



**HAL**  
open science

# Implication de la voie de signalisation Notch dans l'organisation précoce du prosencéphale de l'embryon de poulet : application à la physiopathologie de l'holoprosencéphalie

Leslie Ratié

## ► To cite this version:

Leslie Ratié. Implication de la voie de signalisation Notch dans l'organisation précoce du prosencéphale de l'embryon de poulet : application à la physiopathologie de l'holoprosencéphalie. Science des productions animales. Université Rennes 1, 2013. Français. NNT : 2013REN1S176 . tel-01126833

**HAL Id: tel-01126833**

**<https://theses.hal.science/tel-01126833>**

Submitted on 6 Mar 2015

**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.

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale VAS**

présentée par

**Leslie Ratié**

Préparée à l'unité de recherche UMR6290-CNRS  
Institut de Génétique et Développement de Rennes  
Université de Rennes 1

---

**Implication de la voie  
de signalisation Notch  
dans l'organisation  
précoce du  
prosencephale  
de l'embryon de poulet**

*Application à la physiopathologie  
de l'Holoprosencéphalie*

**Thèse soutenue à Rennes  
le 19 Décembre 2013**

devant le jury composé de :

**Heater ETCHEVERS**

Chargé de recherche 1, INSERM U910/ *rapporteur*

**Fabienne PITUELLO**

Directeur de recherche 2, CNRS, UMR5547/  
*rapporteur*

**Marie-Dominique GALIBERT-ANNE**

Professeur des universités, Université de Rennes1 /  
*examineur*

**Valérie DUPÉ**

Chargé de Recherche 1, INSERM UMR6290 /  
directeur de thèse

*À mes parents pour leur soutien infailible,  
À mon frère qui foule lui aussi le chemin tortueux  
mais ô combien enrichissant de la thèse*



## *Remerciements*

En ce début de manuscrit, je souhaite adresser mes remerciements aux membres du jury, Heather Etchevers, Fabienne Pituello et Marie-Dominique Galibert-Anne, qui ont accepté d'être rapporteurs et examinateurs de cette thèse.

De même, je remercie Claude Prigent et toute l'équipe de direction pour m'avoir accueilli au sein de l'Institut de Génétique et Développement de Rennes.

Bien évidemment je tiens à remercier très chaleureusement Valérie Dupé et Véronique David pour m'avoir encadrée lors de mon doctorat. Leurs conseils toujours avisés et leur investissement m'ont permis d'apprendre un peu plus chaque jour. Leur confiance, leur enthousiasme et leur soutien dans les moments heureux ou plus difficiles ont fait de ces années de thèse un épisode inoubliable.

Je remercie vivement Isabelle Gicquel qui m'a accompagné un bon bout de cette thèse, m'a beaucoup apporté tant dans le domaine scientifique que personnel et qui a contribué à la réalisation de ce travail. De même, je souhaite remercier tous ceux qui ont travaillé à mes côtés dans l'équipe : Christèle pour son aide, sa réactivité et sa gentillesse, Daniel, Sandra, Florence, Hélène pour ses gags sympathiques, Houda pour sa détermination, Julien pour son dévouement auprès de Bruno, bien évidemment Michelle pour ses leçons d'anglais, son travail titanesque, sa précieuse collaboration et pour le plaisir d'entendre le français avec l'accent britannique, et Charlotte qui reprend le flambeau de thésard !

Je tiens également à adresser mes remerciements à ma tutrice Sophie Langouet-Prigent ainsi qu'aux membres de mon comité de thèse, Stéphanie LeBras, Cédric LeCaignec et Christophe Hitte qui m'ont suivi et guider tout au long de cette expérience.

Dans ces remerciements, je souhaite faire une petite dédicace spéciale à mon cher Stéphane, ce MacGyver de l'Institut. Merci à lui pour son travail, pour ses encouragements et pour tous nos échanges souvent à la pause café et devant une petite mousse. Et dernièrement merci à lui pour avoir même réussi à me dépanner avec un bidon d'huile d'olive....

Merci également à mes amis thésards puisque c'est sur, la solidarité est de mise quand on est dans le même bateau. Plus particulièrement, je souhaite remercier du fond du cœur, Manu, mon poto et surtout frangin de thèse, avec qui j'ai partagé tous les moments importants de ces 3 années au labo et en dehors. Il a su trouver les mots quand il le fallait et j'espère que notre amitié continuera fort fort longtemps puisque j'ai bien juré craché à Sophie de veiller sur lui !

Après bien sur, il y a « les gars » (comme on dit dans les couloirs) que je remercie pour l'ambiance chaleureuse, leurs coups de mains, les soirées à l'Amaryllis, les tennis, les picnics,



leurs encouragements le long des parcours de triathlon puis tout le reste mais surtout leur bonne humeur : Joce mon rabbit-sitter, Benoit qui râle mais qui est le plus gentil, Nico charges comprises Loyer, Renaud un des rares qui connaît les règles de rugby, Ghislain ce gentleman qui a même un terrain de tennis, les anciens Pierre, Amaury et Massi. Et puis bien sur il y a les « copines » Nabila, qui m'a montré la voie, Claire, ma partenaire triathlète, Géraldine cette maman d'enfer, Ewa ma première prof d'anglais, Olivia ma première prof de québécois...et tous les autres qui font parti de cette grande famille et que j'ai peut être oublié parce que vous avez bien fini par vous rendre compte que j'avais une mémoire de poisson rouge.

En parlant de poisson rouge, je remercie Flic, Flac et Plouf mes petits poissons qui ont grandi en me regardant pipetter de leur joli bocal erlenmeyer géant et qui m'ont quitté trop vite...

Je souhaite remercier tous les membres de l'Institut avec lesquels j'ai pu échanger au cours de ma thèse : les Stéphanies, Anne, Virginie, les Géraldines, Nadine, Nathalie, Les Isabelles, les Gérards, Edouard, Clotilde, Christophe, Thomas, Pascale, Guillaume, Patricia, Aude, Anne-Gaëlle, Laura, Chris, Blanca, Anthony, Elise, Laëtitia, Solange, Morgane, Françoise, Pauline...enfin voilà plus tous ceux (oui en fait la liste est assez longue) qui ont partager mes moments de doutes mais plus souvent de bonheur et de rigolade au cours de ces années.

Un gigantesque merci à Romain, qui a affronté la dernière partie de ma thèse, et non la moindre, avec une solidité qui m'a permis de dépasser mes limites. J'adresse aussi un grand merci à mes amis de Rennes et d'autres horizons : Charlotte, Amélie, Mélanie, Aurore, Marion, Greg, Alex, Marion, Sylvain, Sophie, Tatiana, Yann et surement d'autres...

Pour finir, j'ai souhaité dédié ce manuscrit et l'aboutissement de mes années d'études à mes parents et à mon petit frère, puisque voilà, j'agrandi le cercle des docteurs Ratié mais surtout je voulais les remercier pour m'avoir soutenu dans tout ce que j'ai entrepris jusqu'à maintenant même dans mes cas d'échecs et pour être présent dès qu'il le faut, me montrant ainsi que je pourrai toujours compter sur eux. Alors ne vous épuisez pas trop mes chers parents, car Gildas marche dans mes pas...

*« Dans les sciences, le chemin est plus important que le but »*

*Erwin Chargaff*





# SOMMAIRE

<b>Table des illustrations</b> .....	<b>1</b>
<b>Table des tableaux</b> .....	<b>3</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>5</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
<b>Développement précoce du cerveau antérieur chez les vertébrés</b> .....	<b>13</b>
1. L'induction neurale.....	13
1.1. Apparition de la ligne primitive .....	15
1.2. Formation de la plaque préchordale .....	17
1.2.1. La voie de signalisation Shh .....	19
1.2.2. La voie de signalisation Nodal .....	21
1.2.3. La voie des BMP .....	23
2. Régionalisation du tube neural.....	23
2.1. Régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale .....	23
2.2. Régionalisation dorso-ventrale .....	25
3. Segmentation du cerveau antérieur.....	29
3.1. Le télencéphale.....	29
3.1.1. Morphologie du télencéphale.....	29
3.1.2. Formation du télencéphale.....	31
3.2. Le diencephale .....	33
3.2.1. Morphologie et modèle prosomérique du diencephale .....	33
3.2.2. Formation du diencephale .....	35
4. L'hypothalamus, structure ventrale du diencephale.....	37
4.1. Induction de l'hypothalamus .....	37
4.1.1. Rôle de SHH, BMP7 et TBX2 .....	37
4.1.2. Action de Nodal.....	39
4.1.3. Rôle du gradient Wnt .....	41
4.2. Spécification de l'hypothalamus.....	41
4.3. Guidage axonal des neurones de l'hypothalamus ventral.....	45
4.4. Pathologies associées .....	47
5. Modèles animaux .....	51
5.1. Modèle d'embryon de poulet.....	51
5.2. Intérêt du modèle d'embryon de poulet .....	51
5.3. Modèle d'embryon de souris.....	53
<b>II. L' Holoprosencéphalie, une pathologie du cerveau antérieur</b> .....	<b>57</b>
1. Définition .....	57
2. Sévérité et classification anatomique.....	57
3. Pronostic .....	59
4. Etiologie de l'HPE .....	59
4.1. La voie Shh, majeure dans d'Holoprosencéphalie .....	63
4.2. La voie Nodal.....	67
4.3. SIX3 et HPE .....	69
4.4. ZIC2 et HPE .....	69
4.5. TGIF et HPE .....	69
4.6. La voie FGF .....	71
5. Le modèle multi-hit.....	71
5.1. Le digénisme chez l'Homme .....	71
5.2. Le digénisme chez le modèle murin.....	73
6. Travaux de l'équipe sur l'Holoprosencéphalie .....	75
7. Recherche de nouveaux gènes candidats : le cas de <i>DLL1</i> .....	77



<b>III. La voie de signalisation Notch chez les vertébrés .....</b>	<b>81</b>
1. Mécanismes moléculaires de la voie Notch .....	81
1.1. Les récepteurs Notch .....	81
1.2. Les ligands de Notch : familles Delta et Serrate .....	85
1.3. Etape régulatrice critique : le clivage par la $\gamma$ -sécrétase .....	87
1.4. La translocation du NICD et activation des effecteurs .....	89
1.5. Les facteurs de transcription Hes/Hey, cibles directes de la voie Notch .....	91
2. La voie Notch au cours de la neurogenèse chez les vertébrés .....	93
2.1. Mécanisme cellulaire de la neurogenèse .....	93
2.2. La voie Notch et le développement du SNC dans le modèle murin .....	95
3. Rôle des facteurs de transcription de type bHLH dans la neurogenèse .....	97
3.1. Les gènes proneuraux .....	97
3.2. La détermination neurale liée aux gènes proneuraux .....	101
3.3. Antagonisme entre les facteurs de transcription bHLH proneuraux et Hes/Hey .....	103
3.4. Les protéines Id .....	107
4. L'inhibition latérale .....	107
4.1. Mode d'action de la voie Notch par inhibition latérale .....	107
4.2. Cibles des gènes proneuraux .....	109
4.2.1. La voie Notch .....	109
4.3.3. Effecteurs du cycle cellulaire .....	113
5. Interaction de la voie Notch avec d'autres voies de signalisation .....	113
4. Dysfonctionnement de la voie Notch et maladies chez l'Homme .....	115
4.1. Cancers .....	115
4.2. Maladies héréditaires .....	117
4.3. Dll1 et Holoprosencéphalie .....	119
<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>121</b>
• Validation de l'implication de la voie de signalisation Notch dans l'Holoprosencéphalie .....	121
• Le modèle multi-hit pour l'Holoprosencéphalie : Etude clinique chez l'homme puis moléculaire chez l'embryon de poulet .....	123
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>125</b>
<b>Partie 1. ....</b>	<b>125</b>
♦ Article 1. NOUVEAUX GÈNES SUREXPRIMÉS LORS DE L'INACTIVATION DE LA VOIE NOTCH AU COURS DU DÉVELOPPEMENT HYPOTHALAMIQUE .....	125
♦ EXPRESSION DYNAMIQUE DE NOUVEAUX MARQUEURS DE NEUROGENÈSE DANS LE SYSTEME NERVEUX EMBRYONNAIRE .....	171
1. Dynamic expression in placodal cells of markers of later neurogenesis steps, <i>Nhlh1</i> and <i>Stmn2</i> .....	171
2. Dynamic expression in placodal cells for three novel neuronal markers, <i>Chga</i> , <i>Tagln3</i> and <i>Cntn2</i> .....	175
3. Coexpression of <i>Nhlh1</i> , <i>Chga</i> and <i>Tagln3</i> and <i>Cntn2</i> in epibranchial-derived ganglia .....	179
4. Coexpression of <i>Nhlh1</i> and <i>Chga</i> in cells of lateral olfactory tract .....	181
♦ LE GÈNE <i>SHH</i> EST RÉGULÉ PAR LA VOIE NOTCH AU NIVEAU DE LA LIGNE MÉDIANE .....	183
1. Plusieurs marqueurs de l'identité hypothalamique sont sous-exprimés en absence d'activité Notch .....	185
2. Les marqueurs de neurogenèse sont sous exprimés en présence de cyclopamine .....	189
<b>Partie 2. ....</b>	<b>193</b>
♦ Article 2. NOUVELLES DONNÉES CONCERNANT LES CORRÉLATIONS GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE DANS UNE SÉRIE EUROPÉENNE DE CAS D'HOLOPROSENCÉPHALIE .....	193
♦ Article 3. L'INHIBITION DOSE-DÉPENDANTE DE NODAL ET SHH CONDUIT A UN PHÉNOTYPE DE TYPE HPE CHEZ L'EMBRYON DE POULET .....	215
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>235</b>
<b>La voie de signalisation Notch agit par inhibition latérale au sein de l'hypothalamus en développement .....</b>	<b>235</b>
• Action de la voie Notch dans le développement de l'hypothalamus .....	237



<ul style="list-style-type: none"> <li>• Une déficience de la voie Notch entraîne une neurogenèse précoce par perte de l'inhibition latérale.....</li> </ul>	243
<b>Caractérisation de nouvelles cibles de la boucle de régulation Notch/gènes proneuraux dans des territoires neurogéniques .....</b>	<b>247</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ascl1 orchestre la neurogenèse de l'hypothalamus .....</li> <li>• De nouveaux gènes cibles d'Ascl1 sont des marqueurs de l'hypothalamus.....</li> <li>• Nouveaux acteurs généraux de la neurogenèse .....</li> <li>• Perspectives .....</li> </ul>	247 251 257 259
<b>Notch, une nouvelle voie de signalisation dans l'Holoprosencéphalie .....</b>	<b>263</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• La voie de signalisation Notch et l'Holoprosencéphalie .....</li> <li>• Notch régule l'expression de <i>Shh</i> dans la plaque neurale antérieure .....</li> </ul>	263 267
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>273</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>275</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>303</b>
<b>Annexe 1.....</b>	<b>303</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Article 4. Des analyses de CGH-array suggèrent une hétérogénéité génétique du Rhombencéphalosynapsis. ....</li> </ul>	303
<b>Annexe 2.....</b>	<b>317</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Poster présenté lors du congrès « British societies of Cellular Biology and Developmental Biology », Coventry, Angleterre.....</li> </ul>	317



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 1. La ligne primitive. ....	14
Figure 2. Voies de signalisations Nodal et BMP et leur antagonisme.....	16
Figure 3. Expérience d’ablation de la plaque préchordale. ....	18
Figure 4. Signalisation Sonic Hedgehog .....	20
Figure 5. Représentation schématique des voies de signalisation lors de la régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale.....	24
Figure 6. Interactions entre Shh et Gli3 au sein du tube neural.....	26
Figure 7. Représentation simplifiée des différentes interactions entre voies de signalisation et facteurs de transcription au cours de la régionalisation dorso-ventrale du prosencéphale.....	26
Figure 8. Schéma de la segmentation du cerveau embryonnaire chez l’Homme. ....	28
Figure 9. Représentation schématique du télencéphale .....	28
Figure 10. Représentation des voies de signalisation dans le télencéphale en formation. ....	32
Figure 11. Représentation schématique des patrons d’expression des principaux gènes de molécules de signalisation ou de facteurs de transcription du diencephale.....	34
Figure 12. Représentation schématique des patrons d’expressions de facteurs de transcription et molécules de signalisation au sein du diencephale. ....	34
Figure 13. Représentation schématique de la formation de l’hypothalamus. ....	38
Figure 14. Les différents noyaux de l’hypothalamus. ....	42
Figure 15. Etapes du développement embryonnaire chez le poulet de 4h à 72h. ....	50
Figure 16. Représentation des différentes formes principales d’HPE. ....	56
Figure 17. Proposition d’un réseau de gènes impliqués dans le développement du cerveau antérieur et identifiés dans des cas d’Holoprosencéphalie.....	70
Figure 18. Défauts cranio-facial et squelettique chez des mutants <i>Gas1</i> et <i>Shh</i> . ....	74
Figure 19. Cartographie répertoriant les délétions et les gènes impliqués dans l’HPE. ....	76
Figure 20. Comparaison des expressions de <i>Dll1</i> et <i>Fgf8</i> chez des embryons de poulet en conditions normales et lors de l’inhibition de la voie Fgf. ....	78
Figure 21. Structure moléculaire des récepteurs Notch et des ligands chez les vertébrés.....	82
Figure 22. Schématisation de la voie de signalisation Notch.....	86
Figure 23. Neurogenèse au sein du cerveau antérieur en développement. ....	94
Figure 24. Les gènes proneuraux .....	98
Figure 25. Représentation simplifiée de la boucle de régulation entre les facteurs bHLH ...	104
Figure 26. Représentation schématique du mécanisme d’inhibition latérale.....	108
Figure 27. Différentes cibles des protéines proneurales. ....	112
Figure 28. Les différentes étapes de la culture roller d’embryons de poulet.....	126
Figure 29. Expression of neuronal markers in the developing chick nervous system detected by <i>in situ</i> hybridisation. ....	172
Figure 30. Co-expression of pan-neural marker, HuC/D and novel markers.....	174
Figure 31. Une perte systématique de l’expression de <i>Shh</i> dans l’hypothalamus en développement .....	184
Figure 32. Validation de l’expression différentielle de <i>Nkx2.1</i> et <i>Nkx2.2</i> chez des embryons traités au DAPT.....	186
Figure 33. Localisation de la perte d’expression d’ <i>Ascl1</i> , <i>Nhlh1</i> et <i>Tagln3</i> chez des embryons traités à la cyclopamine.....	190





# TABLE DES TABLEAUX

---

Tableau 1. Exemples de signes radiologiques des formes classiques d'HPE. ....	56
Tableau 2. Cas de digénisme rapportés chez l'Homme. ....	72
Tableau 3. Brève description des phénotypes au niveau du système nerveux central chez des souris mutantes pour les principaux gènes de la voie Notch (A) et les principaux gènes proneuraux (B). ....	96
Tableau 4. Maladies humaines associées à des gènes de la voie Notch et les phénotypes de souris homozygotes mutantes correspondantes. ....	116
Tableau 5 : Valeurs d'expression différentielles obtenues lors de l'analyse transcriptomique sur des embryons traités à la cyclopamine. ....	188



# LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

ADN : acide désoxyribonucléique

Ascl1 : achaete-scute complex like-1

AR : Acide rétinoïque

bHLH : Basic helix-loop-helix

BMP : Bone Morphogenic protein

CDON (ou CDO) : Cell adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes homologues

CGH : Comparative genomic hybridization

DISP1 : Dispatched homolog 1

DKK1 Dickkopf homolog 1

Dll1 : Delta-like1

DRG : dorsal root ganglia (ganglion rachidien)

EVA : Endoderme viscéral antérieur

FGF : Fibroblast growth factor

GAS1 : Growth arrest-specific 1

GLI2 : GLI family zinc finger 2

GLI3 : GLI family zinc finger 3

HH : Hamburger-Hamilton (auteurs d'une table de développement du poulet)

Hes : Hairy enhancer of split

Hey: Hairy/E(spl)-related with YRPW motif

HIS : Hybridation in situ

HPE : Holoprosencéphalie

MLPA : Multiplex ligation-dependent probe amplification

MLF : Medial longitudinal fascicle

NICD : Notch intra cellular domain

Neurog : Neurogénines

NODAL : Nodal homolog

PTCH1 : Patched 1

RES : Rhombencéphalosynapsis

SHH : Sonic Hedgehog



SIX3 : Sine oculis homeobox homolog 3

SMAD : Small mothers against dpp

SNC : Système nerveux central

TDGF1 : Teratocarcinoma-derived growth factor 1

TGFb : Transforming growth factor b

TGIF : TGF-induced factor homeobox 1

TPOC : tract of the post-optic commissure

Wnt : Wingless/Int

ZIC2 : Zic family member 2

ZLI : Zona limitans intrathalamica

#### Nomenclature génétique officielle utilisée

	Humains, Primates, Espèces domestiques	Souris, Rat, Poulet	Poisson	Drosophile
Nom du gène	insulin-like growth factor	insulin-like growth factor	<i>cyclops</i>	<i>hedgehog</i>
Symbole du gène	<i>IGF1</i>	<i>Igf1</i>	<i>cyc</i>	<i>hh</i>
Symbole de la protéine	IGF1	IGF1	Cyc	Hh ou Hedgehog



# AVANT-PROPOS

---

Au sein de l'équipe où j'ai effectué mon travail de thèse, nous nous intéressons à une pathologie nommée l'Holoprosencéphalie (HPE). Cette pathologie implique une anomalie qui se met en place au cours du développement embryonnaire précoce du cerveau antérieur qui est lié à un défaut de formation de la ligne médiane. Aujourd'hui il est clair que des déficiences de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) conduisent à l'apparition d'un phénotype HPE. Dans une moindre mesure, d'autres voies de signalisation ont été impliquées dans cette pathologie, telles que les voies Nodal ou Fgf.

L'équipe Génétique des Pathologies Liées au Développement s'appuie sur un centre de référence pour cette pathologie qui a permis le recrutement d'une cohorte regroupant des individus atteints, au niveau national et international. Au cours de ma thèse au sein de l'équipe, j'ai contribué aux études de génomique moléculaire réalisées par hybridation comparative du génome (CGH-array) sur la cohorte ainsi qu'au regroupement des données collectées par l'équipe pour réaliser une base de données dédiée. Ces travaux ont permis à l'équipe de générer un profil de corrélation entre le phénotype et le génotype des patients HPE.

Dans l'introduction, j'exposerai le contexte dans lequel l'HPE se met en place. Pour cela je résumerai de façon générale les différentes phases du développement cérébral chez les vertébrés. Dans un deuxième temps, je définirai l'HPE, puis je me concentrerai sur la voie de signalisation moléculaire Notch qui a récemment été impliquée par l'équipe dans cette pathologie (Dupé et al., 2011).

Lorsque j'ai débuté ma thèse, le rôle de la voie Notch au cours du développement précoce du cerveau antérieur n'avait pas été décrit. Il était alors difficile d'aborder le rôle de la voie Notch à des stades très précoces du développement à l'aide de souris transgéniques puisque la perte de fonction Notch s'accompagne d'une létalité très précoce des embryons. Afin d'observer les effets de l'inactivation de la voie Notch sur la régionalisation du cerveau nous avons choisi d'utiliser le modèle d'embryon de poulet. J'ai mis en place l'inactivation chimique au cours du développement du cerveau antérieur chez le poulet.





Ce modèle m'a permis d'aborder le rôle de la voie Notch dans la mise en place du cerveau antérieur chez les vertébrés par analyse transcriptomique et analyse de patron d'expression de gènes.

Les principaux résultats décrits dans ce manuscrit démontrent l'existence d'un rôle précoce de la voie Notch au cours du développement du plancher du cerveau antérieur chez l'embryon de poulet. En particulier, mes résultats précisent le rôle de cette voie au cours de la neurogenèse au sein de l'hypothalamus. Grâce à ces travaux de nouvelles cibles de la voie Notch ont été identifiées puis caractérisées au cours du développement embryonnaire précoce.



# INTRODUCTION

---

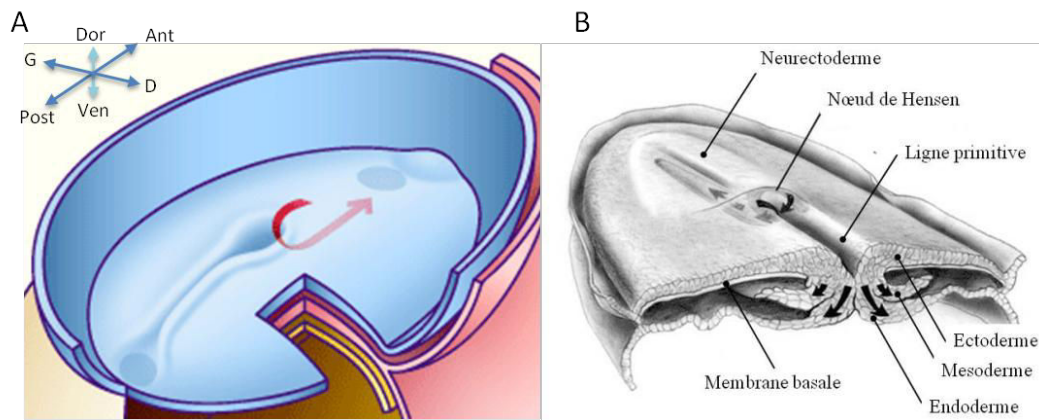
## Développement précoce du cerveau antérieur chez les vertébrés

Au cours du développement embryonnaire, la mise en place de la ligne médiane du cerveau antérieur survient après l'induction neurale, la mise en place de l'axe antéro-postérieur et la spécification des structures du cerveau antérieur. Cependant, ces différents processus se chevauchent dans le temps et impliquent souvent les mêmes acteurs. Je résume donc ici les premiers stades de développement du cerveau antérieur afin de fournir une vision globale de ces différents processus

L'induction du cerveau antérieur débute au cours de la gastrulation et est étroitement liée à la spécification de l'identité neurale de l'ectoderme embryonnaire. Quels sont les mécanismes du développement qui conduisent à la mise en place du cerveau antérieur ?

### 1. L'induction neurale

Après la fécondation, une active multiplication mitotique aboutit à un ensemble cellulaire à faible niveau d'organisation. Cela correspond à la phase de segmentation. Elle est suivie de la pré-gastrulation où se forme le disque embryonnaire didermique. Un dédoublement de la masse cellulaire interne se met en place pour former l'épiblaste et l'hypoblaste chez l'embryon de poulet (la structure équivalente de l'endoderme viscéral antérieur (EVA) de la souris et de l'Homme). Puis la gastrulation va conditionner l'organisation interne de l'individu selon des axes corporels caractéristiques de l'espèce considérée. A partir de l'épiblaste, les trois feuilletts embryonnaires principaux vont se développer : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. L'ectoderme va se modifier pour donner le neurectoderme et l'épiderme. Le mésoderme est à l'origine des organes comme le



**Figure 1. La ligne primitive.**

**A. Vue dorsale.** La flèche rouge indique la direction de migration des cellules de l'épiblaste qui induiront plus tard le processus notochordal. Ant : antérieur ; D : droite ; Dor : dorsal ; G : gauche ; Post : postérieur ; Ven : ventral (D'après [www.embryology.ch](http://www.embryology.ch)). **B. Vue transversale** au niveau du sillon primitif lors de la gastrulation. Les flèches noires indiquent les mouvements d'invagination des cellules épiblastiques de l'ectoderme primitif pour former les 3 feuillets embryonnaires. Le neurectoderme est différencié au niveau antérieur du nœud de Hensen ce qui constituera plus tard la plaque neurale (D'après (Dias and Partington, 2004).

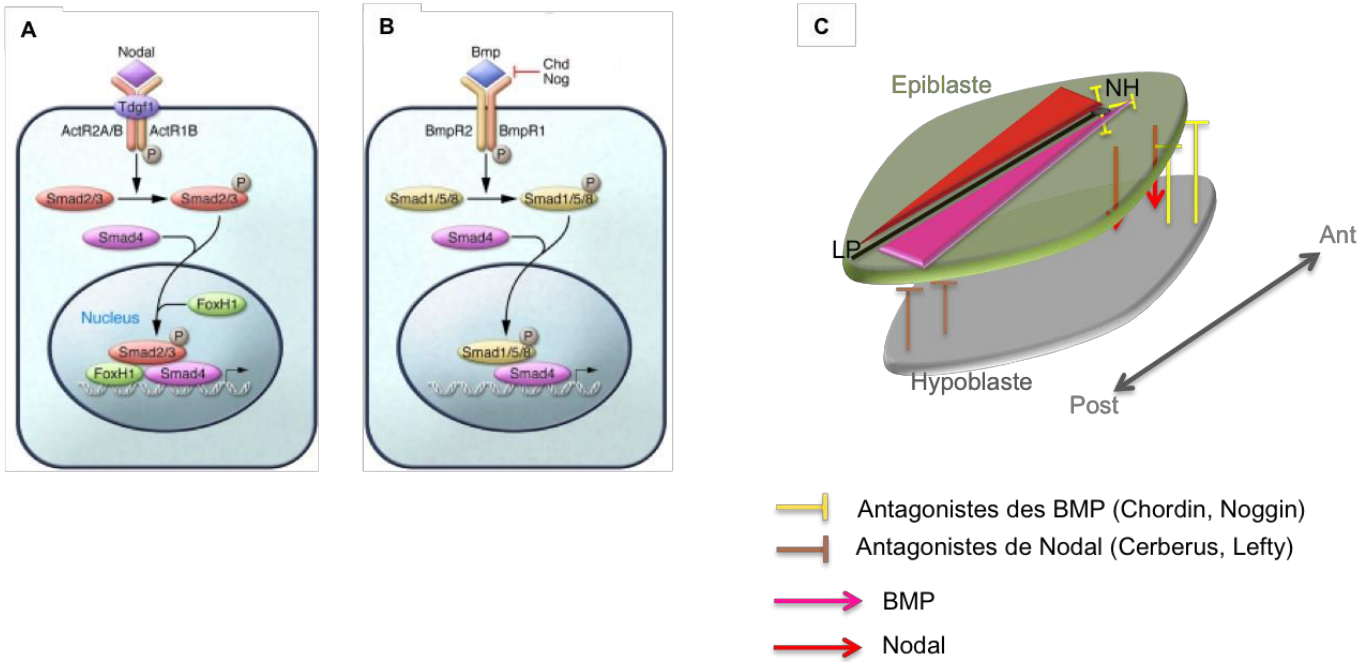
cœur ou les muscles ainsi que des éléments du squelette. L'endoderme permettra le développement des appareils digestif et respiratoire.

Il existe chez les vertébrés des centres organisateurs du cerveau antérieur qui se trouvent en dehors du système nerveux en développement. Ces organisateurs non neuraux agissent avant et au cours de la gastrulation pour induire l'identité neurale et l'identité antéro-postérieure. Par la suite, ils vont induire les centres organisateurs au sein même du cerveau antérieur. Ces organisateurs non neuraux comprennent l'endoderme viscéral antérieur et le nœud de Hensen. Ils vont générer au cours de la gastrulation, la ligne primitive de l'embryon puis la plaque préchordale et la notochorde.

### **1.1. Apparition de la ligne primitive**

Au cours de la gastrulation, c'est un épaississement du sillon médian dans la partie caudale de l'embryon qui permet l'apparition de la ligne primitive. Cette structure va s'allonger pour donner naissance, à son extrémité craniale, au nœud de Hensen grâce à une multiplication des cellules de l'épiblaste. La ligne primitive définit les principaux axes corporels à savoir l'axe rostro-caudal, l'axe médio-latéral, l'axe gauche-droite et le futur axe dorso-ventral (Figure 1A). Le nœud de Hensen correspond à la limite antérieure de la ligne primitive. Ensuite la migration des cellules de l'épiblaste vers la ligne primitive va fournir les trois feuillets embryonnaires primordiaux : ectoderme, mésoderme et endoderme (Figure 1B).

