de l'axe apico-basal appelée migration intercinétique (Fig.2.4). La position des noyaux est en étroite relation avec les phases du cycle cellulaire. Les cellules en mitose sont proches de la lumière du tube neural et les noyaux des cellules en phase S sont situés dans la moitié basale du neuroépithélium (Hollyday, 2001).

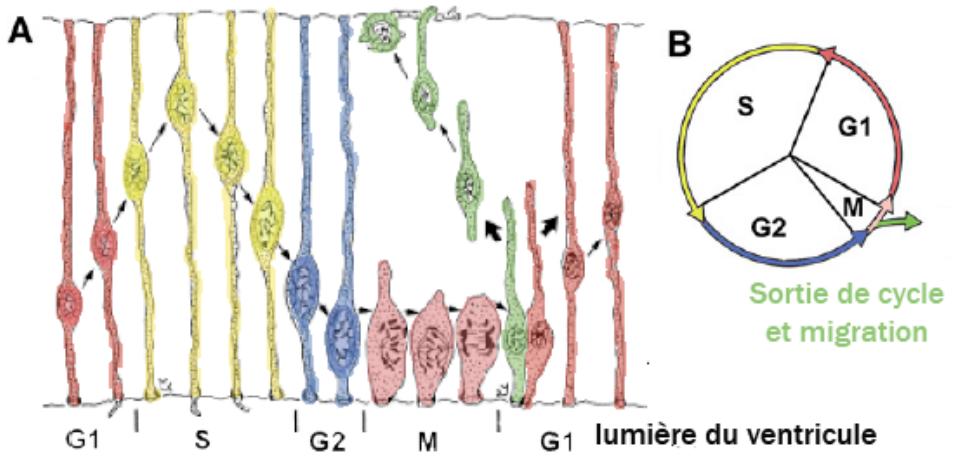



**Fig. 2.4 – Les migrations nucléaires intercinétiques du neuroépithélium**. A. Lorsque les cellules quittent la phase S pour rentrer en phase G2 du cycle cellulaire, leur noyau migre vers la lumière du tube. A l'entrée en mitose, les cellules sont proches du ventricule et perdent leur attachement à la lame basale et s'arrondissent pour se diviser. Après cytokinèse, les cellules filles entrent dans un autre cycle ou quittent le cycle cellulaire pour se différencier. Les cellules filles qui restent dans le cycle cellulaire (phase G1) ont leur membrane qui s'étend vers la lame basale et leur noyau migre avant un nouveau cycle. Les cellules qui quittent le cycle cellulaire perdent, ou ne renouvellent pas, leur attachement coté apical et migrent du coté basal pour se localiser en bordure des cellules en prolifération, dans la zone sous ventriculaire. B. Schématisation du cycle cellulaire. D'après Guerrier et Polleux, 2007

La présence des somites et de la notochorde dans l'environnement du tube neural, génère la polarisation dorso-ventrale du tube neural. Notamment, sonic hedgehog SHH est produit par la chorde puis par la plaque du plancher (partie ventrale du tube) et diffuse dans le tube neural en un gradient. SHH peut induire de façon dose-dépendante la différenciation de toutes les populations ventrales de neurones de la moelle épinière *in vitro*, il existe donc une corrélation entre la position D-V occupée par les précurseurs d'une population de neurones donnée et la dose de SHH requise pour induire la différenciation de cette même population (Jacob and Briscoe, 2003).

Aux deux extrémités dorso-ventrale de la moelle épinière en développement se trouvent des groupes de cellules qui ne génèrent pas de neurones : la plaque du toit, située dans la partie la plus dorsale et la plaque du plancher située dans la partie la plus ventrale. La région entre ces deux plaques opposées est dense en neuroblastes (précurseurs neuronaux), qui génèrent les différents types de neurones dont la localisation définit leurs fonctions. Ainsi les neurones moteurs et certaines classes d'interneurones sont situés dans la moitié ventrale (plaque basale) de la moelle épinière. Plusieurs populations d'interneurones sensoriels et les neurones commissuraux sont localisés dans la partie dorsale (plaque alaire). Les cellules de la crête neurale issues de la partie dorsale du tube neural vont migrer pour former, entre autre, le système nerveux périphérique. Chaque sous-type de neurones est caractérisé par des marqueurs moléculaires. Deux classes de marqueurs moléculaires se distinguent, ceux exprimés dans la zone ventriculaire et marquant les précurseurs neuraux en prolifération (comme Math1, Ngn1/2, *etc.*) et ceux exprimés dans la zone du manteau où les neurones sont en cours de différenciation (comme Brn3, En1 etc.) (Fig 2.5) (Wilson and Maden, 2005). Le profil d'expression dorso-ventral est donc essentiel à la bonne organisation du tube neural.

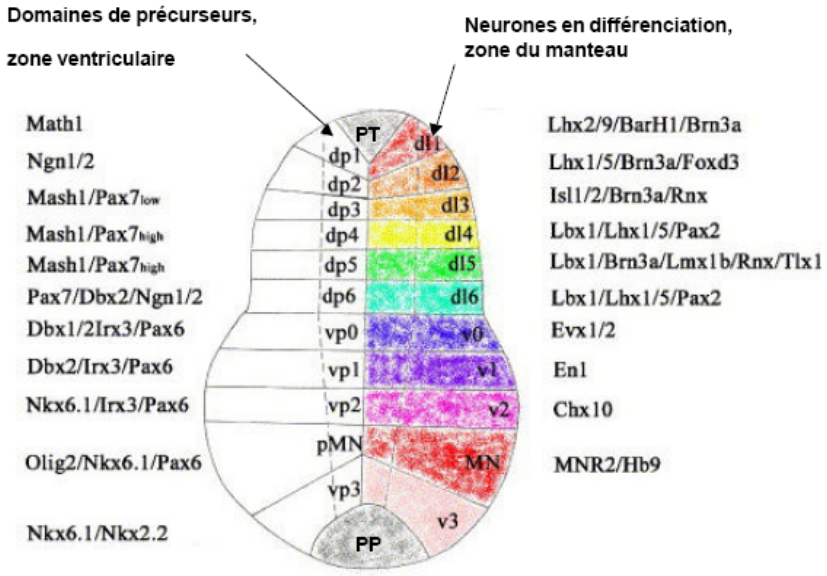



**Fig. 2.5 – Organisation dorso-ventrale de la moelle épinière.** Dans le domaine le plus dorsal se trouve la plaque du toit (PT), dans le domaine le plus ventral, la plaque du plancher (PP). Dans la partie ventrale, 5 domaines progéniteurs (p0-3 et pMN) donnent naissance à 5 sous-types de neurones matures (VO-3 et MN). Dans la partie dorsale, 6 domaines progéniteurs (dp1-6) donnent naissance à 6 types d'interneurones (dl1-6). Sur la gauche, sont indiqués les marqueurs moléculaires spécifiques de chaque sous-type de précurseurs de la zone ventriculaire, et sur la droite est précisé ceux des types neuronaux en différenciation de la zone du manteau. D'après Wilson *et al.,* 2005.

### 2.1.2 Régionalisation du télencéphale

Le télencéphale dérive de la partie la plus antérieure du tube neural. Dans les vésicules télencéphaliques, deux domaines se distinguent, un domaine dorsal ou *pallium* où se différencie le cortex cérébral, et un domaine ventral ou *subpallium*.

Dans le *subpallium*, différentes régions se distinguent : les ganglions de la base, le striatum et le globus pallidum. Ils se développent à partir des éminences ganglionnaires latérale (EGL) et médiane (EGM) (Puelles *et al.*, 2000; Marín *et al.*, 2001). Le *pallium* au cours des stades précoces reste une structure neuroépithéliale tandis que le *subpallium*, plus épais, est constitué déjà d'une zone ventriculaire prolifération et d'une large zone post-mitotique, le manteau. Le pallium est constitué des territoires présomptifs du cortex cérébral (néocortex), du cortex piriforme (paléocortex) et de l'hippocampe (archicortex). Le *pallium* et le *subpallium* sont séparés par une frontière médio-ventrale dont le maintien est important pour la formation des deux structures, exprimant des facteurs de transcription différents et antagonistes.

#### 2.1.2.1 Facteurs de transcription exprimés dans le télencéphale

D'après l'analyse du profil d'expression de différents facteurs de transcription, un modèle a été établi où le télencéphale et le diencéphale sont compartimentés en 6 domaines appelés prosomères ou neuromères (Puelles *et al.*, 1987; Bulfone *et al.*, 1993; Figdor and Stern, 1993; Puelles and Rubenstein, 1993; Rubenstein *et al.*, 1994). Ce modèle prosomérique (Rubenstein *et al.*, 1994) établit une corrélation entre la carte des territoires présomptifs du télencéphale et le profil d'expression de facteurs de transcription spécifiques de l'identité de chaque région du télencéphale. Le télencéphale se subdivise en une compartimentation plus fine qui exprime des facteurs spécifiques, conférant une identité moléculaire différente entre *pallium* et *subpallium*. Par exemple, PAX6 et GSH2 sont exprimés respectivement dans le *pallium* et dans le *subpallium* et activent l'expression de gènes *bHLH* (*basic Helix-loop-Helix*)(Fig. 2.6). PAX6 active l'expression des *Ngn* (Neurogénine), et GSH2 active celle de *Mash1* (*mouse achaete-scute homologue1*), les facteurs proneuraux NGN et MASH1 contrôlent le devenir des neurones dans un territoire donné (Parras *et al.*, 2002). Ainsi l'invalidation du gène *Pax6* conduit à réduire l'expression des Ngn1/2 et entraîne une expression dorsale ectopique de Mash1 (Yun *et al.*, 2001). Ceci démontre l'établissement de réseaux parallèles de régulation initiant un devenir soit dorsalisant soit ventralisant.

#### 2.1.2.2 Contrôle de la frontière cortico-striatale

Comme nous l'avons vu, les gènes exprimés dans le *pallium* et le *subpallium* confèrent une identité moléculaire spécifique de chaque territoire. La régionalisation dorso-ventrale du télencéphale dépend notamment de l'expression de PAX6 et GSH2 qui se répriment

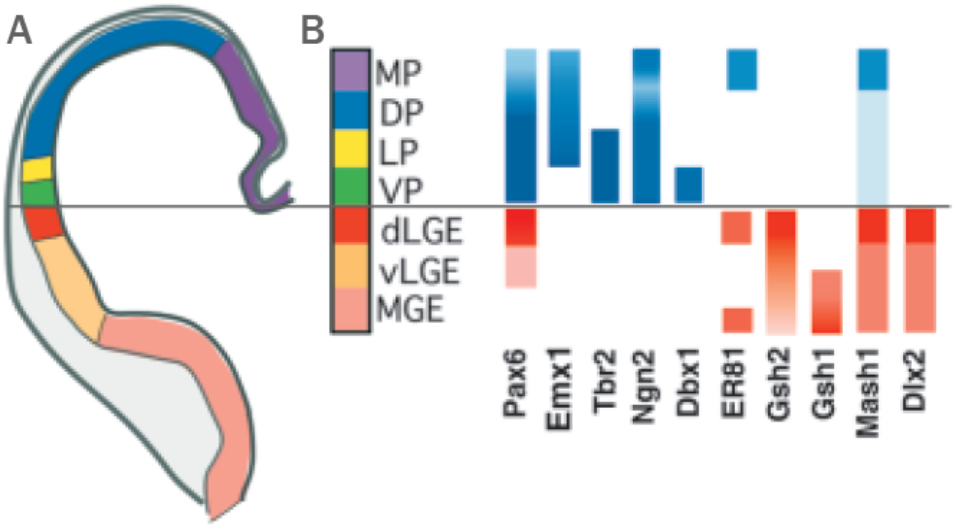



**Fig. 2.6 – Marqueurs palliaux et subpalliaux.** (A). Représentation des territoires présomptifs télencéphaliques montrés ici sur sur une hémi-coupe de télencéphale de souris à E13,5. (B). Profil d'expression des marqueurs palliaux et subpalliaux. La ligne central identifie la frontière cortico-striatale. L'intensité des couleur définit le niveau d'expression du facteur. DP : pallium dorsal ; MP : pallium médian ; PL : pallium latéral ; PV : pallium ventral ; dLGE : éminence ganglionnaire latérale dorsale ; vLGE : éminence ganglionnaire latérale ventrale ; MGE : eminence ganglionnaire médiane ; TS : tige télencéphalique. D'après Yun *et al.,* 2001.

mutuellement à la frontière pallio-subpalliale qui délimite les térritoires ventraux et dorsaux du télencéphale (Rallu *et al.*, 2002). Par la suite, Ngn, Mash1 et Dlx1/2 se répriment mutuellement et participent à l'établisssement et au maintien de cette frontière. Les inhibitions réciproques des facteurs de transcription indispensables à l'établissement et au maintien des structures palliale et subpalliale établissent une frontière précise d'expression. Ces frontières dorso-ventrales sont établies très tôt au cours du développement. L'axe D/V se crée en fonction de la notochorde et de la plaque préchordale (Sussel *et al.*, 1999; Casarosa *et al.*, 1999; Toresson *et al.*, 2000; Mallamaci *et al.*, 2000; Stoykova *et al.*, 2000; Rallu *et al.*, 2002; Schuurmans and Guillemot, 2002). La frontière palliale et subpalliale est constituée notamment de cellules exprimant DBX1, cellules à l'origine des cellules de Cajal-Retzius dont nous parlerons plus loin (Bielle *et al.*, 2005). Les propriétés particulières de la frontière semblent restreindre les échanges cellulaires entre le *pallium* et *subpallium*, ne permettant que la migration des futurs interneurones corticaux depuis les éminences ganglionnaires vers le cortex. Tous les mécanismes de l'établissement et du maintien de cette frontière ne sont pas encore élucider.

#### 2.1.2.3 Centres organisateurs du télencéphale

Comme dans la moelle épinière, l'expression des gènes de développement dans le télencéphale est régulée par des centres organisateurs. En effet, les plaques du toit et du

plancher sécrètent des molécules morphogènes aux activités respectivement dorsalisante et ventralisante.

A la suite de la fermeture du tube neural, le toit constitué par l'ourlet cortical (*cortical hem*) exprime les BMP (*Bone Morphogenic protein*) et les WNT (*Wingless/Int-1*) (Furuta *et al.*, 1997; Grove *et al.*, 1998). La signalisation BMP participerait à la différenciation du plexus choroïde (partie sécrètant le liquide céphalo-rachidien), tandis que WNT régulerait la prolifération cellulaire du pallium (Kuschel *et al.*, 2003). La balance prolifération *versus* différenciation est donc assurée par l'hème. Cependant, ce centre organisateur n'est présent qu'en position médio-caudale, la partie rostrale du télencéphale est donc soumise à d'autres signaux régulateurs.

Le mésoderme préchordal sécrète le facteur *Sonic Hedgehog* (SHH) qui régule le développement des structures ventrales (Muenke and Beachy, 2000). Puis SHH est sécrété par les domaines ventraux du télencéphale où il contrôle le développement des éminences ganglionnaires et la spécification des oligodendrocytes (Murray *et al.*, 2002). Les facteurs de transcription de la famille des GLI sont des médiateurs de la voie SHH impliqués dans de nombreux évènements développementaux, dont GLI3 qui a un rôle central dans la régionalisation du télencéphale (Rallu *et al.*, 2002). SHH a donc une action ventralisante.

Il existe un troisième centre organisateur situé à l'extrémité du télencéphale, le bourrelet neural antérieur (*Anterior Neural Ridge*, ANR). Ce centre sécrète différents facteurs de croissance *Fibroblast Growth Factor* FGF (Bachler and Neubüser, 2001), notamment FGF8 qui régule l'expression de PAX6 et réprime l'expression de EMX2 et de OTX1 (Bertrand *et al.*, 2000). L'ANR sécrète de plus WNT qui agit en amont des facteurs de transcription déterminant l'identité télencéphalique (Backman *et al.*, 2005), permettant le maintien de la prolifération des progéniteurs corticaux et interagissant par la suite avec FGF et SHH pour réguler la différenciation (Hirabayashi *et al.*, 2004).

Des régulations croisées existent entre BMP, FGF et SHH dans le prosencéphale, et une balance d'expression spécifique de ces facteurs permet le développement du télencéphale (Yoshida and Toya, 1997; Mallamaci *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2002; Muzio and Mallamaci, 2003).

### 2.1.3 Régionalisation du cortex cérébral

Le cortex cérébral se développe comme nous l'avons vu à partir de la partie dorsale du télencéphale. Trois territoires chez l'adulte se distinguent : l'archicortex, le paléocortex et le néocortex qui se distinguent par leur architecture. Le néocortex dont nous parlerons, est caractérisé par une structure laminaire de six couches cellulaires tandis que l'archicortex et le paléocortex qui forment l'allocortex ne possèdent que 4 couches moins clairement individualisées que celles du cortex. Le cortex cérébral est régionalisé en différentes aires fonctionnelles qui se distinguent par leur organisation structurelle et par leurs connexions afférentes/efférentes.

#### 2.1.3.1 Organisation du cortex cérébral

Le cortex cérébral reçoit les afférences (informations entrantes) du thalamus et d'autres régions du cortex cérébral. Les efférences (informations sortantes) du cortex cérébral sont dirigées au travers de la ganglia basale et d'autres régions du cortex, du thalamus, de la moelle épinière et du noyau pontique. La ganglia basale reçoit les afférences excitatrices de l'aire corticale et joue un rôle majeur dans les mouvements volontaires. Dans le cerveau de souris embryonnaire, elle se divise en éminences ganglionnaires médiane (MGE) et latérale (LGE) (Schuurmans and Guillemot, 2002). La majorité des neurones de la ganglia basale sont des neurones inhibiteurs GABAergiques (Narboux-Nême and Wassef, 2003) qui migrent dans le cortex cérébral.

Le cortex cérébral est organisé en aires qui sont rdéfinies anatomiquement et fonctionnellement par des processus distincts (aire visuelle, aire somatosensorielle, aire auditive, *etc.*). A la fin de la neurogenèse, les couches corticales comprennent des neurones glutamatergiques aux morphologies et aux propriétés connectives distinctes (Fig. 2.7), à l'exception de la couche I, qui est occupée par les dendrites des cellules des couches inférieures du cortex ou par les axones qui la traversent et forment des connections avec cette couche. D'une façon simplifiée, les couches II et III se projettent vers les couches V et VI (et réciproquement), ces couches assurent les connexions cortico-corticales. La couche IV dont les afférences proviennent principalement du thalamus se projette vers les couches II et III. Enfin, les couches V et VI reçoivent les afférences des autres couches et projettent vers les structures sous-corticales (thalamus...) (Donovan and Dyer, 2005). La fonction de l'organisation laminaire du cortex peut être envisagée sous une autre approche connectiviste du cortex. En effet, les différentes aires corticales n'ont pas la même organisation laminaire. Pour exemple, le cortex moteur primaire renferme une couche IV plus mince que celle du cortex visuel primaire qui peut être subdivisé en trois sous-couches. Cette différence de lamination s'explique par les différences de projections qui y siègent. La couche IV est la principale couche cible des informations sensorielles provenant du thalamus. Au contraire, le cortex moteur est principalement une zone efférente du cortex et reçoit peu d'informations sensorielles directement du thalamus.

#### 2.1.3.2 Modèles du protocortex et de la protocarte

La formation des aires corticales a été décrite par deux modèles, le modèle du protocortex ou *tabla rasa* développé par Van der Loos et Woolsey (1973) puis O'Leary (1989) et le modèle de la protocarte de Rakic (1988) (Rakic, 1988; O'Leary, 1989; Mallamaci and Stoykova, 2006).

Dans le modèle du protocortex, l'organisation corticale reflète l'ensemble des informations extrinsèques qui parviennent au cortex. En d'autres termes, le cortex cérébral est un tissu naïf qui, en recevant les influences extérieurs, les projections neuronales, s'organise en régions fonctionnelles. En revanche, le modèle de la protocarte se base sur l'existence d'informations régionalisant le cortex cérébral indépendamment des informa-

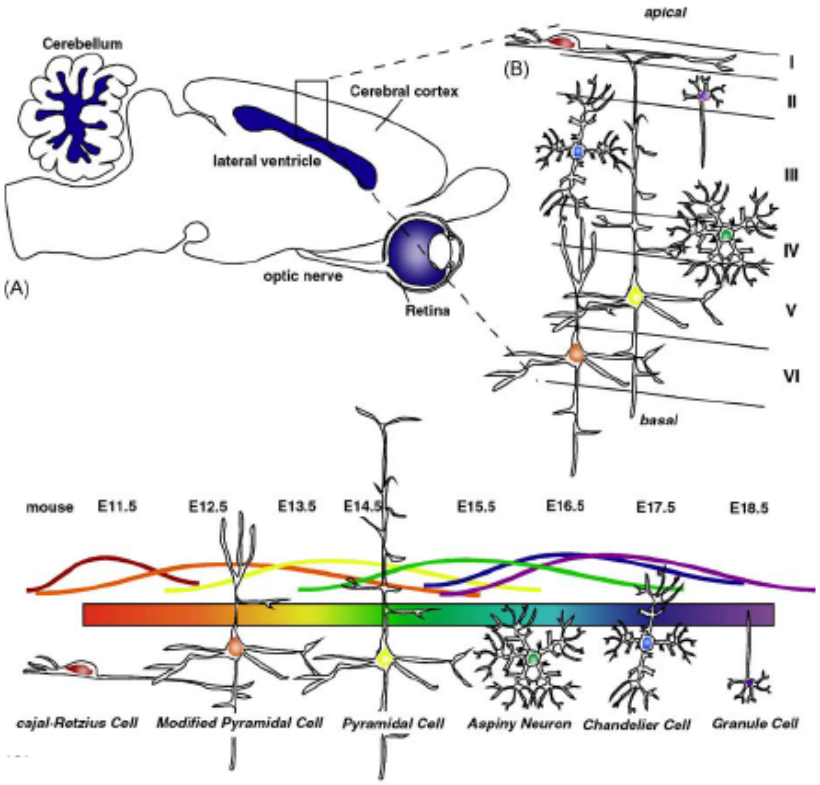



**Fig. 2.7 – Organisation du cortex adulte.** (A) Le cortex cérébral des souris adultes est composé d'une hétérogénéité de populations cellulaires organisées en 6 couches laminaires (B). (C) Les analyses de *Birthdating* (suivi de la descendance des cellules ayant incorporé du BrdU) ont permis de reconstituer la chronologie de génération des différents types de neurones spécifiques à une couche donnée. Seuls les neurones glutamatergiques sont représentés ici, les interneurones GABAergique s'ajoutent à cette organisation (E10 et E16) ainsi que les cellules gliales (E18-P0). D'après Donovan *et al.,* 2005

tions extrinsèques. Dès le début de la formation du cortex cérébral, les cellules de la zone ventriculaire seraient instruites et contiendraient l'information leur permettant de définir les futures aires. Ces informations seraient transmises point par point par migration radiaire dans la plaque corticale reproduisant le schéma d'organisation corticale.

A l'heure actuelle, une synthèse des deux modèles est proposée, la régionalisation du cortex cérébral se ferait alors en deux temps. Une régionalisation précoce s'établit en absence d'afférences extrinsèques. Par la suite, cette organisation est raffinée notamment dans les aires sensorielles primaires par des facteurs extérieurs, essentiellement les afférences thalamiques.

#### 2.1.3.3 Régionalisation antéro-postérieure

De nombreux gènes sont impliqués dans l'identité des territoires dorsaux du télencéphale. Notamment PAX6 et EMX2 sont exprimés en gradients opposés (Bishop *et al.*, 2000). Les souris dont les gènes *Pax6* et *Emx2* sont inactivés montrent une re-spécification intégrale du tissu présomptif du cortex caractérisé par l'expression de marqueurs ventraux (Mallamaci and Stoykova, 2006). Ceci suggère que EMX2 et PAX6 sont nécessaires à l'instruction de la dorsalisation du cortex et inhibent l'identité ventrale (Fig. 2.8). EMX2 est exprimé en gradient faible en rostral et fort en caudal, faible en latéral et fort en médian. Tandis que PAX6 est exprimé en gradient fort en rostral et faible en caudal, fort en latéral et faible en médian (Fig. 2.8). Ces deux gènes sont impliqués dans l'identité régionale A/P du cortex (Muzio *et al.*, 2002; Muzio and Mallamaci, 2003; Manuel and Price, 2005). Ainsi l'inactivation du gène *Pax6* entraîne la caudalisation du cortex. Au contraire celle de EMX2 entraîne sa rostralisation, comme lors d'une surexpression de FGF8. L'expression des EMX est régulée par GLI3 (Theil *et al.*, 1999), et inhibée par FGF8 qui active PAX6 (Mallamaci *et al.*, 2000; Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001; Bishop *et al.*, 2003). FGF8 pourrait donc contrôler la balance EMX2/PAX6 permettant la mise place des différentes aires du cortex.

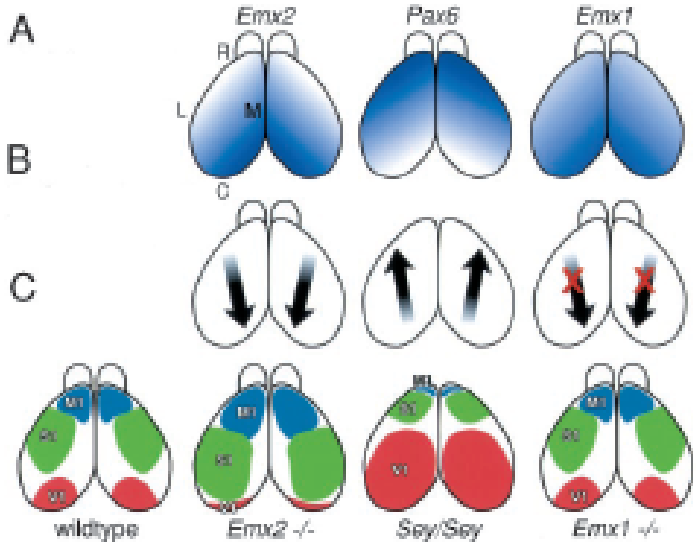



**Fig. 2.8 – Axe antéro-postérieur du cortex en développement.** A. Représentation des différents gradients d'expression de EMX2, PAX6 et EMX1. B. L'inactivation des différents gènes a des effets rostralisant (EMX2), caudolisant (PAX6) ou aucun effet (EMX1). C. De tels effet modifient donc l'organisation en aires fonctionnelles du cortex. L'aire motrice (M) est représentée en bleu, l'aire sensorielle (S) en vert et l'aire visuelle (V) en rouge. D'après Bishop *et al.,* 2002

#### 2.1.3.4 Synopsis de la corticogenèse

Chez de nombreux Mammifères, le développement du cortex cérébral est laminaire et se déroule d'après des étapes précises selon les axes antéro-postérieur et dorso-latéral. La plupart des cellules dérivant de la zone prolifération dorsale deviennent des neurones pyramidaux à projection du cortex mature (Chan *et al.*, 2001; Gorski *et al.*, 2002). La datation des nouveaux neurones par injection de Thymidine tritiée ou de Bromodésoxyuridine (BrdU), a permis de mettre en évidence que les premiers neurones migrent pour former les couches profondes du cortex (Rakic, 1972; Polleux *et al.*, 1997). Les vagues successives de neurones migrants traversent par la suite les couches de neurones déjà établies pour former les couches supérieures. Cette organisation particulière conduit à la stratification du cortex en six couches de façon *inside-out* : les couches les plus profondes sont les plus anciennement formées et réciproquement. Suivons le développement du cortex murin (Fig. 2.9).

- Le développement du cortex débute vers le huitième jour embryonnaire de développement, E8. Le *pallium* est alors rudimentairement composé de la zone ventriculaire (VZ), première zone prolifération du cortex. Entre E10,5 et E11,5, les premières cellules post-mitotiques quittent la VZ pour former la pré-plaque PP.
- Entre E11,5 et E12,5, la corticogenèse commence, les premiers neurones quittent la VZ et migrent le long des fibres de la glie radiaire pour former la plaque corticale CP. Ils scindent la pré-plaque en deux, la zone marginale MZ et la sous-plaque SP. A ce stade, la zone marginale contient essentiellement les cellules de Cajal-Retzius. Ces cellules sécrètent la REELINE, glycoprotéine extra-cellulaire qui coordonne de nombreux aspects du développement du système nerveux central (Tissir and Goffinet, 2003). La MZ est largement amoindrie en cellules de Cajal-Retzius à la naissance. Les cellules de la sous-plaque sont les premières à envoyer des projections vers le thalamus, d'où le nom de projections pionnières. Les neurones de la sous-plaque ont plusieurs rôles importants au cours du développement. Ils émettent des axones vers la capsule interne (regroupement de fibres dans le Thalamus) et serviront de guides pour les axones des neurones des couches corticales V et VI. Enfin ils servent de relais pour les axones en provenance du thalamus avant leur progression vers la couche IV du cortex. Ces relais sont indispensables pour une bonne sélection des cibles synaptiques des afférences thalamiques. Après la naissance, la sous-plaque disparaît rapidement, on suppose soit que ces cellules s'intègrent dans la couche VI, soit qu'elles se dispersent soit qu'elles sont éliminées par mort cellulaire (Allendoerfer *et al.*, 1994).
- Entre E12,5 et E14,5, les neurones post-mitotiques vont coloniser les couches profondes du cortex (couches V et VI). Ces neurones envoient notamment des projections vers le thalamus formant le tractus cortico-fugal. Les projections thalamo-corticales pénètrent dans le cortex. Puis les neurones de la couche IV sont générés et migrent. Les interneurones corticaux des éminences ganglionnaires envahissent alors le cortex en suivant les voies de migrations tangentielles.
- Entre E14,5 et E16,5, les neurones de la couche IV continuent à migrer et composent la couche qui leur est destinée. Les interneurones corticaux colonisent les couches

profondes par migration radiaire cette fois. Parallèlement la gliogenèse débute.Une seconde zone de prolifération s'établit, la zone sous ventriculaire (SVZ).

- A E18,5, la corticogenèse se termine. La majorité des neurones des couches superficielles sont générés et migrent vers les couches II et III. La gliogenèse est massive.
- A P14, période post-natale, la lamination du cortex est terminée, les connexions sont établies. Les neurones pyramidaux des couches III et IV établissent des connexions cortico-corticales de type contra-latérale *via* le corps calleux. Les neurones pyramidaux de la couche V, par contre, envoient des projections vers le striatum, le pons, et les colliculi supérieurs. Quant aux neurones pyramidaux de la couche VI, ils se projettent dans le thalamus.

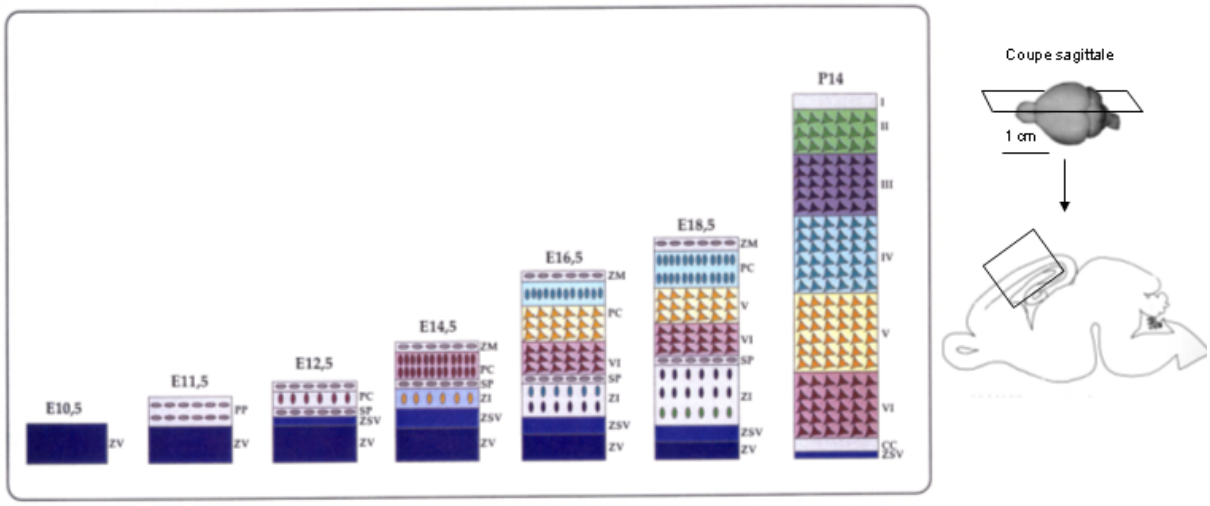



**Fig. 2.9 – Formation laminaire du cortex de façon *inside-out*.** Dans les stades précoces du développement, le cortex est rudimentairement composé d'un pseudo-épithélium, dont les cellules se divisent activement pour former les différents neurones du cortex. A chaque vague de nouveaux neurones, ceux-ci migrent en dépassant les couches déjà formées. Ainsi les couches les plus profonde sont les plus anciennes et réciproquement. ZV, zone ventriculaire ; PP, préplaque ; ZM, zone marginale ; SP, sous-plaque ; ZSV, zone sous ventriculaire ; CP, plaque corticale formée des couches I à VI ; ZI, zone intermédiaire.

#### 2.1.3.5 L'identité corticale

L'organisation des couches de neurones corticaux et des aires phénotypiques est déterminée par l'interaction de différents facteurs moléculaires organisant un réseau de régulation qui définit progressivement la restriction des potentialités des cellules multipotentes, en progéniteurs puis en neurones migrants vers une position donnée du cortex. Les mécanismes moléculaires qui régissent ce processus ne sont à l'heure actuelle que peu connus. Certains facteurs pourtant se distinguent par leurs actions extrinsèque ou intrinsèque.

Comme nous l'avons vu précédemment les WNT, BMP et les FGF sont exprimés par les différents centres organisateurs du télencéphale et spécifient l'identité corticale. Enfin, les Chémokines comme le facteur SDF-1 (*stromal derived factor*), et son récepteur CXCR4, ont un rôle majeur dans le développement du cortex (Pritchett *et al.*, 2007). L'implication de cette voie dans les mécanismes de migration a été démontrée notamment au cours du développement du Poisson zèbre, l'activation polarisée des récepteurs CXCR4 exprimés par les cellules germinales leur permet de migrer le long de l'embryon (Blaser *et al.*, 2006; Haas and Gilmour, 2006; Valentin *et al.*, 2007). De plus, l'analyse des souris dont le gène *Cxcr4* est inactivé ou lors d'ajout d'antagonistes se fixant sur ce récepteur, le développement est perturbé, la prolifération des progéniteurs est réduit ainsi que la différenciation des neurones GABAergiques. SDF-1 est impliqué dans la prolifération, la différenciation des neurones GABAergiques et l'élongation des axones glutamatergiques (Pritchett *et al.*, 2007). Se superpose à ce schéma de régulation, un réseau d'expression spécifique de facteurs de transcription nécessaire au développement du cortex.

Certains mécanismes génétiques impliquent les gènes proneuraux *Ngn1/2* et le gène *Pax6* dans la spécification des neurones pyramidaux, tandis que les gènes *Mash1* et *Dlx1/2* sont impliqués dans la spécification des interneurones corticaux. Ces facteurs sont étroitement régulés par l'action des facteurs extrinsèques. Différents marqueurs moléculaires ont été identifiés comme étant spécifiquement exprimés par les neurones d'une couche corticale donnée (Fig. 2.10). Nous n'en détaillerons que certains ici. Au début de la neurogenèse (E13, chez la souris), OTX1 (Zhang *et al.*, 2002) et TBR1 (Rubenstein *et al.*, 1999) sont exprimées dans la VZ. Par la suite (E15-E18), ces marqueurs sont détectés dans les couches profondes du cortex, plus faiblement dans la VZ. En parallèle, à partir de E15, certains marqueurs comme SVET1 (Tarabykin *et al.*, 2001), CUX2 (Zimmer *et al.*, 2004), BRN1/2 (Sugitani *et al.*, 2002) et Tis21 (Haubensak *et al.*, 2004) sont exprimés dans la SVZ lors de son établissement. Puis vers la fin de la corticogenèse, ce sont majoritairement les couches superficielles qui expriment ces marqueurs. L'expression de ces marqueurs confirme le modèle de corticogenèse dans lequel les programmes génétiques qui gouvernent la formation des couches profondes et superficielles opèrent séparément et séquentiellement (Schuurmans *et al.*, 2004). Différents marqueurs des neurones des couches superficielles sont exprimés par les cellules (souvent par les progéniteurs) de la SVZ. D'après ces marqueurs, un modèle de neurogenèse tardif a été proposé. Les couches profondes du cortex semblent être générées par la VZ, tandis que les couches superficielles proviendraient de la SVZ (Zimmer *et al.*, 2004). Ce modèle revèle la nécessité d'établir très précocément différents progéniteurs du neuroépithélium, dont la spécificité est établie avant la formation de la SVZ. Ceci concorde avec les expériences de greffes menées par Frantz et Mc Connell (1996). Les progéniteurs de la SVZ se divisent pour donner deux types distincts de cellules un « proneurone »et un « progéniteur intermédiaire ». Le proneurone post-mitotique migre directement vers les couches du cortex, tandis que le progéniteur intermédiaire se loge dans la SVZ. La SVZ serait une zone de séjour (Bayer *et al.*, 1991; Noctor *et al.*, 2004) où les cellules déterminées resteraient indifférenciées pour donner par la suite les neurones des couches externes. Ce modèle affine le modèle de la protocarte en suggérant qu'il existe une grande hétérogénéité des cellules du neuroépithélium avant

même le début de la corticogenèse.

Les programmes intrinsèques et extrinsèques interagissent donc dans la spécification des progéniteurs de façon stade spécifique et aire spécifique. (Casanova and Trippe, 2006). Ce réseau de régulation permet la diversité cellulaire et l'architecture adéquate du cortex.

Deux zones de prolifération ont été définies dans le cortex (Noctor *et al.*, 2004). Comme nous allons le voir, la zone ventriculaire VZ génère les neurones pendant les phases précoces de la corticogenèse et contribue à la formation d'une zone de prolifération secondaire vers E12. Cette couche qui se superpose à la VZ est appelée zone sous ventriculaire SVZ. Plusieurs études suggèrent que la SVZ donnerait naissance aux couches superficielles du cortex (Tarabykin *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2004).

## 2.2 Prolifération des cellules corticales

Certains facteurs de régionalisation du télencéphale régulent de plus la prolifération des cellules dont sont issus les différents types cellulaires constituant le cortex cérébral. La régulation de la prolifération est une étape déterminante du développement cortical.

### 2.2.1 Les cellules souches neurales et les progéniteurs neuraux

Le terme de cellules souches désigne des cellules activement prolifératives non déterminées qui, d'une part, peuvent donner des cellules spécialisées (processus de spécification) et, d'autre part, peuvent virtuellement se renouveler indéfiniment (auto-renouvellement), selon leurs potentialités. Les cellules souches neurales (NSC) issues des embryons durant la deuxième moitié de la gestation sont multipotentes [1], elles se distinguent des progéniteurs neuraux (NP) par leur capacité de prolifération et leur niveau d'engagement vers les lignées de cellules différenciées. En effet, les potentialités des progéniteurs sont plus restreintes que celles des cellules NSC. Ces concepts sont développés en Annexes.

Au cours du développement, les cellules souches neurales composant le neuroépithélium neural, restreignent leurs potentialités et deviennent des progéniteurs neuraux des zones prolifératives puis des précurseurs de cellules différenciées unipotents (Fig. 2.11).

A l'exception de la microglie (groupe des macrophages), toutes les cellules constituant le SNC, la macroglie (astrocytes et oligodendrocytes) et les neurones, dérivent du neuroectoderme embryonnaire (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001). A partir de E8, la moitié des

[1] Ces cellules sont multipotentes voir peut-être pluripotentes selon les expériences de transdifférenciation, mais ceci reste controversée.

| Gene | 1 | 2/3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|
| *bHLHb5*[d] | | + | + | | |
| *Brn2*[c] | | + | | | |
| *Clim1a*[b] | | | | + | |
| *CTIP2*[h] | | | | + | |
| *Cux2*[d,e] | | + | + | | |
| *Deltex-like*[g] | | + | + | | |
| *Er81*[c] | | | | + | |
| *Fox01*[d] | | + | | | |
| *Klf6*[d] | | | + | | |
| *Kora1* | | | | + | |
| *Latexin*[i] | | | | | + |
| *Lmo3*[b] | | + | + | | + |
| *Lmo4*[b,d] | | + | + | | + |
| *MEF-2C*[d,g] | | + | + | | |
| *NR4A3*[d] | | | | + | + |
| *Otx1*[c] | | | | + | + |
| *Reelin*[c] | + | | | | |
| *ROR-b*[c] | | | + | | |
| *Satb1*[a] | + | | | + | + |
| *Satb2*[a] | | + | + | | |
| *SCF*[g] | | + | + | | |
| *SCIP*[c] | | + | | | + |
| *Sox5*[d] | | | | + | + |
| *Svet1*[f] | | + | + | | |
| *Tbr1*[c] | + | | | | + |
| *Unc5h4*[g] | | | + | | |
| *Zfp312*[g] | | | | + | + |

**Fig. 2.10 – Marqueurs spécifiques des couches corticales** Dans le cortex, certains marqueurs sont spécifiquement exprimés par les couches profondes du cortex comme OTX1, TBR1 ; d'autres spécifiquement par les couches superficielles comme SVET1, CUX2 et BRN2. Le profil d'expression des marqueurs de couches superficielles a démontré que les progéniteurs des couches superficielles étaient spécifiés très précocement dans le neuroépithélium puis constituaient la SVZ avant d'établir les couches superficielles. [a] Britanova *et al.,* 2005. [b] Bulchand *et al.,* 2003. [c] Hevner *et al.,* 2003. [d] Gray *et al.,* 2004. [e] Nieto *et al.,* 2004 et Zimmer *et al.,* 2004. [f] Tarabykin *et al.,* 2001. [g] Zhong *et al.,* 2004. [h] Arlotta *et al.,* 2005. [i] Arimatsu *et al.,* 1999. D'après Guillemot *et al.,* 2006.

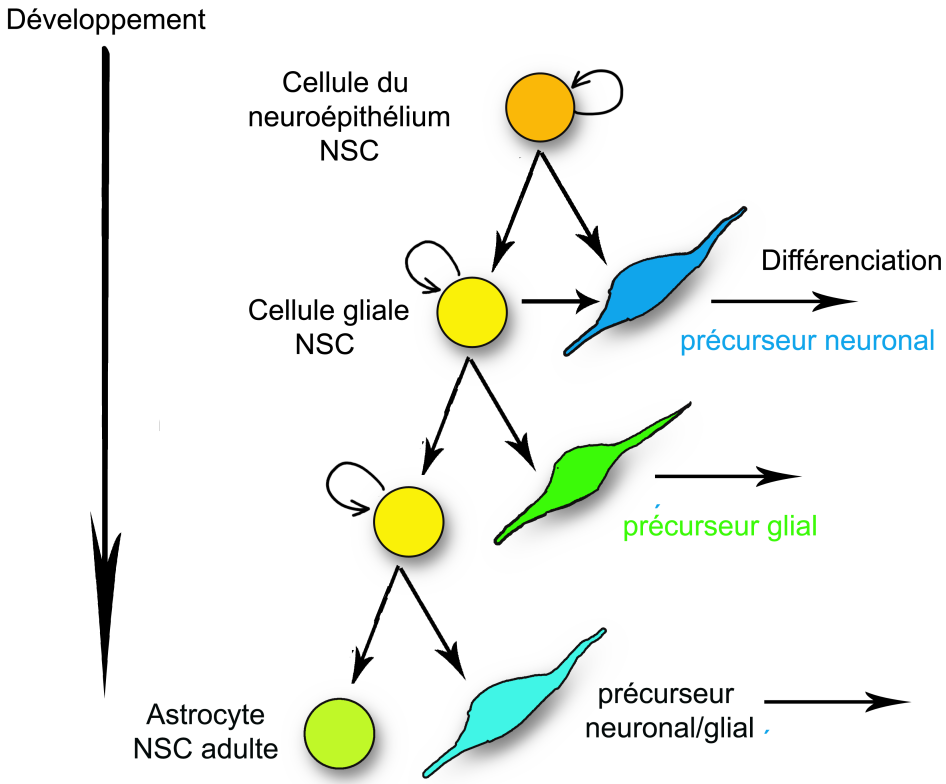



**Fig. 2.11 – Modèle de génération des populations cellulaires du cortex**. La potentialité des cellules souches neurales NSC se restreint au fur et à mesure de leur engagement au cours du développement. Elles génèrent au fur et à mesure des divisions, des progéniteurs NP, puis des précurseurs qui se différencient au début de la corticogenèse en neurones puis en fin de corticogenèse en cellules gliales. Les NP ne sont pas représentés pour simplifier le modèle mais elles constituent des cellules aux potentialités plus réduites que les NSC mais plus élevées que celles des précurseurs.

cellules du tube neural sont des NSC puis la proportion de ces cellules diminue rapidement jusqu'à la naissance pour représenter moins de 1% de la population cellulaire du SNC. La phase précoce d'expansion des NSC est ensuite remplacée par une phase neurogénique (E10-E18). La dernière phase est la phase gliogénique (E18 - développement post-natal) (Fig. 2.11).

Historiquement, la glie radiaire a été définie comme des cellules à prolongement radiaire, support de migration des neurones, et se différencient en astrocytes après la période neurogénique en exprimant différents marqueurs tels que la GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), GLAST (*Glutamate astrocystes specific transporter*) et BLBP (*Brain lipid-binding protein*)(Campbell and Götz, 2002; Malatesta *et al.*, 2003). De plus, il a été démontré que ces cellules prolifèraient au cours du développement cortical, exprimant différents marqueurs comme la Vimentin, la Nestin et RC2, marqueurs exprimés par les précurseurs neuronaux (Hartfuss *et al.*, 2001). En effet, au moyen de transfections rétrovirales de tranches de télencéphale observées en vidéomicroscopie, il a été démontré

que la glie radiaire générait des cellules migrant pendant la période neurogénique (Malatesta *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2001; Tamamaki *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2002; Rakic, 2003; Noctor *et al.*, 2004). Et ces expériences de lignage cellulaire ont démontré leur capacité à générer des neurones *in vivo* et *in vitro* (Malatesta *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2001; Heins *et al.*, 2002). Il a donc été admis que la glie radiaire constituerait la majeur partie des cellules qui prolifèrent dans le cortex et constituent un groupe de cellules capables de générer à la fois des neurones et des cellules gliales (Malatesta *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2001; Tamamaki *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2002). Les cellules du neuroépithélium et les cellules de glie radiaires sont considérées par certains auteurs comme des NSC (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001; Temple, 2001; Fujita, 2003; Götz and Huttner, 2005).

Pourtant, les cellules du neuroépithélium dans les stades précoces de développement du cortex n'ont pas les mêmes potentialités que les cellules de glie radiaire et ces deux types de cellules n'expriment pas les mêmes marqueurs. Si les cellules du neuroépithélium sont caractérisées comme des NSC, qu'en est-il des cellules de glie radiaire ? Sont-elles des cellules souches neurales ou des progéniteurs ? Cette difficulté à caractériser les cellules de glie radiaire réside d'une part dans la définition de cellule souche et de progéniteur (voir Annexes), termes employés différemment dans la littérature. D'autre part, cette confusion réside notamment dans la difficulté de tester les potentialités *in vivo* de ces cellules. De plus, différents types de cellules multipotentes sont capables de proliférer et de générer des neurones et de la glie, coexistants à différents stades du cortex en développement. La caractérisation de ces types, leur hiérarchisation en terme de potentialité n'est à l'heure actuelle pas claire. Elles peuvent toutefois être distinguées selon les structures corticales : le neuroépithélium, la zone ventriculaire et la zone sous-ventriculaire.

### 2.2.2 Les zones prolifératives du cortex des Mammifères

Il existe différentes zones prolifératives dans le cerveau en développement, dont les zones ventriculaire VZ et sous-ventriculaire SVZ du cortex cérébral.

#### 2.2.2.1 La zone ventriculaire

Dès E10 chez la souris, les cellules du neuroépithélium de la VZ sont multipotentes et très actives mitotiquement (Ishii *et al.*, 2000; Temple, 2001). A E13, une population additionnelle de cellules multipotentes est générée dans la VZ, la glie radiaire. Ces cellules portent des propriétés similaires aux cellules originelles du neuroépithélium. La zone ventriculaire (VZ) est constituée d'un épithélium pseudo-stratifié dont la face apicale borde la lumière du ventricule télencéphalique et la face basale jouxte la zone sous ventriculaire (SVZ). La position des noyaux des cellules de la VZ varie selon le cycle cellulaire comme décrit précédemment dans le tube neural (Fig. 2.4). Ce mouvement intercinétique est due à une polarisation de la VZ. Ceci se manifeste au niveau cellulaire par la distribu-

tion hétérogène de déterminants intracellulaires et par la présence de jonctions cellulaires spécifiques. L'observation en temps réel de glie radiaire marquée au DiI (cristal fluorescent) dans des cortex de rat *Sey/Sey* (où le gène *Pax6* est muté) montre des défauts de mouvements intercinétiques, la migration des cellules en G2 vers le ventricule est incomplète et plus lente, et des mitoses ectopiques hors VZ sont plus fréquentes par rapport aux sauvages. La migration et le cycle cellulaire semblent donc découplés chez les souris mutantes pour le gène *Pax6* (Tamai *et al.*, 2007). Il a donc été proposé que PAX6 contrôlerait le positionnement des cellules en phase S et G2, notamment *via* le positionnement des centrosomes. De plus, ce mouvement intercinétique dépend de fines régulations de la dynamique des microtubules, permises par des facteurs comme LIS1 (Tsai *et al.*, 2005) et Cep120 (*Centrosomal protein*) (Xie *et al.*, 2007).

#### 2.2.2.2 La zone sous-ventriculaire.

Une seconde zone de prolifération s'établit vers E13,5 chez la souris, la zone sous ventriculaire SVZ, adjacente à la VZ (Smart, 1976). Les progéniteurs de la SVZ n'ont pas de mouvements intercinétiques et n'étendent pas de prolongement radiaire. Dans le cortex cérébral en développement, la principale zone proliférative reste la VZ, par contre chez l'adulte, la VZ est très restreinte au profit de la SVZ qui maintient une activité proliférative.

La SVZ semble constituée essentiellement de cellules issues de la VZ (Takahashi *et al.*, 1996; Haydar *et al.*, 2000). Des expériences basées sur l'incorporation de la Thymidine tritiée ont démontré le caractère prolifératif de la SVZ. En effet, ces cellules sont capables de se diviser pour générer des neurones mais aussi des cellules gliales en milieu de corticogenèse (Smart and McSherry, 1982; Rakic, 1972; Smart *et al.*, 2002; Noctor *et al.*, 2004).

Les compétences gliogéniques et neurogéniques des cellules de la SVZ participent à l'établissement des couches superficielles du cortex cérébral. Il n'est pas exclu que la SVZ ne génère pas aussi des interneurones. D'autre part, la SVZ servirait de zone de séjour pour les progéniteurs, ce qui permettrait une coordination dans l'établissement de connections entre futur neurone de projection et interneurone, qui migreraient ensemble par la suite jusqu'à la couche à laquelle ils sont destinés (Noctor *et al.*, 2004) dont nous avons parler précédemment.

La SVZ est donc à l'heure actuelle, considérée comme une zone complexe qui pourrait avoir un rôle dans le maintien d'un certain type de cellules proliférantes, qui génèreraient les neurones des couches superficielles. Ainsi les progéniteurs générant les neurones des couches superficielles et ceux générant les couches profondes se distinguent par leur spécification, pourtant ces cellules proviennent des mêmes cellules souches neurales. Les mécanismes qui régissent l'engagement des cellules souches neurales vers tels ou tels progéniteurs n'est à l'heure actuelle que peu comprise, tout comme les mécanismes qui régissent l'engagement des cellules vers une voie de différenciation neuronale ou gliale.

### 2.2.3 Spécification des cellules corticales

Les neurones corticaux sont pour la plupart générés au cours de la période neurogénique prénatale (Kornack and Rakic, 1998). La neurogenèse corticale obéit à un gradient de développement allant de la région rostro-latérale vers la région caudo-médiane du cortex, les régions latérales et antérieures se développent plus précocement que les régions médianes et postérieures (environ 1 jour avant) (Bayer *et al.*, 1991; Miyama *et al.*, 1997; Caviness *et al.*, 2000). Durant cette vague neurogénique, les cellules effectuent 11 cycles cellulaires (Takahashi *et al.*, 1996). La durée du cycle (de 12h en moyenne) s'allonge progressivement de 8h (à E11) à 20h (à E17) chez la souris. Cette augmentation graduelle du cycle cellulaire s'explique essentiellement par l'augmentation de la durée de la phase G1 au cours de la neurogenèse corticale (Takahashi *et al.*, 1996). La durée des autres phases du cycle n'étant pas notablement modifiée. Du cycle cellulaire des NSC/NP, dépend la spécification cellulaire permettant la génération des neurones spécifiques du cortex, comme nous allons le décrire.

#### 2.2.3.1 Mécanismes contrôlant le cycle cellulaire

Différentes régulations régissent le devenir des cellules du cortex en développement, les signaux d'entrée dans le cycle cellulaire (retour en G1) tendent à maintenir les progéniteurs en prolifération tandis que les signaux de sortie de cycle cellulaire (passage en G0) enclenchent la différenciation et la migration des précurseurs. Cette transition est régulée notamment par les cyclines et CDK contrôlant la progression du cycle. D'autres facteurs extrinsèques influencent le devenir des cellules, c'est le cas des facteurs de croissance (bFGF, EGF, IGF, TGF-$\beta$...), les facteurs neurotrophiques (NT3, NT4, BDNF et NGF) ou les neurotransmetteurs (GABA, Glutamate...) (Cameron and McKay, 1998).

Parallèlement à la régulation du cycle cellulaire, le mode de division influence le devenir des cellules corticale. En effet, pendant la première phase de neurogenèse les cellules se divisent de façon symétrique générant des cellules aux potentialités identiques, augmentant ainsi la population de NSC/NP et maintenant leurs potentialités (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001; Temple, 2001; Fujita, 2003; Götz and Huttner, 2005). La seconde phase génère par division asymétrique (consistant à générer des cellules aux potentialités distinctes) à la fois des NSC et à la fois des précurseurs neuronaux ou gliaux qui se différencient et migrent (Malatesta *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2004; Tamamaki *et al.*, 2001; Fishell and Kriegstein, 2003). La troisième phase ne génèrent que des neurones ou que de la glie, de nouveau par division symétrique. Lors de divisions asymétriques, l'une des cellules filles se distingue donc par son engagement vers un lignage différencié. Par conséquent, il y a, au cours des mitoses asymétriques, une spécification qui s'applique différemment sur les cellules filles. Cette spécification répond à des stimuli inconnus à l'heure actuelle, mais pourrait être médiée par différents processus. D'une part, la ségrégation inégale de déterminants dans la cellule peut déterminer des compartiments

cellulaires distincts entre les cellules filles. D'autre part, l'orientation du fuseau mitotique pourrait engendrer cette ségrégation inégale.

### Les déterminants intracellulaires

Si, à l'issue d'une division mitotique, les cellules filles ne sont pas identiques, la ségrégation de déterminants (molécules spécifiant la cellule) s'est faite de façon inégale entre les deux cellules. Différents déterminants ont été identifiés, le plus souvent à partir de l'étude des neuroblastes chez la Drosophile, qui démontre une certaine conservation de ces mécanismes entre les espèces.

NUMB est un de ces déterminants qui s'égrège différemment dans les cellules en division asymétrique (Shen *et al.*, 2002). NUMB, associée étroitement avec l'actine du fuseau mitotique, ségrège préférentiellement dans la cellule neuronale (Shen *et al.*, 2002) alors que l'autre cellule reste une cellule souche neurale exprimant alors NOTCH (Gaiano *et al.*, 2000; Tanigaki *et al.*, 2001). Par conséquent, selon le stade de développement chez les Mammifères et donc des potentialités des NSC, NUMB est exprimé par les NSC puis par les précurseurs neuronaux. NOTCH est connu pour être impliqué dans la polarité mitotique, de par la distribution asymétrique de son antagoniste NUMB (Cayouette and Raff, 2002; Johnson, 2003; Zhong, 2003). Lorsque l'activité de NOTCH est inhibée, les cellules se différencient massivement (Nelson *et al.*, 2007), et inversement, lorsque NOTCH est exprimée la cellule reste indifférenciée (Kageyama *et al.*, 2005). Le déclenchement de l'expression de NOTCH pourrait fournir un signal de début de division asymétrique, signal clé de changement de division (Hatakeyama and Kageyama, 2006). D'autre part, l'expression de certains récepteurs comme les récepteurs à l'EGF ont une distribution asymétrique *in vivo* et *in vitro* dans les NSC (Chenn, 2005). En effet, cette répartition asymétrique de l'EGFR (*tyrosine kinase récepteur*) est lié à l'apparition de mitoses asymétriques où les cellules qui expriment fortement l'EGFR sont des cellules de glie radiaire. La prolifération des NSC est stimulée par le FGF et EGF. Mais les membres des EGFR influencent la spécification des NSC. La surexpression de EGFR au milieu de la gestation entraîne, de plus, les cellules vers un destin astrocytaire au détriment de la formation de neurones (Burrows *et al.*, 1997; Caric *et al.*, 2001). L'EGFR est augmenté en fin de gestation et son activation dans les progéniteurs tardifs stimule la prolifération cellulaire, la migration et la différenciation astrocytaire.

Il semble exister d'autres déterminants qui ségrègent de façon asymétrique. Un modèle suggère que le destin cellulaire adopté par les cellules filles dépend de l'héritage asymétrique du cytoplasme ou des déterminants associés aux membranes plasmiques pendant la division (Fishell and Kriegstein, 2003; Roegiers and Jan, 2004; Wodarz and Huttner, 2003). Les déterminants des membranes plasmiques, la répartition des jonctions adhérentes *etc.*, tous constituants de la polarisation des cellules, une fois ségrégés, modifient le devenir des cellules filles (Betschinger and Knoblich, 2004). Par exemple, l'expression de Tis21, marqueur spécifiant l'identité neurogénique des divisions des NSC (Huttner and Kosodo, 2005) ou encore GAP43 (protéine 43 associée à la croissance) qui marquent les cellules en division asymétrique (Stricker *et al.*, 2006) sont proposés comme

déterminants. Mais rien ne démontre que ces déterminants sont nécessaires et suffisants à l'établissement de la spécification des cellules filles, de plus leur(s) action(s) reste encore inconnue(s).

### Les partenaires du cytosquelette

L'orientation du fuseau mitotique a été très rapidement associée au devenir des cellules. Les divisions symétriques sembleraient correspondre à des mitoses dont le plan de clivage est vertical par rapport à la surface du ventricule, tandis que les divisions asymétriques coïncident à un plan de clivage horizontal à la surface du ventricule (Chenn and McConnell, 1995; Haydar *et al.*, 2003)(Fig. 2.12). Comme le plan de clivage dépend de la position du fuseau mitotique, la machinerie qui gouverne le positionnement du fuseau devient acteur du développement des cellules. Deux types de mécanismes ont été proposés : les protéines G et les protéines centrosomiques.

Lorsque la voie de signalisation des protéines G (notamment les G$\beta\gamma$) est perturbée, le clivage vertical des cellules est augmenté (Sanada and Tsai, 2005). Les protéines G (*guanine nucleotide binding proteins*) permettent la transduction de signaux à l'intérieur de la cellule en utilisant l'échange de GDP en GTP comme un « interrupteur moléculaire » pour déclencher ou inhiber des réactions biochimiques dans la cellule. La perturbation de la voie de signalisation des protéines G résulte en une hyperdifférenciation prématurée des progéniteurs avec une surproduction de neurones (Sanada and Tsai, 2005). Chez le poulet, l'orientation du fuseau mitotique semblait sans conséquence sur le devenir des cellules filles. L'étude de RhoA (petite protéine G de la famille des Rho) a montré le contraire. RhoA est impliquée dans le maintien du fuseau pendant l'anaphase. RhoA serait important dans le maintien des divisions symétriques (Roszko *et al.*, 2006).

La régulation de l'assemblage et du positionnement des centrosomes modifie l'organisation du fuseau mitotique. Leur base structurale étant les microtubules, les régulateurs de la dynamique des microtubules modulent centrosomes et fuseau mitotique. Un des composants des microtubules, NudE, interagit avec LIS1. NudE est important pour la duplication des centrosomes et l'assemblage du fuseau. L'inactivation du gène *NudE* chez la souris provoque des défauts de progression mitotique, d'orientation des mitoses, une augmentation des divisions mitotiques horizontales et donc une réduction du nombre de progéniteurs (Feng and Walsh, 2004). Ainsi NudE semble impliqué dans les processus de spécification des progéniteurs neuraux. Un autre composant de l'organisation des centrosomes est ASPM (*abnormal spindle-like microcephaly-associated*). ASPM est impliqué dans le positionnement du fuseau mitotique dans les NSC (Fish *et al.*, 2006) plus exactement dans la mise en place de l'axe parallèle aux ventricules (divisions symétriques) et le maintien des divisions prolifératives au cours du développement (Huttner and Kosodo, 2005; Fish *et al.*, 2006). L'orientation des divisions mitotiques semble être régulée par des programmes d'expression de gènes neurogéniques et par l'environnement cellulaire (Roszko *et al.*, 2006).

La polarisation initiale des cellules résultant de la répartition inégale de déterminants

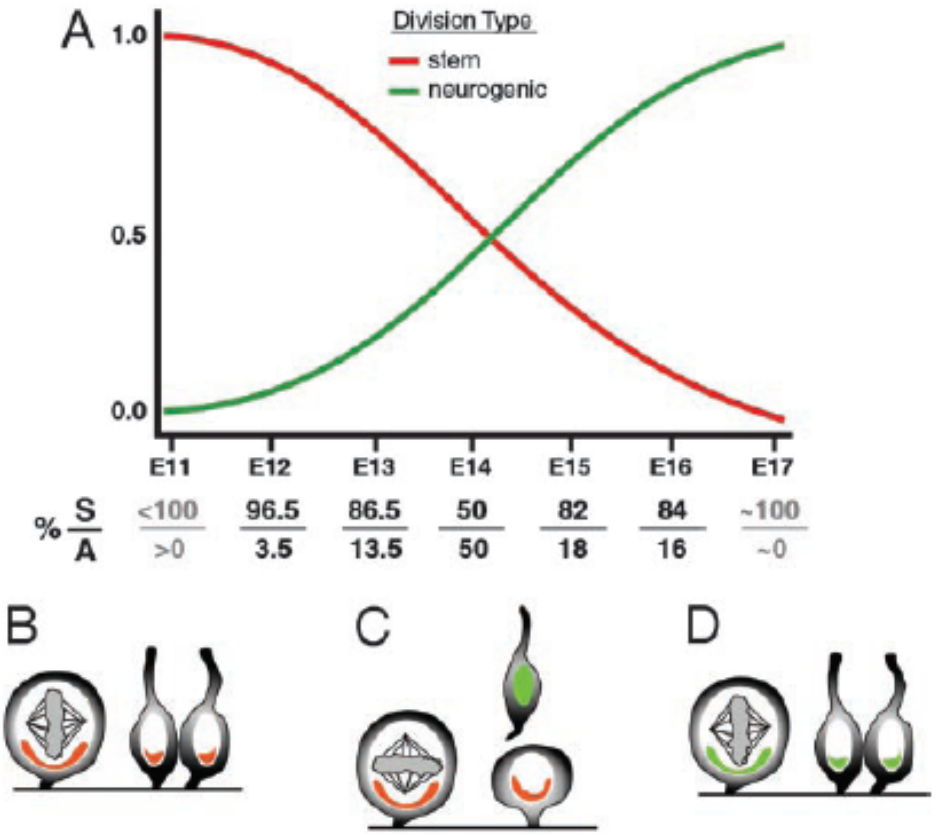



**Fig. 2.12 – Modélisation de la neurogenèse en fonction du plan de clivage.** A. Le ratio de cellules souches/progéniteurs (en rouge) et de précurseurs neurogéniques (en vert) change au cours de la corticogenèse. Le pourcentage de clivage symétrique (S) et asymétrique (A) est indiqué sous l'axe des abcisses représentant les stades de développement chez la souris. Au début de la neurogenèse, les cellules se divisent majoritairement de façon symétrique (plan de clivage perpendiculaire à la surface du ventricule, = vertical), (B). Au milieu de la corticogenèse, celles-ci se divisent en proportions égales de façons symétrique et asymétrique, où le plan de clivage est parallèle à la surface du ventricule (= horizontal) (C). A la fin de la neurogenèse les divisions symétriques sont majoritaires et ne génèrent que des cellules engagées vers la différenciation neuronale (D). D'après Haydar *et al.,* 2003.

pourrait donc influencer le plan de clivage mitotique générant des cellules aux potentialités différentes. Mais le plan de clivage et donc le positionnement du fuseau mitotique, peut influencer le devenir des cellules filles par ségrégation des déterminants cellulaires. La relation de cause à effet reste donc à élucider. De plus, certains études démontrent que la répartition des jonctions membranaires et des marqueurs de la polarité cellulaire pourraient influencer l'orientation du plan de clivage (Kosodo *et al.*, 2004; Huttner and Kosodo, 2005). De plus la définition des angles de divisions semble plus subtile que ce que décrivaient les premières études montrant une division asymétrique par une orientation du plan de clivage vertical, l'angle semble plus variable. Ainsi, la détermination du devenir des cellules selon le plan de clivage mitotique semble très complexe et reste controversé.

Comme nous l'avons vu, le devenir des cellules à la suite d'une mitose (division symétrique ou asymétrique) est finement régulée au cours du développement cortical et nécessite donc des mécanismes de contrôle et d'harmonisation des processus régissant le devenir des cellules en fonction du développement. D'après cette hypothèse, différents auteurs ont modélisé la neurogenèse dans le cortex cérébral.

#### 2.2.3.2 Modèles de la neurogenèse dans le cortex cérébral

Comme nous l'avons décrit, il existe une relation étroite entre les processus prolifératifs et les processus de spécification des neurones corticaux. En effet, l'architecture laminaire du cortex cérébral dépend d'une chronologie précise d'amplification des NSC/NP puis de différentiation séquentielle des neurones. Différents auteurs se sont alors attachés à modéliser la neurogenèse au cours du développement chez la souris, nous détaillerons ici plus les hypothèses de travail que les modèles mathématiques. Le modèle du compteur (Caviness *et al.*, 2003) montre que la majorité des neurones proviennent de l'épithélium pseudostratifié et apparaissent selon une chronologie précise, dépendant de 11 cycles cellulaires (Nowakowski *et al.*, 2002). Une modification de la durée du cycle cellulaire modifie alors l'architecture du cortex cérébral. L'inactivation du gène *p27* (inhibiteur de kinase cycline-dépendante) entraîne une augmentation de la taille du cortex, où toutes les couches corticales sont plus importantes. En effet, en absence de p27, la probabilité qu'une cellule entre de nouveau en phase S est augmentée. En revanche, lorsque le niveau d'expression de p27 augmente (surexpression conditionnelle chez la souris), le cortex est plus réduit, le nombre de cellules des couches II-IV diminue par contre, les couches profondes ne sont pas affectées, ce qui n'était pas prévu par le modèle (Nowakowski *et al.*, 2002; Caviness *et al.*, 2003). Ainsi, les cellules qui vont générer les couches superficielles sortent du cycle plus prématurément sans s'être suffisamment divisées, de plus, ceci suggère que les couches profondes ne sont pas régies par les mêmes mécanismes de sorties de cycles que les couches superficielles.

Un second modèle propose que le changement de mode de division et la longueur du cycle cellulaire déterminerait le devenir des cellules du cortex (Calegari and Huttner, 2003; Calegari *et al.*, 2005). Le modèle repose sur l'étude de la neurogenèse chez des souris par

l'étude de l'expression du gène *Tis21* (Haubensak *et al.*, 2004). Tis21 est exprimé par les NSC/NP qui se divisent asymétriquement pour s'engager vers les lignages neurogéniques (Iacopetti *et al.*, 1999). En suivant les cellules exprimant la GFP sous contrôle de *Tis21* couplée à des incorporations de BrdU, les auteurs constatent que les cellules GFP-Tis21 qui se divisent de façon asymétrique, prolifèrent plus lentement que les cellules NSC/NP qui se divisent de façon symétrique. Mais en moyenne, le cycle de toutes les cellules s'allonge au cours de la corticogenèse. Tis21 serait donc un marqueur spécifique d'un certain type de NSC/NP qui se différencie par division asymétrique.

Ces modèles déterministes supposent que la spécification des cellules prolifératives du cortex cérébral ne dépende que de la durée du cycle de ces cellules, une modélisation plus complète tiendrait compte de l'expression des facteurs qui régissent la spécification des cellules. En effet, il est difficile d'imaginer que seul le cycle puisse déterminer le devenir des cellules NSC/NP, l'environnement cellulaire est aussi déterminant pour l'engagement des cellules vers les lignages différenciés. L'importance des programmes internes des cellules déterminant leur devenir par rapport à l'impact de l'environnement cellulaire sur le choix de l'engagement cellulaire ne peut pour l'instant être estimée, car une meilleure compréhension de ces mécanismes est nécessaire.

### 2.2.4 Mécanismes moléculaires de spécification

L'étude des cellules souches neurales suscite un certain nombre de questions et la recherche des mécanismes d'action qui régissent ces cellules restent à élucider. En effet, quels sont les signaux qui dictent aux NSC de se diviser ou de rester quiescentes ? Qu'est ce qui incite une cellule fille à se différencier ou à rester une cellule souche ? De plus, qu'est-ce qui régule l'engagement des cellules vers telle ou telle voie de différenciation (neuronale/gliale) ? L'engagement des cellules vers une voie de différenciation débute lorsque les cellules souches génèrent des cellules se spécialisant progressivement au cours du développement et dont l'expression génique diffère. Ainsi cette spécification est donc liée à des programmes de régulations génétiques très précis. De cette observation, différents marqueurs de cellules souches neurales ont été identifiés.

#### 2.2.4.1 Les marqueurs de NSC/NP.

Différents marqueurs immunocytochimiques sont utilisés pour identifier les cellules souches neurales dont la Nestine des filaments intermédiaires (Lendahl *et al.*, 1990), la protéine lié à l'ARN *Musashi* (Sakakibara *et al.*, 1996; Yagita *et al.*, 2002) et les facteurs de transcription SOX2 (D'Amour and Gage, 2003) et SOX1 (Barraud *et al.*, 2005). Ces marqueurs sont exprimés de façon spécifique dans les NSC mais aussi à différents degrés dans les cellules progénitrices gliales et neuronales (Kornblum and Geschwind, 2001). En revanche, comme ce sont des marqueurs intracellulaires, ceci limite le suivie des cellules marquées *in vivo* et *ex vivo*. Pour pallier à cet inconvénient, plusieurs études

utilisent la GFP comme rapporteur sous contrôle des gènes spécifiquement exprimés dans les NSC (SOX2, Nestine, Musashi)(D'Amour and Gage, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2001). D'autre part, des études récentes utilisent la technique de FACS pour isoler les NSC et les étudier. Les auteurs utilisent alors des antigènes de surface comme Lewis X (LeX, CD15) (Capela and Temple, 2002) et la Prominin (CD133)(Corti *et al.*, 2007), dernier antigène identifié chez la souris. Ces antigènes sont aussi exhibés par d'autres cellules souches comme les cellules souches hématopoïétiques, suggérant une possible transdifférenciation des cellules souches. La Prominin est une protéine transmembranaire exprimée, dès le stade neuroépithélium (Weigmann *et al.*, 1997), par les cellules souches neurales et les progéniteurs puisque les cellules positives pour la Prominin le sont également pour la Nestine, SOX1/2 et musashi1 (Corti *et al.*, 2007). Par contre, les auteurs n'étudient pas d'autres marqueurs comme LeX, et aucune étude croisée n'est disponible à l'heure actuelle. LeX (FAL, SSEA-1 ou CD15) est exprimé dès le stade blastocyste jusque dans les cellules subventriculaires du cerveau adulte. Dans le cortex cérébral en développement, à E10,5 chez la souris, LeX est exprimé par certaines cellules du neuroépithélium. A E10, le cortex cérébral est composé largement de cellules en prolifération qui en culture génèrent différents types de clones (Davis and Temple, 1994), en effet 10 à 20% des cellules sont des cellules souches multipotentes et 15 à 20% sont des neuroblastes restreints qui produisent seulement des neurones, le reste des cellules se différencie directement. Les marqueurs de NSC comme la Nestin et RC2 marquent beaucoup de cellules dans le cortex cérébral mais pas toutes (à E10,5, 93% des cellules sont Nestine positives et 73% sont RC2 positives). De plus, la moitié des cellules sont LeX positives dont 99% sont alors Nestin positive 73% sont RC2 positives ; les populations LeX négatives sont aussi Nestin et RC2 positives (respectivement 82% et 62%), mais les cellules LeX positives sont beaucoup plus prolifératives que les autres. Ceci démontre l'hétérogénéité des NSC/NP dès les stades précoces du développement. Cette argument contredit les études antérieures indiquant une homogénéité de NSC/NP et conduit à proposer que très tôt le potentiel de ces populations se distinguent. L'analyse des différentes populations de NSC/NP ainsi que leurs dérivés manque malheureusement de marqueurs supplémentaires et spécifiques d'une population donnée. La capacité de pouvoir sélectionner les NSC/NP au moyen de marqueurs spécifiques, n'est pas sans conséquence sur les études portant sur la compréhension des mécanismes qui régissent ces cellules ni sur les possibilités thérapeutiques de greffes que ces cellules laissent entrevoir. En effet, plusieurs études démontrent les capacités des cellules souches neurales dans la régénération des tissus neuraux, mais leur fonctionnalité dans le tissus hôte reste encore à démontrer (Lindvall and Björklund, 2004; Conti *et al.*, 2006).

Pour découvrir les profils d'expression spécifiques des NSC/NP, différentes stratégies expérimentales ont été menées comme les analyses de transcriptome, protéome...(Abramova *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2007). Ainsi d'autres marqueurs ont été identifiés comme enrichis dans les NSC/progéniteurs comme les régulateurs du cycle cellulaire Rb et cyclin D1 et D2, dont l'expression est non seulement importante pour la prolifération cellulaire mais est de plus, critique pour la régionalisation et la formation du cortex cérébral (Geschwind *et al.*, 2001) ; BMP4 est un important régulateur du profil dorsoventral ; enfin des facteurs de modulation de la chromatine comme GCN5, ATRX, SIRT2 sont enrichis dans

les NSC/NP. Ceci renforce l'idée que toutes les cellules souches maintiennent un état chromatinien relativement ouvert différent de celui des cellules différenciées (Ramalho-Santos *et al.*, 2002).

Pour les cellules souches neurales dérivant du cortex embryonnaire, la mécanique de spécification consiste à s'autorenouveller, puis se différencier en neurones puis, au stade tardif du développement, génèrer de la glie (Qian *et al.*, 1997; Qian *et al.*, 2000). Ce schéma de production de cellules différenciées s'accompagne de la modification des potentialités des NSC. Les expériences de greffes de NSC à différents temps de développement montrent bien que les potentialités de ces cellules soient dépendantes de leur histoire et de leur environnement. Ainsi il semblerait que des programmes spatio-temporels régissent précisément ces cellules (Temple, 2001), ces programmes sont régis par des facteurs intrinsèques et extrinsèques.

#### 2.2.4.2 Les facteurs extrinsèques

Les facteurs extrinsèques englobent les stimuli externes issus de l'environnement qui influencent la cellule. Les facteurs diffusibles présents dans le milieu extracellulaire, tels que certains facteurs de croissance, ainsi que les contacts inter-cellulaires, semblent moduler la spécification. Certains facteurs de croissance ont non seulement un effet mitotique mais aussi sont capables d'orienter les NSC vers une voie de différenciation et de favoriser la production de neurones ou de cellules gliales (Guillemot, 2005). Ainsi, le CNTF (Johe *et al.*, 1996) et les BMP (Rajan and McKay, 1998) activent *in vitro* le développement des précurseurs vers la voie astrocytaire, alors que d'autres facteurs orientent les NSC vers la voie neuronale (Caldwell *et al.*, 2001). Certains facteurs ont parfois des effets différents en fonction du contexte cellulaire. C'est le cas par exemple des BMP(2 et 4) qui sont également capables de promouvoir la différenciation neuronale à partir des précurseurs corticaux (Li *et al.*, 1998). Ainsi, un même facteur est capable de promouvoir la production de neurones et de cellules gliales dans des contextes différents de développement (Mehler *et al.*, 2000). De même, les protéines, sécrétées de la famille de signalisation WNT (Cadigan and Nusse, 1997), peuvent à la fois promouvoir la prolifération des progéniteurs neuraux au début du développement (Zechner *et al.*, 2003) et bloquer la prolifération des mêmes progéniteurs aux stades tardifs du développement, tout en activant leur différenciation en neurones (Hirabayashi *et al.*, 2004; Muroyama *et al.*, 2004). Ceci suggère que les NSC/NP sont capables de répondre différemment selon les stades de développement et l'environnement cellulaire. En effet, les cellules souches dépendent notamment de leur microenvironnement cellulaire spécifique ou niche, qui constitue un cadre privilégié pour maintenir le potentiel des cellules souches (Conti *et al.*, 2006).

Les facteurs de croissance comme l'EGF et le FGF sont importants pour le maintien et la croissance des cellules en culture (Lillien, 1998; Gage, 2000) capables de générer à la fois des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes (Davis and Temple, 1994; McKay, 1997; Gage, 2000). Il a été suggéré que les NSC se développant en présence de FGF ont une plus grande probabilité pour générer des neurones qu'en présence de EGF

(Johe *et al.*, 1996) et que les NSC précoces et tardives répondent différemment aux actions mitogènes. Pendant les stades précoces du développement, les NSC prolifèrent en réponse au FGF et non à l'EGF (Burrows *et al.*, 1997). Dans les phases tardives de développement, l'expression des récepteurs à l'EGF est augmentée et les cellules sont capables alors de répondre à l'EGF (Reynolds *et al.*, 1992). Le passage de la réponse au FGF puis à l'EGF est régulée par les effets antagonistes du FGF-2 et des BMP (Lillien and Raphael, 2000) et l'activité du FGF-2 requiert le cofacteur cystatin C (CCg) (Taupin *et al.*, 2000) et la présence de l'IGF (*Insulin Growth Factor*) (Arsenijevic *et al.*, 2001). L'action du FGF et de l'EGF ne se restreint pas qu'à une action mitotique puisqu'ils sont aussi requis pour la migration cellulaire. En effet, il a été démontré que la capacité des cellules à migrer dépendait de leur niveau d'expression en récepteur à EGF (Caric *et al.*, 2001). Enfin, les souris déficientes pour l'expression du FGF-2 ont une organisation anormale du cortex cérébral où certains précurseurs n'atteignent pas les couches auxquelles ils sont destinés (Dono *et al.*, 1998). Ces facteurs de croissance ont donc un rôle clé au cours du contrôle de la destinée cellulaire (*Cell Fate Choice*) des NSC/NP du cortex cérébral en développement.

#### 2.2.4.3 Les facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques représentent les composantes internes de la cellule qui dépendent de l'histoire de celle-ci. Les facteurs intrinsèques correspondent notamment à l'expression de certains facteurs de transcription puisque l'engagement des cellules vers une voie de différenciation résulte de la combinatoire de différentes voies de signalisation (Guillemot *et al.*, 2006).

La voie NOTCH promeut le devenir astrocytaire aux dépens des autres devenirs, mais a également pour effet de maintenir les NSC dans un état indifférencié en inhibant la différenciation neuronale ou oligodendrocytaire (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006). NUMB, son antagoniste, maintient l'autorenouvellement des NSC. D'autres facteurs de transcription de type *basic-helix-loop-helix* (bHLH) sont impliqués dans le développement du système nerveux. Les facteurs HES1 et HES5, directement activés par la voie NOTCH, vont ainsi inhiber d'autres facteurs bHLH, tels que MASH1, Neurogenin (NGN) ou NeuroD. L'activation de ces facteurs proneuraux favorise l'engagement des cellules vers le devenir neuronal (Guillemot, 1999; Guillemot, 2005). Les gènes proneuraux comme *Ngn1* et particulièrement *Ngn2* sont non seulement impliqués dans la neurogenèse (Nieto *et al.*, 2001) mais aussi dans la répression des caractères dorsaux du télencéphale et dans la spécification des neurones corticaux à projection glutamatergiques (Schuurmans *et al.*, 2004). Les gènes *Ngn* sont requis pour la spécification des neurones corticaux précoces qui occupent les couches profondes du cortex mais aussi dans la spécification des neurones tardifs des couches superficielles du cortex. D'autres facteurs ont un rôle dans l'établissement de ces couches comme PAX6 et TLX (Schuurmans *et al.*, 2004; Guillemot, 2005). La famille des facteurs de transcription SOX joue également divers rôles dans les NSC (Pevny and Placzek, 2005). En effet, l'expression de SOX1 et SOX2, régulée par les BMP ou les FGF, semble définir les potentialités neurales des cellules au cours du développement du

neuroectoderme.

L'expression progressive des gènes neuronaux qui enclenchent l'engagement des cellules vers le lignage neuronal et leur différenciation, n'est pas uniquement régulée par des activateurs transcriptionnels comme les protéines proneurales. En effet, des répresseurs transcriptionnels comme REST (ou NRSF, pour *neuron-restrictive silencer factor*), sont impliqués dans la progression des cellules dans le lignage neuronal (Ballas *et al.*, 2005). La transition d'une cellule souche neurale à un précurseur neuronal implique une diminution de la fixation de REST aux promoteurs des gènes spécifiquement exprimés par les neurones, suggérant une régulation épigénétique de la neurogenèse (Ballas and Mandel, 2005). En effet, la fixation de REST permet le recrutement de la machinerie de compaction de l'ADN (Fig. 2.13). Le contrôle de la spécification cellulaire passe aussi par un autre voie de modulation épigénétique (Hsieh and Gage, 2004), la voie JAK/STAT, activée par les cytokines telles que le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*)ou le LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), joue un rôle aussi bien dans le maintien des NSC (Shimazaki *et al.*, 2001) que dans la différenciation des astrocytes (Bonni and Greenberg, 1997). STAT3 et FGF-2 interviennent dans le choix cellulaire entre neurones et astrocytes au cours du développement (Song and Ghosh, 2004). L'activation de la voie FGF-2 *via* l'action de DNMT1 (DNA méthyl transférase) hyperméthyle le promoteur du gène *Gfap* (exprimé spécifiquement dans les astrocytes), inhibant sa transcription car STAT3 ne peut se fixer. Cette activation permet aux progéniteurs de s'engager dans la voie neuronale, alors qu'une hypométhylation du promoteur *Gfap* permet à STAT3 d'activer l'expression de GFAP qui enclenche la différenciation astrocytytaire. Enfin, l'acétylation des histones joue un double rôle dans la différenciation des précurseurs d'oligodendrocytes (Marin-Husstege *et al.*, 2002) et dans la spécification neurones/cellules gliales (Hsieh and Gage, 2004; Fan *et al.*, 2005; Hsieh and Gage, 2005).

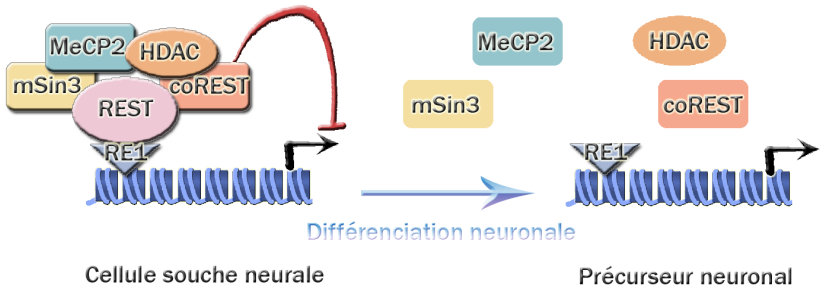



**Fig. 2.13 – Régulation de la neurogenèse embryonnaire par le complexe REST.** Dans les cellules souches neurales, les gènes neuronaux sont réprimés par le complexe REST et la chromatine est relativement compacte. Au cours de la différenciation, REST se détache, l'expression des gènes neuronaux est alors possible. D'après Ballas et Mandel, 2005

De la spécification des NCS/NP résulte un engagement de certaines cellules vers les voies de différenciation. Ces cellules post-mitotiques, dont des neurones, vont migrer et, par la suite, acquérir leur fonction au sein du cortex cérébral.

## 2.3 La migration des neurones du cortex cérébral

Comme nous l'avons vu, au cours de la corticogenèse, la phase d'expansion des NSC/NP est suivie d'une phase de différenciation en précurseurs. Les précurseurs engagés vers les voies de différenciation neuronale vont par la suite migrer dans le cortex cérébral. Au cours de la corticogenèse, deux types de migrations ont été identifiées d'après leur orientation (Fig. 2.14, A.).

- La migration radiaire concerne les neurones issus de la zone progénitrice qui migrent vers la surface du cerveau en suivant l'axe radial du télencéphale.
- La migration tangentielle caractérise le mouvement des neurones qui migrent selon un axe perpendiculaire à l'axe de migration radiaire.

Ces deux migrations permettent aux neurones d'atteindre leur position finale dans le cortex cérébral au cours du développement et établir des connexions fonctionnelles. La migration des différents neurones qui composent le cortex doit être bien coordonnée car, de la position finale de chaque neurone dépend sa fonction.

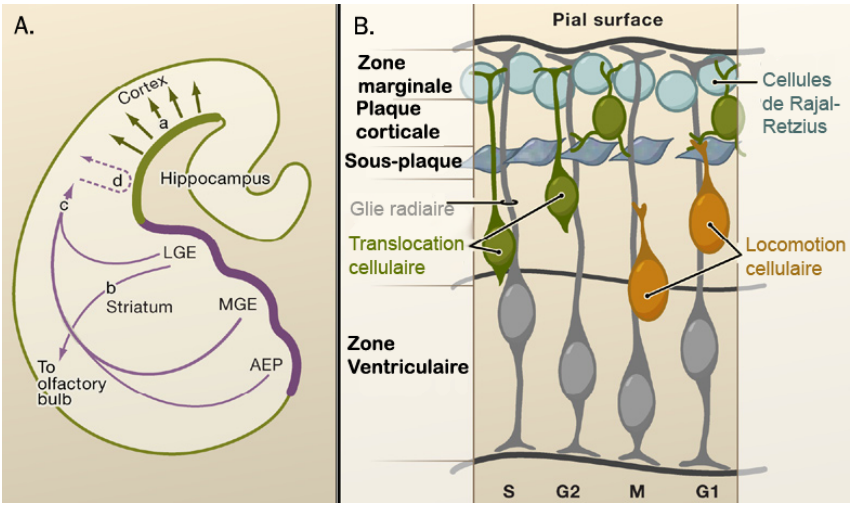



**Fig. 2.14 – Migration dans le cortex cérébral en développement.** A. Au cours de la corticogenèse, la migration radiaire concerne les neurones glutamatergiques issus du cortex qui migrent de façon radiaire (en vert, (a)). La migration tangentielle permet aux interneurones GABAergiques d'atteindre notamment le cortex (en violet, (c)) ou les bulbes olfactifs (b). Ils proviennent des éminences ganglionnaires latérale (LGE), médiane (MGE) et de l'AEP ( *anterior entopeduncular area*). Certains interneurones migrent de façon radiaire une fois dans le cortex (d). B. Les neurones à projection dérivent de la glie radiaire localisée dans la zone ventriculaire. Deux modes de migration distincts sont utilisés par les neurones post-mitotiques pour atteindre leur position finale dans le cortex : la translocation somatique, les cellules se hissent grâce à leur prolongement, et la locomotion, les cellules migrent le long des fibres de glie radiaire vers la surface piale. D'après Ayala *et al.,* 2007

### 2.3.1 La migration radiaire

La migration radiaire est plus lente que la migration tangentielle (10 $\mu$m/h contre 50 $\mu$m/h pour la migration tangentielle). Deux modes de migration des neurones corticaux ont été décrits (Fig. 2.14). La **translocation** consiste pour la cellule à utiliser une projection dirigée vers la surface piale (vers la MZ) et à se hisser (Gupta *et al.*, 2002). Au contraire, la **locomotion** consiste pour le neurone migrant librement à utiliser ses projections (plus courtes) pour s'appuyer sur l'axe de la glie radiaire, qui lui sert de guide. Ce mode est appelé gliophilique (Hatten, 1999). Les observations divergent au cours du développement, et il est donc difficile d'établir clairement quels modes de migration utilisent les neurones au cours de la corticogenèse.

#### 2.3.1.1 La translocation cellulaire dans le cortex cérébral

La translocation des neurones consiste en une extension des prolongements cellulaires des précurseurs neuronaux attachés à la surface piale (Fig. 2.14). Puis les cellules se hissent à l'aide de ce prolongement jusqu'à la zone à laquelle elles sont destinées. Lorsque les neurones se déplacent par translocation, ils étendent des embranchements puis réalisent une nucleokinèse, le noyau est tracté vers l'avant de la cellule. Des études chez l'Opossum ont montrés que la translocation était le mode de migration majoritaire des neurones. Chez la souris, il semblerait qu'au début de la corticogenèse, lorsque le cortex est peu épais, les neurones post-mitotiques utilisent ce mode de migration. L'observation de tranches par vidéo microscopie en temps réel, a montré que certaines cellules du cortex migraient par translocation somatique impliquant l'extension et la rétraction dynamique de prolongements jusqu'à la plaque corticale (Nadarajah and Parnavelas, 2002; Nadarajah *et al.*, 2003; Hatanaka *et al.*, 2004). Miyata *et al.* 2001, en utilisant des tranches marquées au DiI, ont montré que des cellules, morphologiquement semblables aux cellules de glie radiaire, pouvaient après division, hériter du prolongement attaché à la surface piale. La cellule migre alors vers la plaque corticale. Cela représente le mode de migration de 40% des neurones de E12 à 14 (Miyata *et al.*, 2001).

Un tel mode de migration implique que la VZ soit instruite très tôt sur le devenir des cellules, renforçant le modèle de la protocarte du cortex. D'autre part, l'utilisation de différents modes de migration expliquerait pourquoi lorsque la lamination des couches superficielles du cortex est affectée, la préplaque et/ou les couches profondes se développent normalement (Haubensak *et al.*, 2004). Les mécanismes impliqués dans la régulation de la migration semblent donc différents selon le type de migration adopté par les neurones.

#### 2.3.1.2 La migration gliophilique ou locomotion des neurones corticaux

La migration gliophilique est caractéristique du déplacement des neurones guidés par les fibres de glie radiaire, support de ce mode de migration (Fig. 2.14). Ce mouve-

ment, visualisé par vidéo-microscopie dans le cervelet (Hatten, 1999), est saltatoire supposant des interactions complexes d'adhérence/détachement entre le neurone et la fibre de glie radiaire. Par des expériences de lignage des cellules à l'aide de rétrovirus, il a été montré que des rangs de neurones migraient sur une cellule de glie radiaire (cellule mère ou parente)(Luskin *et al.*, 1988; Kornack and Rakic, 1995; Noctor *et al.*, 2001). Noctor et ses collaborateurs ont suivi les voies migratoires des neurones dérivant des divisions symétriques et asymétriques de la VZ et SVZ (Noctor *et al.*, 2004) (Fig. 2.15). Dans un premier temps, les précurseurs neuronaux se déplacent relativement rapidement et directement de la VZ vers la SVZ. Puis, les neurones séjournent dans la SVZ pendant 24h voir plus, et beaucoup adoptent une morphologie multipolaire. Ils s'étendent puis rétractent leur prolongement. Pendant cette période, des déplacements tangentiels sont observés (Tabata and Nakajima, 2003; Noctor *et al.*, 2004). Par la suite, certaines cellules sont capables de se diviser pour générer deux neurones, ces cellules migrent alors par la suite le long des fibres de glie radiaire vers la plaque corticale. D'une façon surprenante et encore inexpliquée, d'autres cellules vont migrer de façon rétrograde vers la VZ et puis migrer de façon gliophilique vers la plaque corticale.

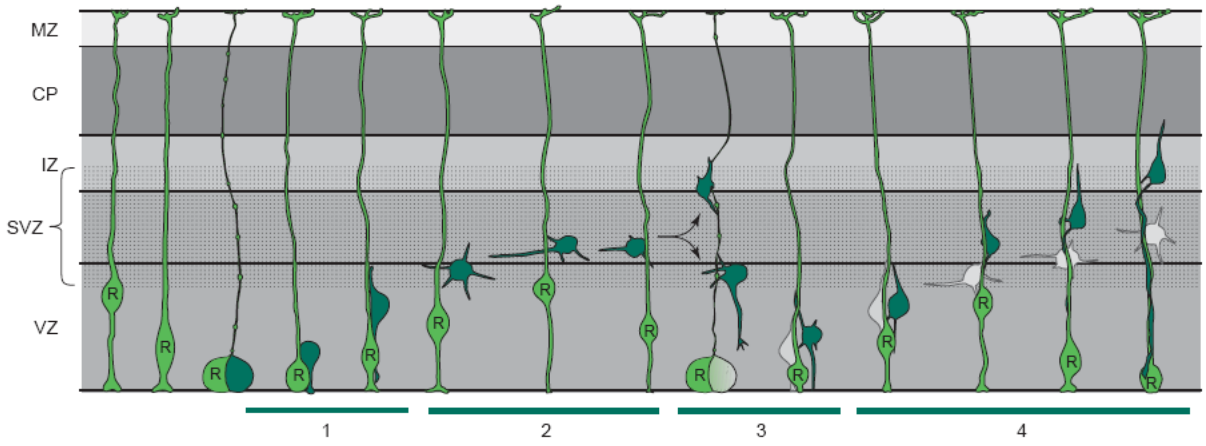



**Fig. 2.15 – Migration des neurones pyramidaux du cortex.** La phase 1 montre le mouvement des cellules issues d'une division de la glie radiaire (R) de la zone ventriculaire (VZ) vers la zone sous ventriculaire (SVZ). Dans la phase 2, les cellules mutipolaires marquent une pause dans la SVZ. Puis certains neurones rentrent dans la phase 3, où ils migrent vers la VZ. Dans la phase 4, tous les neurones migrent au moyen des fibres de glie radiaire vers la plaque corticale (CP). MZ, zone marginale ; IZ, zone intermédiaire. D'après Kriegstein et Noctor, 2004

La migration gliophilique pourrait permettre aux neurones migrants d'atteindre correctement les couches les plus éloignées de la zone de prolifération qui génèrent les neurones en question. Ceci pourrait être une solution pour franchir les couches de neurones déjà formées puisque l'architecture du cortex se fait de façon *inside-out* comme nous l'avons vu précédemment.

### 2.3.2 La migration tangentielle

Parallèlement à la neurogenèse du pallium, la zone prolifération du télencéphale ventral génère des neurones qui migrent tangentiellement dans et à travers le cortex pour constituer les interneurones inhibiteurs GABAergiques (Anderson *et al.*, 1997; Tamamaki *et al.*, 2001). Diverses classes d'interneurones sont générées, différant par leur morphologie, leur constitution moléculaire, leur propriétés physiologiques et leur destinée laminaire ultime (Xu *et al.*, 2003). En parallèle, quelques progéniteurs neuronaux produits dans la ganglia basale migrent tangentiellement par rapport aux neurones du cortex. La grande majorité des interneurones GABAergiques retrouvée dans le cortex murin sont générés par la ganglia basale (Anderson *et al.*, 1997). Ces interneurones sont générés à E11 dans les éminences ganglionnaires et migrent à travers le télencéphale. Au contraire, chez les humains et les primates, les interneurones sont principalement générés par le cortex et seulement une petite fraction provient du subpallium.

Sont décrites plusieurs zones ventriculaires de prolifération, les éminences ganglionnaires latérales (LGE), médianes (MGE) et caudales (CGE). Les interneurones générés migrent tangentiellement jusqu'au cortex où ils constituent les circuits primaires neuronaux inhibiteurs GABAergiques. La majeure partie de ces interneurones arrive dans le cortex *via* la SVZ. Les interneurones se coordonnent avec la lamination du cortex en suivant la séquence *inside-out* de génération des neurones (Fairén *et al.*, 1986; Noctor *et al.*, 2004). En général, les interneurones et les neurones à projections expriment les mêmes marqueurs et adoptent une destinée selon le moment de leur naissance (Takahashi *et al.*, 1999; Hevner *et al.*, 2001). Les interneurones migrent sur de grandes distances et changent de modes et de voies de migration (Ang *et al.*, 2003; Tanaka, 2003). Les interneurones séjournent dans la VZ/ SVZ comme les neurones à projection, et la spécification des deux types neuronaux semble se coordonner dans cette zone (Ang *et al.*, 2003; Nadarajah *et al.*, 2003; Tanaka, 2003; Noctor *et al.*, 2004).

Dans le travail de recherche présenté ici, nous nous sommes attachés en premier lieu à l'étude de la migration radiaire chez les souris mutantes pour le gène *Hsf2*. La compréhension des mécanismes qui régissent la dynamique migratoire des neurones, nous était donc très utile, et je le décrirai dans les paragraphes suivants.