C'est tout d'abord la signalisation Nodal (Figure 2) qui va intervenir précocement au niveau de l'épiblaste pour permettre la mise en place de l'hypoblaste antérieur ou EVA (Mesnard et al., 2006). Une absence de signalisation Nodal provoque un arrêt de la gastrulation par défaut de formation de la ligne primitive chez l'embryon de souris (Conlon et al., 1994). Par la suite, ce sont des molécules antagonistes de la voie Nodal (LEFTY et CERBERUS) qui vont être exprimées par la partie antérieure de l'hypoblaste et vont inhiber l'action de *Nodal* présent au niveau de la ligne primitive. Elles sont nécessaires à l'établissement de l'identité neurale antérieure puisque qu'en leur absence, des lignes primitives ectopiques vont se développer empêchant l'induction de la tête (Perea-Gomez et al., 2002). A ce stade, un équilibre entre le ligand Nodal et ses antagonistes est requis pour le développement ultérieur correct du cerveau. Ceci a été illustré par des modèles



**Figure 2. Voies de signalisations Nodal et BMP et leur antagonisme.**

**A. La voie de signalisation Nodal.** Le ligand Nodal active des récepteurs Activine de type I et II à activité sérine/thréonine kinase via l'interaction avec le corécepteur TDGF1. Cette liaison provoque une cascade de signalisation des facteurs de transcription SMAD2/3 qui pourront interagir avec SMAD4. Lors de sa translocation dans le noyau le complexe s'associe à d'autres facteurs de transcription tel FOXH1 pour réguler l'expression de gènes cibles. **B. La voie de signalisation BMP.** Les BMP se lient à des récepteurs de type I et II à activité sérine/thréonine kinase. S'en suit une phosphorylation des récepteurs de type I par les récepteurs de type II. La transduction du signal est ensuite assurée par les facteurs SMAD1/5/8 qui se complexent avec SMAD4 avant de pouvoir être transloqués dans le noyau pour l'activation des gènes cibles. Les antagonistes NOGGIN/CHORDIN vont empêcher la liaison des BMP aux récepteurs (Adapté de (Geng and Oliver, 2009)). **C. Antagonisme des voies Nodal et BMP lors de l'induction neurale.** Deux gradients de concentration de polarité opposée se mettent en place au niveau de l'épiblaste entre Nodal et BMP. Les antagonistes des deux voies sont sécrétés au niveau de l'endoderme viscéral antérieur. NOGGIN et CHORDIN sont également produits au niveau du nœud de Hensen. NH : nœud de Hensen ; LP : ligne primitive

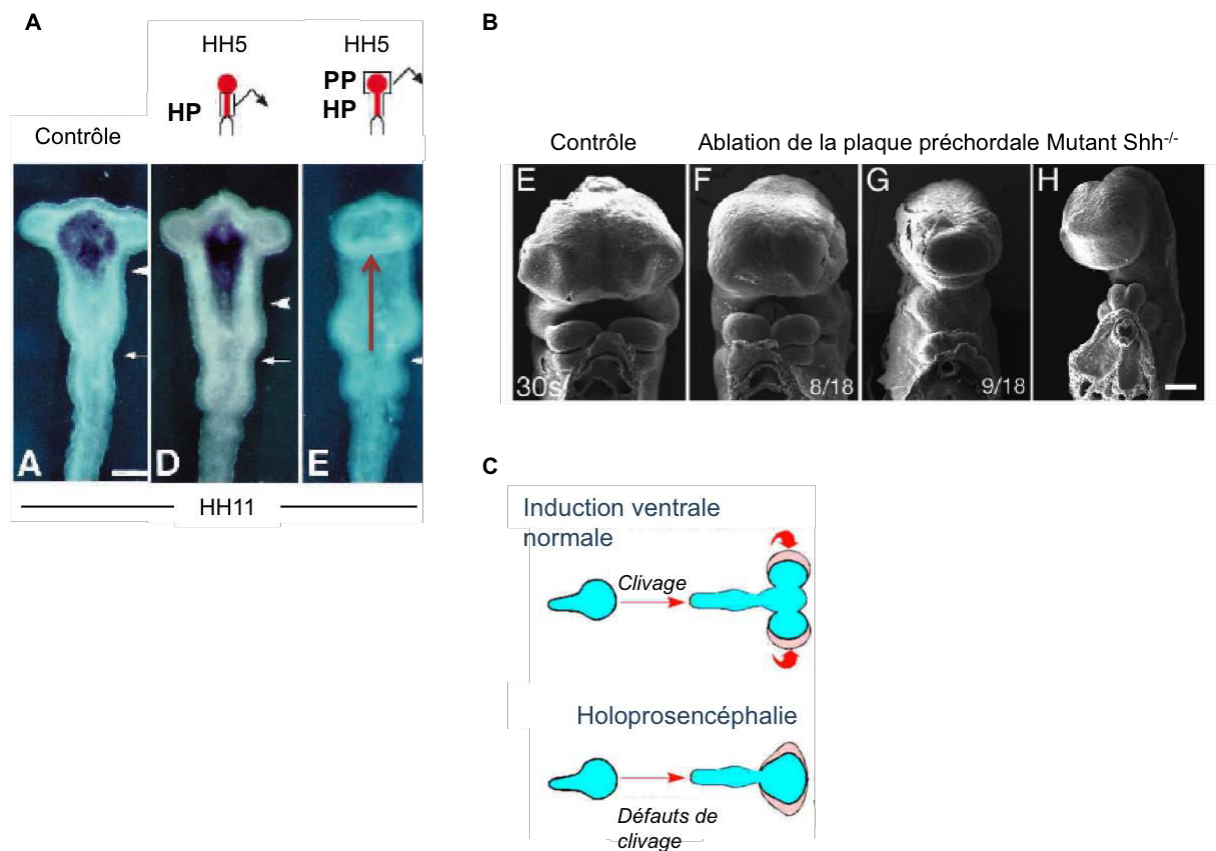
d'inactivation partielle de la voie Nodal où des défauts de la ligne médiane vont entraîner des anomalies du cerveau apparentées à la cyclopie (Hagos and Dougan, 2007; Klingensmith et al., 2010; Lowe et al., 2001; Lu and Robertson, 2004). Il faut noter que la voie Nodal est également régulée négativement par les protéines TGIF capables de bloquer l'activité des protéines SMAD (Powers et al., 2010).

Par ailleurs, une boucle de régulation entre la voie Nodal et la voie BMP (Bone morphogenic protein) permet l'établissement postérieur de la ligne primitive. D'une part, l'activité Nodal est amplifiée au niveau de l'épiblaste par une cascade de signalisation entre BMP4 et WNT3, eux-mêmes induits par la signalisation Nodal (Ben-Haim et al., 2006; Shen, 2007). D'autre part, la voie des BMP peut réguler l'activité Nodal par interférence au niveau de la formation du complexe SMAD2/4/FOXH1. Les cascades d'activation des deux voies de signalisation partagent le même cofacteur SMAD4, ce qui limite probablement la disponibilité de ces cofacteurs (Figure 2A et 2B) (pour revue (Liu and Niswander, 2005)). Récemment, la formation d'un autre complexe inhabituel entre SMAD2 et SMAD5 avec une fonction inhibitrice sur l'activité Nodal a été décrite, ce qui conforte le phénomène d'interférence entre les cofacteurs des voies Nodal et BMP (Pereira et al., 2012).

Afin de maintenir l'axe antéro-postérieur du tissu neural en formation, des antagonistes des BMP (Noggin, Chordin et Follistatin) sont également exprimés au niveau de l'hypoblaste chez l'embryon de poulet et du nœud de Hensen. On observe donc des gradients de concentration inverses des molécules Nodal et BMP au cours de l'induction neurale (Figure 2C). Ces voies de signalisation sont complémentaires lors de cette étape du développement embryonnaire puisqu'il a été montré chez le modèle poulet que la signalisation des BMP n'était pas suffisante pour l'acquisition de l'identité neurale (Stern, 2002). Cependant, d'autres signaux et de façon la plus probable, la voie Fgf, permettrait aux cellules d'acquiescer d'abord un état neural prospectif avant l'action des antagonistes des BMP pour assurer définitivement leur identité neurale (Streit et al., 2000).

## **1.2. Formation de la plaque préchordale**

Une fois la ligne primitive en place, les cellules migrent à travers le nœud de Hensen en direction caudale entre l'ectoderme et l'endoderme (Figure1). Les cellules qui migrent antérieurement, le long de la ligne médiane forment une structure endomésodermique appelée plaque préchordale. Les cellules qui migrent en position caudale forment



**Figure 3. Expérience d'ablation de la plaque préchordale.**

**A.** Vues ventrales du système nerveux rostral au stade HH11 après ablation du centre inducteur précoce de la tête (YHP : young head process), du centre inducteur antérieur de la tête (HP) ou de la plaque préchordale (PP) au st HH5. Les embryons de poulet ont été hybridés avec la sonde *Nkx2.1* avant dissection du mésenchyme de la tête. L'expression de *Nkx2.1* est corrélée avec la présence de la plaque préchordale ou du centre inducteur antérieur de la tête. Une cyclopie est observée lors de l'ablation du YHP ou de la PP et une seule vésicule optique est observée (flèche rouge) (Pera and Kessel, 1997). **B.** Photomicrographies de vues frontales au stade 30 somites d'un embryon contrôle (E) et d'embryons après ablation de la plaque préchordale (F et G) ainsi que d'un embryon  $Shh^{-/-}$  (H) (Aoto et al., 2009) **C.** Représentation schématique du défaut de clivage entraînant une holoprosencéphalie caractérisée par une cyclopie.



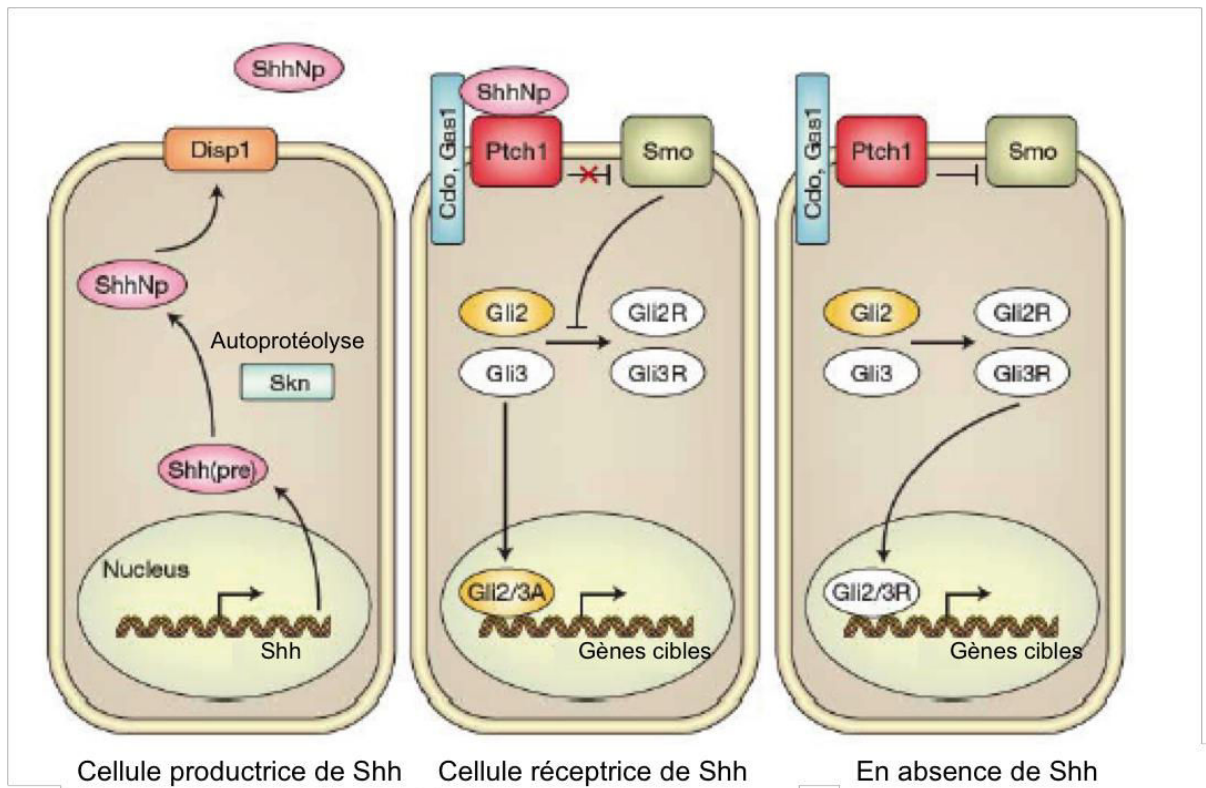
progressivement la notochorde. Ces deux structures sont transitoires et vont permettre la régionalisation du tube neural. De nombreux gènes sont exprimés spécifiquement dans ces deux centres organisateurs afin de permettre l'induction de la plaque neurale au bon endroit et au bon moment.

La plaque préchordale est la partie la plus axiale du mésoderme antérieur. Elle constitue un centre organisateur des motifs ventraux qui sous tendent le développement du cerveau antérieur. L'ablation de ce tissu chez l'embryon de poulet conduit à la fusion des domaines de l'œil et à la suppression des tissus du cerveau antérieur ventral, un phénotype comparable à une forme sévère d'HPE (Pera and Kessel, 1997) (Figure 3).

La plaque préchordale partage de nombreuses similitudes avec la notochorde et en particulier la production de la molécule SHH.

### 1.2.1. La voie de signalisation Shh

Le mécanisme de transduction du signal Shh a fait l'objet d'intenses recherches (pour revue (Briscoe and Thérond, 2013)) (Figure 4). La protéine précurseur est clivée dans le cytoplasme en un domaine de signalisation N-terminal (SHH-N) et un domaine C-terminal (SHH-C) (Porter et al., 1996). Après formation de ces domaines, le cholestérol s'unit au domaine SHH-N (Zeng et al., 2001) qui subit également une palmitoylation catalysée par Skinny Hedgehog (Skn). Le domaine SHH-N subit ensuite deux modifications lipidiques et est appelé SHH-Np. C'est le clivage de ces lipides qui va permettre la sécrétion de SHH hors de la cellule (Zeng et al., 2001). La sécrétion de SHH est médiée par une série de protéines, incluant DISPATCHED (DISP1) (Burke et al., 1999). Des protéines comme CDON (ou CDO) et GAS1 facilitent l'interaction de SHH-Np avec le récepteur PATCHED homologue 1 (PTCH1). En absence de ligand SHH-Np, le récepteur PATCHED inhibe la fonction de SMOOTHENED (SMO). L'inhibition sera levée lors de l'interaction ligand-récepteur et une cascade de signalisation intracellulaire est alors déclenchée. Il en résulte l'activation transcriptionnelle de gènes cibles via la régulation des gènes de la famille GLI (Figure 4). Les protéines GLI sont des facteurs de transcription à doigts de zinc et interviennent dans la voie Shh soit comme activateurs, soit comme inhibiteurs de la transcription (pour revue (Krauss, 2007)). Récemment, le cil primaire, un organite présent à la surface de la plupart des cellules, a été impliqué dans la transmission du signal Shh. L'intégrité structurale et fonctionnelle de celui-ci est nécessaire pour l'activation de la voie Hedgehog (Simpson et al., 2009).



**Figure 4. Signalisation Sonic Hedgehog**

*SHH est initialement produit sous forme de précurseur (SHH(pre)) qui subit un clivage autocatalytique, un transfert de cholestérol et une palmitoylation grâce à Skinny hedgehog (Skn). SHH mature (SHH-Np) est sécrété par la cellule en impliquant DISPATCHED1 (DISP1). Pour les cellules non exposées à SHH-Np, PATCHED1 (PTCH1) inhibe l'activité de SMOOTHENED (SMO) bloquant ainsi la voie Shh. Les facteurs de transcription GLI2 et GLI3 agissent sous forme de répresseurs (GLI2R et GLI3R) qui peuvent transloquer dans le noyau pour réprimer des gènes cibles. Lorsque SHH-Np se lie à PTCH1, avec l'aide des cofacteurs (CDO et GAS1), l'inhibition de SMO est levée ; les facteurs GLI sont présents à l'état d'activateurs (GLI2A et GLI3A) et sont capables d'activer l'expression de gènes cibles après translocation dans le noyau (D'après (Krauss, 2007)).*

La signalisation Shh mise en place au niveau de la plaque préchordale va également y permettre la maintenance des cellules de la plaque préchordale. Par la suite, la voie Shh va agir sur la formation des structures ventrales du cerveau antérieur comme l'hypothalamus ou le chiasma optique (Aoto et al., 2009). En effet, lors de l'ablation de la plaque préchordale, les embryons de souris vont présenter un phénotype HPE comme chez les mutants *Shh*<sup>-/-</sup> (Figure 3C). Chez ces embryons, on observe également une absence d'expression de *Shh* et *Nkx2.1*, marqueurs de l'hypothalamus. Cependant l'expression de *Shh* n'est pas affectée au niveau de la moelle épinière (Aoto et al., 2009). D'autre part, chez les mutants *Shh*<sup>-/-</sup>, les cellules de la plaque préchordale n'acquièrent pas leur identité et subissent une forte apoptose (Aoto et al., 2009).

SHH est normalement sécrété à partir du mésoderme axial et initie sa propre transcription au niveau de la plaque neurale. SHH va induire la formation de la partie ventrale du tube neural qui à son tour va sécréter SHH et engendrer la régionalisation dorso-ventrale du cerveau. En effet, les souris mutantes *Shh*<sup>-/-</sup> ne possèdent pas de structures ventrales tout au long du tube neural (Chiang et al., 1996).

Cependant, contrairement à la notochorde, la plaque préchordale produit plusieurs autres protéines de signalisation comme NODAL, BMP7 et les antagonistes de WNT (Dale et al., 1997; Muller et al., 2000). Ces molécules vont coopérer pour contrôler l'identité antérieure de la plaque neurale.

### 1.2.2. La voie de signalisation Nodal

Un rôle essentiel de la voie Nodal est l'initiation de la transcription de *Shh* dans la plaque préchordale et la notochorde (Gritsman et al., 2000; Muller et al., 2000; Rohr et al., 2001). Une inactivation partielle de la voie Nodal par mutation hypomorphe, doubles hétérozygotes ou par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, permet de dépasser le stade de la gastrulation mais engendre des défauts de régionalisation antérieure (Luxardi et al., 2010; Vincent et al., 2003).

Chez le poisson-zèbre, des mutations dans les composants de la voie Nodal provoquent la perte ou la réduction de la plaque préchordale entraînant de graves déficits



du cerveau antérieur qui s'inscrivent dans le spectre HPE (Brand et al., 1996; Schier et al., 1997). Par exemple, les mutants pour le gène *oep* (One-Eyed Pinhead) montrent une déficience de la voie Nodal, bien qu'ils conservent une source maternelle de cette protéine. En effet, l'expression des gènes spécifiques de la plaque préchordale débute normalement mais ne parvient pas à se maintenir. Au contraire, la notochorde sera correctement établie et exprimera *Shh*. Ces résultats suggèrent qu'un faible niveau de signalisation Nodal est suffisant au développement de la notochorde mais ne l'est pas pour la plaque préchordale particulièrement sensible à une réduction de l'activité Nodal (Schier et al., 1997).

### 1.2.3. La voie des BMP

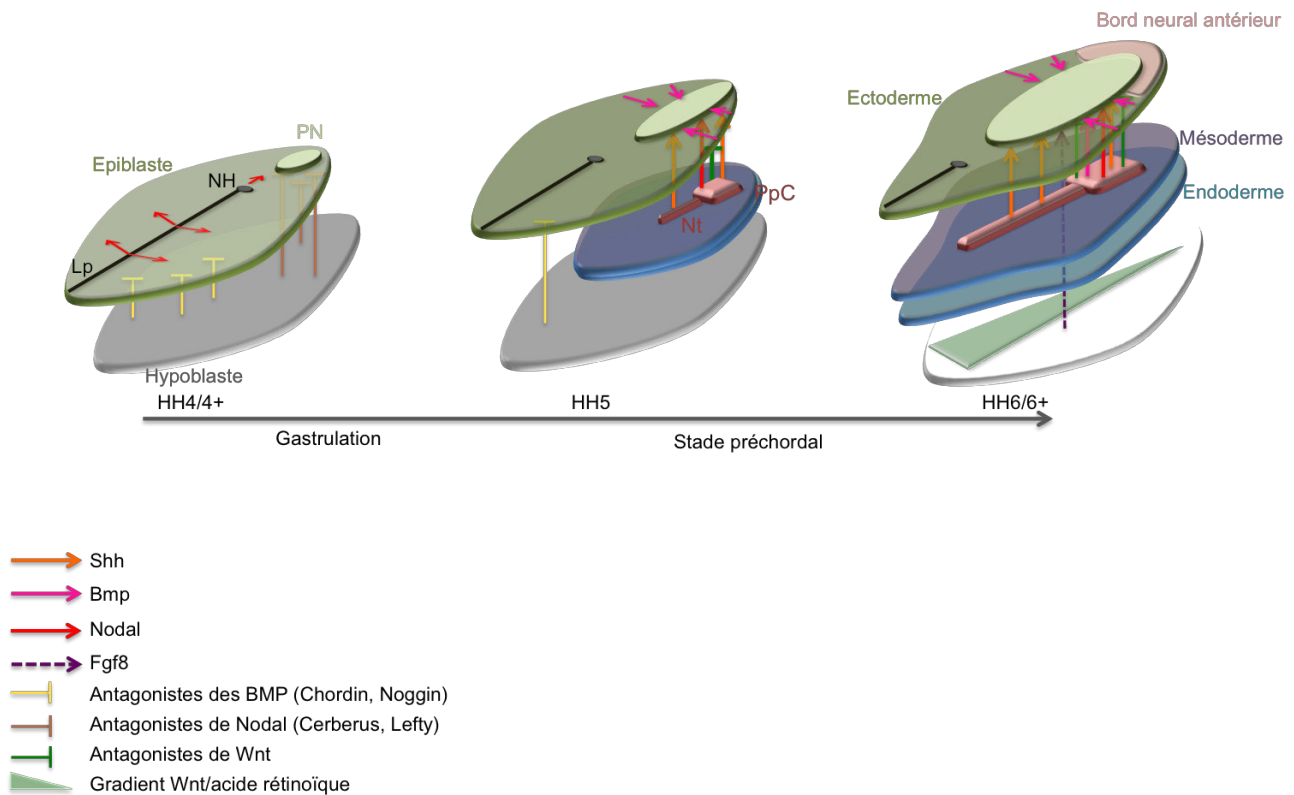
Par ailleurs, les antagonistes de BMP continuent d'être exprimés au niveau du nœud de Hensen et de l'hypoblaste antérieur pour permettre la formation du neurectoderme. Cela permet de lever l'inhibition effectuée par la voie BMP sur la spécification en tissu neural (Dale et al., 1997; Manning et al., 2006). La signalisation BMP sera très active dorsalement et très faible ou absente ventralement. Des doubles mutants pour les antagonistes *Chordin* et *Noggin* (*Chr<sup>-/-</sup>* ; *Nog<sup>+/-</sup>*) ou les récepteurs *BMPR1a* et *BMPR1b* présentent des malformations cérébrales et craniofaciales caractéristiques de l'HPE (Fernandes and Hebert, 2008; Klingensmith et al., 2010).

## 2. Régionalisation du tube neural

La plaque neurale correspond à un épaissement de l'ectoderme qui se met en place au niveau de la ligne médiane de l'embryon en avant de la ligne primitive. La partie antérieure va s'élargir pour donner le futur cerveau alors que la partie postérieure donnera la moelle épinière. Sous l'influence de la plaque préchordale et de la notochorde, la plaque neurale est régionalisée le long des axes dorso-ventral et antéro-postérieur. Simultanément, des mouvements cellulaires vont permettre la fusion de la plaque neurale pour former le tube neural.

### 2.1. Régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale

L'axe antéro-postérieur de la plaque neurale est soumis à plusieurs molécules de signalisation. Cette étape est fondamentale pour une constitution correcte de l'ensemble



**Figure 5. Représentation schématique des voies de signalisation lors de la régionalisation antéro-postérieure de la plaque neurale.**

*Les différents tissus sont présentés en superposition dans un but pédagogique. Les signaux arrivant des tissus situés sous la plaque neurale vont influencer le développement du cerveau antérieur. Les antagonistes des BMP et de Nodal dérivent de l'hypoblaste. Les BMP vont ensuite réguler le devenir de la plaque neurale dans sa périphérie tandis que la plaque préchordale, la notochorde et l'hypoblaste produisent différents signaux (Shh, BMP, Nodal, Fgf8, Wnt, acide rétinoïque) pour induire la régionalisation de la plaque neurale et la mise en place du prosencéphale. L'hypoblaste va disparaître au profit des autres tissus embryonnaires. Les stades de développement embryonnaire sont indiqués pour l'embryon de poulet.*

*NH : Nœud de Hensen ; Lp : Ligne primitive ; Nt : Notochorde ; PpC : plaque préchordale ; PN : plaque neurale*

des structures du système nerveux central. Pour cela, la plaque neurale va être soumise à des facteurs caudalisants tels que les voies Fgf, Wnt et de l'acide rétinoïque. Les tissus embryonnaires protégés de ces facteurs caudalisants formeront le cerveau antérieur prospectif. La plaque préchordale et la notochorde situées sous la plaque neurale vont influencer sa régionalisation grâce à l'activité des signaux SHH, NODAL et BMP restreints à la région antérieure. Une activité FGF8 provenant de l'hypoblaste agit également sur la plaque neurale antérieure de façon complémentaire aux autres signaux bien que plus tardivement au cours du développement (Stern, 2005). Les BMP vont également réguler le devenir de la plaque neurale dans sa périphérie (pour revue (Monuki, 2007; Wilson and Houart, 2004).

D'autre part, un gradient d'activité WNT est principalement impliqué dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur. Cette activité WNT est localisée au niveau des tissus postérieurs de la plaque neurale (Nordstrom et al., 2002) et son action sera limitée au niveau antérieur par la sécrétion de ses antagonistes tels que DKK (Dickkopf) (Carmona-Fontaine et al., 2007). Il existe également une action postériorisante de l'acide rétinoïque grâce à un gradient d'expression (Dupé and Lumsden, 2001; Niederreither et al., 2000) (Figure 5).

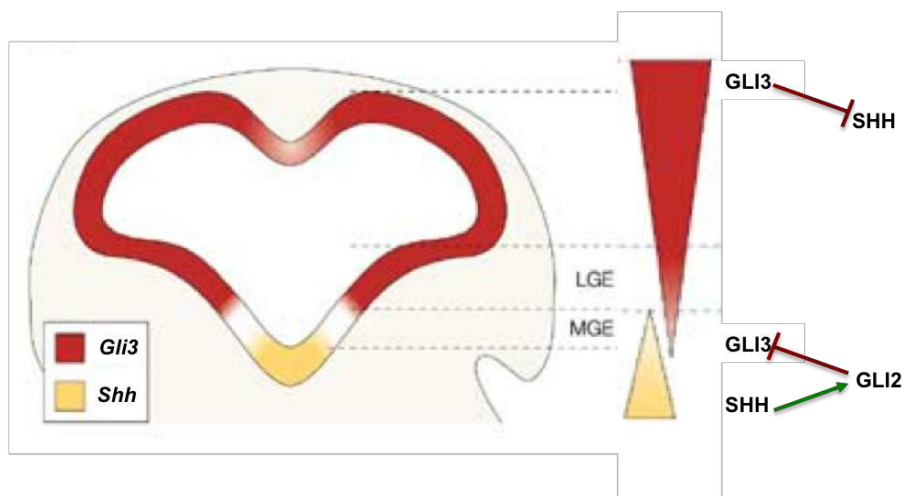
Au niveau de la région antérieure de la plaque neurale en développement, on note également l'expression de *Six3*, un gène à homéoboite codant pour un facteur de transcription à homéodomaine (Oliver et al., 1995). Il est requis pour le développement antérieur du prosencéphale en réprimant la transcription des gènes *Wnt* et *Fgf8* chez le poisson zèbre et la souris. Chez les souris mutantes pour *Six3*, une absence des structures antérieures de la tête et des yeux est observée (Lagutin et al., 2003 ; Carl et al., 2002).

## 2.2. Régionalisation dorso-ventrale

La polarité dorso-ventrale est établie un peu plus tardivement que la polarité antéro-postérieure et est également régie par la plaque préchordale et la notochorde.

Au niveau de la notochorde comme de la plaque préchordale, il est bien établi que l'action morphogène de *Shh* est nécessaire à la spécification ventrale dans ces régions (Briscoe and Ericson, 1999; Chiang et al., 1996; Gunhaga et al., 2000).

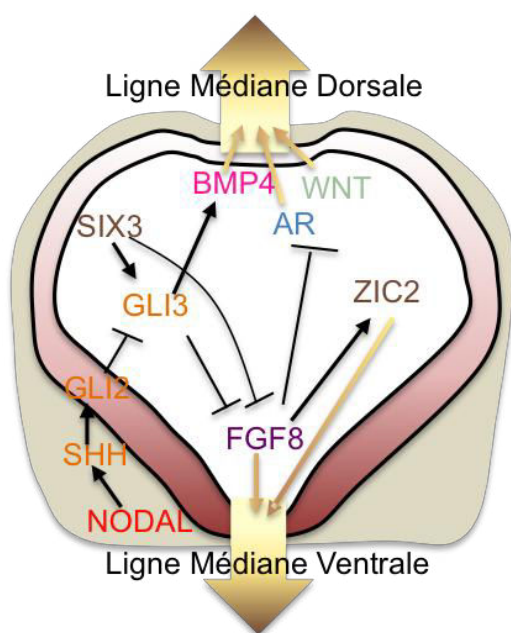
Il est maintenant clairement défini que c'est un équilibre dose-dépendant entre *Shh* et *Gli3* qui établit la polarité dorso-ventrale du cerveau antérieur en formation (Figure 6). En



**Figure 6. Interactions entre Shh et Gli3 au sein du tube neural.**

Les domaines d'expression de Gli3 (en rouge) et Shh (en jaune) sont présentés lors des stades précoces de développement dorso-ventral du cerveau antérieur. Ces deux gènes maintiennent des patrons d'expression complémentaires au cours du développement. C'est l'expression de Shh au niveau de la partie ventrale qui permet l'activation de Gli2, qui va agir ensuite comme un répresseur sur Gli3. Le gradient d'expression de Shh au niveau de la ligne médiane ventrale laisse place ensuite à un gradient d'expression de Gli3 qui va avoir une action beaucoup plus dorsalisante. EGL : éminence ganglionnaire latérale ; EGM : éminence ganglionnaire médiane (D'après (Rallu et al., 2002a)).

**Figure 7. Représentation simplifiée des différentes interactions entre voies de signalisation et facteurs de transcription au cours de la régionalisation dorso-ventrale du prosencéphale.**



La voie Nodal va agir de façon précoce sur l'activation de la signalisation Shh. Cette activation peut être contrebalancée par la protéine GLI3 activée par SIX3. Ce dernier conjointement à GLI3 exerce une activité répressive sur Fgf8 au niveau ventral. FGF8 quant à lui va favoriser la ventralisation par activation de Zic2. Au niveau dorsal, des interactions entre la voie des BMP, Wnt et de l'acide rétinoïque vont permettre l'activation de gènes dorsalisants, implémentée par l'action de GLI3. (D'après (Fernandes and Hebert, 2008)).

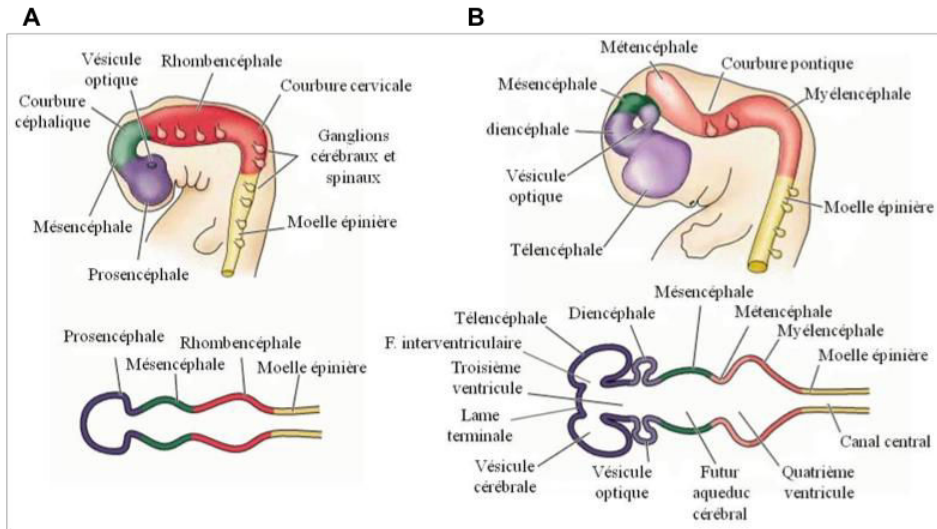


effet, la voie Shh permet l'activation de gènes cibles comme *Gli2*, qui va par la suite inhiber le gène *Gli3*. GLI3 est quant à lui, un facteur de transcription activateur de gènes dorsalisants tel que *Pax7* (Meyer and Roelink, 2003). De plus il a été montré qu'en absence de l'activité fonctionnelle de GLI3, le cerveau antérieur est anormalement ventralisé et présente un retard de croissance (Tole et al., 2000; Yu et al., 2009). La signalisation Shh va également activer des gènes cibles tels que *Nkx2.1*, *Olig2* et *Nkx6.1* pour permettre la caractérisation de cellules progénitrices neurales ventrales (p3, pMN, p2). Dans le cas d'une perte de fonction *Gli3*, l'expression de ces cibles va s'étendre à la région dorsale du tube neural (Persson et al., 2002).

Chez le poisson-zèbre, deux orthologues de *Shh* sont identifiés *ShhA* et *ShhB*. L'analyse des mutants pour ces deux gènes se révèle plus complexe dans ce modèle compte tenu de la compensation qui peut s'exercer entre les deux gènes. En raison de cette redondance, la perte de fonction *Shh* a été étudiée chez le mutant du récepteur *Smo* (Varga et al., 2001) qui contrairement à *Shh*, ne semble pas dupliqué au sein du génome du poisson-zèbre. Les animaux vont présenter des phénotypes sévères correspondant à une dorsalisation du cerveau antérieur et une absence totale de tissu hypothalamique. Ce même phénotype a été observé chez le poisson-zèbre lors de l'utilisation de la cyclopatamine. Ce composant se lie et inhibe directement le récepteur SMO, inactivant ainsi la signalisation Shh (Chen et al., 2002a).

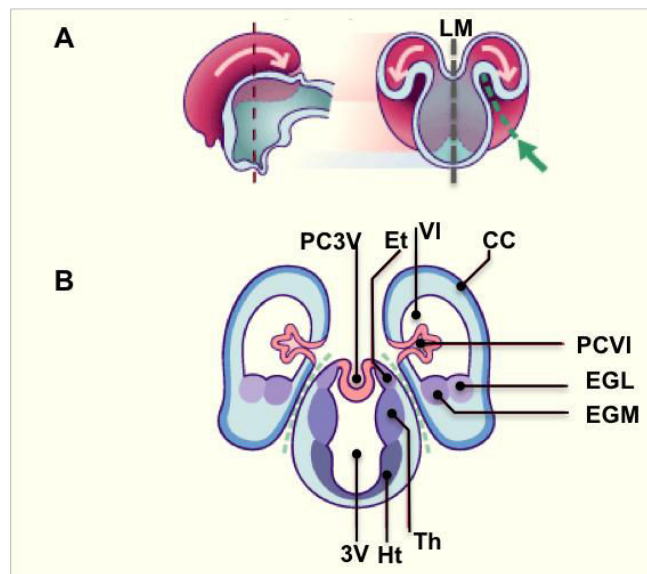
Par ailleurs, FGF8 exerce également une action ventralisante du tube neural et permet l'activation d'autres protéines telles que ZIC2 qui exerce également un rôle ventralisant au niveau de la ligne médiane (Figure 7) (Fernandes and Hebert, 2008). En effet, chez la souris, la perte de fonction de *Zic2* entraîne un défaut de régionalisation ventrale et de sévères malformations du cerveau antérieur (Warr et al., 2008). Au niveau dorsal, les voies WNT, BMP et de l'acide rétinoïque vont permettre l'activation de gènes dorsalisants comme *Bmp4* (pour revue (Bertrand and Dahmane, 2006); (Hu et al., 2004; Rallu et al., 2002a) (Figure 7).

Il apparaît donc que la régionalisation dorso-ventrale du cerveau antérieur implique de multiples interactions entre les voies de signalisation impliquées dans ce processus. C'est un défaut de la régulation de ces voies au niveau de la ligne médiane qui va entraîner une holoprosencéphalie.



**Figure 8. Schéma de la segmentation du cerveau embryonnaire chez l'Homme.**

**A.** Les trois vésicules primaires (prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale) et la moelle épinière se différencient au niveau de la partie la plus antérieure du tube neural. **B.** La division du prosencéphale se fait ultérieurement pour donner le télencéphale et le diencéphale (D'après Sunderland, 2001).



**Figure 9. Représentation schématique du télencéphale**

**A.** Schéma du recouvrement du diencéphale par les vésicules télencéphaliques en vues latérale et ventrale. La ligne médiane (LM) traversant le télencéphale dorsalement et le diencéphale ventralement est représentée en pointillés gris **B.** Section transversale du cerveau antérieur. On distingue les deux vésicules télencéphaliques correspondant aux futurs hémisphères cérébraux. CC : cortex ; VI : ventricule latéral ; PC3V : plexus choroïde du 3ème ventricule ; PCVI : plexus choroïde du ventricule latéral ; EGL : éminence ganglionnaire latérale ; EGM : éminence ganglionnaire médiane ; Et : épithalamus ; Th : thalamus ; Ht : hypothalamus ; 3V : 3ème ventricule (D'après [www.embryology.ch](http://www.embryology.ch))

### 3. Segmentation du cerveau antérieur

Simultanément aux processus de régionalisation, le tube neural va se segmenter le long de l'axe antéro-postérieur (Figure 8A). L'encéphale présomptif dérivant de la plaque neurale rostrale va donner le prosencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur). La partie caudale du tube neural donnera la moelle épinière. Ensuite, le prosencéphale se divise en deux vésicules secondaires, le télencéphale et le diencephale. Le télencéphale se divisera le long de la ligne médiane pour donner les deux hémisphères cérébraux. Au niveau du diencephale se développeront l'hypothalamus, le thalamus, l'épithalamus, la rétine neurale et la glande pinéale. De son côté, le mésencéphale voit sa taille augmenter alors que le rhombencéphale se divise également en deux vésicules secondaires : le métencéphale et le myélocéphale (Figure 8B).

#### 3.1. Le télencéphale

##### 3.1.1. Morphologie du télencéphale

Le télencéphale est composé de deux vésicules latérales qui correspondent aux futurs hémisphères cérébraux. Elles sont séparées par la ligne médiane. La face ventrale des vésicules télencéphaliques fusionne avec les faces latérales du diencephale (Figure 9A).

La voute de chaque hémisphère formera le cortex cérébral alors que leur plancher formera les éminences ganglionnaires médiane et latérale (EGM et EGL). Les deux hémisphères sont joints sauf au niveau la scissure interhémisphérique en dorsal. La zone de raccordement avec le toit du diencephale est appelée plexus choroïde au niveau du 3<sup>ème</sup> ventricule et des ventricules latéraux (Figure 9B). Le télencéphale contient également les ébauches du système olfactif qui donneront les bulbes et tractus olfactifs ainsi que des structures qui y sont associées comme l'hippocampe. D'autre part, le télencéphale correspond à une région complexe du système nerveux et une spécification progressive de cette structure est nécessaire pour définir des populations cellulaires comme les oligodendrocytes ou les interneurones.



### 3.1.2. Formation du télencéphale

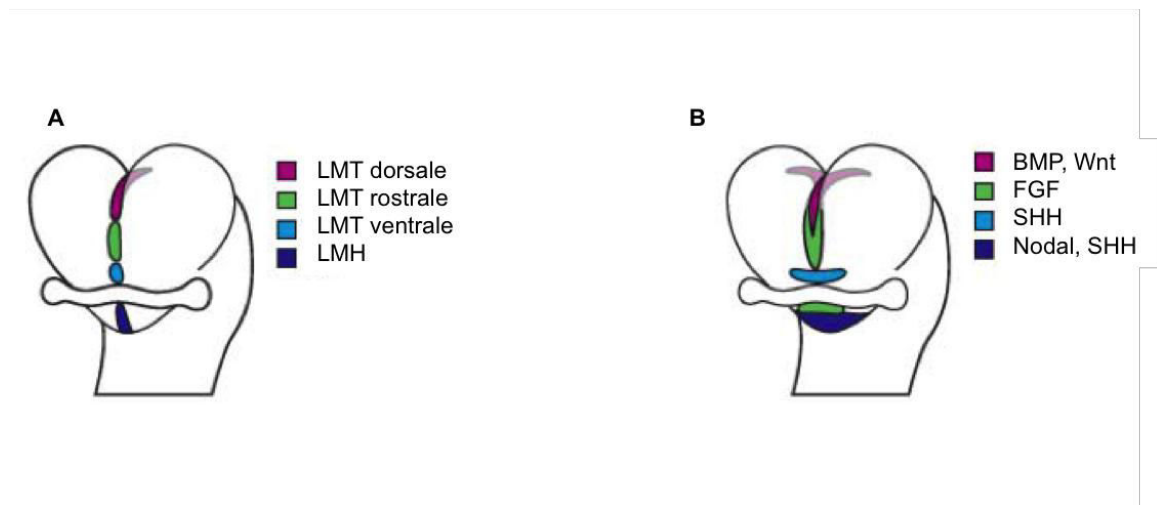
La régionalisation télencéphalique est dépendante de plusieurs centres de signalisation, dont le bord neural antérieur, et intègre les mêmes voies de signalisation que lors de la régionalisation de la plaque neurale. En effet, afin d'obtenir le télencéphale, un gradient d'activité Wnt persiste pour la segmentation selon l'axe antéro-postérieur du futur tube neural (Rallu et al., 2002a). Ceci a été illustré chez le poisson-zèbre où une absence d'activité de *Wnt8b* provoque une augmentation de la taille du télencéphale (Houart et al., 2002).

La régionalisation dorso-ventrale du télencéphale va quant à elle continuer de dépendre de l'antagonisme entre SHH et GLI3 (Rallu et al., 2002b). Ceci explique la diversité des phénotypes au niveau du télencéphale chez les souris partiellement déficientes pour des effecteurs de la voie Shh : réduction de la taille des vésicules, perte de tissus ventraux ou des éminences ganglionnaires (Ferri et al., 2013; Fotaki et al., 2011; Manuel et al., 2011).

La signalisation Nodal va également influencer l'expression de *Shh* pour le développement ventral du télencéphale. Des expériences d'inactivation de la signalisation Nodal chez le poisson-zèbre ont montré un défaut de formation du télencéphale ainsi qu'une absence d'expression de *Shh* (Rohr et al., 2001).

Par ailleurs, plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la régionalisation des vésicules télencéphaliques puis dans l'identité de certaines régions. C'est le cas du gène *Pax6* puisque lors d'une mutation perte de fonction, l'organisation dorso-ventrale du télencéphale est perturbée (Stoykova et al., 2000; Yun et al., 2001). De même le gène *Emx2* est important dans la mise en place de structures du cortex comme l'hippocampe, puis plus tardivement dans la neurogenèse du télencéphale dorsal (Yoshida et al., 1997). De façon intéressante, les patrons d'expression de *Pax6* et *Emx2* forment des gradients opposés dans le télencéphale dorsal et vont participer à l'acquisition de l'identité corticale de sous-domaines du télencéphale (Bishop et al., 2000). Dans le cas d'une déficience simultanée de ces deux gènes, on observe un excès de marqueurs de ventralisation des vésicules télencéphaliques.

D'autre part, *Pax6*, de la même façon que *Gli3*, est exprimé dorsalement et joue un rôle d'antagoniste à l'activité Shh. Il s'avère que chez les doubles mutants *Shh*<sup>-/-</sup>; *Pax6*<sup>-/-</sup>, on observe une restauration des structures ventrales de la même façon que chez les doubles



**Figure 10. Représentation des voies de signalisation dans le télencéphale en formation.**

**A.** Cartographie de la ligne médiane du télencéphale (LMT) ainsi que la ligne médiane de l'hypothalamus (LMH). **B.** Expression des différentes voies de signalisation au niveau de la ligne médiane du télencéphale. Nodal et Shh sont exprimés ventralement et rostralement, Fgf est exprimé au niveau ventral et antérieur de la ligne médiane alors que les voies Wnt et BMP sont exprimées dorsalement. (D'après (Monuki, 2007)).

mutants *Shh*<sup>-/-</sup>; *Gli3*<sup>-/-</sup> (Fuccillo et al., 2006). Ces résultats suggèrent que le gène *Pax6* posséderait un rôle complémentaire à *Gli3* dans la régionalisation du télencéphale.

La voie de l'acide rétinoïque est également cruciale pour le développement antérieur du télencéphale. Chez des embryons de cailles déficients en vitamine A, les signalisations Fgf et BMP sont perturbées. Ces embryons présentent des défauts de segmentation de la vésicule télencéphalique et de l'axe dorso-ventral du diencephale (Halilagic et al., 2003; Wilson et al., 2003).

La division du télencéphale en deux champs correspondant aux hémisphères dépend de la sécrétion de ligands par les structures médianes, NODAL, SHH et BMP. Cette étape sera déficiente en cas d'HPE (Currle et al., 2005; Hebert et al., 2002; Ohkubo et al., 2002). La signalisation Fgf est quant à elle principalement active dans la partie rostrale de la ligne médiane. Plus précisément, une boucle de régulation positive entre les voies Shh, Wnt et BMP ainsi que les protéines FGF8, ZIC2 et SIX3 se met en place au niveau de la ligne médiane pour séparer les vésicules télencéphaliques (Crossley et al., 2001; Kobayashi et al., 2010) (Figure 10).

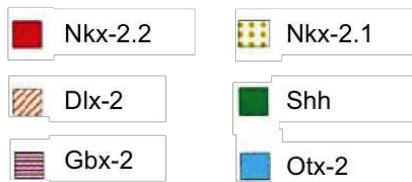
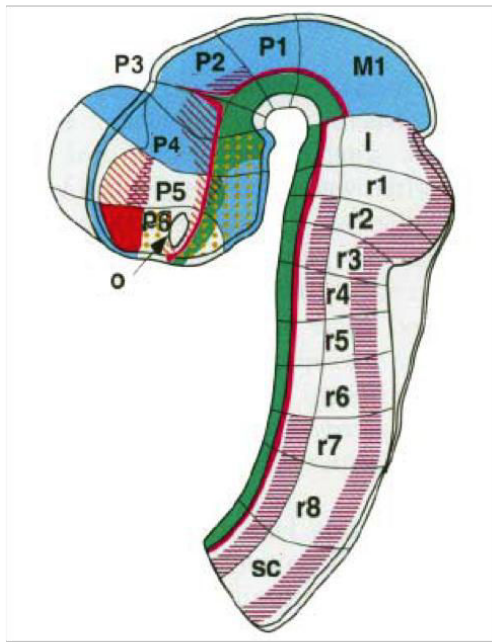
L'utilisation des modèles vertébrés ces 15 dernières années a montré de façon générale, que l'inhibition fonctionnelle d'acteurs des voies de signalisation, tel que l'acide rétinoïque, Shh, Fgf, Nodal ou BMP, conduit à des défauts de régionalisation dorso-ventrale du télencéphale et provoquent des défauts majeurs de cette structure (Arauz et al., 2010; Lana-Elola et al., 2011; Yang et al., 2010).

## **3.2. Le diencephale**

### **3.2.1. Morphologie et modèle prosomérique du diencephale**

Le diencephale est défini selon ce qu'on appelle le modèle prosomérique révisé par Rubenstein et Puelles en 2003 (Puelles and Rubenstein, 2003). Ce modèle détermine 6 prosomères selon les zones d'expression de six gènes : *Nkx2.2*, *Dlx2*, *Gbx2*, *Otx2*, *Shh* et *Nkx2.1* (Figure 11). Les prosomères vont ensuite donner lieu à trois organes distincts: le thalamus, l'épithalamus et l'hypothalamus en position ventrale. Le thalamus est constitué de

E10.5

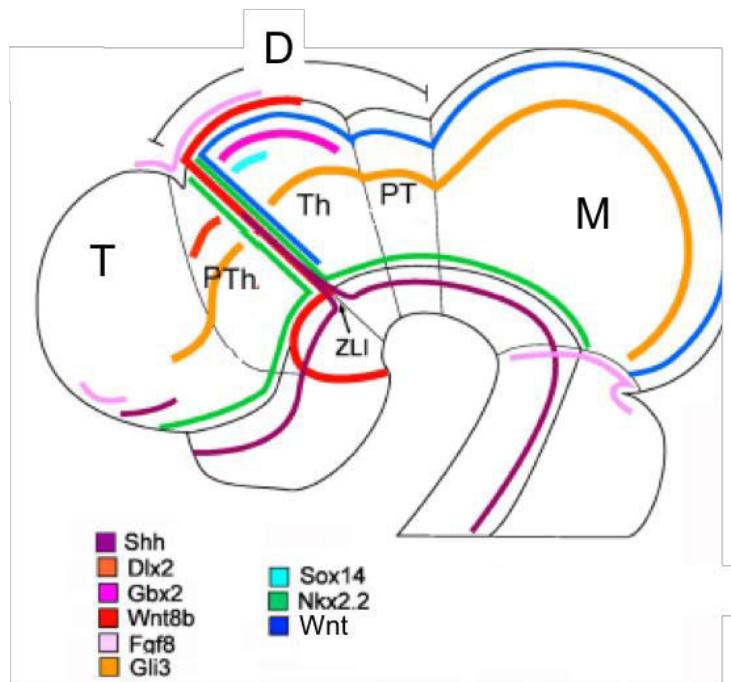


**Figure 12.** Représentation schématique des patrons d'expressions de facteurs de transcription et molécules de signalisation au sein du diencéphale.

Les patrons d'expression ont été observés chez l'embryon de poulet au stade HH23 et ont permis de déterminer plus précisément l'organisation du diencéphale. Shh est exprimé de façon ventrale et au niveau de la ZLI. Gli3 a une expression restreinte au niveau des plaques latérales du diencéphale. Dlx2 sera exprimé dans le préthalamus alors que Gbx2 et Sox14 sont exprimés dans des domaines thalamiques. La limite caudale du domaine d'expression de Gbx2 dans le prosomère 1 permet d'établir la frontière entre p1 et p2. Wnt3a va définir avec Gbx2 et Sox14 les territoires latéraux et basaux du diencéphale. Nkx2.2 est exprimé au niveau du neuroépithélium et va border l'expression de Shh au niveau de la ZLI. D : diencéphale ; M : mésencéphale ; T : télencéphale ; PT : pré tectum ; Th : thalamus ; PTh : préthalamus ; ZLI : zone limitans intrathalamica (Adapté de (Martinez-Ferre and Martinez, 2012)).

**Figure 11.** Représentation schématique des patrons d'expression des principaux gènes de molécules de signalisation ou de facteurs de transcription du diencéphale.

P1-P6 : prosomères 1 à 6 ; M1 : mésencéphale ; I : isthme ; r1-r8 : rhombomères ; sc : moelle épinière ; o : vésicule optique (Adapté de (Rubenstein et al., 1994))





noyaux neuronaux impliqués dans le traitement des informations sensorielles et motrices. L'épithalamus est divisé en deux structures principales qui sont le corps pinéal ou épiphyse et le plexus choroïde. L'hypothalamus sera divisé en quatre territoires qui contiendront des noyaux neuronaux spécifiques. Chacune de ces structures possède un champ ventral et un champ dorsal. C'est également à partir du diencephale que vont apparaître les ébauches optiques. Les vésicules optiques qui en dérivent s'invaginent au niveau de la future jonction du plancher et des faces latérales du diencephale.

### 3.2.2. Formation du diencephale

L'établissement de l'axe antéro-postérieur du diencephale est établi grâce à des centres organisateurs secondaires comme pour le télencéphale. C'est notamment la zone limitans intrathalamica (ZLI) située entre les prosomères 2 et 3 qui va sécréter des signaux nécessaires à la régionalisation. *Shh* est le principal gène exprimé dans la ZLI et va influencer sur la mise en place des structures thalamiques et définir la limite postérieure de l'hypothalamus (Blackshaw et al., 2010; Shimogori et al., 2010). D'une part, l'expression à l'état morphogène de SHH va permettre l'expression de gènes spécifiques ; par exemple, *Shh* induit l'expression des gènes *Sox14* et *Gbx2* au niveau du prosomère 2 (Hashimoto-Torii et al., 2003) (Figure 12). D'autre part, l'expression de *Shh* va être délimitée au niveau de la ZLI par des gènes tels que *Sim1*, *Dlx2* et *Nkx2.1* aux niveaux basal et latéral, *Wnt1* au niveau antérieur, *Fgf8* au niveau postérieur et *Nkx2.2* aux niveaux antérieur et postérieur (Figure 12).

Par ailleurs, SIX3 va aussi activer directement *Shh* au niveau de la ligne médiane rostro-ventrale du diencephale qui à son tour va y maintenir l'expression de *Six3*. En effet, chez des mutants *Six3*, la boucle de régulation est interrompue et va conduire à des défauts de séparation des champs oculaires, de la proéminence nasale et à une microcéphalie, caractéristiques du spectre HPE (Geng et al., 2008; Jeong et al., 2008).

L'identité dorso ventrale du diencephale est établie grâce aux mêmes signaux que ceux impliqués dans le télencéphale. Cependant au niveau de la ligne médiane, le caractère ventral va concerner principalement l'hypothalamus qui sera essentiellement sous l'influence de la voie de Shh et de ses gènes cibles tels *Nkx2.1* et *Nkx2.2*.

C'est le signal Shh graduel émanant du plancher du tube neural qui est nécessaire à la spécification de l'identité neurale ventrale du diencephale. Il permet également la



séparation correcte de la zone optique en deux domaines distincts (pour revue (Roessler and Muenke, 2010)). Plusieurs événements morphogénétiques vont permettre la formation des vésicules optiques (Crossley et al., 2001; Morcillo et al., 2006). Les deux protusions optiques se placent de chaque côté du diencephale entre la zone préoptique et l'hypothalamus antérieur. A ce niveau, l'activité Shh régule la transcription de gènes tels que *Pax6*, *Pax2*, *Vax1* et *Vax2* qui spécifient les pédoncules optiques, la rétine et l'identité de l'épithélium pigmentaire (Macdonald et al., 1995; Mui et al., 2005; Walther and Gruss, 1991; Walther et al., 1991).

#### 4. L'hypothalamus, structure ventrale du diencephale

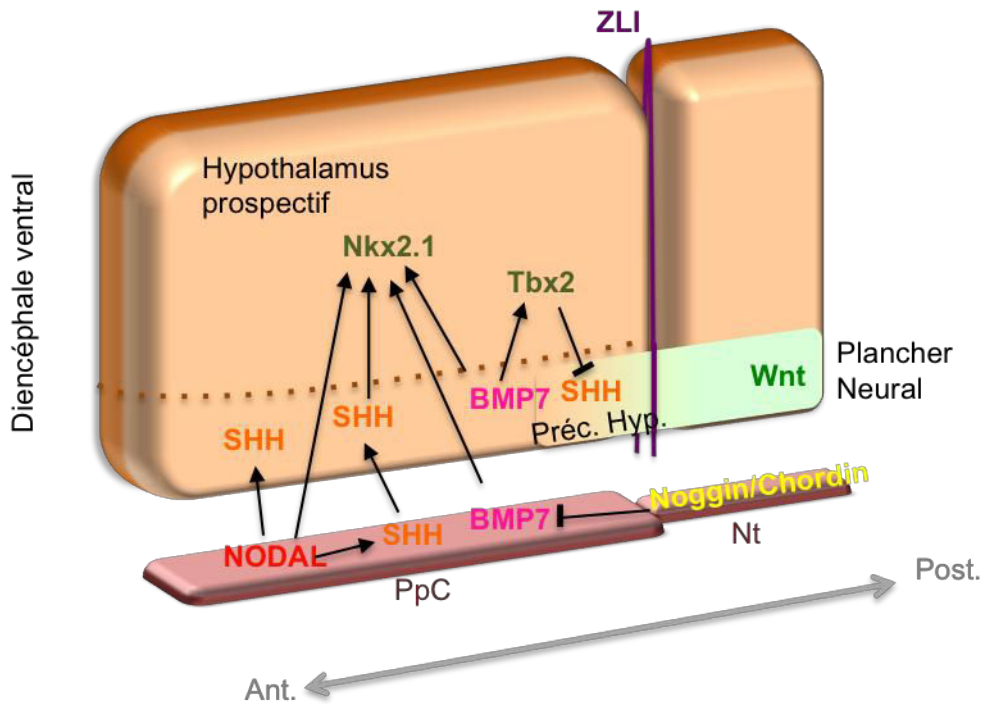
L'hypothalamus dérive de la région rostro-ventrale du cerveau antérieur et constituera la partie ventrale du diencephale. L'hypothalamus sera le siège des régulations neuroendocriniennes du cerveau comme le rythme circadien, l'appétit, la soif et les sécrétions hormonales. L'hypothalamus est constitué d'une douzaine de domaines ou noyaux qui vont réguler les fonctions endocriniennes de façon synchrone. Par exemple, c'est grâce à de multiples connections entre les noyaux hypothalamiques que les cycles circadiens sont intimement liés à l'alimentation et au métabolisme énergétique (Gooley et al., 2006).

##### 4.1. Induction de l'hypothalamus

Le développement de l'hypothalamus est très bien conservé chez les vertébrés et nécessite l'induction de nombreux types cellulaires. Comme pour la plupart des autres régions ventrales du système nerveux central ce sont les signaux Shh, Nodal, BMP et Wnt qui permettent la mise en place de l'hypothalamus présomptif puis la différenciation des précurseurs hypothalamiques.

###### 4.1.1. Rôle de SHH, BMP7 et TBX2

D'une part, il a clairement été démontré que lors de la perte de la signalisation Shh, le diencephale présente une réduction de sa taille et une absence des structures ventrales, dont les précurseurs hypothalamiques (Chiang et al., 1996; Ishibashi and McMahon, 2002). Inversement une augmentation de l'activité Shh chez le poisson-zèbre induit une expression ectopique de marqueurs hypothalamiques (Rohr et al., 2001). De plus, ce sont les



**Figure 13. Représentation schématique de la formation de l'hypothalamus.**

*L'action coordonnée de SHH, BMP7 et les antagonistes des BMP, CHORDIN et NOGGIN, est nécessaire à l'induction des précurseurs hypothalamiques (Préc. Hyp.). De même, NODAL, SHH et BMP7 sont essentiels à l'expression de Nkx2.1 dans le diencéphale ventral pour le développement de l'hypothalamus prospectif. Un gradient de signalisation antéro-postérieur des Wnt permet d'établir la division entre les précurseurs hypothalamiques et les cellules du plancher neural.*

*PpC : plaque préchordale ; Nt : Notochorde ; ZLI : zone limitans intra thalamica*

expressions coordonnées de *Shh* et *Bmp7* qui imposent un caractère ventral aux cellules de la ligne médiane rostrale précédemment induites par *Shh* (Figure 13) (Dale et al., 1997). De plus, *Bmp7* est également capable d'induire l'expression de *Nkx2.1*. Ce dernier va lui même jouer un rôle dans la maintenance de l'expression de *Shh* au sein de l'hypothalamus et est considéré comme le marqueur ventral de l'hypothalamus en développement (Figure 13) (Brand et al., 1996; Dale et al., 1997; Manning et al., 2006; Marin et al., 2002; Sussel et al., 1999).

Par ailleurs, *Shh* et *Bmp7* sont également exprimés au niveau de la notochorde mais cela ne conduit pas à une différenciation des cellules de la ligne médiane ventrale caudale en précurseurs hypothalamiques. Cette différence est due à l'expression d'inhibiteurs de *Bmp7*, CHORDIN et NOGGIN (Figure 13). En effet, chez les double mutants *Chordin*<sup>-/-</sup>; *Noggin*<sup>+/-</sup>, on observe un phénotype restreint au niveau de la tête de sévérité variable d'HPE (Bachiller et al., 2000 ; Anderson et al., 2002). En absence des antagonistes des BMP au niveau de la plaque préchordale, l'activité BMP est augmentée, provoquant une désorganisation des tissus antérieurs. La production des antagonistes CHORDIN et NOGGIN est donc essentielle au statut de centre organisateur de la plaque préchordale pour le diencephale.

Plus généralement, les BMP vont inhiber l'expression de *Shh* et activer l'expression de *Fgf10* au niveau de la ligne médiane ventrale postérieure de l'hypothalamus (Manning et al., 2006). Pour cela, la voie des BMP va activer le gène *Tbx2* codant pour un répresseur transcriptionnel de *Shh* (Pontecorvi et al., 2008). Manning et collaborateurs (2006) suggèrent de plus que la diminution d'expression de *Shh* au niveau de la ligne médiane est nécessaire à l'arrêt transitoire du cycle cellulaire de progéniteurs leur conférant plus tard une activité proliférative expansive.

#### 4.1.2. Action de Nodal

Des mutations des composants de la voie Nodal chez le poisson-zèbre provoquent des phénotypes similaires aux phénotypes des souris mutantes pour *Shh* tels que la cyclopie et l'absence de structures hypothalamiques (Schier and Shen, 2000). De plus, chez ces mutants, l'expression ectopique de *Shh* n'est pas suffisante pour récupérer la perte d'expression de *Nkx2.1*, gène spécifique de l'hypothalamus (Figure 13). Ceci suggère que *Shh* ne peut pas induire seul l'hypothalamus (Rohr et al., 2001). Toujours chez le poisson-zèbre, il a été démontré que le promoteur de *Shh* contenait des éléments activateurs



répondant à la signalisation Nodal qui pouvaient réguler son expression dans les cellules neuronales (Muller et al., 2000).

D'autre part, la signalisation Nodal serait nécessaire à la migration des précurseurs hypothalamiques de la zone ventriculaire vers les différents noyaux qui composent l'hypothalamus mais ce rôle reste encore controversé (Mathieu et al., 2002).