### 2.3.3 Les défauts de migration radiaire

#### 2.3.3.1 Défauts affectant la dynamique du cytosquelette

L'analyse de souris mutantes présentant des défauts d'architecture du cortex couplée aux études de mutations provoquant, chez l'Homme, des problèmes de développement cortical, a permis de comprendre et d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la migration radiaire des neurones au cours du développement cortical.

La migration des neurones post-mitotiques requiert la coordination entre les processus d'adhérence et de dynamique du cytosquelette dans les neurones et la glie radiaire, support de la migration. Les protéines du cytosquelette regroupent différents types de protéines : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Les filaments intermédiaires (de l'ordre de 10nm de diamètre) sont impliqués dans le maintien de l'intégrité cellulaire et le soutien de l'enveloppe nucléaire. La Nestine par exemple, est un des composants des filaments intermédiaires. Leur composition est très hétérogène et leur structure est stable. En revanche, les filaments d'actine et les microtubules sont composés d'un nombre plus restreint de sous-unités formant des structures hautement dynamiques (Fig. 2.16).

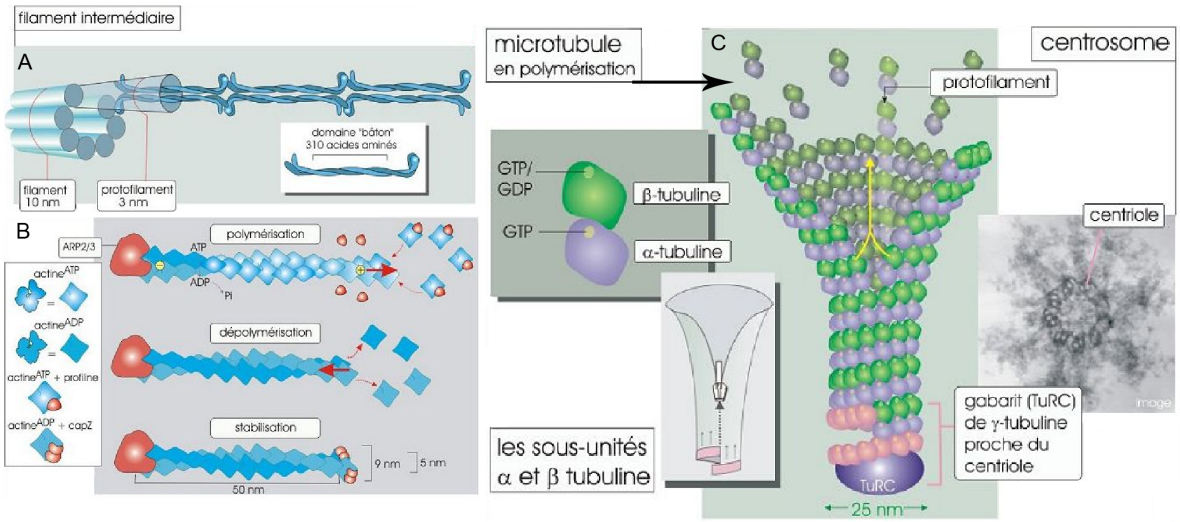



**Fig. 2.16 – Le cytosquelette.** A. Les filaments intermédiaires sont des molécules fibreuses allongées. L'assemblage débute par deux dimères superenroulés qui s'associent de manière antiparallèle pour former un protofilament, puis ces protofilaments s'associent en filament intermédiaire. B. L'actine se polymérise en présence d'ATP en une hélice formant un filament flexible et polaire. *In vivo*, la polymérisation est contrôlée notamment par ARP2/3 qui permet l'initiation de la polymérisation, la profiline protège l'actine-ATP de l'hydrolyse. Après la polymérisation, une hydrolyse aléatoire de l'ATP a lieu, et les molécules d'actine liées à l'ADP ont tendance à se détacher. CapZ stabilise alors le filament. C. A partir d'un centrosome, les dimères de tubuline ($\alpha$ et $\beta$) chargés en GTP sont ajoutés et élaborent des protofilaments, qui s'assemblent latéralement entre eux, formant ainsi des feuillets. Les feuillets se replient progressivement sur eux mêmes pour former le microtubule, cylindre creux et rigide. D'après $http://www.ulysse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell-diffusion$.

Le cytosquelette est essentiel pour le maintien de la morphologie de la cellule, la formation des prolongements mais aussi contrôle la motilité. En effet, dans tous les modèles de cellules en migration (fibroblastes, neutrophiles...), la formation des protrusions membranaires tels les filopodes et des lamellipodes à l'avant de la cellule, comme le mouvement des cônes de croissance neuronaux dépendent de la dynamique des filaments d'actine. Les

filaments d'actine (5-9nm de diamètre) sont composés de différents types d'actine selon les types cellulaires, les cellules non musculaires possèdent la $\beta$- et la $\gamma$-actine. Dans la formation des lamellipodes, le réseau d'actine sous-membranaire sert d'appui à la polymérisation de nouveaux filaments qui repoussent la membrane, formant ainsi progressivement le lamellipode qui progresse (Small *et al.*, 2002). Les sites d'initiation de la polymérisation (sites de nucléation) sont désignés par l'activation de ARP2/3 qui pour sa part est sous l'influence des récepteurs membranaires aux chémokines. Les lamellipodes sont des extensions dynamiques des cellules (leucocytes, fibroblastes...) qui leur permettent de se déplacer sur une surface. Ils se forment (et disparaissent) en quelques secondes, témoignant de la dynamique rapide de la polymérisation et dépolymérisation de l'actine. De plus, à ce déplacement s'ajoutent des mouvements de tension. Les faisceaux contractiles d'actine forment des fibres dites « de tension » qui permettent à la cellule de se contracter et d'exercer ainsi une traction sur la matrice extracellulaire qui les entoure. Ce processus est essentiel pour entamer la cicatrisation par les fibroblastes au cours de laquelle les deux lèvres de la blessure doivent progressivement être rapprochées. Par l'intermédiaire de complexes moléculaires d'adhérence regroupés aux sites appelés contacts focaux, les filaments d'actine sont reliés à la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine et collagène). La molécule principalement impliquée est l'intégrine qui, grâce à un complexe de molécules de liaison (taline, vinculine et -actinine) est fixée au cytosquelette d'actine. De plus, les microfilaments d'actine interagissent avec la myosine, moteur moléculaire qui permet la mobilité de la cellule. Ces interactions dépendent des protéines GTPases de la famille Rho/Rac/cdc42, qui contrôlent le taux de phosphorylation des chaînes légères ou lourdes de la myosine modulant la dynamique générale de la cellule (Hall, 1998).

Le mouvement du noyau (nucleokinèse) est surtout lié à la dynamique de polymérisation/dépolymérisation des microtubules, d'où une migration dite saltatoire des cellules, visualisée en vidéo-microscopie pour différents types cellulaires notamment les neurones corticaux (Nadarajah and Parnavelas, 2002). Les microtubules (25nm) sont constitués de tubulines ($\alpha$ et $\beta$) et stabilisés par MAP2 et TAU, et les fonctions consistent notamment en des mouvements des organites grâce au transport antérograde des kinésines et rétrograde des dynéines. Ces deux protéines motrices de la famille des myosine-II, se déplacent de façon polarisée sur les microtubules grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Ce sont les kinésines qui se déplacent vers l'extrémité plus du microtubule et les dynéines, qui se déplacent vers l'extrémité moins (en direction du centrosome).

### Les protéines régulatrices des microtubules

La lissencéphalie de type 1 ou syndrome de Miller-Diecker se traduit par une malformation sévère du cortex chez l'Homme due à une mutation du gène *Lis1* (Reiner *et al.*, 1993). LIS1 est une phosphoprotéine essentielle pour la migration neuronale, la prolifération et le transport intracellulaire (Leventer *et al.*, 2001). LIS1 est la sous-unité non catalytique de la PAF acétylhydrolase neuronale (PAFAH1B1) qui dégrade le *platelet activitin factor* PAF (Hattori *et al.*, 1994). PAF influence la migration des neurones corticaux . Une réduction de l'activité conduit à des défauts de migration. De plus, LIS1 s'associe à un complexe multiprotéique lié au centrosome, le MTOC (*Microtubule Or-*

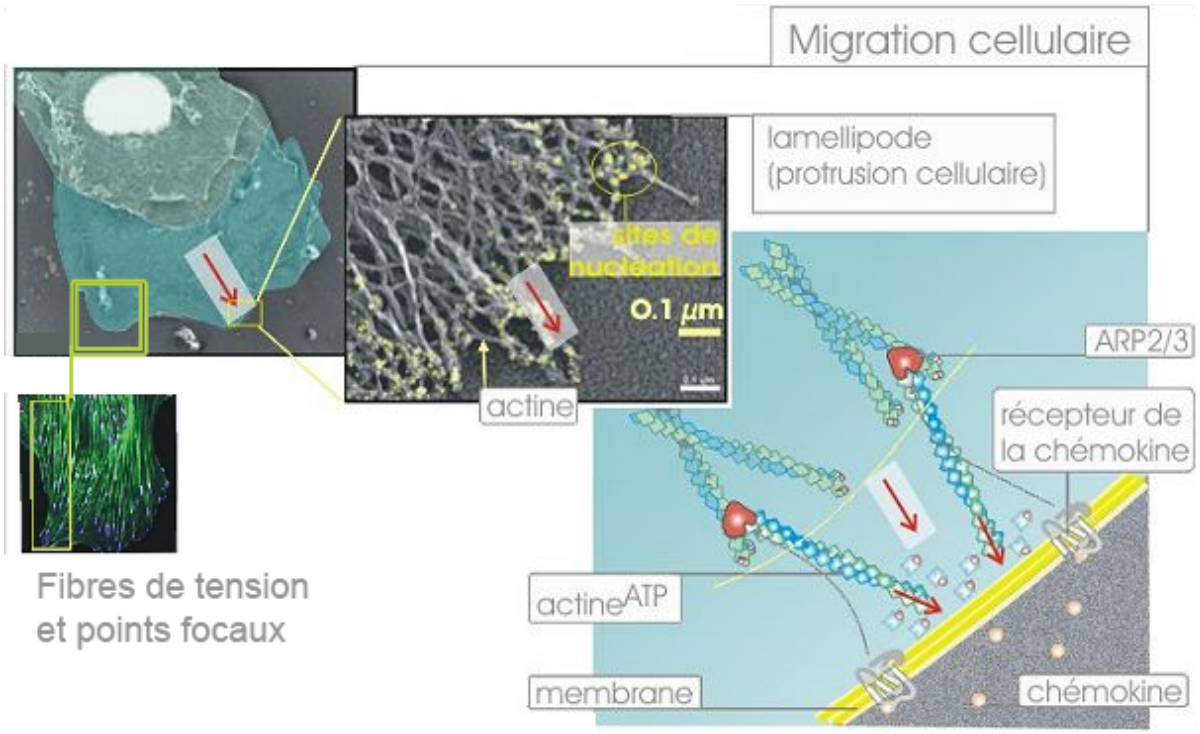



**Fig. 2.17 – La motilité cellulaire.** La migration cellulaire (à droite). La progression du lamellipode cellulaire (à gauche) est permise grâce à la polymérisation *de novo* de filaments d'actine qui poussent la membrane cellulaire. Les fibres de tension (en dessous). Les faisceaux contractiles d'actine forment des fibres dites « de tension » qui permettent à la cellule de se contracter et d'exercer ainsi une traction sur la matrice extracellulaire qui les entoure grâce à des point d'adhérence ou contacts focaux. D'après $http://www.ulysse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell-diffusion$.

*ganising Center*) qui organise le réseau de microtubule. Elle interagit avec la dynéine, moteur moléculaire, avec NUDE (*Nucleokinesis Defective*) qui lie la $\gamma$tubuline et NUDEL (*Nucleokinesis Defect-Like*) une cible de CDK5 dont nous parlerons par la suite (Feng and Walsh, 2001). NUDE, LIS1 et la dynéine colocalisent au MTOC dans le processus de guidage des neurones du cervelet. NUDE est en outre détectée dans le cortex cérébral pendant la migration des neurones corticaux (Aumais *et al.*, 2001).

### Défauts affectant les interactions adhésives

La migration des cellules nécessite une alternance de phase d'adhérence au substrat avec point d'ancrage et de phase non adhérente permettant la motilité. Les molécules d'adhérence sont ainsi impliquées au cours des processus de migration. Elles regroupent les intégrines, les cadhérines et les immunoglobulines (*Ig-Cell Adhesion Molecule*). Dans le cortex, les intégrines et les cadhérines modulent la migration des neurones.

Les intégrines sont des récepteurs impliqués dans les interactions adhésives inter-cellules et entre les cellules et la matrice extracellulaire (MEC). Ces récepteurs pour la plupart, modulent la dynamique des microfilaments d'actine *via* un certain nombre de protéines de liaison qui s'associent à leur région intracellulaire. Elles participeraient alors à la formation des points d'adhérences focaux et auraient un rôle de récepteurs mécanotransducteurs, en créant des forces de traction (Wang *et al.*, 1993). Elles sont constituées d'une sous-unité $\alpha$ et d'une sous-unité $\beta$ dont les propriétés d'adhérence sont différentes. Certaines sous-unités sont impliquées au cours de la corticogenèse (Magdaleno and Curran, 2001). En effet, la sous-unité $\alpha$5 semble responsable de l'adhérence des neurones à la glie. Les souris dont le gène de l'intégrine $\alpha$3 est inactivé présentent une lamination corticale perturbée, les cellules gliales se différencier précocément en astrocyte, et la vitesse de migration neuronale est perturbée (Anton *et al.*, 1999). Les souris, dont le gène de l'intégrine $\alpha$6 ou $\beta$1 est inactivé, présentent un envahissement de la zone marginale par des neurones post-mitotiques, une exencéphalie importante due à un mauvais ancrage des cellules gliales à la membrane basale et une formation anormale de la zone marginale (Georges-Labouesse *et al.*, 1998; Graus-Porta *et al.*, 2001).

Les cadhérines sont des glycoprotéines de la surface cellulaire, capables de se dimériser entre elles de proche en proche dans une même membrane cellulaire ou d'une membrane cellulaire à celle d'une cellule adjacente. Ces protéines peuvent agir avec différentes caténines. La $\beta$caténine et l'$\alpha$caténine interagissent avec les microfilaments d'actine. Les *cadherin neural related* CNRs sont capables de lier la kinase FYN qui intervient dans la phosphorylation de DAB1, protéine impliquée dans les voies de signalisation régissant la migration, notamment dans la voie CDK5/P35. Enfin, le complexe CDK5/P35 lie la N-cadhérine *via* la $\beta$caténine (Kwon *et al.*, 2000), comme nous le verrons plus loin.

#### 2.3.3.2 Les voies de signalisation de la migration

Chez l'Homme, différentes lissencéphalies ont été décelées résultant de défauts de migration des neurones corticaux. Les défauts de migration sont souvent responsables de lissencéphalie qui désigne un ensemble de maladies qui ont en commun la disparition de la morphologie du cortex cérébral, celui-ci apparaît lisse et une désorganisation des couches de neurones du cortex est observée. C'est notamment le cas lors de mutation dans les gènes codant la Reeline ou Lis1 (PAFAH1b1) qui provoque une lissencéphalie importante associée à l'épilepsie et un retard mental (Reiner *et al.*, 1993). Chez la souris, différents mutants présentent des défauts de migration des neurones corticaux. Les souris Reeler (où le gène de la Reeline est muté) présentent une inversion des couches corticales sans séparation de la préplaque tandis que les souris dont le gène Cdk5 est inactivé montrent une inversion des couches corticales avec une séparation de la préplaque, mais la sous-plaque générée n'est pas localisée normalement dans le cortex (Fig. 2.18). Comme nous allons le détailler, ces deux voies régissent la migration des neurones corticaux de façon indépendante.

Beaucoup de protéines de la matrice extracellulaire sont impliquées dans la migration des neurones corticaux : la Reeline, les laminines comme la thrombospondine, la ténascine-C et le collagène IV (Altman and Bayer, 1990). L'établissement des lames basales des cellules ainsi que l'environnement cellulaire, sont importants dans les mécanismes de migration, l'une des voies de signalisations la plus détaillée est celle de la Reeline. De plus, cette voie est impliquée dans le phénotype des souris *Hsf2*$^{-/-}$.

**La voie REELINE**

La mutation du gène codant pour la Reeline provoque de sévères défauts de développement du cerveau chez les Mammifères. En effet, les souris mutantes *Reeler* présentent un désordre dans la lamination des couches corticales où les couches semblent inversées (Fig. 2.18) (Caviness and Rakic, 1978; D'Arcangelo *et al.*, 1995; Lambert de Rouvroit and Goffinet, 1998; Trommsdorff *et al.*, 1999; Rice and Curran, 2001; Tissir and Goffinet, 2003; D'Arcangelo, 2006). Le promoteur humain du gène codant pour la Reeline, contient une région *CG-boxes* pouvant être fixée par des facteurs de transcription basal comme Sp1, et une *T-box*, élément fixé par le facteur TBR1 (D'Arcangelo, 2006). De plus, le niveau d'expression de la Reeline est régulé par différents processus épigénétiques (Tremolizzo *et al.*, 2002), notamment l'action de la DNA méthyltransférase 1, DNMT1 diminue l'expression de la Reeline (Noh *et al.*, 2005). Les cerveaux de patients atteints de schizophrénie présentent une activité de DNMT1 élévée, et un niveau plus réduit de l'expression de la Reeline, suggérant que ces défauts d'expression soient reliés à la pathologie mais ceci reste à démontrer (Chen *et al.*, 2002). Au niveau anatomique, les cortex cérébraux des patients portants une mutation hétérozygote pour *Lis1* ou homozygote pour la *Reeline*, sont très similaires suggérant que ces deux protéines pourraient avoir une fonction commune dans la migration neuronale, comme nous le détaillerons plus loin.

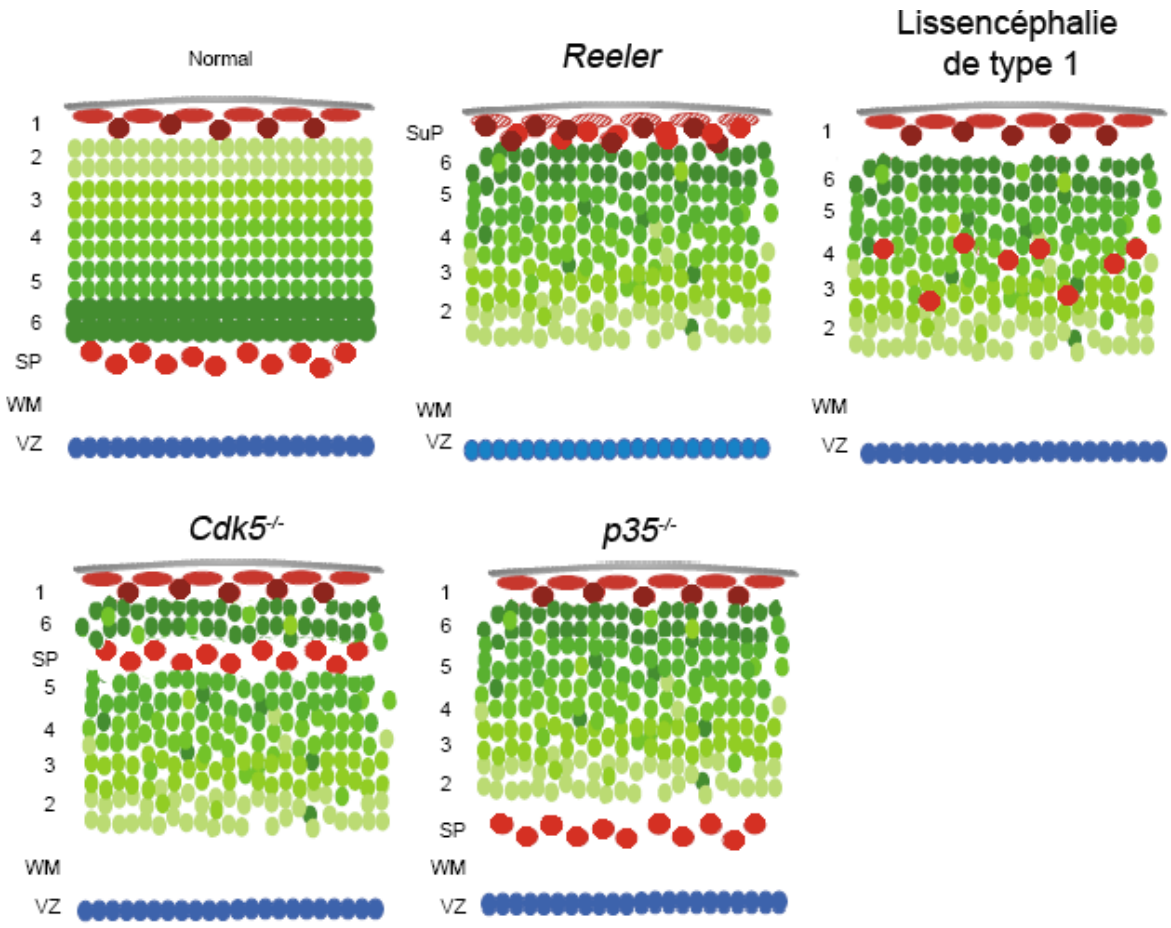



**Fig. 2.18 – Phénotypes des souris affectées par des défauts de migration.** Par comparaison au cortex normal qui montre une organisation *inside-out*, les souris dont les gènes *Reeline* (Reeler), le gène *Lis1* (atteint de lissencéphalie de type 1), et les souris $Cdk5^{-/-}$, $p35^{-/-}$ présentent une inversion des couches corticales de façon *outside-in* avec ou non un bon positionnement de la sous-plaque. D'après Aboitiz *et al.,* 2002,Olson et Walsh,2002.

L'expression de la Reeline débute chez la souris vers E10 dans le cerveau en développement notamment dans le télencéphale. Pendant la corticogenèse, la Reeline est exprimée dans la zone marginale, composée de différents types de cellules dont les cellules de Cajal-Retzius (D'Arcangelo *et al.*, 1995; Nakajima, 2007). Les cellules de Cajal-Retzius produisent majoritairement la Reeline. Ces cellules aux origines très différentes, envahissent la zone marginale du cortex par migration tangentielle (Takiguchi-Hayashi *et al.*, 2004; Bielle *et al.*, 2005). Parce que la Reeline est exprimée dans les couches les plus superficielles, il a été suggéré qu'elle régulait le développement de la plaque corticale en agissant comme un signal d'arrêt pour les neurones migrant de façon radiaire. En effet, la surexpression de la Reeline provoque l'arrêt de la migration et le détachement des neurones à la glie radiaire (Dulabon *et al.*, 2000). Pourtant chez les mutants *Reeler*, les neurones les plus tardifs se localisent d'une façon ectopique dans les couches profondes du cortex sans envahir la zone marginale. Et l'expression ectopique de la Reeline sous contrôle du promoteur du gène codant pour la Nestine rétablit un phénotype normal chez les mutants *Reeler* (Magdaleno *et al.*, 2002). Ainsi la Reeline pourrait être un facteur promouvant la migration neuronale vers la surface du cortex. Ceci suggère qu'un gradient extracellulaire de Reeline pourrait être établi dans le cortex, l'action de la Reeline serait alors différente selon sa concentration. En concentration faible, la Reeline permettrait l'extension des prolongements neuronaux et la migration, tandis qu'à forte concentration dans la zone marginale, la Reeline permettrait le détachement des neurones de la glie radiaire et l'arrêt de la migration.

Une autre hypothèse explique l'action antagoniste de la Reeline, qui dépendrait de l'activation distincte d'acteurs de la voie de signalisation, agissant ainsi différemment sur les neurones en migration. Il a été proposé, à la suite de l'analyse des souris dépourvues des récepteurs ApoER2 et VLDLR, que ces récepteurs de la Reeline n'avaient pas la même action. En effet, ApoER2 permettrait la migration radiale des neurones tandis que VLDLR induirait le signal d'arrêt de la migration (Hack *et al.*, 2007). En effet, la Reeline se fixe sur différents récepteurs membranaires comme les intégrines, les récepteurs VLDLR (*Very Low Density Lipoprotein Receptor*) et ApoER2l (*Apolipoprotein E Receptor 2*) reliés à un adaptateur cytosolique appellé *Disabled-1* (DAB1) (Fig. 2.19). DAB1, une fois phosphorylée, modifie la dynamique du cytosquelette.

### DAB1, adaptateur cytosolique

Les souris dont le gène *Disabled-1* (DAB1) est muté comme les souris mutantes spontanés *scrambler* et *yotari*, présentent un défaut de séparation de la préplaque et une structure laminaire du cortex relativement inversée (Sheldon *et al.*, 1997). La vélocité des neurones migrants est beaucoup plus réduite que chez les souris sauvages conséquence d'une interaction avec la glie radiaire plus forte impliquant les intégrines. (Howell *et al.*, 1997; Sheldon *et al.*, 1997; Howell *et al.*, 1999; Sanada *et al.*, 2004). Ainsi DAB1 est nécessaire pour le positionnement précis et la formation laminaire du cortex. Le phénotype des souris mutantes rappelle le phénotype des souris *Reeler* (D'Arcangelo *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 1995) et celui des souris dont les gènes codant pour ApoER2 et VLDLR

sont inactivés (D'Arcangelo *et al.*, 1995; Hiesberger *et al.*, 1999; Trommsdorff *et al.*, 1999). Cette observation a permis de mieux comprendre la voie de signalisation de la Reeline, et il a été démontré que DAB1 intervenait en aval de la voie de signalisation de la Reeline (Fig. 2.19).

L'expression de DAB1 commence à partir de E14 dans le cortex en développement et diffère selon le type cellulaire, puisque différentes isoformes sont exprimées dans les précurseurs et dans les cellules différenciés (Katyal and Godbout, 2004; Bar *et al.*, 2003). Le gène *Dab1* a été identifié comme étant un gène appartenant à une région de grande instabilité génomique définie, *Common Fragile Sites* (CFSs) (Smith *et al.*, 2006). Les gènes de ces régions ont de grandes séquences introniques, l'épissage alternatif génère plusieurs transcrits participant à l'expression des gènes en conditions physiologiques ou en réponse à un stress cellulaire (UV, apoptose...). *Dab1* est un gène complexe qui suggère une régulation fine de son expression lui permettant sa position clé d'« interrupteur »dans la voie de signalisation Reeline. De plus, DAB1 pourrait avoir un rôle dans le noyau puisque la protéine possède un élément de localisation nucléaire nécessaire pour un transport actif de la protéine dans le noyau où son rôle n'est pas encore identifié (Honda and Nakajima, 2006).

LIS1 interagit avec DAB1 de façon indépendante de la Reeline, peut être en se fixant spécifiquement sur le récepteur VLDLR (Assadi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007)(Fig. 2.19). De plus, il a été démontré que LIS1 est capable d'interagir avec les complexes moteurs dynéine/dynactine associées aux microtubules dans lequel LIS1 interagit avec la chaîne lourde de la dynéine, NudE, NudEL et *plus-end tracking protein* CLIP-170 (Niethammer *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2000; Coquelle *et al.*, 2002), modifiant ainsi la migration. Cette régulation n'est pas complètement comprise. NudE et NudEL (respectivement codés par les gènes Nde1 et Ndel1 chez les Mammifères) associés aux microtubules interagissent directement avec LIS1 (Feng *et al.*, 2000; Stehman *et al.*, 2007). Le complexe NudEL/LIS1/dynéine permettrait l'organisation des microtubules, la translocation nucléaire et le positionnement des neurones post-mitotiques dans le cortex en développement (Shu *et al.*, 2004).

La protéine DAB est activée par phosphorylations sur de multiples résidus tyrosine après fixation de la Reeline sur ses récepteurs (Howell *et al.*, 1999). Outre la voie de signalisation de la Reeline, DAB1 est aussi activée par une seconde voie de signalisation régissant la migration des neurones, en effet, DAB1 est phosphorylée sur ses résidus serine/thréonine par CDK5 activée (Ohshima *et al.*, 2007). Ainsi DAB1 est au croisement de deux voies de signalisation différentes celle de la Reeline et celle de CDK5 (Honda and Nakajima, 2006).

### La voie CDK5

La cyclin-dependant kinase 5 (Cdk5) joue un rôle pivot dans le développement du cerveau et la migration neuronale. C'est une CDK atypique puisque que son activité n'est pas associée à une cycline et elle n'interviendrait pas dans la régulation du cycle

cellulaire. Sa capacité à phosphoryler ses substrats dépend de l'activation de sous-unités régulatrices spécifiques des neurones p35 et p39 auxquelles elle se lie (Tsai *et al.*, 1994; Ko *et al.*, 2001). Malgré son expression ubiquitaire dans le système nerveux, l'activité de CDK5 (sérine/thréonine kinase) est restreinte aux neurones exprimant p35 et p39 (Tsai *et al.*, 1994; Ko *et al.*, 2001). CDK5 est impliqué au cours du développement du cortex pour des fonctions diverses telles que le transport membranaire, la mise en place des structures synaptiques et la plasticité neuronale, dans le guidage axonal, la dynamique des filaments d'actine et des microtubules, la migration neuronale et l'adhérence cellulaire.

Lorsque le gène *Cdk5* est inactivé par transgenèse chez la souris, le cortex cérébral est désorganisé, les neurones ne franchisent pas les couches déjà formées ceci résulte en une inversion de l'organisation du cortex, la sous-plaque est ectopiquement dans la superficie du cortex rappelant le phénotype des souris *Reeler* (Gilmore *et al.*, 1998; Ohshima *et al.*, 1999; Ohshima *et al.*, 2002). Lorsque les gènes *p35* et *p39* sont inactivés, le phénotype des souris est similaire à celui des souris $Cdk5^{-/-}$, suggérant p35 et p39 sont les seules sous-unités activatrices de CDK5. En revanche P35 et P39 ont une action partiellement redondante puisque l'analyse des souris dont le gène *p35* ou *p39* est inactivé montre un phénotype plus modéré que celui des souris $Cdk5^{-/-}$ et $p35^{-/-}p39^{-/-}$. Les souris $p35^{-/-}$ présentent un défaut d'organisation laminaire plus modéré par rapport aux souris $Cdk5^{-/-}$ suggérant une compensation par son homologue p39 (Chae *et al.*, 1997; Kwon and Tsai, 1998; Kwon and Tsai, 2000). En revanche, les souris $p39^{-/-}$ ne dévoilent aucunes anomalies de positionnement neuronales (Ko *et al.*, 2001). Le fait que p35 fixe et active CDK5 de façon plus robuste que p39 exprimée de façon moins abondante dans les cerveaux (Zheng *et al.*, 1998) expliquerait la différence phénotypique des souris mutantes. L'expression de p35 est maximale à E15 dans la plaque corticale (Tsai *et al.*, 1994) et son expression est régulée par les facteurs SP, qui fixent des GC-box identifiées en amont du promoteur de *p35* (Ross *et al.*, 2002). A proximité de ses GC-box, notre équipe a identifié des sites HSE liés par HSF2 en fin de corticogenèse, et par ChIP, il a été démontré que *p35* était une cible directe de HSF2 au cours du développement du cerveau (Chang *et al.*, 2006).

Chez l'adulte, CDK5 semble promouvoir la survie neuronale (Tanaka *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002) mais sous l'effet d'excitotoxines, d'un stress oxydatif ou du peptide $\beta$amyloïde, p39 et p35 membranaires sont respectivement clivées par la calpaïne en p29 et p25 cytosoliques conduisant à une suractivation de CDK5 entraînant la mort neuronale (Patrick *et al.*, 1999; Weishaupt *et al.*, 2003). CDK5 possède une vingtaine de substrats différents dans les neurones dont Tau, impliquée dans les maladies neurodégénératives (Baumann *et al.*, 1993). L'expression et l'activité de CDK5 augmentent au cours de la différenciation neuronale de neuroblastomes de souris (Muñoz *et al.*, 2000) et du développement du cerveau (Tsai *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2000). Bien que son activité soit essentiellement neuronale, CDK5 semble avoir un rôle de régulateur positif dans la différenciation.

CDK5 une fois activé par p35 ou p39, est capable de modifier modifie la dynamique du cytosquelette en phosphorylant différents partenaires comme DCX/DCLK, NudE/NudeL, LIS1 (Humbert *et al.*, 2000; Feng and Walsh, 2001; de Rouvroit and Gof-

finet, 2001). Comme nous l'avons vu le complexe NudE/LIS1/dynein permettrait la migration des neurones post-mitotiques dans le cortex en développement (Shu *et al.*, 2004). Certaines lissencéphalies chez l'Homme ne sont pas dues à la mutation de *Lis1*, mais à la mutation du gène *Dcx* (Olson and Walsh, 2002; Reiner *et al.*, 2006). DCX agit comme une protéine MAP, associée aux microtubules et les stabilise *in vitro*. Elle est régulée par phosphorylation notamment par CDK5. Les souris dont le gène *Dcx* est muté ne présente pas de défauts de lamination du cortex, suggérant une compensation avec *Dcx-like kinase* (DCLK), une protéine homologue associée elle aussi aux microtubules. Par contre, l'inactivation de Dcx et de Dclk par RNAi montre des défauts de positionnement neuronaux (Bai *et al.*, 2003; Deuel *et al.*, 2006) et les souris mutées pour les deux gènes présentent une dispersion des cellules superficielles dans les couches profondes (Deuel *et al.*, 2006). Ces travaux suggèrent que ces deux MAP sont requis pour le positionnement des neurones corticaux et des interneurones, dans l'acquisition d'une forme bipolaire, la formation des prolongements neuronaux et le transport vésiculaire (Koizumi *et al.*, 2006; Deuel *et al.*, 2006; Friocourt *et al.*, 2007; Kappeler *et al.*, 2007).

Non seulement le complexe CDK5/P35 est capable de moduler la dynamique des microtubules, mais il est aussi capable de moduler la dynamique d'actine en modifiant les points d'adhérence. En effet, le complexe diminue l'adhérence cellulaire nécessaire à la migration et permise par les $\beta$caténine/N-cadherin (Kwon *et al.*, 2000). CDK5 phosphoryle DAB1 indépendamment de la voie initiée par Reeline (Keshvara *et al.*, 2002). Il existe donc une synergie des voies de signalisation de CDK5/P35 et de la Reeline dans le positionnement des neurones corticaux dans le cerveau murin en développement (Ohshima *et al.*, 2001)(Fig. 2.19).

## 2.4 Dynamique d'expression de HSF2 au cours de la corticogenèse

Les données présentées ici récapitule la dynamique d'expression et d'activité de liaison à l'ADN déjà décrite pour HSF2. J'ai complété cette analyse dynamique de l'expression de HSF2 par une analyse de l'expression de la $\beta$galactosidase sous contrôle des séquences régulatrices du gène *Hsf2* (Kallio *et al.*, 2002) pour mieux évaluer dans quelles couches corticales HSF2 était exprimée au cours du temps (Fig. 2.21).

A 9 jours et demi de développement, l'expression de *Hsf2* est relativement ubiquitaire. L'activité de liaison à l'ADN de HSF2 atteint un pic à E10,5 (Rallu *et al.*, 1997) (Fig. 2.20) . A ce stade, la protéine HSF2 est détectée de façon homogène le long de l'axe antéropostérieur, dans l'ensemble des vésicules céphaliques et dans l'ensemble du tube neural. Dans le cortex embryonnaire (E9,5-E11,5), protéine et ARN de *Hsf2* sont détectés dans l'ensemble du neuroépithélium (Rallu *et al.*, 1997; Kallio *et al.*, 2002). L'activité de la $\beta$galactosidase sous contrôle des séquences régulatrices du gène *Hsf2* confirme cette dynamique d'expression de HSF2 (Fig. 2.21). Il faut remarquer que les ARNm chimériques

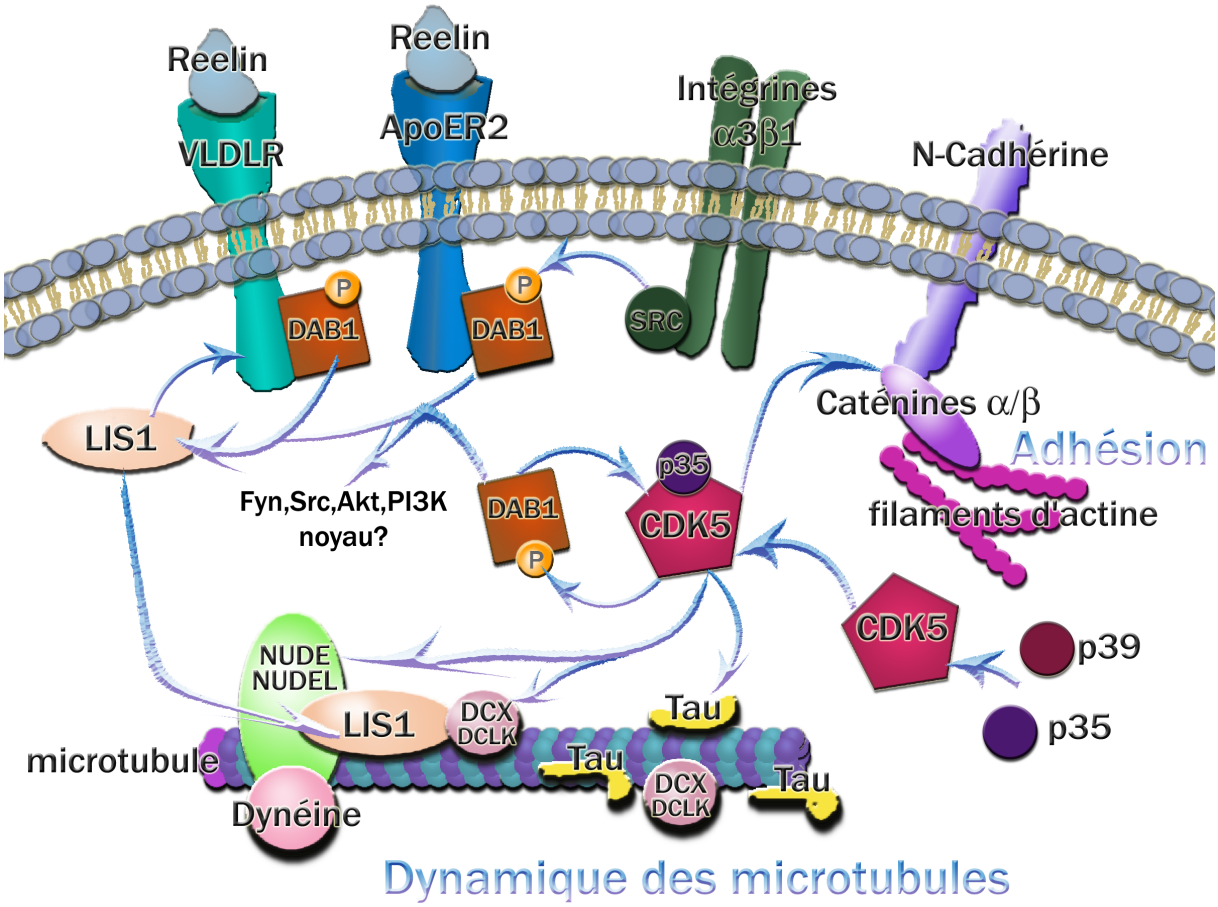



**Fig. 2.19 – Voies de signalisation modulant la migration des neurones.** La fixation de la Reeline aux récepteurs VLDLR et ApoER2 active la kinase de la famille des Src (SFK) et phosphoryle DAB1 fixée à ces recepteurs. DAB1 phosphorylée (DAB1-P) peut se fixer au complexe LIS1. En effet, LIS1 interagit avec le complexe dynéine/NudE/DCX contrôlant donc la migration neuronale et la formation laminaire du cortex. Une autre voie de signalisation, impliquant CDK5 et ses activateurs p35 et p39, est capable de moduler la dynamique du cytosquelette, en phosphorylant DAB1, et en intéragissant avec les MAP (Tau, NudE, DCX) et les N-cadhérine/caténines. D'après Olson *et al.,* 2002 ; Gupta 2002 ; D'Arcangelo 2006

Hsf2-$\beta$geo sont peu abondants (difficile à détecter en RT-PCR) (Kallio *et al.*, 2002), son profil récapitule fidèlement le profil d'expression de HSF2. D'une façon intéressante, dès E11,5, l'activité de la $\beta$galactosidase est moins importante dans le cortex que dans le mésencéphale, où elle est exclue de la ligne médiane dorsale. La ligne médiane dorsale du mésencéphale constitue la plaque du toit, modulant les facteurs extrinsèques et intrinsèques indispensables à la régionalisation dorso-ventrale du tube neural, et à la différenciation des neurones. La ligne médiane exprime spécifiquement certains gènes imbriqués dans des réseaux de régulation comme c'est le cas pour MSX1, WNT1 et GDF7 (Bach *et al.*, 2003; Alexandre *et al.*, 2006). Si l'expression de HSF2 est exclue de la ligne médiane, peut être est-il soumis à une régulation spatio-temporelle dépendante des facteurs MSX1 ou WNT1 ? Ceci reste à confirmer.

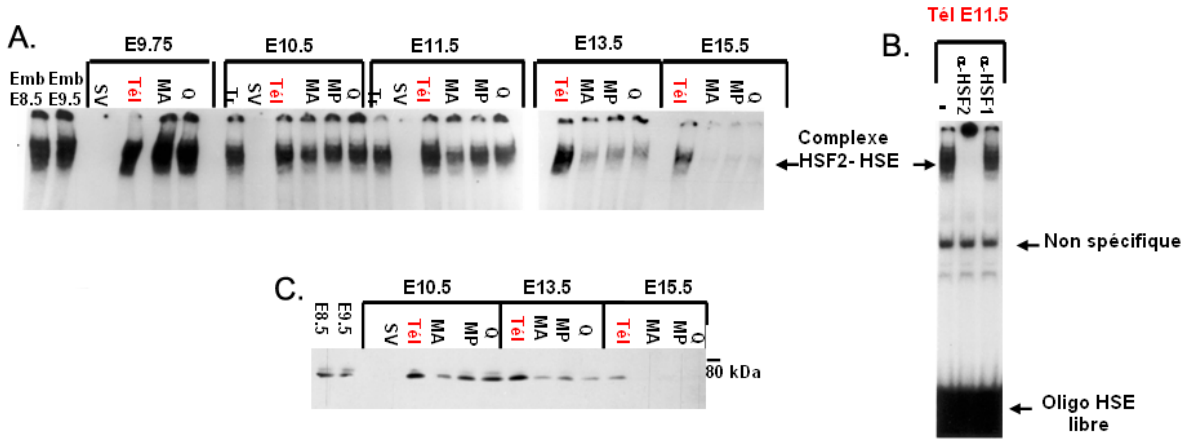



**Fig. 2.20 – Profil d'expression et d'activité de liaison à l'ADN de HSF2 au cours du développement**. A. Suivie de l'activité de liaison des HSF au cours du développement par gel retard. B. Supershift dans des extraits télencéphaliques à E11.5. C. Profil d'expression de HSF2 au cours du développement. Tr, tronc ; SV, sac vitellin ; Tel, vésicules télencéphaliques ; MA, membres antérieurs ; MP, membres inférieurs ; Q, queue. D'après Rallu *et al.,* 1997.

A E12,5, l'expression de HSF2 est décelée dans l'ensemble du télencéphale, particulièrement dans le cortex. La protéine HSF2 est majoritairement exprimée dans la zone proliférative, la VZ. En immunohistochimie, les cellules exprimant le plus HSF2 sont les cellules les plus proches du ventricule (Rallu *et al.*, 1997; Kallio *et al.*, 2002). Comme les cellules de la VZ sont activement mitotiques et suivent comme nous l'avons vu des mouvements intercinétiques, nous pouvons supposer que HSF2 est exprimée par les cellules en phase G1/M/G2 mais non par les cellules en phase S. Cette observation n'a pas été confirmée par les expériences de Xgal[2], puisque dans le télencéphale, l'activité $\beta$galactosidase est détectée d'une façon homogène dans l'ensemble des structures cérébrales, conséquence probable de la stabilité de la $\beta$Gal. Par contre, à ce stade, HSF2 est exprimée fortement dans les zones de prolifération, la zone ventriculaire VZ du cortex, les éminences ganglionnaires latérale et médiane du subpallium et la VZ de la moelle

[2]Le X-gal est un substrat de la $\beta$galactosidase qui le clive en galactose et 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole, une fois oxydé devient un produit insoluble bleu.

épinière en développement (Fig. 2.21). Aucune approche de localisation cellulaire n'a pour l'instant été entreprise.

Pendant la seconde moitié de la gestation, l'activité de liaison de HSF2 diminue progressivement (Fig. 2.20), l'expression de la protéine se restreint notamment au système nerveux central, dont le cortex cérébral (Rallu *et al.*, 1997; Kallio *et al.*, 2002). Il est à noter que le neuroépithélium olfactif exprime HSF2 à ce stade. Le suivie de l'expression de HSF2 grâce au rapporteur $\beta$galactosidase, a permis une localisation des régions corticales exprimant Hsf2 au cours de la corticogenèse (Chang *et al.*, 2006). L'activité $\beta$galactosidase est détectée dans les zones de prolifération VZ et SVZ du cortex à E15,5. A 12,5, les cellules HSF2 positives en immunohistochimie ne semblent pas avoir incorporé de BrdU, HSF2 pourrait donc être exprimée par les cellules ayant quitté la phase S. De ces expériences, nous ne pouvons pas conclure si toutes les cellules de la zone ventriculaire expriment HSF2. Au milieu de la gestation, l'expression de HSF2 dans le subpallium est fortement réduite. Il est intéressant de remarquer que le profil d'expression de HSF2 change aussi dans le mésencéphale, lequel montre une expression plus intense dans la ligne médiane que dans le reste de la structure (Fig. 2.21). Enfin, l'expression de HSF2 est détectée dans la plaque corticale constituée de neurones post-mitotiques en migration. Ainsi, certaines cellules engagées vers la différenciation expriment le facteur HSF2 (Fig. 2.21).

D'après l'expression dynamique de HSF2 dans le cortex, le cortex cérébral embryonnaire semble être une structure intéressante pour étudier la fonction de HSF2 au cours des mécanismes impliqués pendant le développement. En effet, HSF2 est exprimée et active pour sa liaison à l'ADN tout au long de la corticogenèse. De l'étude dynamique du profil d'expression de HSF2, émergent un certain nombre de questions. Le profil d'expression semble finement régulé au cours de la corticogenèse, et l'activité de liaison du facteur HSF2 connaît un pic à E10,5 puis une diminution progressive. Aucun profil d'expression de protéines impliquées au cours de la corticogenèse ne reflète celui de HSF2. Et le rôle de HSF2 restait alors encore très énigmatique. HSF2 est exprimée tout d'abord par les cellules des zones de prolifération. HSF2 pourrait donc être impliquée au cours des processus qui régissent ces cellules, *i.e.* la prolifération, la survie, et la différenciation ? De plus, en fin d'embryogenèse, HSF2 est exprimée par des cellules en migrantion, engagées vers une voie différenciation. Cette observation nous a amené à nous interroger sur l'implication de HSF2 dans les processus régissant les cellules de la plaque corticale, *i.e.* la différenciation et la migration.

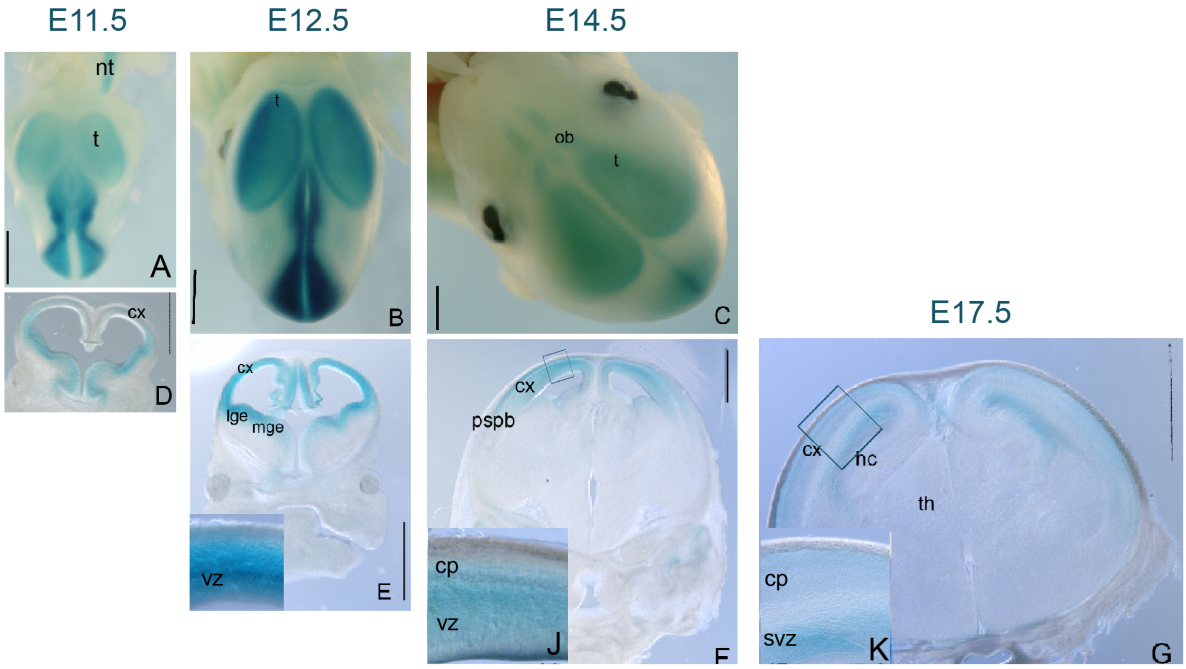



**Fig. 2.21 – Expression dynamique de HSF2 au cours de la corticogenèse.** L'expression de *Hsf2-LacZ* (en bleu) est utilisé comme rapporteur de l'expression de la transcription du gène *Hsf2* dans des embryons $Hsf2^{-/-}$. Les photos A, B, C représentent l'embryon *in toto* tandis que D, E, F, G sont des sections coronales des cerveaux. (A) A E11,5, HSF2 est exprimée dans le télencéphale, le diencéphale et le mésencéphale à l'exception de la ligne médiane dorsale du diencéphale et du mésencéphale. Dans le télencéphale, HSF2 est plus exprimée dans le subpallium que dans le pallium à ce stade (D). (B) Après E12,5, l'expression de HSF2 suit un gradient neurogénique selon l'axe antéro-postérieur d'une façon homogène le long de l'axe dorso-ventral dans les éminences ganglionnaires et dans le cortex (E). A partir du milieu de la gestation, l'expression de HSF2 diminue progressivement et se restreint aux zones prolifératives du télencéphale notamment la zone ventriculaire du cortex, à E14,5 (C, F, H). Puis à E15,5, HSF2 est détectée dans la zone sous ventriculaire ici à E17,5 et apparaît dans la plaque corticale (I et K). Barre d'échelle 1mm. cp, plaque corticale ; cx, cortex cérébral ; hc, hippocampe ; lge, éminences ganglionnaires latérales ; mge, éminences ganglionnaires médianes ; ob, bulbes olfactifs ; pspb, limites du pallium/subpallium ; svz, zone sous ventriculaire ; t, télencéphale ; th, thalamus ; vz, zone ventriculaire.

# Deuxième partie

# Résultats

La multiplicité des facteurs de choc thermique HSF semble refléter la nécessité pour la cellule de répondre finement et de façon la plus appropriée à divers signaux en conditions de stress ou en conditions physiologiques. La spécificité de la réponse liée à l'activation d'un facteur HSF donné, permettrait de moduler le niveau d'expression de gènes cibles *Hsp* ou non, et par conséquent, induit une réponse de la cellule adaptée à son environnent. En conditions physiologiques, la fonction des HSF comme nous l'avons vu dans l'introduction, reste encore peu comprise malgré leur implication dans divers processus. L'étude du facteur HSF2 au cours du développement du système nerveux amène des éléments de réponse, et montre qu'il pourrait influencer les processus de prolifération, différenciation et migration qui s'opèrent dans le cortex en développement.

Mon travail a permis de mieux comprendre la fonction de HSF2 en conditions physiologique, plus particulièrement au cours du développement du système nerveux central dont du cortex cérébral. En effet, la fonction de ce facteur de transcription appartenant à la famille des facteurs de choc thermique, restait encore à élucider. Les études de ce facteur, notamment celles menées au laboratoire, montraient que HSF2 était exprimé et actif pour sa liaison à l'ADN en conditions physiologiques dans le système nerveux central (Rallu *et al.*, 1997; Kallio *et al.*, 2002). De plus, les gènes cibles de HSF2 semblaient être différents des gènes *Hsp* en absence de stress et restaient à identifier. Le mécanisme d'action du facteur HSF2 au cours du développement était inconnu. D'après l'observation du phénotype des souris dont le gène *Hsf2* est inactivé par recombinaison homologue, il a été suggéré que HSF2 était impliqué au cours de la formation du cerveau, mais les processus cellulaires dans lesquels HSF2 était impliqué restaient à découvrir. L'ensemble de mes travaux de thèse sont présentés sous forme d'article dont certains sont en préparation en vue d'une publication.

L'analyse du cortex cérébral au cours du développement des souris *knock-out* pour le gène *Hsf2*, a permis de comprendre l'un des mécanismes d'action de HSF2. En effet, comme nous allons le voir, HSF2 est capable de moduler la migration des neurones post-mitotiques au cours du développement du cortex, en agissant sur différents paramètres (Chang *et al.,* 2006, **article 1**) : les cellules de glie radiaire, progéniteurs et support de la migration ; les cellules de Cajal-Retzius, qui sécrètent la Reeline nécessaire à la signalisation migratoire ; enfin, HSF2 agit sur différentes voies de signalisation qui modifient la dynamique du cytosquelette régulant ainsi la migration cellulaire. En collaboration avec l'équipe de Lea Sistonen (Finlande), nous avons identifié le premier gène cible de HSF2 *in vivo* en conditions physiologiques, *p35*. Comme nous l'avons définit p35 est impliqué dans l'activation de CDK5, kinase nécessaire pour la migration des neurones post-mitotiques.

En complément du modèle souris, j'ai développé en collaboration avec Pascale Gilardi (Ens, Paris), un modèle permettant la surexpression de HSF2 dans le tube neural

de l'embryon de poulet grâce à la technique d'électroporation *in ovo* (Trouillet et al., article en révision, **article 2**). Il a fallut dans un premier temps, vérifier que cette approche était adéquat pour l'étude de facteurs de choc thermique comme HSF2. En effet, l'électroporation *in ovo* consiste en un choc électrique appliqué à l'embryon, ce choc aurait pu déclencher une réponse au choc thermique, ce n'est pas le cas comme nous allons le détailler (Trouillet et al., manuscrit en révision, article 2). Il fallait d'autre part, connaître le profil d'expression et d'activité des facteurs HSF endogènes au cours du développement du tube neural de l'embryon de poulet. Enfin, ce modèle a été d'un grand secours en complément de l'analyse des souris *knock-out* pour le gène *Hsf2*. En effet, les problèmes d'hypofertilité sur le fond C57Bl/6N, où le phénotype est totalement pénétrant, et de variabilité du phénotype sur le fond mixte C57Bl/6N x C57BL/6J (fond qui a résulté d'une dérive malencontreuse du fond génétique au cours de ma thèse mais où les problèmes de fertilité sont par contre plus réduits) ont grandement freiné mon analyse de la fonction de HSF2.

Ceci explique en partie l'utilisation du modèle poulet pour l'analyse de l'action de HSF2 au cours de la prolifération (Trouillet *et al.,* manuscrit en préparation, **article 3**). Le but de ce modèle « gain de fonction »était aussi de s'affranchir des aspects critiquables des KO *Hsf2* et de tenter par une autre approche d'éclairer la controverse régnant alors, et d'espérer infirmer ou asseoir un rôle potentiel de HSF2 dans le développement neural. Pourtant, le modèle poulet connaît aussi des limites. Pour mieux apprécier les effets de la surexpression de HSF2, nous avons dû tenir compte de la variabilité intra-embryon et inter-embryon. Pour cela, en collaboration avec Thomas Tully (Ens, Paris), nous avons développé une approche originale d'analyse statistique hiérarchique (Trouillet *et al.*, manuscrit en préparation, article 3). Cette étude confirme que HSF2 module la prolifération des progéniteurs du tube neural en développement.

Nous nous sommes alors intéressées à l'action de HSF2 plus précisément dans les processus cellulaires qui régissent les cellules souches neurales et les progéniteurs du cortex au cours des stades précoces de développement (Trouillet *et al.*, manuscrit en préparation, **article 4**). L'analyse préliminaire des neurosphères issues de cortex embryonnaire de souris *Hsf2*$^{-/-}$ *versus* sauvage, a révélé une fonction de HSF2 au cours de la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales et des progéniteurs neuraux.

L'ensemble de ces travaux confirme la fonction de HSF2 au cours du développement et démontre son implication au cours de la migration des neurones post-mitotiques, ainsi qu'au cours de la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales et des progéniteurs. Le mécanisme d'action de HSF2 passe par la régulation directe de l'expression de p35 et de MAP qui module la migration neuronale. D'autres part, l'implication de HSF2 dans la prolifération et la différenciation ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude de la fonction de HSF2 dans les processus qui régissent la spécification des cellules.

# Chapitre 1

# Analyse des souris *Knock-out* pour le gène *Hsf2*

## 1.1 HSF2 intervient au cours de la migration des précurseurs corticaux

Cet article présente l'analyse plus approfondie des cortex cérébraux d'embryon $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$ au cours du développement (Kallio *et al.*, 2002). Cet analyse a permis de dégager l'un des mécanismes par lesquels HSF2 affecte le développement du cortex cérébral.

L'analyse des lignées de souris dans lesquelles le gène *Hsf2* avait été inactivé (Kallio *et al.*, 2002; McMillan *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003) démontrait qu'il existait une hétérogénéité du phénotype des souris mutantes. Il était donc très intéressant d'approfondir l'analyse de ce mutant. En effet, les souris adultes $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$ (Kallio *et al.*, 2002) présentent des défauts structuraux, le ventricule latéral et le troisième ventricule sont élargis et l'hippocampe et le striatum sont réduits. Mais ces défauts du système nerveux central sont moindre dans l'analyse des souris $Hsf2^{gfp/gfp}$ (Wang et al., 2003) et non existants dans l'analyse des souris $Hsf2^{neo/neo}$ (McMillan *et al.*, 2002). Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, cette divergence d'analyse peut provenir de différents paramètres.

1. **Des approches expérimentales différentes.** Notre équipe (Kallio *et al.*, 2002) a choisit de générer des souris mutantes par *knock-in* du gène codant pour la $\beta$-geo (gène LacZ et le gène de résistance G418 à la néomycine (Friedrich and Soriano, 1991) inséré en phase dans l'exon 5 du gène *Hsf2*. L'expression de ce transgène génère une protéine HSF2 tronquée dans le domaine d'oligomérisation et donc incapable de lier l'ADN. De plus, cette protéine HSF2 tronquée-chimérique avec la $\beta$-geo, a perdu une des deux séquences NLS et n'est donc pas localisée dans le noyau. (Sheldon and Kingston, 1993; Kallio *et al.*, 2002). Les souris $Hsf2^{gfp/gfp}$ (Wang

*et al.*, 2003) résulte du *knock-in* de la cassette EGFP-néo dans l'exon 1 du gène *Hsf2*, et pour éviter toute potentielle interférence avec la néomycine, les souris sont croisées avec des souris exprimant le gène de la *Cre* (Koni *et al.*, 2001) pour enlever le marqueur de sélection. La troisième souris *knock-in* pour le gène *Hsf2* a été obtenue par insertion d'une cassette néomycine dans le premier exon (McMillan *et al.*, 2002). Les deux premières études confirment que l'expression du gène rapporteur inséré reflète bien l'expression de HSF2 décrite (Eriksson *et al.*, 2000; Rallu *et al.*, 1997).

2. **Un environnement expérimental différent.** L'âge des souris, la qualité de l'animalerie, le stress occasionné aux animaux *etc.* peuvent être des sources de divergences dans l'importance des effets d'une mutation.

3. **Un fond génétique non homogène.** Les analyses sont réalisées sur des fonds génétiques non mixtes différents selon les stratégies : 129/SV puis fond génétique C57Bl6N pour les souris $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$ (Kallio *et al.*, 2002) ; C57Bl6J pour les souris $Hsf2^{gfp/gfp}$ (Wang *et al.*, 2003) et C57Bl6J x 129XI pour les souris $Hsf2^{neo/neo}$ (McMillan *et al.*, 2002). Il a été démontré que les effets d'un phénotype varient d'un fond génétique à un autre (Montagutelli, 2000), ceci expliquerait les différences de phénotypes observés. Dans notre cas, dans l'article Kallio *et al.,* 2002, ont été étudiées des souris sur fond C57BL/6N x 129 Sv. Par contre, dans Chang *et al.,* 2006, ont été utilisées majoritairement des souris C57BL/6N. C'est sur ce fond que le phénotype est le plus pénétrant. Lors du déroulement de ma thèse, suite à une erreur de livraison, deux croisements de nos fondateurs avec des souris C57Bl/6J ont été effectués. Ces croisements ont fait diminué de façon drastique et brutale la pénétrance du phénotype. De notre point de vue, les divergences de phénotype entre les différents KO *Hsf2* sont donc probablement dus en premier lieu à des différences de fond génétique.

L'article 1 permet par différentes approches, de montrer que HSF2 intervient dans la migration des cellules précurseurs du cortex. Tout d'abord, l'analyse des cortex $Hsf2^{-/-}$ présente une réduction des cellules de glie radiaire, support de la migration des neurones post-mitotiques, mais aussi une réduction des cellules de Cajal-Retzius. Ces cellules sécrétent la Reeline, protéine nécessaire à la bonne migration des neurones du cortex. La quantité de Reeline sécrétée est plus faible dans les cortex des souris $Hsf2^{-/-}$. De plus, il a été observé que certains neurones des couches superficielles du cortex adoptaient un positionnement anormal, ils semblaient bloqués dans les couches profondes. Enfin, en regardant les différentes voies de signalisation qui régissent la migration des neurones corticaux, cette étude a permis d'identifier P35, sous unité activatrice de CDK5, comme première cible de HSF2 dans le cerveau en développement grâce aux approches complémentaires de *knock-out* et de surexpression dans les cellules érythroleucémiques K562 développée par l'équipe de Lea Sistonen (Finlande).

J'ai contribué à ce travail initié par Yunhua Chang, en analysant les cortex après immunohistochimie contre la calrétinine et contre RC2. De plus, j'ai réalisé les expériences de *Birthdating* et d'hybridation *in situ*. En collaboration avec Vivienne Fardeau, nous avons évalué l'expression de p35 et de p39 par RT-PCRq.

### 1.1.1 Article 1 : Chang *et al.*, 2006

**Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression.**

Chang, Yunhua*, Paivi Ostling*, Malin Akerfelt**, Diane Trouillet**, Murielle Rallu, Yorick Gitton, Rachid El Fatimy, Vivienne Fardeau, Stéphane Le Crom, Michel Morange, Lea Sistonen, and Valérie Mezger (2006). *Genes Dev.* 20(7) : 836-47.

*, ** These authors contributed equally to this work.

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007

# Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulatorof p35 expression

Yunhua Chang, Päivi Östling, Malin Åkerfelt, Diane Trouillet, Murielle Rallu, Yorick Gitton, Rachid El Fatimy, Vivienne Fardeau, Stéphane Le Crom, Michel Morange, Lea Sistonen and Valérie Mezger

*Genes & Dev.* 2006 20: 836-847
Access the most recent version at doi:10.1101/gad.366906

**Supplementary data** *"Supplemental Research Data"* **http://www.genesdev.org/cgi/content/full/20/7/836/DC1**

**References** This article cites 69 articles, 35 of which can be accessed free at: **http://www.genesdev.org/cgi/content/full/20/7/836#References**

Article cited in: **http://www.genesdev.org/cgi/content/full/20/7/836#otherarticles**

**Email alerting service** Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or **click here**

**Notes**

To subscribe to *Genes and Development* go to: **http://www.genesdev.org/subscriptions/**

© 2006 Cold Spring Harbor Laboratory Press

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007

# Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression

**Yunhua Chang,[1,8,10] Päivi Östling,[3,4,8] Malin Åkerfelt,[3,4,9] Diane Trouillet,[1,9] Murielle Rallu,[5] Yorick Gitton,[6] Rachid El Fatimy,[1] Vivienne Fardeau,[2] Stéphane Le Crom,[7] Michel Morange,[1] Lea Sistonen,[3,4] and Valérie Mezger[1,11]**

[1]Biologie Moléculaire du Stress and [2]Génomique de la Levure, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR8541, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, France; [3]Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Åbo Adademi University, 20520 Turku, Finland; [4]Department of Biology, Åbo Akademi University, 20520 Turku, Finland; [5]Groupe régulateurs et effecteurs de la neurogenèse and [6]Groupe de Biologie Cellulaire des Homéoprotéines, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR8542, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, France; [7]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) 368, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, France

**Heat-shock factors (HSFs) are associated with multiple developmental processes, but their mechanisms of action in these processes remain largely enigmatic. *Hsf2*-null mice display gametogenesis defects and brain abnormalities characterized by enlarged ventricles. Here, we show that *Hsf2*$^{-/-}$ cerebral cortex displays mispositioning of neurons of superficial layers. HSF2 deficiency resulted in a reduced number of radial glia fibers, the architectural guides for migrating neurons, and of Cajal-Retzius cells, which secrete the positioning signal Reelin. Therefore, we focused on the radial migration signaling pathways. The levels of Reelin and Dab1 tyrosine phosphorylation were reduced, suggesting that the Reelin cascade is affected in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices. The expression of *p35*, an activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5), essential for radial migration, was dependent on the amount of HSF2 in gain- and loss-of-function systems. *p39*, another Cdk5 activator, displayed reduced mRNA levels in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices, which, together with the lowered *p35* levels, decreased Cdk5 activity. We demonstrate in vivo binding of HSF2 to the *p35* promoter and thereby identify *p35* as the first target gene for HSF2 in cortical development. In conclusion, HSF2 affects cellular populations that assist in radial migration and directly regulates the expression of p35, a crucial actor of radial neuronal migration.**

[*Keywords*: Corticogenesis; heat-shock factor; p35–Cdk5; radial cortical migration]

Supplemental material is available at http://www.genesdev.org.

Received September 23, 2005; revised version accepted January 31, 2006.

Heat-shock factors (HSFs) were initially discovered to regulate heat-shock genes and the heat-shock response. The heat-shock response, conserved from yeast to man, is characterized by the induction of heat-shock genes encoding molecular chaperones (for review, see Pirkkala et al. 2001). A unique gene constitutes HSF in yeast, nematode, and fruit fly, whereas a family of four members is present in vertebrates. HSF1 and HSF2 are found in all vertebrate species, while HSF3 is specific for avian species and HSF4 is specific for mammals (Rabindran et al. 1991; Sarge et al. 1991; Schuetz et al. 1991; Nakai and Morimoto 1993; Nakai et al. 1997; Råbergh et al. 2000; Hilgarth et al. 2004; Le Goff et al. 2004). In vertebrates, HSF1 is the stress-responsive prototype, which cannot be substituted by any other HSF in stress-inducible *hsp* gene expression or in acquired thermotolerance (McMillan et al. 1998; Xiao et al. 1999; Zhang et al. 2002).

A developmental role for the HSFs began to emerge when the *Drosophila* HSF was found to be required for oogenesis and early larval development (Jedlicka et al. 1997). Strikingly, these developmental effects of *Drosophila* HSF are not mediated by *hsp* gene induction. The basal expression levels of *hsp*s during embryonic development in mouse are not affected by the lack of HSF1 (Xiao et al. 1999). Therefore, other target genes are likely to be controlled by HSF1 in development. Recently, binding of HSF1 and HSF4 to the *FGF-7* promoter with opposing effects on *FGF-7* gene expression suggested a competition between these HSFs during mouse lens development (Fujimoto et al. 2004). HSF4 also binds to the promoter of γ-*crystallin*, the expression of which is se-

[8,9]These authors contributed equally to this work.
[10]Present address: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U362, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France.
[11]Corresponding author.
E-MAIL mezger@biologie.ens.fr; FAX 33-1-44-32-39-41.
Article and publication are at http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.366906.

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007



verely decreased in *Hsf4*-null lens fiber cells, leading to cataract. Inherited cataract in certain Chinese and Danish families has been associated with a missense mutation in the DNA-binding domain of HSF4 (Bu et al. 2002).

HSF2 has been considered an orphan member of the HSF family. HSF2 was found to be abundantly expressed and active for DNA binding in mouse stem cells, embryonic carcinoma cells, and during hemin-mediated differentiation of human K562 erythroleukemia cells (Mezger et al. 1989; Theodorakis et al. 1989; Sistonen et al. 1992, 1994; Murphy et al. 1994). HSF2 does not display significant heat-shock element (HSE)-binding activity in most adult tissues (Fiorenza et al. 1995), but is highly active during mouse embryogenesis. To date, no clear correlation between HSF2 and *hsp* gene expression has been found during development (Mezger et al. 1994a,b; Murphy et al. 1994; Christians et al. 1997; Rallu et al. 1997; Alastalo et al. 1998; Kallio et al. 2002; Wang et al. 2003). The developmental role of HSF2 has been assessed by several gene inactivation strategies. Although one study did not report any effects in HSF2-deficient mice (McMillan et al. 2002), we and others have reported that HSF2 is important for meiosis in both genders (Kallio et al. 2002; Wang et al. 2003). *Hsf2*$^{-/-}$ mice also display brain abnormalities characterized by enlarged lateral and third ventricles (Kallio et al. 2002; Wang et al. 2003). The developmental defects of the *Hsf2*$^{-/-}$ mice do not seem to be due to altered HSP levels, suggesting the importance of other HSF2 target genes.

Mammalian cerebral corticogenesis follows tightly regulated spatial and temporal patterns of neuronal migration. Post-mitotic neurons, generated in the internal ventricular zone (VZ), move along the radial glia guidance fibers toward the external pial surface. The first wave of post-mitotic neurons generates the preplate (PP), into which the next wave of neurons migrates, forming the cortical plate (CP) that consists of an inner subplate (SP) and an outer marginal zone (MZ). Subsequent waves of post-mitotic neurons bypass the SP and any neuronal layers generated earlier, adopting more superficial positions in the CP region formed beneath the MZ. The CP therefore grows in an "inside-out" order, from the innermost layer VI comprising the earliest-born cortical neurons to the outer layer II containing the latest-born neurons (Angevine and Sidman 1961).

Analyses of human disease genes and spontaneous or engineered mutant mice have uncovered several gene products in the regulation of corticogenesis (for reviews, see Gupta et al. 2002; Götz 2003). Reelin is secreted by Cajal-Retzius cells of the MZ, and mutations in the *Reelin* gene in humans cause lisencephaly with simplified cortical folding (Curran and D'Arcangelo 1998; Gupta et al. 2002). The spontaneous mouse mutant *reeler* exhibits an inverted organization of the cortical layers and fails to split the PP (Lambert de Rouvroy and Goffinet 1998). Upon Reelin binding to ApoER2/VLDLR receptors, expressed on migrating neurons, the cytoplasmic adaptor Dab1 becomes phosphorylated on tyrosine residues (Hiesberger et al. 1999; Howell et al. 1999; Bock and Herz 2003). Perinatal lethality due to widespread defects in neuronal migration during CNS development is evident in mice deficient for cyclin-dependent kinase 5, Cdk5 (Ohshima et al. 1996). In contrast to the *reeler* phenotype, the PP splitting is preserved in *Cdk5*$^{-/-}$ mice, but later-born neurons stack up in inverted layers under the SP (Gilmore et al. 1998; Kwon and Tsai 1998). The neuron-specific activity of Cdk5 is regulated by its activating subunits p35 and p39 (Tsai et al. 1994). Mice lacking p35 are viable and show lamination defects only in the cerebral cortex, while the *p35*$^{-/-}$*p39*$^{-/-}$ mice are lethal perinatally (Chae et al. 1997; Ko et al. 2001). During the development of cortex, p35 is predominant but p35 and p39 are expressed equally at birth (Ohshima et al. 2001). The p35–Cdk5 complex in neuronal migration phosphorylates several substrates involved in cell–cell adhesion and cytoskeletal dynamics (for review, see Gupta et al. 2002).

In this study, the role of HSF2 in cerebral corticogenesis was examined. Using *Hsf2*$^{-/-}$ mice, we demonstrate that HSF2 is involved in correct neuronal positioning during cortex formation. Immunohistochemical analyses revealed that HSF2 deficiency has a negative impact on cell populations important for radial neuronal migration. The numbers of radial glia fibers, which provide architectural support for migrating neurons, are reduced in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices. Furthermore, the *Hsf2*$^{-/-}$ MZ is hypocellular and, correspondingly, the Reelin levels are decreased, affecting the Reelin signaling pathway as evidenced by reduced tyrosine phosphorylation of Dab1. The migrating post-mitotic neurons are affected by the lack of HSF2, as seen by a clear reduction of *p35* and *p39* leading to lowered Cdk5 activity, all central regulators of radial migration. Using chromatin immunoprecipitation (ChIP), we identified *p35* as a direct target gene for HSF2. The multiple levels of radial cortical migration that are affected in the absence of HSF2 suggest novel important functions for this protein in the development of the cortex.

## Results

### *Dynamic temporal expression pattern of HSF2 in the developing cortex*

We previously reported that HSF2-deficient adult brains display structural abnormalities characterized by enlarged ventricles (Kallio et al. 2002). Figure 1A illustrates the variability in the extent of morphological defects in *Hsf2*$^{-/-}$ postnatal day 19 (P19) brains. In ~80% of the cases, *Hsf2*$^{-/-}$ brains show severe enlargement of the hemispheres (Fig. 1A, right panel) compared with the *Hsf2*$^{+/+}$ brains (Fig. 1A, left panel), while ~20% exhibit a moderate enlargement (Fig. 1A, middle panel).

The expression of HSF2 was examined at different stages of corticogenesis using *Hsf2*$^{-/-}$ mice, which have the β-galactosidase (β-gal) reporter gene inserted under the control of the endogenous *Hsf2* promoter (Kallio et al. 2002). At embryonic day 15.5 (E15.5), β-gal activity mainly resided in the proliferative zones of *Hsf2*$^{-/-}$ and

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007



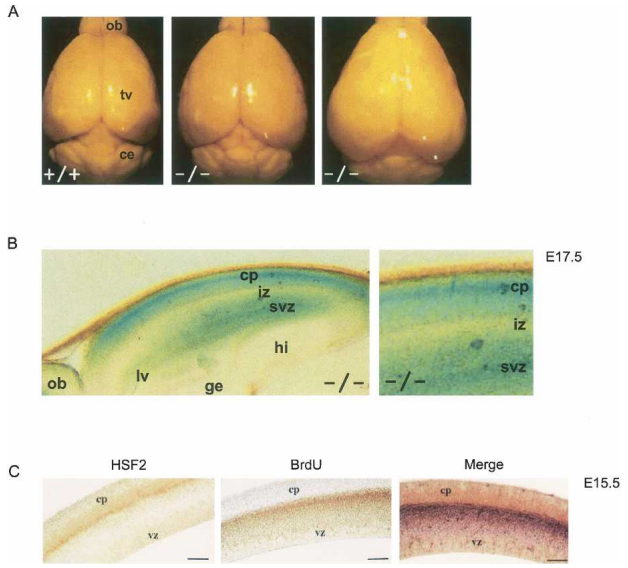



**Figure 1.** (*A*) Characterization of *Hsf2*$^{-/-}$ brains. Compared with *Hsf2*$^{+/+}$ (+/+), *Hsf2*$^{-/-}$ brains (−/−) show enlargement of the hemispheres. Dorsal view of *Hsf2*$^{+/+}$ (+/+, *left*), moderately affected *Hsf2*$^{-/-}$ (−/−, *middle*), and severely affected *Hsf2*$^{-/-}$ (−/−, *right*) fixed brains at P19. (*B*,*C*) HSF2 is expressed in the CP in late gestation. (*B*) Parasaggittal vibratome sections of *Hsf2*$^{-/-}$ cortices stained for β-galactosidase activity (blue signal). β-gal activity not only resided in the VZ and SVZ of *Hsf2*$^{-/-}$ developing cortex at E17.5, but was also observed in the CP. Orientation: The rostral part is near the *lower left* corner. (*C*) Expression of HSF2 in CP was confirmed in *Hsf2*$^{+/+}$ E15.5 parasaggittal sections by immunohistochemistry in combination with a short pulse of bromodeoxyuridine (BrdU) labeling. Bar, 200 µm. (ce) Cerebellum, (cp) cortical plate, (ge) ganglionic eminence, (hi) hippocampus, (iz) intermediate zone, (lv) lumenal vesicle, (ob) olfactory bulb, (svz) subventricular zone, (tv) telencephalic vesicle, (vz) ventricular zone.

*Hsf2*$^{+/-}$ developing cortex, similar to earlier stages (from E9.5 to E13.5) (Kallio et al. 2002; Y. Chang, unpubl.)—that is, the VZ and subventricular zone (SVZ)—and persisted in the SVZ at E17.5 in *Hsf2*$^{+/-}$ as in *Hsf2*$^{-/-}$ embryos (Fig. 1B; data not shown). However, in contrast to earlier stages, β-gal staining started to be visible at E15.5 in the caudal and medial CP (data not shown) and became more intense at E17.5 (Fig. 1B).

The expression of HSF2 in CP was verified in *Hsf2*$^{+/+}$ E15.5 embryos by immunohistochemistry in combination with a short pulse of bromodeoxyuridine (BrdU) labeling, which delimited the proliferating zone (Fig. 1C). In conclusion, HSF2 expression persists throughout corticogenesis in the proliferative zones but is also observed in the CP at late gestation stages. This suggests that HSF2 might have a role not only in the proliferative precursors but also in post-mitotic neurons of the CP.

### *Normal PP formation in* Hsf2$^{-/-}$ *embryos*

To investigate the putative role for HSF2 in corticogenesis, the formation of the PP in E13.5 *Hsf2*$^{-/-}$ mice was examined. We used two different neuronal markers: The Tuj-1 antibody recognizes class III β-tubulin expressed in early differentiated neurons (Geisert and Frankfurter 1989), and necdin is expressed in post-mitotic neurons (Niinobe et al. 2000). Since no gross abnormalities were detected in the expression profiles of either Tuj-1 or necdin in *Hsf2*$^{-/-}$ compared with *Hsf2*$^{+/+}$ cortex at E13.5 by immunohistochemistry (Fig. 2A) or Western blot (data

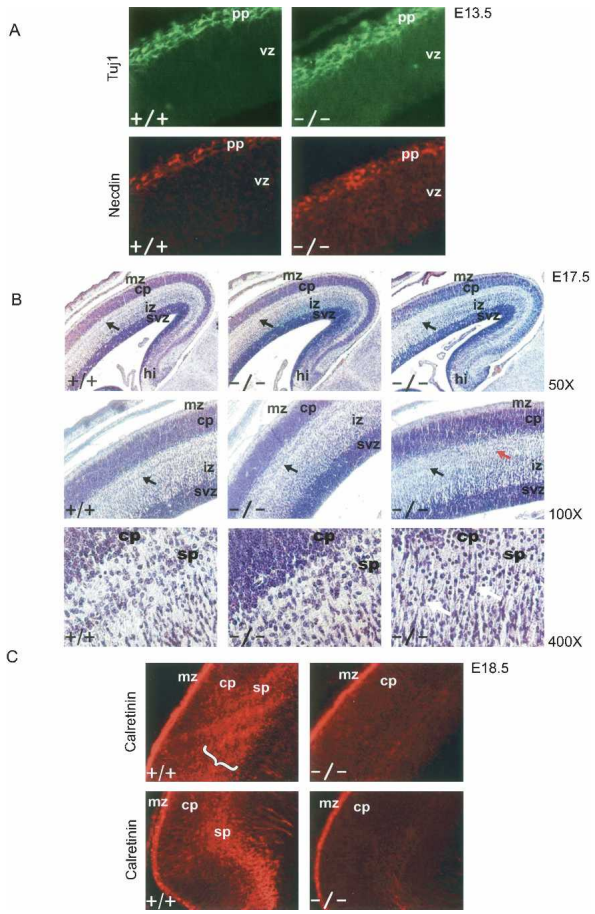



**Figure 2.** SP disorganization at the end of neurogenesis in *Hsf2*$^{-/-}$ cortex. (*A*) Immunolabeling of PP by Tuj-1 and necdin antibodies on parasaggittal sections of E13.5 *Hsf2*$^{+/+}$ (+/+) and *Hsf2*$^{-/-}$ (−/−) cortices. (*B*) Parasaggittal sections of E17.5 brains were stained with hematoxylin. The numbers on the *right* side of the figure show the magnification of the image (50×, 100×, and 400×). (*Left* panel) *Hsf2*$^{+/+}$. (*Middle* panel) Moderate phenotype of the *Hsf2*$^{-/-}$ animals, which exhibit disorganized SP (black arrow, magnification 50×, 100×). (*Right* panel) Severe phenotype of the *Hsf2*$^{-/-}$ animals, where the caudal region is totally devoid of SP (red arrow, 100×), and only a faint SP could be detected rostrally (black arrow, 50×, 100×). Note the numerous trailing cells in the *Hsf2*$^{-/-}$ cortex at SP level (white arrows, 400×). (*C*) Calretinin staining of the SP (white brackets) was dramatically reduced in parasaggittal sections of the *Hsf2*$^{-/-}$ neocortex at E18.5. MZ region is overexposed to clearly show the result in the SP. The caudal region (*upper* panel) was more severely affected than the rostral region (*lower* panel). (mz) Marginal zone, (pp) preplate, (sp) subplate; other abbreviations are as in Figure 1.

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007



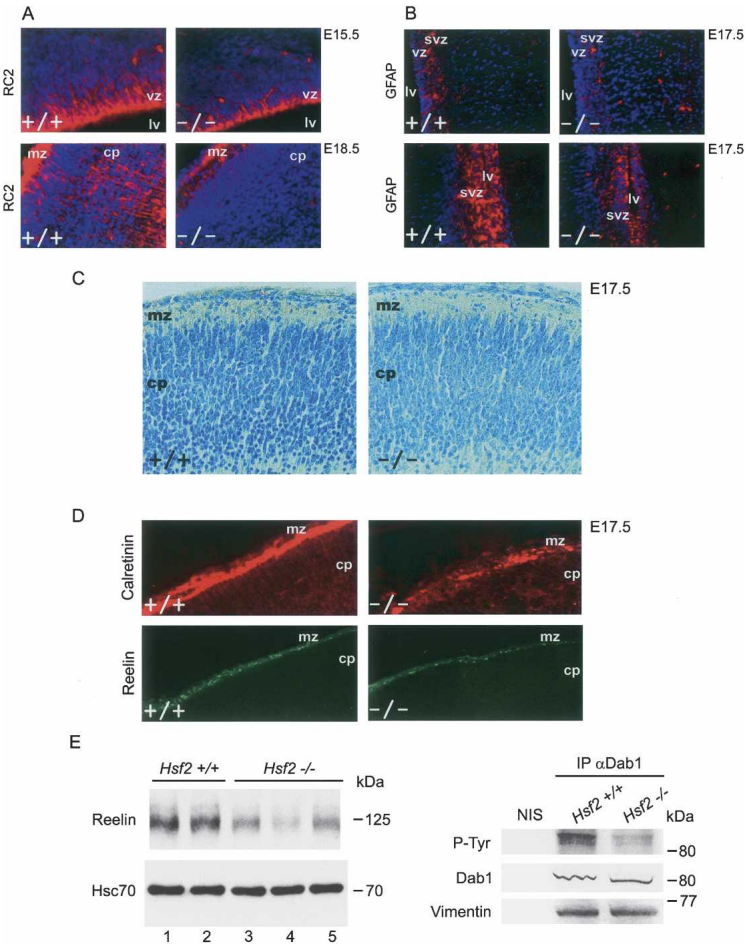



**Figure 3**. The lack of HSF2 affects radial glia cells and MZ cells. (*A*) Immunolabeling of radial glia soma by RC2 (red) in parasaggittal sections of *Hsf2*$^{+/+}$ (+/+) and *Hsf2*$^{-/-}$ (−/−) cortices at E15.5 and fibers at E18.5. (Blue signal) Hoechst. (*B*) The presence of astrocytes at E17.5 was analyzed by immunolabeling of astrocytes for GFAP (red) in parasaggittal sections. Orientation is rostral–caudal from *top* to *bottom*. (*Upper* panels) Rostro–lateral part of the cortex. (*Lower* panels) Caudo–medial part of the cortex. (Blue signal) Hoechst. (*C*) The MZ of *Hsf2*$^{-/-}$ cortex at E17.5 was hypocellular. Coronal sections of dorsal E17.5 cortices stained with toluidin blue. (*D*) Lower calretinin immunolabeling of Cajal-Retzius cells in the MZ on parasaggittal sections of caudo–medial region at E17.5 (*top* panel) and reduction in immunolabeling of Reelin, secreted by Cajal-Retzius cells in *Hsf2*$^{-/-}$ cortex (*bottom* panel). (*E*, *left* panels) Western blotting of CP from individual embryos showed diminished Reelin levels in *Hsf2*$^{-/-}$ (lanes *3–5*) as compared with *Hsf2*$^{+/+}$ (lanes *1,2*). Hsc70 levels were unaffected by the lack of HSF2. (*Right*, *top* panel) Decreased tyrosine phosphorylation of Dab1 in pooled caudo–medial *Hsf2*$^{-/-}$ cortices (reproduced on embryos from three *Hsf2*$^{-/-}$ and three *Hsf2*$^{+/+}$ litters). (NIS) Nonimmune serum. (*Middle* panel) Input material was 1:3 of what was used for IP. (*Bottom* panel) Loading of equal amounts of protein was assessed by vimentin. Abbreviations are as in Figure 1.

not shown), we concluded that PP formation occurs normally during early corticogenesis in *Hsf2*$^{-/-}$ embryos.

### *The SP organization is disturbed at the end of neurogenesis in* Hsf2$^{-/-}$ *cortex*

PP splitting occurred normally in the cortex of *Hsf2*$^{-/-}$ embryos, and the SP was visible by histological analysis at E15.5 in *Hsf2*$^{-/-}$ as well as in *Hsf2*$^{+/+}$ (data not shown). In contrast, SP started to disappear at E16.5 in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices. At E17.5, *Hsf2*$^{-/-}$ embryos displayed SP disorganization of various degrees (Fig. 2B). The histological sections shown in the right panel of Figure 2B represent a severe phenotype with prominent SP disorganization in the developing *Hsf2*$^{-/-}$ cortex. Even in severely affected mutants, SP was still visible in the rostral part of the telencephalon (Fig. 2B, magnification 100×, right panel, black arrow), whereas the caudal region was totally devoid of a structure corresponding to SP (Fig. 2B, red arrow, magnification 100×). The more moderate phenotype exhibited a disorganized SP (Fig. 2B, middle panel). Interestingly, numerous trailing cells were observed in the *Hsf2*$^{-/-}$ cortex at the SP level (Fig. 2B, white arrows, magnification 400×).

Immunostaining for calretinin, a marker for pioneering neurons in SP and in the MZ as well as Cajal-Retzius cells in MZ (Fonseca et al. 1995), was dramatically reduced at the SP level in the *Hsf2*$^{-/-}$ cortex at E18.5 (Fig. 2C). However, weak calretinin immunostaining was still visible in the rostral part of telencephalon near the olfactory bulbs (Fig. 2C, lower right panel). No evidence for massive apoptosis could be detected by a TUNEL assay in the *Hsf2*$^{-/-}$ SP region at stages E14.5–E17.5 (data not shown). The lack of staining of the SP neurons by calretinin at E18.5 (Fig. 2C) confirms that the SP has already disappeared at E17.5 in *Hsf2*$^{-/-}$ caudo–medial cortices (Fig. 2B).

### *The lack of HSF2 affects two cell populations: radial glia cells and Cajal-Retzius cells*

Since the disappearance of SP seemed to be associated with the presence of trailing cells in the SP region (Fig. 2B), we suspected that radial migration problems might affect the *Hsf2*$^{-/-}$ cortices and examined two cell populations involved in this process, radial glia cells and Cajal-Retzius cells. Using the radial glia-specific antibody RC2 (Misson et al. 1988), the *Hsf2*$^{-/-}$ cortex exhibited a prominent reduction in RC2-positive somae and fibers at E15.5 or E18.5, compared with the *Hsf2*$^{+/+}$ cortex (Fig.

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007



3A). Radial glia cells are believed to differentiate into astrocytes at the end of neurogenesis when the neuronal migration is completed (Götz et al. 2002). We labeled E17.5 cortices with the astrocyte-specific marker GFAP (Bignami and Dahl 1974), and *Hsf2*$^{-/-}$ mutants displayed a significantly lower GFAP labeling than *Hsf2*$^{+/+}$ in VZ and SVZ (Fig. 3B). This suggests that, in the absence of HSF2, the number of radial glia cells is specifically reduced in the cortex, which at least partially could account for the reduction in radial glia fibers and fewer astrocytes.

The MZ of *Hsf2*$^{-/-}$ cortex at E17.5 was hypocellular in all regions: dorsal (Fig. 3C), lateral, and medial (data not shown). The number of cells in *Hsf2*$^{-/-}$ MZ was medially reduced by 20.8% ($p < 0.05$), dorsally by 30.6% ($p < 0.04$), and laterally by 29.2% ($p < 0.06$) as compared with *Hsf2*$^{+/+}$. Round and densely stained nuclei in the *Hsf2*$^{+/+}$ CP appeared to be restricted to the deep CP in the *Hsf2*$^{-/-}$ cortex (Fig. 3C), further emphasizing positioning problems. Cajal-Retzius cells reside in MZ and are stained by calretinin (Fonseca et al. 1995). A lower calretinin immunolabeling in MZ of *Hsf2*$^{-/-}$ embryos was evident as compared with the *Hsf2*$^{+/+}$ (Fig. 3D), in agreement with the hypocellularity of the *Hsf2*$^{-/-}$ MZ. A lower expression of Reelin, which is secreted by Cajal-Retzius cells, was observed in the caudo–medial region of *Hsf2*$^{-/-}$ cortex at E17.5 (Fig. 3D, lower panel). The reduced Reelin levels were confirmed in *Hsf2*$^{-/-}$ individual cortices by Western blotting (Fig. 3E, left panel). The extent to which Reelin expression was decreased was in line with the severity of the morphological changes of the dissected mutant brain. The reduction in the number of MZ cells, accompanied by decreased Reelin expression in *Hsf2*$^{-/-}$ cortex, is consistent with a decrease in Cajal-Retzius cells (Bielle et al. 2005).

Next, we investigated the consequences of Reelin reduction on the Reelin signaling pathway by comparing the tyrosine phosphorylation of Dab1 in *Hsf2*$^{-/-}$ and *Hsf2*$^{+/+}$ E17.5 cortices. Decreased levels of Dab1 phosphorylation were observed in mutant cortices (Fig. 3E, right panel), suggesting that the Reelin signaling pathway is negatively affected by the lack of HSF2.

### *Abnormal positioning of neurons from superficial layers of* Hsf2$^{-/-}$ *cortices*

The effect of HSF2 on the cell populations crucial for radial neuronal migration, radial glia cells, and Cajal-Retzius cells, suggested that radial migration might be affected in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices. To confirm that the initial phases of corticogenesis, PP formation and splitting, were spared in *Hsf2*$^{-/-}$ cortex (Fig. 2A), we performed BrdU birthdating experiments. The progeny of neural precursors was labeled by BrdU in S phase at E12.5 or E13.5. The positioning of the BrdU-labeled post-mitotic neurons derived from these progenitors at early stages was not affected in *Hsf2*$^{-/-}$ CPs (data not shown). However, the disappearance of SP and the reduced number of radial glia fibers at E17.5 indicated neuronal positioning problems specifically affecting the most superficial layers. To study the positioning of neurons generated in the late corticogenesis, BrdU was injected into pregnant females at E16.5 and the progeny of the labeled cells was followed 1 mo after birth, after the completion of migration. *Hsf2*$^{+/+}$ cortices showed, as expected, that the vast majority of BrdU-labeled cells were found in superficial layers (Fig. 4, left panel). In contrast, although some BrdU-labeled cells were localized in the same layers in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices, a large number of BrdU-positive cells were found deep in the cortex (Fig. 4, right panel), suggesting abnormal positioning of neurons in the *Hsf2*$^{-/-}$ cortex.

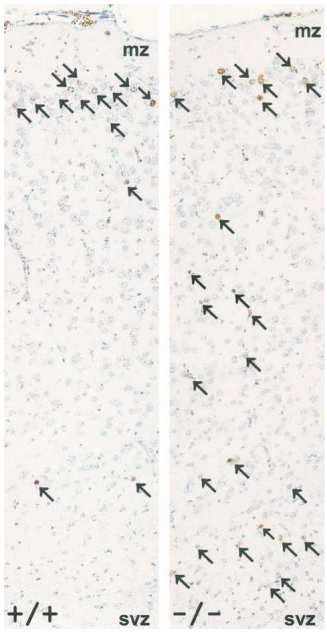



**Figure 4.** Incorrect positioning of neurons in the superficial layers of *Hsf2*$^{-/-}$ cortices. (*Left* panel) BrdU birthdating experiments show that the vast majority of BrdU-labeled cells in parasagittal sections of *Hsf2*$^{+/+}$ cortices are found in superficial layers (arrows). (*Right* panel) In contrast, although some BrdU-labeled cells were found in superficial layers in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices (arrows), several BrdU-positive cells were found in abnormal positions deep in the cortex. Abbreviations are as in Figure 2.

### *Identification of p35 as a potential target gene for HSF2*

We wanted to establish how HSF2 influences the molecular mechanisms regulating neuronal migration. A clue to the nature of these targets was provided by the model system of human K562 cells (see Introduction). K562 human erythroleukemia cells differentiate toward erythroid lineage upon hemin treatment. During this process, HSF2 levels increase and its DNA binding is activated (Sistonen et al. 1992), but HSF2 is not responsible for the expression of the heat-shock genes (Yoshima et al. 1998; P. Östling, unpubl.). To uncover specific HSF2 target genes, we performed cDNA microarray screening with K562 cell lines stably overexpressing HSF2 (Fig. 5A; Leppä et al. 1997; P. Östling, unpubl.).

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007



One of the potential target genes identified from this screen was *p35,* the activator of Cdk5 that is required for cortical lamination (Tsai et al. 1994; Chae et al. 1997). Overexpression of HSF2 was accompanied by a prominent increase in *p35* mRNA, which was further enhanced upon hemin treatment (Fig. 5B). Only a minute increase in p35 protein was seen in the hemin-treated cells stably overexpressing HSF2 (Fig. 5C), but it was consistent with elevated levels of the active form of Cdk5 as detected by Tyr 15 phospho-specific antibody (Fig. 5C). The total Cdk5 levels were not markedly altered (Fig. 5C). The increased activity of Cdk5 upon HSF2 overexpression and subsequently elevated p35 expression during hemin treatment was confirmed with a Cdk5 kinase assay (Fig. 5D). Increased phosphorylation of histone H1 was detected in the HSF2-overexpressing cell line as compared with parental K562 cells.

### *Reduced expression of* p35 *and* p39 *accompanied by attenuated Cdk5 activity in* Hsf2$^{-/-}$ *cortex*

Severe defects in cortical lamination are observed in *p35*-deficient mice, and since the Cdk5–p35 activity has been shown to be crucial for the migration of later-born neurons, we examined their expression in *Hsf2*$^{-/-}$ cortex. Despite variations between individual embryos in the telencephalic p35 expression, E17.5 *Hsf2*$^{-/-}$ telencephalon contained reduced p35 protein levels when compared with *Hsf2*$^{+/+}$ (Fig. 6A, left panel). No significant changes in Cdk5 levels were observed. However, the active Tyr 15-phosphorylated form of Cdk5 was markedly diminished in individual *Hsf2*$^{-/-}$ cortices (Fig. 6A, right panel), demonstrating that this signaling cascade is disturbed by the lack of HSF2. Reduced *p35* mRNA levels in *Hsf2*$^{-/-}$ telencephalon were detected by in situ hybridization on E16.5 *Hsf2*$^{-/-}$ cortices in the caudo–medial region (Fig. 6B, left panels). The expression of *p39* was also decreased in the caudo–medial region in E18.5 *Hsf2*$^{-/-}$ cortices (Fig. 6B, middle panels). In contrast, the *Tbr1* mRNA levels, characteristic for the deep layer VI, were not affected (Fig. 6B, right panels). Quantitative RT–PCR confirmed the reduction of *p35* mRNAs (wild-type/mutant ratio 1.19 ± 0.04; $n = 6$; $p = 0.00134$) and *p39* (wild-type/mutant ratio 3.09 ± 0.35; $n = 8$; $p = 0.00055$) in *Hsf2*$^{-/-}$ CPs. Taken together, these results show that unlike in *p35*$^{-/-}$ mice (Ko et al. 2001), reduced p35 levels were not compensated by p39 in *Hsf2*$^{-/-}$ neocortices.