#### 4.1.3. Rôle du gradient Wnt

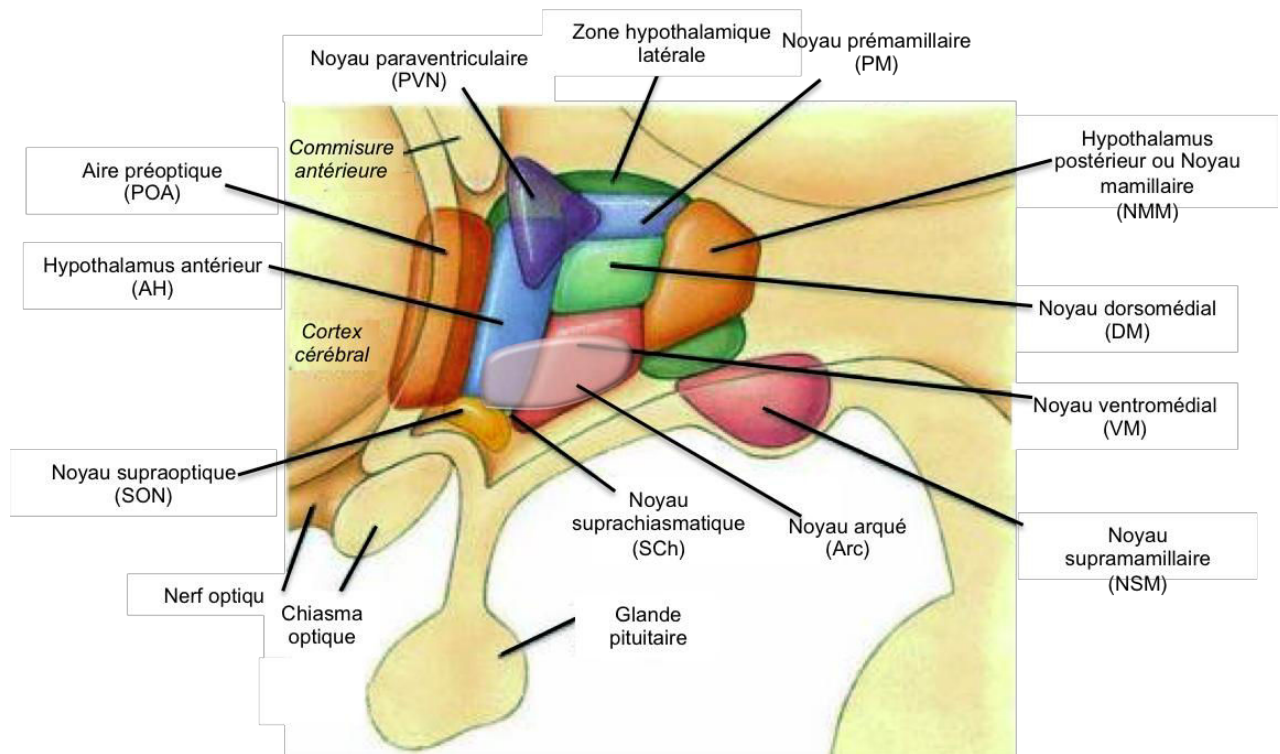
Manning et collaborateurs (2006) ont montré que l'expression du gène *Tbx2* dépendait de la voie des BMP au niveau de l'hypothalamus prospectif. Cependant, comme démontré chez le poisson-zèbre, un gradient d'inhibition de la voie Wnt semble déterminer le destin cellulaire hypothalamique (Kapsimali et al., 2004). En effet, l'utilisation d'un antagoniste de la voie Wnt (WIF : Wnt inhibitory factor) est suffisante pour restaurer l'expression de *Tbx2* au niveau d'explants où la signalisation BMP est bloquée. Les auteurs suggèrent que la voie des BMP pourrait inhiber l'activité Wnt au niveau de l'hypothalamus.

Par ailleurs, la déficience pour les molécules antagonistes de Wnt ou de répresseurs transcriptionnels de Wnt provoque des défauts de spécification du cerveau antérieur incluant l'hypothalamus. Seules les régions postérieures du tube neural seront observées confirmant un rôle de la voie Wnt au niveau de la région antérieure du tube neural (Hoch et al., 2009).

## 4.2. Spécification de l'hypothalamus

Selon son axe antéro-postérieur les noyaux hypothalamiques sont répartis en quatre groupes, préoptique, antérieur, médial et postérieur. Grâce à des études d'expression de gènes, ces noyaux ont pu être subdivisés en noyaux plus spécifiques (Shimogori et al., 2010). La plupart des noyaux hypothalamiques ont été identifiés au cours du développement embryonnaire même si les cellules qui les composent ne sont pas à leur position définitive. En effet, les cellules hypothalamiques migrent latéralement par rapport au troisième ventricule du télencéphale pour se différencier. La migration de ces précurseurs neuronaux hypothalamiques s'effectue le long de cellules spécialisées appelées cellules gliales radiales.

Dans la région la plus antérieure, l'aire préoptique (POA) régule l'équilibre électrolytique du corps, sa température ainsi que les hormones sexuelles (Saper, 2009). La



**Figure 14. Les différents noyaux de l'hypothalamus.**

*Représentation schématique en vue latérale des différents noyaux qui composent l'hypothalamus. L'hypothalamus embryonnaire se forme dans la partie rostro-ventrale du diencephale. Il est divisé en une région médiane et une région latérale. La région médiane est composée d'agrégats neuronaux dans quatre grandes zones selon l'axe antéropostérieur : préoptique, antérieure, tubérale et mamillaire. La région latérale va être principalement composée d'axones (D'après <http://www.diabetesobesity.net>.)*



POA possède une origine télencéphalique et va exprimer le marqueur télencéphalique FoxG1, ce qui la différencie des autres noyaux hypothalamiques (Figure 14). La POA exprime également *Shh* et *Nkx2.1* mais pas les autres cibles de Shh telles que *Nkx2.2* et *Nkx6.2* (Shimogori et al., 2010) qui seront cependant exprimés dans l'hypothalamus antérieur (AH) en partie caudale du POA (Puelles and Rubenstein, 2003; Shimogori et al., 2010). Au sein de la région antérieure de l'hypothalamus regroupant la POA et l'AH, plusieurs noyaux sont identifiés par Shimogori et collaborateurs (2010). Le noyau suprachiasmatique (SCh) en ventral, exprime le gène *Lhx1*, le noyau paraventriculaire (PVN) en dorsal relié latéralement au noyau supraoptique (SON) qui peuvent être identifiés par l'expression de *Otp* et *Sim1* (Shimogori et al., 2010). Ces noyaux contiennent les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus qui vont sécréter la vasopressine et l'oxytocine pour les relarguer directement dans la circulation sanguine. Les axones de ces neurones vont atteindre la glande pituitaire postérieure ou neurohypophyse (Saper, 2004).

Le SCh est impliqué dans la régulation du rythme circadien alors que les PVN et SON sont associés à la régulation de la sécrétion hypophysaire.

Dans sa partie médiale, l'hypothalamus tubéral va réguler la faim, le métabolisme énergétique, la réponse au stress et le cycle circadien (Saper, 2009). Il contient le noyau prémamillaire qui est également subdivisé en différentes régions toujours à partir des études d'expression de gènes (Figure 14). On distingue ainsi le noyau arqué (Arc) identifié par *Pomc*, le noyau ventromédial (VM) identifié par *Nr5a1*, le noyau dorsomédial (DM) identifié par *Lhx8* et la région prémamillaire (PM) par *Lef1* (Shimogori et al, 2010). La région PM régule les capacités reproductives (Donato et al., 2009). L'expression de tous ces acteurs chevauchent le domaine d'expression de *Nkx2.1* exprimé dans cette région en réponse à la signalisation Shh. Une zone hypothalamique latérale est également délimitée dans la partie tubulaire, qui exprime *Lhx9* et *Lhx6* (Shimogori et al., 2010).

Les noyaux PVN, Arc ainsi que la POA contiennent également des neurones neuroendocrines dites parvocellulaires qui sécrètent des hormones vers la glande pituitaire. En réponse par exemple à l'hormone corticotrope hypothalamique provenant de ces neurones, la glande pituitaire synthétise l'hormone adrénocorticotrope (ACTH).



Ces différents noyaux vont, comme le Sch, contrôler le rythme circadien mais également les fonctions de l'hypothalamus dans l'état de vigilance, la réponse au stress ou la faim (Saper, 2009).

Enfin dans sa partie caudale, *Shh* et *Nkx2.1* sont exprimés et le noyau mamillaire (NMM) se différencie par l'expression des gènes *Otp*, *Sim1* et *Foxb1* (Shimogori et al., 2010). Le dernier noyau de l'hypothalamus est situé entre la partie caudale de la zone mamillaire et la partie rostrale de la ZLI. C'est le noyau supramamillaire (NSM) qui est identifié par l'expression d'*Irx5* (Shimogori et al., 2010). La région caudale de l'hypothalamus est critique pour les capacités de mémoire, d'éveil et d'intervention en situations urgentes (Vann and Aggleton, 2004).

Chacun de ces noyaux va réguler une ou plusieurs fonctions de l'hypothalamus et possède au cours du développement embryonnaire des groupes de progéniteurs neuraux qui pourront sécréter des hormones spécifiques.

D'autre part, le rôle de plusieurs facteurs de transcription est aujourd'hui identifié dans la spécification neuroendocrine de l'hypothalamus. En effet, *Brn2* va permettre la production des hormones AVP, OT et CRH (Nakai et al., 1995; Schonemann et al., 1995). La génération des neurones AVP, OT, CRH (corticotropin-releasing hormone), TRH (thyrotropin-releasing hormone) et SS (somatostatine) va dépendre des gènes *Sim1*, *Sim2*, *Arnt-2* et *Otp* (Caqueret et al., 2005; Hosoya et al., 2001; Wang and Lufkin, 2000). La synthèse de la GHRH (Growth hormone releasing hormone receptor) dépend de l'expression du gène *Gsh1* (Li et al., 1996) et plus récemment semble être influencé par le facteur à homéoboite *Bsx* (McArthur and Ohtoshi, 2007).

#### **4.3. Guidage axonal des neurones de l'hypothalamus ventral**

Afin de connecter les différentes structures du cerveau et permettre la circulation des informations entre elles, une architecture axonale est nécessaire. Il a été décrit une architecture axonale « pionnière » au sein du cerveau antérieur en développement, relativement bien conservée entre les vertébrés (Easter et al., 1993; Mastick and Easter, 1996; Ware and Schubert, 2011). Cette structure correspond au tractus ventro-longitudinal qui est composé du faisceau médio-longitudinal (MLF) et du tractus de la commissure post-optique (TPOC). Le MLF dérive des neurones de la frontière entre le cerveau antérieur et le cerveau moyen et le TPOC dérive des neurones de l'hypothalamus rostro-ventral. Les



neurones de l'hypothalamus ventral contribuent à la formation de la commissure post-optique avec l'aide des neurones du thalamus ventral et du chiasma optique. De nombreuses molécules de signalisation ont été identifiées pour permettre la formation des tractus puis pour conduire les projections axonales de divers neurones au travers. Par exemple, les premiers axones des neurones MCH (melanin-concentrating hormon) de l'hypothalamus sont guidés grâce à la NETRINE1 et SLIT2 dans le TPOC pour ensuite rejoindre le MLF (Croizier et al., 2011). De façon plus générale, la signalisation Slit/Robo permet le positionnement dorso-ventral des axones du TPOC et vont servir de guide aux projections axonales au niveau de la commissure médiane (Long et al., 2004; Ricano-Cornejo et al., 2011). Le guidage des axones du TPOC semble également dépendre de PAX6 ainsi que de molécules d'adhérence comme les cadhérines (Andrews and Mastick, 2003; Nural and Mastick, 2004).

D'autre part, des études chez le poisson-zèbre ont montré le rôle de la voie Shh dans la formation des noyaux du TPOC. En effet, chez des mutants pour le gène *Smoothened* (*smo* : *slow muscle omitted*), le TPOC se développe de façon aberrante et n'atteint pas son territoire cible. Bien que les neurones hypothalamiques se développent correctement dans le noyau TPOC, la commissure post-optique ne se forme pas (Varga et al., 2001).

#### 4.4. Pathologies associées

Des défauts de développement de l'hypothalamus semblent perturber le contrôle de sécrétion des neuropeptides hypothalamiques dans l'organisme. Cela pourrait potentiellement induire des pathologies telles que l'obésité, l'hypertension ou le diabète (Caqueret et al., 2005; Krude et al., 1998; Michaud, 2001; O'Rahilly, 2009). Des dysfonctionnements neuroendocriniens joueraient également un rôle dans des formes d'autisme et autres troubles du comportement (pour revue (Kelemenova and Ostatnikova, 2009)).

Cependant, des pathologies du développement du cerveau précoce ont également montré des perturbations ou des malformations de l'hypothalamus. Par exemple, dans le cas d'une dysplasie septo-optique, des défauts pituitaires, du nerf optique et de la ligne médiane du prosencéphale sont observés. Dans ce cas, il s'avère que la source hypothalamique de Shh, qui assure le maintien de l'expression génique nécessaire au

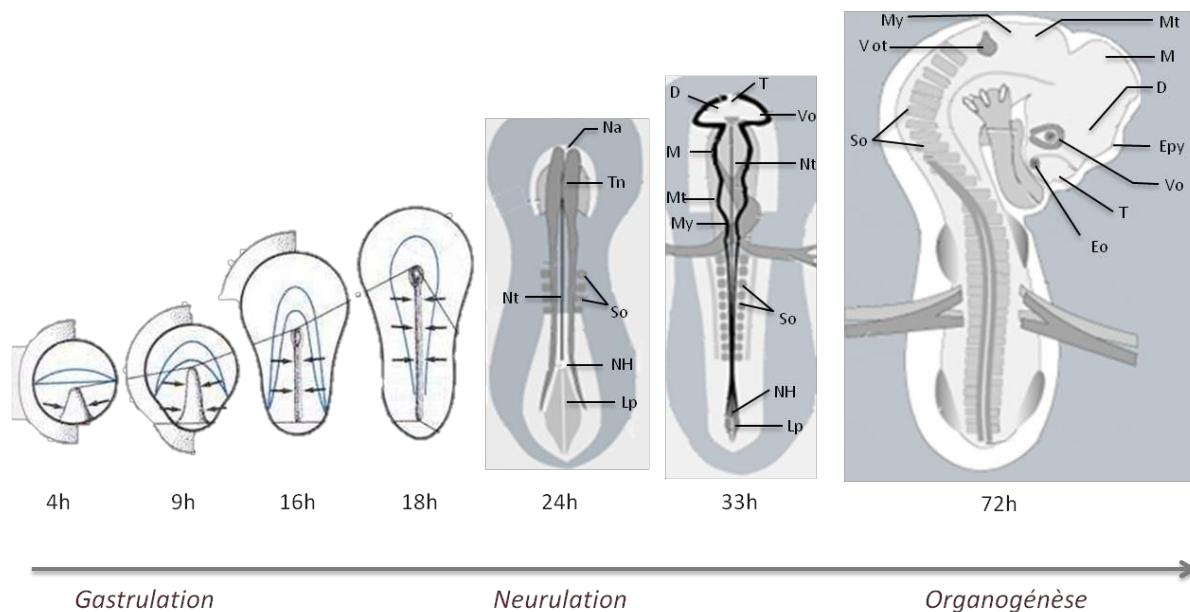


développement pituitaire et des vésicules optiques, est déficiente (Zhao et al., 2010; Zhao et al., 2012). Un des principaux gènes impliqués dans les cas de dysplasie septo-optique est le gène à homéoboite *HESX1* (McCabe et al., 2011). *HESX1* est exprimé au niveau de la ligne médiane de l'hypoblaste et joue un rôle déterminant dans le développement de la région pituitaire.

Chez les patients HPE, les malformations de l'hypothalamus peuvent conduire à une dérégulation du contrôle de la température corporelle et un déséquilibre électrolytique pouvant entraîner des convulsions (Solomon et al., 2010). Parmi les patients HPE vivants, 70% souffrent de diabète insipide en raison d'un déficit de l'hormone antidiurétique, la vasopressine, synthétisée normalement par l'hypothalamus (Hahn et al., 2005). Hahn et collaborateurs (2005) ont montré que la sévérité du diabète insipide était corrélée au degré de non-séparation des lobes de l'hypothalamus chez des patients HPE.

Par ailleurs, plusieurs études chez des patients HPE montrent que lors de mutations perte de fonction du gène *GLI2*, cible de la voie Shh, les patients pouvaient présenter des anomalies de l'hypophyse antérieure et/ou un hypopituitarisme perturbant alors le système hypothalamo-hypophysaire (Bertolacini et al., 2010; Franca et al., 2010; Roessler et al., 2003).

D'autre part, de sévères défauts de la ligne médiane sont observés et sont associés à une HPE chez des embryons de souris porteurs de l'allèle hypomorphe ou nul pour *Fgf8*. Chez ces embryons les anomalies de la fonction endocrinienne de l'hypothalamus résultent d'une diminution des neurones arginine vasopressine et oxytocine dans les noyaux NSO, NSC et NPV (McCabe et al., 2011). Ces derniers travaux ont permis de faire un parallèle avec des patients atteints d'HPE et porteurs de mutation du gène *FGF8*. En effet, des défauts au niveau de l'hypothalamus sont fréquemment observés dans le spectre de cette pathologie. L'étude anatomique de l'hypothalamus au cours du développement embryonnaire ainsi qu'à la naissance constitue donc un outil diagnostique important pour l'HPE (Hahn and Barnes, 2010; Simon et al., 2000).



**Figure 15. Etapes du développement embryonnaire chez le poulet de 4h à 72h.**

Dès les premières heures de la gastrulation le blastoderme s'allonge dans le sens antéropostérieur et permet la formation de la ligne primitive et du nœud de Hensen à son extrémité. La ligne primitive s'allonge de 4h à 18h puis régresse jusqu'à disparaître (72h). A la fin de la gastrulation, une zone de prolifération au niveau du nœud de Hensen va permettre la formation de la notochorde. Au niveau des parois de la ligne primitive se forment les mésodermes latéraux et somitiques de l'embryon. Les plis neuraux permettent la formation du tube neural vers 24h et le neuropore antérieur permet sa fermeture vers 30-33h d'incubation isolant le cerveau antérieur. L'embryon va commencer à subir une rotation de sa partie antérieure vers la gauche et les vésicules cérébrales se différencient. L'organogénèse s'intensifie à partir de 72h d'incubation.

D : diencéphale ; Eo : épithélium olfactif ; Epy : épiphyse ; Lp : ligne primitive ; M : mésencéphale ; Mt : métencéphale ; My : myélocéphale ; Na : neuropore antérieure ; NH : nœud de Hensen ; Nt : notochorde ; So : somites ; Vo : vésicules optiques ; Vot : vésicules olfactives ; T : télencéphale ; Tn : tube neural (Adapté de (Le Moigne, 1997) et DevBio.net).



## 5. Modèles animaux

Lors de mes travaux de thèse j'ai principalement utilisé le modèle d'embryon de poulet propice aux études embryologiques fondamentales. En effet, l'embryon de poulet est très accessible et des outils génomiques sont maintenant disponibles. Le développement embryonnaire précoce est très similaire entre les vertébrés. Il est donc judicieux de travailler sur ce modèle où les mécanismes moléculaires étudiés pourront être transposés par la suite au développement embryonnaire humain.

### 5.1. Modèle d'embryon de poulet

La classification d'Hamburger et Hamilton (Hamburger and Hamilton, 1992) établit dans le temps les stades de développement embryonnaire et les structures associées observables. Cette classification sera utilisée pour nommer les différents stades chez l'embryon de poulet. Le développement rapide de l'embryon de poulet au cours des stades précoces constitue également un atout important. En effet, après seulement deux jours d'incubation (HH5), les différents axes de symétrie sont en place et la neurulation débute.

Le développement du système nerveux a été très étudié chez le poulet et est très similaire à celui de la souris et de l'homme. Il existe cependant une différence majeure. En effet, c'est l'hypoblaste qui est responsable de l'induction neurale antérieure chez l'embryon de poulet alors que ce rôle est joué par l'EVA chez les mammifères (de Souza and Niehrs, 2000). Alors que l'hypoblaste et l'EVA diffèrent par leur composition cellulaire, l'étude de l'expression des marqueurs moléculaires tels que *Nodal* et ses antagonistes *Lefty* et *Cerberus*, révèle leur équivalence (Beddington and Robertson, 1999). L'hypoblaste va donc comme l'EVA préserver la plaque neurale antérieure des facteurs caudalisants.

Au cours de la neurulation, le tube neural se referme antérieurement autour de 30-33h de développement (HH10) puis postérieurement après 44h (HH12). L'embryon va ensuite perdre son aspect plan et subir une rotation de la partie antérieure lors du développement des vésicules cérébrales (HH14) (Figure 15).

### 5.2. Intérêt du modèle d'embryon de poulet

La large taille de l'embryon et sa morphologie plane jusqu'à la segmentation des vésicules cérébrales, font de l'embryon de poulet un modèle facilement observable pour des



études *in vitro* et *in vivo*. Des ablations ou greffe de structure *in ovo* sont réalisables afin de déterminer leur rôle au cours du développement. C'est d'abord chez l'embryon de poulet que le rôle de la plaque préchordale a été mis en évidence dans la régionalisation du prosencéphale. En réalisant une ablation de la plaque préchordale, Pera et Kessel ont produit des embryons développant une cyclopie caractéristique du phénotype HPE (Pera and Kessel, 1997) (Figure 3). L'organisation plane de l'embryon au cours du développement précoce permet également d'utiliser des techniques comme l'électroporation. De plus, sa transparence en fait un modèle très utilisé pour l'analyse d'expression de gènes par hybridation *in situ*. Des cultures d'embryons *ex ovo* en roller sont également réalisables et permettent de traiter un grand nombre d'embryons avec des molécules spécifiques aux stades de développement souhaités (Dupé and Lumsden, 2001). Le génome du poulet est séquencé depuis 2004 et de nombreux outils génomiques sont mis à disposition comme des puces à ADN (Li et al., 2008).

### 5.3. Modèle d'embryon de souris

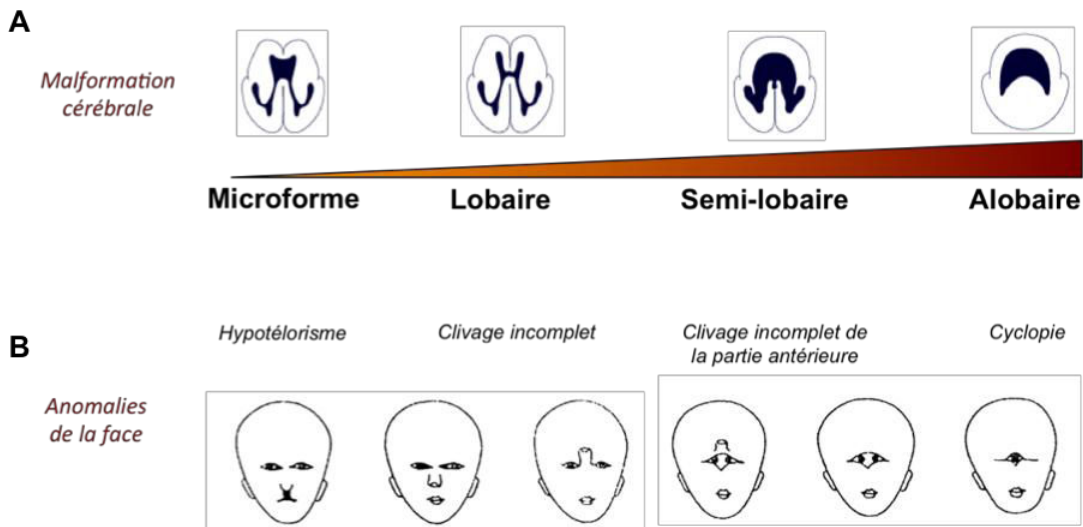
Pour étudier les mécanismes du développement embryonnaire le modèle souris est incontournable. En effet, les outils de transgénèse qui ont été développés pour ce modèle permettent maintenant de définir la fonction d'un gène dans un tissu donné ou à un stade donné du développement.

Il est important de noter que les blastulae chez l'Homme, la souris et le poulet sont similaires au niveau de la formation des futurs tissus embryonnaires à partir d'un seul épithélium. Cependant ce dernier est plan chez l'Homme et le poulet mais forme une coupe chez la souris. Elle renferme l'endoderme viscéral antérieur (EVA) (Beddington and Robertson, 1999). Le nœud primitif va générer comme les autres centres organisateurs des vertébrés la ligne médiane de l'embryon avec la plaque préchordale et la notochorde. Des signaux de ces cellules vers l'épiblaste permettront l'induction de la tête. La plaque préchordale est la structure la plus conservée au sein des vertébrés dans les mécanismes d'induction de la tête ce qui nous permet de réaliser des parallèles entre organismes modèles (de Souza and Niehrs, 2000).

A la fin de ma thèse, j'ai lancé la production d'embryons de souris au sein de l'équipe afin d'apporter une validation supplémentaire aux résultats que j'ai obtenu chez l'embryon de poulet. Une correspondance des stades de développement est établie entre les deux



modèles et il est ainsi possible d'étudier les mêmes processus (HH12 chez le poulet correspond au stade E10.5 chez la souris). Cependant, les résultats étant très préliminaires, ils ne seront pas présentés dans ce travail.



**Figure 16. Représentation des différentes formes principales d’HPE.**

**A.** Sévérité croissante des malformations cérébrales identifiées pour l’HPE. **B.** Les différentes anomalies de la face observées chez des patients HPE allant d’un hypotélorisme à la cyclopie. (Adapté de Nishimura and Okamoto, 1976).

	HPE alobaire	HPE semilobaire	HPE lobaire	Microformes
<b>Scissure interhémisphérique</b>	Absence complète	Postérieure uniquement	Postérieure et hypoplasique en région antérieure	Absence en régions frontales et pariétales postérieures
<b>Ventricules</b>	Unique	Cornes antérieures absentes, petit 3 <sup>ème</sup> ventricule	Cornes antérieures rudimentaires, 3 <sup>ème</sup> ventricule formé	Cornes antérieures normales ou hypoplasiques, 3 <sup>ème</sup> ventricule formé
<b>Noyaux gris centraux</b>	Très souvent fusionnés	Partiellement fusionnés	Fusion variable	Séparés
<b>Hypothalamus</b>	Toujours fusionnés	Très souvent fusionnés	Souvent fusionnés	Séparés

**Tableau 1. Exemples de signes radiologiques des formes classiques d’HPE.**

(D’après (Hahn and Barnes, 2010)).

## II. L' Holoprosencéphalie, une pathologie du cerveau antérieur

### 1. Définition

L'Holoprosencéphalie (HPE) correspond à une malformation congénitale cérébrale qui affecte le développement du cerveau antérieur très précocement. L'HPE résulte d'un défaut de différenciation de la ligne médiane entraînant une anomalie de clivage des deux hémisphères cérébraux au niveau du prosencéphale. L'HPE est considérée comme la plus fréquente des malformations congénitales du cerveau puisque retrouvée dans 1 cas sur 250 produits d'avortements (Orioli and Castilla, 2010) tous types confondus et dans 1 cas pour 16 000 naissances (Cohen, 1989; Ming and Muenke, 1998; Ming et al., 1998; Muenke and Cohen, 2000). Cette importante différence de fréquence reflète une incompatibilité entre la vie et les HPE sévères.

### 2. Sévérité et classification anatomique

L'HPE englobe divers phénotypes avec des niveaux de sévérité variables. Trois grands types d'HPE ont été définis et sont classés selon leur degré de gravité (Demyer and Zeman, 1963) (Figure 16). A la vue de l'étendue du spectre phénotypique de l'HPE, une classification anatomique a été adoptée pour répertorier les malformations associées au degré de sévérité et ainsi améliorer le diagnostic prénatal. Par exemple, la neuro-imagerie a permis d'affiner le spectre de l'HPE et d'associer plus précisément certains aspects cérébraux aux différentes formes (Tableau 1) (Hahn and Barnes, 2010).

La forme alobaire constitue la forme la plus sévère de l'HPE et est due à une absence totale de division des lobes. Elle entraîne une microcéphalie, l'absence de séparation des hémisphères cérébraux ou encore la fusion ou l'absence d'annexes cérébrales (corps calleux, thalamus). Cette forme d'HPE englobe un large spectre d'anomalies de la face comme une absence de nez, la présence d'un proboscis (trompe descendant entre les orbites) ou une ethmocéphalie caractérisée par un hypotélorisme grave. Dans les formes les plus sévères, il est décrit une cyclopie en référence aux créatures mythologiques possédant un œil unique.





La forme semi-lobaire est moins sévère mais les anomalies associées sont équivalentes. On observe également la présence d'un ventricule unique bien qu'une scissure intrahémisphérique soit visible au niveau postérieur. Les annexes cérébrales comme les bulbes olfactifs sont peu ou mal développées et de nombreuses malformations de la face ont été décrites (Mercier et al., 2011).

La forme lobaire correspond à la forme la moins sévère car les hémisphères cérébraux sont séparés. Cependant les lobes frontaux sont toujours légèrement fusionnés au niveau ventral et les annexes cérébrales peuvent également être fusionnées ou absentes. En termes de malformations faciales, on observe des anomalies plus modérées comme un hypotélorisme ou une incisive médiane unique. On distingue également des microformes d'HPE pour lesquelles les anomalies vont être plus subtiles mais relèvent du spectre HPE. Cela comprend par exemple, la fente palatine, l'absence de bulbes olfactifs ou une agénésie du corps calleux (Figure 16).

### **3. Pronostic**

Les patients atteints d'HPE ont une mortalité élevée. Les fœtus porteurs de la forme alobaire, avec des anomalies très sévères comme la cyclopie, ne survivent généralement pas au delà de la première semaine de vie et dans les cas d'anomalies moins sévères les enfants décèdent dans les 4-5 premiers mois à une année. Les patients porteurs d'une microforme ont une espérance de vie identique à la population générale (Solomon et al., 2010).

### **4. Etiologie de l'HPE**

L'HPE d'origine génétique a longtemps été considérée comme une maladie à transmission autosomique dominante, à pénétrance incomplète. Aujourd'hui, les nombreuses études épidémiologiques sur des cohortes de patients et les modèles animaux nous ont amenés à envisager un autre mode de transmission.

En effet, l'hypothèse d'une maladie multigénique semble plus probable. On répertorie aujourd'hui des causes exogènes et/ou génétiques comme responsable de l'apparition de l'Holoprosencéphalie. Cela définit un modèle pour l'HPE dit « multi-hit » car plusieurs événements d'origine différente peuvent intervenir dans l'apparition de la pathologie (Mercier et al., 2011; Roessler and Muenke, 2010).



Au niveau environnemental, certaines pathologies maternelles comme le diabète (Barr et al., 1983) ou l'exposition de façon générale à des produits tératogènes comme l'acide rétinoïque ou l'alcool (Cohen and Shiota, 2002) peuvent augmenter la susceptibilité à l'apparition d'une HPE chez le fœtus. Par exemple, des souris femelles absorbant des dérivés d'alcool produisent des embryons avec de nombreuses anomalies cranio-faciales et des déficiences de structures du cerveau avec une vésicule télencéphalique unique (Rogers et al., 2004). Récemment, une étude a présenté que l'éthanol était effectivement un facteur de risque de l'HPE chez les individus génétiquement prédisposés. Ils ont pour cela généré un modèle murin déficient pour un effecteur de la voie Shh, très impliquée lors de la formation du cerveau antérieur, afin d'évaluer les facteurs de risque environnementaux de l'HPE (Bae et al., 2011).

On distingue également des cas d'HPE dite syndromique lorsqu'elle est associée à d'autres syndromes polymalformatifs dont les plus fréquemment retrouvés sont : le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (Weaver et al., 2010) et le syndrome CHARGE (Colombomata, Heart defect, choanal Atresia, growthand/or developmental Retardation (Lin et al., 1990)).

Des anomalies chromosomiques sont aussi identifiées dans environ 20% des cas d'HPE. On retrouve principalement des cas d'aneuploïdie où le plus fréquemment sont observées des trisomies 13 et 18 ainsi que des cas de triploïdie (Epstein et al., 1988).

Par ailleurs, on distingue les cas d'HPE dite d'origine génétique. La cartographie des délétions chez des patients HPE a facilité l'identification des premiers gènes liés à l'HPE. Par la suite, des travaux de recherche ont démontré une fréquence élevée de microdélétions ou mutations ponctuelles pour ces gènes (Bendavid et al., 2006). Deux catégories de gènes ont ainsi été déterminées : les gènes dits « majeurs », *SHH*, *ZIC2*, *SIX3* et *TGIF*, que l'on retrouve dans plus de 1% des cas d'Holoprosencéphalie diagnostiqués (Solomon et al., 2010). Parmi ceux-ci, *SHH* est considéré comme le gène majeur car retrouvé dans 12% des cas. Puis les gènes mineurs tels que *PTCH1*, *GLI2*, *NODAL* ou *FGF8*, dont la fréquence d'apparition est inférieure à 1%. Tous ces gènes sont retrouvés à l'état hétérozygote (Arauz et al., 2010; Belloni et al., 1996; Dubourg et al., 2007; Roessler et al., 1996). La majorité de ces gènes est clairement identifiée dans des processus du développement du cerveau antérieur et appartiennent tous aux voies de signalisation précédemment décrites (Chapitre I).



En effet, la voie Shh régule le développement du cerveau antérieur et une déficience de Shh ou des composants de sa cascade de signalisation conduit à la formation d'HPE (pour revue (Briscoe and Thérond, 2013)). En outre, les autres voies de signalisation vont avoir une incidence sur l'holoprosencéphalie comme la voie Nodal. L'utilisation des modèles vertébrés a permis d'établir le rôle normal des gènes HPE et de déterminer comment leur perturbation peut entraîner une pathologie chez l'Homme. Les 13 gènes liés à l'HPE jouent des rôles cruciaux au sein de trois grandes voies de signalisation Nodal, Shh et Fgf ou interagissent avec elles lors du développement

#### 4.1. La voie Shh, majeure dans d'Holoprosencéphalie

Le ligand Sonic Hedgehog (SHH), le récepteur PATCHED homologue 1 (PTCH1) et les cofacteurs DISPATCHED (DISP), CDON et GAS1 sont nécessaires à l'activité de la voie de signalisation Shh et ont été retrouvés dans des cas d'HPE.

Le gène **SHH**, situé en 7q36, fut le premier gène HPE identifié. En effet, la mutation retrouvée à l'état hétérozygote dans 5 familles multiplex à transmission dominante de l'HPE a rapidement confirmé son implication (Belloni et al., 1996; Roessler et al., 1996). Aujourd'hui, une centaine de mutations uniques dans le gène **SHH** a été identifiée pour leur implication dans l'HPE (Mercier et al., 2011; Roessler et al., 2009a). Il s'agit notamment d'anomalies du cadre de lecture, de mutations non-sens et faux-sens dans des domaines fonctionnels ou conservés.

Des anomalies dans la voie Shh sont la cause la plus fréquente d'apparition d'HPE. En ce sens, le gène **SHH** est considéré aujourd'hui comme le gène majeur de l'Holoprosencéphalie avec des anomalies retrouvées dans environ 12 % des cas. De façon surprenante, les mutations ou délétions hétérozygotes du gène **SHH** chez les patients atteints sont héritées dans environ 70% des cas. Comme décrit dans les chapitres précédents, son inactivation fonctionnelle chez la souris provoque à l'état homozygote un phénotype HPE alors que les animaux hétérozygotes ne présentent pas d'anomalies (Chiang et al., 1996; Hayhurst and McConnell, 2003).

Par ailleurs, la voie de signalisation Shh jouerait un rôle dans les ciliopathies, pathologies affectant le développement du système nerveux central. En effet, des anomalies de formation ou de fonctionnement de cils primaires réduisent la signalisation Shh dans le tube neural chez la souris (Abdelhamed et al., 2013).



Des mutations chez des patients ont également été identifiées dans le gène **PTCH1** qui code pour PATCHED1 un récepteur de SHH (Ming et al., 2002). PATCHED1 est également un inhibiteur de SMOOTHENED (SMO) responsable de l'activation des gènes cibles de la voie SHH (cf Chapitre I.1.2.1). Plusieurs mutations **PTCH1** sont liées à l'HPE, dont deux dans le domaine extracellulaire au niveau de la séquence interagissant avec le ligand SHH. Deux autres mutations se trouvent dans les domaines intracellulaires qui pourraient être nécessaire à l'interaction entre PTCH1 et SMO.

Par ailleurs, plusieurs cofacteurs nécessaires à la signalisation Shh ont été impliqués dans l'HPE. Tout d'abord, le gène **DISP** codant pour la protéine DISPATCHED est nécessaire à la libération de Shh de son lieu de synthèse. Des mutations tronquantes ainsi que des délétions ont été identifiées chez des patients porteurs de microformes (Roessler et al., 2009a). Bien que **DISP** possède un patron d'expression étendu, il est enrichi dans les régions de signalisation Shh élevée comme la plaque neurale, la notochorde et le cerveau antérieur ventral. Chez la souris et le poisson-zèbre, une perte de fonction de *Disp* entraîne un phénotype typique d'une carence de SHH (Caspary et al., 2002; Kawakami et al., 2002; Nakano et al., 2004).

Ensuite des mutations du gène **GAS1** ont été récemment décrites par une équipe Brésilienne dans des cas d'HPE et deux cas ont également été répertoriés en association avec une mutation dans le gène **SHH** ou **ZIC2** (Pineda-Alvarez et al., 2012; Ribeiro et al., 2010). Le gène **GAS1** code pour un corécepteur de la voie Shh se liant avec PTCH1. **GAS1** (*Growth arrest-specific 1*) a été initialement décrit pour son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire en G(0)/G(1). Cependant, notre équipe a réalisée le séquençage de **GAS1** sur une cohorte de 100 patients porteurs d'un phénotype HPE mais aucune mutation n'a pu être identifiée (communication personnelle).

Un autre corécepteur de SHH, **CDON** présente des mutations qui semblent prédisposer à l'apparition d'une HPE. Sa liaison avec PTCH1 et GAS1 est nécessaire à l'activation de la voie Shh (Bae et al., 2011). En combinant des facteurs environnementaux comme la prise d'éthanol avec des mutations de *Cdon* chez des souris il est possible d'augmenter la susceptibilité à l'HPE (Hong and Krauss, 2012).

Des mutations perte de fonction de **GLI2**, le principal effecteur de Shh, entraînent un phénotype d'HPE associé à des anomalies de l'hypophyse antérieure ou un hypopituitarisme (Roessler et al., 2003).





## 4.2. La voie Nodal

De la même façon que pour Shh, des gènes de la voie Nodal ont été associés dans quelques cas d'HPE. La présence de mutations dans des gènes de la voie Nodal reste rare chez les enfants HPE vivants (Roessler et al., 2008) indiquant que les embryons avec un défaut sévère de signalisation Nodal ne sont probablement pas viables. En effet, le gène **NODAL** est fortement impliqué dans la spécification de la plaque préchordale où il induit l'expression de *SHH* mais également dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Les études sur les modèles animaux suggèrent que cette voie est particulièrement essentielle dans les tous premiers stades de développement (Carp, 2008).

**FOXH1** (ou *FAST1*) code pour un facteur co-transcriptionnel capable de lier les protéines SMAD2/4 intervenant dans la voie Nodal. Les souris mutantes pour *Foxh1* ne présentent pas de plaque préchordale ni de notochorde. Leur cerveau antérieur est sévèrement hypoplasique (Hoodless et al., 2001). De même, chez le poisson-zèbre, des mutations ont été identifiées pour *foxh1* et provoquent la perte ou la diminution de la plaque préchordale, causant de sévères défauts du cerveau antérieur entrant dans le spectre HPE (Brand et al., 1996; Schier et al., 1996). Parmi les mutations de *FOXH1* identifiées chez les patients HPE certaines perturbent le domaine Forkhead de liaison à l'ADN ainsi que les domaines d'interaction avec les protéines SMAD (Roessler et al., 2008).

**TDGF1** (ou *CRIPTO*) est un cofacteur indispensable à la voie Nodal responsable en outre de la mise en place de la ligne médiane et du réseau neuronal (de la Cruz et al., 2002). Une mutation faux-sens a été identifiée chez un patient avec une microforme HPE (hypoplasie du corps calleux) dans le domaine CFC nécessaire à la liaison de la protéine sur le récepteur TGF $\beta$  de type I. Cependant, lorsque la mutation est restaurée chez le poisson-zèbre, le protéine reste non fonctionnelle ; suggérant que la malformation observée chez le patient serait due à une haploinsuffisance de *TDGF1* (de la Cruz et al., 2002). Une autre mutation chez un patient présentant une HPE semi-lobaire a été identifiée dans un domaine nécessaire à la fixation de la protéine à la membrane cellulaire. Toutefois, chez des mutants invalidés pour la signalisation Notch (*oep*), cette protéine mutée peut restaurer le phénotype (Schier et al., 1997). Ces observations continuent de renforcer l'hypothèse que des interactions entre plusieurs déficiences génétiques et effets environnementaux sont responsables de la variabilité de la pénétrance de l'HPE.



### 4.3. *SIX3* et HPE

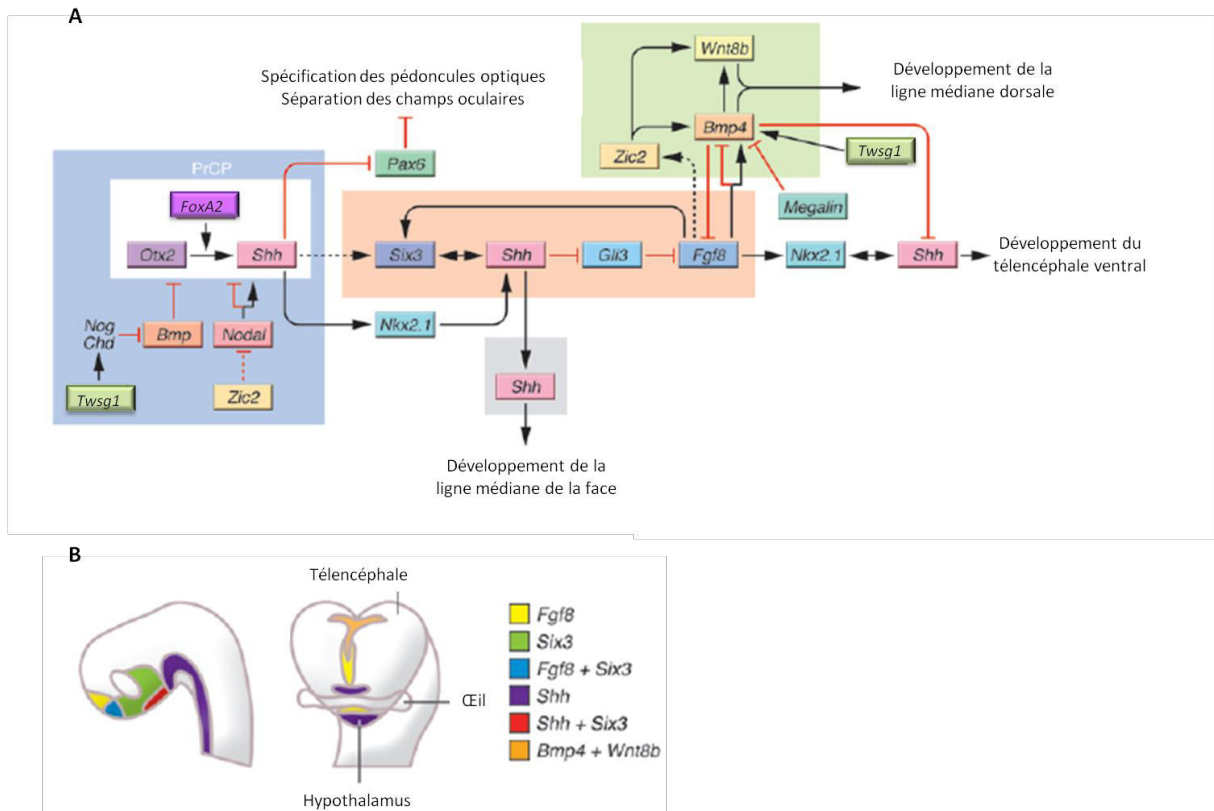
Le gène ***SIX3*** est localisé en 2p21 et les 4 premières mutations ont été publiées dans une forme familiale d'HPE (Wallis et al., 1999). Des mutations de *SIX3* sont identifiées dans 5% des cas d'HPE (Lacbawan et al., 2009; Solomon et al., 2009). *SIX3* code pour un facteur de transcription à Homéoboite exprimé chez les mammifères au niveau de la plaque neurale antérieure puis dans le prosencéphale. Il est homologue au gène *sine oculis* chez la Drosophile impliqué dans le développement du prosencéphale et de l'œil. Les travaux chez la souris suggèrent qu'un défaut d'interaction directe entre *Six3* et la voie de signalisation de Shh sous-tendent le développement de l'HPE (Geng et al., 2008).

### 4.4. *ZIC2* et HPE

***ZIC2*** code pour un facteur de transcription à doigt de zinc, identifié en 13q32.2. Ce facteur de transcription joue un rôle déterminant au cours de la régulation du développement du cerveau antérieur comme lors de la neurulation en interagissant avec les protéines GLI inhérentes à la voie de signalisation Shh. On retrouve des délétions ou mutations du gène *ZIC2* dans environ 9% des cas d'HPE à phénotypes sévères, souvent associé à des anomalies faciales mineures. De plus, il apparaît que les réarrangements du gène *ZIC2* sont rarement hérités (Mercier et al., 2011; Roessler et al., 2009b; Solomon et al., 2009). Les souris mutantes pour *Zic2* présentent de sévères malformations du cerveau antérieur avec une forte diminution des neurones cholinergiques (Hatayama et al., 2011; Warr et al., 2008).

### 4.5. *TGIF* et HPE

Le gène ***TGIF***, situé en 18p11.3 implique les voies de signalisation NODAL et de l'acide rétinoïque dans l'HPE (Powers et al., 2010). En effet, ce répresseur transcriptionnel exprimé dans le système nerveux, module les gènes intervenant dans la dorsalisation (Knepper et al., 2006). Les mutations de *TGIF* dans les cas d'HPE s'avèrent le plus souvent héritées mais leur fréquence d'apparition reste cependant assez faible (1 à 2%). Ceci pourrait être expliqué par la redondance fonctionnelle entre *TGIF1* et *TGIF2* au cours du développement du prosencéphale (Shen and Walsh, 2005).



**Figure 17. Proposition d'un réseau de gènes impliqués dans le développement du cerveau antérieur et identifiés dans des cas d'Holoprosencéphalie.**

**A.** La plaque préchordale est représentée par un rectangle blanc. Le carré bleu qui l'entoure regroupe les étapes critiques identifiées dans l'apparition d'HPE alobaire. Dans le rectangle orange sont représentés les étapes et gènes retrouvés de la forme semi-lobaire de l'HPE et les rectangles vert et gris ceux pour les formes lobaires et mineures de l'HPE. **B et C.** Patrons d'expressions de gènes critiques pour l'HPE aux stades E9.0 et E10.5 (Adapté de (Geng and Oliver, 2009)).

#### 4.6. La voie FGF

Plus récemment, la voie de signalisation FGF a été reliée à l'HPE via des mutations dans le gène **FGF8** (Arauz et al., 2010). L'inactivation de *Fgf8* chez la souris entraîne une anomalie du diencephale ventral et des dysfonctionnements hypothalamiques et pituitaires (McCabe et al., 2011). Chez des souris mutantes pour la voie Wnt menant à une perte de fonction de la  $\beta$ -caténine, l'expression de *Fgf8* est dramatiquement diminuée au niveau de l'ANR et de l'ectoderme facial chez les embryons associés à des défauts de développement du prosencéphale (Wang et al., 2011b). Plus particulièrement, la protéine FGF8 dans le modèle murin d'HPE, joue un rôle important dans la différenciation du prosencéphale (Arauz et al., 2010; Storm et al., 2006).

Une autre étude chez un double mutant pour les récepteurs *Fgfr1*<sup>-/-</sup> ; *Fgfr2*<sup>-/-</sup>, démontre que la signalisation Fgf agit en aval de *Shh* et *Gli3* pour spécifier les cellules télencéphaliques (Gutin et al., 2006).

En résumé, l'ensemble de ces patients HPE conforte l'existence d'une régulation croisée entre plusieurs voies de signalisation au cours du développement précoce du cerveau (Figure 17).

### 5. Le modèle multi-hit

A la vue du spectre phénotypique et des multiples voies de signalisation impliquées dans l'HPE, il est suggéré que cette pathologie relève d'un mode de transmission « multi-hit ». Cela signifie qu'un ou plusieurs événements sont nécessaires pour provoquer l'apparition de l'HPE. Cette hypothèse est également étayée par les cas de digénismes observés chez l'animal et chez l'Homme.

#### 5.1. Le digénisme chez l'Homme

L'HPE est une pathologie à expressivité variable. Il a ainsi été observé chez des familles porteuses d'une mutation du gène *SHH* des formes sévères d'HPE mais également des microformes ou des personnes apparentées sans symptômes HPE (Roessler et al., 1996). On retrouve ce profil également pour les 3 autres gènes majeurs. La mutation d'un gène dit

Voies de signalisation ou facteur indépendant	Digénisme	Nombre de patients	Type d'HPE	Référence
<b>Shh</b>	<i>PTCH1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>GLI2</i> <sup>-/-</sup>	1	microforme	Rahimov <i>et al.</i> , 2006
	<i>GAS1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SHH</i> <sup>-/-</sup>	1	microforme	Ribeiro <i>et al.</i> , 2010 ; Pineda-Alvarez <i>et al.</i> , 2011
<b>Nodal</b>	<i>TGIF</i> <sup>-/-</sup> ; <i>TGIF</i> <sup>-/-</sup>	1	semilobaire	El-Jaick <i>et al.</i> , 2007
<b>Shh / Nodal</b>	<i>SHH</i> <sup>-/-</sup> ; <i>TGIF</i> <sup>-/-</sup>	2	semilobaires	Nanni <i>et al.</i> , 1999
<b>Shh / ZIC2</b>	<i>SHH</i> <sup>-/-</sup> ; <i>ZIC2</i> <sup>-/-</sup>	1	semilobaire	Nanni <i>et al.</i> , 1999
	<i>GLI2</i> <sup>-/-</sup> ; <i>ZIC2</i> <sup>-/-</sup>	1	semilobaire	Wannasilp <i>et al.</i> , 2011
	<i>GAS1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>ZIC2</i> <sup>-/-</sup>	1	semilobaire	Pineda-Alvarez <i>et al.</i> , 2011
<b>SIX3 / ZIC2</b>	<i>SIX3</i> <sup>-/-</sup> ; <i>ZIC2</i> <sup>-/-</sup>	1	semilobaire	Lacbawan <i>et al.</i> , 2009

**Tableau 2. Cas de digénisme rapportés chez l'Homme.**

*Dans le cas du digénisme TGIF/ TGIF, les mutations sont héritées de parents hétérozygotes. Parmi les autres doubles mutations, certaines sont héritées d'un des deux parents et la seconde est survenue de novo. Dans le cas de ZIC2 et GLI2, les mutations sont héritées d'un seul parent porteur des deux mutations. Dans les cas des doubles mutations SHH ;ZIC2 et SIX3 ;ZIC2 l'information n'a pas pu être obtenue.*

majeur pour l'HPE n'est donc pas suffisante au développement d'un cas sévère de la pathologie. Ceci est renforcé par l'observation de doubles mutations dans un certain nombre de cas d'HPE chez l'Homme (Tableau 2).

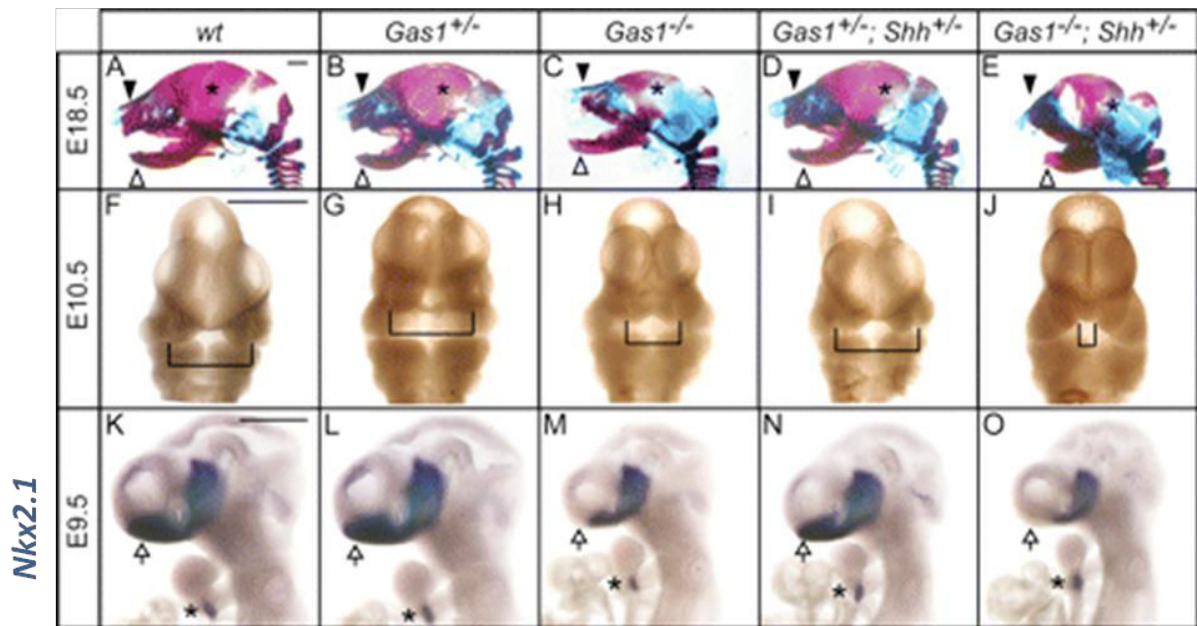
Par exemple, une étude a montré que SIX3 était capable de se lier sur une séquence enhancer (SBE2) de *Shh*. Le séquençage de cette région chez une cohorte de patients HPE a révélé la présence d'un variant nucléotidique. Il s'avère que la présence de ce variant augmente le risque de développer d'une HPE (Jeong et al., 2008).

## 5.2. Le digénisme chez le modèle murin

Les modèles murins ont apporté de forts arguments en faveur de l'hypothèse multi-hit de l'HPE. En effet, plusieurs modèles de souris porteuses de mutations sur un seul gène ne présentent pas de phénotype HPE alors que dans le cas de mutations hétérozygotes sur deux gènes un phénotype HPE est observé. L'haploinsuffisance de plusieurs gènes semble donc nécessaire pour l'apparition d'un phénotype HPE (pour revue (Krauss, 2007)). Il a également été montré que l'inactivation de *Gas1* provoque différents défauts du tube neural et de la face, de façon *Shh* dose-dépendante (Figure 18). De même, une inhibition totale de deux gènes HPE mineurs tels que *Cdo*<sup>-/-</sup>; *Gas1*<sup>-/-</sup> apparaît nécessaire pour obtenir un phénotype HPE ce qui renforce la notion d'effet dose dans l'apparition d'un phénotype HPE (Allen et al., 2007).

De plus, les modèles murins ont permis de mettre en évidence le fait qu'un phénotype HPE apparaît également lors de l'inactivation de gènes appartenant à une même voie de signalisation ou pas. C'est respectivement le cas chez des doubles mutants (*Nodal*; *Smad2*) ou des antagonistes des BMP et des gènes de la voie *Nodal* (*Chd*/*Nodal*; *Nog*/*Smad3*) (Anderson et al., 2002; Yang et al., 2010). Par ailleurs, chez les doubles mutants *Bmpr1a*; *Bmpr1b*, on observe un phénotype HPE associé à une perte des cellules de la ligne médiane dorsale du télencéphale qui n'est pas observée chez les mutants *Shh*<sup>-/-</sup>. Ceci suggère que plusieurs mécanismes indépendants au cours du développement sous-tendent l'ontogénèse de l'HPE (Fernandes et al., 2007).

Dans ces études de digénisme chez la souris, il est important de prendre en compte le fond génétique dans l'apparition du phénotype HPE. En effet, les souris *Cdo*<sup>-/-</sup> développent



**Figure 18. Défauts cranio-facial et squelettique chez des mutants *Gas1* et *Shh*.**

Les interactions génétiques entre *Gas1* et *Shh* provoquent des anomalies cranio-faciales et une anomalie du développement du cerveau antérieur. **A-E.** Vues latérales de têtes d'embryons de souris au stade E18.5 avec un marquage du cartilage (en bleu) et des os en (rouge). Les flèches noires indiquent les bourgeons maxillaires et les flèches blanches les structures mandibulaires. L'os pariétal est indiqué par un astérisque. **F-J.** Vues frontales de têtes d'embryons de souris au stade E10.5. Les accolades mettent en évidence la fusion progressive des bourgeons nasaux en fonction de l'inactivation de la voie *Shh*. **K-O.** Hybridation *in situ* de *Nkx2.1* sur des embryons de souris au stade E9.5. Les flèches indiquent le cerveau antérieur et les astérisques désignent la glande thyroïde. (Échelle 50µm) (D'après (Allen et al., 2007)).



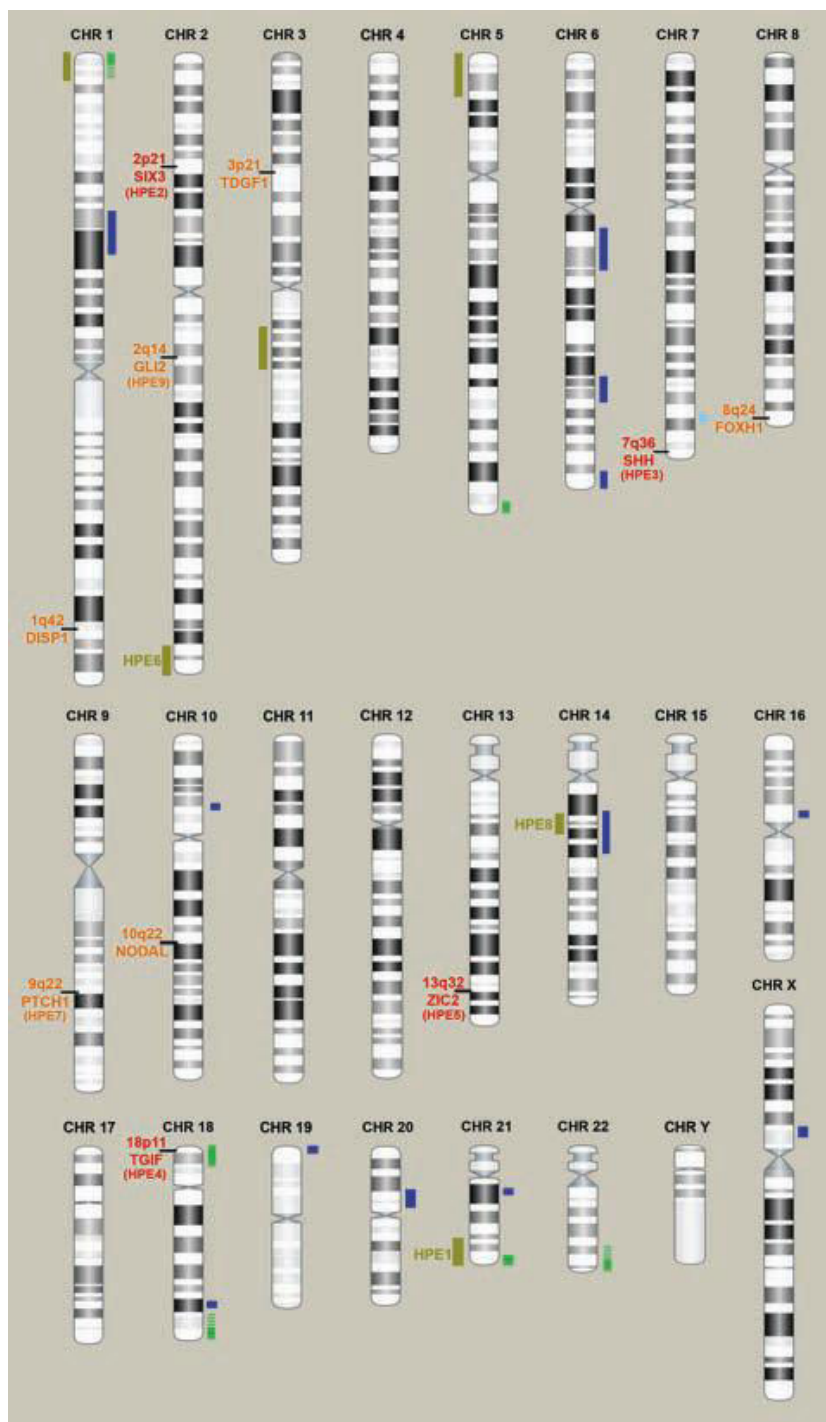
des phénotypes HPE semi-lobaire sur un fond génétique pur C57BL/6 mais seulement des microformes sur un fond génétique mixte (Helms et al., 2005; Zhang et al., 2006). Des facteurs modificateurs dus au fond génétique des individus semblent insuffisants pour induire un phénotype HPE mais peuvent influencer la régulation des voies de signalisation impliquées.

## 6. Travaux de l'équipe sur l'Holoprosencéphalie

L'équipe du Pr. Véronique David travaille depuis 1996 sur la thématique de l'Holoprosencéphalie. Elle a mis en place un réseau européen de recueil de données cliniques et de prélèvements de patients porteurs d'HPE. A partir de ce réseau une base de donnée informatisée a été constituée (<http://webpub.chu-rennes.fr/extranetdim/holopro>). Cette cohorte est à l'origine du centre de référence de Rennes et elle contient aujourd'hui près de 800 proposants et leurs apparentés soit au total 1500 individus. Ce travail de recrutement est réalisé en étroite partenariat avec l'Unité de Génétique Médicale de Rennes et le Centre Labellisé pour les Anomalies du Développement (CLAD) dirigés par le Pr Sylvie Odent.

Ces dernières années des collaborations internationales regroupant des cohortes de patients ont permis d'étudier une population d'effectif important (Dubourg et al., 2011; Mercier et al., 2011; Roessler et al., 2009a; Solomon et al., 2010). Des corrélations génotype-phénotype décrites précédemment par Solomon et collaborateurs en 2010 puis en 2011, ont pu ainsi être établies au sein de l'équipe (Mercier et al., 2011). Aujourd'hui, le diagnostic moléculaire de l'HPE est effectué dans le laboratoire de Génétique Moléculaire du Centre Hospitalier Universitaire de Rennes sur les gènes majeurs décrits dans cette pathologie. Ceci permet d'alimenter et de mettre à jour la base de données répertoriant les cas d'HPE. Cependant seulement 22% des cas présentent une anomalie moléculaire caractérisée.

Différentes stratégies de recherche de nouveaux gènes candidats ont donc été adoptées par les différentes équipes travaillant sur l'Holoprosencéphalie. En effet, dans l'équipe du Pr Muenke au NIH, un séquençage systématique a été réalisé sur des gènes participant aux voies de signalisation déjà impliquées dans l'HPE telles que les voies Shh et Nodal (Ming et al., 2002). L'équipe de Rennes a plutôt utilisé une approche globale pour



**Figure 19. Cartographie répertoriant les délétions et les gènes impliqués dans l’HPE.**

*Les délétions détectées par analyse de caryotype sont représentées en kaki, les réarrangements identifiés par MLPA sont représentés en vert. Les délétions submicroscopiques de novo et héritées identifiés par CGH-array sont représentées en bleu. Les gènes majeurs sont en rouge et les gènes mineurs en orange (Bendavid et al., 2010).*

rechercher de nouvelles bases moléculaires de l'HPE. Une première étude a permis d'explorer les zones subtélomériques par la technique de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) (Bendavid et al., 2007). Ceci a permis d'affiner les loci subtélomériques déjà répertoriés et d'identifier des réarrangements subtélomériques et subcentromériques.