### *HSF2 binds in vivo to the proximal regulatory region of the* p35 *gene*

The results indicated that *p35* mRNA is dependent on the amount of HSF2 in HSF2-overexpressing K562 cells and HSF2-deficient cortices, suggesting that *p35* could be a novel target gene for HSF2. As HSF2 was previously found to be active mainly in highly proliferative stem cells (Mezger et al. 1989, 1994a,b; Murphy et al. 1994; Christians et al. 1997; Rallu et al. 1997), we verified that HSF2 species present in the CP were active for DNA binding (Fig. 7A). To investigate whether HSF2 regulates

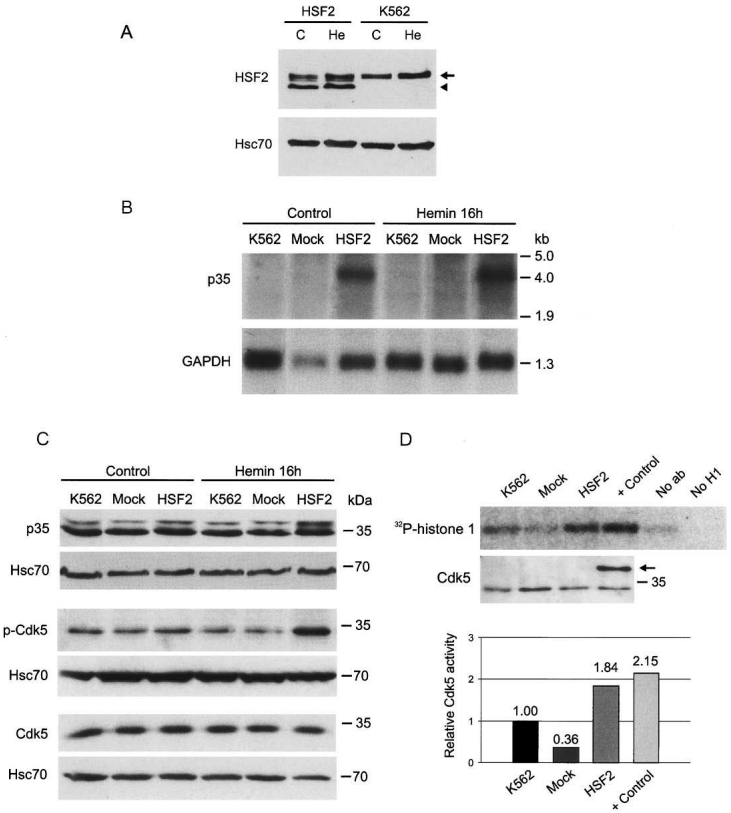



**Figure 5**. Identification of p35 as a potential target gene for HSF2. (*A*) Western blot analysis of K562 cell lines stably overexpressing mouse HSF2 (HSF2) or parental K562 cells (K562) were either left untreated (C) or exposed to hemin (He) for 16 h. Endogenous HSF2 is indicated by an arrow, and exogenous mouse HSF2 is indicated by an arrowhead. Equal loading of protein amounts were assessed by Hsc70. (*B*) Northern blot analysis: *p35* and *GAPDH* mRNA levels of cell lines stably overexpressing HSF2 (HSF2), mock-transfected cell lines (Mock), or K562 cells (K562) either untreated (control) or treated with hemin for 16 h. (*C*) Western blot analysis of p35, Tyr 15-phosphorylated Cdk5, and total Cdk5 levels upon hemin treatement of HSF2-overexpressing cells. (*D*) Immunocomplex kinase assay shows increased Cdk5 activity in HSF2-overexpressing cells (HSF2). (*Top* panel) Histone H1 was used as a substrate for the immunoprecipitated Cdk5. (*Bottom* panel) Similar amounts of Cdk5 were detected in all cell lines (arrow, exogenous Cdk5). The graph shows PhosphorImager quantitation of a representative assay. The measured activities were normalized to the endogenous Cdk5. The relative Cdk5 activity of K562 cells was arbitrarily given the value 1.

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007



the *p35* gene directly by binding to its promoter, we performed ChIP analysis of CP extracts at E16.5. A 200-base-pair (bp) segment within the *p35* promoter is sufficient for p35 expression in rat primary cortical neurons or neurons derived from P19 EC cells (Ross et al. 2002). This region, well conserved between mouse and human, contains a putative HSE close to the main transcription initiation site and two GC-boxes (Fig. 7B). EMSA analyses of CP extracts at E17.5 and E18.5 revealed binding activity on these three sites (data not shown). When immunoprecipitating chromatin from E16.5 cortical extracts with an HSF2-specific antibody, a prominent binding to this region was observed in *Hsf2*$^{+/+}$ cortex (Fig. 7C,D), demonstrating that the *p35* promoter is a direct target for HSF2 binding. Furthermore, binding of Sp3 to this region was detected in vivo, which is in agreement with the EMSA analysis performed by Ross et al. (2002). Interestingly, impaired binding of Sp3 was consistently observed in E16.5 cortical extracts from *Hsf2*$^{-/-}$ mice (Fig. 7B,C).

## Discussion

Although HSFs were originally discovered as transcriptional regulators of the heat-shock response, their function in development has been suspected for many years. Recent gene inactivation studies confirmed that HSFs assume developmental roles, independently of *hsp* gene activation. However, the direct targets of HSF1 and HSF2 have remained to be identified. Our first studies on HSF2 expression in the developing brain suggested that *Hsf2*$^{-/-}$ brain abnormalities might originate in embryogenesis (Rallu et al. 1997; Kallio et al. 2002). Here we show that at the end of gestation, HSF2 is expressed and active for DNA binding in the CP from E15.5 until E18.5. This was unexpected, since previously HSF2 had been found to be active only in undifferentiated proliferative cells during mouse development (Mezger et al. 1989, 1994 a,b; Murphy et al. 1994; Christians et al. 1997; Rallu et al. 1997). The timing of HSF2 expression prompted us to investigate how HSF2 might influence cortical development.

The PP formation and the appearance of SP at E14.5 and E15.5 exhibited no gross abnormalities in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices. Interestingly, in *reeler* mutant mice, PP splitting does not occur (Lambert de Rouvroy and Goffinet 1998), whereas PP splitting seems intact in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices despite reduced Reelin levels. However, Magdaleno et al. (2002) have shown that limited amounts of Reelin (10%–20% of the normal endogenous expression) are sufficient to rescue PP splitting in *reeler* mice. Therefore, the levels observed in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices could be enough to preserve PP splitting. The finding that early corticogenesis is not notably affected in *Hsf2*$^{-/-}$ is in good accordance with the fact that HSF2 is not expressed in the PP or in the CP until E15.5. At E16.5, SP becomes highly disorganized, starts to disappear, and is undetectable or vestigial at E17.5 in *Hsf2*$^{-/-}$ embryos. The disruption does not seem to result from marked apoptotic events, but rather the lack of calretinin-positive cells in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices implicates differentiation problems. This defect is mainly observed in the caudo–medial part of the cortex and is less pronounced in the rostral part, near the olfactory bulbs.

Our results demonstrate that two cell populations are

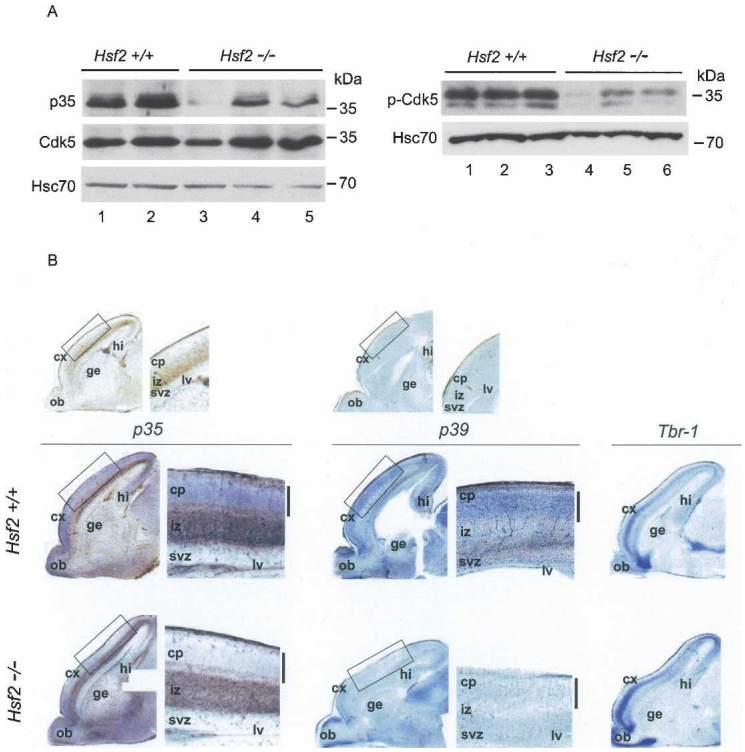



**Figure 6**. The expression of p35 and p39 is reduced in *Hsf2*$^{-/-}$ telencephalon. (*A*, *left* panel) In comparison to *Hsf2*$^{+/+}$ (lanes *1*,*2*), E17.5 *Hsf2*$^{-/-}$ telencephalon (lanes *3*–*5*) from individual embryos showed reduced p35 protein levels. No significant changes in the level of Cdk5 were detected. Equal amounts of protein were analyzed as indicated by the loading control (Hsc70). (*Right* panel) The Tyr 15-phosphorylated form of Cdk5 is reduced in *Hsf2*$^{-/-}$ cortex (lanes *4*–*6*) as compared with *Hsf2*$^{+/+}$ (lanes *1*–*3*). (*B*) In situ hybridization: reduction in *p35* and *p39* mRNA levels (purple signal indicated by a black bar in magnification) at E16.5 and E18.5, respectively, in the caudo–medial region (indicated by box) of *Hsf2*$^{-/-}$ cortices. The dark staining of the IZ does not correspond to specific labeling of *p35* or *p39* mRNA, as seen in the unlabeled sections in the *top* panels. (*Right* panel) The *Tbr1* mRNA levels (shown here at E16.5), characteristic for the deep layer VI, were not affected by the lack of HSF2 in the caudo–medial region. (cx) Cortex; other abbreviations are as in Figure 1.

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007



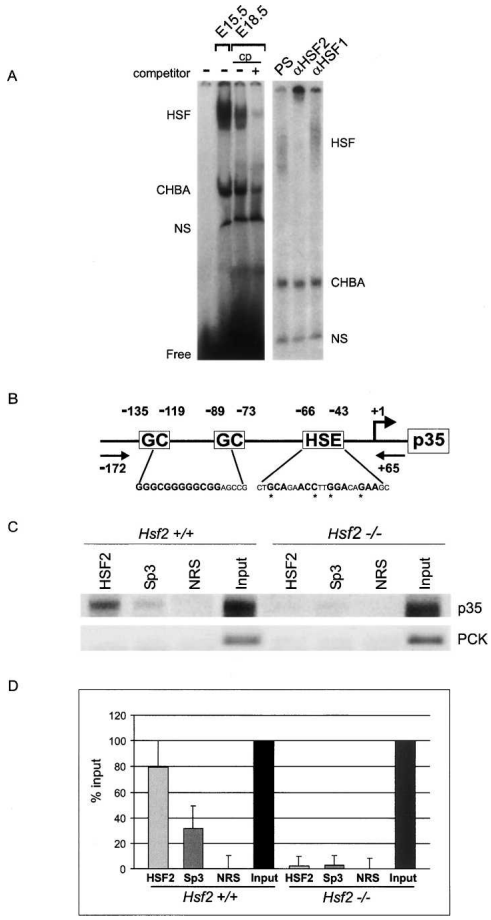



**Figure 7.** HSF2 binds in vivo to the proximal regulatory region of the *p35* gene. (*A*, *left* panel) Using EMSA, an HSE-binding complex was detected in the cortex at E15.5 and CP at E18.5. (*Right* panel) This complex was efficiently supershifted by the HSF2 antibody (αHSF2), but not by HSF1 antibody (αHSF1). (HSF) Specific HSF:HSE complex; (CHBA) constitutive HSE-binding activity; (NS) nonspecific protein–DNA interaction; (Free) free probe; (PS) preserum. (*B*) Schematic illustration of the proximal *p35* promoter region. (GC) GC-boxes; (HSE) putative HSE; (bent arrow) major transcription start site (Ross et al. 2002); (arrows) primers used in amplification step of the ChIP assay. The asterisk marks the key nucleotides required for HSF binding (Fujimoto et al. 2004). (*C*) ChIP of *Hsf2*$^{+/+}$ (+/+) and *Hsf2*$^{-/-}$ (–/–) E16.5 cortical extracts with HSF2, Sp3, and nonspecific (NRS) antibody. Occupancy of the *p35* and the *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (*PCK*) promoters were analyzed. (*D*) Quantification of three ChIP experiments on pooled cortical extracts from *Hsf2*$^{+/+}$ and two ChIP experiments from *Hsf2*$^{-/-}$ animals, where the input value was arbitrarily set to 100%. The nonspecific antibody value was substracted from the sample value to account for general background.

affected in the *Hsf2*$^{-/-}$neocortices. Immunodetection using RC2 revealed a reduction in the radial glia somae and fibers at E15.5 and E18.5. The reduced number of radial glia cells was surprising, since these cells represent a major pool of neuron progenitors (Götz et al. 2002), and no gross abnormalities in neuron generation were detected by either Tuj1 or necdin antibodies at E13.5 or E17.5. This observation was, however, supported by the fact that *Hsf2*$^{-/-}$ cortices displayed a similar reduction in the number of GFAP-positive astrocytes, and that astrocytes are derived from radial glia cells at the end of neurogenesis. Future experiments will determine whether the decrease in radial glia cells is due to the lack of HSF2 in this major pool of progenitors in the VZ. One possibility, which is under investigation, would be that other types of neuronal precursors compensate for the reduction of radial cell progenitors to generate cortical neurons. Moreover, MZ appeared hypocellular, and accordingly the expression of calretinin in the MZ was diminished. The expression of Reelin, which is secreted by Cajal-Retzius cells in MZ, was attenuated in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices, suggesting that the lack of HSF2 affects the Cajal-Retzius cell population in the caudo–medial region. This result together with the diminished tyrosine phosphorylation of a downstream effector Dab1 in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices suggests that the Reelin signaling pathway is compromised in our mutants. Reelin signaling directly affects the morphology of radial glia cells, and *reeler* mutants display a reduction in the extension of radial fibers (Hartfuss et al. 2003). The reduction of radial glia fibers in our mutants might at least partly result from reduced Reelin levels. The reduction of cell populations important for radial neuronal migration, in addition to SP disorganization, prompted us to investigate whether neuronal positioning was disturbed in mutant cortices. BrdU birthdating experiments revealed incorrect positioning of neurons that should have settled in the superficial layers but instead were found in the deep cortical layers. Taken together, our results show that the lack of HSF2 induces incorrect positioning of superficial neurons during cortex formation, suggesting altered migration.

cDNA microarray analysis of K562 cells stably overexpressing HSF2 revealed an increase in *p35* mRNA levels, which in turn were down-regulated in *Hsf2*$^{-/-}$ cortex at E16.5. The minor increase in p35 protein levels in hemin-treated K562 stably overexpressing HSF2 resulted in an increased activity of Cdk5. Therefore, it was conceivable that HSF2 influences Cdk5 activity through induction of *p35*, which could partly explain incorrect positioning of HSF2-deficient neurons from superficial layers. Indeed, we found that the levels of *p35*, but also *p39* and, consequently, the activity of Cdk5 activity were reduced in *Hsf2*$^{-/-}$ cortices. However, these alterations do not recapitulate the entire *p35*$^{-/-}$ phenotype. Although PP splits normally in *p35*$^{-/-}$ mice, the subsequent waves of neurons are roughly inverted (Chae et al. 1997; Kwon and Tsai 1998). In *Hsf2*$^{-/-}$ cortices, PP splitting is intact, but in contrast to *p35*$^{-/-}$, only superficial layers are affected. This is in agreement with HSF2 expression starting at E15.5 in post-mitotic neurons of the CP. In addition, *p35*$^{-/-}$ mice show more severe defects in the rostral–medial part of the brain, whereas in *Hsf2*$^{-/-}$mice *p35* levels are reduced mainly in the caudo–medial portion of the developing cortex, where the *Hsf2*$^{-/-}$ phenotype is most severe in terms of SP disorganization, calretinin expression, and abnormal neuron positioning. The reduction of p35 due to the lack of HSF2 can occur

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007



only in the area of HSF2 expression, which appears in the caudo–medial region but is absent from the rostral area at E15.5 until E17.5 (data not shown).

We identified within the *p35* promoter a putative HSE downstream of two GC-boxes, previously shown to be important for expression in cortical primary neurons (Ross et al. 2002). Sp3 and Sp4 are the major transactivators binding to these two GC boxes in cortical primary neurons. ChIP analysis of E16.5 CP revealed that HSF2 binds to this *p35* promoter region in vivo, identifying *p35* as a direct target gene for HSF2 in brain development. When examining the mouse and human *p39* promoters, we could not find conserved HSEs, suggesting that the mechanism of regulation of *p39* by HSF2 is different from that of *p35*. Recently, HSF2 was reported to regulate chromatin structure by recruiting PP2A, which dephosphorylates and inactivates the condensin complex, to prevent compaction of the *hsp70* promoter during mitosis (Xing et al. 2005). It will be interesting to determine whether HSF2 has a similar mechanism of action in the context of chromatin structure within the *p35* promoter. The identification of *p35* as the first HSF2 target gene in brain development helps us in our attempts to understand the mechanism by which HSFs regulate gene expression during development. HSF2 not only plays a role in radial glia and MZ cell populations, but also has effects on the Reelin and Cdk5 signaling cascades that regulate migration of post-mitotic neurons. The Reelin and p35–Cdk5 pathways seem to operate synergistically in the correct positioning of cortical neurons (Ohshima et al. 2001; Beffert et al. 2004). This requires a tight coordination of signaling molecules, to which HSF2 and possibly also other HSFs might contribute by fine-tuning their expression.

## Materials and methods

### *Mice*

*Hsf2* heterozygous mice described in Kallio et al. (2002) were maintained in a C57Bl/6 N background (backcross 8). Noon on the day of the vaginal plug was considered as E0.5.

### *Cell culture and experimental treatments*

Human K562 erythroleukemia cells were cultured in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum. K562 cells stably overexpressing HSF2-β isoform or the empty vector control (Mock) were maintained as parental K562 cells, with neomycin (G418, 500 μg/mL; Leppä et al. 1997). Hemin (Fluka) was used at a final concentration of 40 μM for 16 h.

### β-*galactosidase staining, immunohistochemistry, and histological analysis*

β–galactosidase activity was detected as described (Kallio et al. 2002). For histology, sections were stained with hematoxylin or toluidine blue. For IHC, embryos were fixed in Bouin's fixative for 5–12 h, or in PFA overnight at 4°C, embedded in paraffin, and cut into 10-μm sections. Serial sections were incubated with antibodies for 1 h at room temperature or overnight at 4°C: rabbit anti-GFAP 1:100 (Dako), mouse anti-Tuj-1 1:100, rabbit anti-necdin 1:100, rat BrdU antibody 1:100 (Sigma). For immunostaining on cryosections, brains were fixed in 4% PFA-PBS overnight at 4°C, embedded in 0.5% gelatine/30% sucrose solution, and cut into 14-μm sections. Serial sections were incubated overnight at 4°C with mouse anti-RC2 1:10 (IgM, Hybridoma Bank) or anti-calretinin 1:2000 (Swant).

### *Birthdating experiments*

Pregnant females (two to three) were injected at E12.5, E13.5, or E16.5 with 70 μg of BrdU per gram of body weight. E15.5 or P31 brains were fixed overnight in Bouin fixative, paraffin embedded, and cut into 10-μm parasagittal sections.

### *IP and Western blot analysis*

Tissue extracts (TE) and whole-cell extracts (WCE) from K562 cells were prepared as described by Mosser et al. (1988) or Loones et al. (2000). Approximately 20–36 μg of TE or WCE per sample was used for SDS-PAGE. Antibodies: mouse anti-Reelin 1:1000 (clone G10, Calbiochem), mouse monoclonal anti-Dab1 1:400 (H3, gift of A. Goffinet, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium), mouse monoclonal anti-phosphotyrosine 1:2500 (4G10, Upstate Cell Signaling Solutions), rabbit anti-phosphoserine 1:2500 (Chemicon International), rat anti-Hsc70 1:5000 (SPA-815, Stressgen), rabbit anti-Cdk5 1:200 (C-8, sc-173, Santa Cruz Biotechnology Inc.), rabbit anti-p-Cdk5 1:200 (sc-12918-R, Santa Cruz Biotechnology Inc.), and rabbit anti-p35 1:200 (N-20, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Dab1 was immunoprecipitated from 150 μg of total extracts from E17.5 caudo–medial neocortex with 10 μL of Dab1 antibody. Conversely, phosphoproteins were immunoprecitated with 4 μL of anti-phosphotyrosine antibody (4G10) and blotted against anti-Dab1. The pull-down was performed using Bio-Ademtech magnetic beads coupled to protein G according to the manufacturer's instructions (Ademtech SA).

### *Northern blot analysis*

mRNA was isolated from control or hemin-treated K562 cells with the QuickPrep Micro mRNA purification kit (Amersham Biosciences) and separated on an agarose–formaldehyde gel and hybridized with [α-$^{32}$P]dCTP-labeled probes: a 775-bp NotI–EcoRI human *p35* insert (GenBank accession no. AA442853) and a PstI-linearized plasmid for rat GAPDH (pGAPDH) (Fort et al. 1985).

### *Cdk5 kinase assay*

The IP was performed using 500 μg of cell lysate and 5 μL of anti-Cdk5 antibody (clone C-8, sc-173, Santa Cruz Biotechnology Inc.) pulled down with Protein A-coated sepharose beads. The immunocomplexes were washed twice with IP buffer and twice with kinase buffer (see Supplemental Material). The Sepharose A pellets were resuspended in 20 μL of kinase buffer containing histone H1 (100 μg/mL). The kinase assay was performed with 5 μL of 5× ATP mix (1 mCi of [$^{32}$P] per milliliter and 125 μM cold ATP in kinase buffer) for 20 min at 30°C and stopped by the addition of 3× Laemmli buffer. The radioactive signal was detected with a PhosphorImager. The measured activities were normalized to the endogenous Cdk5 levels as detected by Western blotting. The relative Cdk5 activity of K562 cells was arbitrarily given the value 1.

### *In situ hybridization*

Embryos were fixed in 4% PFA and embedded in 0.5% gelatine/30% sucrose solution and cut into 150-μm sections by a vibra-

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007



tome (Leica). Digoxygenin-labeled riboprobes synthesized from pcDNA3-p35, pcDNA3-p39 (Ko et al. 2001), or pBSE61-Tbr-1 (Hevner et al. 2001) were incubated on sections as described by Wilkinson and Nieto (1993), using digoxygenin alkaline phosphatase-coupled antibodies (Roche) and BM purple AP revelation substrate (Roche).

### *RT–PCR analysis*

RNAs from the caudo–medial region of E16.5 cortices were purified using RNAqueous-Micro kit (Ambion). Reverse transcription was performed from 500 ng of RNAs using SuperScript first strand Synthesis system for RT–PCR (Life Technologies). Quantitative analysis of the LightCycler data were performed using the Quantitect SYBR green PCR kit (Qiagen) and LightCycler analyzing software. Three genes—the highly expressed α-tubulin, the moderately expressed cyclophilin B, and PPOX with low expression—were used for normalization of the results (Dauphinot et al. 2005). For *p35* and *p39* expression analysis, six and eight independent sets (wild-type and mutant couples), respectively, were analyzed. One set of primers for *p39* and two different sets of primers for *p35* were used (Harada et al. 2001), adapted to murine *p35* sequence (Griffin et al. 2004; Ledee et al. 2005). For primer sequences, see Supplemental Material. *P* value was determined by Student's *t*-test.

### *ChIP*

The ChIP protocol was modified from Takahashi et al. (2000). E16.5 cortical tissue was cross-linked with a final concentration of 1% formaldehyde. Quenching was performed with a final concentration of 125 mM glycine. After cortical cell dissociation, three to five embryonic CPs were lysed in 1 mL of lysis buffer. Fragmentation of the chromatin samples was performed by sonication with Bioruptor (Diagenode) to an approximate size of 500 bp. IP was performed after preclearing with a 50% slurry of protein G-coated Sepharose beads containing bovine serum albumin (100 µg/mL, Amersham Biosciences) overnight at 4°C. The following antibodies were used: HSF2 (Sarge et al. 1993), Sp3 (clone D-20, SC-644X Santa Cruz Biotechnology Inc.), and normal rabbit serum (NRS, Jackson Immuno Research Laboratory). Washing of immunocomplexes was performed three times with wash buffer 1, twice with wash buffer 2, and three times in wash buffer 3 (for washing buffers, see Supplemental Material). Cross-links were reversed by incubating the samples overnight at 65°C. DNA was purified, and PCR analysis was performed on 1:10 of each ChIP sample using puRe Taq Ready-to-go PCR Beads (Amersham Biosciences). For primer sequences, see Supplemental Material.

## Acknowlegdments

We thank K. Yoshikawa and M. Niinobe for the gift of the necdin antibody, and T. Frankfurter for the Tuj1 antibody. We thank J. Rubenstein for the gift of *Tbr1* probe, A. Goffinet for Dab1 antibody, and Li-Huei Tsai for *p35* and *p39* probes. We are indebted to Rick Morimoto for the gift of HSF2 rabbit polyclonal antibody and constructive discussions. We are thankful for the help and support of the Finnish microarray core facility at Turku Centre for Biotechnology, especially Janika Henriksson, Päivi Junni, Arja Reinikainen, Ilana Saarikko, Rolf Sara, Anne West, and Riitta Lahesmaa. We thank Alessandra Pierani, André Goffinet, Marion Wassef, Sonia Garel, Piotr Topilko, John Eriksson, Cecilia Sahlgren, Hanna-Mari Pallari, and the members of the Sistonen laboratory for helpful discussions and comments. We thank Anne Le Mouël, Rosette Goiame, and Fanny Coulpier for technical help, and Severine Larney from the animal house facilities for animal breeding. This work was supported by grants from the Association pour la Recherche contre le cancer (ARC nos. 4671 and 3609, V.M.), the Academy of Finland, the Sigrid Jusélius Foundation, the Finnish Cancer Organizations, the Finnish Retro Life Insurance Companies (L.S.), and the Turku Graduate School of Biomedical Sciences (P.Ö.).

## References

Alastalo, T.-P., Lönnström, M., Leppä, S., Kaarniranta, K., Pelto-Huikko, M., Sistonen, L., and Parvinen, M. 1998. Stage-specific expression and cellular localization of the heat shock factor 2 isoforms in the rat seminiferous epithelium. *Exp. Cell Res.* **240:** 16–27.

Angevine, J.B. and Sidman, R.L. 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of the cerebral cortex in the mouse. *Nature* **192:** 766–768.

Beffert, U., Weeber, E.J., Morfini, G., Ko, J., Brady, S.T., Tsai, L.H., Sweatt, J.D., and Herz, J. 2004. Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission. *J. Neurosci.* **24:** 1897–1906.

Bielle, F., Griveau, A., Narboux-Neme, N., Vigneau, S., Sigrist, M., Arber, S., Wassef, M., and Pierani, A. 2005. Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat. Neurosci.* **8:** 1002–1012.

Bignami, A. and Dahl, D. 1974. Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat. *Nature* **252:** 55–56.

Bock, H.H. and Herz, J. 2003. Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. *Curr. Biol.* **13:** 18–26.

Bu, L., Jin, Y., Shi, Y., Chu, R., Ban, A., Eiberg, H., Andres, L., Jiang, H., Zheng, G., Qian, M., et al. 2002. Mutant DNA-binding domain of HSF4 is associated with autosomal dominant lamellar and Marner cataract. *Nat. Genet.* **31:** 276–278.

Chae, T., Kwon, Y.T., Bronson, R., Dikkes, P., Li, E., and Tsai, L.H. 1997. Mice lacking p35, a neuronal specific activator of cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* **18:** 29–42.

Christians, E., Michel, E., Adenot, P., Mezger, V., Rallu, M., Morange, M., and Renard, J.P. 1997. Evidence for the involvement of mouse heat shock factor 1 in the atypical expression of the HSP70.1 heat shock gene during mouse zygotic genome activation. *Mol. Cell. Biol.* **17:** 778–788.

Curran, T. and D'Arcangelo, G. 1998. Role of Reelin in the control of brain development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **26:** 285–294.

Dauphinot, L., Ryle, R., Rivals, I., Tran Dang, M., Moldrich, R.X., Golfier, G., Ettwiller, L., Toyama, K., Rossier, J., Personnaz, L., et al. 2005. The cerebellar transcriptome during postnatal development of the Ts1Cje mouse, a segmental trisomy model for Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **14:** 373–384.

Fiorenza, M.T., Farkas, T., Dissing, M., Kolding, D., and Zimarino, V. 1995. Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **23:** 467–474.

Fonseca, M., Del Rio, J.A., Martinez, A., Gomez, S., and Soriano, E. 1995. Development of calretinin immunoreactivity in the neocortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* **361:** 177–192.

Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., El Sabrouty, S., Dani, C., Jeanteur, P., and Blanchard, J.M. 1985. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family.

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007



*Nucleic Acids Res.* **13:** 1431–1442.
Fujimoto, M., Izu, H., Seki, K., Fukuda, K., Nishida, T., Yamada, S., Kato, K., Yonemura, S., Inouye, S., and Nakai, A. 2004. HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. *EMBO J.* **23:** 4297–4306.
Geisert Jr., E.E. and Frankfurter, A. 1989. The neuronal response to injury as visualized by immunostaining of class III β-tubulin in the rat. *Neurosci. Lett.* **102:** 137–141.
Gilmore, E.C., Ohshima, T., Goffinet, A.M., Kulkarni, A.B., and Herrup, K. 1998. Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J. Neurosci.* **18:** 6370–6377.
Götz, M. 2003. Doublecortin finds its place. *Nat. Neurosci.* **6:** 1245–1247.
Götz, M., Hartfuss, E., and Malatesta, P. 2002. Radial glia cells as neuronal precursors: A new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res. Bull.* **57:** 777–788.
Griffin, S.V., Hiromura, K., Pippin, J., Petermann, A.T., Blonski, M.J., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., and Shankland, S.J. 2004. Cyclin-dependent kinase 5 is a regulator of podocyte differentiation, proliferation, and morphology. *Am. J. Pathol.* **165:** 1175–1185.
Gupta, A., Tsai, L.H., and Wynshaw-Boris, A. 2002. Life is a journey: A genetic look at neocortical development. *Nat. Rev. Genet.* **3:** 342–355.
Harada, T., Morooka, T., Ogawa, S., and Nishida, E. 2001. ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nat. Cell Biol.* **3:** 453–459.
Hartfuss, E., Förster, E., Bock, H.H., Hack, M.A., Leprince, P., Luque, J.M., Herz, J., Frotscher, M., and Götz, M. 2003. Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development* **130:** 4597–4609.
Hevner, R.F., Shi, L., Justice, N., Huesh, Y., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A.M., Campagnoni, A.T., and Rubenstein, J.L. 2001. Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* **29:** 309–311.
Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A., and Herz, J. 1999. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* **24:** 481–489.
Hilgarth, R.S., Murphy, L.A., O'Connor, C.M., Clark, J.A., Park-Sarge, O.-K., and Sarge, K.D. 2004. Identification of *Xenopus* heat shock transcription factor-2: Conserved role of sumoylation in regulating deoxyribonucleic acid-binding activity of heat shock transcription factor-2 proteins. *Cell Stress Chaperones* **9:** 214–220.
Howell, B.W., Herrick, T.M., and Cooper, J.A. 1999. Reelin induced tyrosine phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes & Dev.* **13:** 643–648.
Jedlicka, P., Mortin, M.A., and Wu, C. 1997. Multiple functions of *Drosophila* heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J.* **16:** 2452–2462.
Kallio, M., Chang, Y., Manuel, M., Alastalo, T.-P., Rallu, M., Gitton, Y., Pirkkala, L., Loones, M.-T., Paslaru, L., Larney, S., et al. 2002. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J.* **21:** 2591–2601.
Ko, J., Humbert, S., Bronson, R.T., Takahashi, S., Kularni, A.B., Li, E., and Tsai, L.H. 2001. p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J. Neurosci.* **21:** 6758–6771.
Kwon, Y.T. and Tsai, L.H. 1998. A novel disruption of cortical development in p35–/– mice distinct from reeler. *J. Comp. Neurol.* **395:** 510–522.
Lambert de Rouvroy, C. and Goffinet, A. 1998. The reeler mouse as a model of brain development. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **150:** 1–106.
Ledee, D.R., Gao, C.Y., Seth, R., Fariss, R.N., Tripathi, B.K., and Zelenka, P.S. 2005. A specific interaction between muskelin and the cyclin-dependent kinase 5 activator p39 promotes peripheral localization of muskelin. *J. Biol. Chem.* **280:** 21376–21383.
Le Goff, P., Le Drean, Y., Le Peron, C., Le Jossic-Corcos, C., Ainouche, A., and Michel, D. 2004. Intracellular trafficking of heat shock factor 2. *Exp. Cell Res.* **294:** 480–493.
Leppä, S., Pirkkala, L., Saarento, H., Sarge, K.D., and Sistonen, L. 1997. Overexpression of HSF2-β inhibits hemin-induced heat shock gene expression and erythroid differentiation in K562 cells. *J. Biol. Chem.* **272:** 15293–15298.
Loones, M.-T., Chang, Y., and Morange, M. 2000. The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggests a role in neuronal and non-neuronal differentiation. *Cell Stress Chaperones* **5:** 291–305.
Magdaleno, S., Keshvara, L., and Curran, T. 2002. Rescue of ataxia and preplate splitting by ectopic expression of Reelin in reeler mice. *Neuron* **33:** 573–586.
McMillan, D.R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K., and Benjamin, I.J. 1998. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273:** 7523–7528.
McMillan, D.R., Christians, E., Forster, M., Xiao, X., Connell, P., Plumier, J.C., Zuo, X., Richardson, J., Morgan, S., and Benjamin, I.J. 2002. Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. *Mol. Cell. Biol.* **22:** 8005–8014.
Mezger, V., Bensaude, O., and Morange, M. 1989. Unusual levels of heat shock element-binding activity in embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **9:** 3888–3896.
Mezger, V., Rallu, M., Morimoto, R.I., Morange, M., and Renard, J.P. 1994a. Heat shock factor 2-like activity in mouse blastocysts. *Dev. Biol.* **166:** 819–822.
Mezger, V., Renard, J.P., Christians, E., and Morange, M. 1994b. Detection of heat shock element-binding activities by gel shift assay during mouse preimplantation development. *Dev. Biol.* **165:** 627–638.
Misson, J.P., Edwards, M.A., Yamamoto, M., and Caviness Jr., V.S. 1988. Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: Studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **44:** 95–108.
Mosser, D.D., Theodorakis, N.G., and Morimoto, R.I. 1988. Coordinate changes in heat shock element-binding activity and *hsp70* gene transcription rates in human cells. *Mol. Cell. Biol.* **8:** 4736–4744.
Murphy, S.P., Gorzowski, J.J., Sarge, K.D., and Phillips, B. 1994. Characterization of constitutive HSF2 DNA-binding activity in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **14:** 5309–5317.
Nakai, A. and Morimoto, R.I. 1993. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol. Cell. Biol.* **13:** 1983–1997.
Nakai, A., Tanabe, M., Kawazoe, Y., Inazawa, J., Morimoto, R.I., and Nagata, K. 1997. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* **17:** 469–481.
Niinobe, M., Koyama, K., and Yoshikawa, K. 2000. Cellular and subcellular localization of necdin in fetal and adult mouse

Downloaded from www.genesdev.org on November 3, 2007



brain. *Dev. Neurosci.* **22:** 310–319.
Ohshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veeranna, X., Pant, H.C., Brady, R.O., Martin, L.J., and Kulkarni, A.B. 1996. Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 11173–11178.
Ohshima, T., Gilmore, E.C., Herrup, K., Brady, R.O., Kulkarni, A.B., and Mikoshibaka, K. 2001. Synergistic contributions of cyclin-dependant kinase5/p35 and Reelin/Dab1 to the positioning of cortical neurons in the developing mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 2764–2769.
Pirkkala, L., Nykänen, P., and Sistonen, L. 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* **15:** 1118–1131.
Råbergh, C.M., Airaksinen, S., Soitamo, A., Björklund, H.V., Johansson, T., Nikinmaa, M., and Sistonen, L. 2000. Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J. Exp. Biol.* **203:** 1817–1824.
Rabindran, S.K., Giorgi, G., Clos, J., and Wu, C. 1991. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor HSF1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88:** 6906–6910.
Rallu, M., Loones, M., Lallemand, Y., Morimoto, R., Morange, M., and Mezger, V. 1997. Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94:** 2392–2397.
Ross, S., Tienhaara, A., Lee, M.S., Tsai, L.H., and Gill, G. 2002. GC box-binding transcription factors control the neuronal specific transcription of the cyclin-dependent kinase 5 regulator p35. *J. Biol. Chem.* **277:** 4455–4464.
Sarge, K.D., Zimarino, V., Holm, K., Wu, C., and Morimoto, R.I. 1991. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes & Dev.* **5:** 1902–1911.
Sarge, K.D., Murphy, S.P., and Morimoto, R.I. 1993. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol. Cell. Biol.* **13:** 1392–1407.
Schuetz, T.J., Gallo, G.J., Sheldon, L., Tempst, P., and Kingston, R.E. 1991. Isolation of a cDNA for HSF2: Evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88:** 6911–6915.
Sistonen, L., Sarge, K.D., Phillips, B., Abravaya, K., and Morimoto, R.I. 1992. Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* **12:** 4104–4111.
Sistonen, L., Sarge, K.D., and Morimoto, R.I. 1994. Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergically induce Hsp70 gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **14:** 2087–2099.
Takahashi, Y., Rayman, J.B., and Dynlacht, B.D. 2000. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: Distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes & Dev.* **14:** 804–816.
Theodorakis, N.G., Zand, D.J., Kotzbauer, P.T., Williams, G.T., and Morimoto, R.I. 1989. Hemin-induced transcriptional activation of the HSP70 gene during erythroid maturation in K562 cells is due to a heat shock factor-mediated stress response. *Mol. Cell. Biol.* **9:** 3166–3173.
Tsai, L.H., Delalle, I., Caviness Jr., V.S., Chae, T., and Harlow, E. 1994. p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371:** 419–423.
Wang, G., Zhang, J., Moskophidis, D., and Mivechi, N.F. 2003. Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. *Genesis* **36:** 48–61.
Wilkinson, D.G. and Nieto, M.A. 1993. Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol.* **225:** 361–373.
Xiao, X., Zuo, X., Davis, A.A., McMillan, D.R., Curry, B.B., Richardson, J.A., and Benjamin, I.J. 1999. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory response in mice. *EMBO J.* **18:** 5943–5952.
Xing, H., Wilkerson, D.C., Mayhew, C.N., Lubert, E.J., Skaggs, H.S., Goodson, M.L., Hong, Y., Park-Sarge, O.-K., and Sarge, K.D. 2005. Mechanism of hsp70i gene bookmarking. *Science* **307:** 421–423.
Yoshima, T., Yura, T., and Yanagi, H. 1998. Heat shock factor 1 mediates hemin-induced hsp70 gene transcription in K562 erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* **273:** 25466–25471.
Zhang, Y., Huang, L., Zhang, J., Moskophidis, D., and Mivechi, N.F. 2002. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J. Cell. Biochem.* **86:** 376–393.

### 1.1.2 Discussion et perspectives

En conclusion, ce travail permet d'apprécier la subtilité qui réside dans l'étude des HSF en conditions dites physiologiques : les HSF interviennent dans des processus différents de la réponse au stress, notamment HSF2 intervient au cours du développement du cortex en modulant les voies régissant la migration des précurseurs neuronaux.

#### L'absence de HSF2 affecte le positionnement des neurones des couches superficielles du cortex

Les cortex embryonnaires *Hsf2*$^{-/-}$ présentent des défauts de positionnement de certains neurones des couches superficielles du cortex, l'expérience de *Birthdating* le montre. Cette technique consiste à injecter une solution de BrDU aux souris gestantes à différents temps de gestation, puis à détecter les cellules ayant incorporer le BrdU dans les cortex des embryons après un temps donné, *i.e.* les cellules post-mitotiques générées par des progéniteurs ayant incorporés le BrdU sont aussi détectés. Des expériences supplémentaires ont été réalisées par des injections à E12,5 et à E13,5 et observées à E15,5, permettant de marquer les couches profondes du cortex (Fig. 1.1). Aucun défaut de positionnement des neurones marqués n'est décelé dans ces conditions, suggérant que la lamination des couches profondes du cortex n'est pas affecté dans les embryons *Hsf2*$^{-/-}$. Ainsi, uniquement la migration des neurones des couches superficielles ne semblent être affectée en absence de HSF2.

Si l'on s'attarde sur l'expression de HSF2 au cours de la corticogenèse, on peut constater que dans la plaque corticale, le facteur HSF2 est principalement exprimé par les couches superficielles du cortex en fin de gestation et à la naissance (Fig. 1.2 ; 1.3 ; 1.4). Dans un souci de clarté, le profil d'expression et d'activité de liaison à l'ADN est récapitulé dans la Fig 1.2.

Du profil d'expression de HSF2 dans le cortex en développement, on constate que son expression qui débute dans la VZ, continue dans la SVZ et les couches corticales superficielles, et coïncide donc avec les profils d'expression des marqueurs des couches superficielles tels que SVET1 (Tarabykin *et al.*, 2001), CUX2 (Zimmer *et al.*, 2004), BRN1/2 (Sugitani *et al.*, 2002) et Tis21 (Haubensak *et al.*, 2004). Ceci suggère que HSF2 serait impliqué plus particulièrement dans la mise en place des couches superficielles. La réduction de l'activité du complexe CDK5/P35, impliqué dans la migration des couches superficielles, le laisse présager. Nous avons donc entrepris des expériences pour évaluer les défauts de mise en place des couches corticales superficielles dans les cortex à différents stades. En utilisant différents marqueurs spécifiques des couches corticales embryonnaires par hybridation *in situ*, nous n'avons pas distingué de perturbations majeures de la lamination chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ sur fond mixte C57Bl /6J x C57Bl/6N, qui est celui où le phénotype est le moins marqué. Des expériences supplémentaires doivent être entreprises sur un fond non mixte C57Bl/6N quand celui-ci sera disponible. De plus, dans le phénotype observé, seuls certains neurones des couches superficielles sont affectés et que cela réduit les chances de voir un effet par marquage de couches en hybridation *in situ*.

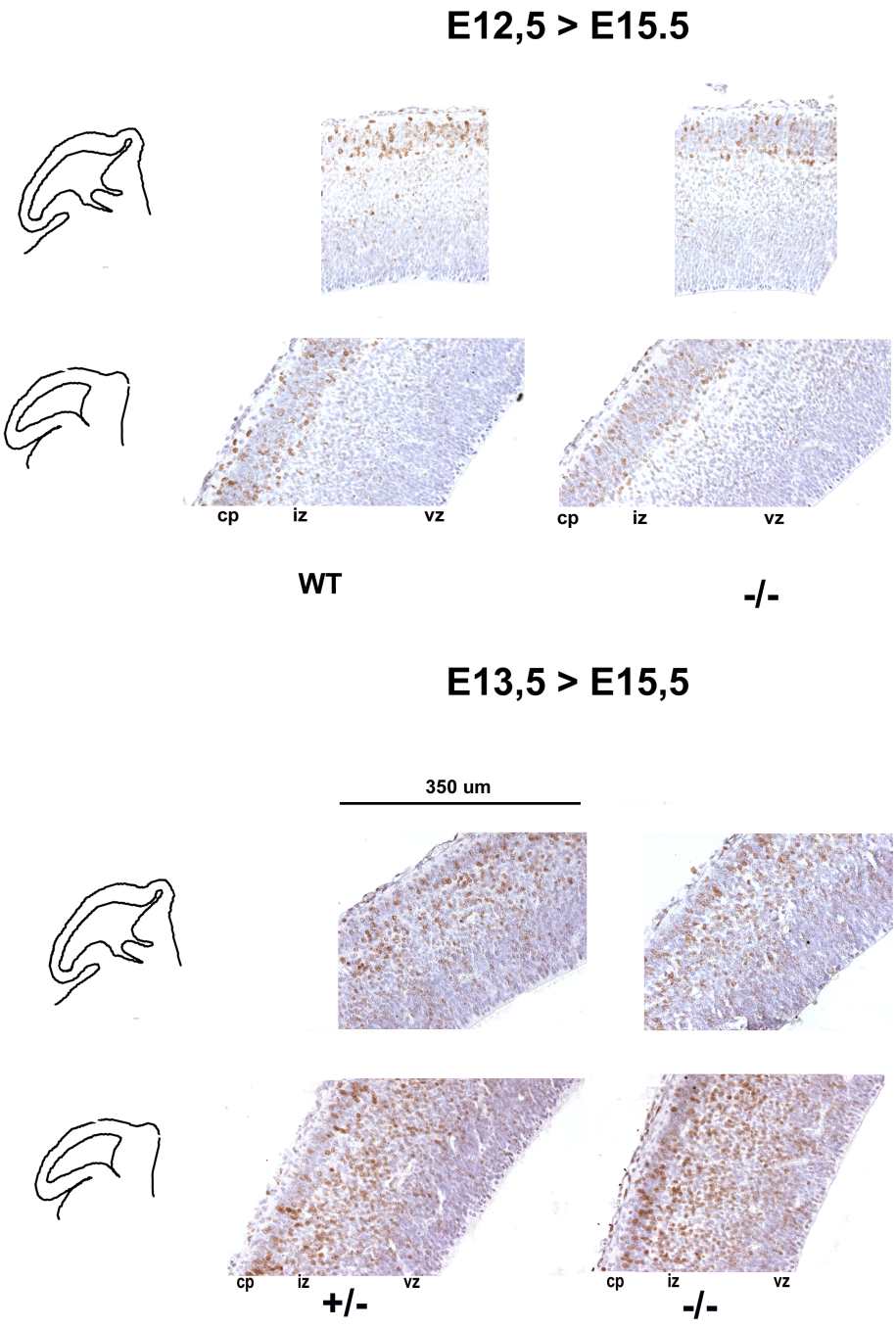



**Fig. 1.1 – Expériences de *Birthdating* chez les embryons *Hsf2*$^{-/-}$ *versus* sauvage.** Ces expériences ont été réalisées par injection à E12,5 (en haut) et E13,5 (en bas) et les cerveaux ont été observés à E15,5. Aucun défaut de positionnement des neurones des couches profondes du cortex n'est observé, par contre, une réduction des cellules ayant incorporées du BrdU est observée dans les cortex E12,5-E15,5, suggérant un défaut de prolifération chez les embryons *Hsf2*$^{-/-}$

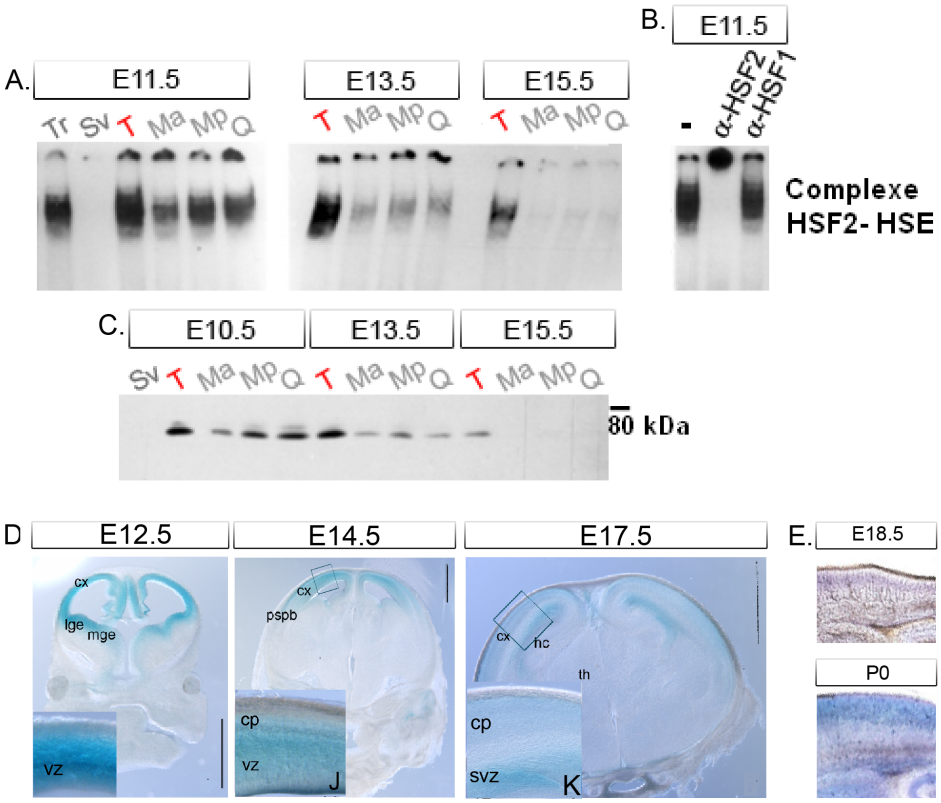



**Fig. 1.2 – Dynamique d'expression et d'activité du facteur HSF2 dans le cortex en développement.** A. Suivie de l'activité de liaison à l'ADN des HSF au cours du développement par EMSA. B. Supershift dans des extraits télencéphaliques à E11.5 montrant que seul HSF2 possède une activité de liaison aux HSE au cours du développement. C. Profil d'expression de HSF2 au cours du développement suivi par Western-blot. D. Suivie de l'expression de la $\beta$Galactosidase sous contrôle du promoteur de *Hsf2* au cours du développement du cortex cérébral (coloration bleue sur coupe coronale). Des grossissements sont représentés en J et K. E. Expression de Hsf2 détectée par hybridation *in situ* sur coupe parasagittale. Barre d'échelle 1mm. cp, plaque corticale ; cx, cortex cérébral ; hc, hippocampe ; lge, éminences ganglionnaires latérales ; Ma, membres antérieurs ; mge, éminences ganglionnaires médianes ; Mp, membres inférieurs ; ob, bulbes olfactifs ; pspb, limites du pallium/subpallium ; Q, queue ; Sv, sac vitellin ; svz, zone sous ventriculaire ; t, télencéphale ; T, vésicules télencéphaliques ; th, thalamus ; Tr, tronc ; vz, zone ventriculaire.

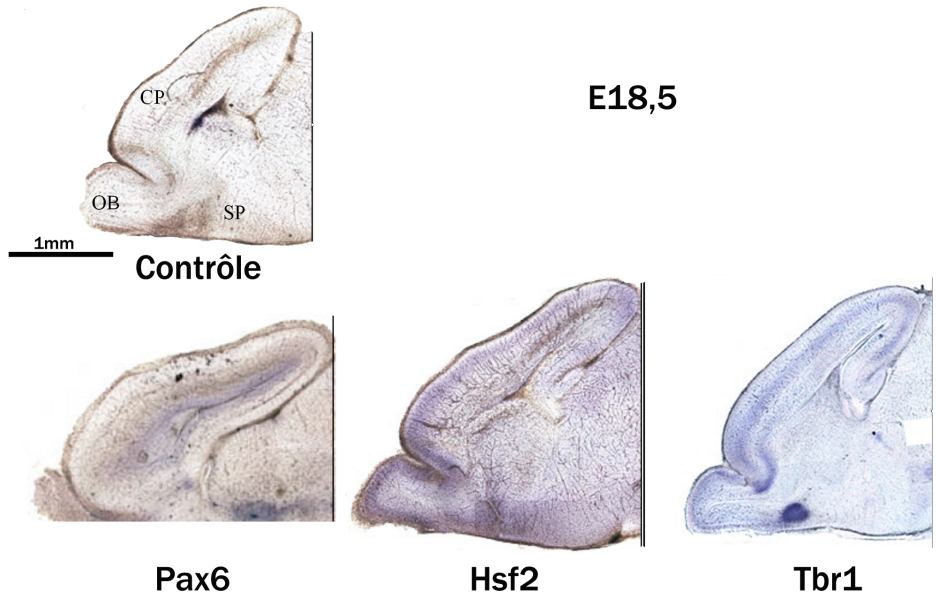



**Fig. 1.3 – Localisation de HSF2 dans les couches laminaires du cortex à E18,5.** Les hybridations *in situ* sur coupe parasagittale de cortex à E18,5 permettent de localiser l'expression (visualisée par la coloration bleue) des ARNm Pax6 dans les couches prolifératives, Hsf2 dans les couches superficielles et de Tbr1 dans les couches profondes. CP, plaque corticale ; OB, bulbes olfactifs ; SP, subpallium.

### L'absence de HSF2 modifie le nombre de progéniteurs

Le profil d'expression de HSF2 débute dès le début de la corticogenèse, HSF2 est exprimé dans toute la zone ventriculaire, renfermant les progéniteurs en prolifération (E10-E12). L'expérience de *Birthdating* menée à E12,5-E15,5 montre une réduction de cellules ayant incorporées du BrdU (Fig. 1.1) suggérant un défaut de prolifération chez les embryons $Hsf2^{-/-}$ à E12,5. Ceci est actuellement en cours de quantification. De plus, le nombre de cellules de glie radiaire, support de la migration et cellule progénitrice est plus réduit dans les cerveaux mutants $Hsf2^{-/-}$. Pourtant, à E13.5 et E17.5, le nombre de neurones marqué par immuhistochimie à l'aide de l'anticorps Tuj1 ne semble pas affecté. A E17.5, d'après les expériences de TUNEL effectuées par Yunhua Chang durant sa thèse au laboratoire, il y a un fort taux d'apopose dans la SVZ. Ceci nous laisse supposer qu'une compensation s'opère chez les mutants. Soit la population plus réduite de progéniteurs prolifère plus, soit une autre sous population de progéniteurs compense le déficit en neurone. Une estimation plus complète des différents types cellulaires présents dans le cortex des embryons $Hsf2^{-/-}$ pourrait donc être très informatif. De plus, s'il y a moins de progéniteurs et si les neurones ne migrent pas correctement, on peut supposer que l'identité corticale des mutants $Hsf2^{-/-}$ pourrait être affectée. Nous avons donc testé dans un premier temps, la polarisation antéro-postérieure des cortex des souris $Hsf2^{-/-}$. En effet, les défauts de positionnement des neurones observés chez les souris $Hsf2^{-/-}$ dans le cortex en développement se localisent majoritairement dans la zone médio-caudale du cortex, suggérant des défauts de formation de l'aire somato-sensorielle. Chacune des vibrisses

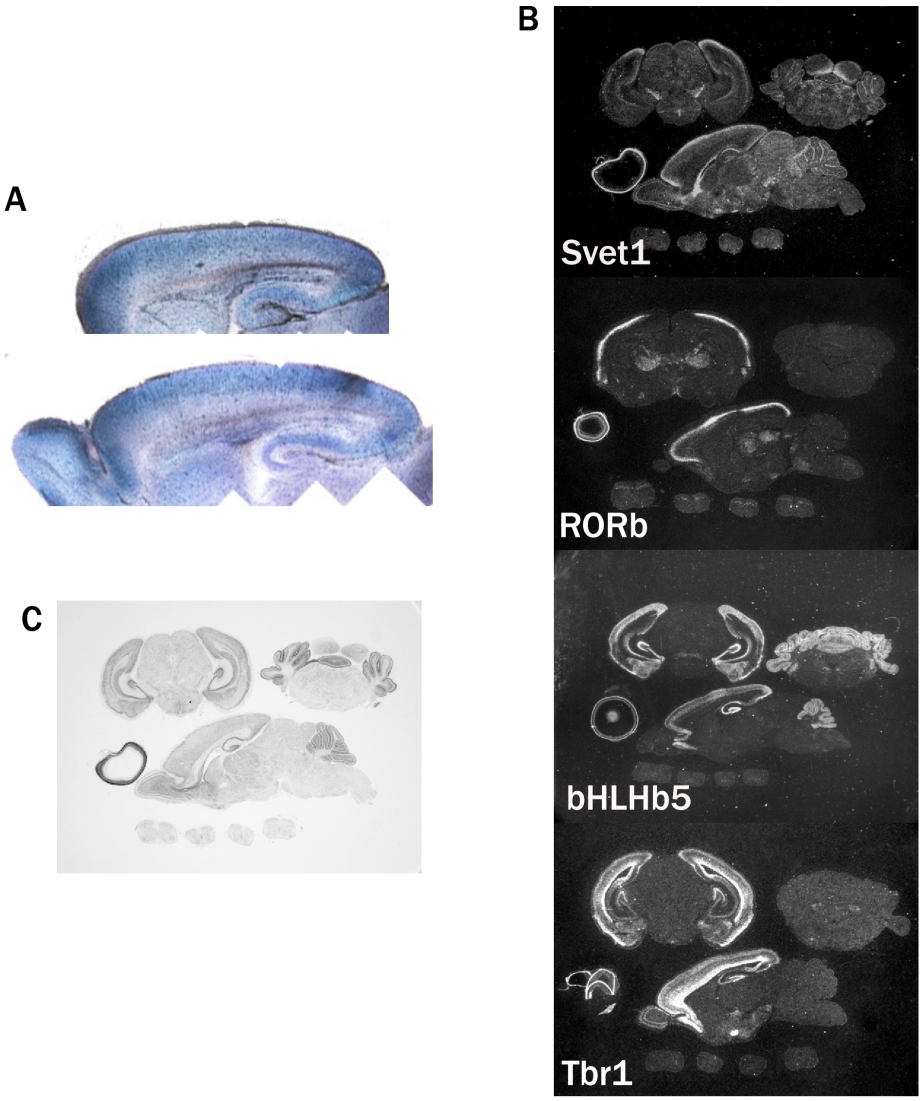



**Fig. 1.4 – Localisation de HSF2 dans les couches laminaires du cortex à P0.** Les hybridations *in situ* sur coupe parasagittale de cortex à P0 confirment une localisation de l'expression de Hsf2 dans le cortex (A) par comparaison aux données disponibles dans les bases de données *www.stjudebgem.org* (B). L'expression de Hsf2 coïncide avec l'expression de bHLHb5 exprimé par les couches superficielles du cortex. En C est représenté un contrôle permettant de visualiser les coupes de cerveaux hybridées en B.

de la souris active des neurones localisés dans une zone particulière du cortex S1 de l'aire somato-sensorielle, identifées comme une partie cylindrique ressemblant à un tonneau (*barrel*) dans la couche IV du cortex : ainsi on retrouve au niveau du cortex S1 l'organisation des vibrisses en 5 rangées de tonneaux de chaque côté des hémisphères cérébraux. Un tonneau est donc un ensemble de neurones du cortex activés par le toucher d'une seule vibrisse. Après avoir observé la localisation des tonneaux corticaux chez les souris $Hsf2^{-/-}$ sur fond mixte C57Bl/6J x C57BL/6N, nous n'avons pas décelé de défauts majeurs de l'identité somato-sensorielle du cortex (Fig. 1.5). Des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'identité antéro-postérieure du cortex chez les souris $Hsf2^{-/-}$, notamment en suivant l'expression de Pax6 et Emx2 comme nous l'avons décrit dans l'introduction.

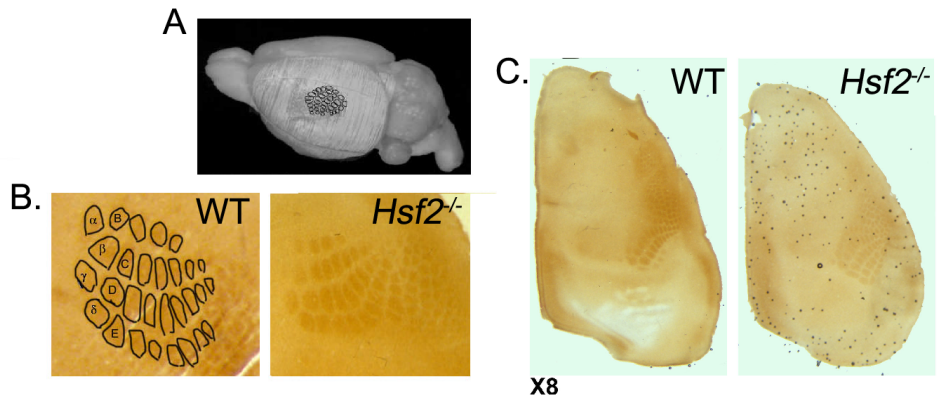



**Fig. 1.5 – Localisation des tonneaux corticaux chez les souris adultes $Hsf2^{-/-}$.** A. Localisation schématique de l'aire somatotopique des vibrisses situées dans l'aire somato-sensorielles chez la souris. B. Les tonneaux corticaux au niveau du cortex somatosensoriel S1 sont schématisé ici et pour faciliter l'interprétation, nous avons fait pivoter la photo de 90°. La disposition des tonneaux reproduit la disposition des vibrisses : 5 rangées horizontales (de A à E) et une rangée verticale de 4 tonneaux ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$). Aucune différence n'est observée chez les souris $Hsf2^{-/-}$ par rapport au sauvage. C. La localisation des tonneaux n'est pas affectée chez les souris $Hsf2^{-/-}$ sur fond C57Bl/6J x C57Bl6N par comparaison au sauvage suggérant que l'identité de l'aire soma-sensorielle n'est pas sensiblement affectée.

### HSF2 pourrait être impliqué dans la migration tangentielle

Autre observation, la zone marginale des mutants $Hsf2^{-/-}$ est hypocellulaire. La MZ est constituée de différents types cellulaires, notamment par des interneurones en transit et les cellules de Cajal-Retzius. Ces cellules sont essentielles pour la lamination du cortex cérébral. Des études préliminaires de suivie des projections thalamo-corticale à E16,5 par coloration au DiI (cristal fluorescent) (en collaboration avec Sonia Garel, Ens, Paris) n'ont montrées aucun défaut des ces projections. Mais on ne peut exclure que la migration tangentielle serait affectée chez les souris $Hsf2^{-/-}$. La diminution de cellules de Cajal-Retzius chez les souris $Hsf2^{-/-}$ suggère en effet que HSF2 est impliqué soit dans la prolifération de ces cellules, soit dans leur migration tangentielle vers le cortex. L'origine des cellules de Cajal-Retzius est multiple : le bourrelet cortical, le septum, et

le pallium ventral (Takiguchi-Hayashi *et al.*, 2004; Bielle *et al.*, 2005). La caractérisation des défauts de la zone marginale observés chez les mutants reste encore à élucider plus précisément. Pour conclure, HSF2 influence deux populations cellulaires qui assistent la migration neuronale radiaire : les cellules de Cajal-Retzius, soit en agissant au niveau de leur porlifération ou bien de leur migration tangentielle ; et les cellules de glie raidiaire, sans doute en agissant au niveau de leur prolifération (mais l'extension de leur fibres pourrait être aussi réduite par la diminution de Reeline dans les mutants *Hsf2*$^{-/-}$) (Hartfuss *et al.*, 2003).

### HSF2 pourrait réguler l'expression de *p35* de façon épigénétique

En parallèle de son action sur ces populations cellulaires, HSF2 agit sur les neurones en migration en modulant deux voies de signalisation indépendantes. L'étude présentée ici apporte une exploration nouvelle de la fonction de HSF2 au cours du développement. HSF2 apparaît comme étant un modulateur des voies de signalisation régissant la migration, notamment en agissant directement sur le contrôle de la transcription de p35, sous unité régulatrice de Cdk5, kinase nécessaire à la migration et au bon positionnement des neurones post-mitotiques.

Le laboratoire de Lea Sistonen par un système « gain de fonction »des cellules K562 ont identifier le gène *p35* comme une cible de HSF2 dont l'expression est augmentée par surexpression de mHSF2 dans des études de transcriptome par puces à ADN. Pour notre part, en utilisant les cortex issus d'embryons de souris où le gène *Hsf2* était inactivé par recombinaison homologue, nous avons montré que HSF2 régulait directement l'expression du gène *p35 in vivo*, influençant l'activité de CDK5. Le gène *p35* est ainsi le premier gène cible identifié *in vivo* en conditions physiologiques. L'expression de p39, autre sous unité activatrice de CDK5, a une expression réduite dans les cortex *Hsf2*$^{-/-}$ suivi par PCRq et hybridation *in situ*. Il reste à démontrer que p39 est une cible directe (en cours au laboratoire). La région régulatrice en amont du promoteur du gène *p35* possède un HSE putatif adjacent à deux *GC-box*, importantes pour la fixation de Sp3 et Sp4. Cette configuration spécifique de fixation de HSF2, soulève plusieurs interrogations. En effet, le HSE fixé ici est peu conservé : GCAgaACCttGGAcaGAA. Ceci suggère soit que la séquence HSE, suffisante et nécessaire à la fixation de HSF2, est moins restreinte *in vivo* que celle décrite précédemment, soit que d'autres facteurs sont impliqués dans le positionnement du facteur sur son HSE ou dans l'accessibilité du site HSE pour le HSF2. Ceci étend notre conception du site HSE ainsi que la reconnaissance spécifique du facteur HSF pour ces séquences cibles et son affinité. De plus, la proximité de facteurs Sp, capables de recruter les complexes histone déacetylases prévenant la repression de la chromatine, laisse entrevoir une régulation de la transcription de *p35* qui passerait également par des mécanismes épigénétiques. Le facteur Sp3 est retrouvé à E16.5, fixé sur le promoteur du gène *p35* en même temps que HSF2, indiquant une potentielle co-dépendance de ces deux facteurs. HSF2 est nécessaire à la liaison de SP3 car en son absence SP3 ne peut se fixer sur la région régulatrice du gène *p35* (expériences de ChIP, Chang *et al.,* 2006). Aucune donnée n'est disponible à l'heure actuelle, sur la liaison de la séquence promotrice de *p35* par les autres HSF. Il a été démontré que HSF2 était capable de *bookmarking* en

recrutant PP2A (Xing *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2007). Il serait intéressant de déterminer si le mécanisme d'action de HSF2 sur les régions proximales de *p35* passe aussi par un remodelage de la structure de la chromatine (voir Discussion finale).

P35 n'est exprimé que dans les neurones post-mitotiques du cortex occupant la plaque corticale à partir du milieu de la gestation (Tsai *et al.*, 1994; Chae *et al.*, 1997; Ko *et al.*, 2001). Aux mêmes stades, HSF2 est exprimée à la fois par les progéniteurs de la VZ/SVZ mais aussi par les neurones post-mitotiques de la plaque corticale. Pourtant HSF2 régulerait positivement l'expression de *p35* uniquement dans les neurones post-mitotiques. Ceci suggère que la régulation de *p35* par HSF2 pourrait nécessiter des partenaires spécifiques présents uniquement dans les cellules corticales en migration. La régulation de ces interactions doit probablement passer par des régulations traductionnelles des partenaires mais aussi par des régulations post-transcriptionnelles de HSF2. Ce mécanisme d'action est plus appronfondi actuellement au laboratoire.

### HSF2 module l'expresssion d'autres gènes impliqués dans la migration des neurones

Le taux de Reeline est diminuée de façon indirecte dans les cortex en développement $Hsf2^{-/-}$ en raison de la diminution du nombre de cellules de Cajal-Retzius. En conséquence, le taux de phosphorylation de DAB1 sur des résidus tyrosine est réduit, ce qui indique que la cascade Reeline est affectée. La voie de signalisation Reeline est synergique à la voie CDK5/P35 et semble être modulée par HSF2 à différents niveaux (Ohshima *et al.*, 2001; Beffert *et al.*, 2004). En effet, les voie de signalisation Reeline et CDK5/P35 converge sur l'adaptateur cytoplasmique DAB1 dont le rôle au cours de la migration est important. En effet, les souris dont le gène *Dab1* est inactivé comme les souris aux mutations spontanées *scrambler* et *yotari* présentent un défaut de séparation de la préplaque et une structure laminaire du cortex relativement inversée (Howell *et al.*, 1997; Sheldon *et al.*, 1997; Ware *et al.*, 1997), comme nous l'avons vu dans l'introduction. Une désorganisation corticale identique est observée chez les souris *Reeler* (D'Arcangelo *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 1995) et les souris dont les gènes codant pour *Apolipoprotein E receptor 2* (ApoER2) et *Very low density lipoprotein receptor* (VLDLR) sont inactivés (D'Arcangelo, 2001; Hiesberger *et al.*, 1999; Trommsdorff *et al.*, 1999). Le phénotype des souris $Hsf2^{-/-}$ est plus modéré que celui de ces souris dont les gène *ApoER2* et *Vldlr* sont inactivés, mais la diminution de la phosphorylation de DAB1 pourrait expliquer les défauts de migration observés. D'autre part, j'ai démontré que la quantité d'ARN *Dab1* est diminuée chez les souris $Hsf2^{-/-}$, par RT-PCRq le ratio de l'expression de DAB1 du contrôle par rapport à l'expression dans les cortex $Hsf2^{-/-}$ à E16,5 est de $1,25 \pm 0,35$ (p-value = 0,04). Le niveau protéique ne semble pas modifié chez les souris $Hsf2^{-/-}$, mais comme DAB1 est exprimée sous différentes isoformes, on ne peut pas exclure que l'expression des isoformes soit modifiées dans les cortex $Hsf2^{-/-}$ et non décelée dans nos expériences. Des expériences supplémentaires sont en cours. Par comparaison aux autres mutants, le niveaux d'expression d'ARN et de protéine DAB1 n'est pas modifié chez les souris $Cdk5^{-/-}$, mais DAB1 n'est pas le seul effecteur de

CDK5. Chez les souris *Reeler*, seul le niveau d'expression de la protéine DAB1 est augmentée (de dix fois). On aurait donc pu s'attendre à ce que les cortex $Hsf2^{-/-}$ montrent une légère augmentation de protéine Dab1, ce qui n'a pas été observé. Enfin, l'expression générale de DAB1 est diminuée chez les souris $Brn1^{-/-}Brn2^{-/-}$, facteurs exprimés dans les couches superficielles du cortex (Rice *et al.*, 1998; Sugitani *et al.*, 2002). Le phénotype des souris $Hsf2^{-/-}$ est pourtant moins affecté que celui des souris $Brn1^{-/-}Brn2^{-/-}$. Une recherche des sites HSE dans les régions proximales du gène *Dab1* est effectuée au laboratoire et ces sites sont actuellement testés par ChIP, pour savoir si le gène *Dab1* est une cible directe de HSF2.

D'autres partenaires des voies de signalisation régissant la migration sont suspectés comme étant des cibles potentielles de HSF2. J'ai montré que les récepteurs VLDLR sont moins exprimés chez les souris $Hsf2^{-/-}$ (par RT-PCRq $1,21 \pm 0,22, p - value = 0,02$). L'expression du récepteur ApoER2 ne semble pas modifié chez les souris $Hsf2^{-/-}$, ni l'expression de *Lis1*. En revanche, les travaux de Anne Lemouel au laboratoire montrent qu'un certain nombre de MAP (*microtubules associated protein*) ont une expression modifiée chez les souris $Hsf2^{-/-}$, comme NudE dont l'expression semble augmentée et Dclk dont l'expression semble diminuée chez les souris $Hsf2^{-/-}$. Ces cibles sont en cours de confirmation.

En conclusion, nous avons démontré que la protéine HSF2 modulait la migration des neurones post-mitotiques du cortex en régulant les voies de signalisation CDK5/P35 et Reeline, régissant la dynamique des microtubules. De plus, HSF2 est exprimée dans les zones prolifératives du cortex tout au long du développement. Les cortex embryonnaires dont le gène *Hsf2* est inactivé montrent une réduction non quantifié dans cet article, des cellules de la glie radiaire et des progéniteurs neuraux. Ainsi, qu'en est-il du taux de prolifération de ces progéniteurs chez les souris $Hsf2^{-/-}$ ?

# Chapitre 2

# Analyse des embryons de poulet surexprimant le gène *Hsf2* murin

L'étude du rôle de HSF2 au cours du développement du poulet fut une alternative face aux problèmes que posaient les souris *knock-out* pour le gène *Hsf2*. Le modèle souris « perte de fonction »pour le gène *Hsf2* est très instructif pour l'étude de la mise en place des neurones migrants au cours de la corticogenèse. Mais les souris $Hsf2^{-/-}$ sont atteintes d'hypofertilité (Kallio *et al.*, 2002) ce qui rend donc difficile la disponibilité du matériel sur fond génétique C57Bl/6N. De plus, face aux différents phénotypes des souris $Hsf2^{-/-}$ rapportés dans le littérature (McMillan *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003), l'utilisation d'un autre modèle d'étude était intéressant et original pour tester le rôle supposé de HSF2 au cours du développement neural. Enfin, au cours de mon travail, nous avons remarqué une variabilité importante du phénotype des souris mutées pour le gène *Hsf2* sur le fond mixte C57Bl/6J x C57Bl/6N, que cela soit au niveau morphologique ou au niveau moléculaire (l'expression de *p35* étant affectée en fonction du fond génétique, pas *p39* pour lequel les effets de HSF2 sont assez robustes). Il s'est avéré que cette variabilité était due à une erreur de croisement entre souris à l'animalerie, passant d'un fond génétique C57Bl6N à un fond mixte C57Bl6J. Ce contretemps a profondément affecté mon travail d'étude, mais il a permis d'évaluer l'impact du fond génétique sur le phénotype comme nous l'aborderons dans la discussion. Une stratégie complémentaire reposait sur un « gain de fonction »de HSF2 par surexpression d'HSF2 murin dans le tube neural de l'embryon de poulet, c'est ce que j'ai mis en place en collaboration avec Pascale Gilardi (Ens, Paris).

## 2.1 Surexpression de HSF2 par électroporation *in ovo*

Le développement du tube neural est un système d'étude mieux décrit que ne l'est le cortex. J'ai développé le modèle de surexpression de HSF2 murin dans le tube neural

de l'embryon de poulet en collaboration avec Pascale Gilardi (Ens, Paris) par l'utilisation de la technique d'électroporation *in ovo*. Cette technique permet de surexprimer rapidement et efficacement une grande quantité du transgène de façon transitoire s'avère être bien moins contraignante que la transgenèse chez la souris. Le changement de modèle d'étude n'était *a priori* pas problématique car les protéines HSF2 de souris et de poulet présentent 80% d'identité (Pirkkala *et al.*, 2001). Par contre, comme l'électroporation est un choc et que nous étudions les facteurs de choc thermique, nous devions nous assurer que les effets de l'électroporation *in ovo* n'affectait pas l'activité des HSF endogènes de l'embryon de poulet, et qu'aucune réponse au choc thermique n'était déclenchée, pouvant biaiser les effets de la surexpression de HSF2. L'article présenté ici, démontre que la technique d'électroporation *in ovo* ne déclenche pas de réponse au choc thermique et peut être utilisée pour suivre les effets de la surexpression de HSF2 au cours du développement du tube neural de poulet. De plus, nous démontrons ici, que le HSF2 murin surexprimé est capable de moduler l'expression de certains gènes cibles des HSF, connus pour être impliqués dans les processus de développement et de différenciation. Cette étude est surtout un pré-requis validant le modèle pour de futures études du rôle de HSF2 au cours du développement neural.

### 2.1.1 Article 2, Trouillet *et la.*, manuscrit en révision à *Cell Stress and Chaperones*

**_In Ovo_ Electroporation : a useful method for gain-of-function analysis of the role of HSFs during development**

Diane Trouillet, Liliana Paslaru, Pascale Gilardi-Hebenstreit et Valérie Mezger

manuscrit en révision à *Cell Stress and Chaperones*

# *In Ovo* Electroporation: a useful method for gain-of-function analysis of the role of HSFs during development

Diane TROUILLET[1], Liliana PASLARU[2], Pascale GILARDI-HEBENSTREIT [3] and Valérie MEZGER[1*]

1. CNRS UMR8541, Laboratoire de Biologie Moléculaire du Stress, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, France

2. Carol Davila University of Medicine and Pharmacy Fundeni Hospital, Bucharest, Romania

3. INSERM U784, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, France

* corresponding author

**Keywords** : Heat Shock Factors
Heat Shock Proteins
Transcription
Chicken Neuronal Development
DNA transfer
*In ovo* electroporation

**Running title** : (60 characters)
HSF2 overexpression by *in ovo* electroporation in chick development.

**ABSTRACT**

HSFs, first discovered as crucial regulators of heat shock genes and of the heat shock response, have been more recently involved in development process as diverse as gametogenesis, preimplantation embryogenesis, placental, sensory placode and brain development. These major breakthroughs were obtained thanks to the production of loss-of-function systems by gene inactivation in mice. In particular, mouse HSF2 was shown to be involved in brain cortical development. However, the field still lacks gain-of-function overexpression of HSF during development.

As an alternative to the very demanding technology of overexpression in transgenic mice, we proposed a gain-of-function system by using HSF2 overexpression by *in ovo* electroporation into the chick neural tube. Our strategy relied on the extensive sequence conservation of cHSF2 and mHSF2 and of their expression during neural tube formation. We showed that this very convenient model could be successfully applied for mHSF2 overexpression. As a prerequisite, we demonstrated that this attractive system could be applied to HSFs. Indeed, if electroporation would, by itself, induce cHSFs or increase HSP levels, it could biaise the potential effects of HSF2 overexpression. First, we demonstrate that electroporation shock does not induces the HSR or disturb chicken HSFs activities or subcellular localization. Second, we demonstrate that mouse HSF2 can be successfully overexpressed in a DNA-binding form, without major alterations of chicken HSP ou HSF levels. The ability of HSE-binding mHSF2 to modulate the expression of endogenous chicken genes, whose mouse or human paralogs are HSF target genes known to be involved in differentiation or development process, further validates this gain-of-function system and paves the way for future studies on the effect of HSF overexpression in development.

## INTRODUCTION

Heat shock transcription factors, HSFs, were first discovered as crucial regulators of heat shock genes and of the heat shock response (HSR). The evolutionnary conserved HSR is characterized by the induction of heat shock genes which mostly encode molecular chaperones (for review see Pirkkala et al 2001; Åkerfelt et al 2007). Whereas yeast, nematode and fruit fly contain a unique HSF gene, four members are present in vertebrates. HSF1 and HSF2 are found in all vertebrate species, while HSF3 is specific for avian species and HSF4 for mammals (Rabindran et al 1991; Sarge et al 1991; Schuetz et al 1991; Nakai and Morimoto 1993; Nakai et al 1997; Råbergh et al 2000; Hilgarth et al 2004; Le Goff et al 2004). In mice, mHSF1 was shown to be the main stress-responsive heat shock factor, as it cannot be substituted by any other HSF in the stress-inducible *Hsp* gene expression or in acquired thermotolerance (McMillan et al 1998; Xiao et al 1999; Zhang et al 2002). In chicken cells, cHSF1 is rapidly activated at mild heat shock temperatures, while HSF3 is activated only by severe heat shock. However, cHSF3 is the major stress responsive factor in chicken cells, since it is essential for HSR, included HSR mediated by HSF1 at moderate temperatures (Nakai et al 1995; Kawazoe et al 1999).

Initial studies revealed that HSFs display expression and activity profile that are regulated during differentiation in *ex vivo* cultures cells (Mezger et al 1989; Theodorakis et al 1989; Sistonen et al 1992 et 1994). Moreover, HSFs are expressed in a stage- and tissue-specific manner during mouse and chick development, which was suggestive of developmental roles (Nakai et Morimoto 1993; Mezger et al 1994; Rallu et al 1997; Kawazoe et al 1999). Studies based on the analysis of spontaneous or engineered mutants in fly, mouse or human demonstrated that dHSF, mHSF1, mHSF2 and m and hHSF4 perform specific -and to some extent overlapping- roles in developmental processes as diverse as meiosis,

gametogenesis, preimplantation, placental, lens, olfactory and respiratory epithelium and brain cortical development (Jedlicka et al 1997; Xiao et al 1999; Christians et al 2000; Bu et al 2002; Kallio et al 2002; Wang et al 2003; Fujimoto et al 2004; Takaki et al 2006; Chang et al 2006).

In the chick embryo, all three cHSFs are ubiquitously expressed at high levels at very early stages. In particular, the localization of chicken HSF2 (cHSF2) in the nucleus of developing neuronal cells, as well as its high expression level in chick neuronal brain and eye tissues have supported the notion that HSF2 is involved in neuronal development (Kawazoe et al 1999). This expression profile is similar to that of murine HSF2. mHSF2 is highly expressed in the nuclei of the neuroepithelial cells and in neural progenitors of the ventricular zone (Rallu et al 1997; Kallio et al 2002; Chang et al 2006) at all stages of development. Knock-out studies demonstrated that mHSF2 is involved in brain development (Kallio et al 2002; Wang et al 2003) and affects the migration of young post-mitotic neurons in the neocortex (Chang et al 2006). Although major breakthroughs were obtained via gene inactivation in mice, the field still lacks gain-of-function overexpression of HSF during development. Such a system would also be invaluable in clarifying discrepancies about the role of HSF2 in brain development (Kallio et al 2002; McMillan et al 2002; Wang et al 2003). HSF2 is highly conserved during evolution and cHSF2 presents 80% of homology with mouse HSF2 (mHSF2) (Pirkkala et al 2001). The high degree of conservation between cHSF2 and mHSF2, combined with similar localization in the nucleus of developing neuronal cells are suggestive of a conserved function in mouse and chick neural tube development and the study of HSF2 in the development of chick neural tube might provide major insights in the developmental role of HSF2.

To investigate the role of HSF2 in the neural stem cells of the neural tube, the overexpression of mHSF2 in the neural tube by *in ovo* electroporation represents an attractive

complementary approach to the study of *Hsf2* knockout mice. Such overexpression, which in mice would require a heavy transgenic technology, is very easy in the chick neural tube.

Indeed, the chick embryo has been an excellent experimental model based on its easy accessibility in the egg and its rapid planar development, allowing facilitated manipulations. This study model has greatly contributed to the understanding of tissue interactions during development. For example, the establishment of the chick–quail chimera system, the tracing of fluorescently labelled cell lineages and, more recently, time-lapse analysis provided powerful techniques for the understanding of cell migration and lineage (Le Douarin, 1973; Fraser et al 1990). However, gene-targeting experiments had been difficult in this ovipar organism, because embryos remain inaccessible during the first 24hrs of embryogenesis.

Alternatively, gain-of function experiments were developped, thanks to the use of *in ovo* electroporation. This technique has rendered possible the transfer of genes *in vivo* and the transient and efficient overexpression of exogenous developmental genes in various part of the chick embryos (for review, see Funahashi et al 1999; Itasaki et al 1999; Nakamura et al 2000; Nakamura and Funahashi 2001). It consists in injecting a DNA vector and in subsequently applying an electric field, using electrodes, in order to target specific embryonic areas (neural tube, somites, limb mesenchyme, lens or surface ectoderm). Upon electric shock, cell surface is transiently permeabilized and DNA is transferred into cells in a polarised manner, into the tissue side which lays along the anode. Gene transfer by *in ovo* electroporation has been put into practice in numerous studies of nervous system development (Gould et al 1998; Giudicelli et al 2001; Garcia-Dominguez et al 2006) because the neural tube, the rudiment of the nervous system, is visible at early stages. At these early stages, usually Hamburger and Hamilton stage (HH) 10 of development (see supplemental data, Table 1), the neural folds have fused, creating a closed system with a lumen into which DNA

constructs can be easily injected *in ovo*. Moreover, the neural epithelium at these early stages consists in a single layer of cells, which are therefore all exposed to the DNA confined to the lumen (Figure 1). The negatively charged DNA constructs move in the electric field to the anode, so that only the anode side of the tissue is transfected. Therefore, the cathode side serves as the internal control in the same embryo. Electric charges used in this procedure do not injure the cells of the neural tube (Nakamura and Funahashi, 2001). Here, we describe a new application for *in ovo* electroporation in the study of the role of Heat Shock Factors during central nervous system development.

Our aim was to design a gain-of-function system by overexpressing HSF2 α and β isoforms (Fiorenza et al 1995; Goodson et al 1995) in the chick neural tube by *in ovo* electroporation. Although *in ovo* electroporation technique was not described as being detrimental for embryo chick development (Itasaki et al 1999; Nakamura et al 2000; Nakamura and Funahashi 2001), this technique is based on an electric shock. Therefore, in this paper, we first examined whether *in ovo* electroporation is susceptible to disturb endogenous HSF activities and to trigger the heat shock response. Indeed, if electroporation by itself could activate HSFs and trigger the HSR, the effects of HSF2 overexpression obtained by this technique would biaised. Second, we addressed whether the overexpression of HSF2 in the neural tube by *in ovo* electroporation modified cHSF activities or their subcellular localization. This point is of great importance in the conclusions that will be deduced for the HSF2 role in development monitored by this technique.

In this study, we prove that *in ovo* electroporation does not activate HSF1 or HSF3 or disturb their subcellular localization in the chick neural tube, nor triggers heat shock gene expression. *In ovo* electroporation does not desactivate cHSF2, but allows the overexpression of an active, HSE-binding mHSF2, demonstrating that *in ovo* electroporation can be used to generate HSF gain-of-function system in the chick embryo and more precisely to study the

role of HSFs by overexpression in the chick neuronal tube. Finally, we show that mHSF2 overexpression specifically modifies the expression of some target gene.

## MATERIELS AND METHODS

*Construction of HSF2 expression vector*

The strategy of these constructs were to inserted into expression vectors mHSF2α or mHSF2β cDNAs, followed by their 3'UTR region, to keep as close as possible of mHSF2 mRNA regulation of expression. They were inserted in a vector optimized for expression in the chick embryo, pAdRSV-Sp. pAdRSV-Sp expression vector contains a regulatory element composed of the Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter, enhanced by a human type 5 adenovirus inverted terminal repeat (Giudicelli et al 2001). A genomic *Bam*HI-*Sal*I DNA fragment of about 1.8 kb corresponding to the 3' end of the cDNA (end of exon 13) followed by the 3' UTR was inserted into plasmid plasmid Bluescript II pKS+. A *Not*I-*Kpn*I fragment of pKS+-*Bam*HI-*Sal*I was inserted into padRSV-Sp. The resulting plasmid was called padRVS-Sp-Bam-13-3'UTR. cDNA inserts for HSF2β (C9) or HSF2α cloned into the *Eco*RI site of pGEM1 were subcloned into phagemid pBK-CMV (Stratagene) and called pBK-CMV- HSF2α or pBK-CMV- HSF2β, respectively (Sarge et al 1991; Goodson et al. 1995). A 1.6 kb BamHI-BamHI fragment corresponding to the 5' end of HSF2 α or β cDNAs was excised from pBK-CMV- HSF2α or β and inserted into the BamH1 site of padRVS-Sp Bam-13-3'UTR in phase with the 3' end of exon 13. The resulting constructs, pAdRSV-Sp-HSF2α and β contain the whole ORF of the Hsf2α and β,.respectively, flanked by 3'UTR sequences.

*Chick embryo culture and heat shock, metabolic labelling and tissues preparation and extraction*

Commercial fertilized hens eggs were incubated in a humidified room at 38°C during 32 hrs or 48 hours. Embryos were recovered in ice-cold PBS solution (Invitrogen SARL, France) and tissues dissected. For EMSA and Western blot experiments, protein extraction

were performed as described in Mezger et al 1989 and Rallu et al 1997, centrifuged at 15,000g for 45 min at 4°C and stored at – 20°C. For immunohistochemistry, embryos were fixed in Bouin fixative or in 4% PFA in PBS, embedded in paraffin and cut into 7-µm sections. For protein metabolic labelling, isolated chick embryos were incubated in L15 medium (Invitrogen SARL, France) in the presence of [$^{35}$S]-methionin (200 µCi/mL ; Pro-Mix L-[35S] *in vitro* cell labelling Mix, GE Healthcare Life Science) for 1 hr at 37°C, and then rapidly washed in PBS and submitted to protein extraction as described above.

X-gal staining for β-Galactosidase activity was performed after 20 min. fixation in 4% PFA in PBS and stained in in 2mM $MgCl_2$, 4mM $K_3Fe(CN)_6$, 4mM $K_4Fe(CN)_6$, 0.8 mg/mL X-Gal (Invitrogen SARL, France) additionned with Nonidet P40 (0.01%). Embryos were observed under binocular Leica MZ6 and photographed by OM-4 Olympus argentic apparatus.

Embryonic stages were determined according to Hamburger and Hamilton (1951; reedition 1992) (Supplemental data, Table 1).

In ovo *Electroporation (Figure 1)*

After a 32 hour incubation (stage 10HH in our conditions), eggs were windowed to get access to the embryos. DNA, resuspended at a concentration of 1 µg/µL in 10 mM Tris (pH 8), was mixed with 0.025% Fast-Green dye (Sigma) in order to control DNA injection. Plasmid pAdRSV-Sp-HSF2 α or β was co-injected together with pEGFP-N1 (Clontech) (2:1) to assess the area of efficient electroporation. The DNA construct mix was microinjected into the neural tube groove using a stretched glass capillary. A drop of L15 medium (Invitrogen SARL, France) was deposited onto the embryo and electroporation was performed with Electro Square Porator ECM830 (BTX; Giuducelli et al 2001). The two electrodes were placed at each side of microinjected embryo, and four square pulses of 25-30 V, and 50 ms at

a frequency of 1 Hz was applied for each embryo (see Figure 1). After 24 hrs of post-electroporation incubation (unless otherwise indicated), embryos were collected and the efficiency and localization DNA entry was monitored by EGFP expression in the electroporated embryos by fluorescence microscopy. In Figure 1, pAdRSVLacZ (Giudicelli et al 2001) was used to illustrate the directional entry of DNA constructs into the neural tube.

*Western blotting*

Equal amounts of protein extract per well (20µg) were analysed by SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis. The following antibodies were used: rat monoclonal anti-mHSF2 (Neomarker; 1:1000), mouse polyclonal antibodies anti-HSP70-90 (gift of M. Catelli; 1:5000), rabbit polyclonal antibodies against cHSF1, cHSF2, cHSF3 (1:500; Nakai et al 1995), rabbit serum against cHSP90, cHSP70, (1:100; Katoh et al 2004). Secondary antibodies were: goat anti-rat IgG peroxydase conjugate (Sigma; 1:10000) and HRP coupled-goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Technology; 1:10000). Signal generated by chemiluminescent kit (Perbio), was analyzed by Chemismart (Vilbert-Luminar).

*Electrophoretic gel mobility shift assay (EMSA)*

20µg of protein extract were used in EMSA as described in Rallu et al (1997). For supershift experiment, extracts were incubated at 4°C with 2.3 µl (1:10 of final volume) of rabbit polyclonal antibodies against cHSF1, cHSF2, cHSF3 (dilution 1:5 in PBS/3% BSA) or of rat monoclonal antibody against mHSF2 (clone 3E2, NeoMarker ; dilution 1:10 or 1:40 in PBS/3% BSA) for 20 min, before the addition of [$\gamma$-$^{32}$P]–HSE labelled probe, as previously described (Kawazoe et al 1999; Kallio et al 2002). Electrophoresis were performed at 160V for 1hr30, gels were fixed in 10% acetic acid/10% ethanol and exposed to an X-Ray film (Kodak) or a IP screen for Fla-3000 PhosphoImager analysis (Fujifilm).

*Isolation of total RNA and quantitative RT-PCR*

Total RNAs from 9HH embryos were purified using RNA Aqueous Micro kit (Ambion) and quantified and checked for quality by RNA 6000 Nano Assay kit on RNA Nano Lab CHIP in Anayzer 2100 (Agilent). Reverse transcription was performed from 500 ng of total RNAs using Superscript-first strand (Invitrogen SARL, France), 5 mM DTT, 0.5 µg OligodT 12-18 (Invitrogen SARL, France), 0.5mM dNTPs. The resulting RT-PCR product was purified using Macherey-Nagel kit. Serial dilutions (1:1, 1:2, 1:5, 1:10) of cDNAs were subjected to real-time quantitative PCR on Light Cycler 480 (Roche Molecular Biochemicals), in the presence of 10 mM of each specific primer (for primer sequences, see Supplemental data) and QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen). Three genes with different expression levels (*Gapdh, L14* and *Cyclophilin B*) were used for result normalization (Dauphinot et al 2005). Quantitative analysis was performed using LightCycler 480 system basic software (Roche Molecular Biochemicals; see Supplemental data). Six independent sets of 5-7 embryos were analyzed. P value was determined by Student t-test.

*Immunochemistry*

Dry sections were treated with $NH_4Cl$ 50mM in PBS for 30 min at room temperature. Blocking was performed during 60 min at room temperature with 0.3% $H_2O_2$, 3% BSA, 0.5% Triton X in PBS. Incubation with primary antibodies against cHSF1, cHSF2or cHSF3 (Kawazoe et al. 1999; 1:100 dilution) or cHSP70, (1:100; Katoh et al 2004) was performed overnight at 4°C. Alexa 568-coupled goat secondary antibody against rabbit IgG was used at 1:400 dilution (Molecular Probes). Yoyo (Invitrogen SARL, France) was used for nuclear staining.

*Fluorescence picture acquisition*

Slide observation and pictures were taken on Leica DMRB microscope with a digital camera DC300F coupled to Leica FW4000 computer program. Confocal pictures of fixed cells were acquired under 10x objective lenses on a Leica (Nussloch, Germany) DM-IRB inverted microscope with a CCD camera (Micromax; Princeton Instruments, Trenton, NJ). Acquisition was done with Leica Control Software (LCS) in black and white in 6-bit mode using appropriate fluorescence emission/excitation filters. For illustration, pictures were pseudocolored with ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/) or Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

## RESULTS

### *Endogeneous cHSF activities, levels and localization during normal early chick development*

The expression of all three cHSFs is detected as early as 8HH and increases during embryo development whereas, in comparison, Hsp70 and Hsp90 levels are constant (Kawazoe et al 1999). We therefore examined the DNA-binding activity of endogenous cHSFs at early stages by gel-shift assays. For easy comparison with the following electroporation experiments, we chosed to name embryos from stage 9HH, followed by the indicated time of further incubation (which, in electroporation experiments, states for the duration of development allowed after electroporation). In non-electroporated embryos, a low HSE-binding activity was detected at stage 9HH + 30 minutes, with a progressive increase between 9HH+ 30 min and 9HH + 24 hrs (Fig. 2A). This activity further increased at stage 12HH and remained stable until stage 18HH (data not shown). Using antibodies specific for cHSF1, cHSF2 or cHSF3 in supershift experiments, we determined that HSF2 is the major factor responsible for this constitutive HSE-binding activity at these stages (Fig.2A; see also Fig.3A). No contribution of cHSF1 could be observed at 9HH+30, although a slight but reproducible contribution for cHSF1 was observed as soon as 9HH + 6 hrs and in 9HH+24 hrs (Fig.2A). cHSF3 did not contribute to HSE-binding activites in non-electroporated embryos at any stage, although it was clearly induced by a 1hr heat shock at 44°C (Fig.2A, Kawazoe et al 1999). The main contribution of cHSF2 to HSE-binding activity in 9HH embryos was found in good agreement with its nuclear localization. Confocal analysis of cHSF subcellular localization of HSFs at stage 9HH revealed that both cHSF1 and cHSF3 displayed cytoplasmic localization, with concomitant nuclear localization for cHSF3 in some cells (Fig.2B and supplemental data) as was already observed by Kawazoe et al (1999). So did HSP70 as expected in non-stress conditions. In agreement to what was previously reported by

Kawazoe et al (1999) and in line with its HSE-binding activity at this stage, cHSF2 was present in the nucleus. Slight discrepancies were observed for the subcellular localization of cHSF1 compared with Kawazoe et al (1999): in this paper, cHSF2 was found exclusively nuclear and cHSF1 and cHSF3 were detected as both cytoplasmic and nuclear, while cHSF1 was exclusively cytoplasmic in the neural tube in our experiments. This could be due to differences in the technical approaches, since confocal analysis was used in our study, or to differences in egg incubation conditions or, alternatively in hens strains. Nevertheless, what emerges from both studies is that cHSF2 is the major factor to be present in a nuclear and DNA-binding form in the neural tube cells of early chick embryo stages.

Therefore, cHSF2 is present in a DNA-binding active form in line with its presence in the nucleus of stage 9HH neuroepithelium cells. It remains the major cHSF for HSE-binding activity between 9HH+6hrs and 9HH+24 hrs, time at which gene overexpression will be typically observed after electroporation in the following experiments. This means that cHSF2 is susceptible to perform developmental roles at this stage and that its partners in such processes are expected be also present and active. In addition, cHSF2 is present at low levels (Figure 2A), so that disturbing the system by the overexpression of mHSF2 might be biologically significant and have informative effects.

***Electroporation does not induce HSF DNA-binding activity or subcellular localization***

In this part, we examined the effect of the sole electric shock delivered by electroporation. In order to determine whether the electric shock delivered by electroporation was susceptible to modify cHSF endogenous DNA-binding activities, we analysed HSE-binding activity by EMSA at various times in the 24hrs following the electroporation of 9HH embryos without injecting DNA. This duration was chosen since, in typical experiments, the transient expression of the DNA construct of interest in chicken embryos starts to be detected

around 6 hours after electroporation and is generally maximal 24 hours after electroporation (Itasaki et al 1999; our data not shown).