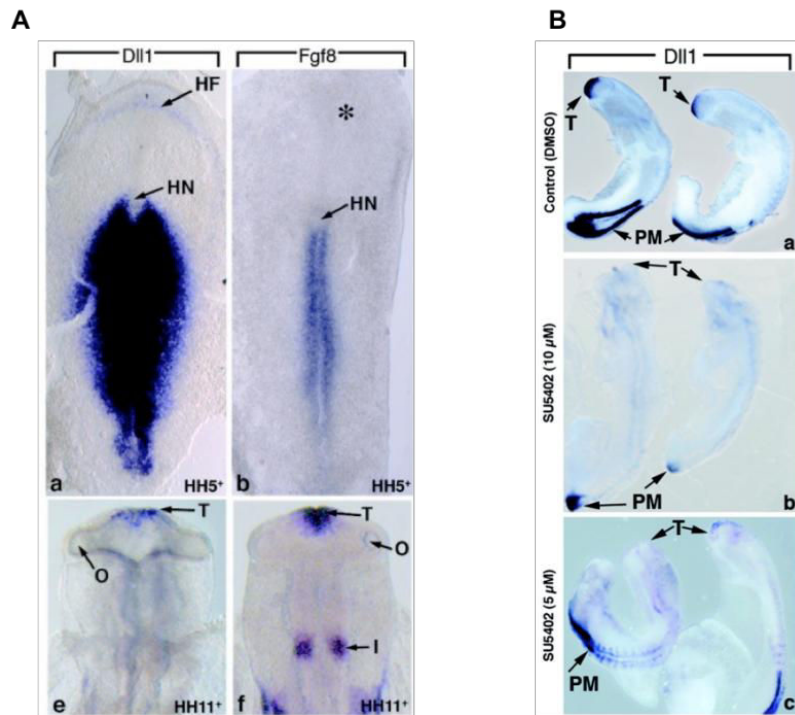
Fortes des résultats obtenus par cette première approche l'équipe a mis en place une étude par hybridation génomique comparative (CGH array) qui a permis de mettre en évidence des réarrangements génomiques dans 17% des cas (Bendavid et al., 2006; Bendavid et al., 2010). Ce travail a été réalisé sur des patients pour lesquels l'étiologie de la maladie n'avait pas été précédemment identifiée (Figure 19).

Aujourd'hui la recherche de délétions ou mutations au niveau des principaux gènes connus sur les cohortes de patients réunis par plusieurs équipes, ne permet d'expliquer que 30% des cas d'HPE génétiques (Mercier et al., 2011). Dans le but d'élucider les 70% restants, une recherche active de nouveaux gènes candidats est effectuée au laboratoire.

### **7. Recherche de nouveaux gènes candidats : le cas de *DLL1***

Dans le cadre de la recherche de nouveaux gènes candidats, l'équipe a poursuivi son étude de micro réarrangements chromosomiques par CGH-array sur une cohorte plus étendue de 260 patients recrutés grâce au centre de référence pour l'HPE à Rennes. Ce travail a permis de caractériser une région redondante de 2.2Mb en 6qter délétée chez 4 patients atteints d'HPE. Cette région qui comporte 14 gènes a été soumise à une analyse bioinformatique (logiciel Endeavour). Ceci a permis de déterminer le gène *Delta-like 1 (DLL1)* comme le meilleur gène candidat. Ce dernier code pour un ligand de la voie de signalisation Notch qui n'a à ce jour pas été associée à l'HPE.

Des études d'expression ont été réalisées au sein de l'équipe sur le modèle d'embryon de poulet par hybridation *in situ* au cours du développement du cerveau antérieur (Dupé et al., 2011). *Dll1* est exprimé du stade HH5 au stade HH9 dans le pli neural puis au niveau de la fermeture du neuropore antérieur, du bord antérieur de la plaque neurale (ANB) et dans le télencéphale au stade HH11. De façon très intéressante, ce domaine d'expression chevauche celui de *Fgf8*, gène impliqué dans des cas d'HPE.



**Figure 20. Comparaison des expressions de *Dll1* et *Fgf8* chez des embryons de poulet en conditions normales et lors de l'inhibition de la voie Fgf.**

**A.** Analyse par hybridation *in situ* des expressions de *Dll1* et *Fgf8* aux stades HH5+ et HH11+. (a,b,) *Dll1* est absent du nœud de Hensen (HN) mais exprimé dans le pli céphalique (HF). *Fgf8* est absent du pli céphalique. L'astérisque marque la région antérieure du stade de pli céphalique. (e,f) *Dll1* et *Fgf8* sont exprimés dans le télencéphale présomptif (T). *Fgf8* est également présent au niveau du centre organisateur de l'isthme. **B.** Analyse par hybridation *in situ* de l'expression de *Dll1* lors de l'inhibition de la voie Fgf par l'inhibiteur SU5402 au stade HH12. (a) Chez des embryons de poulet contrôle, *Dll1* est détecté au niveau du télencéphale ventral (T) et du mésoderme présomitique (PM). (b,c) Une forte concentration de l'inhibiteur SU5402 (10 μM) provoque de sévères anomalies télencéphaliques et inhibe l'expression de *Dll1*. Avec une concentration moins élevée (5 μM), la morphogénèse du télencéphale est moins sévèrement affectée mais l'expression de *Dll1* reste réduite au niveau de cette structure (Dupé et al., 2011).

Dans un deuxième temps l'équipe a alors étudié l'influence de la voie FGF, déjà impliquée dans l'HPE via *Fgf8*, sur l'expression de *Dll1* par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique (SU-5402) en culture roller. Les résultats obtenus suggèrent une régulation de l'expression de *Dll1* dans la région antérieure du prosencéphale par *Fgf8* (Figure 20) alors que l'inhibition de la voie Shh n'a pas d'effet sur l'expression de *Dll1*.

Enfin, le séquençage du gène *DLL1* sur 100 porteurs de la cohorte a été réalisé. Cette étude a permis l'identification, chez un patient porteur d'une forme semi-lobaire, d'une délétion de 3 nucléotides concernant deux codons dans un domaine d'ubiquitination très conservé de la protéine. Cette mutation était héritée du père et n'est pas retrouvée dans une population contrôle.

L'ensemble de ces travaux a permis de proposer une implication de la voie Notch dans l'apparition d'un phénotype HPE. Alors que la signalisation Notch est très bien décrite dans des processus cruciaux du développement embryonnaire comme la somitogénèse ou la neurogenèse, aucun rôle n'est décrit à ce jour pour la voie Notch au cours de la différenciation de la ligne médiane antérieure. C'est pourquoi il est apparu pertinent de caractériser les acteurs de cette voie et ses cibles lors de la mise en place du cerveau antérieur.



### III. La voie de signalisation Notch chez les vertébrés

Un des principaux objectifs de ma thèse a été la caractérisation de l'activité de la voie de signalisation Notch au cours du développement du cerveau antérieur. Je rappellerai donc les principales caractéristiques de cette signalisation et plus précisément les mécanismes de neurogenèse auxquels la voie Notch participe.

La voie de signalisation Notch a été initialement caractérisée chez la Drosophile. En cas de perte de fonction partielle, la drosophile hétérozygote pour Notch présente des encoches (Notch en anglais) à l'extrémité des ailes. Cette voie va définir de nombreux mécanismes d'interactions cellulaires se déroulant principalement entre cellules voisines. Elle contrôle ainsi des processus cruciaux du développement comme le destin cellulaire, la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose (pour revue (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Artavanis-Tsakonas et al., 1999)).

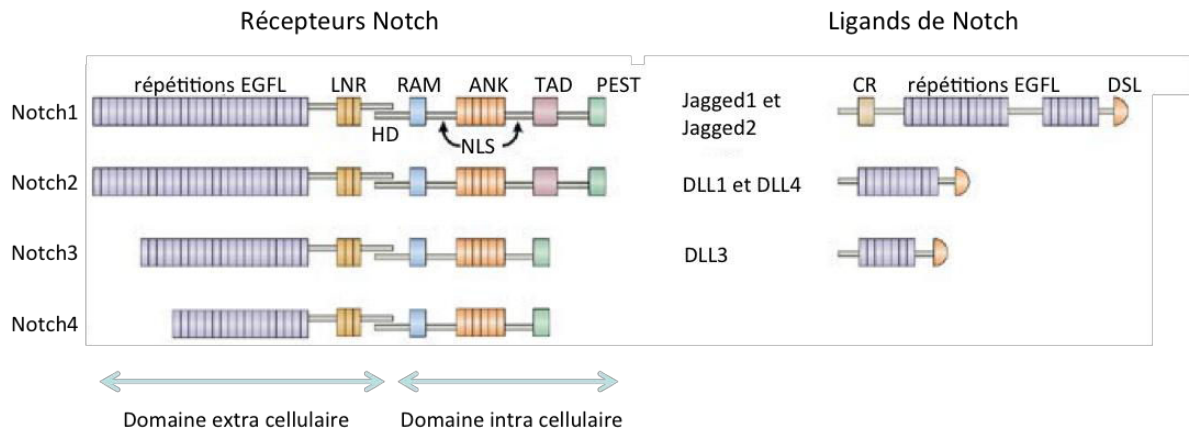
#### 1. Mécanismes moléculaires de la voie Notch

L'activité de la voie Notch repose sur l'interaction entre cellules voisines grâce à un récepteur transmembranaire NOTCH, activé par la liaison d'un ligand également transmembranaire, DELTA/JAGGED, présent sur la cellule voisine. Une fois activé le domaine intracellulaire du récepteur (NICD) sera transloqué jusqu'au noyau pour y jouer un rôle de facteur de transcription. Il s'associe avec plusieurs protéines pour former un complexe régulateur de certains gènes de type bHLH (Enhancer of Split), eux-mêmes capables d'inhiber la transcription d'autres gènes bHLH (Achaete Scute).

##### 1.1. Les récepteurs Notch

Chez les mammifères on dénombre 4 récepteurs NOTCH codés par 4 gènes différents qui présentent une architecture commune. Seuls NOTCH1 et NOTCH2 sont communs aux autres vertébrés. Ce sont des protéines transmembranaires de type I, composées d'une partie extracellulaire et d'une partie transmembranaire.

Le fragment extracellulaire comprend un nombre variable de motifs répétés EGFL (*Epidermal Growth Factor-like*) et de motifs LNR (*Lin12/Notch related regions*). Ces domaines



**Figure 21. Structure moléculaire des récepteurs Notch et des ligands chez les vertébrés.**

*NOTCH1 et NOTCH2 sont quasiment identiques en taille et partagent les mêmes caractéristiques structurales. NOTCH3 et NOTCH4 sont plus courts et ne possèdent pas de domaine TAD. JAGGED1 et JAGGED2 possèdent un domaine conservé riche en cystéine (CR) (Adapté de (Osborne and Minter, 2007)).*



sont respectivement impliqués dans l'interaction ligand-récepteur (Baron, 2003) et l'hétérodimérisation du récepteur ainsi que son maintien dans un état inactif (Figure 21).

Le fragment transmembranaire est composé d'un court domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire unique et d'un domaine intracellulaire. Ce dernier est divisé en un domaine RAM (*RBP-Jk Associated Molecule*) suivi de 7 motifs ankyrine (ANK), de deux domaines de localisation nucléaire NLS (*Nuclear Localisation Signal*) ainsi que d'une région PEST (Pro-Glu-Ser-Thr). Les domaines RAM et ANK vont permettre la liaison du récepteur aux facteurs de transcription CSL (RBPJk chez les vertébrés, Su(H) chez la Drosophile, Lag-1 chez C.Elegans, RBP-Jk chez les mammifères). On note également un domaine d'hétérodimérisation entre les portions extracellulaire et transmembranaire (Figure 21).

Les récepteurs NOTCH de la cellule réceptrice du signal subissent un premier clivage dans l'appareil de Golgi par une convertase Furin-like (clivage S1) (Figure 22). Cette étape est nécessaire à l'adressage du récepteur au niveau de la membrane grâce à une fonction chaperonne de l'enzyme pour le repliement et le transport du récepteur. Une étape de glycosylation se produit également au sein de l'appareil de Golgi par les protéines FRINGE et va moduler la capacité de liaison récepteur-ligand. La glycosylation du récepteur est rendue possible par l'addition au préalable d'une molécule d'O-fucose par la O-fucosyltransférase 1 (POFUT1).

Afin de diminuer l'activation transcriptionnelle de la voie Notch, une dégradation du NICD s'effectue au sein de la cellule réceptrice. Les protéines Mastermind (MAM) et SKIP recrutent des protéines kinases capables de phosphoryler le NICD sur ses domaines TAD et PEST.

La dégradation du récepteur Notch est également favorisée par la protéine NUMB-LIKE (ou NUMB chez la Drosophile) qui est un adaptateur protéique nécessaire à l'endocytose et agit comme un suppresseur de la voie Notch (pour revue (Cayouette and Raff, 2002). Il permet le recrutement de Itch (E3 ubiquitine ligase itchy) (Beres et al., 2011) et va réguler les événements post-endocytaires du récepteur (McGill et al., 2009). Il a également été montré que NOTCH pouvait réciproquement agir sur NUMB. Par exemple lors d'une forte activité de la voie Notch, le niveau protéique de NUMB-like dans le système nerveux central d'embryon de poulet est réduit (Chapman et al., 2006).



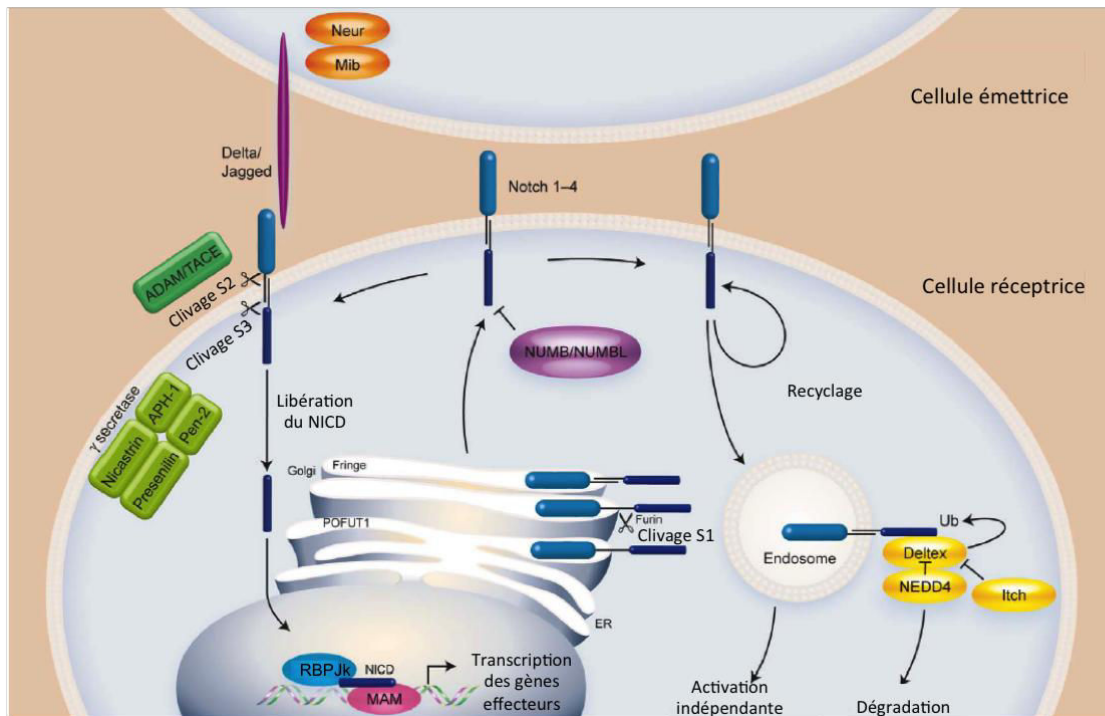
## 1.2. Les ligands de Notch : familles Delta et Serrate

Il existe une forte conservation pour les ligands de ces récepteurs entre la Drosophile et les mammifères. Chez ces derniers, cinq gènes différents codent pour des ligands de la famille des protéines DSL (Delta, Serrate chez la Drosophile, Lag-2 chez C. Elegans). Deux sous-familles se dégagent ensuite chez les mammifères. Une première, de ligands transmembranaires, avec trois variants du gène *Delta* décrits, codant les Delta-like 1, 3 et 4 (DLL1, DLL3, DLL4) qui contiennent chacun un domaine DSL extracellulaire et respectivement 8, 6 et 8 répétitions EGFL. Le deuxième ligand de Notch est appelé SERRATE chez la Drosophile et JAGGED1 et JAGGED2 chez les mammifères. Ils sont également transmembranaires et composés d'un domaine DSL et de 16 motifs EGFL. Un troisième domaine semble impliqué dans les processus de dimérisation pour ces deux ligands (Figure 21).

De façon similaire aux récepteurs Notch, les ligands peuvent être clivés par des sécrétases dans leurs domaines juxta membranaire et transmembranaire pour libérer des fragments intra et extra cellulaires. Ceci pourrait permettre un dialogue entre les récepteurs et les ligands au sein de la cellule. La liaison du ligand au récepteur se réalise au niveau de la région N-terminale du ligand grâce au domaine DSL et aux deux premières répétitions EGFL (Parks et al., 2006). D'autre part, les ligands DSL contiennent des résidus lysine potentiellement cibles d'ubiquitination. Il s'agit des protéines de type MINDBOMB et/ou NEURALIZED qui sont toutes deux des ubiquitines ligase E3 et vont permettre l'adressage des ligands à la membrane de la cellule émettrice en facilitant leur endocytose (pour revue (Le Bras et al., 2011)). Cependant, les molécules d'ubiquitine associées au niveau du domaine intracellulaire des ligands DSL peuvent également conduire à leur dégradation.

L'endocytose des ligands ou leur dégradation va entraîner une absence d'adressage à la membrane de ces ligands et donc moduler l'activité de la voie Notch. De façon surprenante, ces mécanismes semblent augmenter l'activité de Notch dans les cellules voisines alors qu'elles devraient réduire l'activité du récepteur (Gupta-Rossi et al., 2004).

Le mode apparemment simple et direct de la signalisation Notch est en contradiction avec la quantité importante de fonctions qui lui sont attribuées. Le nombre relativement faible de récepteurs et ligands identifiés pour cette voie suggère que la diversité du signal pourrait provenir des formes non canoniques de la voie Notch. En effet, la voie Notch peut



**Figure 22. Schématisation de la voie de signalisation Notch.**

*La liaison du récepteur NOTCH avec un ligand DELTA/SERRATE permet le clivage du domaine intracellulaire NICD par la  $\gamma$ -sécrétase. Il est transféré dans le noyau où il forme un complexe avec la protéine RBPJk et le co-activateur transcriptionnel MAM déclenchant la transcription de gènes cibles (D'après <http://www.abdserotec.com>).*

être activée par des ligands non canoniques ou sans clivage du récepteur. C'est le cas des ligands DLK1/2 similaires aux ligands DLL mais dépourvus du domaine DSL qui vont agir par compétition (Baladron et al., 2005). De plus, des formes de signalisation Notch non canonique ne nécessitent pas les protéines CSL et impliquent alors une boucle de régulation avec d'autres voies de signalisation comme la voie Wnt (pour revue (Heitzler, 2010)).

### 1.3. Etape régulatrice critique : le clivage par la $\gamma$ -sécrétase

La liaison d'un ligand DSL sur le récepteur permet une modification du récepteur au niveau de la région membranaire pour faciliter le clivage S2 (Figure 22). Ces deux événements sont requis pour déclencher l'action du complexe de la  $\gamma$ -sécrétase.

Le clivage S3 du récepteur Notch est un événement protéolytique majeur qui peut être régulé par de nombreuses protéines (Parks and Curtis, 2007). En effet, les quatre protéines qui composent le complexe  $\gamma$ -sécrétase sont nécessaires à son activité enzymatique. Il comprend la Préséniline, la Nicastrine, l'Anterior Pharynx-Defective 1 (APH-1) et la Presenilin enhancer 2 (PEN-2). L'activité enzymatique du complexe provient du site actif qui est attribué à l'hétérodimère de Préséniline. La perte de fonction de la Préséniline chez la Drosophile provoque un phénotype similaire aux observations d'inactivation de la voie Notch (Berezovska et al., 2000; Struhl and Greenwald, 1999), rendant compte de l'importance du complexe de la  $\gamma$ -sécrétase au cours de la signalisation Notch.

D'autre part, la  $\gamma$ -sécrétase est également responsable du clivage des précurseurs de peptides amyloïdes (APP). Ces molécules sont décrites pour leur implication dans la maladie d'Alzheimer ce qui en fait des cibles thérapeutiques importantes. En ce sens, de nombreux inhibiteurs de la  $\gamma$ -sécrétase ont été développés pour lesquels des réponses différentes ont été observées. Par exemple, le composant E va bloquer de façon sélective la production des APP mais va avoir un effet limité sur le clivage du NICD (Seiffert et al., 2000). L'inhibiteur MW163 va lui inhiber la production des APP et du NICD de façon dose-dépendante (Wolfe et al., 1998).

Le DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) est quant à lui un analogue à état non transitoire capable de se lier de façon sélective à la forme active de la  $\gamma$ -sécrétase (Dovey et al., 2001). Il agirait par blocage du mouvement du substrat



ou sur son processus de repliement par une modification de la conformation de la  $\gamma$ -sécrétase (Morohashi et al., 2006; Tomita et al., 2006). De plus, des défauts similaires à ceux observés chez des mutants Notch sont décrits chez le poisson-zèbre ou l'embryon de poulet. Par exemple, le processus de sélection des neuroblastes ou la somitogénèse vont être affectés (Geling et al., 2002; Nelson et al., 2007). De même, le DAPT utilisé au niveau de la notochorde et du plancher neural, inhibe la voie Notch et va perturber le choix de destin des cellules progénitrices de ces deux structures (Dale and Maroto, 2003; Gray and Dale, 2010). C'est ce composé que nous avons choisi d'utiliser au sein de l'équipe pour inactiver la voie Notch.

#### 1.4. La translocation du NICD et activation des effecteurs

L'interaction ligand-récepteur favorise l'accès d'une métalloprotéase (ADAM/TACE) à un site de clivage juxta membranaire (clivage S2) situé dans le domaine extracellulaire du récepteur (Brou et al., 2000; Jarriault and Greenwald, 2005). Ce clivage est indispensable pour que le clivage S3 intervienne grâce à l'action du complexe de la  $\gamma$ -sécrétase qui libère le NICD dans le cytoplasme (Tagami et al., 2008). Le NICD migre ensuite jusqu'au noyau où il interagit avec RBPJk (Recombination signal sequence-binding protein jk) précédemment appelé CBF-1 (C-promoter binding factor-1) (Figure 22).

RBPJk forme un complexe avec des répresseurs transcriptionnels et des histone déacétylases (HDACs) qui favorise l'inhibition de gènes cibles. L'entrée du NICD dans ce complexe déplace des co-répresseurs et permet le recrutement de l'activateur transcriptionnel MAM (Figure 22). Associé à un co-activateur, ce nouveau complexe permet la transcription des gènes cibles incluant la famille Hes (hairy enhancer of split) et la famille Herp/Hey (Hes related protein) appartenant aux facteurs de transcription de la famille bHLH (basic helix-loop-helix).

Ces facteurs sont des cibles directes de la voie Notch. Ainsi, leur expression est un marqueur adapté au suivi des cellules exprimant la voie Notch (Iso et al., 2003). Bien que la famille des répresseurs Hes/Hey représente un groupe important de gènes cible de la voie Notch, les sites de liaison CSL sont présents dans un certain nombre d'autres promoteurs. Une liste croissante de gènes cibles directement régulés positivement par la voie Notch a été identifiée. Par exemple, les gènes de l' *$\alpha$ -actine* (Nosedà et al., 2006), *ErbB2* (Patten et al., 2006), *Gfap* (Glial fibrillary acidic protein) (Ge et al., 2002), *Gata2* (Robert-Moreno et al., 2005) ou pour *Nrarp* (Pirot et al., 2004).





### 1.5. Les facteurs de transcription Hes/Hey, cibles directes de la voie Notch

Chez les mammifères on dénombre 7 membres de la famille HES (HES1-7) et trois membres de la famille HERP (HEY1, HEY2 ET HEYL) connus pour être principalement des répresseurs transcriptionnels. Ce sont les cibles directes de la voie Notch les mieux caractérisées et sont particulièrement connues pour inhiber la neurogenèse. En effet, en réponse à une signalisation Notch, ces facteurs de transcription vont réprimer l'expression de gènes de neurogenèse tels que le complexe *achaete-scute* (*a-sc*) chez la Drosophile et ses homologues chez les vertébrés *Ascl* et *Neurog*. Ils régulent ainsi la maintenance des cellules indifférenciées (pour revue (Latasa et al., 2009)).

Les facteurs de transcriptions HES forment des homodimères au niveau de leur région HLH et se lient au niveau des promoteurs sur des séquences de régulation appelées N-box de séquence CACNAG et les sites de classes C CACG(C/A)G. De plus, comme d'autres facteurs bHLH (cf. III.3.1. Les gènes proneuraux) ils sont capables de se lier sur les E box (enhancer box) de séquence CANNTG avec une moindre affinité.

A côté de leur activité de répresseurs, certains de ces facteurs pourront avoir une action modulatrice positive sur d'autres gènes *Hes*. Par exemple, il peut s'agir d'une action sur *Hes6* (Koyano-Nakagawa et al., 2000). D'autres vont posséder une activité autorégulatrice comme *Hes1* et *Hes7* ce qui leur confère une activité oscillatoire (Hirata et al., 2002; Nakagawa et al., 2000; Sakamoto et al., 2003; Satow et al., 2001). De plus, il peut exister des régulations négatives entre ces facteurs de transcription comme entre *Hes5* et *Hes6* au sein de la moelle épinière chez l'embryon de poulet (Fior and Henrique, 2005). Cependant les facteurs HES restent des effecteurs essentiels à l'activation de la voie de signalisation Notch. En effet, en absence par exemple d'*Hes1* et *Hes5*, l'activité de la voie Notch est fortement diminuée dans le système nerveux central d'embryon de souris (Kageyama and Ohtsuka, 1999).

Les gènes *Hey* ont tout d'abord été fortement impliqués au cours du développement cardiovasculaire. Cependant, il apparaît qu'ils possèdent une activité au cours de la neurogenèse car chez les mutants *Hes*, une part du développement neural subsiste. De plus, les facteurs HEY peuvent former des hétérodimères avec les protéines HES agissant ainsi de



façon synergique bien qu'ils recrutent des cofacteurs différents (Iso et al., 2001). Ces hétérodimères vont plutôt se fixer sur des sites de classe C alors que les homodimères des facteurs HEY reconnaissent aussi les E box (pour revue (Fischer and Gessler, 2003; Fischer et al., 2004)).

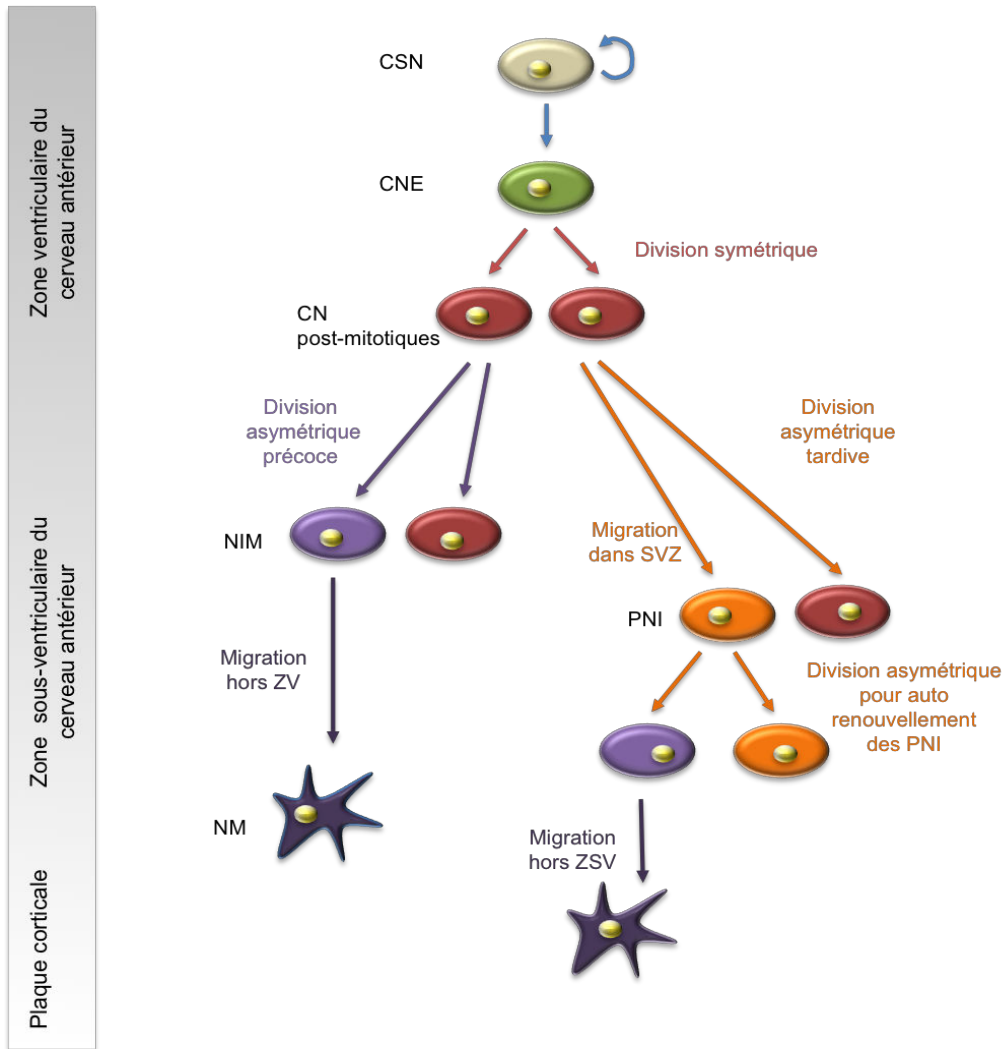
## **2. La voie Notch au cours de la neurogenèse chez les vertébrés**

Des gènes homologues à ceux impliqués dans la signalisation Notch ont maintenant été identifiés dans presque tous les métazoaires. L'analyse de leur fonction dans des systèmes modèles vertébrés comme le poulet, le poisson-zèbre, la souris et le rat a démontré une conservation de la voie Notch dans la neurogenèse chez les vertébrés (pour revue (de la Pompa et al., 1997; Lewis, 1996)).

Au cours du développement embryonnaire, la neurogenèse permet la production d'un grand nombre de types cellulaires à des positions et des temps définis ainsi qu'en nombre approprié. Ces processus demandent une régulation fine et une coordination des mécanismes tels que la division cellulaire, la différenciation neuronale, la spécification neuronale et la migration. Chez la Drosophile, les étapes essentielles de la neurogenèse ont été largement étudiées et ont montré que la voie Notch était cruciale au bon déroulement de la neurogenèse. Chez les vertébrés, la voie Notch est également essentielle à la neurogenèse dans le télencéphale, la moelle épinière ainsi que dans de nombreux domaines sensoriels comme l'épithélium olfactif, l'oreille interne, l'œil et la rétine.

### **2.1. Mécanisme cellulaire de la neurogenèse**

Le mécanisme de neurogenèse primaire se met en place dans le tube neural (qui donnera le cerveau et la moelle épinière) et les cellules de crêtes neurales (qui donneront les placodes sensorielles), permettant de générer les systèmes nerveux central et périphérique. Le neuroépithélium du tube neural donne naissance aux neurones et à la glie, et les cellules de crêtes neurales vont former des neurones, des cellules gliales et des mélanocytes. Plus précisément, c'est au sein de territoires neurogéniques que différentes populations de neurones vont être déterminées au cours du développement du cerveau antérieur. Elles dérivent de cellules progénitrices grâce à des mécanismes de division cellulaire sous



**Figure 23. Neurogenèse au sein du cerveau antérieur en développement.**

*Les cellules souches neurales (CSN) de la zone ventriculaire du cerveau antérieur subissent des changements morphologiques pour devenir des cellules neuroépithéliales (CNE). Ces cellules progénitrices vont se diviser de façon symétrique au sein de la zone ventriculaire pour constituer un groupe de cellules neurales post-mitotiques. La division asymétrique précoce donne lieu à une CN post-mitotique et à un neurone immature. C'est ensuite lors de sa migration hors de la zone ventriculaire (ZV) que le neurone devient mature. Les divisions asymétriques tardives donnent lieu également à une CN post-mitotique et à un progéniteur neural intermédiaire (PNI). Ce dernier va migrer hors dans la zone sous ventriculaire (SVZ) pour donner également par division asymétrique un PNI et un neurone mature. Cette capacité d'auto renouvellement permet d'augmenter par la suite considérablement le nombre de neurones.*

l'influence de la voie de signalisation Notch. Cependant, les régulations moléculaires nécessaires à la détermination d'un lignage cellulaire et à la détermination d'une population neuronale sont encore peu décrites.

Chez les vertébrés, une cellule souche neurale (CSN) correspond à un progéniteur indifférencié et multipotent capable d'auto renouvellement (Figure 23). Des changements morphologiques de ces CSN vont produire des cellules neuroépithéliales (CNE). Ces cellules prolifèrent et donnent des cellules neurales post-mitotiques. Ces dernières peuvent alors se différencier en neurones immatures ou progéniteurs neuraux intermédiaires (PNI). Par migration, les neurones deviennent matures et les PNI par division asymétrique se renouvellent et prolifèrent pour donner un nombre important de neurones (Figure 23). Après la production des neurones au cours du développement du cerveau, les cellules souches neurales vont se différencier en astrocytes, oligodendrocytes ou cellules épendymaires.

## 2.2. La voie Notch et le développement du SNC dans le modèle murin

Les études de phénotype de souris mutantes pour des effecteurs de la voie de signalisation Notch ont principalement montré leur importance dans la segmentation de l'embryon et la somitogénèse. Pour les embryons homozygotes mutants de *Notch1* (Conlon et al., 1995), *RBPJk* (Oka et al., 1995) et *Dll1* (Hrabe de Angelis et al., 1997), les effets au niveau du développement du cerveau antérieur et de la neurogenèse sont difficilement observables en raison de la létalité embryonnaire précoce de ces embryons. Les embryons meurent entre les stades E9.5 et E11.5 correspondant au début de la phase neurogénique.

Cependant, les travaux de de la Pompa (de la Pompa et al., 1997) ont tout de même démontré un rôle de *Notch1* et *RBPJk* dans la neurogenèse chez les mammifères. En effet, les mutations de *Notch1* et *RBPJk* entraînent l'inhibition de l'expression d'*Hes5* et vont favoriser la neurogenèse. De plus le phénotype chez le mutant *RBPJk* est plus sévère que chez le mutant *Notch1*, suggérant une redondance fonctionnelle des récepteurs Notch au cours de la neurogenèse. Une autre étude a montré que *Notch1* maintenait les précurseurs neuraux dans un état indifférencié au sein du neuroépithélium et contrôlait leur différenciation entre E10 et E12.5 (Lutolf et al., 2002; Stump et al., 2002). Les souris mutantes pour les gènes de la voie Notch ont contribué à définir l'implication de la voie de

Gène(s)	Phénotypes	Références
<b>A. Acteurs de la voie de signalisation Notch</b>		
<i>Notch1</i>	Différenciation neuronale précoce. Hes5↘, Dll1↗, Ascl1↗, NeuroD↗ Délétion des progéniteurs neuraux; Délétion télencéphalique Perturbation neurogénèse précoce à E12.5 dans ZSV	De la Pompa et al., 1997; Lutolf et al., 2002 Xang et al., 2004; Yoon and Gaiano, 2005; Mason et al., 2005
<i>Notch2</i>	Mort cellulaire neurale étendue à E9.5 et létalité à E11.5	Hamada et al., 1999
<i>Notch3</i>	Perturbation neurogénèse tardive. Hes5↘, Ascl1↗, NeuroD↗	Mason et al., 2005
<i>RBPJk</i>	Hypoplasie du tube neural et du cerveau Différenciation neuronale précoce. Hes5↘, Dll1↗, Ascl1↗, NeuroD↗	Oka et al., 1995 De la Pompa et al., 1997
<i>PS1</i>	Différenciation neuronale précoce. Hes5 ↘, Dll1↗ Neurogénèse diminuée à E14.5 et perte neuronale massive à E16.5	Handler et al., 2000 Shen et al., 1997
<i>PS1, PS2</i>	Désorganisation du tube neural, absence de Hes5, Dll1↗ Neurodégénération	Donoviel et al., 1999; Saura et al., 2004; Herreman et al., 1999
<i>Dll1</i>	Défauts nœud de Hensen et ligne médiane, différenciation neuronale excessive Production de neurones précoces dans le télencéphale, Hes5↘	Hrabe de Angelis et al., 1997; Przemek et al., 2002; Yun et al., 2002; Grandbarbe et al., 2003
<i>Hes1</i>	Accélération de la neurogénèse, Hes5↗, Ascl1↗ Défauts de neurulation et différenciation précoce des progéniteurs neuraux Augmentation cellules ciliées de l'oreille interne	Ishibashi et al., 1995; Lee et al., 2005; Cau et al., 2000; Nakamura et al., 2000; Zine et al., 2001
<i>Hes5</i>	Différenciation neurale précoce au niveau du télencéphale, Neurog2↗ Diminution cellules gliales de Muller dans la rétine Augmentation des cellules de soutiens de l'oreille interne Augmentation expression de la myéline	Imayoshi et al., 2008; Hojo et al., 2000; Cai et al., 2000; Inoue et al., 2002; Zine et al., 2001; Liu et al., 2006
<i>Hes1, Hes5</i>	Différenciation neurale précoce au niveau du télencéphale, Neurog2↗ Accentuation du phénotype Hes1-/- Défauts nerfs craniaux et spinaux	Imayoshi et al., 2008 Ohtsuka et al., 1999 et 2001 Hatakeyama et al., 2006
<i>Hes1, Hes3</i>	Différenciation neuronale prématurée Défauts de formation du cerveau moyen et postérieur	Hirata et al., 2001
<i>Hes1, Hes3, Hes5</i>	Formation des cellules neuroépithéliales à E8 sans maintien de la population, Différenciation neurale prématurée	Imayoshi et al., 2008 Hatakeyama et al., 2004
<b>B. Gènes proneuraux</b>		
<i>Ascl1</i>	Défauts des éminences ganglionnaires du télencéphale Diminution de la division des précurseurs neuraux Neurogénèse retardée dans les ganglions et lente accumulation	Guillemot et al., 1993 Pattyn et al., 2006
<i>Neurog1</i>	Elimination des ganglions craniaux, NeuroD↘, NeuroD4↘ Au niveau du télencéphale dorsal Ascl1 ↗	Ma et al., 1998 Fode et al., 2000
<i>Neurog2</i>	Défauts de différenciation neuronale au niveau de la rétine et de la moelle épinière Elimination des ganglions craniaux, NeuroD↘, NeuroD4↘, Dll1↘ Diminution du nombre de neurones dopaminergiques et glutaminergiques	Fode et al., 1998 Mattar et al., 2004 Kele et al., 2006
<i>Ascl1, Neurog1</i>	Absence d'expression de Dll1, Hes5 Défauts de génération des neurones sensoriels olfactifs	Cau et al., 2002
<i>Ascl1, Neurog2</i>	Blocage de la différenciation neuronale, Augmentation du nombre de cellules gliales Dll3↘ Perte totale des neurones dopaminergiques	Nieto et al., 2001 Casarosa et al., 1999 Kele et al., 2006
<i>Ascl1, NeuroD4</i>	Blocage de la différenciation neuronale, Augmentation du nombre de cellules gliales	Tomita et al., 2000
<i>Neurog1, Neurog2</i>	Diminution des populations neuronales, Défauts de migration neuronale et guidage axonal, Diminution du nombre de neurones glutaminergiques, Ascl1 ↗	Ma et al., 1996, Fode et al., 2000 Sugimori et al., 2007; Mattar et al., 2004
<i>NeuroD</i>	Différenciation neurale anormale, Défauts du cervelet et de l'hippocampe Dérégulation du cycle cellulaire au niveau de l'épithélium entérique	Liu et al., 2000; Myata et al., 1999 Mutoh et al., 1998

**Tableau 3. Brève description des phénotypes au niveau du système nerveux central chez des souris mutantes pour les principaux gènes de la voie Notch (A) et les principaux gènes proneuraux (B).**

signalisation Notch dans la neurogenèse chez les vertébrés (Tableau 3A). L'inactivation des gènes proneuraux, principales cibles des facteurs HES/HEY, donne des embryons viables et a permis d'observer des défauts de neurogenèse (pour revue (Bertrand et al., 2002; Castro and Guillemot, 2011; Powell and Jarman, 2008; Wullimann, 2009). L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence la boucle de régulation entre les acteurs de la voie Notch et les gènes proneuraux.

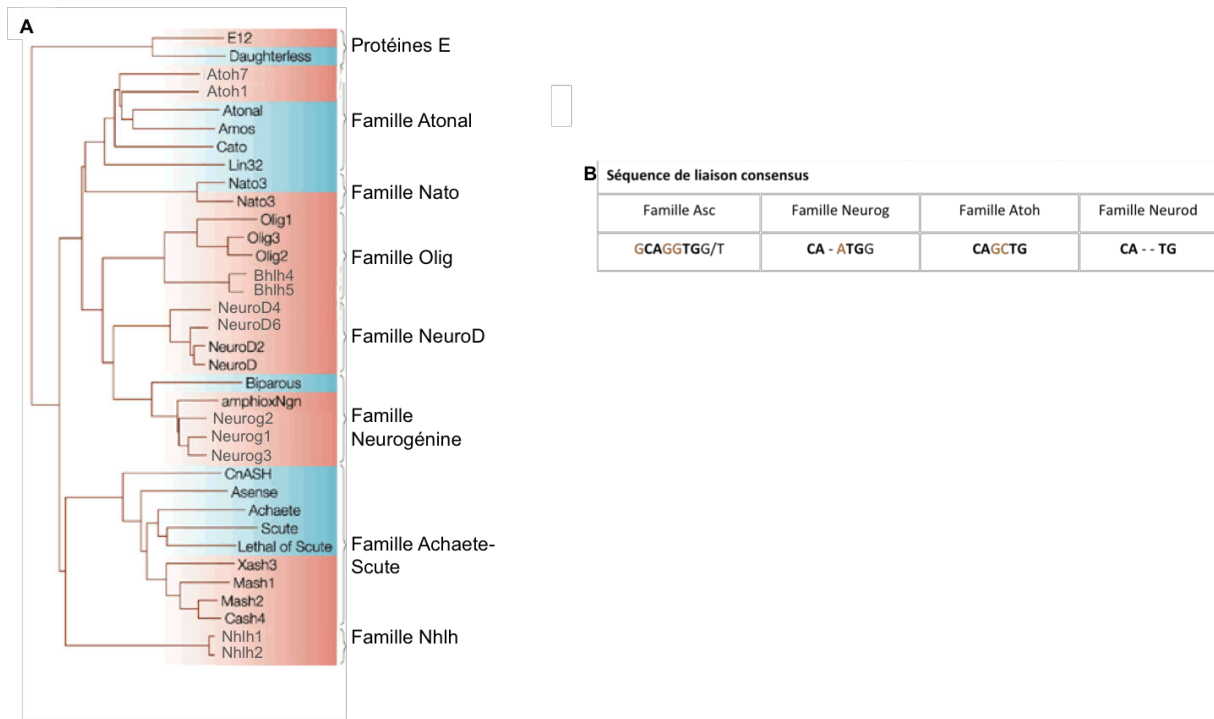
### 3. Rôle des facteurs de transcription de type bHLH dans la neurogenèse

Les premières étapes de spécification et différenciation des précurseurs neuraux ont été très étudiées chez plusieurs modèles et dans plusieurs tissus neurogéniques comme la moelle épinière (Tanabe and Jessell, 1996), les crêtes neurales (Anderson et al., 1997), la rétine (Cepko et al., 1996) ou l'épithélium olfactif (Cau et al., 2000). Ces études ont permis d'identifier des gènes spécifiques codant pour des facteurs de transcription à action antagoniste qui sont nécessaires à la mise en place des différentes populations neuronales.

#### 3.1. Les gènes proneuraux

Malgré la complexité du système nerveux central et une diversité neuronale importante, les vertébrés utilisent les mêmes mécanismes que la Drosophile au cours de la neurogenèse. Dans ce sens, une catégorie particulière de gènes bHLH a d'abord été identifiée chez la Drosophile pour laquelle une perte de fonction entraîne l'absence de certains types de neurones (Jimenez and Campos-Ortega, 1990). Ce sont les gènes proneuraux. Ces facteurs de transcription contrôlent les différentes étapes de la neurogenèse, comme la spécification d'une cellule indifférenciée vers les lignées neuronales et la sortie du cycle cellulaire. Ils activent également l'expression de gènes plus tardifs pour l'accomplissement de la phase de différenciation.

Deux familles de gènes proneuraux ont été identifiées chez la Drosophile et sont conservés chez les vertébrés : *achaete-scute (asc)* et *atonal (ato)* (Johnson et al., 1990). La famille asc-like chez les vertébrés compte 4 membres présents dans toutes les espèces analysées jusqu'ici : *Ascl1* chez le poisson-zèbre (*Zash1*), le xénope (*Xash1*), le poulet (*Cash1*) et la souris (*Mash1*) et trois autres, chacun spécifique d'une espèce de vertébrés, *Xash3* chez



**Figure 24. Les gènes proneuraux**

**A.** Dendrogramme représentant les différentes familles de protéines bHLH chez les invertébrés (en bleu) et chez les vertébrés (en rouge). Les protéines sont regroupées en famille selon la similarité de séquence de leur domaine bHLH. **B.** Séquences consensus des E-box présentes sur les promoteurs des gènes cibles des différentes familles de facteurs neuronaux bHLH. Les bases communes reconnues par l'ensemble des gènes proneuraux sont indiquées en gras. C'est au niveau des bases des deux positions centrales ou adjacentes que se fait la différence de reconnaissance entre les familles de proneuraux (Adapté de (Bertrand et al., 2002)).



le xénope, *Cash4* chez le poulet et *Mash2* chez les mammifères. Les gènes appartenant à la famille *ato* peuvent être sous divisés en 2 familles selon leurs domaines basiques : les Neurogénines (*Neurog1* et *Neurog2*); les homologues d'*ato* (*Atoh1*, *Atoh7*) (Ben-Arie et al., 2000; Hassan et al., 2000) (Figure 24A).

L'activité proneurale est très clairement définie pour les gènes *Ascl1*, *Neurog1* et *Neurog2* qui agissent de façon homologue aux gènes proneuraux de la Drosophile. Ils sont principalement responsables de la sélection des progéniteurs neuraux ainsi que de la spécification de leur identité. Dans le cas d'une perte de fonction des gènes *ac-sc* ou *ato*, on observe une absence de certains type de neurones sensoriels chez la Drosophile et de sous-types neuronaux chez les vertébrés (Bertrand et al., 2002; Campos-Ortega, 1998). D'autres gènes proneuraux ont été ensuite identifiés d'après leurs propriétés biochimiques et structurales. Ils sont pour la plupart exprimés dans le système nerveux en développement.

Afin d'activer la transcription de gènes cibles, les protéines proneurales s'hétérodimérisent entre elles ou avec d'autres facteurs bHLH ubiquitaires, les E-protéines. La séquence de liaison à l'ADN est appelée E-box et est présente sur les promoteurs des gènes cibles. Bien que les facteurs bHLH appartiennent à différentes familles, ils peuvent reconnaître l'hexamère commun CANNTG et vont se différencier au niveau de la reconnaissance des deux bases centrales et de celles des positions adjacentes (Figure 24B). Parmi les gènes cibles des protéines proneurales, on distingue d'autres gènes structurellement très proches des proneuraux, au sein des neurones en différenciation comme les gènes de la famille *NeuroD* (Figure 25A) (Cau et al., 1997; Ma et al., 1996; Sommer et al., 1996). Ces derniers vont être requis pour la détermination des neurones et leur engagement dans un lignage cellulaire (Liu et al., 2000; Miyata et al., 1999). L'activité des gènes de la famille *NeuroD* est située en aval des gènes proneuraux comme leurs homologues chez la Drosophile et cette activation semble être directe (Huang et al., 2000).

L'analyse des phénotypes du système nerveux central chez des mutants des gènes proneuraux a démontré leur rôle dans l'établissement de populations neuronales spécifiques ainsi que des structures du cerveau antérieur qui en découlent.



Par exemple, chez les mutants pour les gènes *Neurog1* et *Neurog2*, une absence des neurones des ganglions craniaux ou des neurones dopaminergiques est observée (Tableau 3B ; (Kele et al., 2006; Ma et al., 1998)). Cependant, leur activité proneurale et leur rôle dans la sélection des progéniteurs neuraux ne sont pas toujours déterminés (Tableau 3B).

### 3.2. La détermination neurale liée aux gènes proneuraux

Plusieurs lignages cellulaires ont été utilisés pour déterminer le rôle des gènes proneuraux au cours de la neurogenèse. Un des plus étudiés est l'épithélium olfactif. Il est considéré comme un épithélium sensoriel simple car composé de deux populations de cellules progénitrices : les cellules neuroépithéliales qui se divisent en apical et une autre catégorie cellulaire qui se divisent en basal avant de se différencier en neurones sensoriels olfactifs (NSO) (Caggiano et al., 1994). Cela a permis de définir une séquence temporelle d'expression des gènes bHLH au cours de la détermination neurale. Les souris mutantes pour *Ascl1* ne sont pas capables de générer les progéniteurs olfactifs et donc les NSO et vont également présenter d'autres défauts neurogéniques (Murray et al., 2003). Au contraire, les mutants pour *Neurog1* montrent une différenciation des progéniteurs neuraux bloquée au sein de l'épithélium olfactif (Cau et al., 2002). L'étude de ces animaux transgéniques a permis de montrer l'existence d'une cascade unidirectionnelle (*Ascl1* puis *Neurog1* puis *NeuroD1*) conduisant à la différenciation des NSO (Cau et al., 2002).

Les mêmes observations sont également rapportées au sein d'autres territoires neurogéniques où des combinaisons et cascades d'activation de gènes proneuraux permettent la détermination de populations neuronales spécifiques. Par exemple, dans le télencéphale ventral, les cellules de la zone ventriculaire (ZV) et les cellules progénitrices de la zone sous-ventriculaire (ZSV) vont permettre la production de neurones. Elles sont localisées dans les ventricules latéraux du télencéphale au niveau de deux élévations qui sont appelées éminence ganglionnaire latérale (EGL) et éminence ganglionnaire médiale (EGM) (cf : Figure 9). Au niveau de la génération des précurseurs ZSV de l'EGM chez des souris mutantes pour *Ascl1*, des défauts de neurogenèse du télencéphale ventral sont observés. *Ascl1* serait impliqué dans la spécification des précurseurs mais également dans leur timing de génération au sein du télencéphale ventral (Casarosa et al., 1999). *Ascl1* détermine le destin des progéniteurs neuraux du télencéphale ventral chez la souris et est



également requis pour la différenciation des interneurons GABAergiques qui est la population neuronale principale du télencéphale. De leur côté, *Neurog1* et *Neurog2* sont exprimés au niveau des progéniteurs dorsaux et *Neurog2* est requis pour la différenciation des neurones à projections glutaminergique dans le cortex cérébral (Schuurmans et al., 2004). De façon similaire, une cascade d'activation existe entre les proneuraux NEUROG1 et NEUROG2 qui activent *Neurod4* et *NeuroD1* au niveau des neurones craniaux sensoriels (Fode et al., 1998; Ma et al., 1998). Au sein des progéniteurs neuraux rétiniens d'embryons de souris, ce sont des combinaisons similaires d'expression de gènes proneuraux qui permettent la mise en place des différents lignages neuronaux rétiniens (pour revue (Bassett and Wallace, 2012)).

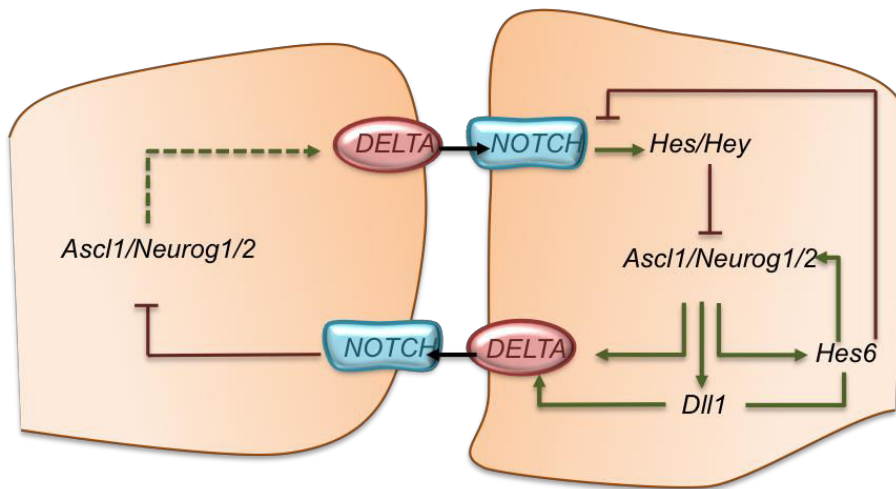
Afin d'obtenir ces différentes populations neuronales, les gènes proneuraux possèdent une caractéristique principale. Ils peuvent restreindre leur propre activité dans les cellules adjacentes à une cellule progénitrice ciblée. L'expression de ces derniers procure donc à la cellule un potentiel neural qui est nécessaire et suffisant pour la formation des progéniteurs neuraux (Bertrand et al., 2002).

Cependant, plusieurs études montrent que le contrôle des progéniteurs neuraux par les gènes proneuraux se ferait en deux étapes. Une première phase réversible de sélection des précurseurs neuraux implique une activité faible des gènes proneuraux, puis une deuxième phase irréversible prend place avec de très hauts niveaux d'expression ou d'activité des proneuraux. Ceci permet alors aux précurseurs de s'engager dans une destinée neuronale définitive (Bertrand et al., 2002; Culi and Modolell, 1998; Kintner, 2002; Latasa et al., 2009).

Les gènes proneuraux sont donc régulés par un mécanisme sophistiqué dont la voie Notch s'avère être le principal composant. Elle agit de façon répressive sur les gènes proneuraux par l'intermédiaire de ses effecteurs, les gènes de la famille *Hes/Hey*.

### **3.3. Antagonisme entre les facteurs de transcription bHLH proneuraux et Hes/Hey**

Au sein des groupes de cellules progénitrices, les gènes proneuraux apparaissent sous la régulation de répresseurs transcriptionnels, identifiés également comme des facteurs bHLH et cibles directes de la voie de signalisation Notch : *Hes/Hey*. Ces gènes sont



**Figure 25. Représentation simplifiée de la boucle de régulation entre les facteurs bHLH**

*Dans le modèle de régulation de la neurogenèse par la voie Notch, la liaison entre le ligand Delta et son récepteur Notch, entre deux cellules voisines, provoque un signal inhibiteur qui est traduit au noyau via l'activation des facteurs Hes/Hey. Ces derniers vont alors réprimer la transcription des gènes proneuraux Ascl1/Neurog1/2. Dans un second temps, les gènes tels que Dll1 et Hes6 sont alors réprimés dans la cellule de droite de façon transitoire en raison des boucles de régulation positive et négative qui se mettent en place.*

considérés comme anti-neuraux. En effet, l'inactivation de ces gènes provoque une différenciation accélérée des progéniteurs neuraux. Ceci suggère qu'ils exercent une action inhibitrice sur la phase de différenciation en réprimant directement ou indirectement l'expression des gènes de spécification neuronale.

Au cours de la neurogenèse, ils jouent donc un rôle de maintien de progéniteurs neuraux et d'inhibition de la détermination neurale. En effet, il a été démontré qu'en absence de *Hes1*, *Hes3* et *Hes5*, les cellules neuroépithéliales se différencient prématurément en neurones dans la moelle épinière de l'embryon (Hatakeyama et al., 2004). Cependant, ces études ont montré qu'il existait une forte redondance entre les facteurs *Hes*, ce qui permet d'atténuer les phénotypes neurogéniques. L'obtention de mutant a montré que ces gènes exerçaient de très nombreuses fonctions au cours du développement embryonnaire, qui ne sont pas restreintes au développement du système nerveux (Ishibashi et al., 1995; Kageyama et al., 2007; Ohtsuka et al., 1999).

Ces répresseurs vont inhiber l'activité des protéines proneurales en se fixant sur les promoteurs des gènes mais ils sont aussi capables d'interférer dans la formation des hétérodimères entre les protéines proneurales et les E-protéines (Davis and Turner, 2001; Kageyama et al., 1995; Van Doren et al., 1994). Par exemple, au sein de tissus sensoriels comme l'épithélium olfactif, *Hes1* et *Hes5* vont contrôler la différenciation neuronale par répression transcriptionnelle de gènes proneuraux comme *Ascl1* (Cau et al., 2000) de la même façon que *Hey1* et *Hey2* interfèrent par le contrôle d'*Ascl1* et *Neurod4* (Iso et al., 2001; Sakamoto et al., 2003; Steidl et al., 2000). Inversement, il a récemment été montré que la protéine HEYL, au sein de culture de progéniteurs neuraux, induirait la différenciation neuronale par activation des gènes proneuraux et répression des autres facteurs des familles *Hes/Hey* (Jalali et al., 2011).

D'autre part, les gènes proneuraux peuvent initier des boucles de régulation positive permettant d'augmenter leur niveau d'activation ou de le maintenir. Pour cela ils induisent l'expression de gènes comme *Hes6* qui va agir au niveau post-transcriptionnel sur *Ascl1* et les *Neurogénines* (Figure 25) (Bae et al., 2011; Nakagawa et al., 2000).

Cet antagonisme entre les facteurs bHLH et la capacité des proneuraux à restreindre le potentiel neural à une cellule isolée est un mécanisme qui permet la mise en place d'un mode d'action de la voie de signalisation Notch appelé inhibition latérale.





### 3.4. Les protéines Id

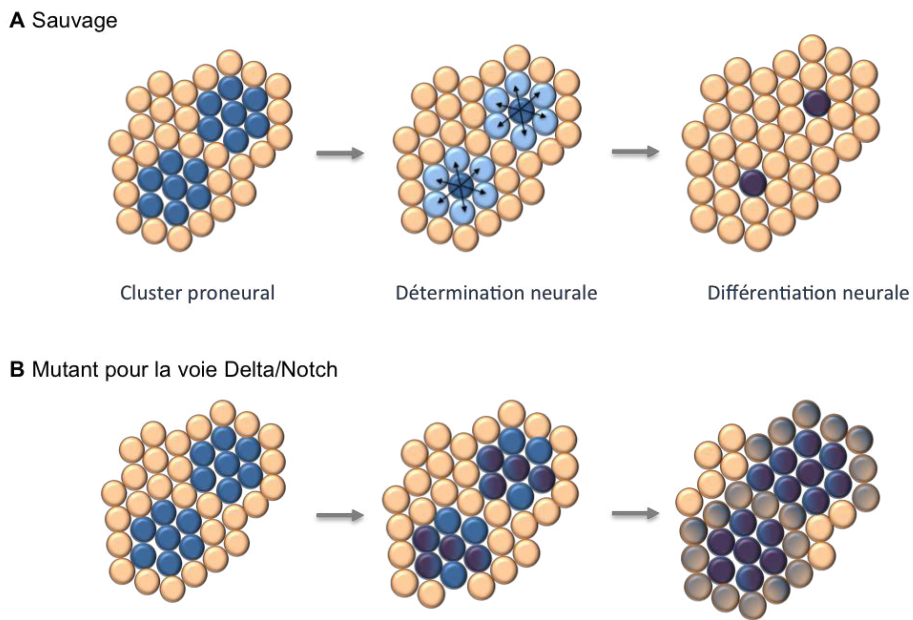
La formation de l'hétérodimère de protéines proneurales et protéine E est une condition préalable à la liaison à l'ADN. Un autre mécanisme de régulation des facteurs proneuraux provient de la compétition lors de la dimérisation. Les gènes de la famille des Id (macrochaetae) codent pour des protéines composées du domaine HLH mais dépourvues du motif de liaison à l'ADN. Les hétérodimères entre protéines E et Id ne seront pas capables de lier l'ADN et inhiberont indirectement l'activité proneurale par séquestration des protéines E (Cabrera and Alonso, 1991; Yokota et al., 2001). Quatre gènes Id sont identifiés chez la souris et présentent un patron d'expression chevauchant et une certaine redondance fonctionnelle (Yokota, 2001). En effet, un double mutant *Id2 ; Id3* conduit à une différenciation prématurée des neurones en raison de l'activation précoce des gènes proneuraux au sein des précurseurs neuronaux (Lyden et al., 1999). Inversement, une expression forcée de *Id4* bloque la neurogenèse chez le Xénope (Liu and Harland, 2003).

## 4. L'inhibition latérale

La voie Notch joue un rôle décisif dans les processus de différenciation des types cellulaires du système nerveux. En effet, les neurones exprimant les ligands DSL empêchent transitoirement la différenciation des précurseurs voisins et ralentissent leur engagement dans la neurogenèse. En cas d'une perte de fonction Notch, toutes les cellules du groupe de progéniteurs équipotents vont exprimer les gènes proneuraux et se spécifier en cellules neurales. On parle de phénotype neurogénique. Inversement lors d'une activation constitutive de la voie Notch, le groupe cellulaire initial va acquérir un destin épidermique par défaut. Ce mécanisme d'action de la voie Notch a été bien étudié et est appelé inhibition latérale.

### 4.1. Mode d'action de la voie Notch par inhibition latérale

Le mode d'action a initialement été décrit chez le Drosophile au cours de la séparation des lignages de progéniteurs neuraux (neuroblastes) et de progéniteurs de l'épiderme (épidermoblastes) (Greenwald and Rubin, 1992; Heitzler and Simpson, 1991).



**Figure 26. Représentation schématique du mécanisme d'inhibition latérale.**

**A.** Au sein d'un groupe de cellule exprimant des gènes proneuraux (cluster, en bleu) une cellule va se différencier en neurone (violet). Au cours de la détermination neurale, la cellule isolée exprime les ligands Delta pour activer la voie Notch dans les cellules voisines et y inhiber l'expression des proneuraux (bleu ciel). **B.** Lors de l'inactivation de la voie Notch chez des mutants, toutes les cellules du cluster proneural vont se différencier en neurones.

L'inhibition latérale repose sur une autorégulation qui déséquilibre l'expression des ligands et récepteurs entre cellules voisines. Là où la voie Notch sera suractivée, l'expression des ligands sera diminuée et réciproquement. Ce phénomène est très présent au cours de la neurogenèse de la même façon chez la Drosophile que chez les vertébrés. Il permet d'établir un choix binaire via l'inhibition d'un programme de différenciation.