*Electroporation does not inactivate cHSF2 nor activate cHSF1 or cHSF3 in embryos 6 to 24 hrs after electroporation*

In electroporated embryos, cHSF-HSE complexes were of comparable intensity than in non-electroporated embryos and equally and almost totally supershifted by the addition of antibodies against cHSF2 (Figure 3A, see also Fig. 2A). This suggested that cHSF2 remained the major factor responsible for HSE-binding in electroporated embryos and was not inactivated by electroporation. In constrast, a 45 min. heat shock at 44°C decreased cHSF2 activity in 9HH +30 min. embryos and almost abolished HSF2 activity at + 6 and + 24 hours (Fig. 3A).

Conversely, such a heat shock clearly induced cHSF1 and cHSF3 DNA-binding activities at these stages (Fig. 3A). In contrast to heat shock, electroporation did not induced cHSF3 activity at any stage (Fig. 3A). Embryos 9HH + 30 min. after electroporation did not display any cHSF1 activity (Fig. 3A). In contrast, a faint but reproducible supershift of the complex was observed 2hrs and 4 hrs after electroporation upon addition of anti-cHSF1 antibodies, implying that cHSF1 slightly contributed to the HSF-HSE complex at these stages (Fig. 3A; compare with Fig. 2A). However, the supershift induced by cHSF1 antibodies observed in extracts of embryos from + 6 to + 24 hrs after electroporation was not greater than in their control counterparts at the same stage, indicating than no cHSF1 induction could be detected from + 6 to + 24 hrs after electroporation (Fig.3A). Rather, this cHSF1 activity likely represented the constitutive contribution of cHSF1 to the cHSF activity of the non-electroporated embryos already observed at 9HH + 6 to 9HH + 24 hrs (Figure 2A).

Together, these results suggest that cHSF2 remains the major active factor at any time after electroporation and that a slight and very transient cHSF1 DNA-binding activity, but none of HSF3 is observed at 2 hrs and 4 hrs after electroporation. However, neither cHSF1 nor cHSF3 induction could be observed from 6 to 24 hours after electroporation, times at which the effects of electroporated vectors overexpression were investigated.

To confirm that, indeed, no major changes in the cHSF status were induced by electroporation, cHSF subcellular localization was analyzed before and after electroporation by confocal microscopy. cHSF1 and cHSF3 appeared to be cytoplasmic in the side of the neural tube that is only submitted to electric shock and receive no DNA (Fig. 3B). Therefore, we demonstrated that the electric shock applied during *in ovo* electroporation did not alter endogeneous cHSF2 activity or subcellular localization. Neither did it induce cHSF1 or cHSF3 activity in the temporal window in which expression of exogenous electroporated genes are typically observed after electroporation.

Therefore, the use of electroporation to study the effect of mHSF2 overexpression on early chicken development is technically valuable for three main reasons. First, we show that, in 9HH embryos, cHSF2 expression is very low and that this stage is therefore suitable for studying the effects of mHSF2 overexpression on early chicken development. Second, we demonstrate that electroporation does not alter cHSF global localization or endogenous cHSF2 HSE-activity. Neither does it induce cHSF1 or cHSF3 activities in the time window in which expression from DNA contruct vectors are usually observed.

*No heat shock response after in ovo electroporation*

Since a very slight but reproducible cHSF1 activity was observed in electroporated embryos 2 and 4 hrs after electroporation, we verified whether HSP induction could be

detected. The up-regulation of heat shock protein by electroporation could disturb cHSF normal regulation (Ali et al 1998; Morimoto 1998; Zou et al 1998; Bharadwaj et al 1999) or could even alter development (Lele et al 1999; Voss et al 2000). The latter is unlikely since no obvious disturbance of development was observed in numerous electroporation studies (Nakamura and Funahashi 2001). However, to verify whether the electric shock delivered by *in ovo* electroporation elicited HSR, HSP expression was examined by metabolic labelling of proteins with [$^{35}$S]-methionin at indicated times after electroporation. However, when compared to control embryos, electroporated embryos did not induce HSP synthesis at any time after electroporation. In contrast, HSP70 synthesis was increased in embryos that have been submitted to a 1hr heat shock at 44°C and allowed to recover 3 hrs (Supplemental data Fig.1A). These results were confirmed in Western blot experiments, where no increase in HSP70 and HSP90 or HSP27 levels is detected after electroporation (Supplemental data Fig.1B). They are in line with our observation that cHSF3 was not induced by electroporation at any time in our experiments (Figure 3A).

Consequently, *in ovo* electroporation does not induce a classical HSR. Neither the development of the chick embryo, nor cHSF levels or activities are likely to be affected by disturbances in HSP levels after electroporation, indicating that this technique can be used for HSF gain of function analysis.

***Experimental design for* HSF2 *overexpression***

The amount of genomic and functional data already available for mHSF2, as well differences in apparent molecular sizes between mHSF2 and cHSF2, allowing easy detection of exogenous mHSF2, led us to overexpress mHSF2 rather than cHSF2 in the chick neural tube. We overexpressed both mHSF2 isoforms (Fiorenza et al 1995; Goodson et al 1995). HSF2α possesses an additional 18 amino acid sequence (exon 11) compared with smaller

HSF2β isoform. HSF2β is predominantly expressed during brain development where it exhibits constitutive HSF2 DNA-binding activity (Rallu et al 1997) in contrast to adult brain and other tissues (Fiorenza et al 1995; Goodson et al 1995). To assess electroporation efficiency, pAdRSV-Sp-HSF2α or β were co-injected with pEGFP-N1 encoding green fluorescent protein with a 2:1 ratio (Fig. 3B, upper panel). Only the results obtained with HSF2β overexpression are illustrated in this paper, but similar results were obtained for HSF2α.

A strong overexpression of mHSF2β protein, which displayed an apparent molecular weight distinct from the endogene protein cHSF2 (Nakai et Morimoto 1993), was evidenced by Western blotting in embryos electroporated with pAdRSV-Sp-HSF2β and not pEGFP-N1 alone (Fig. 4A left panel). Strong overexpression of mHSF2 was also observed in older 18HH chicken embryos, although less efficiently (Fig. 4A right panel). mHSF2 overexpression was accompanied by an increase in HSE-binding activity in embryos which have been electroporated with pAdRSV-Sp-HSF2β plus pEGFP-N1 but not in embryos electroporated with pEGFP-N1 alone (Fig. 4B, left panel). The increased HSE-HSF complex detected after pAdRSV-Sp-HSF2β electroporation were totally supershifted by anti-mHSF2 antibodies but not by anti-cHSF1 or anti-cHSF3, indicated that mHSF2 majorly contributed to this increase (Fig. 4B, right panel). The HSF-HSE complex was also supershifted with anti-cHSF2 which is suggestive of crossreactivity on native mHSF2 or of hetero-mHSF2/cHSF2 complexes in EMSA. Immunohistochemistry (IHC) experiments confirmed that mHSF2 was overexpressed in the anode side of the electroporated neural tube and revealed that cells or group of cells that overexpress HSF2 were also GFP positive (Fig. 4C).

Since HSF2 and HSF1 are known to physically and functionally interact during the heat shock response, overexpression of mHSF2 could have modified other HSF levels or

subcellular localization (Alastalo et al 2003; He et al 2003; Östling et al 2007). Individual embryos were electroporated with pAdRSV-Sp-HSF2β display no major cellular localization modifications for cHSF1, cHSF2, cHSF3 or cHSP70 (Fig. 3B, right panel and Figure 4D). In addition, no increase in cHSF1 or HSF3 could be detected among GFP positive side. Note that cHSF2 recognized only poorly mHSF2 in IHC, which explains that no strong overexpression of mHSF2 could be detected in Figures 3B and 4D. In addition, no modifications in HSF protein levels could be observed by Western blotting (Supplemental Fig.2).

In conclusion, mHSF2 protein was ectopically overexpressed in a DNA-binding active form, paving the way of future studies on the effect of active mHSF2 overexpression on the development of the chick neural tube. Moreover, the overexpression of mHSF2 into the chick neural tube does not induce major modifications of HSP70 and HSP90 levels which could have altered HSF activities (Fig. 4A and Supplemental data Fig.2). Nor does it induce major disturbance in cHSF1 or cHSF3 expression and cellular localization. Likely, the expected effects of HSF2 on neural tube development, if any, will not be mediated by major changes in HSF1 or HSF3 activity, levels or subcellular localization or by changes in HSP levels.

***Effects of* HSF2 *overexpression in chick neuroepithelium on known target genes***

In order to further validate this HSF2 gain-of-function system, we examined by real-time RT-PCR analysis the impact of mHSF2 overexpression on some HSF known target genes implicated in development or during differentiation: *Hsp70*, *Fgf7*, *Lif* and *p35* (Leppä et al 1997; Fujimoto et al 2004; Chang et al 2006; Takaki et al 2006). The *S17* ribosomal gene was used as a control. For each gene, the ratio between mock conditions *versus* electroporated conditions was analyzed in 6 independent electroporation experiments, each involving 5 to 7 embryos. As expected, *S17* gene expression was not significantly altered by the overexpression of HSF2α or β. *Lif* mRNA levels were decreased by about 3.4 fold with a

rather good statistical significance by the overexpression of HSF2α, but interestingly not by HSF2β, indicating that HSF2α specifically lowered *Lif* gene expression. In contrast, *Fgf7* and *p35* gene expression ratio did not seem to be significantly modified by HSF2 isoforms. *Hsp70* expression was 2-fold increased by by HSF2 ovexpression with a better statistical significance for HSF2α compared with HSF2β. This is in line with the previously efficient HSP70 gene activation by HSF2α in K562 cells (Leppä et al 1997). In contrast, *Hsp90* mRNA levels was specifically decreased by the overexpression of HSF2β, but not HSF2α.

Therefore, it seems that known HSF target gene expression, involved in development or differentiation, can be specifically regulated by at least one isoform of HSF2 in the chick neural tube. This gain of function system could therefore be applied in future studies about the role of HSFs during development. Furthermore, differential effects of HSF2α and β isoforms on specific targets genes could reveal subtle modes of target gene regulation by HSFs.

## DISCUSSION

HSF2 is the sole HSF displaying HSE-binding activity and nuclear subcellular localization in the developping mouse CNS and it was demonstrated to be involved in mouse brain development (Nakai et Morimoto 1993; Rallu et al 1997; Kallio et al 2002; Wang et al 2003; Chang et al 2006). Murine HSF2 influences radial neuronal migration in the neocortex, but its high activity in neuroepithelial cells and in neural progenitors of the VZ/SVZ is also suggestive of a role in the proliferation and maintenance of these progenitor cells. Until now, the demonstration of HSF2 involvement in brain development has been mainly based on gene inactivation studies in mice (Kallio et al 2002; Wang et al 2003; Chang et al 2006). However, gain-of-function approaches, in particular in the neural progenitor cells, would bring invaluable complementary informations. Such approaches, which are technically very demanding in mice, are very easy in the chick embryo, thanks to *in ovo* electroporation techniques. cHSF2 and mHSF2 display strong protein homology as well as similar patterns of expression and nuclear localization in the developing neural tube (Kawazoe et al. 1999), suggesting that the chick embryo could be useful for unravelling the role of HSF2 in the neural tube at early stages.

Based on these common characteristics shared by mouse and chicken models, we developped a HSF2 gain-of-function strategy by overexpressing HSF2 in the chick neural tube by *in ovo* electroporation. We chose early 9HH stage chick embryos for the following reasons. First, the chick neural tube is technically accessible for DNA injection and electroporation at this stage, due to the presence of the neural groove which confines the injected DNA to the lumen of the tube. Second, cHSF2 is present at very low levels, but in an active HSE-binding state and is present in the nucleus. This suggests that cHSF2 functions as a transcription factor at these early stages, that its partners for the expression of some given

target genes must be already present and that a dose-effect by HSF2 overexpression is likely to be expected.

However, *in ovo* electroporation consists in an electric shock, and might lead to morphological defects or/and molecular disruption. High voltages are currently used for introducing DNA into cultured bacterial or eukaryotic cells by electroporation. They provoke massive cell death, which, in contrast to cultured cells, is not acceptable for embryos, in which tissue architecture and cell viability must be preserved. Historically, adequate conditions were to be found to combine cellular viability and transfection efficiency. A modified type of electroporation, using a low fixed and controlled voltage ans square pulses, made it possible to enhance cell viability and enabled its application to tissues and living embryos. Although in some cases, vascular system can be disturbed in electroporated embryos (Nakamura and Funahashi 2001), in general, numerous studies agree with the fact that *in ovo* electroporation is an efficient technique for time-course gene overexpression (Itasaki et al 1999) and was very useful in the study of gene potentially involved in neural tube development (Giudicelli et al 2001; Garcia-Dominguez et al 2006). However, in our case, we deal with transcription factors reputed to be stress-responsive. The use of *in ovo* electroporation for the overexpression of HSF2 was therefore conditioned by the fact that electroporation by itself would not alter HSF activities in the chick neural tube.

In terms of heat shock, the classical treatment which is known to induce HSFs, data available on the teratogenic effect of hyperthermia on early chick and rodent embryons point out the extreme vulnerability of neural development to heat and related stress, neural tube defects being prominent (Edwards et al 1997; Walsh et al 1997). Therefore, chick neural tube might have been peculiarly sensitive to *in ovo* electroporation, not in a developmental point of

view, but in a HSF activation aspect. *In ovo* electroporation is susceptible to provoke both thermal effects as well as short exposure to electromagnetic field. Early studies suggested that microwaves (MWs) altered protein conformation and induced HSPs (de Pomerai et al 2003; Mancinelli et al 2004; Leszczynski et al 2002; Nylund and Leszczynski 2004) as well as exposure to extremely low frequency high magnetic fields (Lin et al 1997; Goodman and Blank 1998; Pinpkin et al 1999; Miyakawa et al 2001) However, more recent studies which distinguish between thermal and non-thermal aspects of microwaves, did not observed any effect on HSF-driven gene expression HSP70 (Zhabodov et al 2007; Szabo et al 2003; Sanchez et al 2007 a and b). Few data are available on the effect of electric fields. Recently, the electric field generated by the spiking activity if small intestine myoelectrical migrating complex was shown to induce HSP70 (Laubitz et al 2006).

In this paper, we demonstrate that the electric shock delivered by *in ovo* electroporation does not alter cHSF1, cHSF2 and cHSF3 DNA-binding activity or subcellular localization. No induction of the HSR could be detected by ($^{35}$S)-methionin metabolic labelling of proteins or by Western blot. In addition, the subcellular localization of HSP70, which is known to be shifted to the nucleus upon heat shock, is not modified by *in ovo* electroporation. Both HSP70 and HSP90 are able to regulate HSF activities negatively (Morimoto 1998 and references therein; Ali et al 1998; Zou et al 1998; Bharadwaj et al 1999) and upregulation of these proteins by *in ovo* electroporation might have interfered with overexpressed cHSF2. In addition, members of these families are also involved into developmental processes (reviewed in Eddy 1998; Voss et al 2000; Evans et al 2005). Although the negligeable impact of *in ovo* electroporation on chick embryo development suggested that no important biais were expected from these proteins on chick embryo

development, it was important to confirm that HSP might not modify HSF activity upon *in ovo* electroporation.

Having demonstrated that *in ovo* electroporation can be used for the study of HSF in the chick neural tube, we showed that mHSF2 can be expressed in a HSE-binding active form in the neuroepithelium cells of 9HH chick embryos. Mouse HSF2 overexpression does not notably modify cHSF1 or cHSF3 activity or subcellular localization, which are moreover expressed at very low levels at these stages. Nevertheless, since HSF2 and HSF1 were shown to physically and functionnaly interact (He et al 2003; Östling et al 2007), these data is of importance for interpreting the effects of HSF2 overexpression on the chick neural tube in future studies.

Moreover, we show that the overexpression of mHSF2 in the chick neural tube leads to the modulation of the amount of mRNAs expressed from known target genes, some of which are involved in differentiation or developmental situations, in human or mice: *Hsp70*, *Hsp90* and *Lif*. Human *hsp70.1* is HSF1 and HSF2 target gene upon hemin treatment of human erythroleukemia K562 cells (Östling et al 2007). Human *Hsp90β* was shown to be bound by HSF2 upon hemin treatment (Tricklein et al 2004) and HSP90 is increased during mouse lens development in the absence of HSF4 (Fujimoto et al 2004). The Hsp90 family member, *Hsp82*, was shown to be bound exclusively by HSF4 and not HSF1 or HSF2 in rat postnatal lens (Somasundaram and Bhat 2004). *Lif* is a direct target gene of HSF1 for the maintenance of olfactory epithelium and HSF4 displays opposing effects on LIF expression (Takaki et al 2006). Here we show that *Lif* mRNA levels are downregulated in the chick neural tube by the overexpression of HSF2α but not β, whereas *Hsp90* mRNAs are specifically upregulated in the presence of HSF2β, but not α. These results suggest potentially interesting and subtle regulations in terms of target specificity and transcriptional modulation

by HSF2 isoforms during development, which is in line with previous studies (Goodson et al 1995; Leppä et al 1997; Ösling et al 2006). *Fgf-7* is another target gene regulated by HSF4 and the increase in *Fgf-7* mRNA levels is associated with premature differentiation of HSF4-null lens epithelial cells (Fujimoto et al 2004). In contrast with *Lif*, *Fgf-7* mRNA levels are not clearly regulated by mHSF2 in the chick neural tube. Neurospecific p35 is an activator of kinase Cdk5 essential for the correct positioning of postmitotic cortical neuron in mice and is a direct target gene for HSF2 from stage E15.5 (Chang et al 2006). Interestingly, *p35* gene expression is not affected during mHSF2 overexpression in the chick neural tube, as seen by real-time RT-PCR experiments and by *in situ* hybridization on *in toto* chick embryos (data not shown). This was expected and could be explained by two reasons. First, mouse p35 is not expressed in the neural proliferative zone, although this zone contains high levels of HSF2 active for DNA-Binding. It is expressed in the postmitotic migrating neurons only. This suggests that some HSF2 partners, necessary for *p35* gene expression, are missing in the proliferative cells of the mouse neuroepithelium, a. Our RT-PCR result suggest that they are also be missing in the chick proliferating cells as well, in which mHSF2 overexpression is targeted in our experimental design. In addition, the Cdk5/p35 pathway could participate in a mechanism that allows migrating cells to bypass the oldest neurons, in an inside-out mechanism, which permits mammal-specific cortical architecture, which is not found in chick brain (Aboitiz et al 2002).

In conclusion, mHSF2 overexpression in the chick neural tube by *in ovo* electroporation is a valid gain-of-function system, which potentially will give new insights on the role of HSF2 in neural development in future studies.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We are indebted and grateful to Akirai Nakai for providing us antibodies against cHSFs and cHSPs. We also thank Maria Catelli for the gift of anti-HSP70-antiHSP90 antibody. We thank Michel Morange, Sophie Malinsky, Marion Wassef Anne Le Mouël and Laurence Denis for helpful discussions. This work was supported by grants from Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC#3609 and #3997) and ANR 2006 "Neurosciences, Neurologie et Psychiatrie ». D.T. was supported by the French Ministry of Research and Technology and by ARC.

## REFERENCES

Aboitiz F, Montiel J, Lopez J. 2002 An hypothesis on the early evolution of the development of the isocortex. *Brain Res Bull* 57:481-483.

Alastalo T-P, Hellesuo M, Sandqvist A, Hietakangas V, Kallio M, Sistonen L. 2003. Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of Hsp70. *J Cell Sci* 116: 3557-3570.

Ali A, Bharadwaj S, O'Carroll R, Ovsenek N. 1998. HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* 18: 4949–4960.

Åkerfelt M, Trouillet D, Mezger V, Sistonen L. 2007 Heat Shock Factors at a Crossroad between Stress and Development. Ann N Y Acad Sci. *In press.*

Bharadwaj S, Ali A, Ovsenek N. 1999. Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 *in vivo. Mol Cell Biol* 19: 8033–8041.

Bu L, Jin Y, Shi Y et al. 2002. Mutant DNA-binding domain of HSF4 is associated with autosomal dominant lamellar and Marner cataract. *Nat Genet* 31: 276-278.

Chang Y, Östling P, Åkerfelt M et al. 2006. Role of Heat shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression. *Genes and Dev* 20: 836-847.

Christians E, Davis AA, Thomas SD, Benjamin IJ. 2000. Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature* 407:693-694.

de Pomerai DI, Smith B, Dawe A et al. 2003. Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. *FEBS Lett* 543:93-97.

Eddy EM. 1998. HSP70–2 heat-shock protein of mouse spermatogenic cells. *J Exp Zool* 282: 261–271.

Edwards MJ, Walsh DA, Li Z. 1997. Hyperthermia, teratogenesis and the heat shock response in mammalian embryos in culture. *Int J Dev Biol* 41:345-358.

Evans TG, Yamamoto Y, Jeffery WR, Krone PH. 2005. Zebrafish Hsp70 is required for embryonic lens formation. *Cell Stress Chaperones* 10:66-78.

Fiorenza MT, Farkas T, Dissing M, Kolding D, Zimarino V. 1995. Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucleic Acids Res* 23:467-474.

Fraser S, Keynes R, Lumsden A. 1990. Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* 344 : 431–435.

Fujimoto M, Izu H, Seki K et al. 2004. HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. *EMBO J* 23: 4297-4306.

Funahashi J, Okafuji T, Ohuchi H, Noji S, Tanaka H, Nakamura H. 1999. Role of Pax-5 in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity. *Dev Growth Differ* 41:59-72.

Garcia-Dominguez M, Gilardi-Hebenstreit P, Charnay P. 2006. PIASxbeta acts as an activator of Hoxb1 and is antagonized by Krox20 during hindbrain segmentation. *EMBO J* 25:2432-2442.

Giudicelli F, Taillebourg E, Charnay P, Gilardi-Hebenstreit P. 2001. Krox-20 patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. *Genes Dev* 15: 567-580.

Goodman R, Blank M. 1998. Magnetic field stress induces expression of hsp70. *Cell Stress Chaperones* 3:79-88.

Goodson ML, Park-Sarge OK, Sarge KD. 1995. Tissue-dependent expression of heat shock factor 2 isoforms with distinct transcriptional activities. *Mol Cell Biol* 15:5288-5293.

Gould A, Itasaki N, Krumlauf R. 1998. Initiation of rhombomeric *Hoxb4* expression requires induction by somites and a retinoid pathway. *Neuron* 21: 39–51.

Hamburger V, Hamilton HL. 1992 (New edition). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn*195:231-272.

He H, Soncin F, Grammatikakis N, Li Y, Siganou A, Gong J, Brown SA, Kingston RE, Calderwood SK. 2003. Elevated expression of heat shock factor (HSF) 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. *J Biol Chem* 278: 35465-35475.

Hilgarth RS, Murphy LA, O'Connor CM, Clark JA, Park-Sarge O-K, Sarge KD. 2004. Identification of Xenopus heat shock transcription factor-2: conserved role of sumoylation in regulating deoxyribonucleic acid-binding activity of heat shock transcription factor-2 proteins. *Cell Stress Chaperones* 9: 214-220. Erratum in: (2004) *Cell Stress Chaperones* 9: 397.

Itasaki N, Bel-Vialar S, Krumlauf R. 1999. 'Shocking' developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. *Nat Cell Biol* 1:E203-7.

Jedlicka P, Mortin MA, Wu C. 1997. Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J* 16: 2452-2462.

Kallio M, Chang Y, Manuel M et al. 2002. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J* 21: 2591-2601.

Katoh Y, Fujimoto M, Nakamura K, Inouye S, Sugahara K, Izu H, Nakai A. 2004. Hsp25, a member of the Hsp30 family, promotes inclusion formation in response to stress. *FEBS Lett* 565: 28-32.

Kawazoe Y, Tanabe M, Sasai N, Nagata K, Nakai A. 1999. HSF3 is a major heat shock responsive factor during chicken embryonic development. *Eur J Biochem* 265: 688-697.

Laubitz D, Jankowska A, Sikora A, Wolinski J, Zabielski R, Grzesiuk E. 2006.Gut myoelectrical activity induces heat shock response in Escherichia coli and Caco-2 cells. *Exp Physiol* 91:867-875.

Le Douarin N. 1973. A biological cell labeling technique and its used in experimental embryology. *Dev Biol* 30: 217–222.

Le Goff P, Le Drean Y, Le Peron C, Le Jossic-Corcos C, Ainouche A, Michel D. 2004. Intracellular trafficking of heat shock factor 2. *Exp Cell Res* 294: 480-493.

Lele Z, Hartson SD, Martin CC, Whitesell L, Matts RL, Krone PH. 1999. Disruption of zebrafish somite development by pharmacologic inhibition of Hsp90. *Dev Biol* 210:56-70.

Leppä S, Pirkkala L, Saarento H, Sarge KD, Sistonen L. 1997. Overexpression of HSF2-beta inhibits hemin-induced heat shock gene expression and erythroid differentiation in K562 cells. *J Biol Chem* **272**:15293-15298.

Leszczynski D, Joenvaara S, Reivinen J, Kuokka R. 2002. Non-thermal activation of the

hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* 70:120-129.

Lin H, Han L, Blank M, Head M, Goodman R. 1998. Magnetic field activation of protein-DNA binding. *J Cell Biochem* 70:297-303.

Mancinelli F, Caraglia M, Abbruzzese A, d'Ambrosio G, Massa R, Bismuto E. 2004. Non-thermal effects of electromagnetic fields at mobile phone frequency on the refolding of an intracellular protein: Myoglobin. *J Cell Biochem.* 93:188–196.

McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin IJ. 1998. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* 273: 7523-7528.

McMillan DR, Christians E, Forster M et al. 2002. Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. *Mol Cell Biol* 22: 8005-8014.

Mezger V, Bensaude O, Morange M. 1989. Unusual levels of heat shock element-binding activity in embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 9:3888-3896.

Mezger V, Rallu M, Morimoto RI, Morange M, Renard JP. 1994. Heat shock factor 2-like activity in mouse blastocysts. *Dev Biol.* 166: 819-822.

Miyakawa T, Yamada S, Harada S, Ishimori T, Yamamoto H, Hosono R. 2001. Exposure of Caenorhabditis elegans to extremely low frequency high magnetic fields induces stress responses. *Bioelectromagnetics.* 22:333-339.

Morimoto RI. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12: 3788–3796.

Nakai A, Morimoto RI. 1993. Characterization of a novel chicken Heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol Cell Biol* 13: 1983-1997.

Nakai A, Kawazoe Y, Tanabe M, Nagata K, Morimoto RI. 1995. The DNA-binding properties of two heat shock factors, HSF1 and HSF3, are induced in the avian erythroblast cell line HD6. *Mol Cell Biol* 15:5268-5278.

Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI, Nagata K. 1997. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 17: 469-481.

Nakamura H, Watanabe Y, Funahashi J. 2000. Misexpression of genes in brain vesicles by in ovo electroporation. *Develop Growth Differ* 42: 199–201.

Nakamura H, Funahashi J. 2001. Introduction of DNA into chick embryos by in ovo electroporation. *Methods* 24:43-48.

Nylund R, Leszczynski D. 2004. Proteomics analysis of human endothelial cell line EA.hy926 after exposure to GSM 900 radiation. *Proteomics* 4:1359–1365.

Östling P. 2006. Characterization of heat shock factor 2 as a transcriptional regulator. Academic dissertation, Åbo Akademi University, Turku, Finland.

Östling P, Bjork JK, Roos-Mattjus P, Mezger V, Sistonen L. 2007. Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. J Biol Chem. 282:7077-7086.

Pipkin JL, Hinson WG, Young JF, Rowland KL, Shaddock JG, Tolleson WH, Duffy PH, Casciano DA. 1999. Induction of stress proteins by electromagnetic fields in cultured HL-60 cells. *Bioelectromagnetics* 20:347-357.

Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15: 1118-1131.

Råbergh CM, Airaksinen S, Soitamo A, Björklund HV, Johansson T, Nikinmaa M, Sistonen L. 2000. Tissue-specific expression of zebrafish (Danio rerio) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J Exp Biol* 203: 1817-1824.

Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C. 1991. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor HSF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6906-6910.

Rallu M, Loones, M, Lallemand Y, Morimoto R, Morange M, Mezger V. 1997. Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2392-2397.

Sanchez S, Haro E, Ruffie G, Veyret B, Lagroye I. 2007a. In vitro study of the stress response of human skin cells to GSM-1800 mobile phone signals compared to UVB radiation and heat shock. *Radiat Res* 167:572-580.

Sanchez S, Masuda H, Ruffie G et al. 2007b. Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. III: Expression of heat shock proteins. Int J Radiat Biol. Sep 8;:1-8 [Epub ahead of print]

Sarge KD, Zimarino V, Holm K, Wu C, Morimoto RI. 1991. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes Dev* 5: 1902-1911.

Schuetz TJ, Gallo GJ, Sheldon L, Tempst P, Kingston RE. (1991) Isolation of a cDNA for HSF2: evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6911-6915.

Sistonen L, Sarge KD, Phillips B, Abravaya K, Morimoto RI. 1992. Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells *Mol Cell Biol* 12: 4104-4111.

Sistonen L, Sarge KD, Morimoto RI. 1994. Human Heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergically induce Hsp70 gene transcription. *Mol Cell Biol* 14: 2087-2099.

Somasundaram T, Bhat SP. 2004. Developmentally dictated expression of heat shock factors: exclusive expression of HSF4 in the postnatal lens and its specific interaction with alphaB-crystallin heat shock promoter. *J Biol Chem.* 279: 44497-44503.

Szabo I, Manning MR, Radzievsky AA, Wetzel MA, Rogers TJ, Ziskin MC. 2003. Low power millimeter wave irradiation exerts no harmful effect on human keratinocytes in vitro *Bioelectromagnetics* 24:165–173.

Takaki E, Fujimoto M, Sugahara K et al. 2006. Maintenance of olfactory neurogenesis requires HSF1, a major heat shock transcription factor in mice. *J Biol Chem.* 281:4931-4937.

Theodorakis NG, Zand DJ, Kotzbauer PT, Williams GT, Morimoto RI. 1989. Hemin-induced transcriptional activation of the HSP70 gene during erythroid maturation in K562 cells is due to a heat shock factor-mediated stress response. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3166–3173.

Trinklein ND, Murray JI, Hartman SJ, Botstein D, Myers RM. 2004. The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol Biol Cell*. 15:1254-1261.

Voss AK, Thomas T, Gruss P. 2000. Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development.* 127:1-11.

Walsh D, Li Z, Wu Y, Nagata K. 1997. Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development. *Cell Mol Life Sci.* 53:198-211.

Wang G, Zhang J, Moskophidis D, Mivechi NF. 2003. Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. *Genesis* 36: 48-61.

Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA, Benjamin IJ. 1999. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory response in mice. *EMBO J* 18: 5943-5952.

Zhadobov M, Sauleau R, Le Coq L, Debure L, Thouroude D, Michel D, Le Drean Y. 2007. Low-power millimeter wave radiations do not alter stress-sensitive gene expression of chaperone proteins. *Bioelectromagnetics* 28:188-196.

Zhang Y, Huang L, Zhang J, Moskophidis D, Mivechi NF. 2002. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J Cell Biochem* 86: 376-393.

Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith D, Voellmy R. 1998. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress sensitive complex with HSF1. *Cell* 94: 741-480.

**Legends of figures :**

**Figure 1. Schematic representation of *in ovo* electroporation of DNA construct in the chick neural tube.** A. Upper panel. Step 1: the pressure in the egg is lowered by sucking a few ml of the albumen with a seringue. Step 2: The chick embryo is appearant at the surface of the windowed egg, indicated by a square. Lower panel, magnified representation of the embryo. Step 3: The DNA construct solution (in blue) is injected and trapped into the lumen of the neural tube (neural groove) and is then in contact with all the cells of the neuroepithelium lining (black line; the rest of the embryo is in grey). The two electrodes are applied along each side of the embryo and the DNA construct enters directionnally into the side of the neural tube located near to the anode (in red). B. Dorsal view of a 16HH chick embryo which was electroporated at 9HH with pAdRSV-LacZ, encoding β-galactosidase. 24 hrs after electroporation, expression of β-galactosidase (blue) is observed only in one side of the neural tube, hindbrain (here, the right side indicated with a bracket), and midbrain (arrow). The left side is an internal control.

**Figure 2**. **HSF binding activities and subcellular localization at early stages of chicken development.**

A. cHSF DNA-binding activity increases during early development. *Left panel* : EMSA analysis of cHSF-HSE complexes at stage 9HH (32 hrs) plus 30 min. of development (lanes 2 to 5); plus 2 hrs (lanes 6 to 9); plus 4 hrs (lanes 10 to 13): plus 6 hrs (lanes 14 to 17); plus 24 hrs of development (stage 16HH ; lanes 18 to 21). A positive control for cHSF3 DNA-binding activity is provided by embryos that were heat shocked for 1hr at 44°C (9HH plus 24hrs of

development; lanes 22 and 23). No supershift was observed anti-cHSF3 sera in normal chick embryos (α3; lanes 5, 9 13 17, 21) except in heat-shock conditions (lane 23). A slight supershift was observed with anti-cHSF1 in 9HH+ 4hrs, 9HH + 6 hrs and 9HH + 24 hrs (α1; lanes 12, 16, 20) but not in 9HH+ 30 min. or 9HH + 2 hrs (lanes 4 and 8). In constrast, cH SF-HSE complexes were strongly supershifted by preincubation with anti-cHSF2 serum at all stages between 9HH + 30min to 9HH + 24 hrs (α2; lanes 3, 7, 11, 15, 19). The vestigial remaining sharp band observed in the supershifts with anti-HSF2 is not a specific binding, since, in previous experiments, it could not be competed by non-radioactive HSE oligonucleotides and is sometimes observed in EMSA (Kallio et al 2002). HSF : HSE-cHSF retarded complexes. CHBA : constitutive HSE-binding activity. NS, non specific. Free : unbound oligonucleotides.

B. cHSF subcellular localization in early chick neural tube. Paraffin coronal sections on the chick neural tube at stage 9HH (in forebrain) were immunolabeled (middle and right panels) by anti-cHSF1 (a, b, c), anti-cHSF2 (panels d, e, f), anti-cHSF3 (g, h, i) or anti-cHSP70 (j, k, l). Nuclei were localized using Yoyo. Only cHSF2 displayed nuclear localization (indicated by white arrows). Scale bar : 10μm.

**Figure 3**. **Electroporation does not modify HSF DNA-binding activity or localization.**

A. EMSA analysis of HSF DNA-binding activities after electroporation (EP). For technical reasons due to film exposure times, some samples were loaded more than one time. (C) non-electroporated 9HH+30 min. control embryos. Lanes 1 to 4: stage 9HH plus 30 min. of development. Lanes 21 to 24: stage 9HH plus 6 hrs. Lanes 41 to 44: stage 9HH plus 24 hrs. (EP) Embryos were electroporated at stage 9HH and incubated at 38°C for the indicated time after EP. Lanes 5 to 8 : 30 min. after EP. Lanes 13 to 16: 2 hrs post EP. Lanes 17 to 20: 4 hrs post EP. Lanes 25 to 28 and 33 to 36: 6 hrs post EP. Lanes 37 to 40: 8 hrs post EP. Lanes 45

to 48: 24 hrs post EP. (HS) heat-shocked embryos at indicated time of development. Lanes 9 to 12: heat-shocked embryos at stage 9HH plus 2hrs; lanes 29 to 32: 9HH plus 6 hrs; lanes 49 to 52: plus 24 hrs. CHBA, HSF, NS, α1, α2 and α3 as in Figure 2A. Unbound oligonucleotides are not shown.

B. Immunohistochemical detection of global cHSF subcellular localization in the chick neural tube. Paraffin coronal sections on the anterior chick neural tube electroporated with pEGFP-N1 and pAdRSV-HSF2β constructs at stage 9HH and observed 24 hrs post-electroporation. EGFP fluorescence (a) assessed efficient electroporation and showed the side of the neural tube that received the EGFP expression construct. Sections were immunolabeled (from top to bottom, red signals) by anti-cHSF1 (b, c, d, e), anti-cHSF2 (f, g, h, i), anti-cHSF3 (j, k, l, m) or anti-cHSP70 (n, o, p, q) and nuclei were labeled by yoyo (see merge in c, e, g, i, k, m, o, q). Panels d, h, l, p present a global view of the corresponding serial sections of the neural tube. The left panels (b, c, f, g, j, k, n, o) show a magnification of the side of the neural tube that receive no DNA. cHSF1 and cHSF3 remain mainly cytoplasmic. The global localization of cHSF2 was not modified by electric shock (left control panels), and displayed nuclear localization (indicated by white arrows). Neither global cHSF1 cHSF3 cytoplasmic localization, nor global cHSF2 nuclear localization is altered in the mHSF2 overexpressing side (right raw panels). Since mHSF2 is only poorly recognized by anti-cHSF2 serum (arrowhead) the status of each cHSF in individual mHSF2 overexpressing cells was further investigated (Figure 4D). Nor the electric shock of electroporation by itself (control, left raw panels) nor electroporation combined with EGFP and mHSF2 expression (overexpressing side, right raw panels) altered global cHSF localization. Scale bars: 100µm in p; 10µm in q. AB, antibody; lv, lumen of ventricle.The dorsal part of each section is located towards the top of each panel.

**Figure 4. mHSF2 is overexpressed in a DNA-binding active form in the chick neural tube**

A. WB analysis of mHSF2 overexpression in electroporated embryos. Left panel: individual embryos. Right panel: pooled embryos. Non-electroporated embryos (-): left panel, lanes 1; right panel, lanes 2 and 5. 9HH embryos (left panels lanes 2and 3 and right panel lanes 3and 4) or 12HH embryos (lanes 6 to 8) were injected with 0.5µg/µl pEGFP-N1 alone (GFP, left panel, lane 3; right panel, lanes 3 and 6) or together with 1µg/µl pAdRSV-HSF2β (left panel lane 2; right panel, lanes 4, 7 and 8), checked for GFP expression by UV illumination 24 hrs after electroporation and further analysed by Western blot with anti-mHSF2 antibody. The endogenous cHSF2 is not efficiently recognized by anti-mHSF2 in WB. Equal loading was assessed by an antibody which both recognizes HSP90 and HSP70 (left panel) or vimentin (right panel). 18HH non-electroporated embryos correspond to 12HH + 24hrs. Only GFP positive embryos that were electroporated and co-injected with pAdRSV-HSF2β at 9HH or 12HH display mHSF2 expression.

B. EMSA analysis of chick embryos overexpressing mHSF2. Mouse HSF2 is overexpressed in a HSE-binding form in the chick neural tube. Left panel: lane 1 (C): Individual 9 HH control embryos. Lane 2 to 6: Individual 9HH embryos were injected with pEGFP-N1 alone (-, lanes 3 and 5) or with pAdRSV-HSF2β and pEGFP-N1 (+, lanes 2, 4 and 6), checked for GFP expression by UV illumination 24 hrs post-electroporation and analysed by EMSA. An increase in HSE-binding activity was specifically observed in individual embryos that were injected with pAdRSV-HSF2β plus pEGFP-N1. Right panel: the increase in HSE-binding activity in mainly due to mHSF2. HSE-Binding activity observed in embryos injected with

pAdRSV-HSF2β plus pEGFP-N1 is supershifted by anti-mHSF2 (αm2; lane 3, dilution 1:10; lane 4 dilution 1:40) and by anti-cHSF2 polyclonal antibodies (α2, lane 5) but not by anti-cHSF1 (α1; lane 6) or anti-HSF3 (α3; lane 7).

C. Immunohistochemistry analysis of mHSF2 expression in the chick neural tube. Anti-mHSF2 antibody (α-mHSF2) labels neuroepithelial cells that are restricted to the anode side of the neural tube (panel b) as indicated by overlapping labelling (merge panel c) with EGFP (GFP; panel a). + : catode side; -: anode side; v: ventricule.

D. Immunohistochemistry analysis of mHSF2 expression in the chick neural tube. Anti-mHSF2 antibody labels neuroepithelial cells that are restricted to the anode side of the neural tube as indicated by overlapping labelling with EGFP (a, b, c). Paraffin coronal sections on the chick neural tube at stage 9HH were co-immunolabeled by mouse anti-mHSF2 (b, c, f, i, l) and anti-cHSFs, anti-cHSF2 (d, f, g), anti-HSF1 (h, i, j), anti-HSF3 (k, l, m). Arrows point out mHSF2 ovrexpressing cells. No modifications of cHSFs subcellular localization are observed in these cells. Scale bars: 10μm.

**Table 1**. **Effects of mHSF2 overexpression on the expression of HSF2 potential downstream genes.** Ratio between mRNA levels of control embryo (mock-electroporated embryos) versus HSF2α or HSF2β ovexpressing embryos were analyzed by real-time RT-PCR (n = 6: from 6 independent experiments of 5-7 pooled embryos; see supplemental data). Ratio correspondoing to a p value <0.02 are indicated in black bold characters, while ratio with a p-value < 0.05 are indicated in dark grey. p-value was determined by Student test. SD: standard deviation; SEM: standard error of the mean.

*Supplemental data*

**Table 1**

**Supplemental Figure 1. The electric shock delivered by electroporation does not trigger the heat shock response**

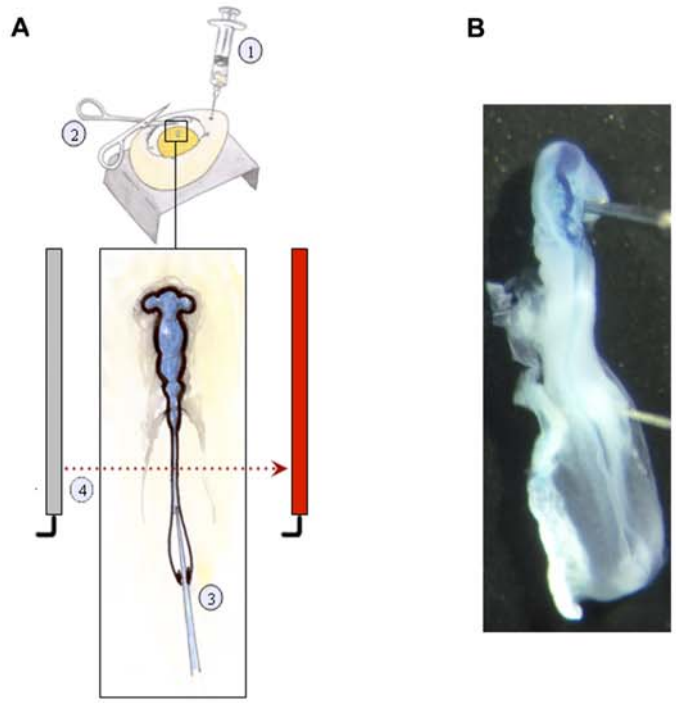
A. [$^{35}$S]-methionine protein metabolic labeling does not reveal induction of HSP synthesis. 2 pooled stage 9HH embryos were untreated (C), electroporated (EP) or heat shocked (HS) for 1 hr at 44 °C and allowed to recover for the indicated times. The last hour of recovery was performed in presence of [$^{35}$S]-methionine. Except for 5 and 7 hrs after electroporation, no significant alteration of global protein synthesis was observed. Electroporation did not elicite the induction of HSP90 and HSP70 synthesis, in contrast to what is observed after heat shock.

(B) Western blot analysis of HSP90, HSP70 levels after electroporation. Embryos were electroporated (EP) at stage 9HH and allowed to recover for the indicated times. 20 µg were loaded in each lane. E10.5: mouse embryo at day 10.5 of gestation, as a positive control. Equal loading of protein amounts was assessed using anti-Hsc70. Although a transient reduction in [$^{35}$S]-methionine incorporation was observed between 5 to 7 hrs after electroporation, *in ovo* electroporation had no effect on HSP accumulation.

**Supplemental Figure 2. mHSF2 overexpression does not markedly modify cHSF1 and cHSF3 levels.** Western blot analysis of the levels of cHSF1, cHSF3, cHSP70 and cHSP90 in non-electroporated embryo (c, lane 1), in embryos electroporated with pEGFP-N1 and pAdRSV-HSF2β (β, lanes 2 and 3), with pEGFP-N1 and pAdRSV-HSF2α (α, lane 4), with

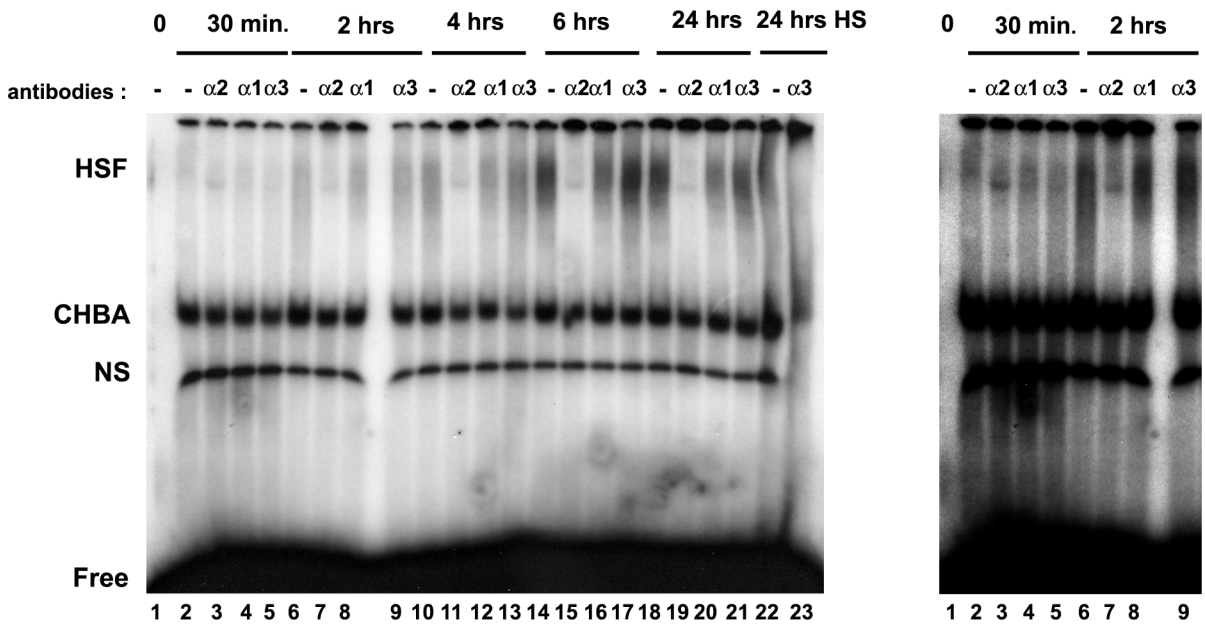
pEGFP-N1 alone (EGFP, lane 5) or with no DNA (-, lane 6). Equal loaded was assessed using anti-actin antibody.

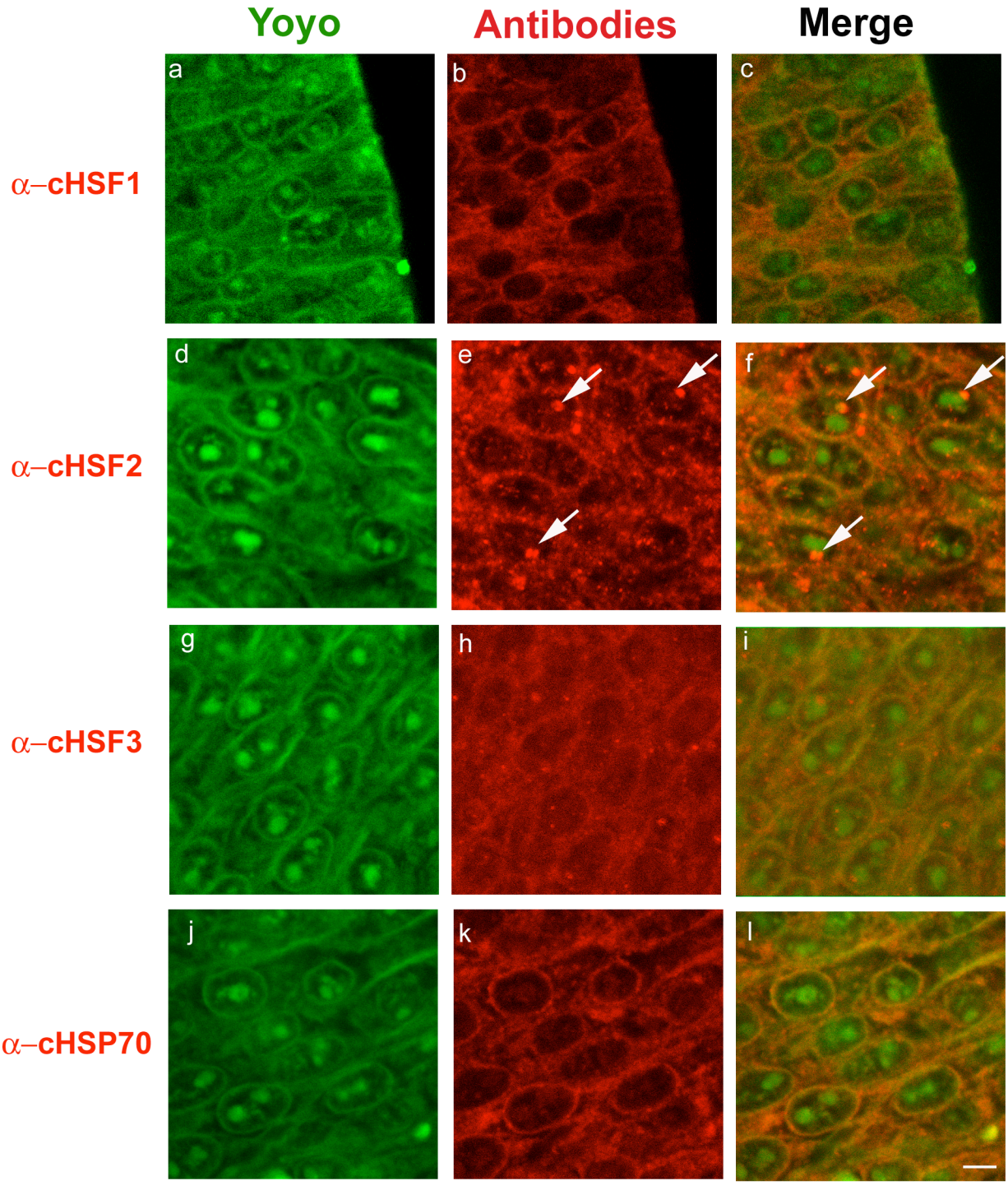
**Trouillet et al., Figure 1**



Trouillet et al., Figure 2A.

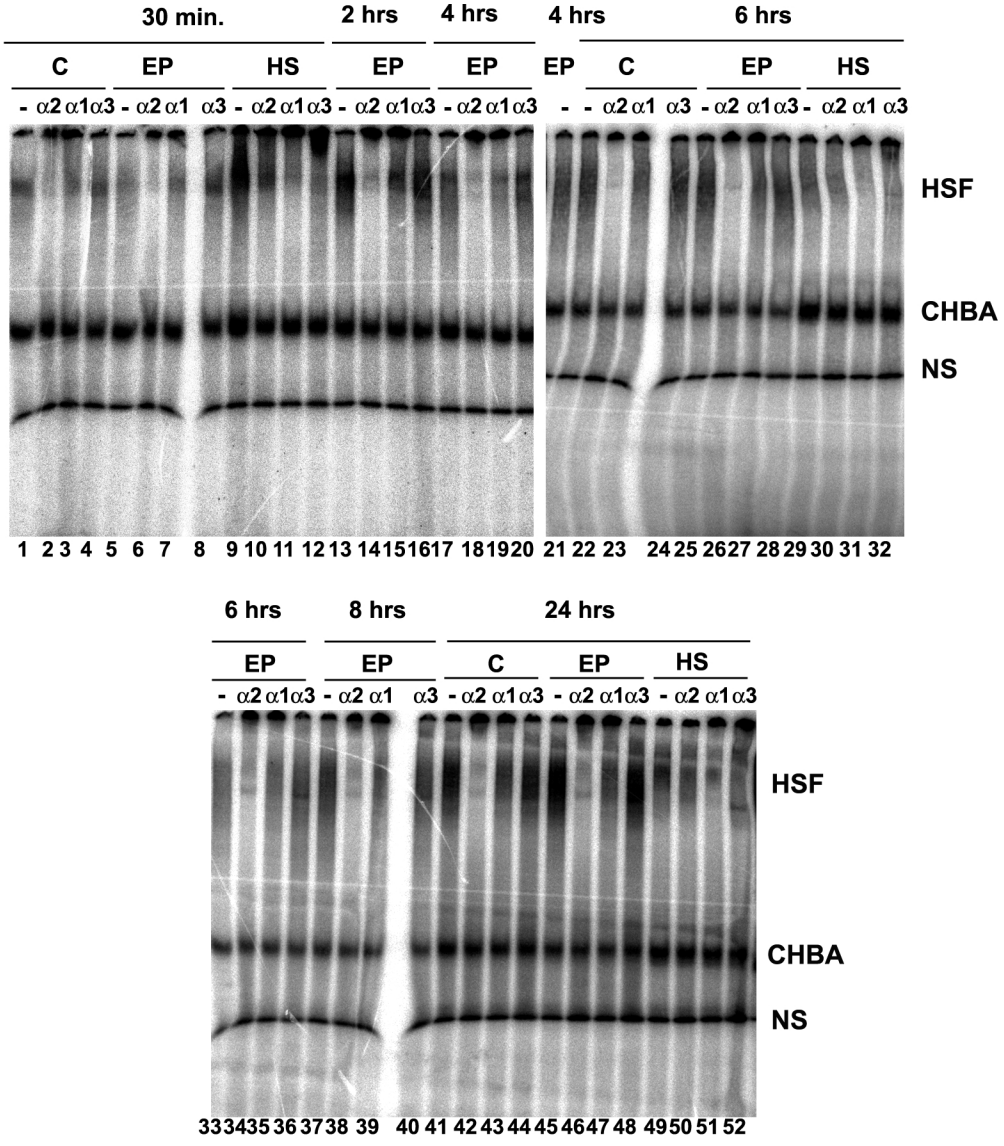
**A.**



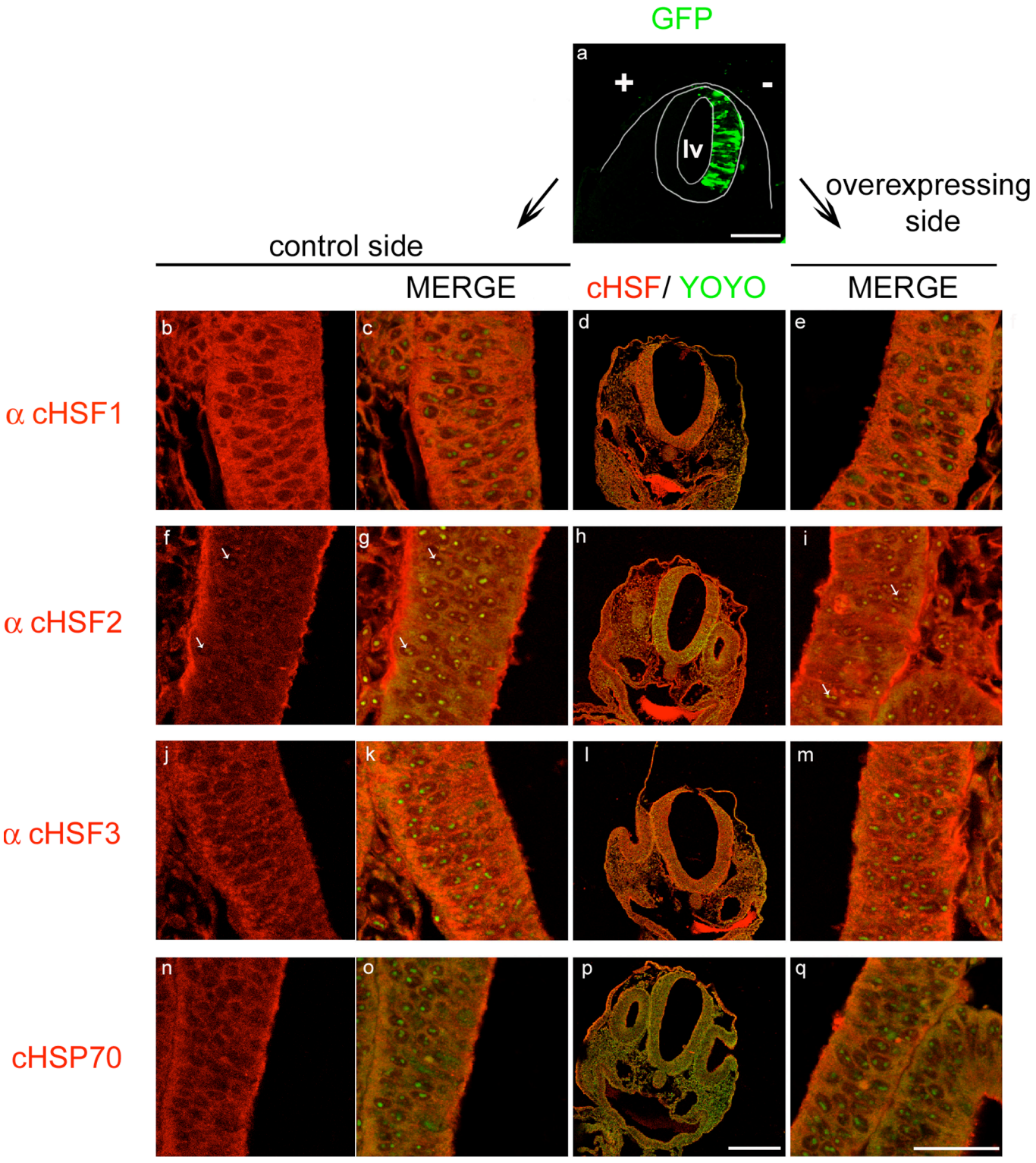



**Trouillet et al., Figure 2B**

Trouillet et al., Figure 3A.

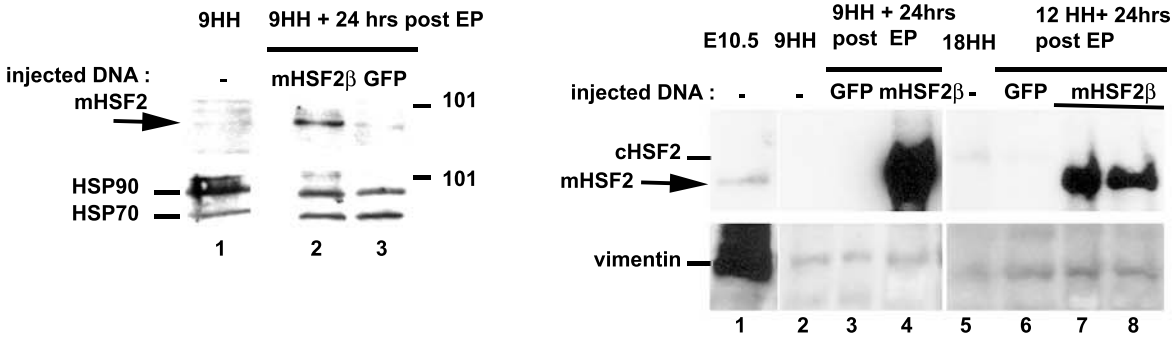


Trouillet et al., Figure 3B

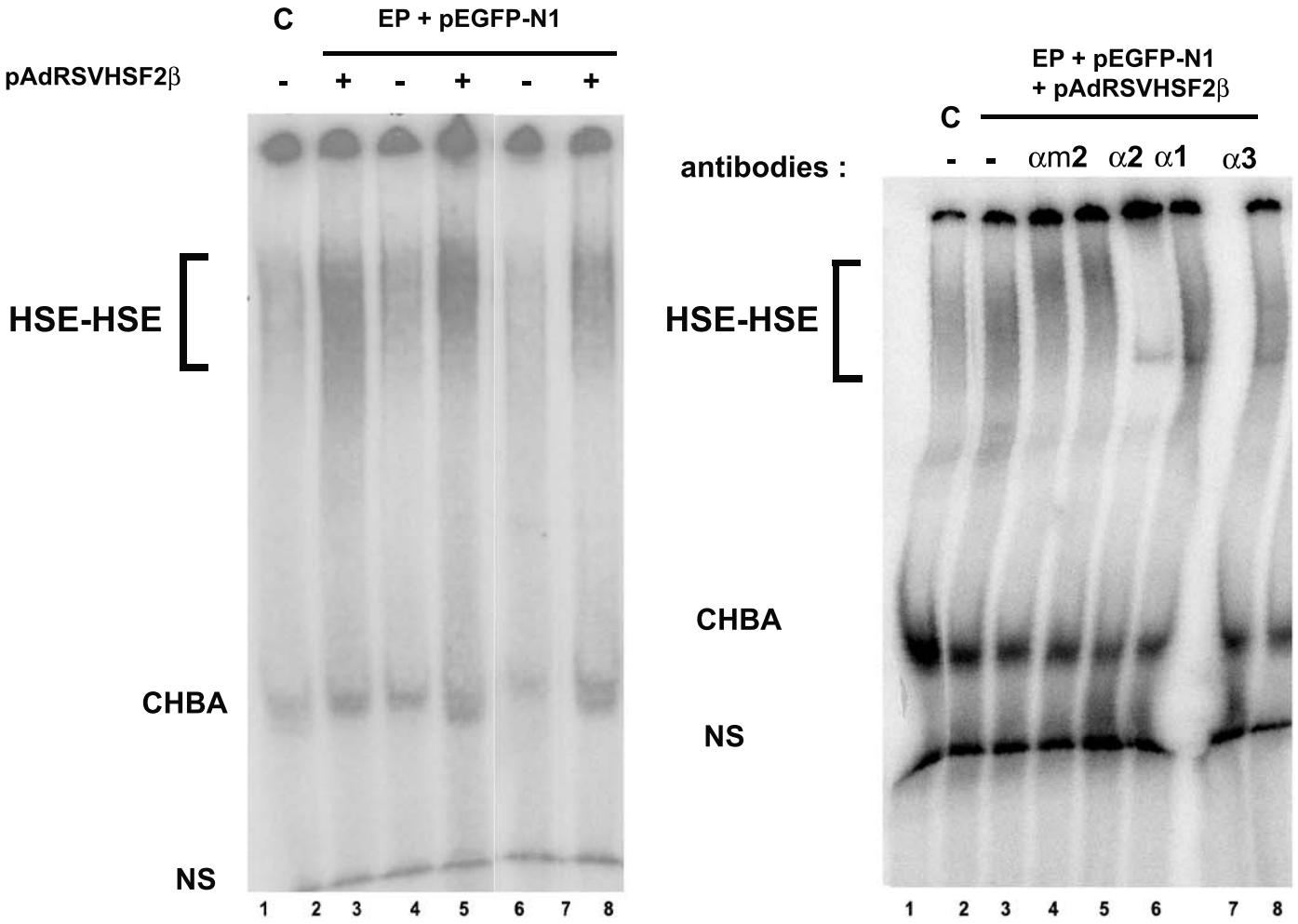


Trouillet et al., Figure 4

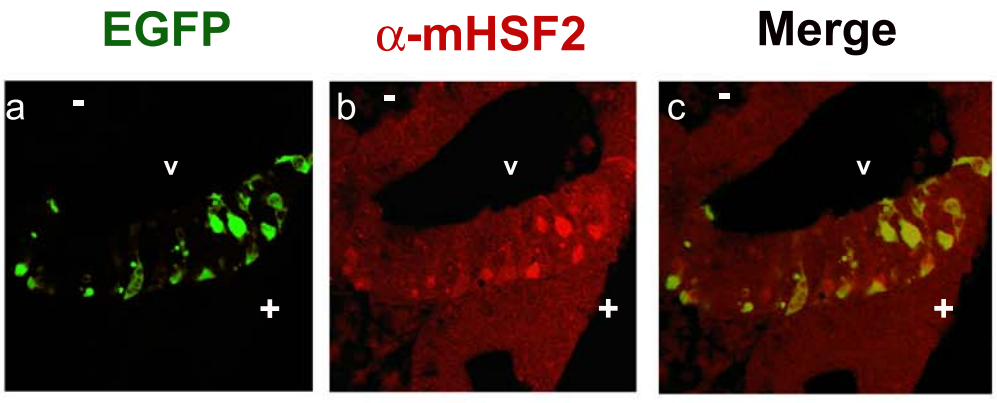
A.

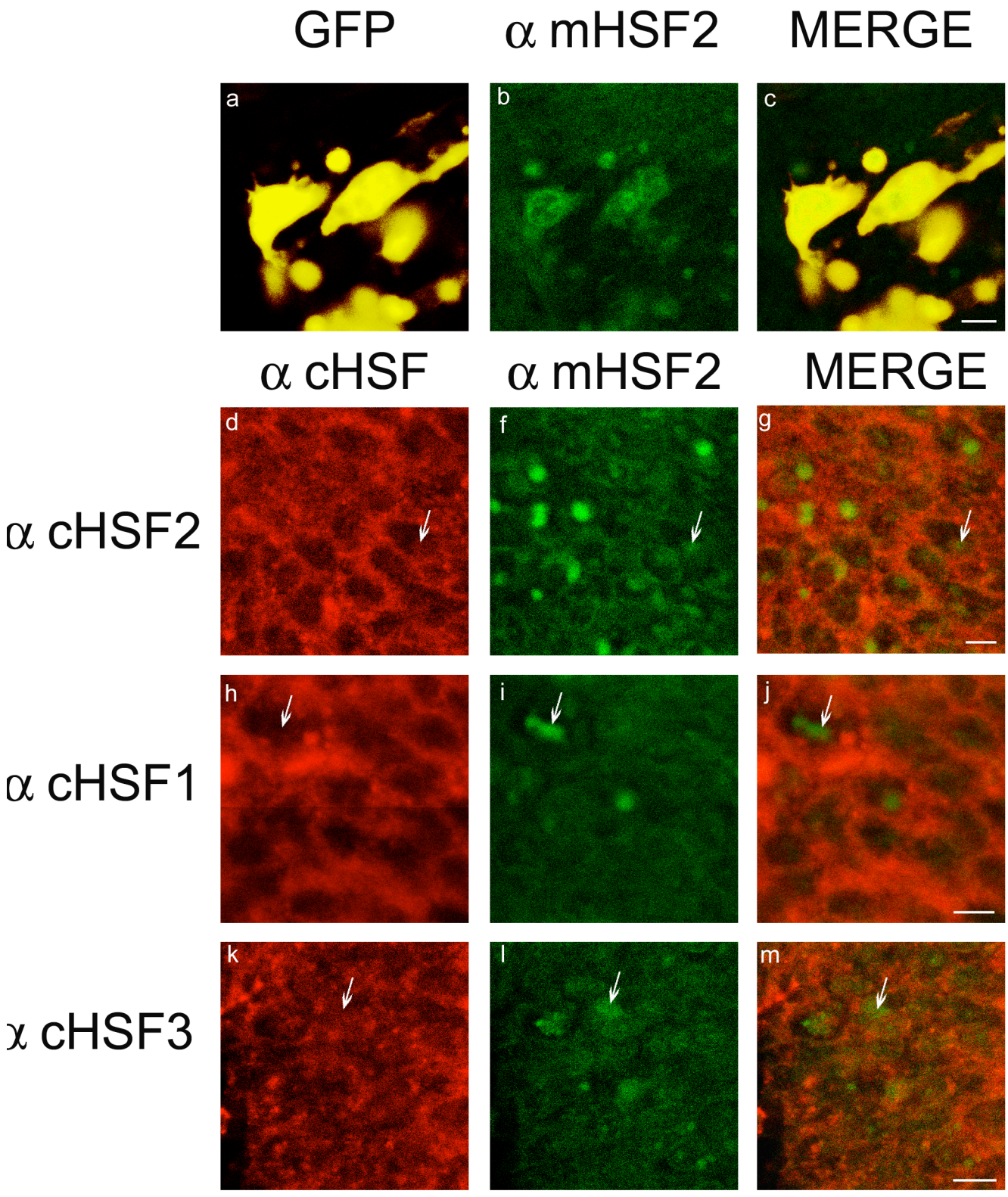



B.




C.

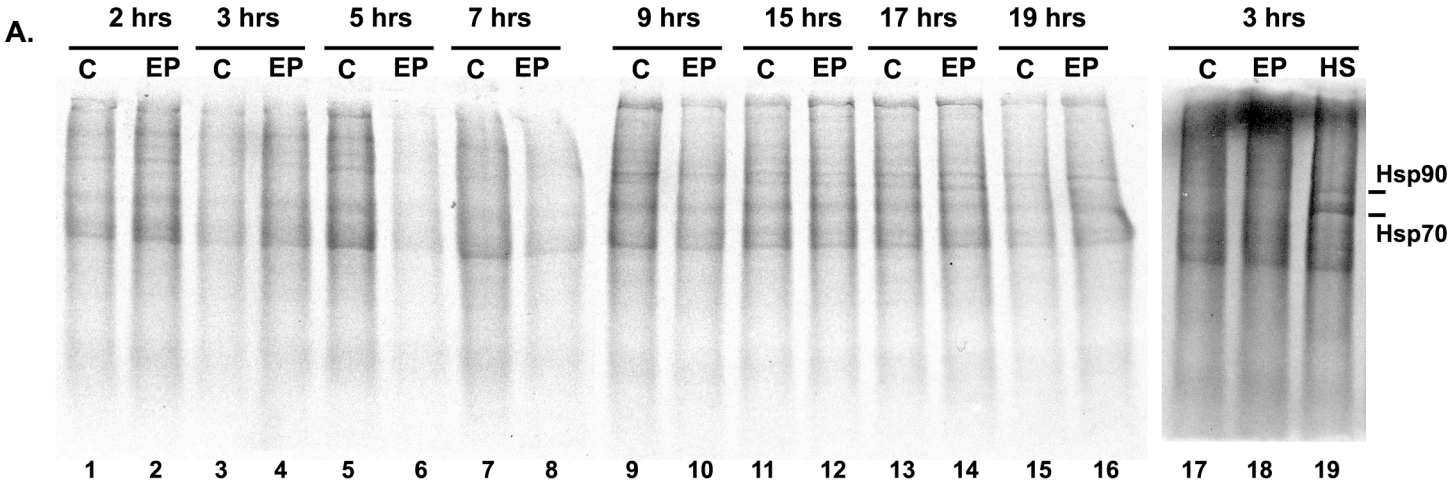


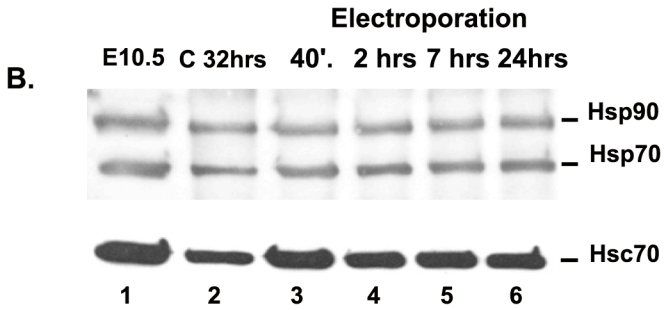



Trouillet et al., Figure 4D.

**Trouillet et al., Table1**

| | | Hsp70 | Hsp90 | Fgf7 | Lif | p35 | S17 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Hsf2α** | Means | **0.54** | 1.35 | 1.21 | **3.44** | 1.00 | 1.01 |
| n=6 | SD | 0.26 | 0.80 | 0.56 | 2.84 | 0.11 | 0.32 |
| | SEM | 0.11 | 0.32 | 0.23 | 1.16 | 0.04 | 0.13 |
| | p-value | 0.0043 | 0.1634 | 0.2004 | 0.0448 | 0.4858 | 0.4662 |
| **Hsf2β** | Means | **0.60** | **1.46** | 1.38 | 1.05 | 1.12 | 1.05 |
| n=6 | SD | 0.46 | 0.34 | 0.59 | 1.21 | 0.15 | 0.42 |
| | SEM | 0.19 | 0.14 | 0.24 | 0.49 | 0.06 | 0.17 |
| | p-value | 0.0413 | 0.0115 | 0.0916 | 0.4618 | 0.0587 | 0.3872 |




Trouillet et al., Suppl. Figure 1

**Trouillet et al., Suppl. Figure 2**

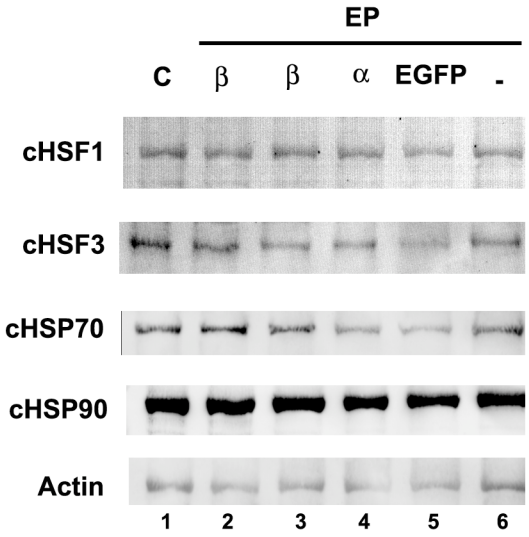


Table 1.

| HH | Identification of stages | Age | somites | Mouse dpc |
|---|---|---|---|---|
| 9 | primary optic vesicles | 29-33 hrs | 7 | 7.5 |
| 9+ to 10- | anterior amniotic fold | 33 hrs | 8-9 | 8-9.25 |
| 10 | 3 primary brain vesicles | 33-38 hrs | 10-12 | |
| 11 | 5 neuromeres of hindbrain | 40-45 hrs | 13 | 9 (8.5-9.75) |
| 12 | Formation of telencephalon | 45-49 hrs | 16 | |
| 13 | atrioventricular canal | 48-52 hrs | 19 | |
| 13+ to 14- | tail bud | 50-52 hrs | 20-21 | 9.5 (9-10.25) |
| 14 | trunk flexure; visceral arches I and II, clefts 1 and 2 | 50-53 hrs | 22 | |
| 14+ to 15- | premandibular head cavities | 50-54 hr | 23 | |
| 15 | visceral arch III, cleft 3 | 50-55 hrs | 24-27 | |
| 16 | wing bud; posterior amniotic fold | 51-56 hrs | 26-28 | |
| 17 | leg bud; epiphysis | 52-64 hrs | 29-32 | 10 (9.5-10.75) |
| 18 | somites extending beyond level of leg bud; allantois | 3 days | 30-36 | 10.5 (10-11.25) |

*Supplemental material and methods*

We detail here the real time polymerase chain reaction (qPCR). The procedure is similar of the general pattern of PCR, but the DNA is quantified at each cycle of amplification by the use of fluorescent dyes that intercalate in double-strand DNA. Analysis processes is very important for the significativity of the results because this technique is very sensitive.

*Material.* Total RNAs from 9HH embryos were purified using RNA Aqueous Micro kit (Ambion). Reverse transcription was performed from 500 ng of RNAs using Superscript-first strand (Invitrogen Life Technologies), 100 mM DTT, OligodT 12-18 (Invitrogen), 10mM dNTPs. The resulting RT-PCR product was purified using Macherey-Nagel kit. cDNAs were subjected to real-time quantitative PCR 480 (Roche Molecular Biochemicals), in the presence of 10 mM of each specific primer (for primer sequences, see Table below) and QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen).

*LightCycler program* as follows : 1) polymerase activation 15 mm at 95°C, 2) 60 cycles of amplification with 15 s at 95°C (denaturation step), 20 s at 60°C (annealing step), and 20 s at 72 °C (extension step). Fluorescence is estimated during this final step. 3) melting-curves are generated by temperature increase (2.2°C/s) from 65°C to 95°C. This step permits to assess the unique and specific products.

*Analysis method :* A qPCR reaction profile has three segments : an early background phase, an exponential phase (quantifiable segment in log phase) and a plateau. The background phase lasts until the fluorescence signal from the PCR product is greater than the background fluorescence. The exponential growth phase begins when sufficient product has accumulated to be detected above background, and ends when the reaction efficiency falls as the reaction enters the plateau. During quantitative real time polymerase chain reaction, DNA quantity $Q_n$ depends on initial number of matrix $Q_0$ and on efficiency $E$ at a given cycle $n$. So $Q_n = Q_0\ E^n$ equation permit to calculate the quantity of amplicon at each cycle during the reaction time.

Relative concentrations of DNA present during the exponential phase of the reaction are determined by plotting fluorescence against cycle number on a logarithmic scale (so an exponentially increasing quantity will be plotted as a linear curve). A threshold for detection of fluorescence above background is determined. The cycle at which the fluorescence from a sample crosses the threshold is called the cycle threshold, Ct. During amplification reaction, the cycle at wich the fluorescence of sample rises above the background fluore-

cence is called Ct of the sample. PCR product visualization is possible if the number of amplicon is exceed the detection limit, at Ct approximately $10^{11}$ product molecules are present in the reaction. This variable depends of fluorochrome used and the apparatus sensibility. Light cycler 480 Basic Software identify automately the Ct of the sample as the point where the fluorescence sample curve turns sharply upward by the 2nd derivative maximum method.

$$\begin{aligned} Q_{Ct} &= Q_0\, E^{Ct} \\ Q_0 &= Q_{Ct}\, E^{-Ct} \end{aligned}$$

where, $Q_{Ct}$ is the amount of target at cycle Ct, $Q_0$ is the initial amount of target and $E^{Ct}$ is the efficiency of amplification.

The slope of standard curve indicates how DNA quantity increase with the amplification cycles. A theorical amplification reaction would realise with an efficiency of 2, because the amplicon double at each amplification cycle, but different limits existing, the efficiency is specific to primers used. Efficiency is calculated by LightCycler 480 system basic software. For that, we used the dilution method, where matrix is diluted in 2, 5 or 10 times. In our quantification analysis, the standard curve permitting to determine the concentration of unknown sample is the sample itself. Considering the initial quantity $Q_0$, the ${}^iQ_{Ct}$ represent the different $i$ dilutions of matrix.

$$\begin{aligned} {}^iQ_{Ct} &= \frac{Q_0}{i} E^{{}^iCt} \\ \log {}^iQ_{Ct} &= \log \frac{Q_0}{i} +^i Ct \log E \\ {}^iCt &= \frac{1}{\log E} + \left( -\log \frac{Q_0}{i} + \log {}^iQ_{Ct} \right) \\ {}^iCt &= -\frac{1}{\log E} \log \frac{1}{i} + \left( \frac{\log {}^iQ_{Ct} - \log Q_0}{\log E} \right) \end{aligned}$$

By non-linear regression line, absolute value are dertermined by the fallowing curve $Ct = \int \left[ \log \left( \frac{1}{i} \right) \right]$ where the efficiency could be calculated by $E = 10\ e^{(-1/slope)}$. The relative amount of RNA from the gene of interest is divided by the relative amount of RNA from housekeeping genes to normalize variations of RT reaction. In fact, three genes with different expression levels (*Gapdh, L14, Cyclophilin B*) were used for results normalization. Six independent sets of 5-7 embryos were analyzed. Arthmetic means, standard deviation and P-value by paired Student t-test was determined.

More informations in *The Real-Time Polymerase Chain Reaction, Kubista, M. et. al, Molecular Aspects of Medicine 27, 95-125 (2006).*

Primers sequence :

| | |
|---|---|
| cL14 | sense 5' TTCTCAAGTTCCCGCACAGC 3'<br>antisense 5'CTTCTTCGCCCATCGTGTTG 3' |
| cGfap | sense 5'AGCTCACGTGAAGAGAAGCATTGTG 3'<br>antisense 5'CTTCTGACACGGATTTGGTGTCCAG 3' |
| cCyclo | sense 5'CCACCGCGTCATCAAGGACTT 3'<br>antisense 5'TTGCCATCCAGCCACGGCGTC 3' |
| mHSF2 | sense 5'CCATTGACTGAAGCGGAAGC 3'<br>antisense 5'TGGTTAGTGAGAAAAGCAAAAGGTG 3' |
| cHsf2 | sense 5'GCAGGGTCGAGAGGACTTGTTGGA 3'<br>antisense 5'TGCTCTCAGTTCTGCCACTTCCCTC 3' |
| cHsf1 | sense 5'CACATCGAGCAGGGAGGGTTGGTGA 3'<br>antisense 5'GGTCAGCAGCTTGGTGACGTTGTCT 3' |
| cHsf3 | sense 5'TGCCTGGCTTCCTGGCCAAG 3'<br>antisense 5'TTCTCCAAAGCAACCACCTTCC 3' |
| cHsp70 | sense 5'CCATCGGCATCGATCTGGGC 3'<br>antisense 5'AATAGCAGCTGCTGTGGGCTC 3' |
| cHsp90 | sense 5'ACTTTTGTCTGCATTCCCTC 3'<br>antisense 5'GAACACCCAGATGTCATACC 3' |
| cFgf2 | sense 5'TGAAGGAGGATGGCAGATTG 3'<br>antisense 5'TGTCCAGGTCCAGTTTTTGG 3' |
| cFgf7 | sense 5'GCAGGTCGGTGACCTAAGAGCAACA 3'<br>antisense 5'GCTGGAACAGTTCACATTTGTAGCCATT 3' |
| cLif | sense 5'ACCGAGAGGAAGGAGGTGATGGTGG 3'<br>antisense 5'AGCAGGCAGGTGAGGTTGGAGATGA 3' |
| cS17 | sense 5'AAGCTGCAGGAGGAGGAGAGG 3'<br>antisense 5' GGTTGGACAGGCTGCCGAAGT 3' |

Tab. 1 – Primers sequences used

### 2.1.2 Discussion et perspectives

Cet article démontre que la technique de l'électroporation *in ovo* dans le tube neural de l'embryon de poulet permet de surexprimer le facteur HSF2 murin capable dans nos conditions de lier l'ADN et de moduler l'expression de certains gènes cibles. Le mécanisme d'action du mHSF2 n'est pas abordé dans cet étude, mais l'on ne peut exclure, au vue de la grande conservation de séquence protéique (Fig. 2.1) avec les facteurs HSF endogènes, que des hétérocomplexes ou encore des hétérotrimères de HSF2 pourraient se former. Des études supplémentaires sont alors nécessaires.

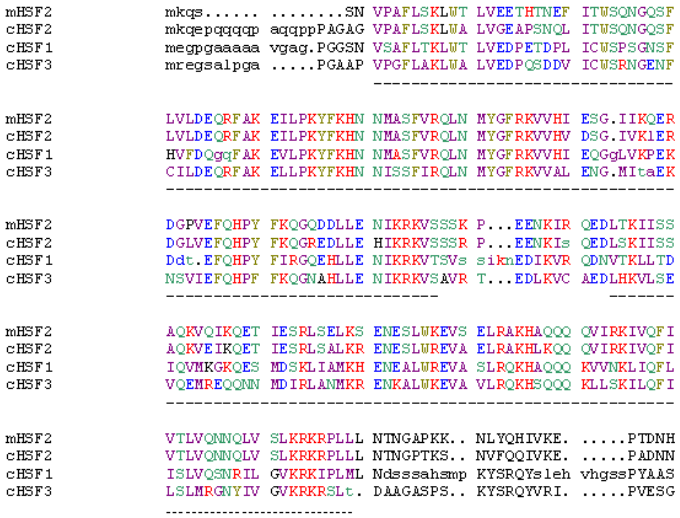



**Fig. 2.1 – Homologie des domaines en N-terminal de mHSF2 et cHSF.** L'alignement de séquence, obtenu par DIAlign, démontre que le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine d'oligomérisation (HR-A/B) (indiqués par les lignes pointillées) sont fortement conservés entre mHSF2 et cHSF2, moins avec les autres HSF. Ont été représentés en rouge les acides aminés basiques, en violet les non polaires, en vert les non chargés, en bleu les acides et en kaki les aromatiques.

Comme nous l'avons vu précedemment dans l'article 1, lorsque HSF2 n'est pas exprimée chez la souris, le niveau d'expression de P35 est diminué. En parallèle, lorsque mHSF2 est surexprimée dans les cellules humaines K562, l'expression de P35 est augmentée. En revanche, une surexpression de mHSF2 dans le tube neural du poulet en développement, ne modifie pas sensiblement l'expression de P35 (Fig. 2.2). Pourtant p35 est exprimé à ce stade dans le tube neural en développement comme le montre les expériences d'hybridation *in situ*, dans les zones où la surexpression de mHSF2 a lieu (Fig. 2.3).

En conclusion, le mécanisme de régulation de l'expression de *p35* par HSF2 semble cellule spécifique voir stade spécifique, ceci suggère que d'autres facteurs inconnus pour l'instant sont impliqués dans cette régulation.

Notons que les expériences actuelles sur les cortex embryonnaires E10.5 (qui

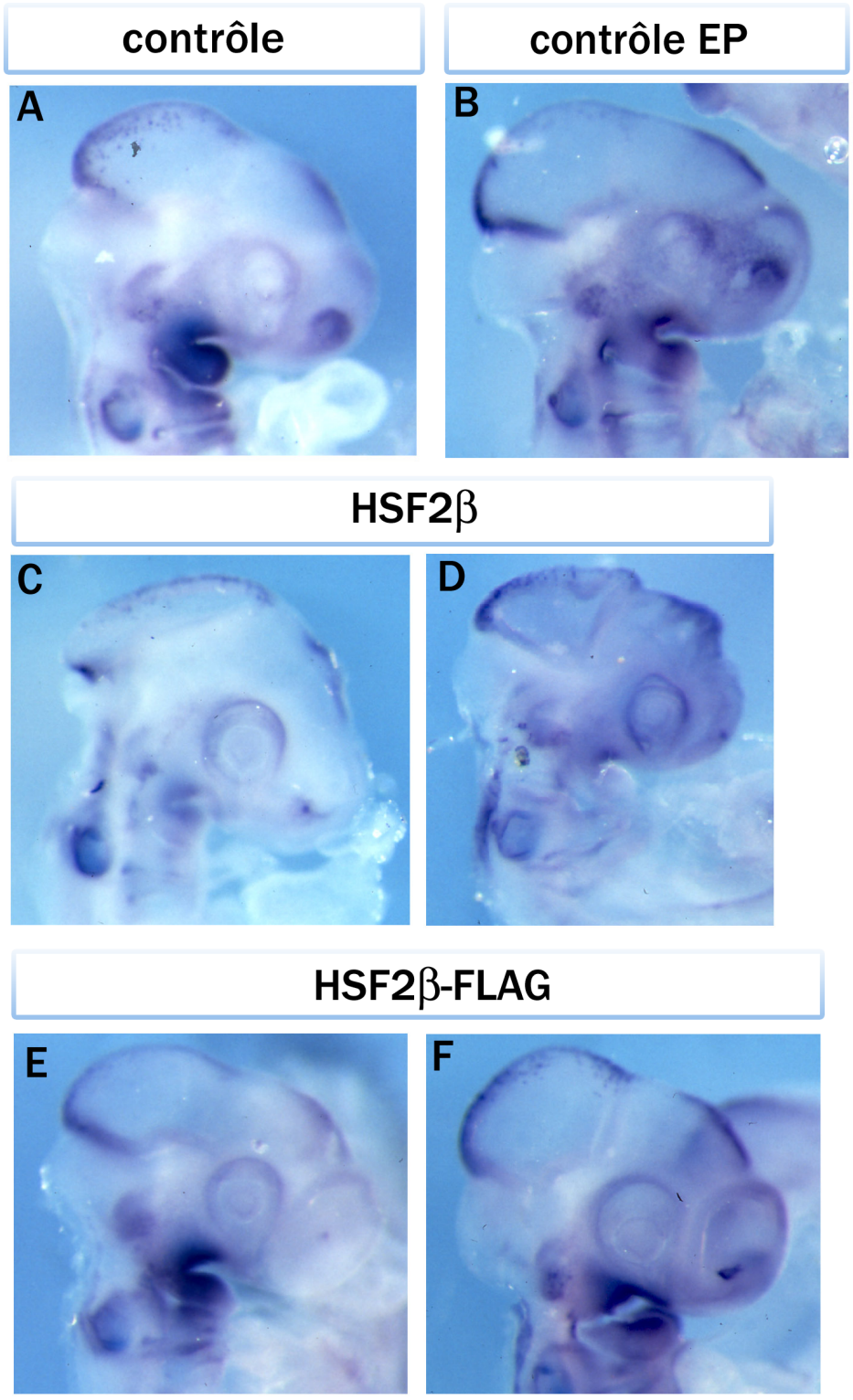



**Fig. 2.2 – Expression de p35 dans des embryons de poulet surexprimant mHSF2.** Les hybridations *in situ* à l'aide de la sonde *p35* ont été réalisées *in toto* sur des embryons au stade 18HH non électroporés (A), électroporés sans vecteur (B), électroporés à l'aide d'une construction HSF2$\beta$ (C,D) ou HSF2$\beta$-FLAG (E,F). Aucune différence de profil d'expression de p35 n'a été décelé.

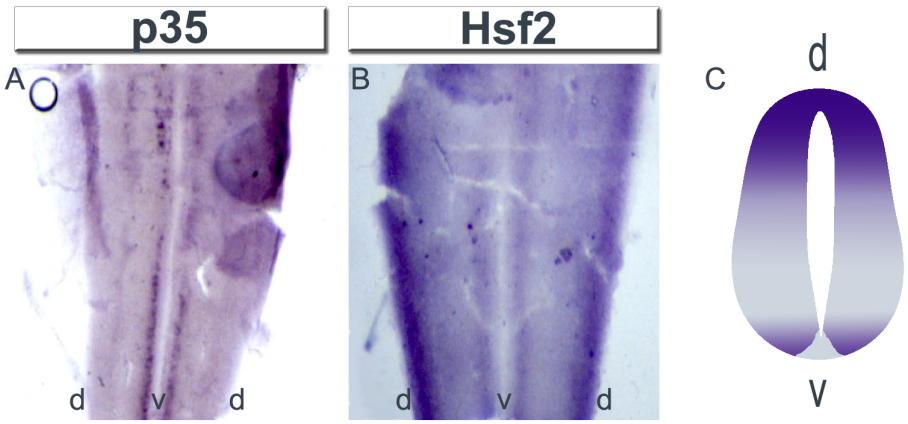



**Fig. 2.3 – Expression de P35 et de HSF2 dans le tube neural en développement à 16HH.** Hybridation *in situ* à l'aide de sonde p35 (A) et Hsf2 (B) sur des tubes neural d'embryon de poulet ouvert. V représente la partie ventrale et D la partie dorsale. En C, est schématisé le gradient d'expression de Hsf2 dans le tube neural reproduisant l'expression protéique.

contiennent essentiellement des cellules NSC/NP de la VZ) semblent suggérer que la présence de HSF2 dans la VZ contribue à rendre silencieux le gène *p35*. La différence de comportement de HSF2 entre les cellules de la VZ et les cellules de la CP dans lesquelles HSF2 a un effet régulateur positif sur l'expression du gène *p35*, pourrait s'expliquer par l'occurrence de modifications post-traductionnelles spécifiques d'un compartiment et de l'apparition d'une forme spécifique de HSF2 dans la CP. C'est le travail de Ryma ABANE (première année de thèse) au laboratoire actuellement.

## 2.2 HSF2 modulerait la prolifération dans le tube neural chez le poulet

La technique d'électroporation *in ovo* est une stratégie originale dans le champ des HSF, permettant d'analyser par surexpression d'HSF2, ses effets au cours du développement du tube neural de l'embryon de poulet. Ce travail présente l'évaluation des effets de la surexpression des différents isoformes de HSF2 murin sur la prolifération des progéniteurs du tube neural par quantification de l'incorporation de BrdU. La variabilité liée au protocole expérimental a vite été un frein à l'analyse classique des données. Il a donc fallu dans un premier temps, définir les paramètres qui influençaient les mesures et en tenir compte. Il s'agit de différents paramètres liés à la variabilité du fond génétique des embryons de poulet, à l'efficacité de l'électroporation et à l'efficacité d'incorporation du BrdU. Dans un second temps, en collaboration avec Thomas Tully (Ens, Paris), nous avons procédé à une analyse statistique des données par la méthode d'analyse hierarchisée. Cette approche est peu commune, du moins dans le champ d'étude des HSF. Elle apporte des outils nouveaux pour quantifier de façon objective les effets faibles du facteur HSF2 et ajoute un argument supplémentaire en indiquant que HSF2 pourrait modifier *in vivo* la prolifération des progéniteurs neuraux.

### 2.2.1 Article 3 : Trouillet, Tully et Mezger, manuscrit en préparation

**Impact of hierarchical statistical analyses on the understanding of the role of HSF2 in the proliferation of neural progenitors**

Diane Trouillet*, Thomas Tully* and Valérie Mezger

* These authors contributed equally to this work

Ce manuscrit est actuellement en préparation.

# Impact of hierarchical statistical analyses on the understanding of the role of HSF2 in the proliferation of neural progenitors

Diane TROUILLET[1§], Thomas TULLY[2§] and Valérie MEZGER[1*]

1. CNRS UMR8541, Laboratoire de Biologie Moléculaire du Stress, CNRS UMR8541, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris, France

2. Laboratoire de Fonctionnement et Évolution des Systèmes Écologiques, CNRS UMR 7625, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: mezger@biologie.ens.fr

§ co-first authors

**Keywords**: Heat Shock Factors, neural development, proliferation ventricular zone, hierarchical statistical analysis.

# Abstract

The typical, or even archetypical, strategy for analysing the role of a transcription factor (TF) *in vivo* consists in doing a succession of qualitative analyses using knocked-out mice or cell line models. This approach has proven successful in studying TF with strong effects on the expression levels of their target genes. However, when transcriptional regulation is mediated by a TF reputed having only moderate effects on transcription, like in the case of Heat Shock Factor 2, result objectivity of is more difficult to estimate, and experimental noise disturbs analyses. In an attempt to remedy to this limit, we adopted an analysis strategy, which have been successfully applied in the ecology field, but is original in the field of cell processes: the hierarchical statistical analyses. This strategy has permitted us to establish a still unknown effect of HSF2 *in vivo* on the proliferation of cells of the chick neural tube. Moreover, this analysis corroborates the new quantitative approach in biology, allowing a better apprehension of complex mechanisms.


# Introduction

Biological approach depends on apprehension of life complexity. But “complexity” is a term that is inversely related to the degree of understanding of one given process. In multicellular eukaryotes, the level of expression of a single gene is often determined by the integrated effects of many different transcription factors (TFs) also named the enhanceosome. The multi-level regulatory networks formed by genes and TFs determine how an organism will develop and respond to some stimuli. Intricate fine-regulation can take place on the TF function. How to estimate this fine regulation *in vivo* and which experimental approach could be rigorous? Complexes phenomena in biology need pluridisciplinary approach. Indeed, common flaw exist in biologists approach problems, which request more unambiguously

understanding. Current qualitative analyses ought to be completed by quantitative analysis including more statistical analyses and modelling in order to perfect living knowledge.

When working on biological organisms, even if individual organisms are kept in similar conditions and carefully submitted to the same treatment, traits under study are usually found to vary a lot between individuals. This can be due to uncontrolled genetic or epigenetic differences between individuals, but also to uncontrolled microenvironmental fluctuations. Even in a controlled environment, the same genotype car produce different phenotypes due to developmental noise. These different sources of variability, if not correctly taken into account, can strongly affect and hide the effect of a treatment. Mixed effect statistical models were designed to take into account these hierarchical levels of variability (Pinheiro & Bates, 2000). We applied such a model to the effects of HSF2 overexpression in the chick neural tube (Trouillet *et al*, submitted), in order to investigate the involvement of HSF2 in neural cell proliferation.

Heat shock factor (HSF) was identified the first time as specific transcriptional regulators of the chaperone Heat Shock Proteins (*Hsp*) expression in *Drosophila* cell upon stress stimulation. A large variety of environmental proteotoxic stresses, such as increase in temperature, triggers the highly conserved heat shock response (HSR), which is characterized by the transcriptional activation of the so-called very conserved *Heat Shock* genes (*Hsp*). Heat Shock Proteins are mostly molecular chaperones that are able to assist protein refolding or degradation, thereby rescuing the cell from proteotoxic damages due to protein unfolding, misfolding or aggregation (Akerfelt *et al.,* 2007; Pirkkala *et al.*, 2001; Wu, 1995). The multigenic family of Heat Shock Factors (HSF) (Pirkkala *et al.*, 2001) includes HSF1 and HSF2, two factors that are found among all vertebrates, HSF4 which is only found in mammals and HSF3 which is present in birds. These factors share a very conserved winged-

helix-turn-helix DNA-binding domain which recognizes heat shock elements (HSE) in the regulatory region of *Hsp* gene and a leucin-zipper trimerization domain. In mammals, HSF1 is the main stress responsive factor indispensable for the induction of the HSR and the acquisition of thermotolerance. In avians, HSF1 and HSF3 are both induced by heat shock depending of the severity of the stress, but HSF3 is the major factor mediating the HSR. Since HSF2 was reported as being inactivated by heat shock, its role in the HSR has long remains elusive, but increasing studies suggest that HSF2 may modulate the effect of HSF1 in the stress-induced activation of heat shock genes (He *et al.,* 2003; Ostling *et al.*, 2007; Paslaru *et al.*, 2003). HSFs are also involved in normal conditions during development. HSF1 is essential for mouse preimplantation embryogenesis, while mouse HSF4 and HSF1 are required for lens and olfactory epithelium development (reviewed in Åkerfelt *et al.*, 2007).

*Hsf2* knock-out mice display meiosis defects and brain abnormalities (Kallio *et al.,* 2002; Wang *et al.*, 2003).-We have shown that HSF2 is involved in the migration of young post-mitotic neurons in the developing cortex (Chang *et al.*, 2006). In addition, since HSF2 is expressed at all stages of corticogenesis in the proliferative neural stem cells (NSCs) or progenitors (NPs) located along the ventricles; we suspected that HSF2 might be involved in the proliferation, survival or differentiation of these NSCs/NPs. However, first, controversial results were reported concerning the effect of *Hsf2* gene inactivation in mice, since in one study no effect of the lack of HSF2 was observed (McMillan *et al.*, 2002). Second, the extent to which HSF2 modulates the transcription of its target genes is very modest, especially in the case of HSF2β which is major HSF2 isoform expressed in brain (Chang *et al.,* 2006 ; Ostling *et al.*, 2007; Sarge *et al.*, 1993; Sistonen *et al.*, 1992; Trouillet *et al.*, submitted). Although the first point could be due to differences in mice genetic backgrounds or in the molecular strategies of *Hsf2* gene inactivation, these two facts prompted us to design a complementary approach to these rather qualitative and loss-of-function approaches. First, we created a gain-

of-function system to overexpress mHSF2 in the neural tube (Trouillet *et al*., submitted) and examined its effects on the proliferation of NCSs/NPs. Second, we applied an advanced statisical analysis to study these effects.

To assess the potential function of HSF2 during neural progenitors proliferation in neural tube, we decided to analyse the effects of mHSF2 overexpression in the chick neural tube in a complementary approach to mice knock-out studies.

*In ovo* electroporation is a useful gain-of-function method to study transient and efficient overexpression, in particular of TF (for review, see Itasaki *et al.,* 1999; Nakamura & Funahashi , 2001; Nakamura *et al.*, 2000; Trouillet et al., submitted). It consists in injecting DNA vector in chick embryo at 10HH and in subsequently applying an electric field, using electrodes, in order to target specific embryonic areas. The negatively charged DNA constructs move in the electric field to the anode, so the cathode side serves as internal control in the same embryo. In this study, we used *in ovo* electroporation to overexpress different HSF2 isoforms (Fiorenza *et al.,* 1995; Goodson *et al.*, 2001; Material and Methods). In a former study, we demonstrated that *in ovo* electroporation could be applied to Heat Shock Factors, and in particular to mouse HSF2, in that the electric shock delivered by *in ovo* electroporation does not activate HSR. *In ovo* electroporation triggered HRS which could have biased the effect of mHSF2 overexpression *via* endogenous cHSF activation and HSP overexpression, which is known to affect HSF activity and development. We also showed that overexpressing HSF2 isoforms have differential effects on the transcription of some developmental target genes in the chick neural tube (Trouillet *et al*., submitted). In order to assess the proliferation rate in neural tube, BrdU was incorporated during chick development for one hour.

This approach, like all experiment strategies depends on uncontrolled parameters, representing limits of any experiments. As already mentioned above, bias can entail experiment in the analysis or reporting of findings. Variability is one well-known problematic parameter and compromises analyses at various steps and degrees, if not taken into account in the experimental design. Electroporation is a very powerful and simple technique, which offers the advantage of being easily reproduced on a large number of eggs. However, each electroporation experiment presents various sources of variability. The first variability parameter depends on inter-individual variability. This is especially important in the case of chick embryos which derive from hens strains whose genetic background is not pure. The second parameter results from variability in electroporation efficiency, since neither all parts of the embryo do receive equal quantity of DNA, neither are they exactly submitted to the same electric field. Electroporation efficiency depends on embryos themselves, DNA purity - in terms of electrolyte abundance- and electroporation material quality. The last variability parameter is defined by an uncontrolled BrdU entry into the neural tube. BrdU solution was injected under vitelline membrane in homogeneous manner, but metabolization of this thymidine analogue remains undetermined. So neural tube cells, during S phase, do not all receive the same BrdU quantity. All these parameters were brought together in an analysis by a hierachical model which take them all into account. Large numbers of electroporated or control embryos were considered in this study to increase significance. A lot of research findings concluded solely on the basis of a single study assessed by formal statistical significance, typically for a p-value less than 5%. We have chosen a better global analysis. Because the probability that a research finding is indeed true must be calculated, we considered the statistical power of the study and the level of statistical significance.

In this study, we demonstrate that HSF2 is implicated during proliferation process of neural tube progenitors, the HSF2 overexpression by *in ovo* electroporation indeed increase the BrdU-labelled cells in chick neural tube.

.

# Material and Methods

*DNA constructs for overexpression*

pAdRSV-Sp-HSF2 α or β, allowing overexpression of isoform HSF2 α or β are described in Trouillet *et al*. (submitted). Plasmid pBKΔHSF2-HA was generated from the excision of a XmnI fragment of HSF2 cDNA from plasmid pBK-HSF2 β in order to overexpress an inactive mHSF2 protein, with a deletion in the end of the DNA-binding domain and in the oligomerization domain, tagged with HA.

In ovo *Electroporation*

Commercial fertilized hens eggs were incubated in a humidified room at 38°C for the required time period to obtain stages 10HH (32 hours in our conditions). Eggs were windowed to get access to the embryos. DNA was resuspended at a concentration of 1 μg/μL in 10 mM Tris (pH 8) solution, and 0.025% Fast-Green dye (Sigma) was added to facilitate the control of DNA injection. Plasmid pBKΔHSF2, pAdRSV-Sp-HSF2 α or β was co-injected with pEGFP-N1 (Clontech) (2:1) to assess the area of efficient electroporation. The DNA construct mix was microinjected into the neural tube groove using a stretched glass capillary. A drop of L15 medium (Invitrogen, SARL France) was deposited onto the embryo and electroporation was performed with Electro Square Porator ECM830 (BTX)(Giudicelli *et al.*, 2001). The two electrodes were placed at each side of microinjected embryo, and four square pulses of 25-30 V, and 50 ms at a frequency of 1 Hz was applied for each embryo (see Figure1). After 24 hrs of post-electroporation incubation (unless otherwise indicated), embryos were collected and the efficiency and localization of DNA entry was monitored by

EGFP expression in the electroporated embryos by fluorescence microscopy. BrdU (SIGMA), an analog of thymidine, was then injected through vitellin membrane of embryos, which were further incubated in the presence of BrdU at 38°C for one hour.

*Immunochemistry*

Embryos were fixed in Bouin fixative or in 4% PFA in PBS, embedded in paraffin and cut into 7-µm sections. Dry sections were treated with $NH_4Cl$ 50mM/PBS for 30 min at room temperature. Blocking was performed during 60 min at room temperature with 0.3% $H_2O_2$, 3% BSA, 0.5% Triton X/PBS. Incubation with primary antibodies anti-BrdU (BD, dilution 1:500) was performed overnight at 4°C. The following secondary antibodies were used at 1:400 dilutions: Alexa 488 and 568-coupled goat antibodies against rabbit IgG (Molecular Probes).

*Fluorescence picture acquisition*

Slide observations and pictures were taken on Leica DMRB microscope with a digital camera DC300F coupled to Leica FW4000 computer program. Confocal pictures of fixed cells were acquired under 10x objective lenses on a Leica (Nussloch, Germany) DM-IRB inverted microscope with a CCD camera (Micromax; Princeton Instruments, Trenton, NJ). For illustration, was used with ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/) or Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

*Imaging analysis*

On each picture, an electroporated positive zone is selected by assess GFP fluorescence. In the same picture, the same area of this selected zone was also considered to the side on the neural tube which does not receive DNA and within these areas in both neural

tube sides, the number of BrdU labelled cells were estimated in pixel² by using ImageJ plugin (http://rsb.info.nih.gov/) and reported to selected area. All data are treated under R free software (http://www.r-project.org/).

*Statistics*

We studied 18 embryos. These embryos were divided into five groups according to the kind of DNA construct with which they were inoculated. Three embryos were mock-electroporated (no DNA-construct ; later called "control") ; four embryos were electroporated with pEGFP-N1 only ("GFP control") ; four with a construction with pAdRSV-Sp-HSF2 α for overexpression of isoform HSF2α ; four with pAdRSV-Sp-HSF2 β for overexpression of isoform of HSF2β and three with pBKΔHSF2-HA for overexpression of an inactive HSF2 form. After 24 hours, embryos were harvested and two or three regions of the neural tube were isolated. Each region was then cut into 1 to 6 slices (2.5 on average). After immunohistochemistry, each slice was analysed by confocal microscopy by taking an average of one picture every 10 micrometers (one to seven pictures, on average 5.3 pictures per slice). 856 measurements were made. But these measurements were obviously not independent. Indeed, they are dependent in a hierarchical way: several focal are included within a slice, slices are included within region, regions are included within embryo and embryos are included within treatment. The data are structured in a similar way as data collected in educational research, where pupils are nested within class, class are nested within school and school nested within geographical regions for instance. The data (proportion of surface measured) were analyzed with linear mixed effect model. We used the function lme (linear fixed effects) of the package nlme from the R statistical package (Ihaka and Gentleman 1996). We used side (electroporated *versus* control) as treatment (two types of controls and three types of isoforms) as a categorical covariates and we used the codes attributed to each focal, each slice, each region and each embryo as five hierarchically nested random effects. We

looked for heteroscedasticity (variance heterogeneity) in the data and we took it into account using the variance function structures (varIdent) available in the nlme library that enables residual variance to vary between groups. The effects of electroporation, treatments and their interactions, but also of random effects and of heteroscedasticity were studied and tested by comparing nested models with likelihood ratio tests. Model parameters and their confidence intervals were estimated with restricted maximum likelihood methods (Pinheiro and Bates 2000). The estimates provided by the mixed linear model are the estimated values for a mean focal from a mean slice from a mean region from a mean embryo in specific electroporation conditions. The difference of BrdU-labelled cells area in function of selected area between electroporated side and control side are represented the rate of difference, $\chi^2_1$ correspond to $\chi^2$ with 1° of liberty and P is the p-value according to t-student test.

# Results

To assess the potential function of HSF2 during neural progenitors proliferation in neural tube, we decide to analyse the effects of mHSF2 isoform overexpression in the chick neural tube. As a first approach to study cell proliferation into the chick neural tube, we analyzed the rate of BrdU incorporation during chick development for one hour.

*Test of analysis strategy: proliferation is not modified in control conditions*

BrdU incorporation was analysed in both sides of the neural tube in non-electroporated embryos (Control, Figure1, a) or in electroporated embryos with injection of GFP reporter expression vector only to assess electroporation effects on neural tube development (GFP, Figure 1, b). We found no differences in the mean BrdU positive cell area between the two sides of the neural tube in non-electroporated embryos (Control, Fig. 1 a; $\chi^2_1$=1.04, P=0.30) and between the side that received DNA and the side that did not receive DNA of the neural tube in pEGFP-N1 injected and electroporated embryos (GFP control, Figure 1 b; $\chi^2_1$=2.8, P=0.09). Moreover, on average, the BrdU-labelled cells areas did not differ between the two control treatments (mean=25.1%, $\chi^2_1$=1.07, P=0.58). The two control conditions did not differ in the levels of BrdU incorporation. Therefore, electroporation by itself does not affect BrdU incorporation levels. This BrdU incorporation strategy can therefore be used to investigate the effect of HSF2 overexpression.

*The overexpression of HSF2 isoforms globally increase BrdU incorporation*

For convenience, the side of the neural tube which does not receive DNA in electroporation experiments will be called “control side”, whereas the side which receives

DNA will be sated as “electroporated” side. As stated above, HSF2 is strongly expressed in the actively dividing NSCs/NPs of the neural tube. To check this hypothesis, we overexpressed HSF2 by *in ovo* electroporation in chick neural tube. Mouse HSF2 isoform α or β expression construct was transfected by *in ovo* electroporation on the right side of the neural plate proneural tube of 10 HH embryos. The number of BrdU labelling cells was increased in the electroporated side of chick neural tube as estimated by the number of nuclei (Figure1).

In order to investigate the effect of HSF2 overexpression and to compare the effect of several HSF2 isoforms, we compared the “electroporated” and “control” sides of the embryos electroporated with α, β or Δ isoforms. Upon HSF2 α overexpression, the electroporated side of the embryo displayed a significantly higher level of BrDU incorporation of 12.5% than the control side (rate= +4.25 [2.5-6.0], $\chi^2_1$=23.5, P<0.001)(Figure2). A similar effect in the electroporated side (14.7%) was found when Hsf2 β was overexpressed (rate= +5.9 [4.5-7.3], $\chi^2_1$=39.2, P<0.001), indicating that the effect induced by Hsf2 β was slightly significantly higher than the one induced by HSF2 α ($\chi^2_1$=49, p<0.001)(Figure2). In contrast, overexpression of HSF2 Δ inactive form induced a reduction of 9.8% in the amount of incorporated BrdU in the electroporate side (rate =-2.7 [-5.5-0.05], $\chi^2_1$=13.8, P<0.001) (Figure2).

# Discussion

In the developing vertebrate, the neural tube gives rise to the central nervous system, which comprises the brain and spinal cord. Chick embryo has been an excellent experimental model for understanding of cell migration and lineage in neural tube. In this paper, using *in ovo* electroporation coupled with hierarchical statistical analysis, we demonstrated that overexpressed transcription factor HSF2 increased the incorporation of BrdU in chick neural tubes .So, HSF2 is able to modulate the proliferation of neural tube progenitors. In our preliminary experiments, no differences were observed during neuronal differentiation when HSF2 isoforms were overexpressed, as suggested by similar numbers of Tuj-1-labeled cells were identical in each condition of electroporation. Tuj1 antibody recognizes class III β-tubulin, a neuronal marker expressed in early differentiated neurons (Geisert & Frankfurter, 1989; data not shown). But this preliminary result requires careful hierarchical statistical analysis. More experiment on the disturbance of cell cycle must be realized.

Surprisingly, when ΔHSF2 was electroporated into neural tube, a decrease of number of BrdU labelled cells was observed. ΔHSF2 form carries a deletion, resulting on a HSF2 form which is inactive for trimerization and DNA-binding. Different hypotheses can explain the potential action of ΔHSF2 overexpression. First, overexpressed ΔHSF2 could associate with endogenous cHSF2, which is expressed and active for DNA-binding in neural tube and trap it out of the nucleus or simply prevents its physiological action on its target genes. More experiment must be performing to test this hypothesis: the subcellular localization of ΔHSF2 which carries HA-tag and of endogeneous cHSF2 should be checked. In addition, the effect of ΔHSF2 on the DNA-binding activity of cHSF2 could be estimated using by EMSA. Second, if ΔHSF2 modulate proliferation of progenitor, the action of ΔHSF2 is maybe performed *via* additional protein interactions, which does not include HSF2 intrinsic transcriptional abilities,

for example interaction with global chromatin remodelers (Sullivan *et al.,* 2001; Tu *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2005) or other transcription factors like SP factors (Chang *et al.,* 2006), which are known HSF partners. Titration of such partners by ΔHSF2 would prevent cHSF2 to perform its role in the proliferation of neural NSCs/NPs.

The advantage of the present study is to demonstrate that statistical approach is very useful to evaluate the impact of overexpression of HSF2 on cellular process as proliferation *in vivo* condition. Moreover, this approach is quite original in HSF field. With this approach we could investigate the function of HSF2 during neural tube development, especially during the proliferation of progenitors.

Different reports proposed that HSF2 is linked to cell cycling, but any assess quantitatively the function of HSF2 *in vivo*. HSF2 was shown to bind the *Hsp70* promoter in mitotic cells, preventing compaction of this promoter by interaction with condensin (Xing *et al.*, 2005). Function of bookmarking allows specific genes to be able to be activated in the early G1 phase of the cell cycle. In this way, if genes are not bookmarked, this would perhaps delay the transcription of usually bookmarked genes until later in G1 (Sarge & Park-Sarge, 2005; Xing *et al.*, 2007). Recent results have shown that sumoylation of HSF2 is upregulated in a mitosis-dependent manner (Xing *et al.*, 2007). Other~~s~~ HSFs seem~~s~~ to be involved during cell cycling. HSF3 directly binds to c-myb proto-oncogene product (c-Myb). c-Myb is induced at G1/S transition in the cell cycle and plays an important role in the regulation of cellular proliferation and apoptosis. p53 directly binds to HSF3 and inhibits the c-Myb-induced activation of HSF3 particularly in DT40 chicken cells (Tanikawa *et al.*, 2000). HSF1 has been shown to associate with Brg1 (Sullivan *et al.*, 2001), Brg1 complexes, belonging to SWI/SNF complexes, remodels nucleosomes to alter transcription in cell cycle manner. HSF1 whose DNA-binding activity is induced during the G1 phase (Bruce *et al.*, 1999) also associates with complexes containing INI1/ SNF5, which are also conserved components of

the SWI/SNF complex (Sullivan *et al.,* 2001). Moreover, HSF4 interacts with Brg1 containing complexes during the G1 phase of the cell cycle (Tu *et al.*, 2006). These various studies suggested a global function of HSF during cell cycle: to regulate HSP expression in proliferating cells to prevent apoptosis events. During chick neural tube development, the function of HSF2 during cell cycle remains to discover, and its target genes could be distinct from *Hsp* gene. But, this study establishes without doubt that HSF2 is implicated during the proliferation of progenitor during central nervous system development.

# Legends of Figures

**Figure 1. HSF2 effects on the proliferating rate of neural progenitors.** Chick embryos were *in ovo* mock-electroporated (with no DNA; control) or *in ovo* electroporated with various expression vectors : pEGFP-N1 only (GFP; b) ; pAdRSV-Sp-HSF2 α and pEGFP (HSF2α; c) ; pAdRSV-Sp-HSF2 β and pEGFP (HSF2β vector; d); or pBKΔHSF2-HA (ΔHSF; e). GFP expression was used to assess electroporation efficiency and to detect the side that receive DNA (in green; b-e). Embryos were then subjected to one hour BrdU pulse labelling immediately before collection 24 hrs following electroporation. BrdU immunodetection (in red) was performed on 10 µm transversal paraffin sections of neural tube (a-e). Control mock-electroporated (a) and pEGFP-N1 electroporated (b) chick embryos present no BrdU-labelling differences between the two sides of neural tube. HSF2 α and β overexpression increased the rate of proliferating neural progenitors in the electroporated side of the neural tube (c-d). In contrast, ΔHSF2 overexpression decreases the proliferating rate of neural progenitor cells. To assess the potential difference between the number of BrdU labelled cells of electroporated or not side of neural tube, a statistical approach was necessary because many pictures were been analysed with a little difference. So, the biological relevance was been estimated. Moreover, the variability intra and inter embryo had to be considered.

**Figure 2. Statistical analysis of the proliferating rate according the electroporated conditions**. The proliferating rate was determined by local analyses of the sides of the neural tube, using ImageJ count plugin. For each condition, three embryos (control and GFP conditions) or four embryos (HSF2 overexpression) were used for each analysis, four to five sections per embryos are observed by Leica confocal, permitting to analyse a picture each

1μm. Slope of the differences between “electroporated” and “control” sides are represented here.

# References

Akerfelt M, Trouillet D, Mezger V, Sistonen L (2007) Heat shock factors at a crossroad between stress and development. Ann N Y Acad Sci : .

Bruce JL, Chen C, Xie Y, Zhong R, Wang YQ et al. (1999) Activation of heat shock transcription factor 1 to a dna binding form during the g(1)phase of the cell cycle. Cell Stress Chaperones 4: 36-45.

Chang Y, Ostling P, Akerfelt M, Trouillet D, Rallu M et al. (2006) Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression. Genes Dev 20: 836-847.

Fiorenza MT, Farkas T, Dissing M, Kolding D, Zimarino V (1995) Complex expression of murine heat shock transcription factors. Nucleic Acids Res 23: 467-474.

Geisert EEJ, Frankfurter A (1989) The neuronal response to injury as visualized by immunostaining of class iii beta-tubulin in the rat. Neurosci Lett 102: 137-141.

Giudicelli, F;Taillebourg, E;Charnay, P;Gilardi-Hebenstreit, P (2001) Krox-20 patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. Genes Dev, 15: 567-580.

Goodson ML, Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Park-Sarge OK et al. (2001) Sumo-1 modification regulates the dna binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. J Biol Chem 276: 18513-18518.

He H, Soncin F, Grammatikakis N, Li Y, Siganou A et al. (2003) Elevated expression of heat shock factor (hsf) 2a stimulates hsf1-induced transcription during stress. J Biol Chem 278: 35465-35475.

Ihaka, R. and Gentleman, R. (1996). R: A language for data analysis and graphics, *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**, 299-314.

Itasaki N, Bel-Vialar S, Krumlauf R (1999) 'shocking' developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. Nat Cell Biol 1: E203-7.

Kallio M, Chang Y, Manuel M, Alastalo T, Rallu M et al. (2002) Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in hsf2 null mice. EMBO J 21: 2591-2601.

McMillan DR, Christians E, Forster M, Xiao X, Connell P et al. (2002) Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. Mol Cell Biol 22: 8005-8014.

Nakamura H, Funahashi J (2001) Introduction of dna into chick embryos by in ovo electroporation. Methods 24: 43-48.

Nakamura H, Watanabe Y, Funahashi J (2000) Misexpression of genes in brain vesicles by in ovo electroporation. Dev Growth Differ 42: 199-201.

Ostling P, Björk JK, Roos-Mattjus P, Mezger V, Sistonen L (2007) Heat shock factor 2 (hsf2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with hsf1. J Biol Chem 282: 7077-7086.

Paslaru L, Morange M, Mezger V (2003) Phenotypic characterization of mouse embryonic fibroblasts lacking heat shock factor 2. J Cell Mol Med 7: 425-435.

Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. FASEB J 15: 1118-1131.

Pinheiro J. C. and Bates D. M. (2000). Mixed-effects models in S and S-PLUS, Springer, New York

Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI (1993) Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of dna-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. Mol Cell Biol 13: 1392-1407.

Sarge KD, Park-Sarge O (2005) Gene bookmarking: keeping the pages open. Trends Biochem Sci 30: 605-610.

Sistonen L, Sarge KD, Phillips B, Abravaya K, Morimoto RI (1992) Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. Mol Cell Biol 12: 4104-4111.

Sullivan EK, Weirich CS, Guyon JR, Sif S, Kingston RE (2001) Transcriptional activation domains of human heat shock factor 1 recruit human swi/snf. Mol Cell Biol 21: 5826-5837.

Tanikawa J, Ichikawa-Iwata E, Kanei-Ishii C, Nakai A, Matsuzawa S et al. (2000) P53 suppresses the c-myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. J Biol Chem 275: 15578-15585.

Trouillet, D., Paslaru, L., Gilardi-Hebenstreit, P., Mezger, V. *In Ovo* Electroporation: a useful method for gain-of-function analysis of the role of HSFs during development. Submitted to *Cell Stress and Chaperones*.

Tu N, Hu Y, Mivechi NF (2006) Heat shock transcription factor (hsf)-4b recruits brg1 during the g1 phase of the cell cycle and regulates the expression of heat shock proteins. J Cell Biochem 98: 1528-1542.

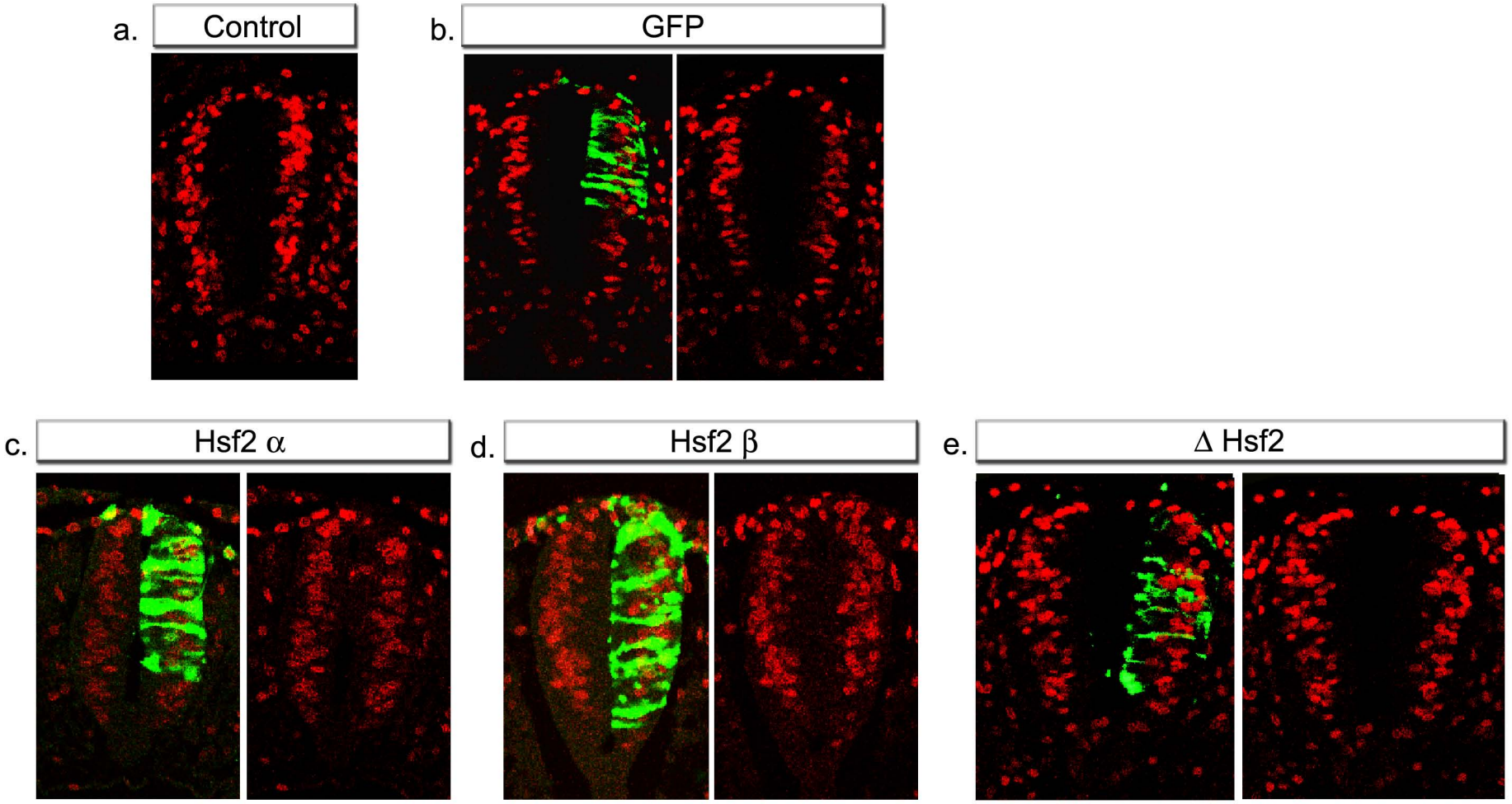
Wang G, Zhang J, Moskophidis D, Mivechi NF (2003) Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. Genesis 36: 48-61.

Wu C (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. Annu Rev Cell Dev Biol 11: 441-469.

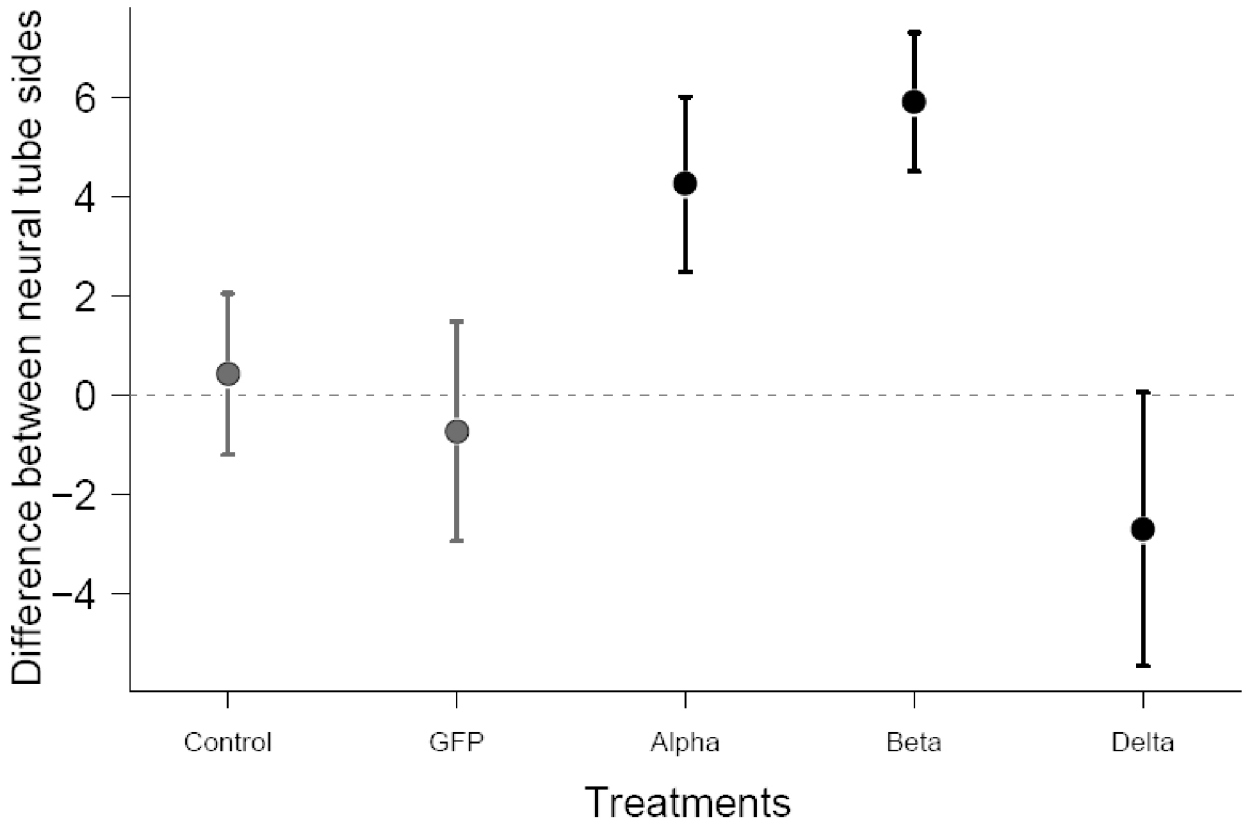
Xing H, Hong Y, Sarge KD (2007) Identification of the pp2a-interacting region of heat shock transcription factor 2. Cell Stress Chaperones 12: 192-197.

Xing H, Wilkerson DC, Mayhew CN, Lubert EJ, Skaggs HS et al. (2005) Mechanism of hsp70i gene bookmarking. Science 307: 421-423.

Figure 1



# Figure 2


Difference between neural tube sides
6
4
2
0
−2
−4
Control
GFP
Alpha
Beta
Delta
Treatments

### 2.2.2 Discussion et perspectives

La surexpression de mHSF2 par électroporation *in ovo* dans le tube neural de l'embryon de poulet, augmente significativement le taux de cellule ayant incorporé du BrdU. Cette observation est le premier argument en faveur d'un rôle de HSF2 au cours de la prolifération des progéniteurs neuraux au cours du développement. Chaque surexpression des isoformes du facteur mHSF2 ($\alpha$, $\beta$), dont les effets transcriptionnels ont été décrits comme différents sur leur cible *Hsp70*, n'a pas le même effet sur l'augmentation de la prolifération des progéniteurs. La forme HSF2$\beta$ semble avoir des effets plus importants que la forme $\alpha$ dans ce contexte cellulaire. Ces observations suscitent plusieurs hypothèses. HSF2 pourrait maintenir plus longtemps les progéniteurs dans un état prolifératif ou encore moduler la rapidité du cycle cellulaire de ces progéniteurs. Pour tester ces hypothèses, je réalise actuellement une quantification des cellules différenciées comme les neurones, pour évaluer le taux de cellules qui sortent du cycle cellulaire lorsque l'on surexprime mHSF2 dans le tube neural de l'embryon de poulet. D'autre part, des études supplémentaires sont entreprises au laboratoire pour comprendre les effets de la surexpression de la forme HSF2 tronquée dans son domaine de liaison à l'ADN, agissant dans nos conditions comme un dominant négatif.

Un certains nombre de questions émanent de cette étude présentée dans l'article 3. Les effets de HSF2 sur le cycle cellulaire et son mécanisme d'action reste encore à élucider. De même, lanalyse des effets de la surexpression de HSF2 sur les cHSF endogènes mériteraient être approfondie. Mais le fait que HSF2 module le taux de prolifération des progéniteurs dans le tube neural en développement suggère une potentielle action au cours de la prolifération des progéniteurs dans le cortex cérébral en développement, ce que nous avons évalué dans l'article suivant.

# Chapitre 3

# Implication du facteur HSF2 dans la prolifération et la différenciation

Comme nous l'avons vu précédemment, les cortex *Hsf2*$^{-/-}$ présentent une réduction de cellules de glie radiaire au moins à partir de E15 (article 1). Et, HSF2 est exprimée dans les cellules composant les zones prolifératives du cortex VZ et SVZ. De plus, les observations issues de l'analyse des effets de la surexpression de HSF2 dans le tube neural de l'embryon de poulet (article 3) suggèrent que HSF2 modulerait la prolifération des progéniteurs du tube neural chez le poulet. Afin de confirmer si HSF2 est impliqué dans les processus de prolifération, j'ai entrepris d'analyser *ex vivo* les cellules souches neurales et les progéniteurs du cortex en développement chez la souris. J'ai de plus, tenter d'évaluer les capacités de différenciation de ces cellules en culture.

Ma contribution dans ce travail a consisté à développer la technique de cultures de neurosphères et de cellules dissociées issues de cortex embryonnaires à E11,5 et E13,5 grâce aux conseils de Yorick Gitton (Muséum d'Histoire Naturelle, Paris) et Isabelle Caillé (IJM, Paris). Après avoir étudié la stratégie d'étude à utiliser, j'ai réalisé les méthodes de quantification et de marquage de ces cellules en culture.

Ce travail démontre que chez la souris, l'absence de HSF2 retarde la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales et des progéniteurs du cortex cérébral. Le mécanisme d'action de HSF2 au cours de ces processus reste à élucider. Ceci justifie le choix d'une discussion de l'article en français, démontrant aussi les perspectives envisagées au moment de la rédaction de ce document.

## 3.1 Article 4, Trouillet *et al.*, manuscrit en préparation

**Characterization of cortical neural stem cells/progenitors derived from *Hsf2*$^{-/-}$**

Diane Trouillet, Anne Le Mouel, Frédéric Larbret, Yunhua Chang et Valérie Mezger

manuscrit en préparation.

# Characterization of cortical neural stem cells/progenitors derived from HSF2 null mutant

Diane TROUILLET[1], Anne LE MOUËL[1], Frédérique LARBRET[2], Yunhua CHANG[2] and Valérie MEZGER[1]

1. Laboratoire de Biologie Moléculaire du Stress, CNRS UMR8541, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, France

2- Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité U790, Pavillon de Recherche 1, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.

**Keywords**: Neural stem cells/progenitors, neurosphere, specification, Heat Shock Factors.

# Introduction

Heat shock factors (HSFs) were identified in eukaryotes as specific transcriptional regulators of heat shock genes (*Hsp*) upon stress (Pirkalla *et al.,* 2001; Warren, 2002; Akerfelt *et al.,* 2007). A large variety of environmental stresses, which have in common to denature cellular proteins and to cause their cytotoxic aggregation, triggers the well-conserved heat shock response (HSR): temperature elevation (heat shock), exposure to ethanol, amino-acid analogs and heavy metals or pathophysiological situations (fever, aging, neuronal injuries…). In higher eukaryotes, HSR is characterized by the activation of a latent transcription factor HSF, which drives the transcription of *Hsp* genes encoding the very conserved Heat Shock Proteins (HSP; Pirkalla *et al*., 2001). Most HSPs are molecular chaperones which dissociate aggregates, assist renaturation of damaged polypeptides, or drive them into proteasome-assisted degradation.

In their N-terminus region, HSFs share a winged-Helix-Turn-Helix DNA-binding domain, which recognizes a conserved heat shock element (HSE) in the regulatory region of heat shock genes, and a leucine-zipper trimerization domain. In constrast, their C-terminal domain, which governs transcriptional abilities, is very variable. A multigenic family of Heat Shock Factors (HSF) was characterized in vertebrates, of which HSF1 and HSF2 are present in all vertebrates, while HSF3 is only found in avian species and HSF4 is solely in mammals (Hilgarth *et al.,* 2004; Nakai & Morimoto, 1993; Nakai *et al.*, 1997; Rabindran *et al.*, 1991; Sarge *et al.*, 1991). Mammalian HSF1 is the paradigm for the activation of heat shock gene transcription in response to stress. HSF1 is present in a monomeric, inactive state in normal conditions, but becomes nuclear, trimeric and able to strongly activate the transcription of heat shock genes upon stress. HSFs are not only responsible for the cellular response to environmental proteotoxic stress, but

are also involved during development (for review see: Pirkkala *et al.*, 2001; Akerfelt *et al.*, 2007). HSF1 is essential for mouse preimplantation embryogenesis (Christians *et al.*, 2000), while mouse HSF4 and HSF1 are required for lens and olfactory epithelium development, with cooperative or opposing effects depending on target genes (Fujimoto *et al.,* 2004; Min *et al.*, 2004; Takaki *et al.*, 2006). HSF2 which was discovered in stem cells (Mezger *et al.,* 1994; Sistonen *et al.*, 1992) is an enigmatic HSF, surprisingly inactivated by heat shock. In constrast to ubiquitous HSF1, HSF2 is abundant and active for HSE-binding during spermatogenesis and brain development but does not regulate *Hsp* genes (Alastalo *et al.,* 2003; Mezger *et al.*, 1994; Rallu *et al.*, 1997). We and others showed that the absence of HSF2 leads to meiotic defects in both genders and to brain abnormalities characterized by enlarged ventricles, reduced cortex width and hippocampus size (Kallio *et al.,* 2002; Wang *et al.*, 2003). Mouse cortex formation relies on two major processes: the proliferation of neural stem cells (NSCs) and of neural progenitors (NPs), as well as the migration of their postmitotic derivatives (for review see (Ayala *et al.,* 2007; Gupta *et al.*, 2002; Götz & Huttner, 2005; Müller *et al.*, 2006). During early corticogenesis, NSCs/NPS are located in the most inner part of the developing cortex - along the ventricles which contains the cerebrospinal fluid, in the so-called ventricular zone (VZ) - and generate postmitotic derivatives which migrate from the VZ to the outer part of the developping cortex.

Althoug it is not clear to what extent stem cells with multipotent properties exist thoughout cortical development, we chose to use the term stem cells in this paper to describe neural cells that are self-renewing, but not necessarily for an unlimited number of cell divisions, and are mutipotent. Before neurogenesis, the neural tube is composed of a single layer of neuroepithelial cells forming the neuroepithelium, and described as neural stem cells (NSCs). The

neuroepithelium looks pseudostratified because the nuclei of neuroepithelial cells migrate up and down the apical–basal axis during the cell cycle (interkinetic nuclear migration; Guerrier & Polleux, 2007; Götz & Huttner, 2005). With the onset of neurogenesis, the neuroepithelium transforms into a tissue with numerous cell layers, and the layer that lines the ventricle (the most apical cell layer that contains most of the progenitor cell bodies) is referred to as the ventricular zone (VZ). Therefore, mitosis occurs along the ventricle, while S phase locates at the outer surface of the VZ. Neuroepithelial cells give rise to a distinct, but related, cell type, the radial glial cells, which exhibits astroglial properties, but also retain neuroepithelial characteristics, including the expression of the intermediate-filament, nestin (Lendahl *et al.*, 1990). Radial glial cells represent more fate-restricted progenitors compared with neuroepithelial cells and successively replace the latter as cortical development progresses. As a consequence, most of the neurons in the brain are derived, either directly or indirectly, from radial glial cells (Fishell & Kriegstein, 2003; Kriegstein & Götz, 2003; Dehay & Kennedy, 2007). A second population of prolifarative cell, even more restricted cell fate, majorly populate subventricular zone (SVZ) of the developping cortex at the midle of neurogenesis (Bayer *et al.,* 1991; Noctor *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 2004). So, according to the protomap model, it was supposed that NSCs/NP of VZ are composed that heterogenous population of cells (Zimmer *et al.*, 2004). The difficulty of characterizing these heterogeneous NSCs/NPs resides in the fact that only few specific markers for each NSC/NP population are currently available.

HSF2 is active at all stages in the neuroepithelium and proliferative neural progenitor cells (NSCs/NPs) of VZ (Chang *et al.,* 2006; Kallio *et al.*, 2002; Rallu *et al.*, 1997). But at the end of gestation (from day 15.5 *postcoïtum*), HSF2 is also present and active for DNA-binding in the cortical plate (CP) during the establishment of the most superficial neuronal layers of the cortex.

In correlation with this pattern of expression, we first identify radial neuronal migration of the most superficial post-mitotic neurons of CP to be affected by the lack of HSF2 (Chang et al., 2006). However, we suspected that the proliferation, survival or differentiation of dividing NSCs/NPs in VZ might be affected by HSF2 at earlier stages.

In addition to the striking expression of HSF2 at all stages in the VZ and SVZ of the developping cortex, a number of considerations led us to suspect that HSF2 might be involved in the proliferation, maintenance or differentiation of NSCs and NPs. First, we observed a deficit in the number of radial glia cells in the developping *Hsf2*$^{-/-}$ cortices (Chang *et al*., 2006). A reduction in the number of Cajal-Retzius cells was also suggestive of proliferation problems (although this could also result from tangential migration problems). Second, mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from *Hsf2*$^{-/-}$ embryos display proliferation impairment (Paslaru *et al*., 2003). Finally HSFs exhibit regulation of their activities depending on cell cycle phases: HSF1 is activated for DNA-binding at the G1 phase (Bruce *et al.*, 1999); HSF1 influences cell cycle behavior and ploidy regulation in malignant cells (Wang *et al.*, 2004) and activated HSF1 plays a key role in the anchorage independent growth and protection against apoptosis (Khaleque *et al.*, 2005). HSF3 directly binds to c-myb proto-oncogene product (c-Myb), inducing the G1/S transition, regulating proliferation and apoptosis. p53 directly binds to HSF3 and inhibits the c-Myb-induced activation of HSF3 (Nakai & Ishikawa, 2001; Tanikawa *et al.*, 2000). In addition, HSF4 interacts with Brg1, a component of the chromatin remodelling SWI/SNF complexes, during the G1 phase of the cell cycle (Tu *et al.*, 2006). These various studies suggested a global function of HSF during cell cycle. HSF2 binds the *Hsp70* promoter in mitotic cells, and is implicated in its decondensed chromatin status during mitoses called “bookmarking” (Xing *et al.*, 2005). The presumptive function of bookmarking allows specific genes to be able to be activated in the early G1 phase of the cell cycle (Xing *et al*., 2005).

In this study, we first show that *Hsf2*$^{-/-}$ cortices display reduction in size and *in vivo* BrdU incorporation defects. Next, we analysed the proliferation and differentiation of NSCs/NPs derived from *Hsf2*$^{-/-}$ *versus* wild-type developing cortices using neurosphere cultures. We showed that *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres display abnormal proliferation parameters and delayed commitment in neural differentiation. We also tried to characterize the impact of HSF2 on neural stem and progenitor cells by using different markers. We used LeX (SSEA1/CD15) (Capela & Temple, 2002; Capela & Temple, 2006; Davis & Temple, 1994) in FACS experiments, an extracellular matrix-associated carbohydrate which is expressing in primary mouse neural progenitors. LeX distinguishes highly proliferative cells in the primitive neuroepithelium, which therefore displays heterogeneity before the appearance of radial glia, and at later stages, labels progenitors with frequent radial morphology (Capela & Temple, 2006). The impact of HSF2 in the LeX positive stem cells and on nestin-labelled progenitors might be an alternative to this approach. Nestin, an intermediate filament (IF) protein, is expressed by most early neuroepithelial cells as well as radial glia proliferating progenitor cells in the cortex was used as a progenitor marker (Hartfuss *et al.*, 2001). As neurogenesis ends and migration begins, cells lose their immunoreactivity to nestin and begin expression of MAP-2 (Niinobe *et al.*, 1988) then the neuron-specific class III β-tubulin protein (Tuj1, Menezes & Luskin, 1994), which was used as markers of neuronal precusors (Cicero & Herrup, 2005).

Our i*n vitro* results suggest that HSF2 could influence the self-renewal and the neural differentiation of these cells.

# Materiels and Methods

*Animals and* in vivo *BrdU Incorporation*

*Hsf2* heterozygous mice described in Kallio *et al.* (2002) were maintained in a C57Bl/6 J x C57Bl/6 N mixed genetic background (backcross 3). Noon on the day of the vaginal plug was considered as E0.5. Pregnant heterozygous females were injected at E10.5 with 70 µg of BrdU per gram of body weight and sacrificied 2 hrs later. The genotype of the embryos was determined by PCR (Kallio *et al*., 2002). Brains were fixed overnight in Bouin fixative, paraffin embedded and cut into 14-µm coronal sections. Serial sections of prosencephalon were incubated with antibodies for 1 hr at room temperature or overnight at 4°C with rat BrdU antibody (BD Pharmingen ; dilution 1:100) and further incubated with goat anti-rat IgG peroxydase conjugate (Sigma; dilution 1:500). For manual counting of BrDU positive cells, 5 serial sections from 3 independent couples of wild-type and *Hsf2*$^{-/-}$ embryos were analyzed by dividing the presumptive cortical vesicles into 9 zones (Z1 to Z9) in order to verify whether differences in BrdU incorporation could be detected in a dorso-ventral manner.

*Cortical explants*

Cortical explants, dissected in ice-cooled L15 medium (Invitrogen SARL, France) were cut at E14.5 into 250-µm sections by vibratome and placed on a Millicell filters in Petri dishes (Millipore) containing neurosphere culture medium supplemented with EGF and FGF. After 6 days in culture in 5% $CO_2$ in this condition (which was initially an experimental design to detect differentiation without EGF and FGF for a neuronal differentiation or with 10% FCS for glial

differentiation after 6 days), slices were fixed with 4% PFA for 10 min and the persistence of NSCs/NPs was investigated.

*Cultures of dissociated neural stem cells/neural precursors and neurospheres*

Embryos (E11 and E13) were removed by caesarean section from sacrified pregnant mice. To produce neurospheres (Doetsch *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 2005; Reynolds & Rietze, 2005; Rietze & Reynolds, 2006), cortices were dissected using sterile tools and collected in separate plates under sterile conditions in PBS (Invitrogen SARL, France) on ice. The tissue was then placed into Trypsin-EDTA-PBS solution (Invitrogen SARL, France) to remove meninges. After PBS washes, cortices are incubated in activated papain solution (0.03% PBS, Worthington Biochemical) during 7 to 10 min. according to the embryo stage of development. To inactivate papain, ovomucoid inhibitor (Worthington Biochemical) and DNAse I (Sigma) were added in Neurobasal Medium (Invitrogen SARL, France) and cells are dissociated by repeated pipetting. After centrifugation, cellular pellets were resuspended in neurosphere medium comprising: Neurobasal Medium (Invitrogen SARL, France) supplemented with N2 (1% final; Invitrogen SARL, France), 2 mM glutamine, 0.6% (w/v) glucose, 0.02 mg/mL insulin, penicillin/streptomycin (Invitrogen SARL, France) and 15 mM Hepes. Cells were counted and plated at $10^6$ cells per mL in the neurosphere medium containing 10 ng/mL epidermal growth factor and 20 ng/mL fibroblast growth factor (EGF and FGF; Invitrogen SARL, France). For reseeding, cells were centrifuged, triturated with a P200 pipette and plated in 50% fresh medium. In some experiments cells from mouse cortex were plated without sorting and cultured for 2 days. For proliferation assays, neurospheres were plated at 5000 cells/mL onto polyornithine/laminin-coated cover-slip. To estimate NSCs/NPS growth rate, the ratio of the number of cells at various time (t) after seeding compared with the number of plated cells seeded at t0 was counted on three

passages (*i.e.* on three weeks). The number of dead cells in neurospheres was estimated at the time of cell dissociation by incubating the cell suspension 2 min. with trypan-blue 0.01% which is actively exported by living cells while dead cells become blue. To assess BrdU incorporation, cell suspensions were plated 25,000 cells/mL and supplemented with 2µM BrdU (Sigma). After 24 hours, the cells were fixed and immunolabeled with with anti-BrdU (BD Pharmingen; 1:500).

*Neurosphere Size*

Neurosphere surfaces and diameters were measured on pictured neurospheres (x40) thanks to ImageJ software (*http://rsb.info.nih.gov/ij*). Real surface was determined by drawing the outline of each neurosphere and defined in pixel$^2$. Theoretical surface was calculated from the smaller diameter of each neurosphere. Statistical analysis of data was done by using R software (*http://www.r-project.org*).

*Neurophere differentiation*

Neurospheres were spin down after the second passage, mechanically dissociated as described above, and dissociated cells were plated onto poly-ornithin/laminin coated dishes. For neural differentiation commitment, cells were plated with a density of 25,000 cells per mL, in the presence of medium without any growth factor. For glial differentiation commitment, cells were plated at a density of 50,000 cells per mL, in the presence of medium supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS; Sigma). Differentiation was allowed to take place during 3 and 6 days.

*Immunocytochemistry on cortical explants and on Neurospheres*

For *ex vivo* cultures cortical explants, immunohistochemistry was performed with mouse anti-nestin (Abcam; 1:100), rabbit anti-β-galactosidase (Cappel; 1:500) or mouse anti-MAP2 (Sigma;1:100). Secondary andibodies were anti-mouse Alexa A488 and anti-rabbit Alexa A564 (Molecular Probes; 1:500).

For immunocytochemistry on total neurosphere, neurospheres were let to attach on polyornithin-laminin coated coverslips for 24hrs. Immunocytochemistry on dissociated plated cells from neurosphere cultures was performed after fixation in 4% paraformaldehyde. Cells were immunostained with anti-Nestin (Abcam; 1:100) for NSCs/NPs, anti-MAP2 (Sigma; 1:100) for neuron precursors, anti-GFAP (DAKO Cytomation; 1:400) for glial cells and anti-Ki67 for cycling cells (Abcam; 1:50). The primary antibodies were then detected by subclass specific secondary antibodies coupled to Alexa 488 or 564 (Molecular Probes; 1:500). Glass coverslips were mounted in Aqua Poly/Mount (Thermoshandon). To rule out any unspecific binding, control experiments were performed without primary antibody (data not shown). Nuclei were then counter-stained with Hoechst and stainings were analyzed at a confocal microscope with 10x or 40x objectives (Leica).

*Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) Analysis*

Cortices were dissected at embryonic day E11.5 and E13.5. Cells were labelled by FITC-LeX antibodies (BD Pharmingen; 1:100). Lex-positive and Lex-negative cells were isolated by FACS (FacsDIVA, Becton Dickinson, France). A negative control of non-fluorescent cells was used to determine the background fluorescence (Malatesta *et al.*, 2003). BrdU Flow Kits (BD Pharmingen™) was tested.

*Statistical analysis*

For all data sets, the arithmetic average, the standard deviation (SD) and the standard error of the mean (SEM) were performed with R software. Error bars depict the SEM. The Student's t-test was used to examine whether data sets differed significantly. Data were considered as significant with $p<0.05$ and as highly significant with $p<0.01$. Data were presented as the mean ± SD.

# Results

### Hsf2$^{-/-}$ *embryos display a reduction of head size*

Microscope observations at different stages suggested us that *Hsf2*$^{-/-}$ embryos displayed reproducible morphological head defects, compatible with reduction of brain size, as illustrated for E12.5 and E13.5 in Figure 1. Here, we present quantitative data that demonstrate that *Hsf2*$^{-/-}$ embryos displayed brain reduction at E13.5. We measured the length and the height of each embryonic brain (n = 19 wild-type embryos; n = 21 *Hsf2*$^{-/-}$ embryos; Figure 1, B). When mean values are compared, *Hsf2*$^{-/-}$ brain length is decreased by 12% (p-value = 6.587e-12) and height by 11% (p-value = 0.00178). This two parameters did not seems to be correlated, because correlation coefficient is r = 0.40 [0.10; 0.63] suggesting that neurospheres are spherical. So, at early corticogenesis stages, *Hsf2*$^{-/-}$ embryos have a significantly smaller brain than wild-type embryos.

### *The cell population expressing the Hsf2 gene contains self-renewing and multipotent cells*

One question that still remains unsolved is whether HSF2 is expressed in all cells in the VZ. In other terms, does HSF2 labels all NSCs/NPS or is it restricted to subpopulations of NSCS and/or NPs? Previous experiments suggested that HSF2 is widely expressed by the majority of the VZ cells at E12.5 (M. Rallu, unpublished results and Kallio *et al.*, 2002). The poor efficiency of currently available HSF2 antibodies did not allow us to determine the precise localization of HSF2 by immunohistochemistry on cortical embryonic sections. As an alternative, we tried to localize HSF2 in *Hsf2*$^{+/-}$ or *Hsf2*$^{-/-}$ using the expression of *LacZ* reporter gene, which, in our KI strategy, is under the control of the *Hsf2* regulatory region (Kallio *et al*., 2002). We tried to

investigate β-galactosidase expression on *ex vivo* culture of sliced cortical explants at E14.5 at the maximum of neurogenesis. We showed that the expression of β-galactosidase was not detected in MAP2 positive precursors, but only in Nestin-positive cells, which defined them NSC/NPs (Fig. 2A). Using E13.5 neurospheres at passage 2, we observed that most Nestin-positive cells at the periphery of the neurosphere appeared β-galactosidase-positive; but HSF2-expressing cells were not all Nestin-positive. More experiments are needed to understand which cell subpopulation, negative for Nestin-staining, express HSF2. Since HSF2 is excluded from the more committed neuronal precursors, as assessed by MAP2 staining (Fig. 2A) it is likely that these β-gal expressing cells, negative for nestin-staining, are a subpopulation of NSCs/NPs. Beta-galactosidase expressing cells seemed excluded from the center of the neurospheres, which was surprising because the nestin-antibody seemed to penetrate the center of the neurosphere, suggesting the neurosphere center should also be accessible to the anti-β-galactosidase antibody. It was also unexpected because neurosphere center is believed to contain most undifferentiated cells and because, as HSF2 is widely expressed in the early neuroepithelium cells (NSCs), it should be expressed by the neurosphere center. Therefore, additional immunocytochemistry experiments on embedded and sectioned neurospheres should be performed. Alternatively, a subpopulation of these center cells is maybe dying. Finally, another possibility could be that these cells, deficient in HSF2, might have adopted unusual cell fate. In conclusion, most nestin-positive cells express HSF2 and, therefore, HSF2 might influence NSC/NP proliferation, survival or differentiation.

*Hsf2$^{-/-}$ embryos have less BrdU labelling cells*

In this part, we describe preliminary results that require to be further verified by statistical analysis. When pregnant heterozygous dams were injected intraperitonally with BrdU, the presumptive territory for *Hsf2$^{-/-}$* cortices at E10.5 displayed a 17.3% increase in BrdU incorporation (Fig. 3, A and C). This increase was correlated with a reduction of 4.5% of the number of nuclei in the VZ in the mutant and with an increase in nucleus size by 9.5% and of the VZ width of 6.3%. Interestingly, such BrdU incorporation effects were also correlated with the occurrence of ectopic mitosis in the basal area of the VZ (Fig.2 D). We are currently exploring the statistical significance of these data in terms of BrdU incorporation and number of normal or ectopic mitoses, cellular size, by analysing a greater number of embryos from different litters. These experiments have been limited so far by the fact that we could not obtain mice from the genetic background C57Bl/6N, on which the phenotype is the most severe (see introduction). Analysis at later stages seemed to suggest that BrdU defects are stage dependent: some stages look non–affected, at which compensation could take place, whereas one day after BrdU incorporation problems appears again. Previous *Birthdating* experiments (Chang *et al.,* 2006), where BrdU was administered to E12.5 embryos and observed at E15.5, have shown no defects of migration but a decrease of BrdU labelled cells. This decrease was not observed at E13.5.

As an alternative to the *in vivo* approach, since we already observed a marked reduction in the proliferation of *ex vivo* cultured *Hsf2$^{-/-}$* MEFs from a mixed genetic backgound (Paslaru *et al.*, 2003), we examined the potential HSF2 function *ex vivo* cultivated neurospheres descended from *Hsf2$^{-/-}$* cortices at two different stages.

*Neurospheres descended from* Hsf2$^{-/-}$ *cortices have abnormal size and growth*

Using the *in vitro* neurosphere system (Doetsch *et al.,* 2002; Palma *et al.*, 2005), we analysed how *Hsf2* gene inactivation could affect the control of neural stem/progenitor cell proliferation. Neurospheres were cultured from E11.5 and E13.5 cortices. At E11.5, analysis of more than 25 neurospheres from 3 wild-type and 6 *Hsf2*$^{-/-}$ embryos suggested that neurospheres generated from *Hsf2*$^{-/-}$ cortex seemed to be smaller by 9.3% compared with wild-type in the third passage (p-value=0.48) (Fig.3 B, illustrated in Fig.3 A) and theoretical area is smaller by 21.3% compared with wild type (p-value=0.12), suggesting that *Hsf2*$^{-/-}$ cortex are lesser spherical. But these results have an insignificant p-value. E11.5 *Hsf2*$^{-/-}$ NSCs/NPs exhibited a growth rate of 1 ± 0.6 whereas wild-type NSCs/NPs have a growth rate of 2.9 ± 0.7, indicating that *Hsf2*$^{-/-}$ NSCs/NPs proliferated more slowly. To determine whether this difference of growth was due to proliferation delay or cell mortality, the number of dead cells was counted using trypan-blue staining. No significant difference was observed between the percentage of wild-type and *Hsf2-/-* dead neurosphere cells (8.7% for *Hsf2*$^{+/+}$; 9.3% for *Hsf2*$^{-/-}$ p-value = 0.80). So, at E11.5, *Hsf2*$^{-/-}$ and *Hsf2*$^{+/+}$ neurospheres cultures displayed no difference of size, but growth rate was decreased in *Hsf2*$^{-/-}$ neurosphere cultures without increased cell death. This implies to verify, in further experiments, whether the number of neurospheres is decreased or alternatively whether the size of the cells is increased by the absence of HSF2 at E11.5. The growth rate of *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres is slow and the mortality of cells is not affected in lack of HSF2, so we have suspected proliferation defects in *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres.

As illustrated in Figure 3 C, at E13.5, *Hsf2*$^{-/-}$ neurosphere surfaces are bigger by 47.5% than their wild-type counterpart, with a strongly significant value (p-value < 2.2e-16; Fig.3 D, illustrated in C) as determined with neurospheres derived from 4 embryos of each genotype, at

the second passage. If theoretical neurosphere areas were considered, which was calculated from diameter measurement, *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres area was bigger by 49.7% than wild-type (p-value < 2.2e-16) (Fig. 2D). Interestingly, *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres real area and theoretical area diverged from 1.2 fold and seemed to be independent (correlation coefficient are WT=0.21 and KO=0.33). This result could be explained by the fact that neurospheres are more egg-shaped than spherical, which might suggest neurosphere fusion (Jessberger *et al.*, 2007). Two preliminary counts, that obviously require to be confirmed statistically, revealed that E13.5 *Hsf2*$^{-/-}$ and neurospheres had a 8% increase in the number of cells per neurosphere compared with wild-type. Cell mortality was estimated by staining with trypan-blue on dissociated cells at the time of reseeding. *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres seemed to present increased cells mortality than wild-type by 21%. These data still need to be confirmed statistically. If the statistical relevance of these data are confirmed, namely if the cell number per neurosphere is the same in wild-type and *Hsf2*$^{-/-}$ counterparts, although *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres are bigger, one explanation could be that cell volume is bigger in *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres. Experiments are currently undergone to estimate cell volume. This is reminiscent of the increase in nucleus size in *in vivo Hsf2*$^{-/-}$ cortices at E10.5 and could be a consequence of cell division defects. Alternatively, it could be due to the presence of an increase number of differentiated cells, which are more voluminous than NSCs/NPs. Wild-type NSCs/NPs have a growth rate of 2.2 ± 0.7 compared with 1 ± 0.4 for *Hsf2*$^{-/-}$ NSCs/NPs (p-value = 0.02). *Hsf2*$^{-/-}$ neurosphere plated cells contained 10.5% of dead cells compared with 4% for wild-type (p-value = 0.03) as estimated using trypan blue. In conclusion, E13.5 *Hsf2*$^{-/-}$ neurosphere cells have a delay in their growth and increased cell death.

At the third passage, *Hsf2*$^{-/-}$ neurosphere surface is bigger than wild-type surface by 10%, but this difference seemed not significant (p-value = 0.5). There might be a compensation

phenomenon which occurs between passages. The analysis of further passages could allow to determine whether these problems appear again in later passages. This would be in line with our *in vivo* observations which suggest that proliferation problems, like BrdU incorporation, are detected at some stages and not in the next embryonic day, and reappeared later (Y. Chang, unpublished results).

### Hsf2$^{-/-}$ *Neurospheres have a proliferation deficit*

To address the mechanism of growth defects in mutant neurospheres, we analyzed NSCs/NPs proliferation at E11.5 and E13.5 using the nucleotide substitution method. A significant decrease in bromodeoxyuridine (BrdU)-labeled nuclei was observed in *Hsf2*$^{-/-}$ plated-neurospheres at E11.5 (27%, p-value = 0.003). The decreased BrdU labelling in mutant NSCs/NPs could be due to a reduction of NSCs/NPs population, to a shorter cell cycling, or to proliferation defects.

Analyses at E13.5 are in progress. In parallel, trying an alternative experiment approach, we made one FACS analysis on total cell population isolated from 7 wild-type, 5 *Hsf2*$^{+/-}$ and 2 *Hsf2*$^{-/-}$ E13.5 cortices from 2 litters. This technique revealed no differences in the cell cycle of cortical neural stem cells/progenitors at E13.5. However, such a technique is not appropriate to detect differences around 10%, which turned out to be the case in our system.

### *Characterization of Hsf2*$^{-/-}$ *Neurospheres*

Considering that neurospheres are a complex mixed population of NSCs/NPs and differentiated cells (Davis and Temple 1994; Reynolds and Rietze, 2005), we decided to analysed subpopulation in *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres. Recents studies have used FACS analysis, permitting cell purification strategy (*i.e.* hematopoietic stem cells) on the basis of cell surface antigens as Lewis

X (Capela & Temple, 2002). In our study, we sorted dissociated cells thanks to LeX markers, but we did not observe any difference in LeX-positive NSCs population neither at E11.5 nor at E13.5 (number). Unfortunately, we have not been able to cultivate this selected population on the account of the use of BSA for the convience of FACS analyses, which induces differentiation.

*HSF2 interfere with neural stem cell differentiation*

The property of stem cells is to differentiate into more specialized cells, namely neuronal progenitors, immature neurons or glial cells. We therefore investigated whether HSF2 might influence the capacity of NSCs/NPs to differentiate into neurons. Dissociated cells were plated on laminin/poly-D-lysine coated culture dishes for 3 and 6 days in conditions favouring neuronal or glial differentiation (according to Conti *et al.*, 2005). At J0, *Hsf2*$^{-/-}$ neurosphere plated cells displayed a reduction of nestin-positive population compared with wild-type (Fig. 5 A and D). Cells positive for MAP2 (a marker for neuron precursors) with neuron-like morphology were detected 3 days after plating in medium deprived from growth factor (Fig. 5B and D). The frequency with which immature neurons differentiated from the NSCs/NPs was significantly lowered at J3 ($p = 0.008$) by the absence of HSF2 (Fig.5 B and D). However, at J6, no significant differences were observed ($p=0.143$), suggesting a delay rather than impairment to enter into neuronal differentiation process. In addition, the lack of HSF2 did not significantly affected the capacity of the cells to differentiate into the glial lineage, as demonstated by immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) 3 days after plating in the presence of 10% fetal calf serum (FCS) ($p=0.744$) or in 6 days ($p=0.457$) ; Fig.5 C). The cycling cell number remained constant during *Hsf2*$^{-/-}$ cells differentiation, while, in contrast, during wild-type cell differentiation, cycling cell number decreased, as evidenced by Ki67 labelling (Fig5 B

and C). The increased in the number of nestin-positive cells during neuronal differentiation is probably not due to an increased of proliferation cells but rather due to delay in the uncommitment of cell in differentiation lineage.

In a parallel manner, the number of cycling cells is increased in *Hsf2*$^{-/-}$ differentiating in the neuronal lineage at J3, as detected by Ki67 staining, compared with wild-type (p-value = 0.054 ; Fig.5 D), which is in line with the delay in neuronal differentiation observed at J3 with MAP2 . At J6 however, as was observed with MAP2, no significant differences were detected between *Hsf2*$^{-/-}$ and wild-type cells (p= 0.857).

In conclusion, it seems that the absence of HSF2 provokes persistent cell cycling and deferred neuronal differentiation at J3, but the defects seemed to have disappeared at J6.

# Discussion

*Réduction de la taille du cerveau*

À l'origine de ce travail, nous avons observé une réduction statistiquement significative de la taille du cerveau, en particulier du cortex. Cette réduction est suggestive d'un problème ou tout du moins d'un retard de croissance. Aux stades plus tardifs, à E16.5 on observe souvent une réduction de la taille du cortex, mais cela se conjugue parfois à un début d'hydrocéphalie qui rend difficile l'estimation de la taille réelle (ces données n'ont pas été quantifiées).

*HSF2 est exprimé par les NSCs/NPs, mais pas par les précurseurs MAP2-positifs*

Les expériences menées jusqu'à E13.5, à la fois par détection de l'expression de la β-galactosidase *ex vivo* sur explants et sur neurosphères (Figure 2), montrent que HSF2 est exprimé dans les NSCs/NPs et non dans les précurseurs à potentialités restreintes qui sont marqués par MAP2. Ces données sont cohérentes avec le profil d'expression de la β-gal *in toto* dès le stade neuroepithelium donc dans NSCs (chapitre 2.4 figure 2.13 ; Kallio *et al*., 2002). Notons cependant, qu'à partir de E15.5, HSF2 étant exprimé dans la SVZ on pourrait avoir une expression dans les précurseurs aux stades tardifs du développement. Quoiqu'il en soit, aux stades précoces de la neurogenèse, ce profil suggère deux pistes: 1) HSF2 est-il exprimé dans toutes les cellules NSCs ou NPS ou marque-t-il une ou des sous-populations? 2) HSF2 affecte-t-il la prolifération, la survie ou la différenciation des NSCs/NPs qui l'expriment?

*Une sous-population de NSCs/NPs révélée par HSF2?*

L'absence d'anticorps permettant une localisation non-ambigüe de HSF2 dans les cellules

de la VZ a considérablement limité notre approche. Si nous nous basons sur les données d'expression de la β–galactosidase, il semble que toutes les cellules nestine-positives soient β-gal-positives ; par contre, il existe des cellules β-gal-positives qui ne sont pas nestine-positives, ce qui laisserait supposer qu'il existe une sous-population de NSCs/NPs exprimant HSF2, mais pas la nestine. S'agit-il d'une population LeX-positive? Il faudrait pour cela faire des experiences similaire combinant des marquages β-gal, LeX et Nestine. Les expériences de FACS à l'aide de l'anticorps anti-LeX ne montrent aucune différence significative du nombre de cellules LeX positives dans les cortex *Hsf2*$^{-/-}$ et sauvage, mais une faible différence peut ne pas être détectée en FACS.

Les cellules exprimant HSF2 peuvent-ils être des progéniteurs de la zone "basale" qui apparaissent à partir du démarrage de la neurogenèse? Cela nous semble peu problable car, si HSF2 semble largement exprimé par la vaste majorité des cellules de la VZ avant E13.5, il semble exclu de la zone basale et donc, soit des cellules en phase S, soit des progéniteurs basaux. Une analyse de l'expression de l'ARN non-codant *SVET1* et des gènes codant les facteurs de transcriptions TBR2 et CUX1 et CUX2, permettrait de le savoir (Englund *et al.*, 2005; Nieto *et al.*, 2001; Tarabykin *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2004).

Dans l'état actuel de nos données, nous observons que les cellules des neurophères *Hsf2*$^{-/-}$ présentent autant de cellules Lex-positives que les sauvages. Par contre, à E13.5, moins de cellules des neurophères *Hsf2*$^{-/-}$ expriment la nestine par rapport aux sauvages. Ces résultats sont à prendre avec prudence, puiqu'ils ne sont pas obtenus avec la même technique et que la technique de FACS utilisée pour LeX est susceptible de masquer des differences de l'ordre de 10%. Là encore, il faudrait faire des expériences similaires, combinant des marquages β-gal, LeX et Nestine. Cela dit, les expériences d'immunocytochimie décelant une réduction des cellules

exprimant la nestine font appraître une différence significative de l'ordre de 20% entre les embryons sauvages et les embryons *Hsf2*$^{-/-}$. Si l'on en croit ces données, tous les NCS/NPs ne seraient donc pas affectés de la même façon par l'absence de HSF2. La β-gal marque une sous-population qui recoupe partiellement la population nestine-positive, mais fait peut-être apparaître une sous-population supplémentaire. On manque actuellement de marqueurs de sous-populations de NCS/NPs, bien que le marqueur LeX fasse apparaitre une hétérogénéité des NSCs dès le stade neuroepithelium en marquant des cellules à taux prolifératif élevé (Capela & Temple, 2006). À l'avenir, l'étude de HSF2 pourrait aider à caractériser des sous-populations. D'autres marqueurs de NSCs pourraient être utilisés pour tenter de faire des recoupements entre l'expression de HSF2 et certaines populations celulaires: *Musashi* (Sakakibara *et al.*, 2002), SOX2 et SOX1 (Barraud *et al.,* 2005; D'Amour & Gage, 2003) et la prominin (CD133, (Corti *et al.*, 2007). La production d'un anticorps est actuellement mise en oeuvre au laboratoire par Laurence DENIS (post-doc ANR Neurosciences) et nous espérons qu'il permettra de déceler HSF2 en immunocytochimie et immunohistochimie.

Cependant, il existe une autre hypothèse à l'existence d'une sous-population de NPCs/NPs nestine-négative, mais HSF2-positive: en l'absence de HSF2, certains NSCs pourraient avoir une destinée cellulaire altérée et ne pas exprimer la Nestine ou subir une restriction plus rapide de leurs potentialités.

Notons enfin que la déficience en cellules positives pour la nestine est reminiscente de la réduction en nombre de cellules de glie radiaire que nous avions observée dans les cortex en formation *Hsf2*$^{-/-}$ (Chang *et al.,* 2006). Des marquages RC2 effectuées sur les cellules de neurosphères pourraient aider à confirmer ce point.

*Effet de HSF2 sur la prolifération des NSCs/NPs*

Nous nous cantonnerons, ici, à la discussion des résultats statistiquement significatifs.

À E11.5, nous observons une diminution significative de l'incorporation de BrdU dans les cellules de neurosphèes dissociées à E11,5, ce qui suggère un défaut d'entrée en phase S et donc des problèmes potentiels en phase G1. Cet effet est à mettre en parallèle avec le fait que la surexpression de HSF2β provoque une augmentation de l'incorporation BrdU dans les cellules de la VZ du tube neural de poulet au stade 9HH. Ces deux données semblent suggérer qu'effectivement les niveaux de HSF2 soient capables d'affecter la phase S. Ceci implique de faire une étude exhaustive d'incorporation de BrdU *in vivo,* à tous les stades de la neurogenèse, ainsi que sur plusieurs passages à partir de neurophères issues d'un stade donné.

*Effet de HSF2 sur la différenciation des NSCs/NPs*

La différenciation neuronale des cellules de neurosphères secondaires à E13.5 est altérée. Le nombre de cellules MAP2 positives est significativement réduit à J3 pour les cellules *Hsf2*$^{-/-}$, mais à J6, un taux comparable de cellules est observé entre *Hsf2*$^{-/-}$ et sauvages. Ceci suggère un retard dans l'engagement des cellules vers la différenciation neuronale plutôt qu'une incapacité réelle à se différencier dans la voie neuronale. Il est cependant possible qu'*in vivo*, ce retard finisse, en fin de neurogenèse, par porter préjudice à la production de neurones. Bien que les marquages avec l'anticoprs Tuj1 n'aient pas laissé présager de réduction majeure du nombre de neurones *in vivo* aux stades E13.5 ou E17.5 (Chang *et al*., 2006), l'examen des coupes hitologiques révèle un tissu cortical plus faiblement peuplé en neurones et surtout un taux d'apoptose massif dans la SVZ aux stades tardifs à E17.5 (thèse de Yunhua Chang au laboratoire,

2004). Des études aux stades tardifs sont donc nécessaires pour évaluer l'existence et l'impact de ce retard *in vivo*. Quoiqu'il en soit, HSF2 ne peut donc pas être considéré comme un facteur neurogénique au sens strict. Par contre il pourrait moduler finement à la fois le cycle cellulaire (entrée ou sortie de cycle) et par conséquence, comme nous allons le voir, la différenciation.

Contrairement au retard d'entrée en différenciation neuronale observé, l'engagement dans la voie de différenciation gliale n'est pas affecté dans les cellules issues de neurosphères secondaires à E13.5. Cela implique que la réduction en nombre d'astrocytes exprimant la GFAP en fin de gestation chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ (Chang *et al*., 2006) serait due à la diminution du nombre de cellules de glie radiaire, plutôt qu'à un problème de différenciation gliale.

Au cours de la corticogenèse, deux types de progéniteurs génèrent des neurones, ceux des couches profondes, puis ceux des couches superficielles (Noctor *et al.,* 2004; Zimmer *et al.*, 2004). Ces deux populations coexistent très tôt dans le cortex en développement. Il reste à savoir si HSF2 perturbe la neurogenèse de ces deux populations ou d'une en particulier. Ceci expliquerait que *in vivo* la production de neurones ne soit pas affectée d'une façon continue chez les embryons *Hsf2*$^{-/-}$.

Les problèmes de cycle cellulaire observés à certains stades peuvent avoir une conséquence sur la spécfication de leurs dérivés en différenciation. Il est donc crucial dans la poursuite de cette étude, de caractériser précisément les défauts d'entrée et de sortie cycle des NSCs/NPs *Hsf2*$^{-/-}$, à différents stades à la fois *in vivo* et *ex vivo*. La phase G1 pourrait être perturbée car on observe des problèmes d'entrée en phase S en cas de déficience en HSF2. Mais *in vivo*, à E10.5 l'augmentation de cellules BrdU positives et l'augmentation de la taille des noyaux peut-être suggestive de problèmes d'endo-réplication et de sortie de phase S. Il est crucial de déterminer dans nos systèmes gain-de-fonction et perte-de-fonction le nombre de mitoses, par exemple en utilisant des anticorps dirigés contre l'histone H3 phosphorylée. De plus, il serait intéressant de

suivre les mitoses symétriques générant deux NSC/NP en début de corticogenèse et les mitoses asymétriques générant un NSC/NP et une cellule différencier. Cette orientation dépend de différents facteurs, comme la répartition de déterminants cellulaires tel NUMB ou des jonctions cellulaires (Götz & Huttner, 2005). D'autre part, le plan de clivage semble important dans l'engagement des cellules vers la prolifération ou la différenciation. L'orientation du plan de clivage est régulé notamment par des MAP (telles que DCLK et NUDEL) dont les gènes ont déjà été identifiés comme étant régulés par HSF2 au stade tardif.

Par ailleurs, si HSF2 module le cycle cellulaire, la phase du cycle régulée doit être caractérisée. L'utilisation d'inhibiteurs du cycle cellulaire et la synchronisation des cellules permettrait de comparer le comportement des cellules de neurosphères *Hsf2*$^{-/-}$ vis-à-vis des sauvages. Du reste, l'optimisation des expériences de FACS permettrait de déceler les défauts de cycle cellulaire chez les individus *Hsf2*$^{-/-}$ à différents stades. Pour cela, l'utilisation de marqueurs des NSC/NP tels que LeX ou la prominin, permettrait de trier les cellules pour enrichir les populations considérées puis, couplée à des « pulses » de BrdU, permettrait de mettre en évidence les défauts de cycle chez les individus *Hsf2*$^{-/-}$ par rapport aux sauvages. En effet, cette approche permettrait de confirmer les analyses réalisées par comptage et expliquerait pourquoi aucun défaut n'a été observé pour l'instant par FACS dans une population hétérogène de cellules corticales.

Sur le plan moléculaire, il faut noter que de nombreuses études tendent à montrer que des défauts du cycle cellulaire dans les NSCs/NPs induisent des problèmes de différenciation neuronale. Cicero et Herrup (Cicero & Herrup, 2005) montrent que la déficience en activité CDK5, dont l'activité est régulée par HSF2 (Chang *et al.,* 2006), induit des problèmes de sortie de cycle, la persistence de cellules cyclantes d'ailleurs localisées de façon ectopiques en dehors de la VZ, ainsi qu'un retard de différenciation visualisé par les différentes formes précoces ou

matures de MAP2. La déficience en acitivté CDK5 observée dans les souris *Hsf2*$^{-/-}$ pourraient donc être à l'origine de certains problèmes de neurogenèse. Cependant, des expériences préliminaires - menées avec Anne Le Mouël au laboratoire - montrent que l'absence de HSF2 à E16,5 induit des perturbations de l'expression de deux gènes connus pour être essentiels dans la progression de la mitose et l'intégrité du fuseau mitotique : *Nde1* et *Dclk* (Feng & Walsh, 2004 ; Shu *et al.*, 2006). De façon intéressante, les perturbations de l'expression de l'un ou l'autre de ces gènes induisent une différenciation neuronale « par défaut », suggérant là que des perturbations du cycle – ici du bon déroulement de la mitose- conduisent les cellules à entrer en différenciation neuronale.

D'autres articles mentionnent également la différenciation neuronale par défaut lors de perturbations du cycle. Les cortex inactivés pour le gène *β-caténine* montrent un accroissement de la taille du cerveau avec une proportion accrue de précurseurs entrant à nouveau dans le cycle cellulaire après la mitose (Woodhead *et al.*, 2006). Or, l'inactivation du gène *β-caténine* provoque une différenciation neuronale prématurée (Woodhead *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'activité d'inhibiteurs des kinases cyclines-dépendantes tels que p27/Kip1 (en G1) contrôlent la sortie de cycle cellulaire, dont la durée et la progression sont étroitement contrôlées au cours de la corticogenèse (Caviness *et al.,* 2003; Lukaszewicz *et al.*, 2005). Différents domaines protéiques de p27 gèrent indépendamment ses fonctions de contrôle du cycle cellulaire, de la différenciation et de la migration neuronale radiaire (Nguyen *et al.*, 2006). Il serait donc intéressant d'examiner les niveaux et l'activité de p27 dans nos cortex en développement *Hsf2*$^{-/-}$, et la différenciation *via* une stabilisation de la protéine pro-neurale Ngn2. Il est intéressant de remarquer qu'on observe une diminution progressive de la quantité de HSF2 au cours du développement au fur et à mesure que s'allonge la durée de la phase G1. Or la surexpression de p27/Kip1 induit un allongement

prématuré du cycle cellulaire résultant principalement dans l'extension de la durée de la phase G1, permettant sans doute l'accumulation de déterminants neuronaux spécifiques en G1. Par ailleurs, p27/Kip régule également la migration neuronale par sa phosphorylation par CDK5 qui lui permet d'être localisé dans le cytoplasme d'exercer ses fonctions sur le réseau d'actine. Il est donc nécessaire d'examiner l'impact de la diminution d'activité CSK5 de nos mutants sur la phosphorylation de p27/Kip1 et sa localisation dans les dérivés post-mitotiques.

Enfin, se pose le problème de la répartition de HSF2 dans les cellules filles au cours de développement, puisque son niveau diminue au cours de la corticogenèse. Cette répartition pourrait indiquer si HSF2 influe sur le caractère symétrique ou asymétrique des mitoses. Cette question est toujours limitée par le problème des anticorps. Des approches génétiques par croisement avec les souris *Tis21* qui permettent de différencier les mitoses symétriques des mitoses asymétriques (Götz & Huttner, 2005) en parallèle un examen approfondi de l'orientation des mitoses de HSF2, grâce à la répartition des protéines de jonctions apicales et adhérentes pourraient éclairer le rôle de HSF2 dans le destin cellulaire.

L'ensemble de ces résultats est encore lacunaire et nécessite une étude approfondie à différents stades du développement embryonnaire *in vivo* chez la souris et *ex vivo* sur un nombre plus grand de passages à différents stades qui auront été identifies comme affectés *in vivo*. Par ailleurs, des approches fonctionelles sont aussi nécessaires. L'approche gain-de-fonction par électroporation *in ovo* chez le Poulet permettra d'examiner les paramètres qui semblent affectés par l'absence de HSF2. Dans les neurosphères, où la croissance est altérée et sans doute la mort cellulaire, il sera crucial d'effectuer des expériences de "sauvetage" (*rescue*) pour vérifier si la réintroduction de HSF2 permettrait de récupérer un phénotype sauvage. De même, on peut supposer que, dans l'inactivation du gène *Hsf2*, des phénomènes de compensation aient pu être

mis en place très tôt chez l'animal, peut-être même dès la lignée germinale. Des expériences d'interférence à ARN (RNAi) permettraient d'explorer les effets de l'absence aigüe de HSF2 sur la prolifération, la croissance et la survie.

Le mécanisme d'action de HSF2 dans les NSC/NP reste encore à élucider. Différentes hypothèses sont possibles, HSF2 pourrait moduler l'expression des gènes neuronaux en modulant l'activité du complexe transcriptionnel basal ou en modulant l'état chromatinien des régions régulatrices en amont de ces gènes. Par des approches globales (comme les puces ADN et le ChIp on Chip) aux stades précoces, l'action de HSF2 sur l'expression de gènes neurogéniques, influençant ainsi l'engagement des cellules vers la différenciation neuronale, pourrait être évaluée. Différentes études démontrent que l'engagement des cellules vers la différenciation neuronale passe par une régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes et par des mécanismes épigénétiques (Hsieh & Gage, 2004). L'analyse des facteurs de transcription impliqués dans la spécification neuronale et gliale a montré notamment que le facteur NRSF (*neuron-restrictive silencing factor*) était un représseur des gènes neuronaux (Ballas & Mandel, 2005; Hsieh & Gage, 2004), sa fixation recrute en effet les HDAC et les DNA-méthyltransférases en amont de ces gènes. Il reste à découvrir si HSF2 pourrait moduler l'association du complexe NRSF sur les gènes neuronaux. D'autre part, Brg1 (du complexe SWI/SNF) est impliqué au cours des processus de spécification neuronale. En effet, lorsque l'activité de Brg1 est réduite (par l'utilisation de morpholinos ou d'injection de dominant négatif chez l'embryon de Xénope), la différenciation neuronale diminue et les progéniteurs prolifèrent plus longtemps. De plus, Brg1 est trouvé associé aux protéines proneurales comme Neugenin1 et NeuroD, qui promeuvent la neurogenèse (Seo *et al.*, 2005). Comme nous l'avons vu, HSF1 et HSF4 interagissent avec Brg1 dans les cellules en prolifération, mais qu'en est-il pour HSF2 ? Enfin, l'action de la DNA

méthyltransférase DNMT1 réprime la transcription des gènes gliogéniques, dont le gène *Gfap* en empêchant la fixation de STAT, permettant ainsi la transcription des gènes neurogéniques (Song & Ghosh, 2004). L'expression de la DNMT1 est diminuée en absence de HSF2 dans les stades tardifs (à E16,5 décelé par RT-PCRq et par puces) et augmenté lors d'une surexpression de HSF2 dans le tube neural de poulet (résultats de RT-PCRq préliminaires). Les conséquences d'une telle diminution chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ ne sont pas encore comprises car aucune astrogliogenèse prématuréd n'est observée chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ comme cela est la cas chez les souris *Dnmt1*$^{-/-}$ (Fan *et al.*, 2005).

En conclusion, l'absence de HSF2 modifie les potentialités des NSCs/NPs, la prolifération est plus réduite et leur différenciation est retardée. Même si les mécanismes d'action de HSF2 dans les NSCs/NPs restent à élucider, ce facteur de choc thermique module la prolifération et la différenciation des NSCs/NPs. HSF2 pourrait donc être un modulateur fin de processus régissant le devenir des cellules au cours de la prolifération, la différenciation et la migration.

**Legends of figures**

**Figure 1. Head size reduction in E12.5 (A) and E13.5 *Hsf2*$^{-/-}$ embryos (B).** Embryos pictures were analysed by measuring the length (black line) and the height (white line) of brain. Analysis of 19 wild-type (+/+) and 21 *Hsf2*$^{-/-}$ (-/-) embryos demonstrated that wild-type brain length displayed a mean value of 11.3 ± 0.47 pixels while *Hsf2*$^{-/-}$ brain length had a mean value of 9.9 ± 0.44 pixels, p-value = 6.587e-12. Moreover, wild-type brain height had a mean value of 4.5 ± 0.51 and *Hsf2*$^{-/-}$ brain of 4.0 ± 0.38, p-value = 0.00178.

**Figure 2. HSF2 is expressed by NSCs/NPs during cortex formation.** The β-galactosidase (β-gal) reporter, which in the KI in the *Hsf2* gene inactivation strategy is under the control of the *Hsf2* regulatory region, was used to identify HSF2 expressing cells in cultured E14.5 cortical explants (A). Using Nestin NSCs/NPs marker, MAP2 a neuronal precursor marker (MAP) and we observed that HSF2 is specifically expressed by nestin-positive NSCs/NPs but is excluded from MAP2 differentiating neuronal precursors. Nuclei were labelled with DAPI. (B) Morevoer, cultured neurospheres analysis showed that some β-gal positive cells do not express nestin (see arrowheads), suggesting the existence of a subpopulation of NSC/NPs.

**Figure 3. Increased BrdU incorporation and enlarged nucleus size in the *Hsf2*$^{-/-}$ at E10.5.** (A). Immunohischemical detection of BrdU positive cells in wild-type (+/+, left panel) and (-/-, right panel) *Hsf2*$^{-/-}$ prosencephalon. (B). Prosencephalon were divided into 9 zones for the counting of BrdU positive cells. No regional differences could be observed. (C). Magnification of

zone 3 illustrates the enlargement in nucleus size in *Hsf2*$^{-/-}$ prosencephalon. (D). Arrowheads point to normally localized mitosis along the ventricle, whereas ectopic mitosis are indicated by arrows (illustration in zone 2).

**Figure 4. Size analysis of *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres.** Neurospheres generated from wild-type (+/+) and *Hsf2*$^{-/-}$ cortices at E11.5 (A) and E13.5 (C) adopted different behavior in culture. Statistical analyses of neurospheres areas (left graphs in B and D) and of theoretical areas (right graphs in B and D) at E11.5 (B) and at E13.5 (D). At E11.5, *Hsf2*$^{-/-}$ neurosphere surface (-/-; 215181 pixel$^2$) seemed to be smaller than wild-type (+/+; 237370 pixel$^2$), although in a non-significative manner (p-value= 0.4816). In contrast, E13.5 *Hsf2*$^{-/-}$ neurosphere mean surface value (90337 pixel$^2$) is significantly bigger than wild-type (47428 pixel$^2$; p-value < 2.2$^{e-16}$). pixel$^2$. Theoretical wild-type neurophere maen surface was 38790 pixel$^2$ and *Hsf2*$^{-/-}$ neurosphere mean surface value was 77174.87 (p-value < 2.2e$^{-16}$), indicating that theoretical surface was in both cases decreased compared to real surface. Real and theoretical and areas comparison demonstrated that E13.5 *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres are significantly less spherical than wild-type.

**Figure 5: NSC/NP specification is affected when HSF2 is not expressed.** (A). Immunohistochimestry on dissociated and plated E13.5 neurosphere cells before differentiation. The Nestin-positive cell population is reduced in *Hsf2*$^{-/-}$ neurospheres compared with wild-type at J0 after three days in culture (B). Immunohistochimestry on dissociated neurospheres engaged into differentiation processes showed that *Hsf2*$^{-/-}$ cells have a deficit in MAP2 (MAP) neuronal precursors, indicative of a delay in neural differentiation at J3. Nuclei were labelled with Hoechst. (C) In contrast, no clear differences in the number of GFAP-positive cells could be observed during differentiation towards glial fate. Proliferating Cycling cells (positive for Ki67

labelling) are less numerous in *Hsf2*$^{-/-}$ cells compared with wild-type at J3 (B). In D, the graph summarizes cell count (in %) for the different markers cited above, at various time during the differentiation process (t is expressed in days number). The percentage of Hoechst stained cells determines counted cells total (100 to 200 cells per conditions were analysed). Values are presented as ± the standard error of the mean. The number of embryos examined twice at each time of differenciation was: $n$ = 5 control and −/−, distributed in four litters. Significant data associated with p-values<0,05 were indicated with *.

# References

Akerfelt M, Trouillet D, Mezger V, Sistonen L (2007) Heat shock factors at a crossroad between stress and development. Ann N Y Acad Sci : .

Alastalo T, Hellesuo M, Sandqvist A, Hietakangas V, Kallio M et al. (2003) Formation of nuclear stress granules involves hsf2 and coincides with the nucleolar localization of hsp70. J Cell Sci 116: 3557-3570.

Ayala R, Shu T, Tsai L (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. Cell 128: 29-43.

Ballas N, Mandel G (2005) The many faces of rest oversee epigenetic programming of neuronal genes. Curr Opin Neurobiol 15: 500-506.

Barraud P, Thompson L, Kirik D, Björklund A, Parmar M (2005) Isolation and characterization of neural precursor cells from the sox1-gfp reporter mouse. Eur J Neurosci 22: 1555-1569.

Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Dai XF, Simmons JA (1991) Cell migration in the rat embryonic neocortex. J Comp Neurol 307: 499-516.

Bruce JL, Chen C, Xie Y, Zhong R, Wang YQ et al. (1999) Activation of heat shock transcription factor 1 to a dna binding form during the g(1)phase of the cell cycle. Cell Stress Chaperones 4: 36-45.

Capela A, Temple S (2002) Lex/ssea-1 is expressed by adult mouse cns stem cells, identifying them as nonependymal. Neuron 35: 865-875.

Capela A, Temple S (2006) Lex is expressed by principle progenitor cells in the embryonic nervous system, is secreted into their environment and binds wnt-1. Dev Biol 291: 300-313.

Caviness VSJ, Goto T, Tarui T, Takahashi T, Bhide PG et al. (2003) Cell output, cell cycle duration and neuronal specification: a model of integrated mechanisms of the neocortical proliferative process. Cereb Cortex 13: 592-598.

Chang Y, Ostling P, Akerfelt M, Trouillet D, Rallu M et al. (2006) Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression. Genes Dev 20: 836-847.

Christians E, Davis AA, Thomas SD, Benjamin IJ (2000) Maternal effect of hsf1 on reproductive success. Nature 407: 693-694.

Cicero S, Herrup K (2005) Cyclin-dependent kinase 5 is essential for neuronal cell cycle arrest and differentiation. J Neurosci 25: 9658-9668.

Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M et al. (2005) Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. PLoS Biol 3: e283.

Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Locatelli F et al. (2007) Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on prominin-1 expression. Exp Neurol 205: 547-562.

D'Amour KA, Gage FH (2003) Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 100 Suppl 1: 11866-11872.

Davis AA, Temple S (1994) A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. Nature 372: 263-266.

Dehay C, Kennedy H (2007) Cell-cycle control and cortical development. Nat Rev Neurosci 8: 438-450.

Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) Egf converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. Neuron 36: 1021-1034.

Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RAM et al. (2005) Pax6, tbr2, and tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. J Neurosci 25: 247-251.

Fan G, Martinowich K, Chin MH, He F, Fouse SD et al. (2005) Dna methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of jak-stat signaling. Development 132: 3345-3356.

Feng Y, Walsh CA (2004) Mitotic spindle regulation by nde1 controls cerebral cortical size. Neuron 44: 279-293.

Fishell G, Kriegstein AR (2003) Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance. Curr Opin Neurobiol 13: 34-41.

Fujimoto M, Izu H, Seki K, Fukuda K, Nishida T et al. (2004) Hsf4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. EMBO J 23: 4297-4306.

Guerrier S, Polleux F (2007) The ups and downs of neural progenitors: cep120 and taccs control interkinetic nuclear migration. Neuron 56: 1-3.

Gupta A, Tsai L, Wynshaw-Boris A (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. Nat Rev Genet 3: 342-355.

Götz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 6: 777-788.

Hartfuss E, Galli R, Heins N, Götz M (2001) Characterization of cns precursor subtypes and radial glia. Dev Biol 229: 15-30.

Hilgarth RS, Murphy LA, O'Connor CM, Clark JA, Park-Sarge O et al. (2004) Identification of xenopus heat shock transcription factor-2: conserved role of sumoylation in regulating deoxyribonucleic acid-binding activity of heat shock transcription factor-2 proteins. Cell Stress Chaperones 9: 214-220.

Hsieh J, Gage FH (2004) Epigenetic control of neural stem cell fate. Curr Opin Genet Dev 14: 461-469.

Jessberger S, Clemenson GDJ, Gage FH (2007) Spontaneous fusion and nonclonal growth of adult neural stem cells. Stem Cells 25: 871-874.

Kallio M, Chang Y, Manuel M, Alastalo T, Rallu M et al. (2002) Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in hsf2 null mice. EMBO J 21: 2591-2601.

Khaleque MA, Bharti A, Sawyer D, Gong J, Benjamin IJ et al. (2005) Induction of heat shock proteins by heregulin beta1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. Oncogene 24: 6564-6573.

Kriegstein AR, Götz M (2003) Radial glia diversity: a matter of cell fate. Glia 43: 37-43.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) Cns stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell 60: 585-595.

Lukaszewicz A, Savatier P, Cortay V, Giroud P, Huissoud C et al. (2005) G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex. Neuron 47: 353-364.

Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W et al. (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. Neuron 37: 751-764.

Menezes JR, Luskin MB (1994) Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. J Neurosci 14: 5399-5416.

Mezger V, Rallu M, Morimoto RI, Morange M, Renard JP (1994) Heat shock factor 2-like activity in mouse blastocysts. Dev Biol 166: 819-822.

Mezger V, Renard JP, Christians E, Morange M (1994) Detection of heat shock element-binding activities by gel shift assay during mouse preimplantation development. Dev Biol 165: 627-638.

Min J, Zhang Y, Moskophidis D, Mivechi NF (2004) Unique contribution of heat shock transcription factor 4 in ocular lens development and fiber cell differentiation. Genesis 40: 205-217.

Müller F, Snyder EY, Loring JF (2006) Gene therapy: can neural stem cells deliver?. Nat Rev Neurosci 7: 75-84.

Nakai A, Ishikawa T (2001) Cell cycle transition under stress conditions controlled by vertebrate heat shock factors. EMBO J 20: 2885-2895.

Nakai A, Morimoto RI (1993) Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. Mol Cell Biol 13: 1983-1997.

Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI et al. (1997) Hsf4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. Mol Cell Biol 17: 469-481.

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

Nieto M, Schuurmans C, Britz O, Guillemot F (2001) Neural bhlh genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. Neuron 29: 401-413.

Niinobe M, Maeda N, Ino H, Mikoshiba K (1988) Characterization of microtubule-associated protein 2 from mouse brain and its localization in the cerebellar cortex. J Neurochem 51: 1132-1139.

Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci 7: 136-144.

Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC et al. (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. Development 132: 335-344.

Paslaru L, Morange M, Mezger V (2003) Phenotypic characterization of mouse embryonic fibroblasts lacking heat shock factor 2. J Cell Mol Med 7: 425-435.

Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C (1991) Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, hsf1. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 6906-6910.

Rallu M, Loones M, Lallemand Y, Morimoto R, Morange M et al. (1997) Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 2392-2397.

Reynolds BA, Rietze RL (2005) Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. Nat Methods 2: 333-336.

Rietze RL, Reynolds BA (2006) Neural stem cell isolation and characterization. Methods Enzymol 419: 3-23.

Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T, Shibata S, Koike M et al. (2002) Rna-binding protein musashi family: roles for cns stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 15194-15199.

Sarge KD, Zimarino V, Holm K, Wu C, Morimoto RI (1991) Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive dna-binding ability. Genes Dev 5: 1902-1911.

Seo S, Richardson GA, Kroll KL (2005) The swi/snf chromatin remodeling protein brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of ngn and neurod. Development 132: 105-115.

Shu T, Tseng H, Sapir T, Stern P, Zhou Y et al. (2006) Doublecortin-like kinase controls neurogenesis by regulating mitotic spindles and m phase progression. Neuron 49: 25-39.

Sistonen L, Sarge KD, Phillips B, Abravaya K, Morimoto RI (1992) Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. Mol Cell Biol 12: 4104-4111.

Song M, Ghosh A (2004) Fgf2-induced chromatin remodeling regulates cntf-mediated gene expression and astrocyte differentiation. Nat Neurosci 7: 229-235.

Takaki E, Fujimoto M, Sugahara K, Nakahari T, Yonemura S et al. (2006) Maintenance of olfactory neurogenesis requires hsf1, a major heat shock transcription factor in mice. J Biol Chem 281: 4931-4937.

Tanikawa J, Ichikawa-Iwata E, Kanei-Ishii C, Nakai A, Matsuzawa S et al. (2000) P53 suppresses the c-myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. J Biol Chem 275: 15578-15585.

Tarabykin V, Stoykova A, Usman N, Gruss P (2001) Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by svet1 gene expression. Development 128: 1983-1993.

Tu N, Hu Y, Mivechi NF (2006) Heat shock transcription factor (hsf)-4b recruits brg1 during the g1 phase of the cell cycle and regulates the expression of heat shock proteins. J Cell Biochem 98: 1528-1542.

Wang G, Ying Z, Jin X, Tu N, Zhang Y et al. (2004) Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. Genesis 38: 66-80.

Wang G, Zhang J, Moskophidis D, Mivechi NF (2003) Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. Genesis 36: 48-61.

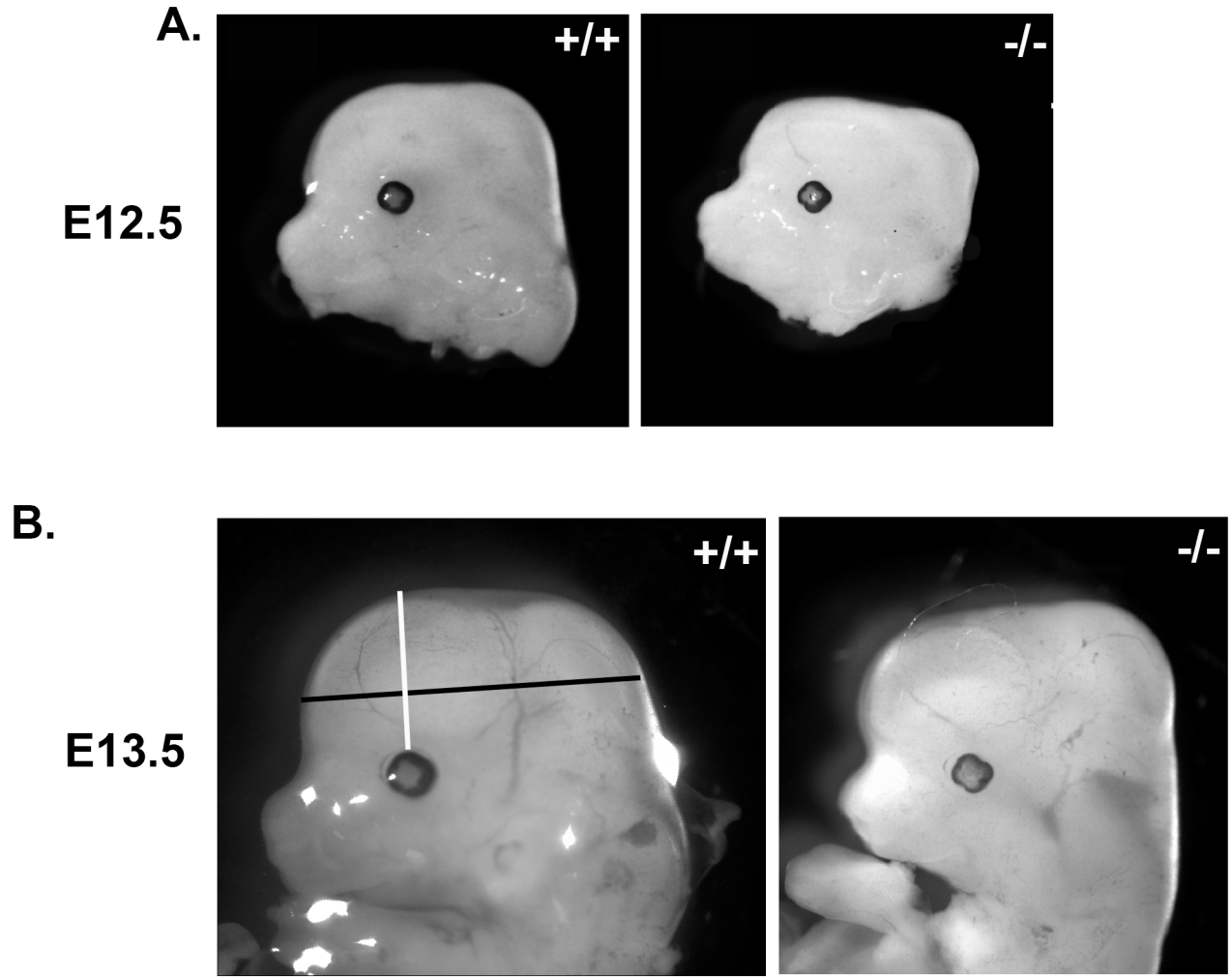
Warren AJ (2002) Eukaryotic transcription factors. Curr Opin Struct Biol 12: 107-114.

Woodhead GJ, Mutch CA, Olson EC, Chenn A (2006) Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation. J Neurosci 26: 12620-12630.

Xing H, Wilkerson DC, Mayhew CN, Lubert EJ, Skaggs HS et al. (2005) Mechanism of hsp70i gene bookmarking. Science 307: 421-423.

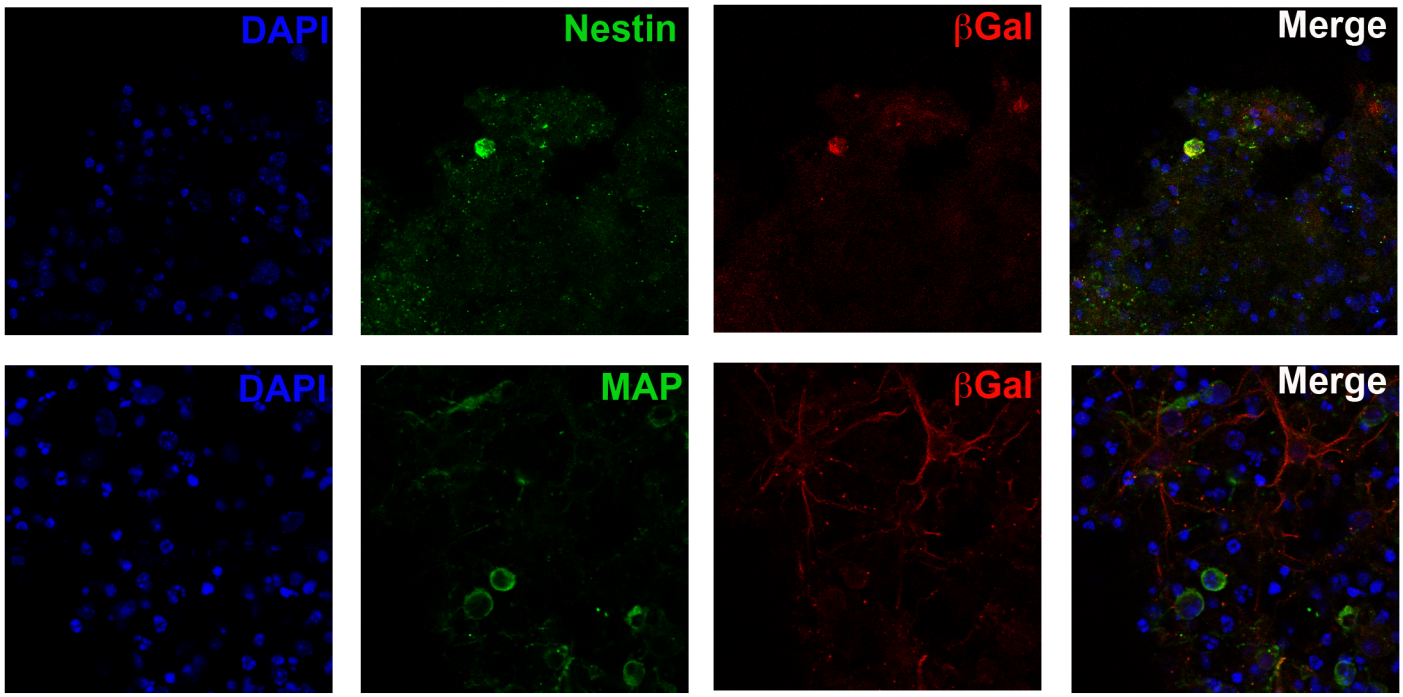
Zimmer C, Tiveron M, Bodmer R, Cremer H (2004) Dynamics of cux2 expression suggests that an early pool of svz precursors is fated to become upper cortical layer neurons. Cereb Cortex 14: 1408-1420.

**Trouillet et al., Figure 1 A et B**

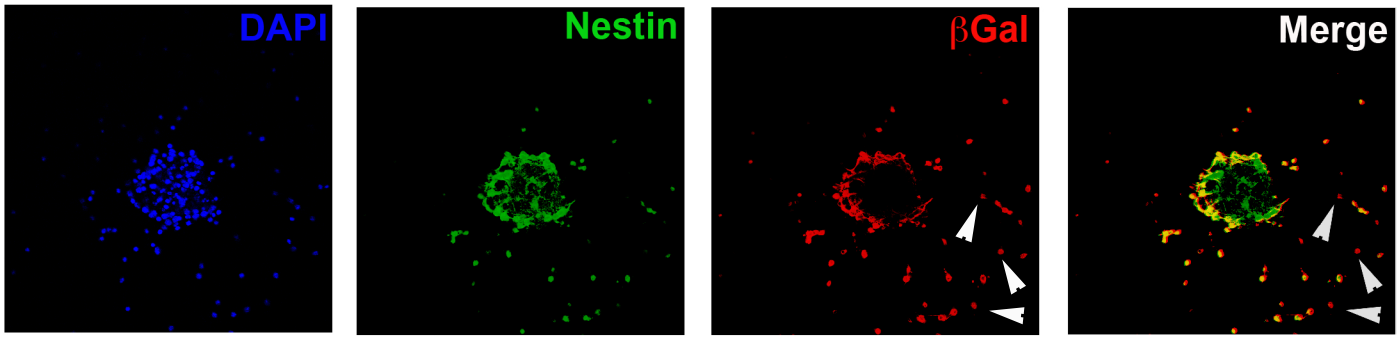


Trouillet et al. Figure 2, A et B

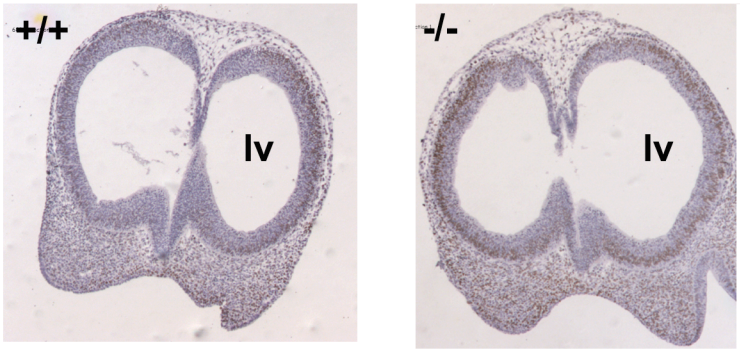
A.




B.

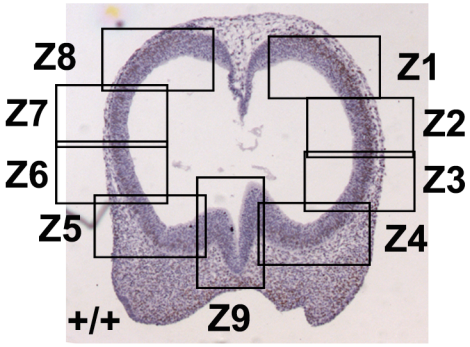


A.

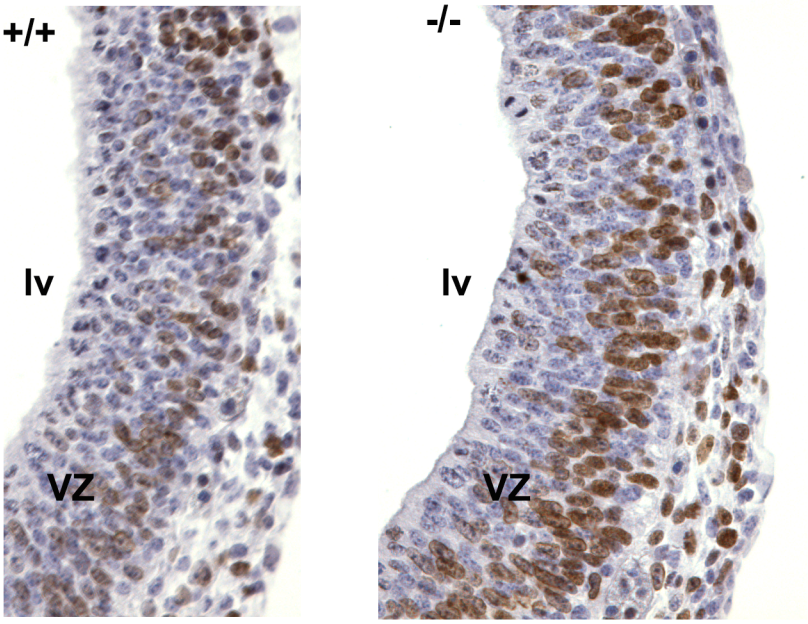



E10.5 prosencephalon

B.




C.




D.

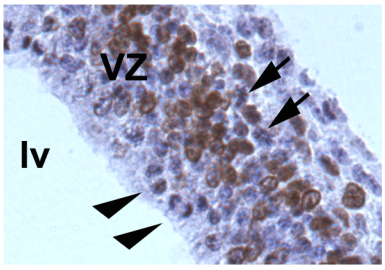
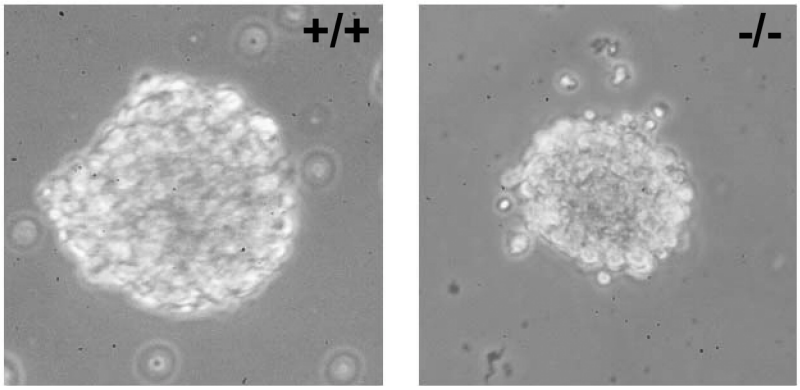


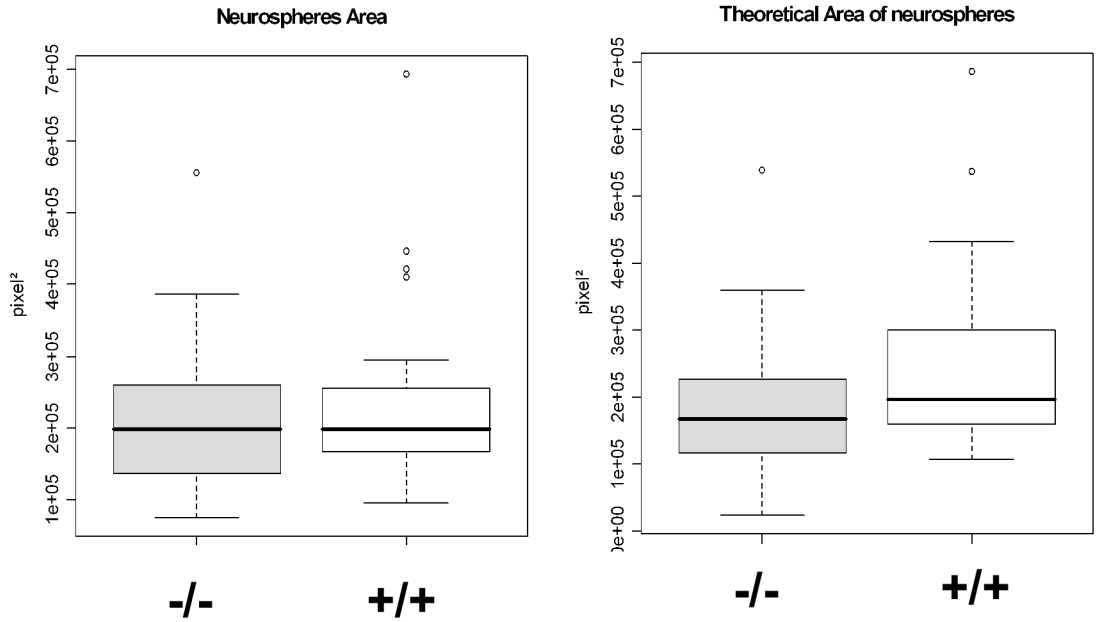

Figure 3 A à D

# Trouillet et al., Figure 4, A and B

**A.**

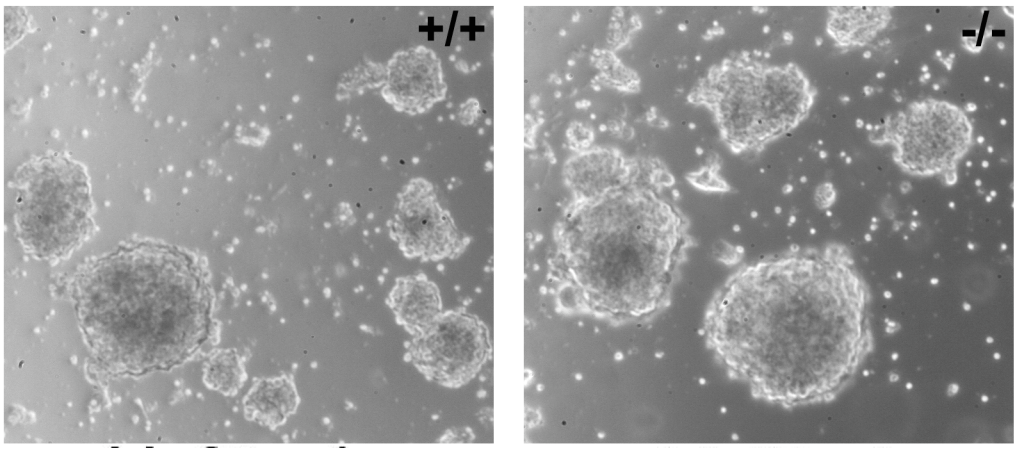



**B.**

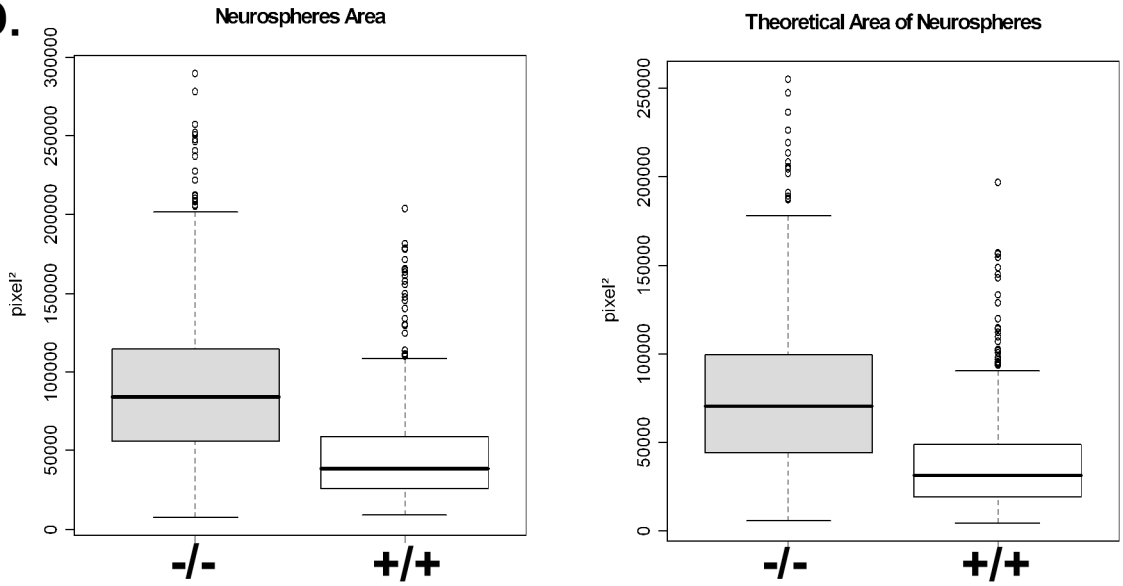


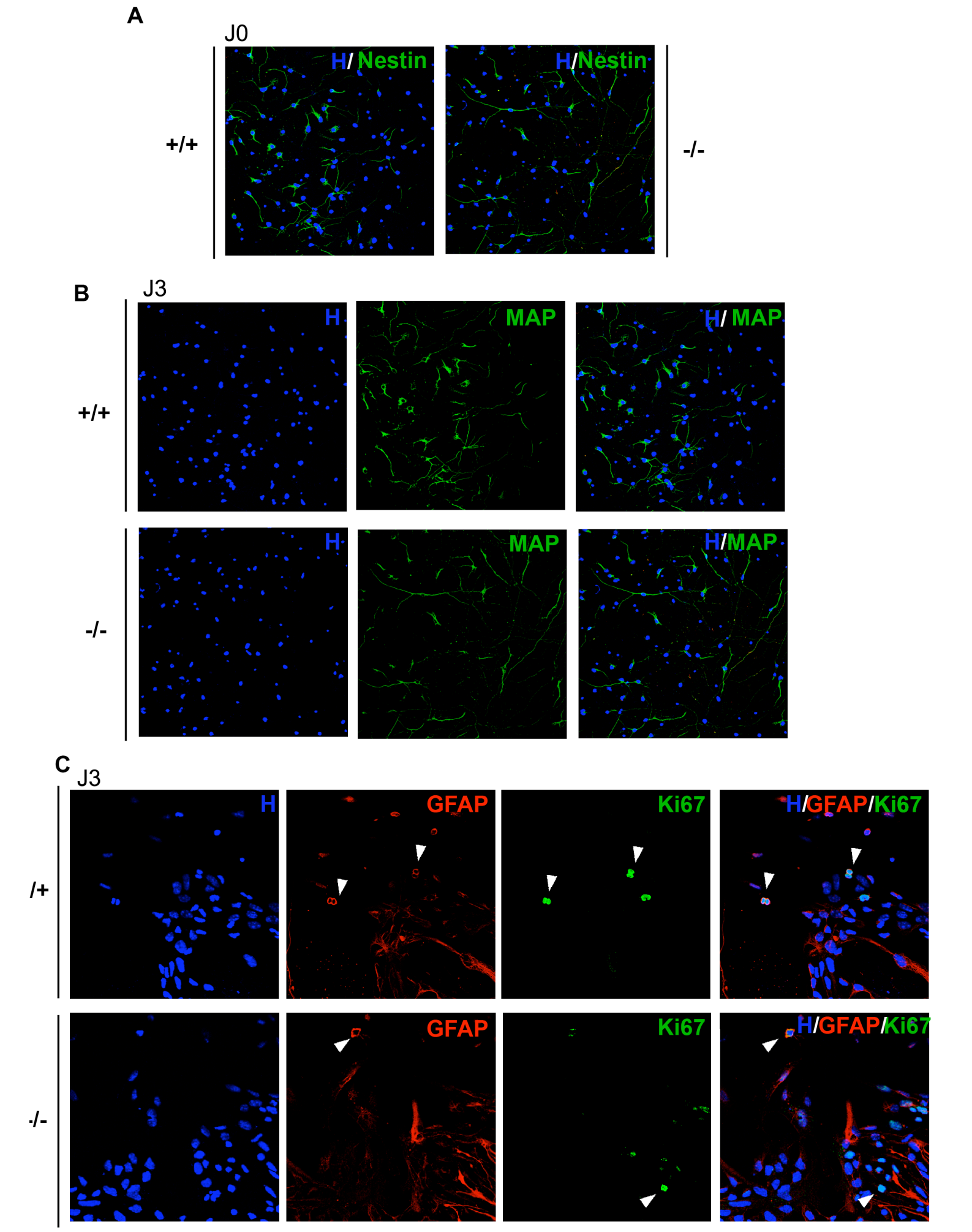
# Trouillet et al., Figure 4 C et D

C.

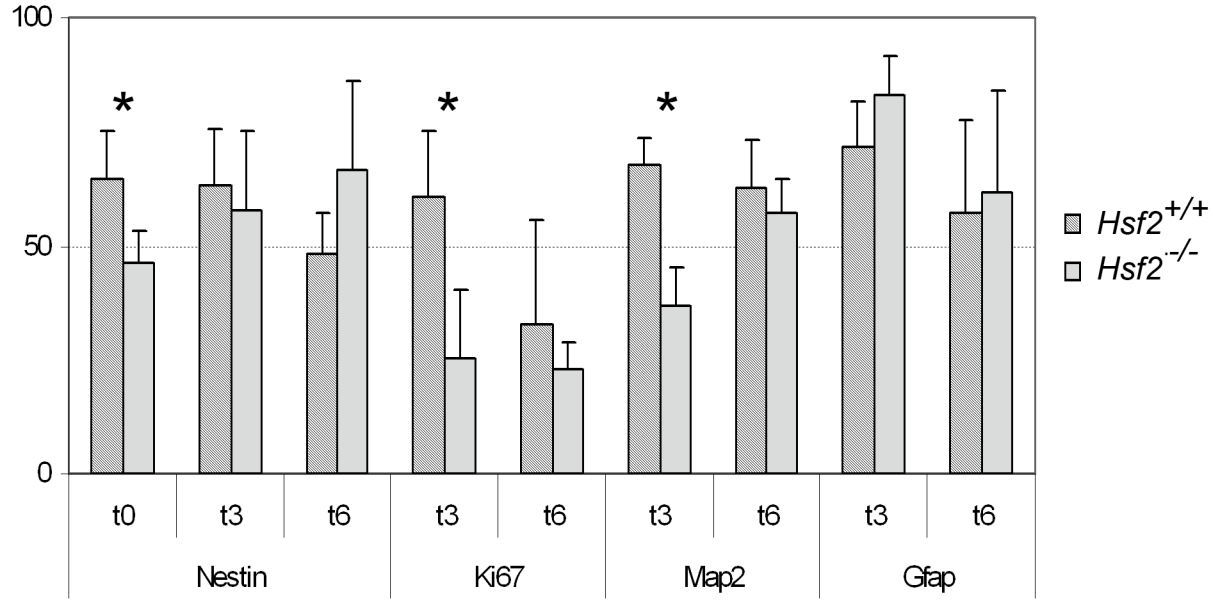



D.




A
J0
+/+
H/ Nestin
H/Nestin
-/-
B
J3
+/+
H
MAP
H/ MAP
-/-
H
MAP
H/MAP
C
J3
/+
H
GFAP
Ki67
H/GFAP/Ki67
-/-
GFAP
Ki67
H/GFAP/Ki67

**D.**




**Trouillet et al, Figure 5D**

# Chapitre 4

# Recherche de nouveaux gènes cibles de HSF2

Les connaissances actuelles portant sur le facteur de transcription HSF2 permettent d'entrevoir une fonction potentielle de ce facteur au cours des processus de prolifération et de différenciation/migration des cellules composant le cortex embryonnaire. Mais il manque un certain nombre d'information pour clairement établir les voies de signalisation impliquant HSF2 au cours de ces mécanismes. La découverte de *p35*, sous unité activatrice de CDK5, impliquée au cours des processus de migration, est un premier jalon de cette voie de signalisation. Mais cette unique cible ne suffit pas à expliquer l'ensemble du phénotype observé chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ (Chang *et al.*, 2006). D'autres gènes pourraient donc être régulés par HSF2. Il existe différentes stratégies pour rechercher les gènes cibles d'un facteur de transcription. Disposant de la souris KO pour *Hsf2*, nous avons opté pour une analyse globale du transcriptome par puces à ADN. Cette technique est fiable, rapide. De plus, le département de Biologie de l'ENS dispose d'une plateforme spécialisée dans l'analyse du transcriptome. Ce travail n'aurait pu être réalisé sans la collaboration de Vivienne Fardeau (UMR8541) et Stéphane Le Crom (INSERM 368).

## 4.1 Principe des puces à ADN et stratégie expérimentale

La technique des puces à ADN (Fig. 4.1) est une approche globale permettant de comparer les transcriptomes de deux populations cellulaires différentes. Le transcriptome peut se définir comme l'ensemble des transcrits présents dans une cellule à un instant t et dans une condition donnée. C'est une image de l'état fonctionnel du génome. Il est à noter que cette technique, aussi puissante soit-elle, possède des limites. En effet, les puces à ADN nous donnent accès à la quantité d'ARNm, qui est donc le résultat, non seulement de la transcription mais également de la dégradation des ARNm. De

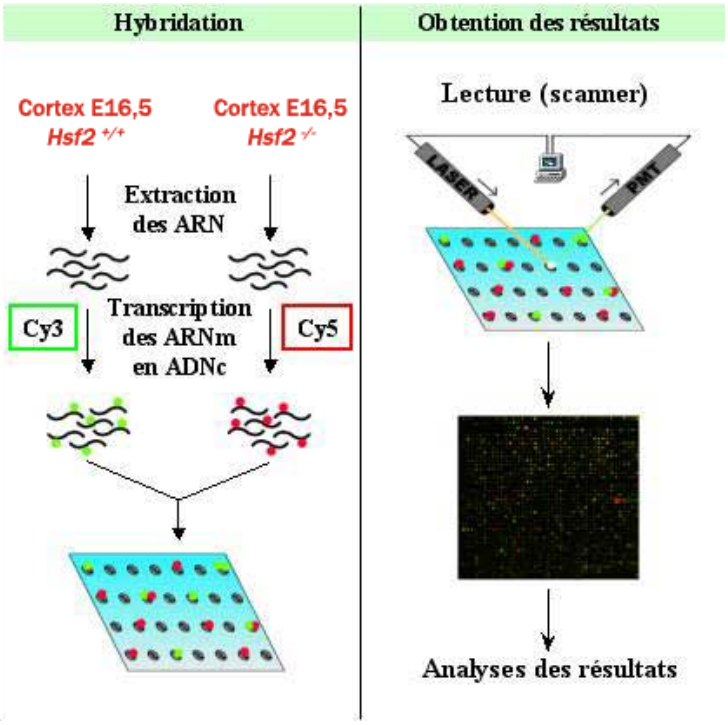



**Fig. 4.1 – Technique des puces à ADN.** D'après *www.transcriptome.ens.fr.*

plus, les véritables acteurs des fonctions cellulaires sont les protéines codées par ces ARNm et non les ARNm eux-mêmes. Toutefois, les données obtenues par puces à ADN restent un bon indicateur de la quantité effective de protéines dans la cellule (Greenbaum *et al.*, 2002). L'étude de la dynamique du transcriptome permet de caractériser des gènes dont les comportements sont liés et d'établir ainsi une hiérarchie d'expression de groupes de gènes pour ensuite révéler la structure des réseaux de régulation. Le protocole est disponible sur le site de la plateforme transcriptome du département de l'ENS : *http ://www.transcriptome.ens.fr/sgdb/protocols*

Les puces utilisées sont des 22k où 22000 gènes de souris (Mus musculus) spotés à la plateforme. Les embryons d'une même portée issus de femelles sauvages ou *knock-in* du gène de la *βgeo* inséré dans le gène *Hsf2* (Kallio *et al.*, 2002), sont disséqués et seuls les cortex sont prélevés pour l'expérience, précisément la partie caudo-médiane du cortex à E16.5 en évitant au maximum de prélever la VZ/SVZ. Les ARNm sont ensuite extraits, purifiés et traités à la DNase.

## 4.2 Résultats préliminaires

Six expériences ont été réalisées sur 5 couples d'embryons au stade E16,5, issus de portée sauvage et mutante pour le gène *Hsf2*. Les gènes analysés représentent 2251 gènes au total, soit une très faible proportion des gènes disponibles sur l'ensemble de la puce. D'un

point de vue général, on remarque que l'inactivation du gène *Hsf2* a pour conséquence l'induction d'un grand nombre de gènes. Cela indique que le facteur de transcription HSF2 aurait un effet majoritairement répresseur. Par ailleurs, les ratios sont relativement faibles ce qui confirme que le facteur HSF2 n'est pas un régulateur transcriptionnel très performant comparé à HSF1 (Sarge, 1995; Sistonen *et al.*, 1994).

Les gènes dont l'expression est modifiée dans la souris KO par rapport aux souris sauvages ont été regroupés en différentes catégories fonctionnelles. Le facteur HSF2 régule des gènes majoritairement impliqués dans la régulation de la transcription, la protéolyse et la transduction de signaux. Nous ne détaillerons ici que certains gènes sous couvert d'une étude préliminaire.

### 4.2.1 Gènes impliqués dans la neurogenèse et la gliogenèse

L'expression **APRF/STAT3** est plus réduite dans les cortex $Hsf2^{-/-}$, expliquant en partie, la réduction en cellules GFAP positives, marqueur astrocytaire, observée chez $Hsf2^{-/-}$ (Chang *et al.*, 2006). Au cours du développement du cortex, les facteurs bHLH contrôlent l'engagement cellulaire des progéniteurs vers la différenciation neuronale en activant les gènes proneuraux et par antagonisme avec les gènes qui promeuvent l'engagement astrocytaire des progéniteurs, les STAT (Guillemot, 2005). Les STAT sont impliqués dans les voies de signalisation de réponse aux facteurs de croissances. Un déficit en STAT, entraîne donc un défaut de signalisation nécessaire à l'engagement des cellules vers la différenciation astrocytaire. D'une façon très intéressante, ces facteurs STAT sont activés après ischémie. De plus, ils sont capables d'activer la transcription de *Hsp70* et *Hsp90*. STAT1 et HSF1 interagissent sur les promoteurs *Hsp* tandis que STAT3 et HSF1 ont une action antagoniste sur ces promoteurs (Stephanou and Latchman, 1999).

### 4.2.2 Gènes impliqués dans la migration et la dynamique des microtubules

Nous avons identifié *p35*, impliqué dans les voies régissant la migration des neurones corticaux comme cible directe de HSF2 (Chang *et al.*, 2006). P35 est capable de lier directement la tubuline et les microtubules modifiant ainsi la dynamique de migration des neurones (Hou *et al.*, 2007). De plus, lorsque la tubuline est mutée, des défauts de migration de type lissencéphalie sont observés chez les souris (Keays *et al.*, 2007). Les gènes codant pour la tubuline alpha 3 (**Tuba3**) et tubulin, beta 3 (**Tubb3**) sont réprimés chez les mutants $Hsf2^{-/-}$. Ceci renforce l'idée que HSF2 est capable de moduler la migration des neurones en agissant à différents niveaux. Les protéines **SLIT** sont d'autres acteurs régulant la direction des axons et la migration neurale (Whitford *et al.*, 2002). Slit3 est fortement surexprimé dans les cortex $Hsf2^{-/-}$. Slit3 est un inhibiteur de la croissance neuritique des neurones dopaminergiques. On peut supposer que les mutants $Hsf2^{-/-}$ pourraient avoir des défauts de connexion de ces neurones. *EGF-like growth factor re-*

*ceptor* **ErbB4** est important pour la migration tangentielle des interneurones du cortex (Hanashima *et al.*, 2006). L'expression de ErbB4 est augmentée chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$. Aucune observation de ce type de migration dans le cortex n'a été réalisée chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$.

### 4.2.3 Gènes impliqués au cours du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN

*RAD51 associated protein 1* (**Rad51ap1**) est capable d'interagir avec Rad51, ce complexe est important pour la recombinaison homologue et la réparation de l'ADN (Kovalenko *et al.*, 1997). Les cellules corticales *Hsf2*$^{-/-}$ expriment moins ce gène, ce qui pourrait affecter la viabilité des cellules du cortex. D'autres gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ont une expression augmentée chez le mutant. C'est le cas de la **cyclin H**, qui associée à CDK7 est impliquée dans la régulation de l'ARN polymérase (Liu *et al.*, 2007) ; **SEK1** (Jnkk1/ Map2k4) dont l'accumulation est retrouvée lors de mort neuronale ; **FAF1** est impliquée dans l'apoptose ; et **Fgf3** est un facteur de croissance.

Cette expérience nous permet de plus, de constater que des gènes impliqués dans la modification de l'état chromatinien ont une expression modulée dans les cortex *Hsf2*$^{-/-}$. L'*histone deacetylase complex subunit* **SAP30** est capable d'interagir avec p35 et le mutant SAP30 présente des défauts de prolifération ()Li2004. Son expression est augmentée chez les mutant *Hsf2*$^{-/-}$. La méthylation de l'ADN est un processus essentiel au cours du développement embryonnaire et important pour la répression transcriptionnelle. La *methylguanine-DNA methyltransferase* (**Mgmt**) a une expression réprimée chez le mutant *Hsf2*$^{-/-}$, de même pour les DNA methyl transférase **Dnmt3b** et **Dnmt1**. Ces résultats nous laissent supposer que HSF2 pourrait moduler les mécanismes régulant la répression de l'état chromatinien.

D'autres cibles ont attiré notre attention au vue de nos résultats préliminaires ou selon la littérature. L'expression des gènes HSP ne semble pas affectées par l'inactivation du gène *Hsf2* dans nos expériences. Néanmoins, l'$\alpha$-A-crystallin est plus exprimée chez le *Hsf2*$^{-/-}$. Pour ce qui est de la voie de signalisation de CDK5, p35 et p39 ont une expression qui diminue dans les cortex mutants *Hsf2*$^{-/-}$ (1,4 fois) en accord avec les résultats publiés.

## 4.3 Autres données générées par des puces...

Peu de données de puces sont disponibles à l'heure actuelle. L'équipe de Mivechi (Wang *et al.*, 2003) a proposé différents gènes comme étant potentiellement des cibles de HSF2. Ces expériences sont réalisées sur des puces Affymetrix (Murine Genome U74A set oligonucleotide arrays) à partir d'embryons totaux aux stade E8,5 et E10,5 issus de portée

sauvage ou *knock-in* du gène codant la GFP inséré dans l'exon 1 du gène *Hsf2*. Le protocole expérimental est donc sensiblement différent du notre. Dans cette étude, seulement 476 gènes sont exprimés dont 193 gènes sont connus. Entre les deux conditions, peu de gènes voient leur expression modifiée dans les stades E8,5 et E10,5. Il en ressort moins en commun avec notre étude. Dans les deux mutants, l'Apolipoprotein A est réprimé 2,3 fois à E8 et 2,5 fois à E16,5 ; l'interleukin5 est activé 3 fois à E8 et 1,3 fois à E16,5 ; RBP2 est réprimé 25 fois à E10 et 1,5 fois à E16,5. De plus, Tbr1 est activé de 3,3 fois chez le mutant à E10. Tbr1 est exprimé spécifiquement par les couches profondes du cortex qui sont générées en début de corticogenèse, une surexpression de Tbr1 peut résulter d'un défaut de formation des couches profondes qui perturberait l'agencement des couches successives. Les couches Tbr1 positives sont clairement établies à E16,5 (Puelles *et al.*, 1999). Tbr1 est réprimé de 0,8 fois dans nos conditions mais nos expériences d'hybridation in situ à E16,5 ne montrent aucune différence entre les souris sauvage et les mutantes pour le gène *Hsf2* (Chang *et al.*, 2006). Dlx1 est très exprimé chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ par rapport au sauvage à E10. Dlx1 est impliqué dans la différentiation des cellules subpalliales migrant tangentiellement dans le cortex (Cobos *et al.*, 2005). Dlx1 est faiblement réprimé dans nos expériences (0,9 fois). Ainsi le recoupement d'analyses est très difficile voir impossible car le fond génétique, le stade, les tissus, les puces utilisées ne sont absolument pas les mêmes. Il serait pourtant très enrichissant que des expériences de puces issues des différents KO souris soient réalisées de façon homogène, ceci dans un but de renforcer les données.

## 4.4 Limites et conclusion

La base de données issue de ces expériences de puces est importante et difficilement concluante uniquement par cette analyse. En effet, il faut modérer ces résultats car des limites existent. La première limite est expérimentale, puisque aucune analyse statistique n'a été possible du à une trop grande variabilité expérimentale dans nos conditions. Ce travail a été initié après Chang *et al.*, mais, en raison des problèmes d'hypofertilité des femelles *Hsf2*$^{-/-}$, deux années ont été nécessaire pour obtenir les portées nécessaires à cette étude. D'une part c'est sur fond encore mixte C57Bl/6J x C57Bl/6N au phénotype variable, que ces expériences ont été réalisées, des cibles ne sont peut être pas révélées dans nos conditions. De plus, les effets de HSF2 sur ses gènes cibles sont modestes au vu de ce qui se passe pour p35 et p39.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires à la confirmation de ces gènes cibles. Dans un premier temps, le niveau d'expression de ces gènes devra être vérifier soit par RT-PCR quantitative soit par hybridation *in situ*, deux techniques couramment utilisées au laboratoire. Dans un second temps, une recherche systématique de site HSE sur les gènes potentiels cibles pourra être entrepris au moyen du programme TESS (*http ://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess ?RQ=SEA-FR-Query*. Puis la fixation de HSF2 sur ces régions régulatrices, pourra être vérifié par chromatine immunoprécipitation, technique en cours d'optimisation au laboratoire. Les expériences de puces ne permettent pas de déterminer si les gènes régulés par HSF2 le sont de façon directe ou indirecte, d'où

la confirmation par ChIp.

Il sera intéressant de compléter cette étude par de nouvelles expériences réalisées, cette fois à partir d'embryons uniques. De nouvelles puces devraient être entreprises à différents stades embryonnaires par exemple E9,5 sur embryon unique, donc avec amplification. On peut aussi envisager, grâce au perfectionnement des différentes techniques, réaliser des puces pour étudier le transcriptome de population de cellules homogènes triées. Le transcriptome des cellules souches neurales *Hsf2*$^{-/-}$ pourrait être ainsi suivi après engagement dans les voies de différenciation neuronale ou astrocytaire. Ce *design* expérimental serait optimisé par l'utilisation de puces à haute résolution. Afin de discriminer les cibles directes des cibles indirectes, des expériences de ChIP devront être réalisées. Enfin, les expériences de ChIP on Chip et SACO [1]apparaîssent très attractives pour notre étude mais restent encore très limitées pour le modèle souris de part leur faiblesse de séquences analysées. D'ailleurs des études de ChIP on chip ont déjà été débutées dans le laboratoire de Lea Sistonen.

[1]La technique SACO (*serial analysis of chromatin occupancy technique*) (Impey *et al.,* 2004) permet d'analyser les séquences fixées par un facteur de transcription après ChIP de façon systématique sans discrimination de séquences. Elle apporte une alternative aux techniques de ChIP on Chip coûteuses et difficile chez la souris. Après l'expérience de ChIP classique, les fragments d'ADN sont amplifiés par PCR.

| Gene name | Fold Change | genbank |
|---|---|---|
| Slc4a3 | 67 | NM_009208 |
| Mam5 | 24 | BF180721 |
| Adam7 | 12 | NM_007402 |
| CBX3-ps1 pseudogene for heterochromatin protein 1 gamma | 11 | AJ278620 |
| fork head-1 | 11 | X74040 |
| immunoglobulin gamma-chain (IgG) | 9 | M58570 |
| transcription factor S-II-related protein | 9 | D00926 |
| homeo box B13 (Hoxb13) | 8 | NM_008267 |
| TPCR34 | 8 | X89686 |
| glycoprotein hormones, alpha subunit (Cga), . | 6 | NM_009889 |
| solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter) | 6 | NM_016972 |
| 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A (Htr3a) | 6 | NM_013561 |
| RPB5-mediating protein (Rmp-pending) | 6 | NM_011274 |
| Ott protein | 5 | X96606 |
| ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5 | 5 | NM_007647 |
| transforming growth factor, beta 2 (Tgfb2), . | 5 | NM_009367 |
| onzin | 5 | AF263458 |
| endogenous retroviral sequence ERV-L pol gene | 4 | AJ233594 |
| rearranged T-cell receptor delta-chain | 4 | X99249 |
| guanine nucleotide binding protein (G protein) | 3 | NM_025278 |
| candidate taste receptor TRB4 | 3 | AF247734 |
| putative pheromone receptor (VR6) | 3 | AF011416 |
| IgA V-D-J-heavy chain. | 3 | X94417 |
| IG heavy chain VDJ region (M-T408) | 3 | X65089 |
| DNA methyltransferase 3B (Dnmt3b), . | 3 | NM_010068 |
| inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 1 (Itih1) | 3 | NM_008406 |
| baculoviral IAP repeat-containing 1d (Birc1d) | 3 | NM_010869 |
| fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2 (Facl2) | 3 | NM_007981 |
| fibroblast growth factor receptor 3 (Fgfr3), | 3 | NM_008010 |
| nuclear RNA export factor 2 (Nxf2) | 3 | NM_031259 |
| Cacna1s | 3 | NM_014193 |
| putative CAMP protein (Camp) | 3 | AF119384 |
| anti human TNF-alpha immunoglobulin heavy chain v | 3 | AF252545 |
| Mouse rearranged immunoglobulin for heavy ch | 3 | X58644 |
| K+ voltage-gated channel, subfamily S, 1 (Kcns1), | 3 | NM_008435 |
| Ig rearranged H-chain gene V11-DQ52-J1 region. | 3 | L16828 |
| cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptid | 3 | NM_015730 |
| homeodomain protein RINX (Rinx) gene, complete cd | 3 | AF391757 |
| silver (Si), . | 3 | NM_021882 |
| Ig rearranged L-chain V-region, 5' end of cd | 3 | L20958 |
| kainate receptor GluR7 3 subunit , partial cd | 3 | AF245444 |
| homeo box D9 (Hoxd9), . | 3 | NM_013555 |
| TESP4 | 3 | AB009661 |
| anti-ganglioside GD3 immunoglobulin G heavy chain | 3 | S63023 |
| M. musculus rearranged T-cell receptor alpha chain | 3 | X56717 |
| endomucin (Emcn-pending) | 3 | NM_016885 |
| T-cell receptor alpha V region t2c6 | 3 | U86731 |
| ribosomal protein S6 kinase, 90kD, polypeptide 2 | 3 | NM_011299 |
| rearranged T-cell receptor beta chain Vbeta5 repertoire | 3 | Z12440 |
| protein kinase, cGMP-dependent, type I (Prkg1) | 3 | NM_011160 |
| spleen tyrosine kinase (Syk) | 2 | NM_011518 |
| Ig heavy chain V region (Igh-V) gene | 2 | AF029736 |
| synuclein, alpha (Snca). | 2 | NM_009221 |
| dC7 anti-poly(dC) monoclonal antibody kappa light | 2 | AF045496 |
| prothymosin alpha (Ptma), . | 2 | NM_008972 |
| PKC-regulated kinase PKK , . | 2 | AF302127 |
| potassium inwardly-rectifying channel, (Kcnj1) | 2 | NM_019659 |
| troponin T1, skeletal, slow (Tnnt1) | 2 | NM_011618 |
| radical fringe gene homolog, (Drosophila) (Rfng) | 2 | NM_009053 |

| | | |
|---|---|---|
| G protein-coupled receptor (MrgA3) | 2 | AY042193 |
| synaptic vesicle protein SV2B gene | 2 | AF196782 |
| gap junction membrane channel protein alpha 4 (Gja4) | 2 | NM_008120 |
| G protein-coupled receptor (MrgB3) gene | 2 | AY042201 |
| clone mOR11-40a olfactory receptor gene | 2 | AF309124 |
| regulated endocrine-specific protein 18 (Resp18) | 2 | NM_009049 |
| prohibitin (Phb) | 2 | NM_008831 |
| vertebrate homolog of C. elegans Lin-7 type 2 (Veli2-pending) | 2 | NM_011698 |
| Emr1 | 2 | U66888 |
| mitsugumin 29 (Mg29) | 2 | NM_008596 |
| Similar to CMRF35 leukocyte immunoglobulin-like | 2 | BC006801 |
| kinesin-related mitotic motor protein. | 2 | AJ223293 |
| prolactin receptor related sequence 1 (Prlr-rs1) | 2 | NM_008932 |
| nuclear autoantigenic sperm protein (Nasp) | 2 | NM_016777 |
| collagen alpha3(VI) (Col6a3) | 2 | AF034136 |
| lectin, galactose binding, soluble 12 (Lgals12) | 2 | NM_019516 |
| pyruvate kinase liver and red blood cell (Pklr) | 2 | NM_013631 |
| muscarinic acetylcholine receptor | 2 | AJ006521 |
| Svet1, 3'UTR | 2 | AF323987 |
| checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe) (Chek1) | 2 | NM_007691 |
| immunoglobulin heavy chain variable region | 2 | S54194 |
| Mouse Ig germline X24 kappa-chain (V-J1) | 2 | M24272 |
| macrophage receptor with collagenous structure | 2 | NM_010766 |
| heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2 (Hs6st2) | 2 | NM_015819 |
| cytochrome P450, 1a1, aromatic compound inducible | 2 | NM_009992 |
| TCR beta locus from bases 250554 to 501917 (secti | 2 | AE000664 |
| DNA polymerase epsilon small subunit , partia | 2 | AF036898 |
| Ras suppressor protein 1 (Rsu1), . | 2 | NM_009105 |
| RAD51 associated protein 1 (Rad51ap1), . | 2 | NM_009013 |
| granzyme B (Gzmb), . | 2 | NM_013542 |
| anti-DNA monoclonal autoantibody G5-33 heavy chai | 2 | AF289176 |
| 10, 11 days embryo cDNA, RIKEN full-length enrich | 2 | AK012841 |
| adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriche | 2 | AK015044 |
| 601332191F1 NCI_CGAP_Mam6 cDNA clone IMAGE:370946 | 2 | BE569977 |
| myelocytomatosis oncogene (Myc), . | 2 | NM_010849 |
| keratin complex 1, acidic, gene 2 (Krt1-2), . | 2 | NM_010665 |
| tubulin, beta 3 (Tubb3), mRNA. | 1,5 | NM_023279 |
| tubulin alpha 3 (Tuba3), mRNA. | 1,4 | NM_009446 |
| cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 2 (p39) | 1,4 | NM_009872 |
| cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35) | 1,4 | NM_009871 |
| Fas-associated factor 1 (Faf1), mRNA. | -1,5 | NM_007983 |
| fibroblast growth factor 3 (Fgf3), mRNA. | -1,5 | NM_008007 |
| Sin3-associated protein (sap30) mRNA, complete cds. | -1,6 | AF075136 |
| Mgmt, mRNA. | -1,6 | NM_008598 |
| Mouse 1400 base pair ubiquitin , 5' end. | 2 | M81747 |
| EGF-like growth factor receptor ErbB4 extracellul | -2 | AF059176 |
| Aip1 , . | -2 | AF069744 |
| trace amine receptor 1 (Ta1) gene, ., | -2 | AF380187 |
| Mouse for immunoglobulin kappa chain variabl | -2 | D50387 |
| killer cell lectin-like receptor subfamily A, mem | -2 | NM_008459 |
| 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (Hmgc | -2 | NM_008254 |
| K20D4 (K20D4) , . | -2 | AF313800 |
| CD3 antigen, gamma polypeptide (Cd3g), . | -2 | NM_009850 |
| inducible T-cell co-stimulator (Icos), . | -2 | NM_017480 |
| olfactory receptor 64 (Olfr64), . | -2 | NM_013616 |
| Mouse (cell line 40-160) anti-digoxin Ig heavy ch | -2 | M17943 |
| proto-oncogene AF4 , . | -2 | AF074266 |
| infected mouse B seq 11, day 10, T cell receptor | -2 | AF041938 |
| epidermal growth factor-containing fibulin-like e | -2 | NM_021474 |
| cyclic AMP specific phosphodiesterase PDE4D5A mRN | -2 | AF038896 |

| | | |
|---|---|---|
| Mouse Ig active H-chain V-region: anti-phOx | -2 | X06504 |
| seven in absentia 2 (Siah2), . | -2 | NM_009174 |
| MJ0495-like protein SelB , . | -2 | AF268871 |
| cysteine-rich protein 3 (Csrp3), . | -2 | NM_013808 |
| tripartite motif protein 26 (Trim26), ., chro | -2 | NM_030698 |
| steroid sulfatase (Sts), . | -2 | NM_009293 |
| CD6 antigen (Cd6), . | -2 | NM_009852 |
| for beta chimaerin (bch gene). | -2 | AJ279014 |
| M. musculus rearranged T-cell receptor alpha chai | -2 | X56722 |
| CocoaCrisp (AF329198), ., location = 1..2543, | -2 | NM_031402 |
| partial for N-acetylgalactosaminyltransferas | -2 | AJ133523 |
| nucleoporin 155 (Nup155) , . | -2 | AF322375 |
| for tenascin-r, partial. | -2 | AJ005844 |
| histocompatibility-2 complex class 1-like sequenc | -2 | NM_008209 |
| , Similar to nucleolar phosphoprotein p130, clone | -2 | BC003244 |
| matrix metalloproteinase 20 (enamelysin) (Mmp20), | -2 | NM_013903 |
| sperm associated antigen 6 (Spag6), . | -2 | NM_015773 |
| Mouse Ig rearranged H-chain V-region from hy | -2 | M12236 |
| T cell receptor V8.2D2J2.6 beta chain , parti | -2 | AF034162 |
| for beta-A3/A1 crystallin protein (Cryba1 ge | -2 | AJ239052 |
| cellular retinoic acid binding protein I (Crabp1) | -2 | NM_013496 |
| Mouse immunoglobulin heavy chain variable region. | -2 | L26542 |
| tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2 (T | -2 | NM_009396 |
| heme binding protein 2 (Hebp2), . | -2 | NM_019487 |
| clone N2.1.a immunoglobulin heavy chain VDJ regio | -2 | AF059707 |
| Down syndrome critical region gene c (Dcrc), | -2 | NM_019543 |
| Mouse for Krox-20 protein containing zinc fi | -2 | X06746 |
| clone 1 immunoglobulin IgG heavy chain VDJ region | -2 | AF145962 |
| for immunoglobulin heavy chain variable regi | -2 | Z72449 |
| Mouse T-cell differentiation antigen (Lyt-2) | -2 | M12052 |
| anti-DNA immunoglobulin heavy chain IgG , ant | -2 | U55480 |
| 5' IAP LTR=defective retrovirus...Int-3 {integrat | -2 | S80638 |
| junctophilin 1 (Jph1), . | -2 | NM_020604 |
| Mouse genetic suppressor element (911GSE) . | -2 | L27154 |
| PYS-2 , exons 5-8, 3' UTR. | -2 | M23894 |
| clone pMG75 nonsatellite RNA sequence. | -2 | U26225 |
| infected mouse B seq 4, day 14, T cell receptor b | -2 | AF041961 |
| G protein-coupled receptor 87 (Gpr87), ., loc | -2 | NM_032399 |
| anti-Plasmodium circumsporozoite surface protein | -2 | S57281 |
| kinase interacting with leukemia-associated gene | -2 | NM_010633 |
| for 15kD interferon alpha responsive protein | -2 | AJ251363 |
| Wnt-15 protein (Wnt-15) gene, partial cds., produ | -2 | AF031169 |
| solute carrier family 10, member 2 (Slc10a2), mRN | -2 | NM_011388 |
| calsenilin-like protein (Calp) , | -2 | AF305071 |
| heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1 (Hs6st1), | -2 | NM_015818 |
| brain Cog8 cDNA, clone MNCb-5704. | -2 | AB041610 |
| for Tcell receptor chain chain. | -2 | X00441 |
| cyclin H (Ccnh) , . | -2 | AF287135 |
| alpha 1 microglobulin/bikunin (Ambp), ., chro | -2 | NM_007443 |
| rearranged T-cell receptor beta chain Vbeta8 repe | -2 | Z12557 |
| phosphotriesterase related (Pter), . | -2 | NM_008961 |
| solute carrier family 16 (monocarboxylic acid tra | -2 | NM_020516 |
| rearranged T-cell receptor beta chain Vbeta8 repe | -2 | Z12206 |
| dachshund-like protein DACH2 (Dach2) , comple | -2 | AF257217 |
| partial for TGFb inducible Sp1-like protein | -2 | AJ275989 |
| breast metastasis suppressor 1-like protein , | -2 | AF233580 |
| single WAP motif protein 2 , . | -2 | AF276975 |
| M.domesticus for P lysozyme gene. | -2 | X53630 |
| myelodysplasia syndrome 1 homolog (human) (Mds1), | -2 | NM_021442 |
| pleckstrin homology-like domain, family A, member | -2 | NM_013750 |

| | | |
|---|---|---|
| for mszf15, partial cds. | -2 | AB010329 |
| FVB/N collagen pro-alpha-1 type I chain , com | -2 | U08020 |
| Mouse gamma-B-crystallin (gamma-3) , 3' end. | -2 | K02585 |
| potassium voltage-gated channel, shaker-related s | -2 | NM_010597 |
| cell adhesion molecule nectin-3 alpha , compl | -2 | AF195833 |
| claudin 5 (Cldn5), . | -2 | NM_013805 |
| Mouse interleukin 2 receptor (IL 2R) , partia | -2 | M21982 |
| cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptid | -2 | NM_007390 |
| keratin associated protein 6-1 (Krtap6-1), . | -2 | NM_010672 |
| , Similar to vacuolar protein sorting 26 (yeast ho | -2 | BC007148 |
| odorant receptor K13 gene, ., product | -2 | AF282273 |
| selenium binding protein 2 (Selenbp2), . | -2 | NM_019414 |
| cordon-bleu , partial cds. | -2 | U26967 |
| Ig H=anti-alpha-fetoprotein antibody AF5 heavy ch | -2 | S78554 |
| metabotropic glutamate receptor type 5 , part | -2 | AF140349 |
| for immunoglobulin kappa light chain variabl | -2 | X99509 |
| immunoglobulin heavy chain . | -2 | L31896 |
| rearranged T-cell receptor beta chain Vbeta8 repe | -2 | Z12239 |
| Mouse endothelial ligand for L-selectin (GLYCAM1) | -2 | M93428 |
| cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit | -2 | AF305427 |
| M.domesticus IgG variable region. | -2 | Z22038 |
| UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminylt | -2 | NM_016888 |
| interleukin 16 (Il16), . | -2 | NM_010551 |
| coagulation factor III (F3), . | -2 | NM_010171 |
| mitochondrial for very-long-chain acyl-CoA d | -2 | Z71189 |
| platelet derived growth factor receptor, beta pol | -2 | NM_008809 |
| IMAGE:975524 plectin , partial cds. | -2 | AY032899 |
| Mouse gamma-F-crystallin (gamma-2) , complete | -2 | K02584 |
| cone-rod homeobox containing gene (Crx), . | -2 | NM_007770 |
| mg97c02.r1 Soares mouse embryo NbME13.5 14.5 cDNA | -2 | AA008901 |
| ADP-ribosyltransferase 2b (Art2b), . | -2 | NM_019915 |
| strain C57BL odorant receptor B1 , partial cd | -2 | AF178750 |
| anti-rhinovirus HRV2 immunoglobulin G heavy chain | -2 | S62964 |
| tripartite motif protein 10 (Trim10), . | -2 | NM_011280 |
| potassium voltage-gated channel, shaker-related s | -2 | NM_010598 |
| , Similar to ELK4, member of ETS oncogene family, | -2 | BC004798 |
| latent transforming growth factor beta binding pr | -2 | NM_008520 |
| partial for immunoglobulin light chain, (IGK | -2 | AJ272393 |
| infected mouse C seq 3, day 10, T cell receptor b | -2 | AF041942 |
| Mouse gamma-glutamyltransferase , 5' untransl | -2 | L17335 |
| nitric oxide synthase 3, endothelial cell (Nos3), | -2 | NM_008713 |
| 8-3 immunoglobulin light chain variable region mR | -2 | AF178619 |
| rearranged Ig H-chain , VDJH region (clone C5 | -2 | L14356 |
| Mouse Ig gamma chain , V-D-J region from hybr | -2 | M92394 |
| solute carrier family 17 vesicular glutamate tran | -2 | NM_009198 |
| thromboxane A2 receptor (Tbxa2r), . | -2 | NM_009325 |
| cartilage associated protein (Crtap), . | -2 | NM_019922 |
| membrane protein, palmitoylated 5 (MAGUK p55 subf | -2 | NM_019579 |
| cyclin H (Ccnh) mRNA, complete cds. | -2 | AF287135 |
| Mouse apolipoprotein A-I/CIII . | -3 | L04150 |
| for Qa-2 antigen. | -3 | X57330 |
| for syncoilin (dystrobrevin binding protein) | -3 | AJ251641 |
| calpain 3 (Capn3), . | -3 | NM_007601 |
| anti-DNA immunoglobulin heavy chain IgG , ant | -3 | U55543 |
| guanylate nucleotide binding protein 3 (Gbp3), mR | -3 | NM_018734 |
| myozenin 1 (Myoz1), . | -3 | NM_021508 |
| phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit | -3 | NM_008841 |
| killer cell lectin-like receptor, subfamily A, me | -3 | NM_013794 |
| casein delta (Csnd), . | -3 | NM_009973 |
| anti-polycation monoclonal antibody, Ig heavy cha | -3 | U78493 |

| | | |
|---|---|---|
| latexin (Lxn), . | -3 | NM_016753 |
| Mouse 56 kdal protein  from an interferon act | -3 | M13794 |
| crystallin, gamma A (Cryga), ., chromosome = | -3 | NM_007774 |
| glutathione S-transferase, theta 2 (Gstt2), . | -3 | NM_010361 |
| serologically defined colon cancer antigen 28 (Sd | -3 | NM_019990 |
| Mouse Ig rearranged gamma-chain , clone AN12g | -3 | M19904 |
| dC3 anti-poly(dC) monoclonal antibody heavy chain | -3 | AF045485 |
| TAR (HIV) RNA binding protein 2 (Tarbp2), . | -3 | NM_009319 |
| beta-parvin (Parvb) , . | -3 | AF237770 |
| olfactory receptor 17 (Olfr17), . | -3 | NM_020598 |
| Mouse  fragment, clone S20. | -3 | M94291 |
| proliferin 2 (Plf2), ., location = 1..850, ti | -3 | NM_011118 |
| advanced glycosylation end product-specific recep | -3 | NM_007425 |
| infected mouse B seq 2, day 7, T cell receptor be | -3 | AF041893 |
| carbonic anhydrase 5b, mitochondrial (Car5b), mRN | -3 | NM_019513 |
| phosphatidic acid phosphatase 2a (Ppap2a), . | -3 | NM_008903 |
| wingless-related MMTV integration site 5B (Wnt5b) | -3 | NM_009525 |
| , , testis-specific gene. | -3 | AB033128 |
| anti-DNA immunoglobulin heavy chain IgG , ant | -3 | U55461 |
| sialyltransferase 7 ((alpha-N-acetylneuraminyl 2, | -3 | NM_011373 |
| Mouse class II MHC E-beta 2 (a/k) gene exon 3., l | -3 | X05316 |
| Mouse gene for IgE heavy chain constant region., | -3 | X01857 |
| gene for anti-CEA mAb T84.66 kappa light chain V- | -3 | X52768 |
| galanin receptor 2 (Galr2), . | -3 | NM_010254 |
| mG28K  for GTP-binding protein like 1, comple | -3 | AB051827 |
| pre-B lymphocyte gene 1 (Vpreb1), . | -3 | NM_016982 |
| neuropeptide NPFF receptor , . | -3 | AF330054 |
| Mouse Ig rearranged kappa-chain (NC19-F8)  Vk | -3 | M34632 |
| , Similar to tubulin tyrosine ligase-like 1, clone | -3 | BC010510 |
| chloride channel K1-like (Clcnk1l-pending), . | -3 | NM_019701 |
| rer gene, partial. | -3 | AJ006130 |
| odorant receptor S1 gene (Ors1), . | -3 | NM_020288 |
| gastric intrinsic factor (Gif), . | -3 | NM_008118 |
| rearranged T-cell receptor beta chain Vbeta8 repe | -3 | Z12555 |
| chromatin-specific transcription elongation facto | -3 | AF323667 |
| traube (Trb), . | -3 | NM_019816 |
| 12 days embryo male wolffian duct includes surrou | -3 | AK020172 |
| phosphatidylserine synthase 2 (Ptdss2), . | -3 | NM_013782 |
| Mouse Ig rearranged H-chain  V-D-J region, pa | -3 | M36742 |
| Mouse Ig unproductively rearranged kappa-chain mR | -4 | M30420 |
| amyloid beta (A4) precursor protein-binding, fami | -4 | NM_021546 |
| glutamic acid decarboxylase 2 (Gad2), . | -4 | NM_008078 |
| urocortin (Ucn), ., chromosome = 5, location | -4 | NM_021290 |
| BCL2-antagonist/killer 1 (Bak1), . | -4 | NM_007523 |
| Mox-2A . | -4 | Z16406 |
| 12 days embryo female mullerian duct includes sur | -4 | AK018356 |
| MAD homolog 5 (Drosophila) (Madh5), . | -4 | NM_008541 |
| immunoglobulin light chain, variable region. | -5 | AJ001950 |
| SLIT3 (Slit3) , partial cds. | -5 | AF144629 |
| infected mouse A seq 1, day 10, T cell receptor b | -5 | AF041917 |
| nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3 ( | -5 | NM_013839 |
| RAB17, member RAS oncogene family (Rab17), . | -5 | NM_008998 |
| glucose-6-phosphatase, catalytic (G6pc), . | -6 | NM_008061 |
| transient receptor potential cation channel, subf | -6 | NM_012035 |
| Mouse lens alpha-A-crystallin , 3' end. | -7 | J00376 |
| Ig rearranged anti-Sm hybridoma  V-region seq | -7 | L08997 |
| bone morphogenetic protein 8a (Bmp8a), . | -11 | NM_007558 |
| complement receptor related protein (Crry), . | -13 | NM_013499 |
| retinal G protein coupled receptor (Rgr), . | -13 | NM_021340 |
| infected mouse A seq 6, day 14, T cell receptor b | -14 | AF041954 |

# Troisième partie

# Discussion

Depuis de nombreuses années au laboratoire, le facteur HSF2 est étudié dans un contexte développemental. Mes travaux de recherche ont contribués à confirmer que HSF2 est impliqué au cours de la formation du cortex cérébral chez la Souris où celui-ci est fortement exprimé et actif au cours de la corticogenèse. Cet étude s'inscrit dans une investigation plus générale sur les fonctions que remplissent les facteurs HSF au cours du développement.

Après avoir discuté les avantages et les limites des différents modèles développés pour l'étude de la fonction de HSF2 au cours du développement, nous récapitulerons les principaux résultats obtenus au cours de l'étude de l'implication du facteur HSF2 dans les processus de migration, de prolifération et de différenciation du système nerveux central. Ces données offrent de nouvelles perspectives d'études dans les mécanismes d'action de HSF2 au cours du développement, confirmant que les HSF sont aussi impliqués dans la régulation de l'expression de gènes autres que les gènes *Hsp* en conditions physiologiques.

# 1 Intérêt des modèles utilisés et des stratégies employées

## 1.1 Modèles

Pour étudier l'action potentielle de HSF2 *in vivo* au cours du développement, deux modèles animaux ont été utilisés dans ce travail. Le premier est le modèle souris *knock-in* obtenus par l'insertion du gène codant la $\beta$galactosidase dans le gène *Hsf2*. Le second est le modèle poulet, où l'embryon précoce est soumis à une transfection par électroporation.

Par comparaison aux souris sauvages, l'analyse du phénotype des cortex des souris *Hsf2*$^{-/-}$ a montré une désorganisation cellulaire du cortex, une réduction de certains progéniteurs comme la glie radiaire et un défaut de migration de certains neurones destinés aux couches superficielles (Chang *et al.*, 2006). Une analyse plus fine des mécanismes affectés en absence de HSF2 a été rendue possible par l'analyse biochimique des cortex *Hsf2*$^{-/-}$ complétée par la surexpression de mHSF2 dans les cellules K562 en collaboration avec le laboratoire de Lea Sistonen (Finlande). Des souris *Hsf2*$^{-/-}$ générées au laboratoire (Kallio *et al.*, 2002), différents types cellulaires ont été dérivés et mis en culture comme les fibroblastes embryonnaires (Ostling *et al.*, 2007) ou les cellules souches neurales foetales. Par comparaison aux sauvages, ces cellules souches neurales mises en culture semblent indiquer que HSF2 est impliqué dans la prolifération et la différenciation. D'autres stratégies sont envisagées à l'heure actuelle par transfection des cellules souches neurales soit pour

surexprimer HSF2 dans des cellules sauvages, pour tester l'effet dose du facteur, soit dans des cellules *Hsf2*$^{-/-}$ pour tenter de sauver le phénotype (expérience de *rescue*). Enfin, l'utilisation de siRNA permettant une extinction totale des transcrits du gène *Hsf2*, pourrait apporter des informations complémentaires à l'étude menée pour l'instant et confirmer les effets du *knock-out*.

En parallèle, un second modèle d'étude a été développé. En utilisant l'électroporation *in ovo* en collaboration avec Pascale Gilardi (Ens, Paris), les embryons de poulet au stade précoce peuvent être transfectés par différentes constructions codant pour les différentes isoformes de HSF2, des dominants négatifs, ou des constructions shRNA. L'analyse de l'effet des dernières constructions n'a pas été pleinement exploitée dans le temps imparti. L'avantage de l'électoporation *in ovo* comme nous l'avons présenté dans l'article 2 est que cette technique est plus rapide et plus aisée par rapport aux techniques classiques de transgenèse chez la souris. Le modèle poulet est complémentaire au modèle souris, même si le stade de développement ainsi que le tissu étudié ne sont pas les mêmes. En effet, chez la souris, nous avons étudié principalement le cortex cérébral aux stades tardifs du développement après E10,5 (soit après 30-36 somites), chez le poulet, nous avons étudié la formation du tube neural aux stades 16HH de développement (soit 26-28 somites). Le stade de développement précoce choisi pour l'électroporation facilite la technique car l'embryon est plus accessible et se trouve à un stade où les HSF endogènes sont faiblement exprimés (Trouillet *et al.,* manuscrit en révision). L'utilisation de ces deux modèles se justifie dans la mesure où HSF2 est impliqué dans les processus de prolifération, de survie et de différenciation qui s'opèrent très tôt dans le tube neural en développement et déterminent la régionalisation et l'architecture du cortex.

## 1.2 Sévérité et variabilité du phénotype *Hsf2*$^{-/-}$

Le modèle poulet a de plus, permis de fournir une alternative à l'étude de la fonction de HSF2. En effet, si le phénotype *Hsf2*$^{-/-}$ est totalement pénétrant sur le fond C57Bl6 N, une variabilité du phénotype a été observée sur d'autres fonds génétiques notamment sur la lignée sur laquelle je travaillai après un croisement malencontreux (C57Bl6 N x C57Bl6 J).

L'analyse des différentes souris *Hsf2*$^{-/-}$, la pénétrance du phénotype ainsi que la variabilité de la sévérité du phénotype est relativement complexe. Différents laboratoires ont généré des souris *Hsf2*$^{-/-}$ utilisant différentes stratégies sur différents fonds génétiques comme nous l'avons vu et n'ont pas la même sévérité de phénotype. Les souris *Hsf2*$^{-/-}$ générées au laboratoires présentent une variabilité du phénotype marquée lorsque le fond génétique est mixte C57BL/6J x C57Bl/6N. Ces études suggèrent que le phénotype des souris *Hsf2*$^{-/-}$ est influencé par le fond génétique des lignées utilisées. De plus, une variabilité de la sévérité du phénotype est observée chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ est observée que cela soit au niveau morphologique ou au niveau biochimique, puisque le niveau d'expression de *p35* varie selon les cerveaux considérés (Chang *et al.*, 2006).

D'une façon générale, il n'existe pas de fond génétique consanguin idéal pour l'étude d'une mutation donnée. Par contre, plusieurs publications rapportent que le phénotype d'une mutation donnée varie en fonction du fond génétique (Nadeau, 2001; Al-Saktawi *et al.*, 2003). Sans l'expérimentation le choix du fond génétique le plus approprié est difficile. Aussi il est préférable de maintenir le modèle *Hsf2*$^{-/-}$ sur un fond génétique consanguin C57Bl6 N pour l'analyse du mécanisme d'action de HSF2, fond génétique présentant une pénétrance du phénotype quasi totale. Ceci est actuellement réalisé au laboratoire. En revanche, sur ce fond, les problèmes d'hypofertilité des femelles rendent difficiles l'obtention de portées *Hsf2*$^{-/-}$ en quantité suffisante pour des expériences telles que les ChIP et les chips.

Les études d'inactivation génique chez la souris sont le plus souvent réalisées dans des lignées consanguines, pour que l'allèle muté constitue la seule différence génétique entre la lignée sauvage et celle mutée. Cependant, les animaux transgéniques sont souvent produits dans des fonds génétiques hybrides qui procurent de meilleurs rendements pour la transgenèse. Ces animaux possèdent alors un fond génétique non fixé rendant difficile les comparaisons entre animaux. Le transgène est alors transféré dans une lignée consanguine à la suite de croisements en retour (N10). Au bout d'au moins dix générations de croisement en retour, la probabilité que les souris ne possède plus les allèles des souris donneuses du transgène est négligeable. Ainsi, le fond des souris transgéniques est passé de celui des souris donneuses du transgène au fond génétique des receveuses. En revanche, les locus situés à proximité du transgène sont sélectionnés aussi. Les souris transgéniques sélectionnées possèdent donc le segment chromosomique contenant le site d'intégration du transgène. Après dix croisements en retour, la taille moyenne de ce segment chromosomique est d'environ 40 mégabases (Mb), soit environ 1,5% du génome (Montagutelli, 2000). Il est donc difficile d'exclure, dans l'analyse d'un phénotype d'une souris transgénique donnée, l'apparition d'un biais par l'intégration d'un segment chromosomique contenant plus que le transgène. L'analyse des régions flanquantes des différents transgènes utilisés pour générer les souris KO pourrait être instructif pour comprendre la variabilité des phénotype obtenu. En parallèle, des approches complémentaires pour confirmer les effets observés chez les souris KO sont donc nécessaires, justifiant l'utilisation du modèle poulet ou des cellules K562.

D'autre part, l'étude du phénotype des souris *Hsf2*$^{-/-}$, montre des variabilités sensibles au fond génétique (Kallio *et al.*, 2002; McMillan *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Des gènes dits « modificateurs »pourraient contrôler ces différences (Johnson *et al.*, 2006). Un gène modificateur peut intervenir dans l'expression phénotypique d'un allèle situé sur un locus différent du sien. Exemple, la quantité de taches du pelage des vaches ; les différentes teintes des yeux ... Chaque individu possède une combinaison unique de traits polymorphiques qui modifient sa susceptibilité à développer certaines pathologies mais aussi qui modulent le type de réponse à un médicament ou à une agression. Ces gènes modificateurs ont été reconnus impliqués dans certaines maladies comme la mucoviscidose. L'identification de ces gènes a été réalisée en combinant sévérité du phénotype et analyses génétiques soit par microsatellites, soit par QTL (Davies 2005). De plus les données disponibles sur *Mouse phenome database (http : //www.jax.org/phenome)* collectant des

informations phénotypiques variées sur les lignées consanguines de souris pourraient aussi être utilisées, pour caractériser les gènes modificateurs impliqués dans la variabilité du phénotype des souris *Hsf2*$^{-/-}$.

Globalement, sur le fond génétique C57Bl6/N, le phénotype des souris *Hsf2*$^{-/-}$ est totalement pénétrant c'est-à-dire que tous les embryons sont affectés. Mais la sévérité des défauts observés chez les embryons est variable. La caractérisation du phénotype par la taille du cerveau pourrait être utilisée pour évaluer le cœfficient de sévérité du phénotype muté. Cette variabilité comme nous l'avons vu semble dépendre du fond génétique, de gènes modificateurs. J'ai eu l'occasion d'analyser l'organisation des cerveaux des souris $Hsf2^{neo/neo}$ données par Elisabeth Christians (Toulouse), ceux-ci présentent à E15,5 et E16,5 d'importantes anomalies de formation du cortex, certains des hydroencéphalies. De plus, une désorganisation de la sous-plaque est observée rappelant les défauts du phénotype des souris $Hsf2^{\beta geo/\beta geo}$. Par ailleurs, HSF2 est un facteur de réponse au stress dont les stimuli activateurs ne sont pas encore connus en conditions physiologiques. D'après la variabilité des phénotypes observés chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ issus des différents laboratoires, on peut supposer que HSF2 serait impliqué dans une réponse selon un environnement particulier. En conclusion, HSF2 pourrait être impliqué au cours des processus d'épigenèse [2] qui s'opèrent au cours du développement.

## 1.3 Stratégies

Différentes stratégies d'études ont été menées de façon complémentaires dans ce travail de recherche, qu'il s'agissent de modèle perte de fonction à l'aide des souris KO pour le gène *Hsf2* ou du modèle gain de fonction à l'aide de l'électroporation *in ovo* chez le poulet. Face à la variabilité du phénotype des souris *Hsf2*$^{-/-}$ et la variabilité des effets de la surexpression de HSF2 dans le tube neural du poulet, il a donc fallu développer d'autres stratégies d'analyses. En collaboration avec Thomas Tully (Ens,Paris), nous avons développé une analyse statistique des phénomènes observés chez le modèle poulet d'une part et dans les neurosphères en culture issues du modèle souris d'autre part. Cela valorise d'autant plus les résultats obtenus de part leur robustesse statistique mais aussi de par l'originalité d'une telle approche *in vivo*.

Cette stratégie d'étude nous a permis de confirmer l'hypothèse suivante. D'après le profil d'expression et d'activation du facteur HSF2 (Rallu *et al.*, 1997; Kallio *et al.*, 2002), nous suspections une fonction de celui-ci en conditions physiologiques dans les processus

[2] Théorie qui a été opposé à la préformation au cours du développement. Mais une nouvelle signification a émergé lorsque la génétique a développé les notions de génotype et de phénotype. Des modifications du phénotype sont dites épigénétiques lorsqu'elles sont héritables en dépit du fait qu'elles ne sont pas dues à des modifications génétiques (mutations ou remaniements du génome). Elles peuvent apparaître à la suite d'un signal de l'environnement, mais elles ne disparaissent pas avec ce signal. Autrement dit, avec le même génome, et dans des conditions identiques, des cellules ou des organismes peuvent avoir un phénotype différent, si leur passé a été différent. Ceci est la manière biologique de décrire ce que les physiciens appellent la multistationnarité, et qui résulte du fonctionnement de certains systèmes dynamique présentant des interactions non linéaires.

de différenciation, de survie et de prolifération qui régissent l'organisation du cortex. En effet, HSF2 est impliqué au cours de la migration des neurones post-mitotiques, et au cours de la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales et des progéniteurs du système nerveux central.

# 2 HSF2 est impliqué au cours de la migration des neurones

L'analyse des souris générées au laboratoire dont le gène *Hsf2* est inactivé (sur fond C57Bl/6N), montre des défauts de lamination des couches superficielles du cortex par rapport au sauvage. En effet, les expérences de *Birthdating* (Chang *et al.*, 2006) montrent que certains neurones destinés aux couches superficielles du cortex restent bloqués dans les couches profondes. Tous les neurones n'ont pas une localisation ectopique, suggérant un phénotype plus modéré par rapport à celui des cortex des souris *Reeler* ou $Cdk5^{-/-}$ où les couches corticales sont quasiment inversées (Gilmore *et al.*, 1998; Ohshima *et al.*, 1999; D'Arcangelo, 2006).

## 2.1 Origine des défauts de migration

Ces défauts de positionnement des neurones post-mitotiques peuvent s'expliquer au niveau cellulaire par une réduction du nombre de cellule de glie radiaire en milieu de gestation, comme le montrent les expériences d'immunohistochimie à E15,5 à l'aide d'un anticorps contre RC2 (marqueurs de la glie radiaire) (Chang *et al.*, 2006). La glie radiaire constitue à la fois une population de progéniteurs cellulaires (Hartfuss *et al.*, 2001; Alvarez-Buylla *et al.*, 2001; Temple, 2001; Fujita, 2003; Götz and Huttner, 2005) et permet la migration des précurseurs neuronaux grâce à leurs fibres radiaires (Luskin *et al.*, 1988; Kornack and Rakic, 1995; Noctor *et al.*, 2001). S'il y a moins de progéniteurs, le processus de neurogenèse en est perturbé mais des phénomènes de compensations peuvent avoir lieu, modifiant le schéma de corticogenèse classique. De plus, si le réseau de fibre de glie radiaire, support de la migration gliophilique des neurones est désorganisé, les neurones auront plus de difficultés à atteindre les couches auxquelles ils sont destinés. D'autre part, une réduction du nombre des cellules peuplant la zone marginale, dont les cellules de Cajal-Retzius est observée grâce à l'utilisation d'anticorps anti-calrétinine (Chang *et al.*, 2006). Ces cellules sécrètent la Reeline, protéine impliquée dans la signalisation permettant la migration des neurones. Cette diminution de l'expression de la Reeline semble due principalement à la réduction de cellules Cajal-Retzius et non à une régulation directe du niveau d'expression de la Reelline par HSF2 car le facteur de choc thermique n'est pas exprimé dans la zone marginale.

Par ailleurs, les voies de signalisation régissant la migration des neurones post-mitotiques sont affectées chez les souris $Hsf2^{-/-}$ par rapport aux sauvages. Une diminution

indirecte de l'expression de la protéine Reeline, due à la diminution de cellules de Cajal-Retzius, et par ailleurs, une diminution directe de p35 résultant en une réduction d'activité CDK5, affectent probablement la dynamique des microtubules dans les neurones *Hsf2*$^{-/-}$ (Fig. 2). Ainsi, HSF2 module la migration des neurones corticaux à partir du milieu de la gestation, en agissant à différents niveaux des voies de signalisation régissant la migration. La diminution de la Reeline semble affecter le niveau de phosphorylation de DAB1 sur ses résidus tyrosine. Ceci pourrait perturber l'action de DAB1 sur ses effecteurs comme LIS1 ou d'autres MAP. L'action de HSF2 sur l'expression de la protéine DAB1, protéine activée par phosphorylation dans la voie Reeline et CDK5, n'est pas encore clairement élucidée. En effet, chez les souris *Reeler*, l'expression protéique de DAB1 et non de l'ARN est augmentée. Mes résultats démontrent que l'expression protéique de DAB1 est inchangée chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ par contre son niveau d'ARN augmente. Il reste à préciser si DAB1 est une cible directe de HSF2.

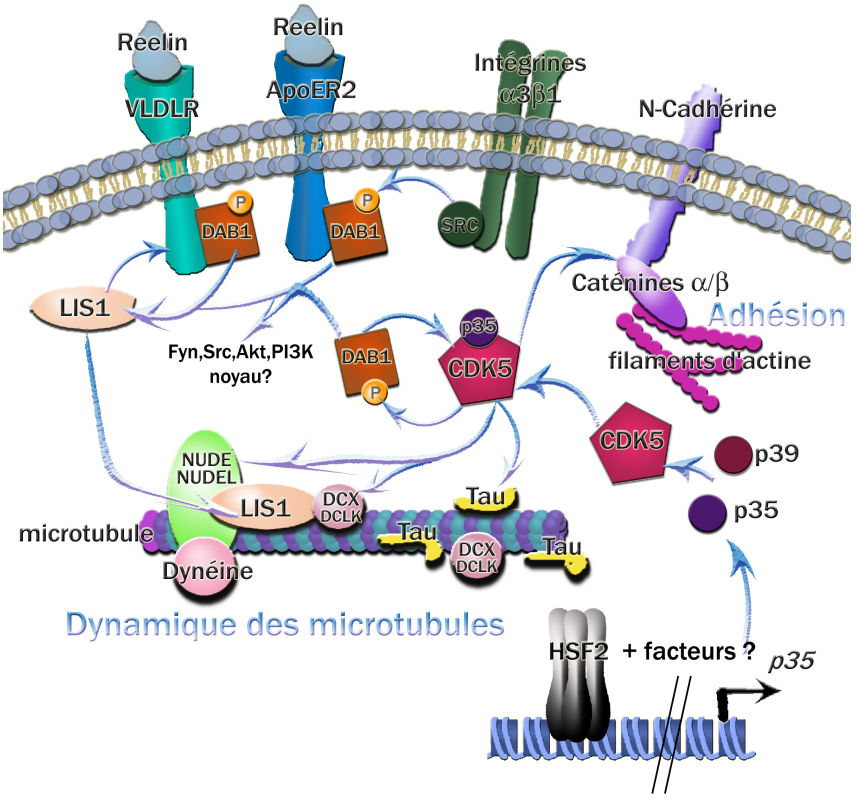



**Fig. 2 – HSF2 module la migration des neurones post-mitotiques du cortex.** HSF2 agit sur la mise en place ou/et le maintien de deux populations de cellules requises pour la migration des neurones : les cellules de glie radiaire, support de la migration et les cellules de Cajal-Retzius qui sécrètent la Reeline, qui induit une voie de signalisation modulant la dynamique du cytosquelette. De plus, HSF2 module l'activité de CDK5 en contrôlant directement l'expression du gène *p35* codant pour la sous-unité activatrice de CDK5. Le mécanisme moléculaire d'action de HSF2 reste encore à élucider. Par ailleurs, il n'est pas exclus que HSF2 module l'expression de différents partenaires des voies de signalisations présentées ici, comme DAB1, LIS1, NUDE/NUDEL et DCX/DCLK. D'après Chang *et al.*, 2006

## 2.2 Le gène *p35* est une cible directe de HSF2

Au niveau mécanistique, HSF2 se fixe directement sur les régions régulatrices du gène *p35*, sous unité régulatrice de CDK5 ainsi que cela a été démontré par ChIP dans des extraits de cortex. Lorsque mHSF2 est surexprimé dans des cellules K562, le niveau d'expression de *p35* augmente tandis que l'inactivation du gène *mHSF2* dans les souris $Hsf2^{-/-}$ entraîne une diminution du niveau d'expression de *p35*. Ainsi, HSF2 module directement l'expression de *p35*, premier gène cible *in vivo* de HSF2 découvert au cours du développement en conditions physiologiques.

HSF2 module l'activité de CDK5 qui modifie la dynamique du cytosquelette, en régulant l'expression de *p35*. L'action de HSF2 sur *p39*, l'homologue de *p35*, n'a pas été démontrée comme étant directe, mais HSF2 régule aussi l'expression de *p39*. Lorsque HSF2 n'est pas exprimé, l'expression de *p39* diminue dans les cortex d'embryon $Hsf2^{-/-}$, ceci a été évalué par RT-PCR quantitative et par hybridation *in situ*. La recherche de site(s) HSE en amont du gène *p39* fixé(s) potentiellement par HSF2 est en cours au laboratoire.

| Site HSE | gène cible par le HSF | système |
|---|---|---|
| ctGCAgaACCttGGAcaGAAgc | site HSE (*p35*) lié par HSF2 [a] | cortex de souris |
| gagaGAAggTTCcaGAT | site HSE (*Hsp27.1*) lié par HSF2 /HSF1 [b] | K562 |
| cGAAacCCCtgGAAtaTTCccGAC<br>aGTGaaTCCcaGAAgaCTCtgGAGagTTCt | site (*Hsp70*) lié par HSF1/ HSF2 [b] | K562 |
| ggcTTCcaGAAagCTCcta | site (*Clusterin*) lié par HSF1 et HSF2 [c] | U-251 MG<br>+ MG132 |
| cCtgGCAcTCCtgGAAacaaCtg | site (*Il6*) lié par HSF1 [d] | MEF |
| cGAAagCTCtgGAGaGTCtaa | site (*γFCrystalin*) lié par HSF4 [e] | Cristallin de souris |
| tGCCccGCAaaGCCc(5)cCACcaGGGgaCACa(2)<br>gGTAacCTCcaGTCt(15)cACCcaGTTgaAACtgGAAc(7)<br>gGGGggCACagGCTg(10)tGAAtcCCCctGAGa(8)<br>cCACcaGACccATCt | site (*Lif*) lié par HSF4 (HSF1?) [f] | épithélium<br>olfactif de<br>souris |
| TTCcaGAAgcTTC | site (*αBcrystallin*) lié par HSF2 [g] | U-251 MG, HeLa<br>+ HS ou +KCl |

**Fig. 3 – HSE des gènes cibles régulés par les HSF *in vivo*.** Les séquences HSE des différents gènes cibles des HSF *in vivo* sont représentés selon un code couleur qui définit l'orientation du motif GAA souvent imparfait. Le site HSE de la αBcrystallin est représenté pour exemple. [a] Chang *et al.*, 2006 ; [b] Trinklein *et al.*, 2004 ; Ostling *et al.*, 2007 ; [c] Loison *et al.*, 2005 ; [d] Inouye *et al.*, 2007 ; [e] Fujimoto *et al.*, 2004 ; [f] Takaki *et al.*, 2006 ; [g] Sadamatsu *et al.*, 2006.

L'analyse de la séquence HSE présente dans la séquence régulatrice en amont du promoteur du gène *p35* (Fig. 3), répond à la re-définition actuelle des HSE. Comme

nous l'avons vu, la séquence HSE se compose d'une succession d'au moins trois motifs GAA répétés inversés où la guanine est essentielle en première position et l'adénosine en troisième position est requise (Xiao and Lis, 1988; Kroeger and Morimoto, 1994; Trinklein *et al.*, 2004a) et devant être espacés d'au plus de deux nucléotides. Par contre, à la vue de l'ensemble des HSE liés *in vivo*, la définition du HSE se complexifie. Beaucoup de motifs constituant les HSE sont souvent imparfaits, mais l'orientation d'au moins trois motifs se retrouve à chaque fois permettant la fixation d'au moins un trimère HSF [3]. Dans certains HSE quatre motifs sont présents, comme c'est le cas pour le HSE en amont du gène *p35* fixé par HSF2. L'importance biologique d'un motif supplémentaire n'est pas encore comprise. Enfin, au vu des expériences récentes, il reste à clairement définir si tous ces HSE fixés en conditions physiologiques par des HSF peuvent l'être par des homotrimères ou des hétérotrimères de HSF, par des complexes de HSF différents et, enfin si la reconnaissance des HSE par les HSF nécessite d'autres facteurs pour positionner les HSF sur un site particulier ou pour rendre le site accessible aux HSF.

Le mécanisme d'action de HSF2 au cours de la régulation de l'expression du gène *p35*, reste encore à approfondir. En effet, il existe une variabilité dans les niveaux de réduction de l'expression de *p35* chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ sur fond mixte C57Bl/6J x C57Bl/6N. Ceci peut suggérer de plus, que l'action de HSF2 dépendrait de facteurs complémentaires. Comme nous l'avons vu, la surexpression de mHSF2 dans les cellules humaines érythroleucémiques K567 entraîne l'augmentation de l'expression de *p35*. En revanche, la surexpression de mHSF2 dans l'embryon de poulet par électroporation *in ovo* ne suffit pas pour modifier le niveau d'expression de *p35*. Plusieurs hypothèses sont alors possibles, la régulation de l'expression de *p35* sous contrôle de HSF2 pourrait dépendre de facteurs cellule-spécifiques et stade-spécifiques, de plus, la régulation de *p35* pourrait être soumis à un seuil de niveau d'expression HSF2, dans le cas de l'électroporation *in ovo* ce seuil ne serait pas atteint. Cette notion de seuil est retrouvée lors de l'activation de l'expression de *Hsp70* dans les motoneurones (Batulan *et al.*, 2003), mais reste à confirmer pour *p35*.

Enfin, la présence de site *GC-box* et la fixation des facteurs Sp, laissent entrevoir des régulations fines entre ces facteurs et HSF2 qui restent à élucider. Notons de plus, que SP3 ne peut se lier à la région régulatrice de *p35* dans la CP en absence de HSF2 (Chang *et al.,* 2006). D'après les travaux de l'équipe de Sarge, HSF2 pourrait permettre un état chromatinien ouvert en amont du gène *Hsp70* pour faciliter la transcription du gène de façon rapide en cas de stress (Xing *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2007). Il reste à comprendre si un tel mécanisme se produit en amont du gène *p35*.

D'autre part, comme nous l'avons vu, HSF2 régule positivement l'expression de *p35* dans les cellules de la plaque corticale qui exprime *p35* et non avant. Comme le montre les expériences réalisées dans le laboratoire par R. Elfatimy, l'ajout de Trichostatin A, un inhibiteur des Histones deacétylases, sur des extraits à E10.5 n'entraîne pas l'expression de *p35* qui est réprimée à ce stade. En revanche, l'ajout de Trichostatin A sur des extraits

[3]type de HSE fixé : 5' GnAnnTnCnnGnA 3' selon Trinklein *et al.,* 2004 ou 5'G....c.G....c..G 3' selon l'équipe de Nakai (Congrès CSSI, 2006)

*Hsf2*$^{-/-}$ déclenche l'expression de *p35*. Ceci suggère qu'à ce stade HSF2 participe au verrouillage de l'expression du gène *p35* et aurait donc un rôle de régulateur négatif sur *p35*. Le modèle poulet, dans lequel la surexpression de HSF2 n'a pas d'effet sur la transcription du gène *p35* pourrait apporter des informations complémentaires à l'analyse de la VZ chez la souris, sur le mécanisme d'action de HSF2. Plusieurs hypothèses sont possibles, les modifications post-traductionnelles du facteur, l'expression d'isoforme spécifique, la présence d'autres facteurs modulant l'état chromatinien ou régulant le recrutement de la machinerie de transcription basale pourrait expliquer la divergence d'action de HSF2 en fonction du contexte cellulaire en conditions physiologiques.

## 2.3 D'autres cibles ?

Le gène *p35* n'est pas la seule cible de HSF2 dans les neurones en migration. Nous avons découvert que d'autres partenaires du cytosquelette ont une expression affectée chez les mutants *Hsf2*$^{-/-}$. C'est le cas de NUDEL, DCLK dont le rôle est esssentiel dans l'établissement et le maintien du fuseau mitotique dans les NSC/NP. Il reste à confirmer que ce sont des cibles directes, une recherche systématique des séquences HSE en amont et dans les introns de gènes est en cours grâce à l'utilisation du programme TESS (*http ://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess ?RQ=SEA-FR-Query*). Ces séquences sont par la suite testées pour leur fixation par HSF2 par ChIP. Les études préliminaires menées par A Lemouel montrent que les cortex des souris *Hsf2*$^{-/-}$ à E16,5 exprime plus NudE et moins Dclk. De plus, par ChIP, il a été démontré que NudE était une cible directe de HSF2 à E10,5. Ces expériences doivent néanmoins être confirmées.

Les cibles potentielles trouvées par les expériences de puces doivent aussi être testées de la même façon pour être confirmée. En parallèle une approche SACO [4] a été initiée au laboratoire, permettant de tester d'une façon exhaustive les gènes cibles de HSF2 en combinant des expériences de ChIP à un séquençage systématique des séquences liées. Ces techniques permettent en outre de s'affranchir des problèmes posés par le fait que HSF2 ne module l'expression de ses cibles que d'un facteur modeste.

Outre la modulation de la dynamique du cytosquelette, HSF2 pourrait être impliqué dans les processus d'adhérence des cellules. De part la modulation de l'activité CDK5 *via* p35, HSF2 peut moduler indirectement l'adhérence cellulaire par la N-cadhérine/$\beta$Caténine. Ceci n'a pas été vérifié chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$. Fait intéressant, lors de la dissection, les cellules de cerveaux embryonnaires des souris *Hsf2*$^{-/-}$ se dissocient plus facilement, ils sont plus sensibles à l'action des protéases. Les fibroblastes embryonnaires et les neurosphères en culture issus de tissus *Hsf2*$^{-/-}$ se détachent plus rapidement de leur substrats, signe de problèmes d'adhérence. Il serait intéressant d'approfondir ces observations en suivant l'expression de différentes protéines impliquées dans le processus d'adhérence. Enfin, l'expression de la tubuline et de la nestine (microfilaments) semble modulée par HSF2 décelée respectivement dans les

[4] voir note de la partie Résultats

embryons de poulet surexprimant HSF2 par RT-PCRq et dans les neurosphères *Hsf2*$^{-/-}$ en culture par immunocytochimie. La tubuline est notamment requise pour la migration des neurones post-mitotiques et une mutation du gène provoque des lissencéphalies importantes chez la souris et l'homme (Keays *et al.*, 2007). Ces observations vont dans le sens des expériences menées par Liliana Paslaru au laboratoire qui montrent que les fibroblastes embryonnaires *Hsf2*$^{-/-}$ migrent moins vite que les sauvages. Ceci suggère que d'une façon plus générale, la dynamique du cytosquelette est modulée par HSF2 à différents niveaux, contrôlant l'expression de différents partenaires du cytosquelette. Une analyse plus approfondie est alors nécessaire.

## 2.4 Fonction potentielle de HSF2 dans la plaque corticale

A la fin de la corticogenèse, HSF2 est exprimé par les cellules de la plaque corticale, mais le type cellulaire exact qui exprime le facteur n'est pas encore connu et la fonction de HSF2 dans ces cellules différenciées qui ont déjà migré reste à approfondir. Il a été suggéré dans différentes études que HSF2 serait exprimé par les neurones dans le cerveau adulte et contribuerait à leur neuroprotection face aux stress grâce à l'expression des gènes codant les chaperons moléculaires tel que *Hsp70* (Brown and Rush, 1999). En conditions physiologiques la fonction du facteur reste à élucider. Comme le cortex cérébral est composé d'une hétérogénéité de cellules, il serait intéressant de localiser l'expression de HSF2 selon les types cellulaires qui constituent le cortex cérébral. Ceci pourrait être réalisé par co-marquage à l'aide d'anticorps spécifiques des sous-types neuronaux (récepteurs des neurotransmetteurs...) et d'un anticorps spécifique reconnaissant HSF2 dans les cortex en développement. Un tel anticorps est actuellement en cours d'élaboration au laboratoire par Laurence Denis.

En conditions physiologiques, si HSF2 module la migration gliophilique des neurones corticaux, on peut supposer que la migration gliophilique des interneurones le soit aussi. La migration tangentielle pourrait être perturbée chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ puisque la sous-plaque, élément important pour le transit des interneurones disparaît prématurément. Chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$, la sous-plaque disparaît précocement mais suffisamment tardivement pour que des interneurones aient eu le temps de migrer. Aucune étude n'a pour l'instant été menée pour l'évaluer. De plus, HSF2 est exprimé dès E10 dans les éminences ganglionnaires du subpallium, zone générant notamment des interneurones. Des études supplémentaires comme le suivi du niveaux d'expression de marqueurs spécifiques des interneurones par RT-PCRq sont nécessaires. En parallèle, le nombre de cellules de Cajal-Retzius est plus réduit chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$. Comme ces cellules migrent de façon tangentielle, on peut se demander quelle action HSF2 pourrait avoir sur la dynamique de migration des cellules de Cajal-Retzius. D'une façon plus générale, il serait intéressant de suivre la migration des neurones marqués par exemple au DiI dans des tranches en culture (notamment à E16,5) pour observer en temps réel la dynamique de déplacement des neurones lorsque HSF2 n'est pas exprimé ou lors de surexpression/d'extinction par siRNA par électroporation de tranche de cortex en culture. Ceci permettrait d'évaluer

plus précisément les défauts de branchement, de mouvement saltatoire, de direction des neurones en migration s'ils existent (Kappeler *et al.*, 2007).

Nous avons vu que HSF2 est impliqué dans la migration des neurones. La migration est un processus qui s'opère dans le cortex en même temps que la différenciation. La migration est sous contrôle de l'expression de certains facteurs de transcription qui promeuvent la différenciation neuronale et donc la sortie du cycle cellulaire. Ainsi, les défauts de migration observés chez les souris *Hsf2*$^{-/-}$ peuvent aussi dépendre d'une mauvaise signalisation de sortie de cycle. De plus, l'expression et l'activité de HSF2 dans les cellules souches neurales (NSC) et les progéniteurs neuraux (NP) dès les stades précoces, nous laissaient supposer que HSF2 pourrait être impliqué dans les processus de prolifération et de différenciation qui régissent ces cellules.

# 3 Fonction de HSF2 dans la prolifération, la survie et la différenciation des NSC/NP

Au moyen d'approches complémentaires, j'ai confirmé que HSF2 était impliqué dans la prolifération et la différenciation des NSC et NP du système nerveux en développement. Les analyses menées lors de surexpression de HSF2 dans le tube neural de l'embryon de poulet convergent vers ce constat.

Les embryons *Hsf2*$^{-/-}$ à E13,5 présentent une réduction de la taille du système nerveux central, notamment du cortex. Un tel phénotype est retrouvé lors de dérégulations de sortie de cycle des progéniteurs corticaux ou lors de défauts de positionnement du fuseau mitotique modifiant le ratio des mitoses symétrique/asymétrique perturbant l'entrée en différenciation des neurones. En effet, les souris dont le gène *Tlx* est muté présentent une réduction des couches superficielles associée à un changement de l'engagement des cellules dans la prolifération/différenciation. Le cycle cellulaire des progéniteurs est plus court à E9,5 chez les souris *Tlx*$^{-/-}$, en revanche au milieu de la corticogenèse, les progéniteurs sont en nombre restreint et prolifèrent beaucoup moins (Roy *et al.*, 2004). Le *knock-down* de Aspm (*abnormal spindle-like microcephaly-associated*) par RNAi montre aussi une réduction de la taille du cortex. L'orientation des mitoses est perturbée, le nombre de mitoses perpendiculaires augmente, les divisions asymétriques se produisent de façon plus fréquente et les cellules se différencient prématurément (Fish *et al.*, 2006). Par conséquent, il était important d'évaluer l'implication de HSF2 au cours des processus de différenciation des NSC/NP.

## 3.1 HSF2, marqueur d'une sous-population de NSC/NP ?

HSF2 est exprimé dans les NSC/NP et non dans les précurseurs à potentialités restreintes qui sont marqués par MAP2. Ces données sont cohérentes avec le profil d'ex-

pression de la $\beta$-gal *in toto* dès le stade neuroépithélium donc dans les NSC. En revanche, HSF2 semble être exprimé par une sous population spécifique de NSC/NP. En effet, il semble que toutes les cellules nestine-positives soient $\beta$-gal-positives ; par contre, il existe des cellules $\beta$-gal-positives qui ne sont pas nestine-positives, ce qui laisserait supposer qu'il existe une sous-population de NSC/NP exprimant HSF2, mais pas la nestine. Mais une meilleure caractérisation des cellules exprimant HSF2 doit être entreprise à l'aide d'autres marqueurs des cellules souches comme Musashi, Sox, LeX et la Prominin. De plus, l'utilisation d'un anticorps plus spécifiques reconnaissant HSF2 permettrait une analyse moins indirecte que celle réalisée à l'aide des anticorps anti-$\beta$-gal.

D'après le profil d'expression de HSF2 au cours de la corticogenèse, dans les stades précoces, HSF2 est exprimé dans la VZ, puis dès E14 HSF2 est exprimé dans la SVZ puis dans la CP. Cela n'est pas sans rappeler le modèle de corticogenèse proposé notamment par Zimmer et al (Zimmer *et al.*, 2004), celui-ci présente une corticogenèse qui se réalise en deux temps (Fig. 4). Les couches profondes du cortex seraient générées en début de neurogenèse par des NP de la VZ puis les couches superficielles seraient générées en dernier par des NP distincts des premiers et confinés dans la SVZ. L'hypothèse d'une ségrégation très précoce de deux types de population de NP expliquerait la différence de descendances issues des NP de VZ et des NP de la SVZ.

Dans les neuropshères en culture issues de cortex de souris où le gène *Hsf2* est inactivé, HSF2 est exprimé à E13,5 par les NSC/NP, et non par les précurseurs neuronaux. *In vivo*, à ce stade, seuls les neurones des couches profondes sont générés par les NSC/NP de la VZ, mais aucune étude ne démontre qu'*ex vitro* il y aurait deux types de neurogenèse. D'après le modèle présenté ci-dessus, s'il y a deux types de NP destinés à générer les couches profondes ou superficielles et que l'expression de marqueurs est contrôlé par différents programmes de spécification, on peut supposer que dans des neurosphères en culture à E13 ces deux populations coexistent et ne répondent pas de la même façon aux stimuli. La caractérisation des cellules exprimant HSF2 pourrait donc apporter des informations sur l'hétérogénéité de cellules qui prolifèrent dans le cortex. La sous population de cellules LeX n'est pas affectée dans les cortex *Hsf2*$^{-/-}$ mais cette population recoupe-t-elle celle marquée par HSF2 ? Une approche plus approfondie de la caractérisation de ce type de sous population est requise.

D'une façon générale, une meilleure caractérisation des cellules souches neurales est nécessaire. L'analogie avec les recherches sur les cellules souches hématopoïétiques est très instructive. D'une cellule souche hématopoïétique totipotente dérive deux types de cellules souches lymphoïde et myéloïde qui par la suite, subissent des restrictions de leurs potentialités et s'engagent vers différentes lignées de cellules. Après différenciation, elles constituent l'ensemble des cellules du système hématopoïétique. Chaque restriction de potentiel d'une cellule l'engage vers une lignée cellulaire et est caractérisée par l'expression de marqueurs et/ou antigène de surface spécifique. Dans le cadre de la spécification des cellules souches neurales, encore trop peu de marqueurs permettent la caractérisation des différents intermédiaires aux potentialités distinctes. L'expression de facteur tel que HSF2 pourrait donc contribuer à une meilleure compréhension des différentes populations

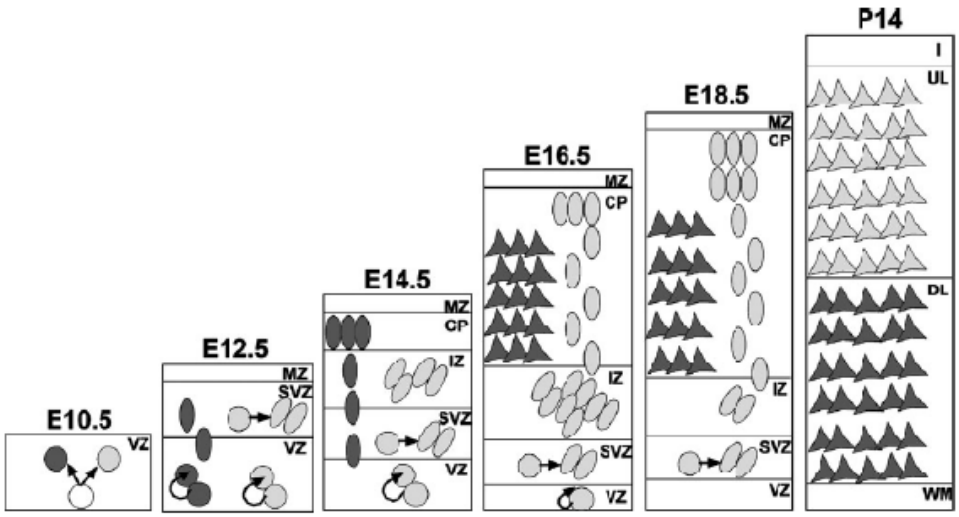



**Fig. 4 – Modèle de la neurogenèse en deux temps dans les cortex de souris.** D'après les modèles antérieurs une seule population de progéniteurs multipotents dès E10,5 (cercle blanc) généraient tous les types de neurones du cortex des couches profondes (DL, cercle noir) et des couches superficielles (UL, cercle gris). Or à E12,5, la population de progéniteurs des couches UL se divisent dans la zone sous ventriculaire SVZ, pendant que les premiers précurseurs des couches DL issus des progéniteurs de la zone ventriculaire VZ, sortent du cycle cellulaire et migrent vers les couches profondes. A E14,5, les progéniteurs de la SVZ génèrent les neurones des couches superficielles, qui restent dans la zone intermédiaire IZ, attendant des signaux extrinsèques ou intrinsèques qui leurs permettront de migrer vers les couches superficielles. A E16,5, les neurones des couches profondes se différencient (triangle noir) tandis que les progéniteurs des couches superficielles génèrent des neurones qui migrent vers les couches superficielles. A P14, tous les neurones sont différenciés (triangle gris). D'après Zimmer *et al.,* 2005.

de NSC et de NP.

## 3.2 HSF2 est impliqué dans la prolifération et la différenciation

Comme nous l'avons déjà décrit, la prolifération et la différenciation sont retardées à E13,5 dans les souris *Hsf2*$^{-/-}$ par rapport aux sauvages. Il y a moins de progéniteurs de glie radiaire et moins d'astrocytes dans les cortex des souris *Hsf2*$^{-/-}$. De plus, les études préliminaires d'incorporation de BrdU montre qu'en absence de HSF2, la prolifération est perturbée. Dans les cellules souches neurales en culture, les cellules *Hsf2*$^{-/-}$ prolifèrent moins que les sauvages. Enfin, les expériences de surexpression de mHSF2 dans le tube neural de poulet démontre que la prolifération est augmentée de 10% dans nos conditions. Ces observations suggèrent que HSF2 pourrait moduler les processus de survie, de prolifération et de différenciation. Une autre vision consisterait à appréhender ces mécanismes comme étant interdépendants. En effet, si les cellules cyclent moins vite et quittent le cycle

cellulaire plus rapidement, elles prolifèrent moins, se différencient prématurément, affectant l'autorenouvellement des cellules progénitrices qui sont alors en nombre plus restreint. HSF2 pourrait donc avoir un rôle de modulateur des signaux engageant les cellules à proliférer ou à se différencier en sortant du cycle cellulaire. L'engagement d'une cellule vers la prolifération/différenciation est régit par différents signaux extrinsèques et intrinsèques, qui impliquent une coordination et une compilation des informations au niveau cellulaire et à chaque instant.

Au cours de la neurogenèse, le cycle des cellules s'allonge, notamment en phase G1 (Caviness *et al.*, 2003). L'analyse des souris dont le gène *p27* est inactivé, démontre que l'action de cet inhibiteur de kinase cycline-dépendante régule la sortie du cycle cellulaire des cellules de la VZ, sortie déterminante pour l'organisation du cortex (Nowakowski *et al.*, 2002; Caviness *et al.*, 2003). Par conséquent, la phase G1 semble être une étape clé dans l'engagement de la cellule vers la prolifération/différenciation (Fig. 5). Différents facteurs de croissance exercent un effet positif sur la synthèse des cyclines D, la formation de complexe D/CDK4,6 et l'activation des CDK pendant la phase G1 (Owa *et al.*, 2001). Les KIP (*kinase inhibiting protein* comme p21, p27, p57) inhibent notamment CDK4 et CDK6 et sont impliquées dans le contrôle de la progression du cycle. La phase G1 est une phase décisive et critique pour la destiné cellulaire (nouveau cycle cellulaire ou non).

La phase G1 est soumise à différentes régulations par les facteurs de transcription tels que Wnt1 et Wnt3 *via* les cyclines D1 et D2 (Megason and McMahon, 2002), SHH et GLI2/3 (Bai *et al.*, 2004) et Pax6 *via* p27 (Estivill-Torrus *et al.*, 2002). Les inhibiteurs de CDK comme p21 et p27 ont une expression qui augmentent au cours du développement et participent à l'établissement et au maintien de l'état quiescent des cellules différenciées. Par exemple p27 est capable de lier la cycline D (Fig. 5), inhibant le complexe CDK5/D au profit de l'association de CDK5/p35 dans les neurones post-mitotiques (Lee *et al.*, 1996) (Fig. 6).

Par son contrôle de l'expression de *p35*, HSF2 pourrait donc influencer l'engagement des cellules vers la différenciation (sortie en G0), favorisant indirectement l'association CDK5/P35 au dépend des cyclines (Fig. 6). L'utilisation de différents inhibiteurs de la phase G1 (comme la rapamycine, geldamycine, fumagilline), pourrait permettre de mieux comprendre l'action de HSF2 sur le cycle cellulaire. D'autre part, en comparant les différents niveaux d'expression et d'activité des cyclines D, E, CDK 5,4,6 et inhibiteurs p21, p27 dans des contextes cellulaires différents par exemple à E13,5 dans les progéniteurs *versus* précurseurs issus de souris *Hsf2*$^{-/-}$ *versus* sauvage, l'implication du facteur HSF2 au cours de la phase G1 du cycle cellulaire serait plus explicite.

En parallèle, HSF2 influence l'expression de différentes MAP comme NuDE et Dclk qui comme nous l'avons vu sont impliquées dans les processus de prolifération en régulant la dynamique des microtubules et donc du fuseau mitotique durant la mitose. En régulant ces cibles, HSF2 pourrait donc influencer les signaux d'entrée en mitose. De plus, les cellules du neuroépithélium qui prolifèrent activement et les cellules ES qui ont une phase G1 courte expriment fortement HSF2, suggérant un rôle de celui-ci au cours de la pro-

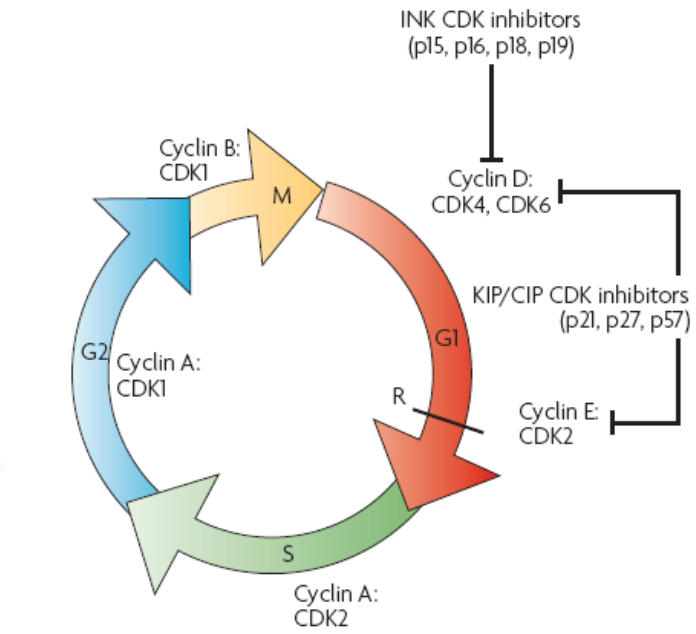



**Fig. 5 – Cycle cellulaire dans les cellules eucaryotes.** Le cycle cellulaire se déroule en quatre phases : la mitose (M), la phase de réplication de l'ADN (S), deux phases autres séparent les précédentes (G1 et G2). La phase G1 est une phase critique où différents facteurs influencent l'entrée des cellules dans un nouveau cycle cellulaire ou la sortie de cycle en G0 entraînant la différenciation. La phase G1 est aussi impliquée dans le contrôle de l'intégrité de l'ADN avant la réplication. Chaque transition de phase est dépendante de l'activité de cycline/CDK (*cyclin dependent kinase*). Les facteurs influençant la neurogenèse sont représentés sur le schéma. Le point de restriction du cycle (R) est localisé en fin de phase G1. Après ce point, la cellule invariablement réalise un cycle complet. Dans les neuroblastes, de nombreuses cyclines sont exprimées (D, E). D'après Dehay et Kennedy, 2007.

lifération. On peut alors supposer que HSF2 ait un rôle différent selon le contexte cellulaire dans le contrôle de la progression en phase M qui conduit la cellule à cycler ou dans le contrôle de la sortie de cycle conduisant les cellules à se différencier.

A l'heure actuelle, plusieurs indices convergent pour soutenir cette hypothèse. HSF2 a une fonction de *bookmarking* qui permet à certains gènes d'être activés très tôt dans la phase G1 du cycle cellulaire (Sarge and Park-Sarge, 2005; Xing *et al.*, 2005). D'autre part, les facteurs HSF1, HSF4 et HSF3 ont une fonction associée à la phase G1. HSF3 est impliquée dans le cycle cellulaire en permettant la transition G1/S, puisqu'il interagit directement avec le proto-oncogène c-Myb (Tanikawa *et al.*, 2000; Nakai and Ishikawa, 2001). HSF1 et HSF4b s'associent au complexe SWI/SNF qui est responsable du remodelage de la chromatine au cours du cycle cellulaire (Sullivan *et al.*, 2001), et HSF4b interagit spécifiquement avec le complexe en phase G1 (Tu *et al.*, 2006b). Ainsi, pendant la phase G1, les HSF participeraient à différents mécanismes de régulation de la structure chromatinienne de gènes spécifiques. Ceci permettrait à la cellule de réguler finement sa réponse en fonction d'un contexte cellulaire spécifique : prolifération (entrée en phase M)

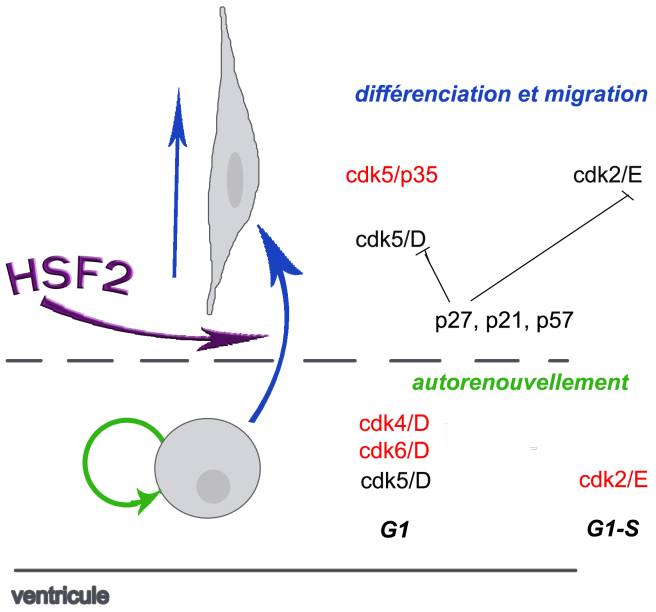



**Fig. 6 – Rôle des inhibiteurs de CDK au cours du développement.** P21, p27, p57 sont impliquées dans la sortie du cycle cellulaire. En inhibant les complexes CDK/cyclines, elles engagent la différenciation neuronales. Les termes rouges déterminent les complexes actifs, en noir, les inactifs. Adapté de Lee *et al.*, 1996.

ou différenciation (sortie en G0).

# 4 HSF et la spécification des neurones corticaux ?

Si HSF2 régule le choix prolifération/différenciation des cellules souches neurales, c'est que le facteur HSF2 est capable d'influencer le processus selon lequel la cellule subit une restriction de ces potentialités développementales. Ceci correspond au choix de l'identité cellulaire (*cell fate choice*) ou spécification des cellules. Il serait intéressant de suivre l'expression de différents facteurs responsables de la spécification des cellules souches en fonction de l'activation de HSF2. Par exemple, HSF2 pourrait avoir une action sur les voies de signalisation activées par des facteurs extrinsèques par exemple l'EGF et le FGF. En effet, mon étude préliminaire montre que les neurosphères $Hsf2^{-/-}$ en culture ne semblent pas répondre de façon identique à ces deux facteurs de croissance. En parallèle, il serait instructif d'évaluer l'expression de différents facteurs de transcription impliqués dans la spécification des cellules souches neurales comme Notch, Pax6, Ngn, Tlx...

Par contre pour étudier la spécification des NSC, le suivie des cellules est indispensable. Cette analyse pourrait être possible par croisement des souris $Hsf2^{-/-}$ avec des souris dont l'expression de la GFP est sous contrôle de gènes exprimés soit dans les populations de NSC comme le gène *Musashi* (Keyoung *et al.*, 2001), le gène co-

dant pour la Nestin ou encore Sox2 (D'Amour and Gage, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2001; Keyoung *et al.*, 2001) soit par une population de NSC particulière, comme celle exprimant *Tis21* (Haubensak *et al.*, 2004), marqueur de NSC/NP se divisant d'une façon asymétrique pour générer les neurones post-mitotiques. Le tri des cellules par les marqueurs de surface LeX et Prominin puis l'évaluation de leur potentialité en culture lorsque HSF2 n'est pas exprimé serait une approche complémentaire.

D'après ces travaux préliminaires, qui nécessitent d'être confirmés par d'autres approches, HSF2 pourrait promouvoir la différenciation neurogénique des cellules en activant la transcription de *p35*, qui active la CDK5 influençant la sortie en G0 des cellules. D'autre part, HSF2 semble réguler l'expression de DNA-méthyltransférases. Notamment, j'ai montré que *Dnmt1* a une expression diminuée dans les cortex $Hsf2^{-/-}$ à E16,5 (estimé par RT-PCRq et par analyse du transcriptome par puces à ADN en comparant -/- et sauvages), tandis que son expression est augmentée lors de surexpression de HSF2 dans le tube neural de poulet (décelé par RT-PCRq). Les caractéristiques majeures de la méthylation de l'ADN consistent en un verrouillage de l'expression des gènes par modification de l'état chromatinien et par le ciblage de régions spécifiques du génome, par exemple le chromosome X ou les îlots CpG en amont de promoteurs spécifiques. Certaines DNMT, comme DNMT1, sont requises au cours du développement de la souris (Egger *et al.*, 2006). De plus, en bloquant l'activité de JAK-STAT, qui ne peut se fixer sur le promoteur du gène *Gfap* lorsque celui-ci est hyperméthylé, l'astrogliogenèse est réprimée pendant la période de neurogenèse (Fan *et al.*, 2005). La régulation des Dnmt par HSF2 et leurs effets dans le phénotype des souris $Hsf2^{-/-}$ n'est à l'heure actuelle pas élucidée. L'estimation de la méthylation générale du génome des souris $Hsf2^{-/-}$ serait un début d'analyse. D'autres processus de régulation épigénétique régulent l'expression des gènes proneuraux, comme le complexe REST (Ballas and Mandel, 2005). Il serait intéressant de regarder l'action de HSF2 sur la mise en place de ce complexe. D'une façon plus générale, HSF2 pourrait donc moduler l'engagement des cellules vers les différentes lignées de différenciation en modulant directement ou indirectement l'état chromatinien de séquences régulatrices de gènes progliaux ou proneuraux. Ceci reste une hypothèse à confirmer.

En conclusion, le facteur de choc thermique HSF2 agirait de façon pléiotropique comme un aiguilleur de destin cellulaire au sein des cellules multipotentes, en modulant les signaux qui régissent la prolifération/différenciation des cellules. Dans les stades précoces de développement, HSF2 pourrait stimuler la prolifération en agissant notamment sur certaines MAP comme NudE et Dlck qui régulent le fuseau mitotique. Puis, lorsque les neurones constituant les couches superficielles du cortex doivent être mises en place, HSF2 pourrait modifier l'engagement des cellules prolifératives vers la différenciation en régulant l'expression de p35 et p39 qui active la CDK5 permettant la migration. Cette action pléiotropique s'appuierait sur l'existence d'isoforme et de modifications post-traductionnelles de HSF2 propres aux NSC/NPS par rapport aux cellules de la CP qui restent à confirmer.

D'une façon plus générale, l'implication d'un facteur de choc thermique au cours des processus de spécification cellulaire, remet en question les modèles de neurogenèse

déterministes proposés (Caviness *et al.*, 2003; Calegari *et al.*, 2005). En effet, il est difficilement concevable à l'heure actuelle que seuls des programmes pré-établits comme le décrivent les différentes modélisations. L'environnement cellulaire, la chronologie du développement doivent forcément intervenir dans les processus qui régissent l'architechture du cortex cérébral. Hors, l'orchestration de ces différents signaux qui gouvernent la destiné d'une cellule est pour l'instant inconnu. D'après les caractéristiques du facteur HSF2, en tant que fin modulateur transcriptionnel et pléiotropique et facteur de choc thermique, ce facteur pourrait fournir une piste de réflexion. Selon l'environnement cellulaire, la chronologie du développement, les programmes de neurogenèse ne s'établiraient pas de la même façon. En conditions normales, les HSF pourraient donc avoir une fonction dans les processus d'épigenèse.

# Bibliographie

# Bibliographie


Abramova, Natalia, Carol Charniga, Susan K Goderie, and Sally Temple (2005). Stage-specific changes in gene expression in acutely isolated mouse cns progenitor cells. *Dev Biol* 283(2) : 269–281.

Abravaya, K., B. Phillips, and R. I. Morimoto (1991). Attenuation of the heat shock response in hela cells is mediated by the release of bound heat shock transcription factor and is modulated by changes in growth and in heat shock temperatures. *Genes Dev* 5(11) : 2117–2127.

Ahn, S G, P C Liu, K Klyachko, R I Morimoto, and D J Thiele (2001). The loop domain of heat shock transcription factor 1 dictates dna-binding specificity and responses to heat stress. *Genes Dev* 15(16) : 2134–45.

Akerfelt, Malin, Diane Trouillet, Valérie Mezger, and Lea Sistonen (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann N Y Acad Sci* .

Al-Saktawi, K., M. McLaughlin, M. Klugmann, A. Schneider, J. A. Barrie, M. C. McCulloch, P. Montague, D. Kirkham, K-A. Nave, and I. R. Griffiths (2003). Genetic background determines phenotypic severity of the plp rumpshaker mutation. *J Neurosci Res* 72(1) : 12–24.

Alastalo, T P, M Lonnstrom, S Leppa, K Kaarniranta, M Pelto-Huikko, L Sistonen, and M Parvinen (1998). Stage-specific expression and cellular localization of the heat shock factor 2 isoforms in the rat seminiferous epithelium. *Exp Cell Res* 240(1) : 16–27.

Alastalo, Tero-Pekka, Maria Hellesuo, Anton Sandqvist, Ville Hietakangas, Marko Kallio, and Lea Sistonen (2003). Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of Hsp70. *J Cell Sci* 116(Pt 17) : 3557–70.

Alexandre, Paula, Isabelle Bachy, Morgane Marcou, and Marion Wassef (2006). Positive and negative regulations by fgf8 contribute to midbrain roof plate developmental plasticity. *Development* 133(15) : 2905–2913.

Allendoerfer, K. L., R. J. Cabelli, E. Escandón, D. R. Kaplan, K. Nikolics, and C. J. Shatz (1994). Regulation of neurotrophin receptors during the maturation of the mammalian visual system. *J Neurosci* 14(3 Pt 2) : 1795–1811.

Altman, J. and S. A. Bayer (1990). Vertical compartmentation and cellular transformations in the germinal matrices of the embryonic rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 107(1) : 23–35.

Alvarez-Buylla, A., J. M. García-Verdugo, and A. D. Tramontin (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2(4) : 287–293.

Amin, J, J Ananthan, and R Voellmy (1988). Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol* 8(9) : 3761–9.

Anckar, Julius, Ville Hietakangas, Konstantin Denessiouk, Dennis J Thiele, Mark S Johnson, and Lea Sistonen (2006). Inhibition of dna binding by differential sumoylation of heat shock factors. *Mol Cell Biol* 26(3) : 955–964.

Anderson, S. A., D. D. Eisenstat, L. Shi, and J. L. Rubenstein (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex : dependence on dlx genes. *Science* 278(5337) : 474–476.

Ang, Eugenius S B C, Tarik F Haydar, Vicko Gluncic, and Pasko Rakic (2003). Four-dimensional migratory coordinates of gabaergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* 23(13) : 5805–5815.

Ang, S. L., R. A. Conlon, O. Jin, and J. Rossant (1994). Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse otx2 in ectoderm explants. *Development* 120(10) : 2979–2989.

Anton, E. S., J. A. Kreidberg, and P. Rakic (1999). Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* 22(2) : 277–289.

Arsenijevic, Y., S. Weiss, B. Schneider, and P. Aebischer (2001). Insulin-like growth factor-i is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. *J Neurosci* 21(18) : 7194–7202.

Assadi, Amir H, Guangcheng Zhang, Uwe Beffert, Robert S McNeil, Amy L Renfro, Sanyong Niu, Carlo C Quattrocchi, Barbara A Antalffy, Michael Sheldon, Dawna D Armstrong, Anthony Wynshaw-Boris, Joachim Herz, Gabriella D'Arcangelo, and Gary D Clark (2003). Interaction of reelin signaling and lis1 in brain development. *Nat Genet* 35(3) : 270–276.

Aumais, J. P., J. R. Tunstead, R. S. McNeil, B. T. Schaar, S. K. McConnell, S. H. Lin, G. D. Clark, and L. Y. Yu-Lee (2001). Nudc associates with lis1 and the dynein motor at the leading pole of neurons. *J Neurosci* 21(24) : RC187.

Bach, Antoine, Yvan Lallemand, Marie-Anne Nicola, Casto Ramos, Luc Mathis, Mathilde Maufras, and Benoît Robert (2003). Msx1 is required for dorsal diencephalon patterning. *Development* 130(17) : 4025–4036.

Bachler, M. and A. Neubüser (2001). Expression of members of the fgf family and their receptors during midfacial development. *Mech Dev* 100(2) : 313–316.

Backman, Mattias, Ondrej Machon, Line Mygland, Christiaan Johannes Bout, Weimin Zhong, Makoto M Taketo, and Stefan Krauss (2005). Effects of canonical wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon. *Dev Biol* 279(1) : 155–168.

Bai, C. Brian, Daniel Stephen, and Alexandra L Joyner (2004). All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is gli dependent and involves an activator function of gli3. *Dev Cell* 6(1) : 103–115.

Bai, Jilin, Raddy L Ramos, James B Ackman, Ankur M Thomas, Richard V Lee, and Joseph J LoTurco (2003). Rnai reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci* 6(12) : 1277–1283.

Ballas, Nurit, Christopher Grunseich, Diane D Lu, Joan C Speh, and Gail Mandel (2005). Rest and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* 121(4) : 645–657.

Ballas, Nurit and Gail Mandel (2005). The many faces of rest oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Curr Opin Neurobiol* 15(5) : 500–506.

Balogh, Gábor, Ibolya Horváth, Enikõ Nagy, Zsófia Hoyk, Sándor Benkõ, Olivier Bensaude, and László Vígh (2005). The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response. *FEBS J* 272(23) : 6077–6086.

Baniwal, Sanjeev Kumar, Kapil Bharti, Kwan Yu Chan, Markus Fauth, Arnab Ganguli, Sachin Kotak, Shravan Kumar Mishra, Lutz Nover, Markus Port, Klaus-Dieter Scharf, Joanna Tripp, Christian Weber, Dirk Zielinski, and Pascal Koskull-Döring (2004). Heat stress response in plants : a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci* 29(4) : 471–487.

Bar, Isabelle, Fadel Tissir, Catherine Lambert Rouvroit, Olivier De Backer, and Andre M Goffinet (2003). The gene encoding disabled-1 (dab1), the intracellular adaptor of the reelin pathway, reveals unusual complexity in human and mouse. *J Biol Chem* 278(8) : 5802–5812.

Bardwell, J. C. and E. A. Craig (1984). Major heat shock gene of drosophila and the escherichia coli heat-inducible dnak gene are homologous. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(3) : 848–852.

Barraud, Perrine, Lachlan Thompson, Deniz Kirik, Anders Björklund, and Malin Parmar (2005). Isolation and characterization of neural precursor cells from the sox1-gfp reporter mouse. *Eur J Neurosci* 22(7) : 1555–1569.

Batulan, Zarah, Gayle A Shinder, Sandra Minotti, Bei Ping He, Mohammad M Doroudchi, Josephine Nalbantoglu, Michael J Strong, and Heather D Durham (2003). High threshold for induction of the stress response in motor neurons is associated with failure to activate hsf1. *J Neurosci* 23(13) : 5789–98.

Baumann, K., E. M. Mandelkow, J. Biernat, H. Piwnica-Worms, and E. Mandelkow (1993). Abnormal alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 336(3) : 417–424.

Bayer, S A, J Altman, R J Russo, X F Dai, and J A Simmons (1991). Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J Comp Neurol* 307(3) : 499–516.

Beddington, R. S. (1994). Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* 120(3) : 613–620.

Beddington, R. S. and E. J. Robertson (1998). Anterior patterning in mouse. *Trends Genet* 14(7) : 277–284.

Beffert, Uwe, Edwin J Weeber, Gerardo Morfini, Jane Ko, Scott T Brady, Li-Huei Tsai, J David Sweatt, and Joachim Herz (2004). Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission. *J Neurosci* 24(8) : 1897–1906.

Begemann, G., M. Marx, K. Mebus, A. Meyer, and M. Bastmeyer (2004). Beyond the neckless phenotype : influence of reduced retinoic acid signaling on motor neuron development in the zebrafish hindbrain. *Dev Biol* 271(1) : 119–129.

Bertrand, N., F. Médevielle, and F. Pituello (2000). Fgf signalling controls the timing of pax6 activation in the neural tube. *Development* 127(22) : 4837–4843.

Betschinger, Jörg and Jürgen A Knoblich (2004). Dare to be different : asymmetric cell division in drosophila, c. elegans and vertebrates. *Curr Biol* 14(16) : R674–R685.

Bharadwaj, S., A. Ali, and N. Ovsenek (1999). Multiple components of the hsp90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 in vivo. *Mol Cell Biol* 19(12) : 8033–8041.

Biamonti, Giuseppe (2004). Nuclear stress bodies : a heterochromatin affair ? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(6) : 493–8.

Bielle, Franck, Amelie Griveau, Nicolas Narboux-Neme, Sebastien Vigneau, Markus Sigrist, Silvia Arber, Marion Wassef, and Alessandra Pierani (2005). Multiple origins of cajal-retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8(8) : 1002–1012.

Bishop, K. M., G. Goudreau, and D. D. O'Leary (2000). Regulation of area identity in the mammalian neocortex by emx2 and pax6. *Science* 288(5464) : 344–349.

Bishop, Kathie M, Sonia Garel, Yasushi Nakagawa, John L R Rubenstein, and Dennis D M O'Leary (2003). Emx1 and emx2 cooperate to regulate cortical size, lamination, neuronal differentiation, development of cortical efferents, and thalamocortical pathfinding. *J Comp Neurol* 457(4) : 345–360.

Bishop, Kathie M, John L R Rubenstein, and Dennis D M O'Leary (2002). Distinct actions of emx1, emx2, and pax6 in regulating the specification of areas in the developing neocortex. *J Neurosci* 22(17) : 7627–7638.

Bjornson, C. R., R. L. Rietze, B. A. Reynolds, M. C. Magli, and A. L. Vescovi (1999). Turning brain into blood : a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283(5401) : 534–537.

Blakemore, W. F. and R. J. Franklin (1991). Transplantation of glial cells into the cns. *Trends Neurosci* 14(8) : 323–327.

Blaser, Heiko, Michal Reichman-Fried, Irinka Castanon, Karin Dumstrei, Florence L Marlow, Koichi Kawakami, Lilianna Solnica-Krezel, Carl-Philipp Heisenberg, and Erez Raz (2006). Migration of zebrafish primordial germ cells : a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev Cell* 11(5) : 613–627.

Boellmann, Frank, Toumy Guettouche, Yongle Guo, Mary Fenna, Laila Mnayer, and Richard Voellmy (2004). Daxx interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(12) : 4100–4105.

Bonni, A. and M. E. Greenberg (1997). Neurotrophin regulation of gene expression. *Can J Neurol Sci* 24(4) : 272–283.

Brown, I. R. and S. J. Rush (1999). Cellular localization of the heat shock transcription factors hsf1 and hsf2 in the rat brain during postnatal development and following hyperthermia. *Brain Res* 821(2) : 333–340.

Brown, Ian R (2007). Heat shock proteins and protection of the nervous system. *Ann N Y Acad Sci* .

Brown, S. A. and R. E. Kingston (1997). Disruption of downstream chromatin directed by a transcriptional activator. *Genes Dev* 11(23) : 3116–3121.

Bruce, J. L., C. Chen, Y. Xie, R. Zhong, Y. Q. Wang, M. A. Stevenson, and S. K. Calderwood (1999). Activation of heat shock transcription factor 1 to a dna binding form during the g(1)phase of the cell cycle. *Cell Stress Chaperones* 4(1) : 36–45.

Bu, Lei, Yiping Jin, Yuefeng Shi, Renyuan Chu, Airong Ban, Hans Eiberg, Lisa Andres, Haisong Jiang, Guangyong Zheng, Meiqian Qian, Bin Cui, Yu Xia, Jing Liu, Landian Hu, Guoping Zhao, Michael R Hayden, and Xiangyin Kong (2002). Mutant dna-binding domain of hsf4 is associated with autosomal dominant lamellar and marner cataract. *Nat Genet* 31(3) : 276–278.

Bulfone, A., L. Puelles, M. H. Porteus, M. A. Frohman, G. R. Martin, and J. L. Rubenstein (1993). Spatially restricted expression of dlx-1, dlx-2 (tes-1), gbx-2, and wnt-3 in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J Neurosci* 13(7) : 3155–3172.

Burrows, R. C., D. Wancio, P. Levitt, and L. Lillien (1997). Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in egfr expression in the cortex. *Neuron* 19(2) : 251–267.

Cadigan, K. M. and R. Nusse (1997). Wnt signaling : a common theme in animal development. *Genes Dev* 11(24) : 3286–3305.

Calderwood, Stuart K, Salamatu S Mambula, Philip J Gray, and Jimmy R Theriault (2007). Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett* 581(19) : 3689–3694.

Caldwell, M. A., X. He, N. Wilkie, S. Pollack, G. Marshall, K. A. Wafford, and C. N. Svendsen (2001). Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol* 19(5) : 475–479.

Calegari, Federico, Wulf Haubensak, Christiane Haffner, and Wieland B Huttner (2005). Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J Neurosci* 25(28) : 6533–6538.

Calegari, Federico and Wieland B Huttner (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci* 116(Pt 24) : 4947–4955.

Cameron, H. A. and R. McKay (1998). Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 8(5) : 677–680.

Campbell, Kenneth and Magdalena Götz (2002). Radial glia : multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25(5) : 235–238.

Campbell, S. L., R. Khosravi-Far, K. L. Rossman, G. J. Clark, and C. J. Der (1998). Increasing complexity of ras signaling. *Oncogene* 17(11 Reviews) : 1395–1413.

Capela, Alexandra and Sally Temple (2002). Lex/ssea-1 is expressed by adult mouse cns stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35(5) : 865–75.

Caric, D., H. Raphael, J. Viti, A. Feathers, D. Wancio, and L. Lillien (2001). Egfrs mediate chemotactic migration in the developing telencephalon. *Development* 128(21) : 4203–4216.

Casanova, Manuel F and Juan Trippe (2006). Regulatory mechanisms of cortical laminar development. *Brain Res Rev* 51(1) : 72–84.

Casarosa, S., C. Fode, and F. Guillemot (1999). Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126(3) : 525–534.

Caviness, V. S. and P. Rakic (1978). Mechanisms of cortical development : a view from mutations in mice. *Annu Rev Neurosci* 1 : 297–326.

Caviness, V. S., T. Takahashi, and R. S. Nowakowski (2000). Neuronogenesis and the early events of neocortical histogenesis. *Results Probl Cell Differ* 30 : 107–143.

Caviness, V S Jr, T Goto, T Tarui, T Takahashi, P G Bhide, and R S Nowakowski (2003). Cell output, cell cycle duration and neuronal specification : a model of integrated mechanisms of the neocortical proliferative process. *Cereb Cortex* 13(6) : 592–8.

Cayouette, Michel and Martin Raff (2002). Asymmetric segregation of numb : a mechanism for neural specification from drosophila to mammals. *Nat Neurosci* 5(12) : 1265–1269.

Chae, T, Y T Kwon, R Bronson, P Dikkes, E Li, and L H Tsai (1997). Mice lacking p35, a neuronal specific activator of cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18(1) : 29–42.

Chan, C. H., L. N. Godinho, D. Thomaidou, S. S. Tan, M. Gulisano, and J. G. Parnavelas (2001). Emx1 is a marker for pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Cereb Cortex* 11(12) : 1191–1198.

Chang, Yunhua, Päivi Ostling, Malin Akerfelt, Diane Trouillet, Murielle Rallu, Yorick Gitton, Rachid El Fatimy, Vivienne Fardeau, Stéphane Le Crom, Michel Morange, Lea Sistonen, and Valérie Mezger (2006). Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression. *Genes Dev* 20(7) : 836–47.

Chen, Ying, Rajiv P Sharma, Robert H Costa, Erminio Costa, and Dennis R Grayson (2002). On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res* 30(13) : 2930–2939.

Chenn, A. and S. K. McConnell (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82(4) : 631–641.

Chenn, Anjen (2005). The simple life (of cortical progenitors). *Neuron* 45(6) : 817–819.

Christians, E, A A Davis, S D Thomas, and I J Benjamin (2000). Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature* 407(6805) : 693–4.

Christians, E, E Michel, P Adenot, V Mezger, M Rallu, M Morange, and J P Renard (1997). Evidence for the involvement of mouse heat shock factor 1 in the atypical expression of the hsp70.1 heat shock gene during mouse zygotic genome activation. *Mol Cell Biol* 17(2) : 778–88.

Christians, E S and I J Benjamin (2006). Heat shock response : lessons from mouse knockouts. *Handb Exp Pharmacol* (172) : 139–52.

Christians, Elisabeth and Ivor J Benjamin (2005). A murine world without hsfs : meeting report. *Cell Stress Chaperones* 10(4) : 265–267.

Christians, Elisabeth S (2003). [when the mother further impacts the destiny of her offspring : maternal effect mutations]. *Med Sci (Paris)* 19(4) : 459–64.

Chu, B., F. Soncin, B. D. Price, M. A. Stevenson, and S. K. Calderwood (1996). Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *J Biol Chem* 271(48) : 30847–30857.

Clos, J., S. Rabindran, J. Wisniewski, and C. Wu (1993). Induction temperature of human heat shock factor is reprogrammed in a drosophila cell environment. *Nature* 364(6434) : 252–255.

Clos, J., J. T. Westwood, P. B. Becker, S. Wilson, K. Lambert, and C. Wu (1990). Molecular cloning and expression of a hexameric drosophila heat shock factor subject to negative regulation. *Cell* 63(5) : 1085–1097.

Cobos, Inma, Maria Elisa Calcagnotto, Alex J Vilaythong, Myo T Thwin, Jeffrey L Noebels, Scott C Baraban, and John L R Rubenstein (2005). Mice lacking dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat Neurosci* 8(8) : 1059–1068.

Colas, J. F. and G. C. Schoenwolf (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* 221(2) : 117–145.

Conti, Luciano, Erika Reitano, and Elena Cattaneo (2006). Neural stem cell systems : diversities and properties after transplantation in animal models of diseases. *Brain Pathol* 16(2) : 143–154.

Coquelle, Frédéric M, Michal Caspi, Fabrice P Cordelières, Jim P Dompierre, Denis L Dujardin, Cynthia Koifman, Patrick Martin, Casper C Hoogenraad, Anna Akhmanova, Niels Galjart, Jan R De Mey, and Orly Reiner (2002). Lis1, clip-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol Cell Biol* 22(9) : 3089–3102.

Corti, Stefania, Monica Nizzardo, Martina Nardini, Chiara Donadoni, Federica Locatelli, Dimitra Papadimitriou, Sabrina Salani, Roberto Del Bo, Serena Ghezzi, Sandra Strazzer, Nereo Bresolin, and Giacomo P Comi (2007). Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on prominin-1 expression. *Exp Neurol* 205(2) : 547–62.

Cotto, J., S. Fox, and R. Morimoto (1997). Hsf1 granules : a novel stress-induced nuclear compartment of human cells. *J Cell Sci* 110 ( Pt 23) : 2925–2934.

Cotto, J. J., M. Kline, and R. I. Morimoto (1996). Activation of heat shock factor 1 dna binding precedes stress-induced serine phosphorylation. evidence for a multistep pathway of regulation. *J Biol Chem* 271(7) : 3355–3358.

Cotto, J. J. and R. I. Morimoto (1999). Stress-induced activation of the heat-shock response : cell and molecular biology of heat-shock factors. *Biochem Soc Symp* 64 : 105–118.

Dai, Chengkai, Luke Whitesell, Arlin B Rogers, and Susan Lindquist (2007). Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* 130(6) : 1005–1018.

Dai, R., W. Frejtag, B. He, Y. Zhang, and N. F. Mivechi (2000). c-jun nh2-terminal kinase targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity. *J Biol Chem* 275(24) : 18210–18218.

D'Amour, Kevin A and Fred H Gage (2002). Are somatic stem cells pluripotent or lineage-restricted ? *Nat Med* 8(3) : 213–214.

D'Amour, Kevin A and Fred H Gage (2003). Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1 : 11866–11872.

D'Arcangelo, G. (2001). The role of the reelin pathway in cortical development. *Symp Soc Exp Biol* (53) : 59–73.

D'Arcangelo, G., G. G. Miao, S. C. Chen, H. D. Soares, J. I. Morgan, and T. Curran (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374(6524) : 719–723.

D'Arcangelo, Gabriella (2006). Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders. *Epilepsy Behav* 8(1) : 81–90.

Davis, A A and S Temple (1994). A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372(6503) : 263–6.

de Rouvroit, C. Lambert and A. M. Goffinet (2001). Neuronal migration. *Mech Dev* 105(1-2) : 47–56.

Deuel, Thomas A S, Judy S Liu, Joseph C Corbo, Seung-Yun Yoo, Lucy B Rorke-Adams, and Christopher A Walsh (2006). Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron* 49(1) : 41–53.

Doetsch, Fiona, Leopoldo Petreanu, Isabelle Caille, Jose Manuel Garcia-Verdugo, and Arturo Alvarez-Buylla (2002). Egf converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36(6) : 1021–34.

Doniach, T. (1995). Basic fgf as an inducer of anteroposterior neural pattern. *Cell* 83(7) : 1067–1070.

Dono, R., G. Texido, R. Dussel, H. Ehmke, and R. Zeller (1998). Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in fgf-2-deficient mice. *EMBO J* 17(15) : 4213–4225.

Donovan, Stacy L and Michael A Dyer (2005). Regulation of proliferation during central nervous system development. *Semin Cell Dev Biol* 16(3) : 407–421.

Douarin, N. M. Le, M. A. Teillet, and M. Catala (1998). Neurulation in amniote vertebrates : a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. *Int J Dev Biol* 42(7) : 909–916.

D'Souza, S. M. and I. R. Brown (1998). Constitutive expression of heat shock proteins hsp90, hsc70, hsp70 and hsp60 in neural and non-neural tissues of the rat during postnatal development. *Cell Stress Chaperones* 3(3) : 188–199.

Dubrulle, Julien and Olivier Pourquié (2004). fgf8 mrna decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature* 427(6973) : 419–422.

Dulabon, L., E. C. Olson, M. G. Taglienti, S. Eisenhuth, B. McGrath, C. A. Walsh, J. A. Kreidberg, and E. S. Anton (2000). Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27(1) : 33–44.

Dunaief, J. L., B. E. Strober, S. Guha, P. A. Khavari, K. Alin, J. Luban, M. Begemann, G. R. Crabtree, and S. P. Goff (1994). The retinoblastoma protein and brg1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* 79(1) : 119–130.

Dyson, Mark H, Stuart Thomson, and Louis C Mahadevan (2005). Heat shock, histone h3 phosphorylation and the cell cycle. *Cell Cycle* 4(1) : 13–17.

Egger, Gerda, Shinwu Jeong, Sonia G Escobar, Connie C Cortez, Tony W H Li, Yoshimasa Saito, Christine B Yoo, Peter A Jones, and Gangning Liang (2006). Identification of dnmt1 (dna methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for dnmt1 in cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(38) : 14080–14085.

Ellis, R. J. and S. M. Hemmingsen (1989). Molecular chaperones : proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem Sci* 14(8) : 339–342.

Eriksson, M, E Jokinen, L Sistonen, and S Leppä (2000). Heat shock factor 2 is activated during mouse heart development. *Int J Dev Biol* 44(5) : 471–7.

Estivill-Torrus, Guillermo, Helen Pearson, Veronica Heyningen, David J Price, and Penny Rashbass (2002). Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development* 129(2) : 455–466.

Evans, Tyler G, Zachery Belak, Nick Ovsenek, and Patrick H Krone (2007). Heat shock factor 1 is required for constitutive hsp70 expression and normal lens development in embryonic zebrafish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146(1) : 131–140.

Fairén, A., A. Cobas, and M. Fonseca (1986). Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 251(1) : 67–83.

Fan, Guoping, Keri Martinowich, Mark H Chin, Fei He, Shaun D Fouse, Leah Hutnick, Daisuke Hattori, Weihong Ge, Yin Shen, Hao Wu, Johanna Hoeve, Ke Shuai, and Yi E Sun (2005). Dna methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of jak-stat signaling. *Development* 132(15) : 3345–56.

Feng, Y., E. C. Olson, P. T. Stukenberg, L. A. Flanagan, M. W. Kirschner, and C. A. Walsh (2000). Lis1 regulates cns lamination by interacting with mnude, a central component of the centrosome. *Neuron* 28(3) : 665–679.

Feng, Y. and C. A. Walsh (2001). Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration. *Nat Rev Neurosci* 2(6) : 408–416.

Feng, Yuanyi and Christopher A Walsh (2004). Mitotic spindle regulation by nde1 controls cerebral cortical size. *Neuron* 44(2) : 279–293.

Figdor, M. C. and C. D. Stern (1993). Segmental organization of embryonic diencephalon. *Nature* 363(6430) : 630–634.

Fiorenza, M T, T Farkas, M Dissing, D Kolding, and V Zimarino (1995). Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucleic Acids Res* 23(3) : 467–474.

Fish, Jennifer L, Yoichi Kosodo, Wolfgang Enard, Svante Pääbo, and Wieland B Huttner (2006). Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(27) : 10438–10443.

Fishell, Gord and Arnold R Kriegstein (2003). Neurons from radial glia : the consequences of asymmetric inheritance. *Curr Opin Neurobiol* 13(1) : 34–41.

Frejtag, W., Y. Zhang, R. Dai, M. G. Anderson, and N. F. Mivechi (2001). Heat shock factor-4 (hsf-4a) represses basal transcription through interaction with tfiif. *J Biol Chem* 276(18) : 14685–14694.

Friedrich, G. and P. Soriano (1991). Promoter traps in embryonic stem cells : a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 5(9) : 1513–1523.

Friocourt, Gaëlle, Judy S Liu, Mary Antypa, Sonja Rakic, Christopher A Walsh, and John G Parnavelas (2007). Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration. *J Neurosci* 27(14) : 3875–3883.

Fujimoto, Mitsuaki, Hanae Izu, Keisuke Seki, Ken Fukuda, Teruo Nishida, Shu-Ichi Yamada, Kanefusa Kato, Shigenobu Yonemura, Sachiye Inouye, and Akira Nakai (2004). HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. *EMBO J* 23(21) : 4297–306.

Fujimoto, Mitsuaki, Eiichi Takaki, Tetsuya Hayashi, Yasushi Kitaura, Yasunori Tanaka, Sachiye Inouye, and Akira Nakai (2005). Active hsf1 significantly suppresses polyglutamine aggregate formation in cellular and mouse models. *J Biol Chem* 280(41) : 34908–34916.

Fujita, Setsuya (2003). The discovery of the matrix cell, the identification of the multipotent neural stem cell and the development of the central nervous system. *Cell Struct Funct* 28(4) : 205–228.

Fukuchi-Shimogori, T. and E. A. Grove (2001). Neocortex patterning by the secreted signaling molecule fgf8. *Science* 294(5544) : 1071–1074.

Furuta, Y., D. W. Piston, and B. L. Hogan (1997). Bone morphogenetic proteins (bmps) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* 124(11) : 2203–2212.

Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287(5457) : 1433–1438.

Gaiano, N., J. S. Nye, and G. Fishell (2000). Radial glial identity is promoted by notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26(2) : 395–404.

Gajiwala, K. S. and S. K. Burley (2000). Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10(1) : 110–116.

Garigan, Delia, Ao-Lin Hsu, Andrew G Fraser, Ravi S Kamath, Julie Ahringer, and Cynthia Kenyon (2002). Genetic analysis of tissue aging in Caenorhabditis elegans : a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* 161(3) : 1101–12.

Georges-Labouesse, E., M. Mark, N. Messaddeq, and A. Gansmüller (1998). Essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination. *Curr Biol* 8(17) : 983–986.

Geschwind, D. H., J. Ou, M. C. Easterday, J. D. Dougherty, R. L. Jackson, Z. Chen, H. Antoine, A. Terskikh, I. L. Weissman, S. F. Nelson, and H. I. Kornblum (2001). A genetic analysis of neural progenitor differentiation. *Neuron* 29(2) : 325–339.

Giffard, Rona G, Lijun Xu, Heng Zhao, Whitney Carrico, Yibing Ouyang, Yanli Qiao, Robert Sapolsky, Gary Steinberg, Bingren Hu, and Midori A Yenari (2004). Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J Exp Biol* 207(Pt 18) : 3213–3220.

Gilmore, E C, T Ohshima, A M Goffinet, A B Kulkarni, and K Herrup (1998). Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J Neurosci* 18(16) : 6370–6377.

Goff, S. A. and A. L. Goldberg (1985). Production of abnormal proteins in e. coli stimulates transcription of lon and other heat shock genes. *Cell* 41(2) : 587–595.

Goodson, M L, Y Hong, R Rogers, M J Matunis, O K Park-Sarge, and K D Sarge (2001). Sumo-1 modification regulates the dna binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem* 276(21) : 18513–8.

Goodson, M. L. and K. D. Sarge (1995). Regulated expression of heat shock factor 1 isoforms with distinct leucine zipper arrays via tissue-dependent alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 211(3) : 943–949.

Gorski, Jessica A, Tiffany Talley, Mengsheng Qiu, Luis Puelles, John L R Rubenstein, and Kevin R Jones (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not gabaergic neurons, are produced in the emx1-expressing lineage. *J Neurosci* 22(15) : 6309–6314.

Götz, Magdalena and Wieland B Huttner (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(10) : 777–88.

Graus-Porta, D., S. Blaess, M. Senften, A. Littlewood-Evans, C. Damsky, Z. Huang, P. Orban, R. Klein, J. C. Schittny, and U. Müller (2001). Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* 31(3) : 367–379.

Greenbaum, Dov, Ronald Jansen, and Mark Gerstein (2002). Analysis of mrna expression and protein abundance data : an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts. *Bioinformatics* 18(4) : 585–596.

Grove, E. A., S. Tole, J. Limon, L. Yip, and C. W. Ragsdale (1998). The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple wnt genes and is compromised in gli3-deficient mice. *Development* 125(12) : 2315–2325.

Guettouche, Toumy, Frank Boellmann, William S Lane, and Richard Voellmy (2005). Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem* 6 : 4.

GuhaThakurta, Debraj, Lisanne Palomar, Gary D Stormo, Pat Tedesco, Thomas E Johnson, David W Walker, Gordon Lithgow, Stuart Kim, and Christopher D Link (2002). Identification of a novel cis-regulatory element involved in the heat shock response in caenorhabditis elegans using microarray gene expression and computational methods. *Genome Res* 12(5) : 701–712.

Guillemot, F. (1999). Vertebrate bhlh genes and the determination of neuronal fates. *Exp Cell Res* 253(2) : 357–364.

Guillemot, Francois, Zoltán Molnár, Victor Tarabykin, and Anastassia Stoykova (2006). Molecular mechanisms of cortical differentiation. *Eur J Neurosci* 23(4) : 857–868.

Guillemot, François (2005). Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Cell Biol* 17(6) : 639–647.

Gupta, Amitabh, Li-Huei Tsai, and Anthony Wynshaw-Boris (2002). Life is a journey : a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3(5) : 342–355.

Haas, Petra and Darren Gilmour (2006). Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev Cell* 10(5) : 673–680.

Hack, Iris, Sabine Hellwig, Dirk Junghans, Bianka Brunne, Hans H Bock, Shanting Zhao, and Michael Frotscher (2007). Divergent roles of apoer2 and vldlr in the migration of cortical neurons. *Development* 134(21) : 3883–3891.

Hall, A. (1998). Rho gtpases and the actin cytoskeleton. *Science* 279(5350) : 509–514.

Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 195(4) : 231–272.

Han, S. I., S. Y. Oh, S. H. Woo, K. H. Kim, J. H. Kim, H. D. Kim, and H. S. Kang (2001). Implication of a small gtpase rac1 in the activation of c-jun n-terminal kinase and heat shock factor in response to heat shock. *J Biol Chem* 276(3) : 1889–1895.

Hanashima, Carina, Zoltán Molnár, and Gord Fishell (2006). Building bridges to the cortex. *Cell* 125(1) : 24–27.

Hartfuss, E., R. Galli, N. Heins, and M. Götz (2001). Characterization of cns precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 229(1) : 15–30.

Hartfuss, Eva, Eckart Forster, Hans H Bock, Michael A Hack, Pierre Leprince, Juan M Luque, Joachim Herz, Michael Frotscher, and Magdalena Gotz (2003). Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development* 130(19) : 4597–4609.

Hatakeyama, Jun and Ryoichiro Kageyama (2006). Notch1 expression is spatiotemporally correlated with neurogenesis and negatively regulated by notch1-independent hes genes in the developing nervous system. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1 : i132–i137.

Hatanaka, Yumiko, Shin-Ichi Hisanaga, Claus W Heizmann, and Fujio Murakami (2004). Distinct migratory behavior of early- and late-born neurons derived from the cortical ventricular zone. *J Comp Neurol* 479(1) : 1–14.

Hatten, M. E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22 : 511–539.

Hattori, M., H. Adachi, M. Tsujimoto, H. Arai, and K. Inoue (1994). Miller-dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [corrected]. *Nature* 370(6486) : 216–218.

Haubensak, Wulf, Alessio Attardo, Winfried Denk, and Wieland B Huttner (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon : a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9) : 3196–3201.

Hayashida, Naoki, Sachiye Inouye, Mitsuaki Fujimoto, Yasunori Tanaka, Hanae Izu, Eiichi Takaki, Hitoshi Ichikawa, Jaerang Rho, and Akira Nakai (2006). A novel hsf1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. *EMBO J* 25(20) : 4773–4783.

Haydar, T. F., F. Wang, M. L. Schwartz, and P. Rakic (2000). Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* 20(15) : 5764–5774.

Haydar, Tarik F, Eugenius Ang, and Pasko Rakic (2003). Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5) : 2890–2895.

He, B., Y. H. Meng, and N. F. Mivechi (1998). Glycogen synthase kinase 3beta and extracellular signal-regulated kinase inactivate heat shock transcription factor 1 by facilitating the disappearance of transcriptionally active granules after heat shock. *Mol Cell Biol* 18(11) : 6624–6633.

He, Haiying, Fabrice Soncin, Nicholas Grammatikakis, Youlin Li, Aliki Siganou, Jianlin Gong, Steven A Brown, Robert E Kingston, and Stuart K Calderwood (2003). Elevated expression of heat shock factor (HSF) 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. *J Biol Chem* 278(37) : 35465–75.

Heinrich, Peter C, Iris Behrmann, Serge Haan, Heike M Hermanns, Gerhard Muller-Newen, and Fred Schaper (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374(Pt 1) : 1–20.

Heins, Nico, Paolo Malatesta, Francesco Cecconi, Masato Nakafuku, Kerry Lee Tucker, Michael A Hack, Prisca Chapouton, Yves-Alain Barde, and Magdalena Götz (2002). Glial cells generate neurons : the role of the transcription factor pax6. *Nat Neurosci* 5(4) : 308–315.

Hensold, J. O., C. R. Hunt, S. K. Calderwood, D. E. Housman, and R. E. Kingston (1990). Dna binding of heat shock factor to the heat shock element is insufficient for transcriptional activation in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* 10(4) : 1600–1608.

Hevner, R F, L Shi, N Justice, Y Hsueh, M Sheng, S Smiga, A Bulfone, A M Goffinet, A T Campagnoni, and J L Rubenstein (2001). Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29(2) : 353–366.

Hiesberger, T, M Trommsdorff, B W Howell, A Goffinet, M C Mumby, J A Cooper, and J Herz (1999). Direct binding of reelin to vldl receptor and apoe receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24(2) : 481–489.

Hietakangas, Ville, Johanna K Ahlskog, Annika M Jakobsson, Maria Hellesuo, Niko M Sahlberg, Carina I Holmberg, Andrey Mikhailov, Jorma J Palvimo, Lila Pirkkala, and Lea Sistonen (2003). Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* 23(8) : 2953–68.

Hietakangas, Ville, Julius Anckar, Henri A Blomster, Mitsuaki Fujimoto, Jorma J Palvimo, Akira Nakai, and Lea Sistonen (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(1) : 45–50.

Hilgarth, Roland S, Yiling Hong, Ok-Kyong Park-Sarge, and Kevin D Sarge (2003). Insights into the regulation of heat shock transcription factor 1 sumo-1 modification. *Biochem Biophys Res Commun* 303(1) : 196–200.

Hilgarth, Roland S, Lynea A Murphy, Colleen M O'Connor, James A Clark, Ok-Kyong Park-Sarge, and Kevin D Sarge (2004). Identification of xenopus heat shock transcription factor-2 : conserved role of sumoylation in regulating deoxyribonucleic acid-binding activity of heat shock transcription factor-2 proteins. *Cell Stress Chaperones* 9(2) : 214–20.

Hirabayashi, Yusuke, Yasuhiro Itoh, Hidenori Tabata, Kazunori Nakajima, Tetsu Akiyama, Norihisa Masuyama, and Yukiko Gotoh (2004). The wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131(12) : 2791–2801.

Hoehn, B., T. M. Ringer, L. Xu, R. G. Giffard, R. M. Sapolsky, G. K. Steinberg, and M. A. Yenari (2001). Overexpression of hsp72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 21(11) : 1303–1309.

Hollyday, M. (2001). Neurogenesis in the vertebrate neural tube. *Int J Dev Neurosci* 19(2) : 161–173.

Homma, Sachiko, Xiongjie Jin, Guanghu Wang, Naxin Tu, Jinna Min, Nathan Yanasak, and Nahid F Mivechi (2007). Demyelination, astrogliosis, and accumulation of ubiquitinated proteins, hallmarks of cns disease in hsf1-deficient mice. *J Neurosci* 27(30) : 7974–7986.

Honda, Takao and Kazunori Nakajima (2006). Mouse disabled1 (dab1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein. *J Biol Chem* 281(50) : 38951–38965.

Hou, Zhibo, Qing Li, Lisheng He, Hui-Ying Lim, Xinrong Fu, Nam Sang Cheung, Donna X Qi, and Robert Z Qi (2007). Microtubule association of the neuronal p35 activator of cdk5. *J Biol Chem* 282(26) : 18666–18670.

Howell, B. W., R. Hawkes, P. Soriano, and J. A. Cooper (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389(6652) : 733–737.

Howell, B W, T M Herrick, and J A Cooper (1999). Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev* 13(6) : 643–648.

Hsieh, Jenny and Fred H Gage (2004). Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev* 14(5) : 461–469.

Hsieh, Jenny and Fred H Gage (2005). Chromatin remodeling in neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 17(6) : 664–671.

Hsu, Ao-Lin, Coleen T Murphy, and Cynthia Kenyon (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300(5622) : 1142–5.

Hu, Yanzhong and Nahid F Mivechi (2003). Hsf-1 interacts with ral-binding protein 1 in a stress-responsive, multiprotein complex with hsp90 in vivo. *J Biol Chem* 278(19) : 17299–17306.

Hu, Yanzhong and Nahid F Mivechi (2006). Association and regulation of heat shock transcription factor 4b with both extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and dual-specificity tyrosine phosphatase dusp26. *Mol Cell Biol* 26(8) : 3282–3294.

Hubl, S. T., J. C. Owens, and H. C. Nelson (1994). Mutational analysis of the dna-binding domain of yeast heat shock transcription factor. *Nat Struct Biol* 1(9) : 615–620.

Humbert, S., R. Dhavan, and L. Tsai (2000). p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 113 ( Pt 6) : 975–983.

Huttner, Wieland B and Yoichi Kosodo (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 17(6) : 648–657.

Iacopetti, P., M. Michelini, I. Stuckmann, B. Oback, E. Aaku-Saraste, and W. B. Huttner (1999). Expression of the antiproliferative gene tis21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8) : 4639–4644.

Inouye, Sachiye, Mitsuaki Fujimoto, Tamami Nakamura, Eiichi Takaki, Naoki Hayashida, Tsonwin Hai, and Akira Nakai (2007). Hsf1 opens chromatin structure of il-6 promoter to facilitate binding of an activator or a repressor. *J Biol Chem* .

Inouye, Sachiye, Hanae Izu, Eiichi Takaki, Harumi Suzuki, Mutsunori Shirai, Yoshifumi Yokota, Hitoshi Ichikawa, Mitsuaki Fujimoto, and Akira Nakai (2004). Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1. *J Biol Chem* 279(37) : 38701–9.

Inouye, Sachiye, Kensaku Katsuki, Hanae Izu, Mitsuaki Fujimoto, Kazuma Sugahara, Shu-Ichi Yamada, Yoichi Shinkai, Yoshitomo Oka, Yumiko Katoh, and Akira Nakai (2003). Activation of heat shock genes is not necessary for protection by heat shock transcription factor 1 against cell death due to a single exposure to high temperatures. *Mol Cell Biol* 23(16) : 5882–5895.

Ishii, Y., S. Nakamura, and N. Osumi (2000). Demarcation of early mammalian cortical development by differential expression of fringe genes. *Brain Res Dev Brain Res* 119(2) : 307–320.

Ivaldi, M. Soledad, Caline S Karam, and Victor G Corces (2007). Phosphorylation of histone h3 at ser10 facilitates rna polymerase ii release from promoter-proximal pausing in drosophila. *Genes Dev* .

Izu, Hanae, Sachiye Inouye, Mitsuaki Fujimoto, Koji Shiraishi, Katsusuke Naito, and Akira Nakai (2004). Heat shock transcription factor 1 is involved in quality-control mechanisms in male germ cells. *Biol Reprod* 70(1) : 18–24.

Jacob, John and James Briscoe (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep* 4(8) : 761–765.

Jakobsen, B. K. and H. R. Pelham (1988). Constitutive binding of yeast heat shock factor to dna in vivo. *Mol Cell Biol* 8(11) : 5040–5042.

Jedlicka, P, M A Mortin, and C Wu (1997). Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J* 16(9) : 2452–62.

Johe, K. K., T. G. Hazel, T. Muller, M. M. Dugich-Djordjevic, and R. D. McKay (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10(24) : 3129–3140.

Johnson, Jane E (2003). Numb and numblike control cell number during vertebrate neurogenesis. *Trends Neurosci* 26(8) : 395–396.

Johnson, Kenneth R, Qing Yin Zheng, and Konrad Noben-Trauth (2006). Strain background effects and genetic modifiers of hearing in mice. *Brain Res* 1091(1) : 79–88.

Jolly, Caroline, Lara Konecny, Deborah L Grady, Yulia A Kutskova, Jose J Cotto, Richard I Morimoto, and Claire Vourc'h (2002). In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J Cell Biol* 156(5) : 775–81.

Jolly, Caroline, Alexandra Metz, Jérôme Govin, Marc Vigneron, Bryan M Turner, Saadi Khochbin, and Claire Vourc'h (2004). Stress-induced transcription of satellite iii repeats. *J Cell Biol* 164(1) : 25–33.

Jurivich, D. A., C. Pachetti, L. Qiu, and J. F. Welk (1995). Salicylate triggers heat shock factor differently than heat. *J Biol Chem* 270(41) : 24489–24495.

Kadonaga, J T (1998). Eukaryotic transcription : an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92(3) : 307–13.

Kageyama, Ryoichiro, Toshiyuki Ohtsuka, Jun Hatakeyama, and Ryosuke Ohsawa (2005). Roles of bhlh genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* 306(2) : 343–348.

Kallio, Marko, Yunhua Chang, Martine Manuel, Tero-Pekka Alastalo, Murielle Rallu, Yorick Gitton, Lila Pirkkala, Marie-Thérèse Loones, Liliana Paslaru, Severine Larney, Sophie Hiard, Michel Morange, Lea Sistonen, and Valérie Mezger (2002). Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in hsf2 null mice. *EMBO J* 21(11) : 2591–601.

Kappeler, Caroline, Marc Dhenain, Françoise Phan Dinh Tuy, Yoann Saillour, Serge Marty, Catherine Fallet-Bianco, Isabelle Souville, Evelyne Souil, Jean-Marc Pinard, Gundela Meyer, Ferechté Encha-Razavi, Andreas Volk, Cherif Beldjord, Jamel Chelly, and Fiona Francis (2007). Magnetic resonance imaging and histological studies of corpus callosal and hippocampal abnormalities linked to doublecortin deficiency. *J Comp Neurol* 500(2) : 239–254.

Katyal, Sachin and Roseline Godbout (2004). Alternative splicing modulates disabled-1 (dab1) function in the developing chick retina. *EMBO J* 23(8) : 1878–1888.

Kawaguchi, A., T. Miyata, K. Sawamoto, N. Takashita, A. Murayama, W. Akamatsu, M. Ogawa, M. Okabe, Y. Tano, S. A. Goldman, and H. Okano (2001). Nestin-egfp transgenic mice : visualization of the self-renewal and multipotency of cns stem cells. *Mol Cell Neurosci* 17(2) : 259–273.

Kawazoe, Y, M Tanabe, N Sasai, K Nagata, and A Nakai (1999). Hsf3 is a major heat shock responsive factor duringchicken embryonic development. *Eur J Biochem* 265(2) : 688–97.

Keays, David A, Guoling Tian, Karine Poirier, Guo-Jen Huang, Christian Siebold, James Cleak, Peter L Oliver, Martin Fray, Robert J Harvey, Zoltán Molnár, Maria C Piñon, Neil Dear, William Valdar, Steve D M Brown, Kay E Davies, J. Nicholas P Rawlins, Nicholas J Cowan, Patrick Nolan, Jamel Chelly, and Jonathan Flint (2007). Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell* 128(1) : 45–57.

Keshvara, Lakhu, Susan Magdaleno, David Benhayon, and Tom Curran (2002). Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates disabled 1 independently of reelin signaling. *J Neurosci* 22(12) : 4869–4877.

Keyoung, H. M., N. S. Roy, A. Benraiss, A. Louissaint, A. Suzuki, M. Hashimoto, W. K. Rashbaum, H. Okano, and S. A. Goldman (2001). High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain. *Nat Biotechnol* 19(9) : 843–850.

Khaleque, Md Abdul, Ajit Bharti, Douglas Sawyer, Jianlin Gong, Ivor J Benjamin, Mary Ann Stevenson, and Stuart K Calderwood (2005). Induction of heat shock proteins by heregulin beta1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. *Oncogene* 24(43) : 6564–6573.

Kiecker, Clemens and Andrew Lumsden (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci* 6(7) : 553–564.

Kim, J., A. Nueda, Y. H. Meng, W. S. Dynan, and N. F. Mivechi (1997). Analysis of the phosphorylation of human heat shock transcription factor-1 by map kinase family members. *J Cell Biochem* 67(1) : 43–54.

Kline, M. P. and R. I. Morimoto (1997). Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17(4) : 2107–2115.

Kültz, Dietmar (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* 67 : 225–257.

Knauf, U., E. M. Newton, J. Kyriakis, and R. E. Kingston (1996). Repression of human heat shock factor 1 activity at control temperature by phosphorylation. *Genes Dev* 10(21) : 2782–2793.

Ko, J, S Humbert, R T Bronson, S Takahashi, A B Kulkarni, E Li, and L H Tsai (2001). p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J Neurosci* 21(17) : 6758–6771.

Koizumi, Hiroyuki, Teruyuki Tanaka, and Joseph G Gleeson (2006). Doublecortin-like kinase functions with doublecortin to mediate fiber tract decussation and neuronal migration. *Neuron* 49(1) : 55–66.

Kolch, Walter (2002). Ras/raf signalling and emerging pharmacotherapeutic targets. *Expert Opin Pharmacother* 3(6) : 709–718.

Komarnitsky, P., E. J. Cho, and S. Buratowski (2000). Different phosphorylated forms of rna polymerase ii and associated mrna processing factors during transcription. *Genes Dev* 14(19) : 2452–2460.

Kondo, T. and M. Raff (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential cns stem cells. *Science* 289(5485) : 1754–1757.

Koni, P. A., S. K. Joshi, U. A. Temann, D. Olson, L. Burkly, and R. A. Flavell (2001). Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice : impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J Exp Med* 193(6) : 741–754.

Kornack, D. R. and P. Rakic (1995). Radial and horizontal deployment of clonally related cells in the primate neocortex : relationship to distinct mitotic lineages. *Neuron* 15(2) : 311–321.

Kornack, D. R. and P. Rakic (1998). Changes in cell-cycle kinetics during the development and evolution of primate neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3) : 1242–1246.

Kornblum, H. I. and D. H. Geschwind (2001). Molecular markers in cns stem cell research : hitting a moving target. *Nat Rev Neurosci* 2(11) : 843–846.

Kosodo, Yoichi, Katja Röper, Wulf Haubensak, Anne-Marie Marzesco, Denis Corbeil, and Wieland B Huttner (2004). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J* 23(11) : 2314–2324.

Kovalenko, O. V., E. I. Golub, P. Bray-Ward, D. C. Ward, and C. M. Radding (1997). A novel nucleic acid-binding protein that interacts with human rad51 recombinase. *Nucleic Acids Res* 25(24) : 4946–4953.

Kroeger, P. E. and R. I. Morimoto (1994). Selection of new hsf1 and hsf2 dna-binding sites reveals difference in trimer cooperativity. *Mol Cell Biol* 14(11) : 7592–7603.

Kroeger, P. E., K. D. Sarge, and R. I. Morimoto (1993). Mouse heat shock transcription factors 1 and 2 prefer a trimeric binding site but interact differently with the hsp70 heat shock element. *Mol Cell Biol* 13(6) : 3370–3383.

Krumm, A., T. Meulia, M. Brunvand, and M. Groudine (1992). The block to transcriptional elongation within the human c-myc gene is determined in the promoter-proximal region. *Genes Dev* 6(11) : 2201–2213.

Kuschel, Stefanie, Ulrich Rüther, and Thomas Theil (2003). A disrupted balance between bmp/wnt and fgf signaling underlies the ventralization of the gli3 mutant telencephalon. *Dev Biol* 260(2) : 484–495.

Kwon, Y. T., A. Gupta, Y. Zhou, M. Nikolic, and L. H. Tsai (2000). Regulation of n-cadherin-mediated adhesion by the p35-cdk5 kinase. *Curr Biol* 10(7) : 363–372.

Kwon, Y T and L H Tsai (1998). A novel disruption of cortical development in p35(-/-) mice distinct from reeler. *J Comp Neurol* 395(4) : 510–522.

Kwon, Y. T. and L. H. Tsai (2000). The role of the p35/cdk5 kinase in cortical development. *Results Probl Cell Differ* 30 : 241–253.

Kwong, Jacky M K, Maziar Lalezary, Jessica K Nguyen, Christine Yang, Anuj Khattar, Natik Piri, Sergey Mareninov, Lynn K Gordon, and Joseph Caprioli (2006). Coexpression of heat shock transcription factors 1 and 2 in rat retinal ganglion cells. *Neurosci Lett* 405(3) : 191–5.

Lambert de Rouvroit, C and A M Goffinet (1998). The reeler mouse as a model of brain development. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 150 : 1–106.

Lamigeon, C., J. P. Bellier, S. Sacchettoni, M. Rujano, and B. Jacquemont (2001). Enhanced neuronal protection from oxidative stress by coculture with glutamic acid decarboxylase-expressing astrocytes. *J Neurochem* 77(2) : 598–606.

Law, A., K. Hirayoshi, T. O'Brien, and J. T. Lis (1998). Direct cloning of dna that interacts in vivo with a specific protein : application to rna polymerase ii and sites of pausing in drosophila. *Nucleic Acids Res* 26(4) : 919–924.

Le Goff, Pascale, Yves Le Dréan, Christine Le Péron, Catherine Le Jossic-Corcos, Abdelkadder Ainouche, and Denis Michel (2004). Intracellular trafficking of heat shock factor 2. *Exp Cell Res* 294(2) : 480–93.

Lee, J. H., A. Hübel, and F. Schöffl (1995). Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic arabidopsis. *Plant J* 8(4) : 603–612.

Lee, M. H., M. Nikolic, C. A. Baptista, E. Lai, L. H. Tsai, and J. Massagué (1996). The brain-specific activator p35 allows cdk5 to escape inhibition by p27kip1 in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8) : 3259–3263.

Lendahl, U, L B Zimmerman, and R D McKay (1990). Cns stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60(4) : 585–95.

Leppa, S, L Pirkkala, H Saarento, K D Sarge, and L Sistonen (1997). Overexpression of hsf2-beta inhibits hemin-induced heat shock gene expression and erythroid differentiation in k562 cells. *J Biol Chem* 272(24) : 15293–15298.

Leventer, R. J., C. Cardoso, D. H. Ledbetter, and W. B. Dobyns (2001). Lis1 : from cortical malformation to essential protein of cellular dynamics. *Trends Neurosci* 24(9) : 489–492.

Li, Bing-Sheng, Lei Zhang, Satoru Takahashi, Wu Ma, Howard Jaffe, Ashok B Kulkarni, and Harish C Pant (2002). Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-jun n-terminal kinase 3. *EMBO J* 21(3) : 324–333.

Li, G. C. and Z. Werb (1982). Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(10) : 3218–3222.

Li, W., C. A. Cogswell, and J. J. LoTurco (1998). Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by bmp. *J Neurosci* 18(21) : 8853–8862.

Lillien, L. (1998). Neural progenitors and stem cells : mechanisms of progenitor heterogeneity. *Curr Opin Neurobiol* 8(1) : 37–44.

Lillien, L. and H. Raphael (2000). Bmp and fgf regulate the development of egf-responsive neural progenitor cells. *Development* 127(22) : 4993–5005.

Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55 : 1151–1191.

Lindquist, S. and E. A. Craig (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22 : 631–677.

Lindvall, Olle and Anders Björklund (2004). Cell therapy in parkinson's disease. *NeuroRx* 1(4) : 382–393.

Lis, J. (1998). Promoter-associated pausing in promoter architecture and postinitiation transcriptional regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63 : 347–356.

Lis, J and C Wu (1993). Protein traffic on the heat shock promoter : parking, stalling, and trucking along. *Cell* 74(1) : 1–4.

Littlefield, O. and H. C. Nelson (1999). A new use for the 'wing' of the 'winged' helix-turn-helix motif in the hsf-dna cocrystal. *Nat Struct Biol* 6(5) : 464–470.

Liu, P. C. and D. J. Thiele (1999). Modulation of human heat shock factor trimerization by the linker domain. *J Biol Chem* 274(24) : 17219–17225.

Liu, Qing Yun, Zhi Li Wu, Wen Jian Lv, Yuan Chang Yan, and Yi Ping Li (2007). Developmental expression of cyclin h and cdk7 in zebrafish : the essential role of cyclin h during early embryo development. *Cell Res* 17(2) : 163–173.

Liu, X. D., P. C. Liu, N. Santoro, and D. J. Thiele (1997). Conservation of a stress response : human heat shock transcription factors functionally substitute for yeast hsf. *EMBO J* 16(21) : 6466–6477.

Loeffler, Markus and Ingo Roeder (2004). Conceptual models to understand tissue stem cell organization. *Curr Opin Hematol* 11(2) : 81–87.

Loison, Fabien, Laure Debure, Philippe Nizard, Pascale Goff, Denis Michel, and Yves Drean (2006). Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress : implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes. *Biochem J* 395(1) : 223–31.

Loones, M T, Y Chang, and M Morange (2000). The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggests a role in neuronal and non-neuronal differentiation. *Cell Stress Chaperones* 5(4) : 291–305.

Loones, M T, M Rallu, V Mezger, and M Morange (1997). Hsp gene expression and hsf2 in mouse development. *Cell Mol Life Sci* 53(2) : 179–90.

Louvi, Angeliki and Spyros Artavanis-Tsakonas (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 7(2) : 93–102.

Luft, J. C. and D. J. Dix (1999). Hsp70 expression and function during embryogenesis. *Cell Stress Chaperones* 4(3) : 162–170.

Luskin, M. B., A. L. Pearlman, and J. R. Sanes (1988). Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with a recombinant retrovirus. *Neuron* 1(8) : 635–647.

Lynn, Stephen, Eric J Huang, Sailaja Elchuri, Mohammed Naeemuddin, Yumiko Nishinaka, Junji Yodoi, Donna M Ferriero, Charles J Epstein, and Ting-Ting Huang (2005). Selective neuronal vulnerability and inadequate stress response in superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med* 38(6) : 817–828.

Ma, Li, Bingyun Sun, Leroy Hood, and Qiang Tian (2007). Molecular profiling of stem cells. *Clin Chim Acta* 378(1-2) : 24–32.

Magdaleno, S. M. and T. Curran (2001). Brain development : integrins and the reelin pathway. *Curr Biol* 11(24) : R1032–R1035.

Magdaleno, Susan, Lakhu Keshvara, and Tom Curran (2002). Rescue of ataxia and preplate splitting by ectopic expression of reelin in reeler mice. *Neuron* 33(4) : 573–586.

Malatesta, P., E. Hartfuss, and M. Götz (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127(24) : 5253–5263.

Malatesta, Paolo, Michael A Hack, Eva Hartfuss, Helmut Kettenmann, Wolfgang Klinkert, Frank Kirchhoff, and Magdalena Götz (2003). Neuronal or glial progeny : regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37(5) : 751–764.

Mallamaci, A., L. Muzio, C. H. Chan, J. Parnavelas, and E. Boncinelli (2000). Area identity shifts in the early cerebral cortex of emx2-/- mutant mice. *Nat Neurosci* 3(7) : 679–686.

Mallamaci, Antonello and Anastassia Stoykova (2006). Gene networks controlling early cerebral cortex arealization. *Eur J Neurosci* 23(4) : 847–856.

Manuel, M, J Sage, M G Mattéi, M Morange, and V Mezger (1999). Genomic structure and chromosomal localization of the mouse hsf2 gene and promoter sequences. *Gene* 232(1) : 115–24.

Manuel, Martine and David J Price (2005). Role of pax6 in forebrain regionalization. *Brain Res Bull* 66(4-6) : 387–393.

Manuel, Martine, Murielle Rallu, Marie-Thérèse Loones, Vincenzo Zimarino, Valérie Mezger, and Michel Morange (2002). Determination of the consensus binding sequence for the purified embryonic heat shock factor 2. *Eur J Biochem* 269(10) : 2527–37.

Marcuccilli, C. J., S. K. Mathur, R. I. Morimoto, and R. J. Miller (1996). Regulatory differences in the stress response of hippocampal neurons and glial cells after heat shock. *J Neurosci* 16(2) : 478–485.

Marin-Husstege, Mireya, Michela Muggironi, Aixiao Liu, and Patricia Casaccia-Bonnefil (2002). Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression. *J Neurosci* 22(23) : 10333–10345.

Marín, O., A. Yaron, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne, and J. L. Rubenstein (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293(5531) : 872–875.

Mathew, A, S K Mathur, C Jolly, S G Fox, S Kim, and R I Morimoto (2001). Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 21(21) : 7163–71.

McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* 276(5309) : 66–71.

McMillan, D R, X Xiao, L Shao, K Graves, and I J Benjamin (1998). Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* 273(13) : 7523–8.

McMillan, D Randy, Elisabeth Christians, Michael Forster, XianZhong Xiao, Patrice Connell, Jean-Christophe Plumier, XiaoXia Zuo, James Richardson, Sylvia Morgan, and Ivor J Benjamin (2002). Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. *Mol Cell Biol* 22(22) : 8005–14.

Megason, Sean G and Andrew P McMahon (2002). A mitogen gradient of dorsal midline wnts organizes growth in the cns. *Development* 129(9) : 2087–2098.

Mehler, M. F., P. C. Mabie, G. Zhu, S. Gokhan, and J. A. Kessler (2000). Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive cns lineage fate. *Dev Neurosci* 22(1-2) : 74–85.

Mezger, V, O Bensaude, and M Morange (1989). Unusual levels of heat shock element-binding activity in embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 9(9) : 3888–3896.

Mezger, V, J P Renard, E Christians, and M Morange (1994). Detection of heat shock element-binding activities by gel shift assay during mouse preimplantation development. *Dev Biol* 165(2) : 627–38.

Michaud, S., R. Marin, J. T. Westwood, and R. M. Tanguay (1997). Cell-specific expression and heat-shock induction of hsps during spermatogenesis in drosophila melanogaster. *J Cell Sci* 110 ( Pt 17) : 1989–1997.

Min, Jin-Na, Yan Zhang, Demetrius Moskophidis, and Nahid F Mivechi (2004). Unique contribution of heat shock transcription factor 4 in ocular lens development and fiber cell differentiation. *Genesis* 40(4) : 205–17.

Miyama, S., T. Takahashi, R. S. Nowakowski, and V. S. Caviness (1997). A gradient in the duration of the g1 phase in the murine neocortical proliferative epithelium. *Cereb Cortex* 7(7) : 678–689.

Miyata, T., A. Kawaguchi, H. Okano, and M. Ogawa (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31(5) : 727–741.

Montagutelli, X. (2000). Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. *J Am Soc Nephrol* 11 Suppl 16 : S101–S105.

Morange, M. (2000). [heat shock proteins]. *Ann Pathol* 20(3) : 188–189.

Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response : cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12(24) : 3788–3796.

Morimoto, R. I., M. P. Kline, D. N. Bimston, and J. J. Cotto (1997). The heat-shock response : regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem* 32 : 17–29.

Morley, James F and Richard I Morimoto (2004). Regulation of longevity in Caenorhabditis elegans by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell* 15(2) : 657–64.

Morrison, A J, S J Rush, and I R Brown (2000). Heat shock transcription factors and the hsp70 induction response in brain and kidney of the hyperthermic rat during postnatal development. *J Neurochem* 75(1) : 363–72.

Morshead, Cindi M, Patricia Benveniste, Norman N Iscove, and Derek Kooy (2002). Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* 8(3) : 268–273.

Mosser, Dick D and Richard I Morimoto (2004). Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23(16) : 2907–2918.

Muchardt, C. and M. Yaniv (2001). When the swi/snf complex remodels...the cell cycle. *Oncogene* 20(24) : 3067–3075.

Muenke, M. and P. A. Beachy (2000). Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Curr Opin Genet Dev* 10(3) : 262–269.

Muñoz, J. P., A. Alvarez, and R. B. Maccioni (2000). Increase in the expression of the neuronal cyclin-dependent protein kinase cdk-5 during differentiation of n2a neuroblastoma cells. *Neuroreport* 11(12) : 2733–2738.

Muroyama, Yuko, Hisato Kondoh, and Shinji Takada (2004). Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochem Biophys Res Commun* 313(4) : 915–921.

Murphy, S P, J J Gorzowski, K D Sarge, and B Phillips (1994). Characterization of constitutive hsf2 dna-binding activity in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 14(8) : 5309–5317.

Murray, Kerren, Viviane Calaora, Catherine Rottkamp, Oivin Guicherit, and Monique Dubois-Dalcq (2002). Sonic hedgehog is a potent inducer of rat oligodendrocyte development from cortical precursors in vitro. *Mol Cell Neurosci* 19(3) : 320–332.

Muzio, Luca, Barbara DiBenedetto, Anastassia Stoykova, Edoardo Boncinelli, Peter Gruss, and Antonello Mallamaci (2002). Conversion of cerebral cortex into basal ganglia in emx2(-/-) pax6(sey/sey) double-mutant mice. *Nat Neurosci* 5(8) : 737–745.

Muzio, Luca and Antonello Mallamaci (2003). Emx1, emx2 and pax6 in specification, regionalization and arealization of the cerebral cortex. *Cereb Cortex* 13(6) : 641–647.

Nadarajah, B., P. Alifragis, R. O L Wong, and J. G. Parnavelas (2003). Neuronal migration in the developing cerebral cortex : observations based on real-time imaging. *Cereb Cortex* 13(6) : 607–611.

Nadarajah, Bagirathy and John G Parnavelas (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3(6) : 423–432.

Nadeau, J. H. (2001). Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet* 2(3) : 165–174.

Nakai, A (1999). New aspects in the vertebrate heat shock factor system : Hsf3 and Hsf4. *Cell Stress Chaperones* 4(2) : 86–93.

Nakai, A and T Ishikawa (2001). Cell cycle transition under stress conditions controlled by vertebrate heat shock factors. *EMBO J* 20(11) : 2885–95.

Nakai, A and R I Morimoto (1993). Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol Cell Biol* 13(4) : 1983–97.

Nakai, A, M Suzuki, and M Tanabe (2000). Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J* 19(7) : 1545–54.

Nakai, A, M Tanabe, Y Kawazoe, J Inazawa, R I Morimoto, and K Nagata (1997). HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 17(1) : 469–81.

Nakajima, Kazunori (2007). Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Neurochem Int* 51(2-4) : 121–131.

Narboux-Nême, Nicolas and Marion Wassef (2003). [origin of gabaergic cortical interneurons in mice and humans]. *Med Sci (Paris)* 19(4) : 408–411.

Neidhardt, F. C., R. A. VanBogelen, and V. Vaughn (1984). The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 18 : 295–329.

Nelson, Branden R, Byron H Hartman, Sean A Georgi, Michael S Lan, and Thomas A Reh (2007). Transient inactivation of notch signaling synchronizes differentiation of neural progenitor cells. *Dev Biol* 304(2) : 479–498.

Newton, E. M., U. Knauf, M. Green, and R. E. Kingston (1996). The regulatory domain of human heat shock factor 1 is sufficient to sense heat stress. *Mol Cell Biol* 16(3) : 839–846.

Nguyen, V. T., M. Morange, and O. Bensaude (1989). Protein denaturation during heat shock and related stress. escherichia coli beta-galactosidase and photinus pyralis luciferase inactivation in mouse cells. *J Biol Chem* 264(18) : 10487–10492.

Niederreither, K., J. Vermot, B. Schuhbaur, P. Chambon, and P. Dollé (2000). Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* 127(1) : 75–85.

Niethammer, M., D. S. Smith, R. Ayala, J. Peng, J. Ko, M. S. Lee, M. Morabito, and L. H. Tsai (2000). Nudel is a novel cdk5 substrate that associates with lis1 and cytoplasmic dynein. *Neuron* 28(3) : 697–711.

Nieto, M, C Schuurmans, O Britz, and F Guillemot (2001). Neural bhlh genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29(2) : 401–13.

Nishimura, R. N. and B. E. Dwyer (1996). Evidence for different mechanisms of induction of hsp70i : a comparison of cultured rat cortical neurons with astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 36(2) : 227–239.

Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, R. S. Dammerman, and A. R. Kriegstein (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409(6821) : 714–720.

Noctor, Stephen C, Alexander C Flint, Tamily A Weissman, Winston S Wong, Brian K Clinton, and Arnold R Kriegstein (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22(8) : 3161–3173.

Noctor, Stephen C, Verónica Martínez-Cerdeño, Lidija Ivic, and Arnold R Kriegstein (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7(2) : 136–144.

Noh, Jai Sung, Rajiv P Sharma, Marin Veldic, Alain A Salvacion, Xiaomei Jia, Ying Chen, Erminio Costa, Alessandro Guidotti, and Dennis R Grayson (2005). Dna methyltransferase 1 regulates reelin mrna expression in mouse primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5) : 1749–1754.

Nollen, Ellen A A and Richard I Morimoto (2002). Chaperoning signaling pathways : molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci* 115(Pt 14) : 2809–2816.

Nover, L. and K. D. Scharf (1997). Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 53(1) : 80–103.

Nowakowski, Richard S, Verne S Caviness, Takao Takahashi, and Nancy L Hayes (2002). Population dynamics during cell proliferation and neuronogenesis in the developing murine neocortex. *Results Probl Cell Differ* 39 : 1–25.

O'Brien, T., S. Hardin, A. Greenleaf, and J. T. Lis (1994). Phosphorylation of rna polymerase ii c-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature* 370(6484) : 75–77.

O'Callaghan-Sunol, Cornelia and Michael Y Sherman (2006). Heat shock transcription factor (hsf1) plays a critical role in cell migration via maintaining map kinase signaling. *Cell Cycle* 5(13) : 1431–1437.

Ogawa, M., T. Miyata, K. Nakajima, K. Yagyu, M. Seike, K. Ikenaka, H. Yamamoto, and K. Mikoshiba (1995). The reeler gene-associated antigen on cajal-retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14(5) : 899–912.

Ohshima, T., E. C. Gilmore, G. Longenecker, D. M. Jacobowitz, R. O. Brady, K. Herrup, and A. B. Kulkarni (1999). Migration defects of cdk5(-/-) neurons in the developing cerebellum is cell autonomous. *J Neurosci* 19(14) : 6017–6026.

Ohshima, T, M Ogawa, M Hirasawa, G Longenecker, K Ishiguro, H C Pant, R O Brady, A B Kulkarni, and K Mikoshiba (2001). Synergistic contributions of cyclin-dependant kinase 5/p35 and reelin/dab1 to the positioning of cortical neurons in the developing mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5) : 2764–2769.

Ohshima, Toshio, Masaharu Ogawa, Kyoko Takeuchi, Satoru Takahashi, Ashok B Kulkarni, and Katsuhiko Mikoshiba (2002). Cyclin-dependent kinase 5/p35 contributes synergistically with reelin/dab1 to the positioning of facial branchiomotor and inferior olive neurons in the developing mouse hindbrain. *J Neurosci* 22(10) : 4036–4044.

Ohshima, Toshio, Hiromi Suzuki, Toshifumi Morimura, Masaharu Ogawa, and Katsuhiko Mikoshiba (2007). Modulation of reelin signaling by cyclin-dependent kinase 5. *Brain Res* 1140 : 84–95.

Ohtsuka, K. and T. Suzuki (2000). Roles of molecular chaperones in the nervous system. *Brain Res Bull* 53(2) : 141–146.

O'Leary, D. D. (1989). Do cortical areas emerge from a protocortex ? *Trends Neurosci* 12(10) : 400–406.

Olson, Eric C and Christopher A Walsh (2002). Smooth, rough and upside-down neocortical development. *Curr Opin Genet Dev* 12(3) : 320–327.

Ostling, Päivi, Johanna K Björk, Pia Roos-Mattjus, Valérie Mezger, and Lea Sistonen (2007). Heat shock factor 2 (hsf2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with hsf1. *J Biol Chem* 282(10) : 7077–86.

Owa, T., H. Yoshino, K. Yoshimatsu, and T. Nagasu (2001). Cell cycle regulation in the g1 phase : a promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr Med Chem* 8(12) : 1487–1503.

Park, J. M., J. Werner, J. M. Kim, J. T. Lis, and Y. J. Kim (2001). Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by hsf upon heat shock. *Mol Cell* 8(1) : 9–19.

Parras, Carlos M, Carol Schuurmans, Raffaella Scardigli, Jaesang Kim, David J Anderson, and François Guillemot (2002). Divergent functions of the proneural genes mash1 and ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* 16(3) : 324–338.

Parsell, D. A. and R. T. Sauer (1989). Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in escherichia coli : dependence on protein level not protein degradation. *Genes Dev* 3(8) : 1226–1232.

Paslaru, Liliana, M Morange, and Valérie Mezger (2003). Phenotypic characterization of mouse embryonic fibroblasts lacking heat shock factor 2. *J Cell Mol Med* 7(4) : 425–35.

Patrick, G. N., L. Zukerberg, M. Nikolic, S. Monte, P. Dikkes, and L. H. Tsai (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402(6762) : 615–622.

Pelham, H. R. and M. Bienz (1982). A synthetic heat-shock promoter element confers heat-inducibility on the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *EMBO J* 1(11) : 1473–1477.

Pevny, Larysa and Marysia Placzek (2005). Sox genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* 15(1) : 7–13.

Pinaud, S. and J. Mirkovitch (1998). Regulation of c-fos expression by rna polymerase elongation competence. *J Mol Biol* 280(5) : 785–798.

Pirkkala, L, P Nykanen, and L Sistonen (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15(7) : 1118–1131.

Plet, A., D. Eick, and J. M. Blanchard (1995). Elongation and premature termination of transcripts initiated from c-fos and c-myc promoters show dissimilar patterns. *Oncogene* 10(2) : 319–328.

Polleux, F., C. Dehay, and H. Kennedy (1997). The timetable of laminar neurogenesis contributes to the specification of cortical areas in mouse isocortex. *J Comp Neurol* 385(1) : 95–116.

Potten, C. S. and M. Loeffler (1990). Stem cells : attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. lessons for and from the crypt. *Development* 110(4) : 1001–1020.

Pritchett, James, Clare Wright, Leo Zeef, and Bagirathy Nadarajah (2007). Stromal derived factor-1 exerts differential regulation on distinct cortical cell populations in vitro. *BMC Dev Biol* 7 : 31.

Puelles, L., J. A. Amat, and M. Martinez Torre (1987). Segment-related, mosaic neurogenetic pattern in the forebrain and mesencephalon of early chick embryos : I. topography of ache-positive neuroblasts up to stage hh18. *J Comp Neurol* 266(2) : 247–268.

Puelles, L., E. Kuwana, E. Puelles, A. Bulfone, K. Shimamura, J. Keleher, S. Smiga, and J. L. Rubenstein (2000). Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes dlx-2, emx-1, nkx-2.1, pax-6, and tbr-1. *J Comp Neurol* 424(3) : 409–438.

Puelles, L., E. Kuwana, E. Puelles, and J. L. Rubenstein (1999). Comparison of the mammalian and avian telencephalon from the perspective of gene expression data. *Eur J Morphol* 37(2-3) : 139–150.

Puelles, L. and J. L. Rubenstein (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16(11) : 472–479.

Qian, X., A. A. Davis, S. K. Goderie, and S. Temple (1997). Fgf2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18(1) : 81–93.

Qian, X., Q. Shen, S. K. Goderie, W. He, A. Capela, A. A. Davis, and S. Temple (2000). Timing of cns cell generation : a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28(1) : 69–80.

Queitsch, Christine, Todd A Sangster, and Susan Lindquist (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417(6889) : 618–624.

Rabindran, S K, G Giorgi, J Clos, and C Wu (1991). Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, hsf1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16) : 6906–10.

Rabindran, S. K., R. I. Haroun, J. Clos, J. Wisniewski, and C. Wu (1993). Regulation of heat shock factor trimer formation : role of a conserved leucine zipper. *Science* 259(5092) : 230–234.

Rajan, P. and R. D. McKay (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the cns. *J Neurosci* 18(10) : 3620–3629.

Rajdev, S., K. Hara, Y. Kokubo, R. Mestril, W. Dillmann, P. R. Weinstein, and F. R. Sharp (2000). Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann Neurol* 47(6) : 782–791.

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145(1) : 61–83.

Rakic, P. (1988). Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241(4862) : 170–176.

Rakic, Pasko (2003). Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex* 13(6) : 541–549.

Rallu, M, M Loones, Y Lallemand, R Morimoto, M Morange, and V Mezger (1997). Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6) : 2392–7.

Rallu, Murielle, Joshua G Corbin, and Gord Fishell (2002). Parsing the prosencephalon. *Nat Rev Neurosci* 3(12) : 943–951.

Ramalho-Santos, Miguel, Soonsang Yoon, Yumi Matsuzaki, Richard C Mulligan, and Douglas A Melton (2002). "stemness" : transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298(5593) : 597–600.

Rasmussen, E. B. and J. T. Lis (1995). Short transcripts of the ternary complex provide insight into rna polymerase ii elongational pausing. *J Mol Biol* 252(5) : 522–535.

Reiner, O., R. Carrozzo, Y. Shen, M. Wehnert, F. Faustinella, W. B. Dobyns, C. T. Caskey, and D. H. Ledbetter (1993). Isolation of a miller-dieker lissencephaly gene containing g protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364(6439) : 717–721.

Reiner, Orly, Sivan Sapoznik, and Tamar Sapir (2006). Lissencephaly 1 linking to multiple diseases : mental retardation, neurodegeneration, schizophrenia, male sterility, and more. *Neuromolecular Med* 8(4) : 547–565.

Reynolds, B. A., W. Tetzlaff, and S. Weiss (1992). A multipotent egf-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12(11) : 4565–4574.

Rice, D. S. and T. Curran (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24 : 1005–1039.

Rice, D. S., M. Sheldon, G. D'Arcangelo, K. Nakajima, D. Goldowitz, and T. Curran (1998). Disabled-1 acts downstream of reelin in a signaling pathway that controls laminar organization in the mammalian brain. *Development* 125(18) : 3719–3729.

Richter, K. and J. Buchner (2001). Hsp90 : chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol* 188(3) : 281–290.

Richter-Landsberg, C. and O. Goldbaum (2003). Stress proteins in neural cells : functional roles in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 60(2) : 337–349.

Ritossa, F. (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1(2) : 97–98.

Rockett, J. C., F. L. Mapp, J. B. Garges, J. C. Luft, C. Mori, and D. J. Dix (2001). Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol Reprod* 65(1) : 229–239.

Roegiers, Fabrice and Yuh Nung Jan (2004). Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol* 16(2) : 195–205.

Ross, Sarah, Anri Tienhaara, Ming-Sum Lee, Li-Huei Tsai, and Grace Gill (2002). Gc box-binding transcription factors control the neuronal specific transcription of the cyclin-dependent kinase 5 regulator p35. *J Biol Chem* 277(6) : 4455–4464.

Roszko, I., C. Afonso, D. Henrique, and L. Mathis (2006). Key role played by rhoa in the balance between planar and apico-basal cell divisions in the chick neuroepithelium. *Dev Biol* 298(1) : 212–224.

Rougvie, A. E. and J. T. Lis (1990). Postinitiation transcriptional control in drosophila melanogaster. *Mol Cell Biol* 10(11) : 6041–6045.

Roy, Kristine, Kathleen Kuznicki, Qiang Wu, Zhuoxin Sun, Dagmar Bock, Gunther Schutz, Nancy Vranich, and A. Paula Monaghan (2004). The tlx gene regulates the timing of neurogenesis in the cortex. *J Neurosci* 24(38) : 8333–8345.

Rubenstein, J. L., S. Anderson, L. Shi, E. Miyashita-Lin, A. Bulfone, and R. Hevner (1999). Genetic control of cortical regionalization and connectivity. *Cereb Cortex* 9(6) : 524–532.

Rubenstein, J. L., S. Martinez, K. Shimamura, and L. Puelles (1994). The embryonic vertebrate forebrain : the prosomeric model. *Science* 266(5185) : 578–580.

Rubenstein, J. L., K. Shimamura, S. Martinez, and L. Puelles (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu Rev Neurosci* 21 : 445–477.

Rutherford, S. L. and S. Lindquist (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396(6709) : 336–342.

Sakakibara, S., T. Imai, K. Hamaguchi, M. Okabe, J. Aruga, K. Nakajima, D. Yasutomi, T. Nagata, Y. Kurihara, S. Uesugi, T. Miyata, M. Ogawa, K. Mikoshiba, and H. Okano (1996). Mouse-musashi-1, a neural rna-binding protein highly enriched in the mammalian cns stem cell. *Dev Biol* 176(2) : 230–242.

Sakurai, Hiroshi and Yukiko Takemori (2007). Interaction between heat shock transcription factors (HSFs) and divergent binding sequences : binding specificities of yeast HSFs and human HSF1. *J Biol Chem* 282(18) : 13334–41.

Saltsman, K. A., H. L. Prentice, and R. E. Kingston (1998). The c-terminal hydrophobic repeat of schizosaccharomyces pombe heat shock factor is not required for heat-induced dna-binding. *Yeast* 14(8) : 733–746.

Sanada, Kamon, Amitabh Gupta, and Li-Huei Tsai (2004). Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to radial glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis. *Neuron* 42(2) : 197–211.

Sanada, Kamon and Li-Huei Tsai (2005). G protein betagamma subunits and ags3 control spindle orientation and asymmetric cell fate of cerebral cortical progenitors. *Cell* 122(1) : 119–131.

Santos, S D and M J Saraiva (2004). Enlarged ventricles, astrogliosis and neurodegeneration in heat shock factor 1 null mouse brain. *Neuroscience* 126(3) : 657–63.

Sarge, K D (1995). Male germ cell-specific alteration in temperature set point of the cellular stress response. *J Biol Chem* 270(32) : 18745–8.

Sarge, K. D., A. E. Bray, and M. L. Goodson (1995). Altered stress response in testis. *Nature* 374(6518) : 126.

Sarge, K D and E S Maxwell (1991). Evidence for a competitive-displacement model for the initiation of protein synthesis involving the intermolecular hybridization of 5 s rrna, 18 s rrna and mrna. *FEBS Lett* 294(3) : 234–8.

Sarge, K D, S P Murphy, and R I Morimoto (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of dna-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* 13(3) : 1392–1407.

Sarge, K. D., O. K. Park-Sarge, J. D. Kirby, K. E. Mayo, and R. I. Morimoto (1994). Expression of heat shock factor 2 in mouse testis : potential role as a regulator of heat-shock protein gene expression during spermatogenesis. *Biol Reprod* 50(6) : 1334–1343.

Sarge, Kevin D and Ok-Kyong Park-Sarge (2005). Gene bookmarking : keeping the pages open. *Trends Biochem Sci* 30(11) : 605–10.

Schuetz, T J, G J Gallo, L Sheldon, P Tempst, and R E Kingston (1991). Isolation of a cdna for hsf2 : evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16) : 6911–6915.

Schuurmans, Carol, Olivier Armant, Marta Nieto, Jan M Stenman, Olivier Britz, Natalia Klenin, Craig Brown, Lisa-Marie Langevin, Julie Seibt, Hua Tang, James M Cunningham, Richard Dyck, Christopher Walsh, Kenny Campbell, Franck Polleux, and François Guillemot (2004). Sequential phases of cortical specification involve neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 23(14) : 2892–2902.

Schuurmans, Carol and François Guillemot (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* 12(1) : 26–34.

Shamovsky, Ilya and David Gershon (2004). Novel regulatory factors of hsf-1 activation : facts and perspectives regarding their involvement in the age-associated attenuation of the heat shock response. *Mech Ageing Dev* 125(10-11) : 767–775.

Shamovsky, Ilya, Maxim Ivannikov, Eugene S Kandel, David Gershon, and Evgeny Nudler (2006). Rna-mediated response to heat shock in mammalian cells. *Nature* 440(7083) : 556–560.

Sharma, Shiv K, Debra A Brock, Robin R Ammann, Tiffany DeShazo, Meenal Khosla, Richard H Gomer, and Gerald Weeks (2002). The cdk5 homologue, crp, regulates endocytosis and secretion in dictyostelium and is necessary for optimum growth and differentiation. *Dev Biol* 247(1) : 1–10.

Sheldon, L A and R E Kingston (1993). Hydrophobic coiled-coil domains regulate the subcellular localization of human heat shock factor 2. *Genes Dev* 7(8) : 1549–58.

Sheldon, M., D. S. Rice, G. D'Arcangelo, H. Yoneshima, K. Nakajima, K. Mikoshiba, B. W. Howell, J. A. Cooper, D. Goldowitz, and T. Curran (1997). Scrambler and

yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature* 389(6652) : 730–733.

Shen, Qin, Weimin Zhong, Yuh Nung Jan, and Sally Temple (2002). Asymmetric numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts. *Development* 129(20) : 4843–4853.

Sherbet, G. V. and M. S. Lakshmi (1967). Loss of neural inductive capacity of the chick primary organizer by treatment with histone and its restoration by follicle-stimulating hormone. *Nature* 215(5105) : 1089–1090.

Sherman, M. Y. and A. L. Goldberg (2001). Cellular defenses against unfolded proteins : a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29(1) : 15–32.

Shimamura, K. and J. L. Rubenstein (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124(14) : 2709–2718.

Shimazaki, T., T. Shingo, and S. Weiss (2001). The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 21(19) : 7642–7653.

Shu, Tianzhi, Ramses Ayala, Minh-Dang Nguyen, Zhigang Xie, Joseph G Gleeson, and Li-Huei Tsai (2004). Ndel1 operates in a common pathway with lis1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* 44(2) : 263–277.

Sidera, Katerina, Martina Samiotaki, Eleni Yfanti, George Panayotou, and Evangelia Patsavoudi (2004). Involvement of cell surface hsp90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system. *J Biol Chem* 279(44) : 45379–45388.

Singh, Ishwar S, Ju-Ren He, Stuart Calderwood, and Jeffrey D Hasday (2002). A high affinity hsf-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor-alpha gene is a transcriptional repressor. *J Biol Chem* 277(7) : 4981–4988.

Singh, Varsha and Alejandro Aballay (2006). Heat-shock transcription factor (HSF)-1 pathway required for Caenorhabditis elegans immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(35) : 13092–7.

Sistonen, L, K D Sarge, and R I Morimoto (1994). Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. *Mol Cell Biol* 14(3) : 2087–2099.

Sistonen, L, K D Sarge, B Phillips, K Abravaya, and R I Morimoto (1992). Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* 12(9) : 4104–4111.

Small, J. Victor, Theresia Stradal, Emmanuel Vignal, and Klemens Rottner (2002). The lamellipodium : where motility begins. *Trends Cell Biol* 12(3) : 112–120.

Smart, I. H. (1976). A pilot study of cell production by the ganglionic eminences of the developing mouse brain. *J Anat* 121(Pt 1) : 71–84.

Smart, I. H. and G. M. McSherry (1982). Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. ii. histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. *J Anat* 134(Pt 3) : 415–442.

Smart, Iain H M, Colette Dehay, Pascale Giroud, Michel Berland, and Henry Kennedy (2002). Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* 12(1) : 37–53.

Smith, Austin (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature* 441.

Smith, D. F., W. P. Sullivan, T. N. Marion, K. Zaitsu, B. Madden, D. J. McCormick, and D. O. Toft (1993). Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol Cell Biol* 13(2) : 869–876.

Smith, David I, Yu Zhu, Sarah McAvoy, and Robert Kuhn (2006). Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. *Cancer Lett* 232(1) : 48–57.

Somasundaram, T and Suraj P Bhat (2004). Developmentally dictated expression of heat shock factors : exclusive expression of hsf4 in the postnatal lens and its specific interaction with alphab-crystallin heat shock promoter. *J Biol Chem* 279(43) : 44497–503.

Song, Mi-Ryoung and Anirvan Ghosh (2004). Fgf2-induced chromatin remodeling regulates cntf-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci* 7(3) : 229–235.

Sorger, P. K. (1990). Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. *Cell* 62(4) : 793–805.

Sorger, P. K. and H. R. Pelham (1988). Yeast heat shock factor is an essential dna-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54(6) : 855–864.

Stacchiotti, A, R Rezzani, L Rodella, L Tiberio, L Schiaffonati, and R Bianchi (1999). Cell-specific expression of heat shock transcription factors 1 and 2 in unstressed rat spinal cord. *Neurosci Lett* 268(2) : 73–6.

Stehman, Stephanie A, Yu Chen, Richard J McKenney, and Richard B Vallee (2007). Nude and nudel are required for mitotic progression and are involved in dynein recruitment to kinetochores. *J Cell Biol* 178(4) : 583–594.

Stephanou, A. and D. S. Latchman (1999). Transcriptional regulation of the heat shock protein genes by stat family transcription factors. *Gene Expr* 7(4-6) : 311–319.

Stern, Claudio D (2005). Neural induction : old problem, new findings, yet more questions. *Development* 132(9) : 2007–2021.

Stoykova, A., D. Treichel, M. Hallonet, and P. Gruss (2000). Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J Neurosci* 20(21) : 8042–8050.

Stricker, Stefan H, Karina Meiri, and Magdalena Götz (2006). P-gap-43 is enriched in horizontal cell divisions throughout rat cortical development. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1 : i121–i131.

Sugitani, Yoshinobu, Shigeyasu Nakai, Osamu Minowa, Miyuki Nishi, Kou-Ichi Jishage, Hitoshi Kawano, Kensaku Mori, Masaharu Ogawa, and Tetsuo Noda (2002). Brn-1 and brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes Dev* 16(14) : 1760–1765.

Sullivan, E. K., C. S. Weirich, J. R. Guyon, S. Sif, and R. E. Kingston (2001). Transcriptional activation domains of human heat shock factor 1 recruit human swi/snf. *Mol Cell Biol* 21(17) : 5826–5837.

Sussel, L., O. Marin, S. Kimura, and J. L. Rubenstein (1999). Loss of nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon : evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126(15) : 3359–3370.

Tabata, Hidenori and Kazunori Nakajima (2003). Multipolar migration : the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 23(31) : 9996–10001.

Takahashi, T., T. Goto, S. Miyama, R. S. Nowakowski, and V. S. Caviness (1999). Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate : relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall. *J Neurosci* 19(23) : 10357–10371.

Takahashi, T., R. S. Nowakowski, and V. S. Caviness (1996). Interkinetic and migratory behavior of a cohort of neocortical neurons arising in the early embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 16(18) : 5762–5776.

Takaki, Eiichi, Mitsuaki Fujimoto, Takashi Nakahari, Shigenobu Yonemura, Yoshihiko Miyata, Naoki Hayashida, Kaoru Yamamoto, Richard B Vallee, Tsuyoshi Mikuriya, Kazuma Sugahara, Hiroshi Yamashita, Sachiye Inouye, and Akira Nakai (2007). Heat shock transcription factor 1 is required for maintenance of ciliary beating in mice. *J Biol Chem* .

Takaki, Eiichi, Mitsuaki Fujimoto, Kazuma Sugahara, Takashi Nakahari, Shigenobu Yonemura, Yasunori Tanaka, Naoki Hayashida, Sachiye Inouye, Tsuyoshi Takemoto, Hiroshi Yamashita, and Akira Nakai (2006). Maintenance of olfactory neurogenesis requires hsf1, a major heat shock transcription factor in mice. *J Biol Chem* 281(8) : 4931–7.

Takiguchi-Hayashi, Keiko, Mariko Sekiguchi, Shizuko Ashigaki, Masako Takamatsu, Hiroshi Hasegawa, Rika Suzuki-Migishima, Minesuke Yokoyama, Shigetada Nakanishi, and Yasuto Tanabe (2004). Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J Neurosci* 24(9) : 2286–2295.

Tamai, Hiroshi, Hiroshi Shinohara, Takaki Miyata, Kanako Saito, Yuji Nishizawa, Tadashi Nomura, and Noriko Osumi (2007). Pax6 transcription factor is required for the interkinetic nuclear movement of neuroepithelial cells. *Genes Cells* 12(9) : 983–996.

Tamamaki, N., K. Nakamura, K. Okamoto, and T. Kaneko (2001). Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci Res* 41(1) : 51–60.

Tanabe, M, Y Kawazoe, S Takeda, R I Morimoto, K Nagata, and A Nakai (1998). Disruption of the hsf3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance. *EMBO J* 17(6) : 1750–8.

Tanabe, M., N. Sasai, K. Nagata, X. D. Liu, P. C. Liu, D. J. Thiele, and A. Nakai (1999). The mammalian hsf4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing. *J Biol Chem* 274(39) : 27845–27856.

Tanaka, Keiji (2003). Columns for complex visual object features in the inferotemporal cortex : clustering of cells with similar but slightly different stimulus selectivities. *Cereb Cortex* 13(1) : 90–99.

Tanaka, T., Veeranna, T. Ohshima, P. Rajan, N. D. Amin, A. Cho, T. Sreenath, H. C. Pant, R. O. Brady, and A. B. Kulkarni (2001). Neuronal cyclin-dependent kinase 5 activity is critical for survival. *J Neurosci* 21(2) : 550–558.

Tanigaki, K., F. Nogaki, J. Takahashi, K. Tashiro, H. Kurooka, and T. Honjo (2001). Notch1 and notch3 instructively restrict bfgf-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* 29(1) : 45–55.

Tanikawa, J, E Ichikawa-Iwata, C Kanei-Ishii, A Nakai, S Matsuzawa, J C Reed, and S Ishii (2000). p53 suppresses the c-myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J Biol Chem* 275(20) : 15578–85.

Tarabykin, V., A. Stoykova, N. Usman, and P. Gruss (2001). Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by svet1 gene expression. *Development* 128(11) : 1983–1993.

Taupin, P., J. Ray, W. H. Fischer, S. T. Suhr, K. Hakansson, A. Grubb, and F. H. Gage (2000). Fgf-2-responsive neural stem cell proliferation requires ccg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron* 28(2) : 385–397.

Taylor, David M, Miranda L Tradewell, Sandra Minotti, and Heather D Durham (2007). Characterizing the role of hsp90 in production of heat shock proteins in motor neurons reveals a suppressive effect of wild-type hsf1. *Cell Stress Chaperones* 12(2) : 151–162.

Taylor, I. C., J. L. Workman, T. J. Schuetz, and R. E. Kingston (1991). Facilitated binding of gal4 and heat shock factor to nucleosomal templates : differential function of dna-binding domains. *Genes Dev* 5(7) : 1285–1298.

Temple, S (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414(6859) : 112–7.

Theil, T., G. Alvarez-Bolado, A. Walter, and U. Rüther (1999). Gli3 is required for emx gene expression during dorsal telencephalon development. *Development* 126(16) : 3561–3571.

Thomson, Stuart, Angela Hollis, Catherine A Hazzalin, and Louis C Mahadevan (2004). Distinct stimulus-specific histone modifications at hsp70 chromatin targeted by the transcription factor heat shock factor-1. *Mol Cell* 15(4) : 585–594.

Till, J. E. and E. A. McCulloch (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14 : 213–222.

Tissir, Fadel and André M Goffinet (2003). Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* 4(6) : 496–505.

Tissières, A., H. K. Mitchell, and U. M. Tracy (1974). Protein synthesis in salivary glands of drosophila melanogaster : relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84(3) : 389–398.

Toresson, H., S. S. Potter, and K. Campbell (2000). Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon : opposing roles for pax6 and gsh2. *Development* 127(20) : 4361–4371.

Tosh, David and Jonathan M W Slack (2002). How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3) : 187–194.

Tremolizzo, L., G. Carboni, W. B. Ruzicka, C. P. Mitchell, I. Sugaya, P. Tueting, R. Sharma, D. R. Grayson, E. Costa, and A. Guidotti (2002). An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26) : 17095–17100.

Trinklein, Nathan D, Will C Chen, Robert E Kingston, and Richard M Myers (2004a). Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation. *Cell Stress Chaperones* 9(1) : 21–8.

Trinklein, Nathan D, John I Murray, Sara J Hartman, David Botstein, and Richard M Myers (2004b). The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol Biol Cell* 15(3) : 1254–1261.

Trommsdorff, M., M. Gotthardt, T. Hiesberger, J. Shelton, W. Stockinger, J. Nimpf, R. E. Hammer, J. A. Richardson, and J. Herz (1999). Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the vldl receptor and apoe receptor 2. *Cell* 97(6) : 689–701.

Tsai, Jin-Wu, Yu Chen, Arnold R Kriegstein, and Richard B Vallee (2005). Lis1 rna interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *J Cell Biol* 170(6) : 935–945.

Tsai, L H, I Delalle, V S Jr Caviness, T Chae, and E Harlow (1994). p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371(6496) : 419–423.

Tu, Naxin, Yanzhong Hu, and Nahid F Mivechi (2006a). Heat shock transcription factor (hsf)-4b recruits brg1 during the g1 phase of the cell cycle and regulates the expression of heat shock proteins. *J Cell Biochem* 98(6) : 1528–42.

Tu, Naxin, Yanzhong Hu, and Nahid F Mivechi (2006b). Heat shock transcription factor (hsf)-4b recruits brg1 during the g1 phase of the cell cycle and regulates the expression of heat shock proteins. *J Cell Biochem* 98(6) : 1528–1542.

Tytell, M. (2005). Release of heat shock proteins (hsps) and the effects of extracellular hsps on neural cells and tissues. *Int J Hyperthermia* 21(5) : 445–455.

Tytell, M., S. G. Greenberg, and R. J. Lasek (1986). Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. *Brain Res* 363(1) : 161–164.

Valentin, Guillaume, Petra Haas, and Darren Gilmour (2007). The chemokine sdf1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of cxcr7 and cxcr4b. *Curr Biol* 17(12) : 1026–1031.

Valgardsdottir, Rut, Ilaria Chiodi, Manuela Giordano, Fabio Cobianchi, Silvano Riva, and Giuseppe Biamonti (2005). Structural and functional characterization of noncoding repetitive rnas transcribed in stressed human cells. *Mol Biol Cell* 16(6) : 2597–2604.

Vigh, László, Ibolya Horváth, Bruno Maresca, and John L Harwood (2007). Can the stress protein response be controlled by 'membrane-lipid therapy'? *Trends Biochem Sci* 32(8) : 357–363.

Voss, A. K., T. Thomas, and P. Gruss (2000). Mice lacking hsp90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development* 127(1) : 1–11.

Vuister, G. W., S. J. Kim, C. Wu, and A. Bax (1994). Nmr evidence for similarities between the dna-binding regions of drosophila melanogaster heat shock factor and the helix-turn-helix and hnf-3/forkhead families of transcription factors. *Biochemistry* 33(1) : 10–16.

Vujanac, Milos, Angelia Fenaroli, and Vincenzo Zimarino (2005). Constitutive nuclear import and stress-regulated nucleocytoplasmic shuttling of mammalian heat-shock factor 1. *Traffic* 6(3) : 214–229.

Wagers, Amy J and Irving L Weissman (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116(5) : 639–648.

Walsh, D, Z Li, Y Wu, and K Nagata (1997a). Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development. *Cell Mol Life Sci* 53(2) : 198–211.

Walsh, D., Z. Li, Y. Wu, and K. Nagata (1997b). Heat shock and the role of the hsps during neural plate induction in early mammalian cns and brain development. *Cell Mol Life Sci* 53(2) : 198–211.

Wang, Guanghu, Zhekang Ying, Xiongjie Jin, Naxin Tu, Yan Zhang, Michele Phillips, Demetrius Moskophidis, and Nahid F Mivechi (2004). Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. *Genesis* 38(2) : 66–80.

Wang, Guanghu, Jing Zhang, Demetrius Moskophidis, and Nahid F Mivechi (2003). Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. *Genesis* 36(1) : 48–61.

Wang, N., J. P. Butler, and D. E. Ingber (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260(5111) : 1124–1127.

Wang, Z. and S. Lindquist (1998). Developmentally regulated nuclear transport of transcription factors in drosophila embryos enable the heat shock response. *Development* 125(23) : 4841–4850.

Ware, M. L., J. W. Fox, J. L. González, N. M. Davis, C. Lambert Rouvroit, C. J. Russo, S. C. Chua, A. M. Goffinet, and C. A. Walsh (1997). Aberrant splicing of a mouse disabled homolog, mdab1, in the scrambler mouse. *Neuron* 19(2) : 239–249.

Weigmann, A., D. Corbeil, A. Hellwig, and W. B. Huttner (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23) : 12425–12430.

Weishaupt, J. H., C. Neusch, and M. Bähr (2003). Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and neuronal cell death. *Cell Tissue Res* 312(1) : 1–8.

Welch, W J (1992). Mammalian stress response : cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72(4) : 1063–81.

Welch, W. J. and J. P. Suhan (1985). Morphological study of the mammalian stress response : characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J Cell Biol* 101(4) : 1198–1211.

Westwood, J. T., J. Clos, and C. Wu (1991). Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. *Nature* 353(6347) : 822–827.

Westwood, J. T. and C. Wu (1993). Activation of drosophila heat shock factor : conformational change associated with a monomer-to-trimer transition. *Mol Cell Biol* 13(6) : 3481–3486.

Whitford, Kristin L, Valérie Marillat, Elke Stein, Corey S Goodman, Marc Tessier-Lavigne, Alain Chédotal, and Anirvan Ghosh (2002). Regulation of cortical dendrite development by slit-robo interactions. *Neuron* 33(1) : 47–61.

Wiederrecht, G., D. Seto, and C. S. Parker (1988). Isolation of the gene encoding the s. cerevisiae heat shock transcription factor. *Cell* 54(6) : 841–853.

Wilkerson, Donald C, Hollie S Skaggs, and Kevin D Sarge (2007). Hsf2 binds to the hsp90, hsp27, and c-fos promoters constitutively and modulates their expression. *Cell Stress Chaperones* 12(3) : 283–290.

Wilson, Leigh and Malcolm Maden (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282(1) : 1–13.

Wilson, Stephen W and Corinne Houart (2004). Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* 6(2) : 167–181.

Wirth, Delphine, Elisabeth Christians, Carine Munaut, Cécile Dessy, Jean-Michel Foidart, and Pascal Gustin (2002). Differential heat shock gene hsp70-1 response to toxicants revealed by in vivo study of lungs in transgenic mice. *Cell Stress Chaperones* 7(4) : 387–395.

Wodarz, Andreas and Wieland B Huttner (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in drosophila and vertebrates. *Mech Dev* 120(11) : 1297–1309.

Wu, A. M., J. E. Till, L. Siminovitch, and E. A. McCulloch (1967). A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J Cell Physiol* 69(2) : 177–184.

Wu, C (1984). Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature* 311(5981) : 81–4.

Wu, C (1995). Heat shock transcription factors : structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11 : 441–69.

Wu, Chwen-Huey, Yuki Yamaguchi, Lawrence R Benjamin, Maria Horvat-Gordon, Jodi Washinsky, Espen Enerly, Jan Larsson, Andrew Lambertsson, Hiroshi Handa, and David Gilmour (2003). Nelf and dsif cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in drosophila. *Genes Dev* 17(11) : 1402–1414.

Wu, D. C., Y. P. Yu, N. T. Lee, A. C. Yu, J. H. Wang, and Y. F. Han (2000). The expression of cdk5, p35, p39, and cdk5 kinase activity in developing, adult, and aged rat brains. *Neurochem Res* 25(7) : 923–929.

Wurmser, Andrew E, Kinichi Nakashima, Robert G Summers, Nicolas Toni, Kevin A D'Amour, Dieter C Lie, and Fred H Gage (2004). Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 430(6997) : 350–356.

Xiao, H and J T Lis (1988). Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Science* 239(4844) : 1139–42.

Xiao, H, O Perisic, and J T Lis (1991). Cooperative binding of Drosophila heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. *Cell* 64(3) : 585–93.

Xiao, X, X Zuo, A A Davis, D R McMillan, B B Curry, J A Richardson, and I J Benjamin (1999). HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J* 18(21) : 5943–52.

Xie, Yue, Changmin Chen, Mary Ann Stevenson, Philip E Auron, and Stuart K Calderwood (2002). Heat shock factor 1 represses transcription of the il-1beta gene through physical interaction with the nuclear factor of interleukin 6. *J Biol Chem* 277(14) : 11802–11810.

Xie, Zhigang, Lily Y Moy, Kamon Sanada, Ying Zhou, Joshua J Buchman, and Li-Huei Tsai (2007). Cep120 and taccs control interkinetic nuclear migration and the neural progenitor pool. *Neuron* 56(1) : 79–93.

Xing, Hongyan, Yiling Hong, and Kevin D Sarge (2007). Identification of the pp2a-interacting region of heat shock transcription factor 2. *Cell Stress Chaperones* 12(2) : 192–7.

Xing, Hongyan, Christopher N Mayhew, Katherine E Cullen, Ok-Kyong Park-Sarge, and Kevin D Sarge (2004). Hsf1 modulation of hsp70 mrna polyadenylation via interaction with symplekin. *J Biol Chem* 279(11) : 10551–10555.

Xing, Hongyan, Donald C Wilkerson, Christopher N Mayhew, Eric J Lubert, Hollie S Skaggs, Michael L Goodson, Yiling Hong, Ok-Kyong Park-Sarge, and Kevin D Sarge (2005). Mechanism of hsp70i gene bookmarking. *Science* 307(5708) : 421–423.

Xu, Qing, Estanislao Cruz, and Stewart A Anderson (2003). Cortical interneuron fate determination : diverse sources for distinct subtypes ? *Cereb Cortex* 13(6) : 670–676.

Yagita, Yoshiki, Kazuo Kitagawa, Tsutomu Sasaki, Takaki Miyata, Hideyuki Okano, Masatsugu Hori, and Masayasu Matsumoto (2002). Differential expression of musashi1 and nestin in the adult rat hippocampus after ischemia. *J Neurosci Res* 69(6) : 750–756.

Yamamoto, Ayako, Junko Ueda, Noritaka Yamamoto, Naoya Hashikawa, and Hiroshi Sakurai (2007). Role of heat shock transcription factor in saccharomyces cerevisiae oxidative stress response. *Eukaryot Cell* 6(8) : 1373–1379.

Yan, Jizhou, Lisha Xu, Gregory Crawford, Zenfeng Wang, and Shawn M Burgess (2006). The forkhead transcription factor foxi1 remains bound to condensed mitotic chromosomes and stably remodels chromatin structure. *Mol Cell Biol* 26(1) : 155–168.

Yeh, Fu-Lung, Lung-Ying Hsu, Bo-An Lin, Chiao-Fu Chen, I-Chen Li, Shin-Hua Tsai, and Todd Hsu (2006). Cloning of zebrafish (danio rerio) heat shock factor 2 (hsf2) and similar patterns of hsf2 and hsf1 mrna expression in brain tissues. *Biochimie* 88(12) : 1983–8.

Yenari, M. A., R. G. Giffard, R. M. Sapolsky, and G. K. Steinberg (1999). The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (hsp70). *Mol Med Today* 5(12) : 525–531.

Yoshida, K. and S. Toya (1997). Neurotrophic activity in cytokine-activated astrocytes. *Keio J Med* 46(2) : 55–60.

Yoshima, T, T Yura, and H Yanagi (1998). Heat shock factor 1 mediates hemin-induced hsp70 gene transcription in k562 erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 273(39) : 25466–25471.

Young, J. C., I. Moarefi, and F. U. Hartl (2001). Hsp90 : a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154(2) : 267–273.

Yu, Hong-Guo and Douglas E Koshland (2003). Meiotic condensin is required for proper chromosome compaction, sc assembly, and resolution of recombination-dependent chromosome linkages. *J Cell Biol* 163(5) : 937–947.

Yun, K., S. Potter, and J. L. Rubenstein (2001). Gsh2 and pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128(2) : 193–205.

Zechner, Dietmar, Yasuyuki Fujita, Jörg Hülsken, Thomas Müller, Ingrid Walther, Makoto M Taketo, E. Bryan Crenshaw, Walter Birchmeier, and Carmen Birchmeier (2003). beta-catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol* 258(2) : 406–418.

Zhang, Guangcheng, Amir H Assadi, Robert S McNeil, Uwe Beffert, Anthony Wynshaw-Boris, Joachim Herz, Gary D Clark, and Gabriella D'Arcangelo (2007). The pafah1b complex interacts with the reelin receptor vldlr. *PLoS ONE* 2(2) : e252.

Zhang, Y., W. Frejtag, R. Dai, and N. F. Mivechi (2001). Heat shock factor-4 (hsf-4a) is a repressor of hsf-1 mediated transcription. *J Cell Biochem* 82(4) : 692–703.

Zhang, Yan, Lei Huang, Jing Zhang, Demetrius Moskophidis, and Nahid F Mivechi (2002). Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J Cell Biochem* 86(2) : 376–93.

Zheng, M., C. L. Leung, and R. K. Liem (1998). Region-specific expression of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and its activators, p35 and p39, in the developing and adult rat central nervous system. *J Neurobiol* 35(2) : 141–159.

Zhong, Weimin (2003). Diversifying neural cells through order of birth and asymmetry of division. *Neuron* 37(1) : 11–14.

Zimmer, Céline, Marie-Catherine Tiveron, Rolf Bodmer, and Harold Cremer (2004). Dynamics of cux2 expression suggests that an early pool of svz precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cereb Cortex* 14(12) : 1408–1420.

Zuo, J., R. Baler, G. Dahl, and R. Voellmy (1994). Activation of the dna-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. *Mol Cell Biol* 14(11) : 7557–7568.

Zuo, J., D. Rungger, and R. Voellmy (1995). Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 15(8) : 4319–4330.

# Annexes

*Il est peu fréquent de retrouver une annexe aux travaux exposés dans une thèse. La volonté qui anime ce choix est un souci de compléments et de commentaires aux concepts et informations énoncés dans ce document sans pour autant en alourdir la lecture. Elle comporte une partie de vulgarisation qui expose succinctement les pré-requis concernant les cellules souches souches (NSC) et des progéniteurs neuraux (NP) du système nerveux central (SNC). L'autre partie vise à compléter les connaissances au sujet des HSF, regroupant une revue publiée (Akerfelt et al., 2007) portant sur les HSF et une revue non publiée portant sur les fonctions putatives de HSF2 au cours de la corticogenèse.*

# Annexe A

# Cellules souches et progéniteurs neuraux du SNC

L'engouement scientifique et politique qui entoure les cellules souches (*stem cells*, SC) du SNC repose sur les grandes perspectives d'applications thérapeutiques envisagées (conférence Ens, Axel Kahn). Cette exaltation ne peut se soustraite à l'éthique, mais les possibilités des cellules souches ravivent d'ores et déjà les espoirs de régénération du corps, rappelant le mythe du phénix (pour lecture « Le secret de la Salamandre »A. Kahn et F. Papillon).

Avec la découverte et la caractérisation de l'hématopoïèse, débute la description des premières cellules souches (Till and McCulloch, 1961; Wu *et al.*, 1967). La notion de SC est définie alors par le fait que cette petite population de cellules soit capable de répondre à trois critères : (i) elles sont capables d'autorenouvellement, (ii) elles peuvent être maintenues en culture pour une durée quasi illimitée, (iii) elles sont capables, lorsqu'elles sont cultivées clonalement, de générer des cellules précurseurs capables de générer tous les types cellulaires présents dans le tissu d'origine (Loeffler and Roeder, 2004).

## A.1 Définition d'une cellule souche

Avant de décrire les processus qui régissent les cellules souches neuronales, il est important de revenir sur quelques définitions que nous utiliserons par la suite. Cette démarche est animée non seulement par un souci de compréhension car « ce que l'on conçoit bien s'énonce clairement »(Boileau) mais aussi par un souci d'exactitude car certains termes diffèrent selon les champs biologiques et les auteurs (Potten and Loeffler, 1990; Smith, 2006).

Le terme de cellules souches désigne des cellules activement prolifératives non déterminées qui, d'une part, peuvent donner des cellules spécialisées selon leurs

potentialités (déterminisme ou spécification) et, d'autre part, peuvent virtuellement se renouveler indéfiniment (autorenouvellement).

L'autorenouvellement représente un cycle de division qui se réitère, générant des cellules filles équivalentes à la cellule mère avec des capacités latentes de différenciation. C'est l'une des propriétés qui définit les cellules souches. La potentialité d'une cellule représente l'ensemble des engagements potentiels d'une cellule, *i.e.* toutes les différenciations cellulaires possibles pour une cellule donnée. La potentialité d'une cellule peut être classée selon l'ampleur des engagements potentiels de cette cellule. Plus grande est la potentialité d'une cellule, moins est restreint son potentiel d'engagement. Les potentialités cellulaires sont classées ici par ordre décroissant.

- Une cellule est **totipotente** lorsqu'elle est suffisante pour former un organisme entier. La totipotence est observée dans les cellules du zygote et les cellules du méristème des plantes, mais non démontrée pour les cellules souches des vertébrés. Ainsi le zygote (oeuf fécondé) et peut être aussi les cellules de l'embryon au stade 2 à 8 cellules (ceci reste contreversé), peut fournir les 200 catégories de cellules du corps.
- Est **pluripotente**, une cellule dont la capacité est de former toutes les lignées cellulaires du corps, incluant les cellules germinales et quelques mais pas tous les types cellulaires embryonnaires (*e.g.* les cellules souches embryonnaires).
- Les cellules **multipotentes** sont capables de former une multitude de lignées cellulaires qui constituent les tissus (*e.g.* cellules souches hématopoïétiques). Le plus souvent ce terme décrit les cellules donnant naissance aux cellules dérivées des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme et ectoderme voir chapitre précédent).
- Les cellules **oligopotentes** peuvent former plus de deux lignées cellulaires d'un tissu (*e.g.* les cellules souches neurales (NSC) peuvent créer toutes les sous-populations du cerveau, et peut être des cellules d'autres tissus mais ceci reste controversé. Certains auteurs caractérisent donc les NSC comme multipotente).
- Les cellules **unipotentes** ne forment qu'une seule lignée cellulaire (*e.g.* les cellules souches spermatogoniales).

Par conséquent, il existe différents types de cellules souches plus ou moins capables de générer d'autres cellules selon le stade de développement et selon leur tissu d'origine. Ces cellules semblent donc être soumises à la régulation de signaux spatiaux-temporels spécifiques qui régissent l'architecture corporelle.

## A.2 Cellule souche, progéniteur, précurseur

Il existe une hiérarchie précise dans les cellules prolifératives basées sur leurs niveaux d'engagement. Les cellules souches, les progéniteurs, les précurseurs diffèrent selon leur activité de prolifération, leurs potentialités, leurs phénotypes et leurs fonctions spécifiques.

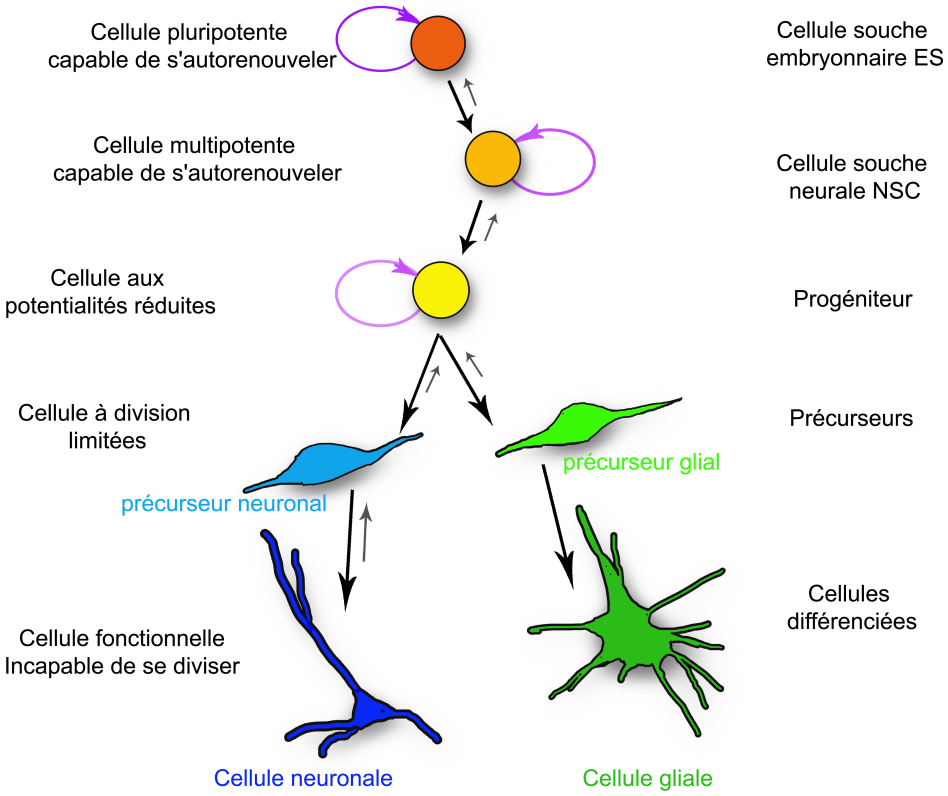



**Fig. A.1** – *Spécification des cellules du système nerveux central.* La potentialité des cellules se restreint au fur et à mesure de son engagement. La hiérarchie est présentée ici, les cellules souches ont une potentialité plus élévée que les progéniteurs et les précurseurs qu'elles génèrent

Une cellule souche peut générer soit des cellules filles qui seront elles-mêmes des cellules souches (autorenouvellement), la division mitotique est dite alors symétrique ; soit les cellules filles (ou l'une des cellules filles) s'engageront dans une voie de différenciation en restreignant ses potentialités développementales (précurseurs). La division est dite alors asymétrique. La division asymétrique génère donc une différence dans les destins de la progéniture issue d'une même mitose. Ainsi l'orientation de la division peut prédisposer la cellule selon différents micro-environnement ou déterminants intrinsèques qui ségrégent de façon inégale dans les cellules. Cette division se produit dans beaucoup mais pas toutes les cellules souches ainsi que dans certains progéniteurs cellulaires. Les cellules issues de mitoses asymétriques peuvent proliférer avant de se différencier, elles sont donc souvent appelées *transit amplifying cells* ou cellules d'amplification transitoire (Fig. A.1) termes de précurseurs et de progéniteurs sont généralement interchangeables mais certains auteurs utilisent « progéniteur »pour faire référence à des cellules qui ont de plus grandes potentialités développementales que les « précurseurs ».

La distinction en termes de biologie cellulaire entre cellule souche et progéniteur/précurseur n'est pourtant pas toujours très claire. Les notions d'autorenouvellement et de potentialité sont des caractéristiques *in fine*.

## A.3 Concepts de déterminisme, de spécification et de différenciation cellulaire

Le déterminisme est une notion philosophique selon laquelle chaque évènement est déterminé par un principe de causalité scientifique qui fonde le caractère prédictif des événements et non prédéterminé. Ce concept gouverne un nombre fini d'éléments (exemple du boulet de canon). Etant donné que le devenir d'une cellule dépend du caractère déterministe de son génome (pour lecture « la part des gènes »de M. Morange) mais est aussi imposée et dépendant des interactions avec son environnement, le concept de spécification semble être plus approprié. La spécification cellulaire est le processus selon lequel une cellule subit une restriction de ses potentialités développementales. Ceci correspond au choix de l'identité cellulaire (*cell fate choice*). Nous utiliserons le terme « spécification »plutôt que « déterminisme »en raison de la connotation d'irréversibilité du déterminisme.

L'engagement (*commitment*) d'une cellule détermine le processus qui l'oblige à suivre une voie de différenciation spécifique. Pour une cellule souche, ceci consiste à sortir de l'autorenouvellement. L'engagement des cellules vers une voie de différenciation résulte de la combinatoire de différentes voies de signalisation distinctes et chaque type de cellules souches possède des caractéristiques précises. Par exemple, les cellules souches mésenchymateuses s'autorenouvellent puis se différencient tandis que les NSC s'autorenouvellent et se différencient en présence ou non de facteurs de croissance comme le EGF (*epidermal grwth factor* et le FGF *fibroblast growth factors*). Les mécanismes de l'autorenouvellement sont communs à certaines cellules souches, impliquant pour les NSC, les voies SHH (*Sonic Hedgehog*) et NOTCH dans le maintien des potentialités.

La différenciation cellulaire (maturation) est le processus par lequel les cellules se spécialisent en un type cellulaire spécifique. La morphologie d'une cellule peut changer radicalement durant la différenciation, mais le matériel génétique reste le même, à quelques exceptions près. Le processus de différenciation cellulaire est caractérisé par l'apparition de « marqueurs de différenciation », spécifiques à chaque lignage cellulaire et à l'état de maturité de la cellule, correspondant à leurs fonctions physiologies finales. Certains auteurs utilisent le terme de « différenciation »pour définir un changement du programme d'expression génique, certains gènes ne pouvant plus être transcrits alors que d'autres pourront l'être, définition que nous appliqueront au terme de « spécification ». Au fur et à mesure que les cellules se différencient, leur potentialité (nombre de types cellulaires qu'elles peuvent produire) diminue, d'où le nom de spécialisation. Cependant il existe des phénomènes de dédifférenciation par lesquels des cellules relativement spécialisées peuvent redevenir moins spécialisées.

La spécification des cellules souches n'est pas irréversible. Dans le système nerveux, il a été démontré *in vitro* que des populations de précurseurs d'oligodendrocytes pouvaient retrouver les caractéristiques de cellules souches neurales (Kondo and Raff, 2000). D'autre part, certains neurones et astrocytes de la zone sous-ventriculaire ont la capacité de se

convertir en cellules souches neurales *in vivo* et *in vitro* (Doetsch *et al.*, 2002). L'environnement des cellules semble déterminer les potentialités cellulaires spécifiques notamment des cellules souches. La niche englobe ce microenvironnement cellulaire à condition qu'il apporte le maintien et les stimuli nécessaires à l'autorenouvellement des NSC (Wagers and Weissman, 2004; Smith, 2006).

Lorsque un type cellulaire change pour donner un type de cellule normalement présent dans un autre lignage cellulaire, on parle de plasticité cellulaire, de métaplasie, de changement de lignage ou de transdifférenciation (Tosh and Slack, 2002). La plasticité des cellules souches est une notion improuvée qui permet à des cellules souches de répondre en changeant leurs potentialités selon l'environnement cellulaire (Smith, 2006). Il a été montré que les cellules souches neurales, préparées à partir de cerveaux adultes de souris et transplantées, ont la possibilité de générer des cellules sanguines (Bjornson *et al.*, 1999). Certains travaux (Morshead *et al.*, 2002) semblent montrer que les rares transdifférenciations observées seraient dues à des altérations génétiques ou des fusions cellulaires spontanées ce que contredit d'autres travaux qui démontrent que la transdifférenciation des cellules souches neurales vers le lignage endothélial est possible (D'Amour and Gage, 2002; Wurmser *et al.*, 2004). Ainsi la dédifférenciation semble être possible mais la transdifférenciation reste controversée.

Trois catégories de cellules souches se distinguent, les cellules souches embryonnaires, les cellules souches foetales et les cellules souches adultes. L'étude présentée dans ce manuscrit se focalise sur les cellules issues du cortex, essentiellement sur les cellules souches foetales neurales NSC.

# Annexe B

# Revues

# Heat Shock Factors at a Crossroad between Stress and Development

MALIN ÅKERFELT[a], DIANE TROUILLET[b] VALÉRIE MEZGER[b] AND LEA SISTONEN[a]

*[a]Turku Centre for Biotechnology and Department of Biology, Åbo Akademi University, 20520 Turku, Finland; [b]Biologie Moléculaire du Stress, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR8541, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, France.*

**ABSTRACT: Organisms must be able to sense and respond rapidly to changes in their environment in order to maintain homeostasis and survive. Induction of heat shock proteins (Hsps) is a common cellular defence mechanism for promoting survival in response to various stress stimuli. Heat shock factors (HSFs) are transcriptional regulators of Hsps, which function as molecular chaperones in protecting cells against proteotoxic damage. Mammals have three different HSFs which have been considered functionally distinct; HSF1 is essential for the heat shock response and is also required for developmental processes, whereas HSF2 and HSF4 are important for differentiation and development. Specifically, HSF2 is involved in corticogenesis and spermatogenesis, and HSF4 is needed for maintenance of sensory organs, such as the lens and the olfactory epithelium. Recent evidence, however, suggests a functional interplay between HSF1 and HSF2 in the regulation of *Hsp* expression under stress conditions. In lens formation, HSF1 and HSF4 have been shown to have opposite effects on gene expression. In this chapter, we present the different roles of the mammalian HSFs as regulators of cellular stress and developmental processes. We highlight the interaction between different HSFs and discuss the discoveries of novel target genes in addition to the classical *Hsp*s.**

**KEYWORDS: Heat shock factor; heat shock response; corticogenesis; spermatogenesis; transcription**

Address for correspondence: Lea Sistonen, Ph.D., Turku Centre for Biotechnology, P.O. Box 123, FI-20521 Turku, Finland. Phone: +358-2-333-8028. FAX: +358-2-333-8000. E-mail: lea.sistonen@btk.fi

## THE MAMMALIAN HEAT SHOCK FACTOR FAMILY

The eukaryotic heat shock response (HSR) is mediated by a positive control element, the heat shock element (HSE), which is present in multiple copies upstream of the *Hsp* genes. The first evidence for a factor that could interact with the HSE originated from studies of protein-DNA interactions in *Drosophila* cell nuclei.[1] An activator protein, named heat shock factor (HSF), was identified to specifically bind to the HSE and regulate the *Hsp* expression upon stress stimulation. Since then efforts from a large number of investigators have shown that the HSR is conserved in all organisms from yeast to plants and animals. In yeast, fruit fly and nematode, only a single HSF exists, whereas in vertebrates and plants, the HSF family consists of several members.[2,3] HSF1 and HSF2 exist in all vertebrates, while HSF3 is specific for avian species and HSF4 for mammals.[4] HSF1 was originally identified as the transcriptional regulator of the HSR and has been most extensively investigated in mammals. HSF1 is activated in response to elevated temperatures, exposure to oxidants, heavy metals, and bacterial or viral infections, and genetic studies indicate that no other HSF is able to compensate for HSF1 in the HSR.[5-7] HSF2 is known to be involved in development and differentiation-related processes such as spermatogenesis and corticogenesis in mice and hemin-mediated differentiation of human K562 erythroleukemia cells.[8-14] No stress-related functions have been shown for HSF4, but its importance in lens formation and maintenance of olfactory epithelium has been well documented.[15-17]

HSF activation is a multistep process, including trimerization, localization to the nucleus, and binding to DNA. Several inducible post-translational modifications (PTMs), such as phosphorylation and sumoylation, are involved in regulation of the transactivation capacity of HSF1.[18-21] Upon activation HSF1 undergoes a transition from monomer to trimer,[22,23] whereas HSF2 undergoes a transition from dimer to trimer.[9] Similar to most transcriptional regulators, HSFs are composed of different functional domains, of which the DNA-binding domain (DBD) is best preserved (Fig. 1.).[21,23] HSFs bind to DNA where each DBD recognizes the HSE in the major groove of the double helix.[23] HSEs are highly conserved consisting of multiple inverted repeats of the pentameric sequence nGAAn.[24] The promoters of HSF target genes can also have more than one HSE, thereby allowing simultaneous binding of multiple HSFs. HSF binding to an HSE occurs in a cooperative manner, where binding of one HSF trimer facilitates the binding of the next.[25] Trinklein and colleagues confirmed the finding of Xiao and Lis, identifying guanines to be the most conserved nucleotides within the HSEs.[26,27] In addition to typical HSEs, binding of HSF1 to a discontinuous type of HSE was recently observed *in vitro*.[28] These results suggest that both the nucleotides and the spacing of the repeated units are critical determinants for recognition by HSFs and transcriptional activation.

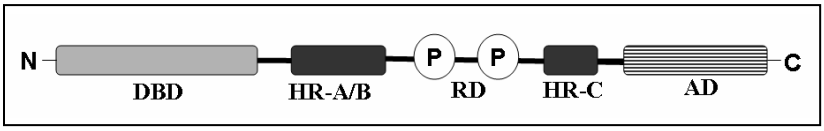



**FIGURE 1.** The functional domains of HSF1. DBD: DNA-binding domain, HR-A/B and HR-C: Hydrophobic heptad repeats, RD: Regulatory domain, AD: Activation domain, P: Post-translational modifications (PTMs). Note that PTMs occur also within other functional domains than RD.

## HSFs AS CELLULAR STRESS REGULATORS

HSF1 is the *bona fide* stress-responsive prototype in mammals. *Hsf1* knockout mouse models have demonstrated that HSF1 is required as a transcriptional activator of *Hsp* genes during the HSR. Moreover, HSF1 is critical for maintaining cellular integrity during stress, since cells from *Hsf1*$^{-/-}$ mice lack the ability to develop thermotolerance.[5-7,29] In contrast, the role of HSF2 in the HSR was not revealed until very recently.[14] *Hsf2*-null mice are viable and have no gross defects in the HSR, but several reports have proposed that HSF2 could contribute in the transcriptional regulation through interplay with HSF1.[10-12,14,30-32]

### *Functional interaction between HSF1 and HSF2*

Using chromatin immunoprecipitation (ChIP), binding of both HSF1 and HSF2 was detected on *Hsp* promoters upon heat shock and hemin treatment (TABLE 1.).[14,27] Further studies using both knockdown and knockout strategies elucidated that during stress, HSF2 is recruited to the *Hsp70* promoter only in the presence of HSF1 and that this cooperation requires an intact HSF1 DBD.[14] Importantly, gene expression analyses showed that HSF2 is able to modulate the HSF1-mediated inducible expression of *Hsp*s and reintroduction of HSF2 into *Hsf2*$^{-/-}$ fibroblasts potentiated the expression of major *Hsp* genes. In addition, individual targets were differently regulated, depending on stimuli. These findings indicate that HSF2, in contrast to the previous model, actively participates in the transcriptional regulation of the HSR.[14] HSF2 has also been reported to regulate the chromatin structure of the *Hsp70* promoter during mitosis,[33] and it will be interesting to find out whether HSF1, possibly through interplay with HSF2, would participate in bookmarking. HSF1 and HSF2 were also found to interact during proteasome inhibition, and both factors bound to the c*lusterin (Clu)* promoter in such stress conditions.[32] Since the HSE located on the *Clu* promoter contains only three pentamers, HSF1 and HSF2 binding as a heterocomplex is an intriguing possibility.

**TABLE 1. Mammalian HSF target genes identified *in vivo***

| DNA-binding factor | Target gene promoter | Reference |
|---|---|---|
| HSF1 and HSF2 | *Hsp*s | 27 |
| HSF1 and HSF2 | *Hsp70.1* and *Hsp25.1* | 14 |
| HSF1 and HSF2 | *Clu* | 32 |
| HSF1 | *Il-6* | 34 |
| HSF4 | *Crygf* | 16 |
| HSF1 and HSF4 | *Fgf7* | 16 |
| HSF1 and HSF4 | *Lif* | 17 |
| HSF2 | *p35* | 13 |

Apart from target gene promoters, HSF1 concentrates rapidly upon stress into nuclear stress bodies (nSBs). nSBs form on specific chromosomal loci, mainly q12 of human chromosome 9, where HSF1 binds to a subclass of satellite III repeats.[35,36] Stress-inducible HSF1-dependent transcription of the satellite III repeats, originating from the 9q12 locus, has been shown to produce non-coding RNA molecules, whose functions remain to be established.[37] Intriguingly, HSF2 was also found to localize in nSBs in HeLa cells exposed to heat stress.[38] Upon heat shock, HSF1 and HSF2 co-localize in the nSBs,[39] and an interaction between HSF1 and HSF2 during both control and heat shock treatment has been detected,[31,39] suggesting a possible functional interplay between the two transcription factors. Further studies are required to determine whether HSF2 functions as a modulator of HSF1-mediated transactivation of other targets than *Hsp*s, including satellite III repeats, and whether competition between HSFs is a common phenomenon in the regulation of their target gene expression.

### *HSF1 in the immune response*

*Hsf1* knockout mice display a significantly impaired T cell-dependent B cell response.[34] Transcriptional profiling of *Hsf1*$^{-/-}$ fibroblasts has revealed that HSF1, in addition to *Hsp* genes, regulates immunologically important genes. In mouse spleen cells, HSF1 was found to directly bind to the *Il-6* gene (TABLE 1.),[34] coding for a pro-inflammatory cytokine secreted by T cells to stimulate an immune response and is required for B cell differentiation.[40] In response to immunization with sheep red blood cells, the *Hsf1*-deficient mice showed 50% lower production of immunoglobulins, especially IgG2a. These results unravelled a novel molecular link between HSF1 and a gene related to immune response and inflammation.[34]

The nematode *C. elegans* has evolved an immune system, which is excellent for studying the effect of elevated temperatures on immunity. Upon heat shock the worms become more resistant to bacterial pathogens. The enhanced resistance requires HSF1-mediated activation of Hsp90 and small Hsps, effectors of the immune protection.[41] In addition, the HSF1 defence

pathway interacts with the insulin/IGF-1 signaling pathway, including FOXO transcription factor DAF-16 and its upstream receptor DAF-2 that are known to affect aging and immunity in *C. elegans.*[41-43] These findings indicate that HSF1 has multiple ways of regulating the immune system.

## HSFs AS DEVELOPMENTAL REGULATORS

A developmental role for HSFs was introduced when the *Drosophila* HSF was found to be required for early larval development and oogenesis.[44] Surprisingly, these developmental effects were not mediated by *Hsp* gene expression, which is consistent with the subsequent studies showing that basal *Hsp* expression during mouse embryonic development is not affected by the lack of HSF1.[6] Gene inactivation studies in mice have revealed functions beyond the HSR and demonstrated roles in embryonic development, reproduction, cortical lamination, lens development, and maintenance of olfactory epithelium.[10,11,13,16,17,30,45] A major challenge is to establish the genes that are directly controlled by HSFs, and most importantly, the processes where these gene products play a key role.

### *HSF1 – a maternal factor*

Mice lacking HSF1 can survive to adulthood but they exhibit multiple defects, including placental insufficiency, prenatal lethality, growth retardation, and female infertility.[6] In developing *Hsf1*$^{-/-}$ embryos, no extensive defects were evident and no changes were detected in the expression of *Hsp70*, which is the earliest sign of zygotic genome activation. In contrast, an abnormal architecture of the placenta was observed at E11.5, suggesting that the prenatal lethality was due to failure in the extra-embryonic tissue. No fertilized oocytes developed past the zygotic stage when *Hsf1*$^{-/-}$ females were mated with wildtype males. These results demonstrate that HSF1 is a maternal factor, essential for early post-fertilization development.[46] Disturbed control by maternal HSF1 during oogenesis or in the initiation phase of embryogenesis could therefore be associated with infertility in mammals.

### *HSF1 and HSF4 interplay in sensory organs*

Little was known about the physiological function of HSF4 before a genetic study by Bu and coworkers showed that inherited cataract in certain Chinese and Danish families was associated with a mutation in the DBD of HSF4.[47] The phenotype of *Hsf4*-null mice supports an important role for HSF4 in lens formation; although *Hsf4* knockout mice displayed normal lens development during embryogenesis, abnormalities in the lens appeared soon

after birth and the mice developed cataract by six weeks of age.[16,45] *Hsf4*$^{-/-}$ lens fiber cells were abnormal containing inclusion-like structures, probably due to a reduction in the expression of *γ-crystallin* gene family members. HSF4 was found to directly bind and regulate the *γF-crystallin (Crygf)* gene.[16] Binding of HSF1 and HSF4 to the *Fgf7* promoter showed opposite effects on gene expression, i.e. repression by HSF4 and activation by HSF1, providing evidence for a competition between these two HSFs during mouse lens development (TABLE 1.).[16] This finding is the first example of an interplay between two different mammalian HSFs in development.

During early post-natal period the *Hsf1*$^{-/-}$ mice display severe atrophy of the olfactory epithelium, increased cell death of olfactory sensory neurons and increased expression of the *Lif* gene.[17] In contrast, this phenotype is alleviated to some extent in the *Hsf4*$^{-/-}$ olfactory epithelium. A similar interplay between HSF1 and HSF4 as detected during lens formation, also occurs on the *Lif* promoter in the olfactory epithelium (TABLE 1.).[16,17] HSF1 and HSF4 are required for the maintenance of different sensory organs, the lens and the olfactory epithelium, specifically when these organs are exposed to environmental stimuli for the first time after birth.[16,17] The increased sensitivity of these organs may be partly due to the altered expression of *Crygf, Fgf7* and *Lif*. In addition, decreased levels of *Hsp25, Hsp70* and *Hsp90* were observed in *Hsf1*$^{-/-}$ olfactory epithelium, and *Hsf4*-deficient lens fiber cells had compromised expression of *Hsp25*. The results suggest that the preservation of the protein homeostasis by Hsps could be an important determinant in sensory organ maintenance.[16,17] Although these gene inactivation studies mainly focused on the cooperative and competitive roles of HSF1 and HSF4, it is also possible that HSF2 might have a function in the neuronal part of retinal formation, due to similar expression patterns.[48]

### *HSFs in brain development*

During rodent brain development, HSF2 is highly expressed in the neuroepithelium, with nuclear localization in the developing neural tube, and HSF2 DNA-binding activity can be detected in cortex, striatum, olfactory bulbs and mesencephalon before birth (Y. Chang's unpublished results).[10,11,13,49-51] In the mouse, HSF2 is expressed in the proliferative neuronal progenitors of the ventricular zone. In addition, HSF2 expression is detected in the cortical plate, when the most superficial layers of cortex are being established.[10,50] HSF2 expression and activity profiles implicate a major role for HSF2 as a transcriptional regulator in development of fore- and midbrain, and possibly also in cerebellum.

*Hsf2* inactivation studies have been performed by three different laboratories.[10,11,30] In all three cases, *Hsf2*-null mice did not display any overt morphological abnormalities. While one laboratory did not observe any brain phenotype in adult mice,[30] embryonic brain defects were reported by the two

others groups.[10,11] Adult brains displayed enlarged ventricles and reduction of hippocampus and striatum, as well as in the width of the cortex. In addition, prominent abnormalities in the central nervous system (CNS), with collapse of the ventricular systems and hemorrhages in cerebral regions at early stages, were detected.[10,11] HSF2 was also found to be involved in later brain development, in the migration phase of newborn cortical neurons.[13] When migrating, cortical neurons receive migration inputs, such as Reelin secreted from Cajal-Retzius cells, and the neurons benefit from architectural guides provided by radial glia cell fibers, which extend all the way from the ventricular zone to the marginal zone.[52] In the absence of HSF2, a reduced number of radial glia and Cajal-Retzius cells, together with disturbances in the Reelin signaling cascade, were observed.[13] Moreover, the expression of p35, which is an activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) and essential for radial migration,[52] was found to be dependent on the amount of HSF2.[13] As demonstrated *in vivo* by ChIP experiments, HSF2 directly bound to the promoter of *p35*, which was thereby identified as the first HSF2 target gene in development (TABLE 1.).[13] In the light of present knowledge, HSF2 could function as a fine tuner of gene expression, required for correct neuronal positioning in superficial layers in the developing cortex. The role of HSF2 in cortical development is unlikely to be restricted only to the late phase of migration, as HSF2 also is expressed at high levels in the cells of the neuroepithelium and neuronal progenitors in the ventricular zone (D. Trouillet's unpublished results).[10,11] It is plausible that HSF2 participates in the regulation of neuronal proliferation, which is well in line with defects observed in the early CNS of *Hsf2*-null mice.[11]

Although no substantial data on the role of HSF1 in brain development is currently available, HSF1 has been implicated in maintainance of the post-natal brain under non-stressed conditions.[53] In accordance with *Hsf2*-null mice, *Hsf1* disruption resulted in enlarged ventricles. Moreover, astrogliosis and neurodegeneration occurred in specific areas.[53] Interestingly, the expression levels of *Hsp27* and *αB crystallin*, which protect cells against stress and apoptosis, were decreased in *Hsf1* knockout brain regions. Since *Hsf1*$^{-/-}$ embryonic brains are still normal at E18.5, the abnormalities probably originate from a later stage in the perinatal and post-natal development.[6]

### *HSFs in spermatogenesis*

HSFs have been found to be involved in the regulation of gametogenesis in both genders.[10-12,46,54,55] In males, experimental evidence reveals a critical function for both HSF1 and HSF2 in germ cell production. A constitutively active form of HSF1 caused disruption of spermatogenesis and death of pachytene spermatocytes.[54] Although *Hsf1*$^{-/-}$ mice are fertile and exhibit normal spermatogenesis, decreased heat-induced elimination of the pachytene spermatocytes was observed, which is an opposite effect to that detected in HSF1-overexpressing mice.[55] In general, mutations affecting

spermatogenesis result in apoptosis at the pachytene stage,[56] and HSF1 is activated at this specific stage, which could be a marker for accumulation of damaged proteins and a signal to induce cell death.[55]

*Hsf2* deficiency resulted in reduced size of testis, increased apoptosis and decreased sperm count.[10,11] Severe disruption and vacuolization of the seminiferous tubules were observed, reflecting the absence of differentiating spermatocytes and spermatids. At the late pachytene stage, up to 90% of spermatocytes were dead. Furthermore, in the *Hsf2*$^{-/-}$ pachytene spermatocytes, the synaptonemal complex, which forms an axis of paired chromosomes, was often disorganized showing an abnormal loop-like structure between pairs of homologous chromosomes.[10] Disruption of both *Hsf1* and *Hsf2* caused a more severe phenotype associated with male sterility and a potentiation of the phenotype seen in *Hsf2*$^{-/-}$ mice, suggesting that transcriptional activity of both factors is required for normal spermatogenesis.[12] Global expression analyses in testis of double knockout mice, demonstrated changes in expression patterns of genes involved in spermatogenesis.[12] Together these observations strongly suggest that the activities of HSF1 and HSF2 are tightly intertwined during spermatogenesis. Identification of the direct target genes is a prerequisite for understanding the physiological functions of HSFs in testis.

## FUTURE PERSPECTIVES

Previously, HSFs were identified solely as regulators of *Hsp*s, whereas now there is unambiguous evidence for HSFs having a great variety of target genes (TABLE 1.). In *S. cerevisiae* and *Drosophila*, about 3% of the genomic loci were identified as targets for HSF upon heat stress.[57,58] The existence of multiple HSFs in higher eukaryotes with different expression patterns, suggests that they may have functions that are triggered by distinct stimuli, leading to activation of specific target genes. The *Hsf* knockout mice have rendered the possibility of identifying novel targets. However, a challenging genome-wide ChIP-microarray approach to investigate *in vivo* targets of mammalian HSFs could uncover entirely novel gene clusters, pathways and functions for these transcription factors. This approach would most certainly broaden the current view of HSFs.

The functional relationship between different HSFs, both in cell stress and in developmental processes, is of great interest, and a novel dimension of the cooperation between HSFs is emerging. Synergy of DNA-binding activities among different transcription factors offers an efficient way to control gene expression in a cell- and stimulus-specific manner. By interacting with distinct partners and responding to both stress and developmental stimuli, HSFs could orchestrate differential gene regulation. It will be intriguing to elucidate whether HSF-mediated regulation depends on the activity of individual trimers, or whether homo- or heterotrimer formation is a common theme in HSF-mediated transcription (Fig. 2.). Obvious

questions for future studies are the stoichiometry between HSF1 and HSF2 in a possible complex and the mechanism by which the factors interact with each other. Given the slightly different binding preferences of HSF1 and HSF2,[2] the composition of the HSE on the target promoter could direct the formation of a specific heterocomplex. Sequence variations of the HSE, in a specific chromatin environment determined by histone modifications, could be an efficient way of regulating the DNA-binding ability of HSFs.

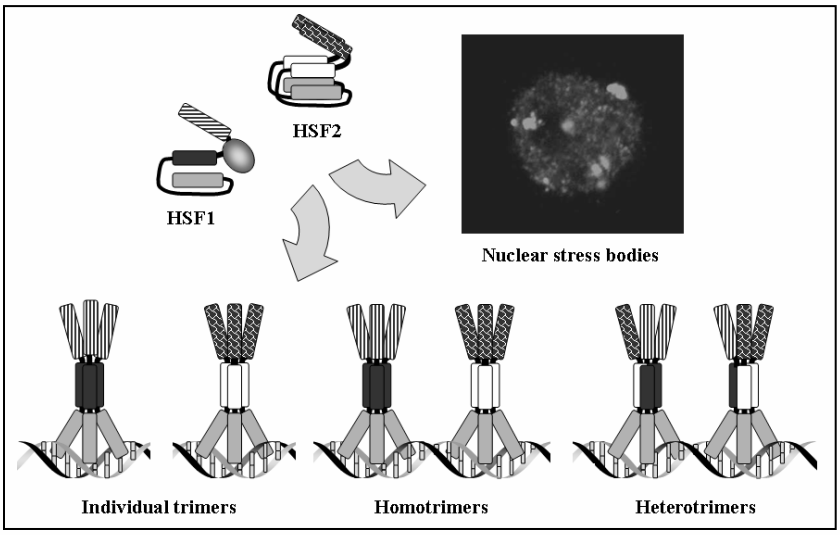



**FIGURE 2.** Activation and complex formation of HSF1 and HSF2 on the DNA. Inactive HSF1 is kept as a monomer, whereas HSF2 is a dimer. Upon activation HSFs trimerize and translocate to their target gene promoters and nuclear stress bodies (nSBs) mainly formed on locus 9q12 (confocal microscopy image is a courtesy of Anton Sandqvist). The possible composition of HSF trimers, either individual, or combined homo- and heterotrimers, on the DNA is displayed in the figure.

It is not exactly known how the cells sense stress. The correlation between longevity and stress resistance suggests that the ability to sense and respond to environmental challenges is important for the regulation of life span. Results from several groups indicate a direct role for HSF1 in the regulation of life span.[42,43,59] Interestingly, down-regulation of HSF1 leads to both decreased life span and an accelerated aging phenotype in *C. elegans*. Recent discoveries demonstrate that a mutation conferring longevity also delays polyQ aggregation and toxicity, suggesting a link between the regulation of aging and aging-related diseases. Inactivation of *Daf-16*, *Hsf* or small *Hsp*s, accelerates the aggregation of polyQ expansion proteins in *C.*

*elegans*.[42,43] Correspondingly, human diploid fibroblasts show attenuated heat-inducible HSF1 DNA-binding activity and a decrease in Hsps upon aging.[60] These findings support a model where HSF1 is a key molecule for coupling the regulation of life span with the ability of cells to sense stress. Many pathologies in humans are associated with stress, age and expression of misfolded proteins, and several HSF-targeted therapeutic strategies have already been proposed. Small molecular regulators of the HSF activity have been identified and will be valuable tools for discovering novel therapies.[61] The functional interplay between different mammalian HSFs emphasize that great consideration is required when planning future HSF-targeted therapies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We apologize to our colleagues whose original work could only be cited indirectly due to space limitations. Members of our laboratories are acknowledged for valuable comments on the manuscript. Our own work is supported by The Academy of Finland, Sigrid Jusélius Foundation, The Finnish Life and Pension Insurance Companies, The Finnish Cancer Organizations, Åbo Akademi University, The Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC #3609, #3997), and The Agence Nationale pour la Recherche (ANR Neurosciences). M. Åkerfelt is supported by the Turku Graduate School for Biomedical Sciences (TuBS), and D. Trouillet by The French Ministry of Research and Technology and by ARC.

## REFERENCES

1. WU, C. 1984. Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. Nature **311:** 81-84.
2. PIRKKALA, L., P. NYKÄNEN and L. SISTONEN. 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. FASEB J. **15:** 1118-1131.
3. NOVER, L., K. BHARTI, P. DORING, *et al.* 2001. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: How many heat stress transcription factors do we need? Cell Stress Chap. **6:** 177-189.
4. NAKAI, A. 1999. New aspects in the vertebrate heat shock factor system: Hsf3 and Hsf4. Cell Stress Chap. **4:** 86-93.
5. MCMILLAN, D.R., X. XIAO, L. SHAO, *et al.* 1998. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. J. Biol. Chem. **273:** 7523-7528.
6. XIAO, X., X. ZUO, A.A. DAVIS, *et al.* 1999. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. EMBO J. **18:** 5943-5952.
7. ZHANG, Y., L. HUANG, J. ZHANG, *et al.* 2002. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible hsp molecular chaperones. J. Cell. Biochem. **86:** 376-393.

8. SISTONEN, L., K.D. SARGE, B. PHILLIPS, *et al.* 1992. Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. Mol. Cell. Biol. **12:** 4104-4111.
9. SISTONEN, L., K.D. SARGE and R.I. MORIMOTO. 1994. Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. Mol. Cell. Biol. **14:** 2087-2099.
10. KALLIO, M., Y. CHANG, M. MANUEL, *et al.* 2002. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. EMBO J. **21:** 2591-2601.
11. WANG, G., J. ZHANG, D. MOSKOPHIDIS, *et al.* 2003. Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. Genesis **36:** 48-61.
12. WANG, G., Z. YING, X. JIN, *et al.* 2004. Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. Genesis **38:** 66-80.
13. CHANG, Y., P. ÖSTLING, M. ÅKERFELT, *et al.* 2006. Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression. Genes Dev. **20:** 836-847.
14. ÖSTLING, P., J.K. BJÖRK, P. ROOS-MATTJUS, *et al.* 2007. Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. J. Biol. Chem. **282:** 7077-7086.
15. NAKAI, A., M. TANABE, Y. KAWAZOE, *et al.* 1997. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. Mol. Cell. Biol. **17:** 469-481.
16. FUJIMOTO, M., H. IZU, K. SEKI, *et al.* 2004. HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. EMBO J. **23:** 4297-4306.
17. TAKAKI, E., M. FUJIMOTO, K. SUGAHARA, *et al.* 2006. Maintenance of olfactory neurogenesis requires HSF1, a major heat shock transcription factor in mice. J. Biol. Chem. **281:** 4931-4937.
18. HOLMBERG, C.I., S.E.F. TRAN, J.E. ERIKSSON, *et al.* 2002. Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. Trends Biochem. Sci. **27:** 619-627.
19. HIETAKANGAS, V., J.K. AHLSKOG, A.M. JAKOBSSON, *et al.* 2003. Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. Mol. Cell. Biol. **23:** 2953-2968.
20. HIETAKANGAS, V., J. ANCKAR, H.A. BLOMSTER, *et al.* 2006. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103:** 45-50.
21. ANCKAR, J. and L. SISTONEN. 2007. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. Adv. Exp. Med. Biol. **594:** 78-88.
22. SORGER, P.K. and H.C.M. NELSON. 1989. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. Cell **59:** 807-813.
23. WU, C. 1995. Heat shock transcription factors: Structure and regulation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **11:** 441-469.
24. AMIN, J., J. ANANTHAN and R. VOELLMY. 1988. Key features of heat shock regulatory elements. Mol. Cell. Biol. **8:** 3761-3769.
25. XIAO, H., O. PERISIC and J.T. LIS. 1991. Cooperative binding of drosophila heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. Cell **64:** 585-593.
26. XIAO, H. and J.T. LIS. 1988. Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. Science **239:** 1139-1142.

27. TRINKLEIN, N.D., W.C. CHEN, R.E. KINGSTON, *et al.* 2004. Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation. Cell Stress Chap. **9:** 21-28.
28. SAKURAI, H. and Y. TAKEMORI. 2007. Interaction between heat shock transcription factors (HSFs) and divergent binding sequences: Different binding specificities of yeast HSFs and human HSF1. J. Biol. Chem. In press.
29. PIRKKALA, L., T-P. ALASTALO, X. ZUO, *et al.* 2000. Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway. Mol. Cell. Biol. **20:** 2670-2675.
30. MCMILLAN, D.R., E. CHRISTIANS, M. FORSTER, *et al.* 2002. Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. Mol. Cell. Biol. **22:** 8005-8014.
31. HE, H., F. SONCIN, N. GRAMMATIKAKIS, *et al.* 2003. Elevated expression of heat shock factor (HSF) 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. J. Biol. Chem. **278:** 35465-35475.
32. LOISON, F., L. DEBURE, P. NIZARD, *et al.* 2005. Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress. implication of HSF1/HSF2 heterocomplexes. Biochem. J. **395:** 223-31.
33. XING, H., D.C. WILKERSON, C.N. MAYHEW, *et al.* 2005. Mechanism of hsp70i gene bookmarking. Science **307:** 421-423.
34. INOUYE, S., H. IZU, E. TAKAKI, *et al.* 2004. Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1. J. Biol. Chem. **279:** 38701-38709.
35. JOLLY, C., L. KONECNY, D.L. GRADY, *et al.* 2002. In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. J. Cell Biol. **156:** 775.
36. DENEGRI, M., D. MORALLI, M. ROCCHI, *et al.* 2002. Human chromosomes 9, 12, and 15 contain the nucleation sites of stress-induced nuclear bodies. Mol. Biol. Cell **13:** 2069-2079.
37. BIAMONTI, G. 2004. Nuclear stress bodies: A heterochromatin affair? Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **5:** 493-498.
38. SHELDON, L.A. and R.E. KINGSTON. 1993. Hydrophobic coiled-coil domains regulate the subcellular localization of human heat shock factor 2. Genes Dev. **7:** 1549-1558.
39. ALASTALO, T-P., M. HELLESUO, A. SANDQVIST, *et al.* 2003. Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of Hsp70. J. Cell Sci. **116:** 3557-3570.
40. HEINRICH, P.C., I. BEHRMANN, S. HAAN, *et al.* 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem. J. **374:** 1-20.
41. SINGH, V. and A. ABALLAY. 2006. Heat-shock transcription factor (HSF)-1 pathway required for *Caenorhabditis elegans* immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103:** 13092-13097.
42. HSU, A.L., C.T. MURPHY and C. KENYON. 2003. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. Science **300:** 1142-1145.
43. MORLEY, J.F. and R.I. MORIMOTO. 2004. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. Mol. Biol. Cell **15:** 657-664.

44. JEDLICKA, P., M.A. MORTIN and C. WU. 1997. Multiple functions of *Drosophila* heat shock transcription factor in vivo. EMBO J. **16:** 2452-2462.
45. MIN, J.N., Y. ZHANG, D. MOSKOPHIDIS, *et al.* 2004. Unique contribution of heat shock transcription factor 4 in ocular lens development and fiber cell differentiation. Genesis **40:** 205-217.
46. CHRISTIANS, E., A.A. DAVIS, S.D. THOMAS, *et al.* 2000. Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. Nature **407:** 693-694.
47. BU, L., Y. JIN, Y. SHI, *et al.* 2002. Mutant DNA-binding domain of HSF4 is associated with autosomal dominant lamellar and marner cataract. Nat. Genet. **31:** 276-278.
48. KWONG, J.M., M. LALEZARY, J.K. NGUYEN, *et al.* 2006. Co-expression of heat shock transcription factors 1 and 2 in rat retinal ganglion cells. Neurosci. Lett. **405:** 191-195.
49. WALSH, D., Z. LI, Y. WU, *et al.* 1997. Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development. Cell Mol. Life Sci. **53:** 198-211.
50. RALLU, M., M. LOONES, Y. LALLEMAND, *et al.* 1997. Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **94:** 2392-2397.
51. MIN, J.N., M.Y. HAN, S.S. LEE, *et al.* 2000. Regulation of rat heat shock factor 2 expression during the early organogenic phase of embryogenesis. Biochim. Biophys. Acta **1494:** 256-262.
52. AYALA, R., T. SHU and L.H. TSAI. 2007. Trekking across the brain: The journey of neuronal migration. Cell **128:** 29-43.
53. SANTOS, S.D. and M.J. SARAIVA. 2004. Enlarged ventricles, astrogliosis and neurodegeneration in heat shock factor 1 null mouse brain. Neuroscience **126:** 657-663.
54. NAKAI, A., M. SUZUKI and M. TANABE. 2000. Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. EMBO J. **19:** 1545-1554.
55. IZU, H., S. INOUYE, M. FUJIMOTO, *et al.* 2004. Heat shock transcription factor 1 is involved in quality-control mechanisms in male germ cells. Biol. Reprod. **70:** 18-24.
56. DE ROOIJ, D.G. and P. DE BOER. 2003. Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. Cytogenet. Genome Res. **103:** 267-276.
57. HAHN, J.S., Z. HU, D.J. THIELE, *et al.* 2004. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. Mol. Cell. Biol. **24:** 5249-5256.
58. BIRCH-MACHIN, I., S. GAO, D. HUEN, *et al.* 2005. Genomic analysis of heat-shock factor targets in *Drosophila*. Genome Biol. **6:** R63.
59. GARIGAN, D., A.L. HSU, A.G. FRASER, *et al.* 2002. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans:* A role for heat-shock factor and bacterial proliferation. Genetics **161:** 1101-1112.
60. LEE, Y.K., D. MANALO and A.Y. LIU. 1996. Heat shock response, heat shock transcription factor and cell aging. Biol. Signals **5:** 180-191.
61. WESTERHEIDE, S.D. and R.I. MORIMOTO. 2005. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. J. Biol. Chem. **280:** 33097-33100.

# Role of HSF2 during forebrain development.

Diane TROUILLET, Valérie MEZGER*

CNRS UMR8541, Laboratoire de Biologie Moléculaire du Stress, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, France

* corresponding author

**Keywords** : Forebrain; Cortex; Transcription factors; Heat Shock Factors.

**Heat Shock Factors: Stress transcription factors in development.**

A large variety of environmental stresses, like temperature elevation, trigger the great conserved heat shock response (HSR)[2,8]. In higher eukaryotes, HSR is characterized by the activation of latent transcription factor HSF, which permit the transcription of genes encoding the conserved chaperone Heat Shock Proteins (HSP)[8]. A multigenic family of Heat Shock Factors (HSF) was characterized in vertebrates, whereas a unique HSF is present in *Drosophila* and *C. elegans*. Three HSF, HSF1, HSF2 and HSF4 are found in mammals[2]. They share a helix-turn-helix DNA-binding domain, recognizing heat shock elements (HSE) in the regulatory region of *Hsp* genes. HSF are not only responsible for the cellular response to environmental proteotoxic stress, but are also involved during development, in particular in the brain development[2]. During development, HSF1 is essential for mouse preimplantation embryogenesis, while mouse HSF4 and HSF1 are required for lens and olfactory epithelium development[2].

*Hsf2* knock-out mice[4,6,12] display meiosis defects and brains abnormalities characterized by enlarged ventricles, reduced cortical width in some areas and reduced hippocampus[4,12]. We have shown that HSF2 is involved in the proliferation of neural progenitors and in the migration of their post-mitotic neuron derivatives.

**HSF2 modulates superficial cortical layers establishment.**

The six-layered mammalian neocortex depends on an inside-out neurogenic waves in which late-produced neurons migrate past earlier-generated neurons to sequencially establish more superficial layers. This contrasts with the development of the reptilian cortex, where cells are positioned in an outside-in manner[5]. Birthdating analysis with Bromo-deoxy-Uridine (BrdU), demonstrated that HSF2 is required for the correct positioning of neurons of the most superficial cortical layers (II and III), but not for the positioning of deeper layers[3].

The originality of HSF2 is to act at different levels of the migration process by affecting cell populations, radial glia and Cajal-Retzus cells that are crucial for radial neuronal migration, and, in addition, by modulating signaling pathways involved in the control of migration within postmitotic neurons. In particular, p35 and p39 levels are reduced by the lack of HSF2. P35, the first HSF2 target gene identified in brain development, and p39 are activators of Cdk5, a kinase essential for correct cortical neuron positioning. In *Hsf2*$^{-/-}$ neocortices, reduced p35 and p39 levels lead to lowered Cdk5 activity[3]. Only late-born cortical neurons require Cdk5/p35 to cross the subplate and reach their final layer destination[1]. Cdk5/p35 activation has been proposed as a key factor in the evolutionary origin of the inside-out neurogenic gradient[1]. Cdk5/p35 pathway could participate in a mechanism that allows migrating cells to bypass the oldest neurons. The control of *p35* and *p39* expression by HSF2, in latest born neurons (layer II and III) might therefore provide a supplemental evolutionary refinement to secure the bypassing of deeper neurons by the most superficial ones.

**Role of HSF2 in specifying superficial layers?**

The highly dynamic expression of HSF2 during brain development is illustrated in figure 1. The ventricular (VZ) and subventricular (SVZ) proliferative zones underlay two-step neurogenesis, which sustains cortical complexity. Interestingly, the dynamic two-step expression of HSF2 during forebrain development parallels neurogenesis. HSF2 appears robustly expressed and active for DNA-binding in the neuroepithelium of the forebrain (Fig. 1A and E)[9]. During the first step of neurogenesis (between E10.5-E14.5), *Hsf2* is restricted to VZ (Fig.1D, H, J). In contrast, a second phase of HSF2 expression at later stages is characterized by the loss of HSF2 in VZ and the appearance of HSF2 in SVZ as well as in upper cortical plate layers (Fig. 1I and K). This pattern corresponds to the emergence of the cortical superficial layers and is reminiscent of the expression of transcription factors such as

*Svet1*, *Cux2* and *Brn1/2* genes, which are expressed by SVZ intermediate progenitors and their derivatives upper cortical layer neurons[10,11,13]. Symmetric divisions of intermediate progenitors in the SVZ have been hypothesized to underline evolutionary cortical expansion[5,7]. We have shown that the absence of HSF2 in *Hsf2*$^{-/-}$ neocortices, as well as the overexpression of HSF2 in chick neural tube, affects the proliferation of neural progenitors. Further more the lack of HSF2 compromises survival, especially in SVZ, and differentiation (D. Trouillet's and Y. Chang's, unpublished results). HSF2 might therefore influence the proliferation of such intermediate SVZ progenitors and might help to control the number of superficial neurons. Further studies are required to determine the precise role of HSF2 in the proliferation in VZ/SVZ, to identify target genes and to unravel neocortical evolution. HSF2 is conserved among vertebrates, human and rodent HSF2 proteins are 94% identical throughout their coding region and show strong similarity with chick (75%) protein (Ensembl data base). The DNA binding domain of mammalian HSF2 displays over 90% identity with *Xenopus* xHSF2 and 87% identity with Zebrafish zHSF2. HSF2 is conserved among vertebrates and expressed in developing brains, which suggests, at least, the conservation of its role in VZ.

Neocortex architecture suggests a precise timing of neural progenitor proliferation and of post-mitotic neuron differentiation/migration[5]. HSF2 transcription factor as a modulator of the migration and proliferation of neural cells, in particular during upper layer establishment. HSF2 might therefore contribute by fine-tuning target gene expression, to shunt between cell cycle regulation and differentiation/migration programmes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marion Wassef and Anne Le Mouël for helpful discussions. This work was supported by grants from Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC#3609 and

#3997) and ANR 2006 “Neurosciences, Neurologie et Psychiatrie ». D.T. was supported by the French Ministry of Research and Technology and by ARC.

REFERENCES

[1] Aboitiz F, Montiel J, Lopez J. An hypothesis on the early evolution of the development of the isocortex. Brain Res Bull. (2002) 57:481-483.

[2] Akerfelt M, Trouillet D, Mezger V, Sistonen L. Heat Shock Factors at a Crossroad between Stress and Development. Ann N Y Acad Sci. (2007) In press.

[3]Chang Y, Ostling P, Akerfelt M, Trouillet D, Rallu M, Gitton Y, El Fatimy R, Fardeau V, Le Crom S, Morange M, Sistonen L, Mezger V. Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression. Genes Dev. (2006) 20: 836-847.

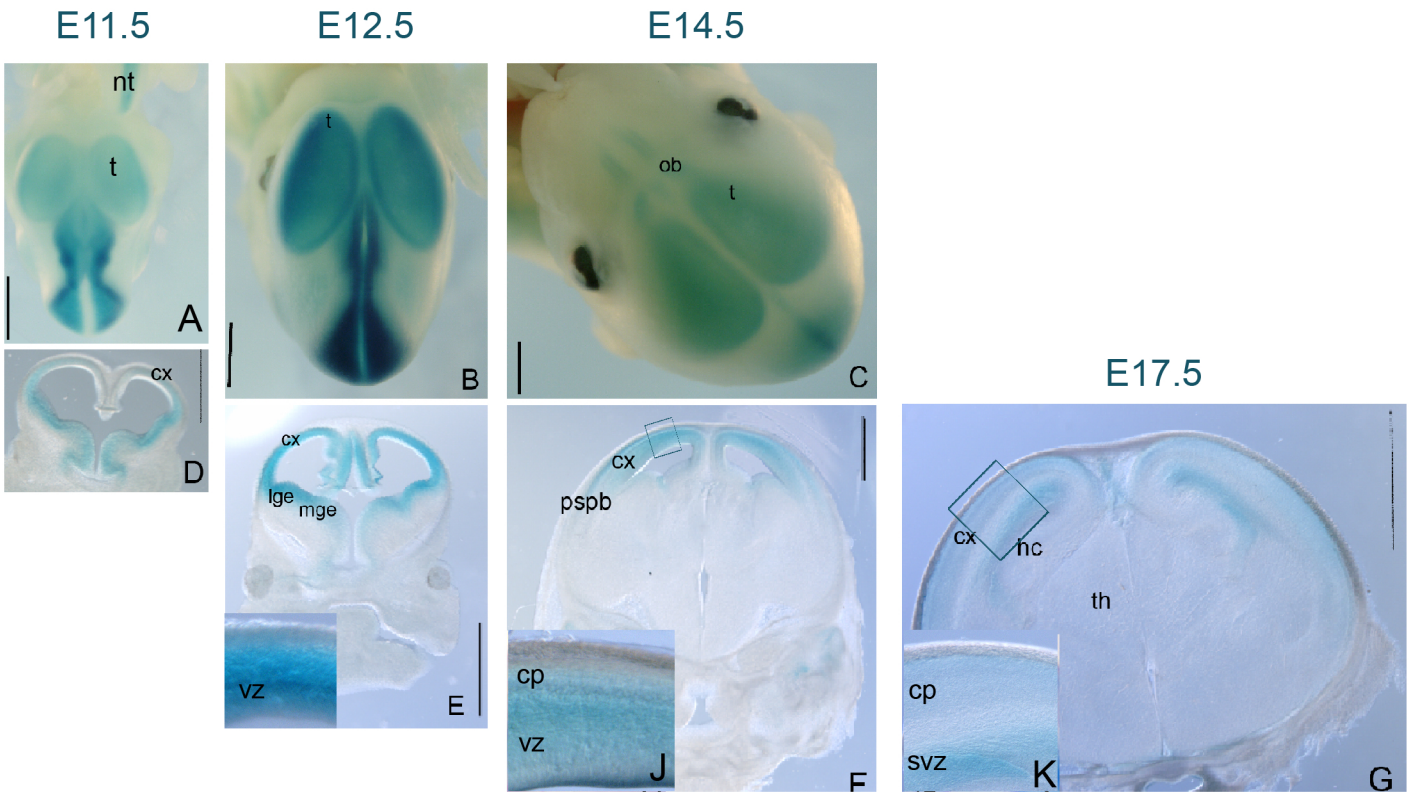
[4] Kallio M, Chang Y, Manuel M, Alastalo TP, Rallu M, Gitton Y, Pirkkala L, Loones MT, Paslaru L, Larney S, Hiard S, Morange M, Sistonen L, Mezger V. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. EMBO J. (2002) 21: 2591-2601.

[5] Kriegstein A, Noctor S, Martinez-Cerdeno V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. Nat Rev Neurosci. (2006) 7:883-890.

[6] McMillan DR, Christians E, Forster M, Xiao X, Connell P, Plumier JC, Zuo X, Richardson J, Morgan S, Benjamin IJ. Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. Mol Cell Biol. (2002) Nov;22(22):8005-14.

[7] Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci (2004) 7:136–144

Figure 1


E11.5
E12.5
E14.5
E17.5
nt
t
A
cx
D
t
B
ob
t
C
cx
lge
mge
vz
E
cx
pspb
cp
vz
J
F
cx
hc
th
cp
svz
K
G

# FONCTION DU FACTEUR DE CHOC THERMIQUE HSF2 DANS LES PROCESSUS DE PROLIFÉRATION ET DE DIFFÉRENCIATION AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Les recherches exposées dans ce document portent sur l'étude du rôle de HSF2 au cours du développement du système nerveux central. Les *Heat Shock Factors* (HSF) sont impliqués dans la réponse au choc thermique et également au cours du développement embryonnaire. Mes travaux ont démontré que HSF2 est requis au cours de la formation du cortex cérébral pour la migration de certains neurones en régulant directement l'expression de *p35*, sous unité activatrice de CDK5. D'autres cibles ont été identifiées *NudE, Dclk, Dab1* nécessaires à la migration des neurones en participant à la dynamique du cytosquelette. De plus, ces travaux montrent que HSF2 module la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales (NSC) et des progéniteurs (NP) car i) par électroporation in ovo chez le poulet, la surexpression de HSF2 provoque une augmentation de la prolifération des NP ; ii) les NSC *Hsf2*$^{-/-}$ en culture présentent un retard de prolifération, de survie et de différenciation. Ainsi, HSF2 pourrait assister la décision cellulaire des NSC/NP vers la prolifération ou la différenciation et la migration, tel un aiguilleur de destin cellulaire.

The research exposed in this thesis concerns the exploration of HSF2 function during the development of neural nervous system. The Heat shock factors (HSF) are involved during heat shock response and during embryonic development. My studies have demonstrated that HSF2 is implicated during cerebral cortex formation in neuronal migration by acting directly on the *p35* expression, a subunit activating the CDK5. Others target genes have been described like *NudE, Dclk, Dab,* modifying the dynamic of cytoskeleton. Moreover, these studies display that HSF2 modulates proliferation and differentiation process of neural stem cells (NSC) and progenitors (NP) i) by in ovo electroporation in chick embryo, HSF2 overexpression increases the proliferation rate of NP ; ii) *Hsf2*$^{-/-}$ NSC exhibit a delay during proliferation, survival and differentiation. In conclusion, HSF2 might adjust the cell fate choice of NSC/NP into proliferation/differentiation process like a switcher of cell fate.