Au sein des différents territoires sensoriels en développement, l'inhibition latérale semble permettre la production de lignages cellulaires spécifiques. Chez les mammifères, le poulet et le poisson-zèbre, les neurones olfactifs se différencient par mécanisme d'inhibition latérale (pour revue (Neves et al., 2013)). En effet, une cellule isolée au niveau des progéniteurs neuronaux va exprimer les gènes proneuraux ainsi que *Dll1*. Une variation des niveaux d'expression de ces gènes va permettre d'activer la signalisation Notch au sein des cellules voisines. Ainsi, les facteurs bHLH des familles HES/HEY vont être activés dans ces dernières et donc y inhiber les gènes proneuraux et les gènes des ligands DSL. Ces cellules reviennent à un état indifférencié ou deviennent des cellules de soutien alors que la cellule isolée adopte un destin neural. Le patron d'expression des récepteurs et des ligands de la voie Notch est alors qualifié de « poivre et sel » (Figure 26).

Au niveau de la placode olfactive chez le poulet, les gènes *Hes* sont actifs avant le mécanisme d'inhibition latérale afin de définir le domaine de neurogenèse. Ensuite, leur activité répressive sur les gènes proneuraux va prendre place pour contrôler le nombre de progéniteurs neuronaux émergeant de ce domaine. En plus de son action par l'inhibition latérale, la voie Notch est donc nécessaire en amont à la maintenance des cellules progénitrices de la placode olfactive (Maier et al., 2011; Schwarting et al., 2007).

## **4.2. Cibles des gènes proneuraux**

### 4.2.1. La voie Notch

L'activation des ligands de la voie Notch va donc constituer un élément clé du processus d'inhibition latérale. Chez la Drosophile comme chez les vertébrés, les proneuraux sont capables d'influencer l'activité des gènes *Delta* et *Jagged* au cours de la neurogenèse (Figure 27). En effet, la protéine ASCL1 va activer la transcription de *Dll1* et *Dll3*



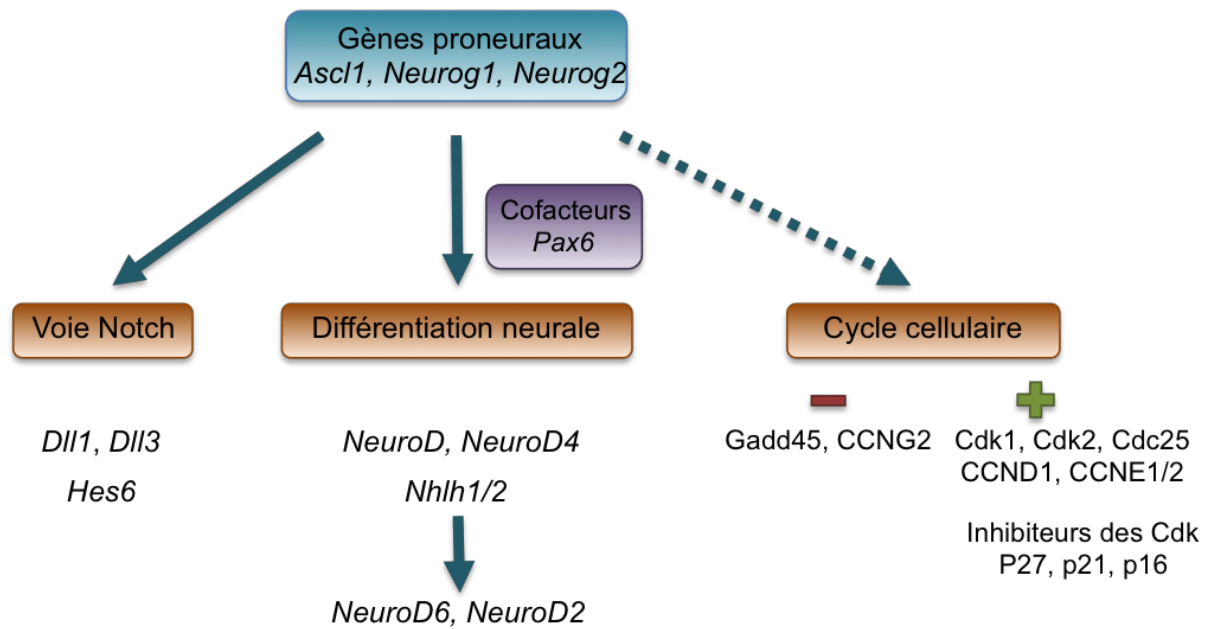
dans plusieurs régions du système nerveux central (Henke et al., 2009). NEUROG1 et NEUROG2 sont quant à eux nécessaires à l'expression de *Dll1* dans les précurseurs de neurones sensoriels craniaux au sein du télencéphale (Castro et al., 2006; Fode et al., 1998; Ma et al., 1998). Par exemple, chez les souris mutantes pour *Neurog2*, l'expression de *Dll1* est diminuée au même titre que celle de *NeuroD* (Fode et al., 1998) (Tableau 3). Les phénotypes observés chez les nombreuses souris transgéniques pour les gènes proneuraux montrent la complexité du réseau de régulation entre la voie Notch et les gènes proneuraux des différentes familles.

#### 4.2.2. Gènes bHLH de différenciation neurale

Il s'avère que les gènes proneuraux ont une expression transitoire au sein des progéniteurs neuraux. Afin de réaliser une différenciation neurale complète, les gènes proneuraux vont activer des gènes neuraux afin de relayer l'engagement des cellules vers un destin neuronal. Ces gènes de différenciation neuronale sont très proches structurellement des gènes proneuraux (Figure 27). Ce sont principalement les gènes bHLH de la famille NeuroD. Des études de perte de fonction chez la souris ont suggéré une relation d'épistasie entre les gènes proneuraux et les gènes de différenciation. En effet, NEUROG1 est nécessaire à l'activation de *NeuroD4* dans les ganglions craniaux (Ma et al., 1998), et NEUROG2 est nécessaire à l'activation de *NeuroD1* au niveau des placodes épibranchiales (Fode et al., 1998) (Tableau 3B).

D'autre part, les gènes proneuraux et les gènes de différenciation jouent un rôle important dans l'équilibre entre la neurogenèse et la gliogenèse. Les neurones et les cellules gliales proviennent d'un même progéniteur neural et une fine régulation spatio-temporelle des expressions des gènes proneuraux et de leurs gènes cibles bHLH est nécessaire pour le choix de destin cellulaire. Par exemple, des doubles mutants *Ascl1/NeuroD4* et *Ascl1/Neurog2* montrent une différenciation prématurée des astrocytes en raison d'un blocage de la différenciation neuronale (Cai et al., 2000; Nieto et al., 2001; Tomita et al., 2000) (Tableau 3B).

Inversement, les gènes proneuraux sont capables de réprimer les gènes dits pan-neuraux comme *Sox1*, *Sox2* (Bylund et al., 2003) et *Stmn2/SCG10* (Cau et al., 2000) ou des gènes participant à la spécification de sous type neuronaux comme *Pax6* et *Olig2* (Zhou et al., 2000).



**Figure 27. Différentes cibles des protéines proneurales.**

*L'expression des gènes proneuraux au niveau d'un progéniteur neural va initier le programme de différenciation neuronale. Pour cela, la voie Notch va être activée pour inhiber les gènes proneuraux dans les cellules voisines. Les proneuraux activent également des facteurs bHLH pour continuer la différenciation neurale. En parallèle les proneuraux peuvent induire la sortie du cycle cellulaire par l'activation d'inhibiteurs de Cdk ou la régulation des cyclines et kinases dépendantes (Adapté de (Bertrand et al., 2002)).*

### 4.3.3. Effecteurs du cycle cellulaire

Afin de générer des populations neuronales au sein du système nerveux, la différenciation des progéniteurs est couplée à l'interruption du cycle cellulaire qui maintient le stock de progéniteurs. Les protéines proneurales jouent un double rôle dans la neurogenèse, à savoir qu'elles induisent de façon simultanée l'arrêt du cycle cellulaire et l'engagement vers un destin neuronal.

Au niveau du tube neural chez l'embryon de poulet, la surexpression de *Neurog2* entraîne une différenciation neuronale prématurée des cellules neuroépithéliales couplée à une sortie prématurée du cycle cellulaire (Mizuguchi et al., 2001; Novitsch et al., 2001).

La progression du cycle cellulaire résulte de l'activité de kinases cycline dépendantes (CDK) et de leurs partenaires, les cyclines. Les différentes phases du cycle cellulaire sont gérées par des combinaisons spécifiques de CDK/cyclines. Les gènes proneuraux vont agir de façon positive ou négative sur la progression cellulaire. Par exemple, *ASCL1* est capable d'activer *Cdk1*, *Cdk2* et *Cdc25B* alors qu'il va inhiber l'expression de *Gadd45* et *Ccng2* (Castro et al., 2011) (Figure 27). De la même façon, *NEUROG2* régule l'arrêt du cycle cellulaire au niveau de la moelle épinière chez le poulet. En effet, *NEUROG2* va réprimer l'expression des cyclines *CCND1* et *CCNE1/2* au cours de la phase G1/S (Lacomme et al., 2012).

De plus, la régulation du cycle cellulaire par les gènes proneuraux implique également l'activation d'inhibiteurs de kinase cycline dépendant (p16, p21 ou p27) (Farah et al., 2000; Mutoh et al., 1998) (Figure 27).

## 5. Interaction de la voie Notch avec d'autres voies de signalisation

Au cours de la neurogenèse, la voie Notch joue un rôle prépondérant pour la régulation des gènes proneuraux conduisant à la détermination neurale. Cependant, les gènes proneuraux semblent aussi sous l'influence d'autres voies de signalisation. La voie de l'acide rétinoïque déjà impliquée au cours de la régionalisation du tube neural va influencer sur l'activité de la voie Notch et par conséquent sur les gènes proneuraux (Jacob et al., 2013). En effet, la voie de l'acide rétinoïque va réguler l'expression quantitative d'*Ascl1* qui va déterminer le type neuronal final.

Une autre étude a mis en évidence la synergie entre la voie Notch et la voie Slit/Robo. En effet, cette voie de signalisation plus particulièrement impliquée dans le





guidage axonal, joue également un rôle dans l'équilibre entre les progéniteurs neuraux primaires et les progéniteurs neuraux intermédiaires. Les auteurs ont montré que cette régulation de la neurogenèse dans le cortex cérébral par la voie Slit/Robo impliquait une interaction avec la voie Notch via le contrôle de la transcription du facteur *Hes1* (Borrell et al., 2012). Par ailleurs, au niveau de l'épithélium olfactif, c'est un équilibre entre la voie Notch et la voie des BMP qui va permettre la neurogenèse et le développement correct du nerf olfactif (Maier et al., 2011). Plus précisément, les signaux BMP vont inhiber l'activité Notch au niveau de l'épithélium olfactif. Ces deux voies de signalisation contrôlent les événements précoces de la neurogenèse et la formation des premiers neurones migratoires à partir des neurones sensoriels olfactifs.

## 4. Dysfonctionnement de la voie Notch et maladies chez l'Homme

### 4.1. Cancers

Historiquement, le premier lien entre la voie Notch et le cancer a été démontré en 1991 avec l'identification d'un réarrangement chromosomique rare dans des types de leucémies lymphoblastiques T-ALL (T-cell acute lymphoblastic leukémias) (Ellisen et al., 1991). Une translocation chromosomique conduisant à une forme tronquée de Notch1 a été identifiée de façon récurrente. In vitro, les formes actives des domaines intra cellulaires de Notch provoquent la transformation des cellules et peuvent ainsi favoriser l'apparition de lymphomes ou tumeurs mammaires (Bellavia et al., 2000; Gallahan and Callahan, 1997). Des mutations au niveau de *NOTCH2* ont récemment été découvertes dans un sous type cellulaire des lymphomes à cellules B (Lee et al., 2009). Notch agirait alors dans certains types cellulaires comme un suppresseur de tumeurs (Wang et al., 2011a). Inversement, d'autres cancers s'accompagnent d'une augmentation de l'activité de la voie Notch due à une surexpression de certains de ses acteurs. La signalisation Notch exercerait alors une activité oncogénique (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2012).

Gène	Maladies humaines associées	Références	Phénotype des souris homozygotes mutantes	Références
<i>NOTCH1</i>	Leucémies lymphoblastiques T-ALL Maladies de la valve aortique	(Weng et al., 2004)  (Garg, 2006)	Létalité embryonnaire (E9.5-E11.5) Défauts de neurogenèse, somitogénèse et désorganisation vasculaire Déficit mnésiques chez les mutants +/-	(Swiatek et al., 1994) (Ge et Stanley, 2010) (Conlon et al., 1995) (Costa et al., 2003)
<i>NOTCH2</i>	Syndrome Alagille Syndrome Hajdu-Cheney et du foie polycystique Serpentine fibula	(McDaniell et al., 2006) (Simpson et al., 2011; Isidor et al., 2011)	Létalité embryonnaire (E11.5) Défauts de déterminisme et à la mort des cellules neurales	(Hamada et al., 1999)
<i>NOTCH3</i>	Syndrome CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)	(Joutel et al., 2004)	Pas de défauts phénotypiques/ Défauts au niveau du thymus/ Diminution du taux de cibles de Notch3 dans les cellules des muscles lisses artériels	(Krebs et al., 2003/ Kitamoto et al., 2005/Jin et al., 2008)
<i>NOTCH4</i>	Implication controversée dans la schizophrénie	(Ivo et al., 2006)	Pas de défauts phénotypiques	(Krebs et al., 2000)
<i>DLL1</i>	Holoprosencéphalie	(Dupé et al., 2011)	Létalité embryonnaire (E9.5-11.5) Défauts de neurogenèse et somitogénèse Anomalies métabolique et immunologiques chez les mutants +/-	(Hrabe de Angelis et al., 1997)
<i>DLL3</i>	Dystose spondylocostale	(Kusumi et al., 1998; Bulman et al., 2000; Turnpenny et al., 2003)	Déformations vertébrale et nerveuse, tronc et queue raccourcis Défauts de somitogénèse	(Dunwoodie et al., 2002)
<i>DLL4</i>	—	—	Létalité embryonnaire des mutants -/- et +/- (E9.5-E11.5) Défauts de vasculogénèse, retard de développement	(Krebs et al., 2004)
<i>JAGGED1</i>	Syndrome Alagille Tétralogie de Fallot	(Oda et al., 1997) (Li et al., 1997)	Létalité embryonnaire (E11.5) Défauts de vasculogénèse	(Xue et al., 1999)
<i>JAGGED2</i>	—	—	Létalité post-natale suite à des anomalies craniofaciales (fente palatine), du thymus et des membres (Syndactylie)	(Jiang et al., 1998) (Xu et al., 2010)
<i>MESP2</i>	Dystose spondylocostale	(Whitlock et al., 2004)	Létalité post-natale Défauts de somitogénèse, fusion des ganglions de la racine dorsale et de la colonne vertébrale	(Saga et al., 1997)
<i>MAML2</i>	Carcinome mucoépidermoïde Leucémie myéloïde aigue secondaire	Conkright et al., 2003; Enlund et al., 2004; Tonon et al., 2003)	—	—
<i>LFNG</i>	Dystose spondylocostale	(Sparrow et al., 2006)	Défauts de somitogénèse et des poumons Déformation nerveuse Diminution de la fertilité des femelles	(Zhang et Gridley, 1998)
<i>HES7</i>	Dystose spondylocostale	(Sparrow et al., 2008)	Létalité post-natale Défauts de somitogénèse, tronc et queue raccourcis. Déformation et fusion des vertèbres	(Bessho et al., 2001)

**Tableau 4. Maladies humaines associées à des gènes de la voie Notch et les phénotypes de souris homozygotes mutantes correspondantes.**

## 4.2. Maladies héréditaires

Des mutations ou réarrangements chromosomiques d'effecteurs de la voie Notch ont été identifiés chez l'Homme et sont responsables de différentes pathologies (Tableau 4). Des pathologies héréditaires comme le syndrome Alagille ou la Tétralogie de Fallot sont liées à des mutations de *JAGGED1* ou *NOTCH2*. Ces deux maladies sont les formes les plus fréquentes de malformation cardiaque congénitale et sont donc caractérisées par des troubles de développement du cœur ainsi que du foie, des yeux et du squelette. D'autres défauts du squelette sont observés dans une forme de nanisme, la dystose spondylocostale lors de mutations de *DLL3*, *LFNG*, *HES7* et *MESP2*. La voie Notch est également impliquée dans des maladies du métabolisme osseux comme le syndrome Hadju-Cheney ou le syndrome du foie polycystique Serpentine Fibula lors de mutations de *NOTCH2*. Les gènes des récepteurs *NOTCH1* et *NOTCH3* vont être respectivement associés à des maladies cardiovasculaires dont les symptômes sont présents dans le syndrome Alagille ; et cérébrovasculaires avec des déficits autosomiques dominants de la vascularisation (CADASIL). Enfin, des mutations de *NOTCH4* pourraient être associées à des formes de schizophrénies mais leurs implications restent encore nuancées par des travaux plus récents.

Les études du phénotype des souris transgéniques mutantes pour ces effecteurs de la voie Notch sont cohérentes avec les pathologies humaines associées. En effet, malgré une létalité embryonnaire entre E9.5 et E11.5 ou post-natale, des défauts de somitogénèse, neurogénèse ou de vasculogénèse chez les mutants *Notch1*, *Notch2*, *Jagged1*, *Mesp2* et *Hes7* sont observés. Chez les mutants *Notch3* de nombreux phénotypes ont été observés mais restent difficilement comparables aux symptômes du syndrome CADASIL. Les mutants *Dll3* et *Lfnf* présentent des défauts de somitogénèse concordant avec la dystose spondylocostale humaine et restent viables. Dans le cas des mutants *Notch4*, aucun phénotype morphologique n'a pu être observé (Tableau 4).



### 4.3. *Dll1* et Holoprosencéphalie

Récemment, l'équipe a émis l'hypothèse qu'une diminution de l'activité de la voie Notch au cours du développement du cerveau pourrait potentialiser l'apparition de l'Holoprosencéphalie.

En effet, le gène *Dll1* codant pour un ligand des récepteurs Notch a été associé à l'Holoprosencéphalie chez plusieurs patients. Ce gène est délété à l'état hétérozygote chez 4 patients présentant un phénotype d'Holoprosencéphalie (2 formes alobaires, 1 forme semilobaire et 1 microforme chez 2 frères). Cependant, cette délétion dans la région 6qter, comporte de nombreux autres gènes. La plus petite région délétée (2,2 MB) comprend 14 gènes. C'est donc par hiérarchisation bioinformatique dans un premier temps que notre équipe a identifié *DLL1* comme le meilleur gène candidat (Aerts et al., 2006). L'étude moléculaire du gène *DLL1* par séquençage a ensuite été mise au point et une série de 100 proposants a été analysée. Une délétion de 3 nucléotides a été identifiée concernant deux codons impliqués dans le domaine d'ubiquitination. D'autre part, l'expression de *Dll1* est compatible avec un rôle au cours du développement précoce du cerveau antérieur.

Par ailleurs, les mutants hétérozygotes pour *Dll1* présentent des anomalies de la ligne médiane mais pas de réel phénotype HPE (Przemeck et al., 2003). Cependant, il n'existe pas à ce jour d'études approfondies des structures cérébrales chez ces embryons qui présentent une létalité embryonnaire précoce (E11). Des inactivations conditionnelles et des surexpressions de *Dll1* dans le télencéphale ont pu mettre en évidence un rôle dose-dépendant dans la neurogenèse de la zone ventriculaire (Kawaguchi et al., 2008). Cela conforte le rôle important de *Dll1* au cours du développement du cerveau mais à des stades plus tardifs que ceux impliqués dans l'HPE.

Les études d'inactivation des principaux acteurs de la voie Notch ont mis en évidence son caractère indispensable dans la différenciation et le développement des tissus comme le système nerveux central.



# OBJECTIFS DE LA THESE

---

Mon travail de thèse s'est inscrit dans le projet de recherche de l'équipe « Génétique des Pathologies Liées au Développement » au sein de l'unité CNRS-UMR6290. Le travail mis en place sur la thématique de l'HPE a débuté en 1996 et a pour objectif d'améliorer les connaissances cliniques, moléculaires et physiologiques inhérentes à cette pathologie. Dans ce but, des études sont réalisées sur des cohortes de patients permettant d'identifier des mécanismes moléculaires impliqués qui seront également analysés grâce à de modèles animaux. Ces deux approches sont totalement complémentaires et ont été incluses dans mon travail de thèse. Cela m'a permis d'avoir une vision globale des processus perturbés au cours de l'apparition de l'HPE.

- **Validation de l'implication de la voie de signalisation Notch dans l'Holoprosencéphalie**

Il est ressorti des travaux préalables réalisés par l'équipe que la voie de signalisation Notch pourrait jouer un rôle dans l'apparition d'une anomalie de type HPE. L'un des objectifs de ma thèse a donc été de caractériser l'expression des composants de la voie Notch au cours du développement du cerveau antérieur en conditions normales de développement.

Pour cela j'ai utilisé le modèle d'embryon de poulet. J'ai ainsi pu décrire une activité de la voie Notch spécifiquement restreinte au niveau de l'hypothalamus. Par la suite, j'ai mis en place une technique originale de culture d'embryons pour réaliser des inhibitions pharmacologiques. Cette approche combinée à une analyse transcriptomique m'a permis d'étudier les répercussions d'une inactivation de la voie Notch au cours du développement de l'hypothalamus. Notre étude a permis d'identifier de nouvelles cibles de la voie Notch, tels que *Tagln3*, *Chga* ou *Chrdl1* au niveau de différents territoires neurogéniques, en particulier au niveau de ceux de l'hypothalamus.

La neurogenèse au niveau de ce territoire est encore mal définie et bien que certaines études y associent la voie Notch, aucune ne fait part de son mode d'action.





Par ailleurs, l'étude d'expression de *Shh*, gène majeur de l'HPE, chez des embryons déficients pour la voie Notch, m'a permis de montrer que cette voie contribuait à la régulation de ce gène. Pour la première fois cette étude fonctionnelle permet le lien entre l'HPE et la voie Notch.

- **Le modèle multi-hit pour l'Holoprosencéphalie : Etude clinique chez l'homme puis moléculaire chez l'embryon de poulet**

Dans l'hypothèse multi-hit pour l'Holoprosencéphalie, il a été mis en avant que différents facteurs, d'origine génétique ou environnementale, pourraient retentir sur une ou plusieurs voies de signalisation et en entraîner la dérégulation. La modification des interactions entre ces voies de signalisation qui s'en suit, va agir au niveau spatio-temporel sur la mise en place du cerveau antérieur. De plus, le caractère dose-dépendant entre les différents acteurs des voies de signalisation corrèle avec la diversité des phénotypes observés dans l'HPE.

Afin de consolider le modèle multi-hit, nous avons choisi dans un premier temps de regrouper les données cliniques et moléculaires des patients porteurs d'une HPE. Les données ont été entrées dans une base de données dédiée, accessible en ligne. Sandra Mercier a ensuite réalisé des recherches de corrélations génotype-phénotype. Ce travail avait pour but de conforter le modèle multi-hit chez l'Homme en dégagant des signes cliniques caractéristiques d'une voie de signalisation. Par ailleurs, Sandra Mercier a pu définir un algorithme diagnostique afin de préciser le conseil génétique.

Dans un deuxième temps, nous avons choisi de valider ce modèle multi-hit en utilisant un modèle animal, l'embryon de poulet. Pour cela, deux voies majeures de l'Holoprosencéphalie, les voies Nodal et *Shh*, ont été testées.



# RÉSULTATS

---

## Partie 1.

### ◆ Article 1. NOUVEAUX GÈNES SUREXPRIMÉS LORS DE L'INACTIVATION DE LA VOIE NOTCH AU COURS DU DÉVELOPPEMENT HYPOTHALAMIQUE

*Neural development, accepté le 4 Décembre 2013*

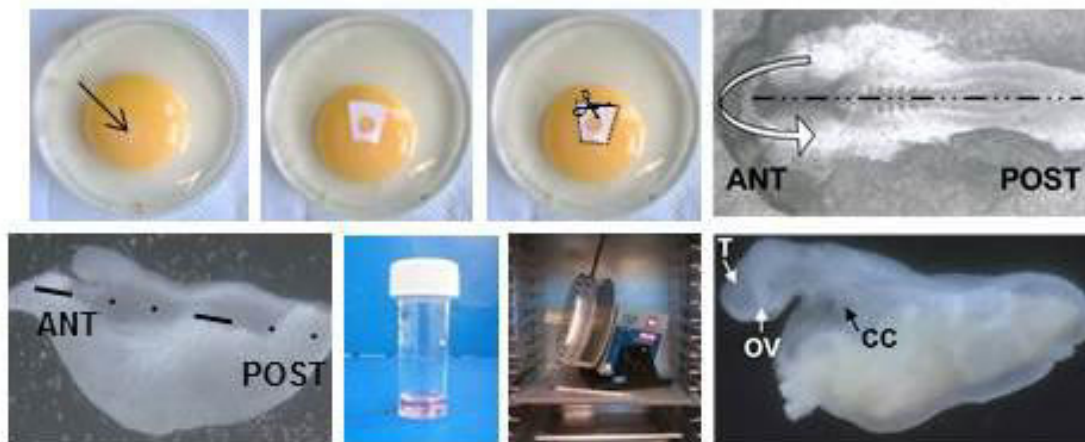
Ratié L, Ware M, Barloy-Hubler F, Romé H, Gicquel I, Dubourg C, David V, Dupé V.

Afin de mieux caractériser l'implication de la voie Notch dans le développement de l'hypothalamus, nous avons fait le choix du modèle d'embryon de poulet pour réaliser une inhibition de la voie.

Dans un premier temps, nous avons démontré que le ligand *Dll1* et les effecteurs de la voie Notch *Hes5* et *Hey1* étaient exprimés au niveau du cerveau antérieur à partir du stade HH11 et plus précisément au sein de l'hypothalamus en développement. D'autre part, il est apparu que ces acteurs de la voie Notch étaient localisés au niveau de l'hypothalamus antérieur donnant lieu au noyau du tractus de la commissure post-optique (nTPOC) suggérant leur contribution dans la différenciation des neurones hypothalamiques.

Une approche combinant une inhibition pharmacologique de la voie Notch avec une analyse transcriptomique m'a ensuite permis d'obtenir une vision globale des dérégulations au niveau du cerveau antérieur d'embryon de poulet. Pour cela, nous avons utilisé une technique originale appelée culture roller. Elle permet de cultiver les embryons de poulet dans un milieu liquide dans lequel un inhibiteur pharmacologique peut être ajouté avec une concentration déterminée (Figure 28). L'inhibiteur de la voie Notch, le DAPT a été utilisé à une concentration de 40µM. Une culture du stade HH10 au stade HH13 permet un développement correct de l'embryon et une morphologie comparable entre les embryons témoins et les embryons traités avec le DAPT.

Lors de l'inhibition de la voie Notch, il apparait de façon cohérente que les répresseurs transcriptionnels *Hes5* et *Hey1* étaient fortement sous-exprimés alors que leurs principales cibles, comme le ligand *Dll1* et les gènes proneuraux *Ascl1*, *Neurog1* et *Neurog2*



**Figure 28. Les différentes étapes de la culture roller d'embryons de poulet.**

*Les embryons sont prélevés au stade HH10 et repliés sur eux-mêmes selon l'axe antéro-postérieur. Les membranes sont soudées entre elles par une coupure aux micro-ciseaux pour former une raviolle. Les embryons sont ensuite placés dans des tubes 5mL contenant le milieu de culture. Ils sont ensuite placés sur une roue en rotation dans une étuve à 38°C et les embryons sont incubés 16h. Après la culture, les embryons sont prélevés au stade HH13 où les segments du cerveau sont morphologiquement caractérisables comme le télencéphale (T), de même que les vésicules optiques (OV) et la cavité cardiaque (CC).*

étaient surexprimés en condition d'inhibition de la voie Notch. Celle-ci révèle une sous-expression des gènes positivement régulés par Notch (e.g. *Hes5* et *Hey1*) et une surexpression des gènes normalement réprimés par les effecteurs de Notch (e.g. *Ascl1* et *Neurog1*), validant ainsi l'approche employée.

Une analyse selon les termes de Gene Ontology, a révélé un enrichissement significatif de gènes du développement du système nerveux parmi les 1558 gènes dérégulés. Une sélection des gènes présentant le même profil de surexpression que les gènes proneuraux a été réalisée dans le but d'identifier de nouvelles cibles potentielles de la voie Notch. Sur une cinquantaine de gènes testés, nous avons produits 23 sondes ARN présentant un domaine d'expression spécifique. Finalement, les patrons d'expression observés pour 8 d'entre eux suggèrent l'existence d'une neurogenèse précoce au niveau de la ligne médiane ventrale chez les embryons traités au DAPT : *Ascl1*, *Nhlh1*, *Stmn2*, *Slit1*, *Robo2*, *Tagln3*, *Chga* et *Chrdl1*. *Ascl1*, *Nhlh1* et *Stmn2* sont tous les trois des marqueurs successifs du processus de différenciation neuronale et impliqués dans le mécanisme d'inhibition latérale. La validation de leur expression différentielle par hybridation *in situ* révèle une perte de patron d'expression en « poivre et sel » typique de l'inhibition latérale. Ces résultats suggèrent qu'une neurogenèse précoce se met en place au niveau de l'hypothalamus en développement lors d'une inhibition de la voie Notch.

Par ailleurs, l'analyse d'expression des gènes *Slit1* et *Robo2*, décrits pour leur rôle dans le guidage axonal au sein de l'hypothalamus, montre également une surexpression au sein de l'hypothalamus sous la dépendance de la voie Notch.

Finalement, nous décrivons 3 gènes, *Tagln3*, *Chga* et *Chrdl1*, très peu étudiés dans la littérature et jamais associés précédemment à la voie Notch.

Pour compléter ces résultats et comprendre les mécanismes de régulation entre les différents facteurs identifiés, une étude *in silico* des promoteurs des gènes d'intérêts a été réalisée. Cela m'a permis de prédire un programme de régulation transcriptionnelle au sein de l'hypothalamus en développement pouvant être appliqué à d'autres régions neurogéniques.



## **Novel genes upregulated when NOTCH signalling is disrupted during hypothalamic development**

Leslie Ratié<sup>1</sup>, Michelle Ware<sup>1</sup>, Frédérique Barloy-Hubler<sup>1,3</sup>, Hélène Romé<sup>1</sup>, Isabelle Gicquel<sup>1</sup>,  
Christèle Dubourg<sup>1,2</sup>, Véronique David<sup>1,2</sup> and Valérie Dupé<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Génétique et Développement, CNRS UMR6290, Université de Rennes 1, IFR140  
GFAS, Faculté de Médecine, Rennes, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Pontchaillou, Rennes, France

<sup>3</sup>Amadeus Platform, SFR BIOSIT, Rennes, France

\*To whom correspondence should be addressed at: CNRS UMR6290, Université de Rennes1,  
2, avenue du Pr. Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France. Tel: +33 223234543; Fax: +33  
223234470; Email: valerie.dupe@univ-rennes1.fr





## **ABSTRACT**

### **Background**

The generation of diverse neuronal types and subtypes from multipotent progenitors during development is crucial for assembling functional neural circuits in the adult central nervous system. It is well known that Notch signalling pathway through the inhibition of proneural genes is a key regulator of neurogenesis in the vertebrate central nervous system. However, its role during hypothalamus formation along with its downstream effectors remains poorly defined.

### **Results**

Here, we have transiently blocked Notch activity in chick embryos and used global gene expression analysis to provide evidence that Notch signalling modulates the generation of neurons in the early developing hypothalamus by lateral inhibition. Most importantly, we have taken advantage of this model to identify novel targets of Notch signalling, such as *Tagln3* and *Chga*, which were expressed in hypothalamic neuronal nuclei.

### **Conclusions**

This data gives essential advances into the early generation of neurons in the hypothalamus. We demonstrate that inhibition of Notch signalling during early development of the hypothalamus enhances expression of several new markers. These genes must be considered as important new targets of the Notch/proneural network.

Key words: Notch, Proneural genes, hypothalamus, neuronal differentiation, embryonic brain.

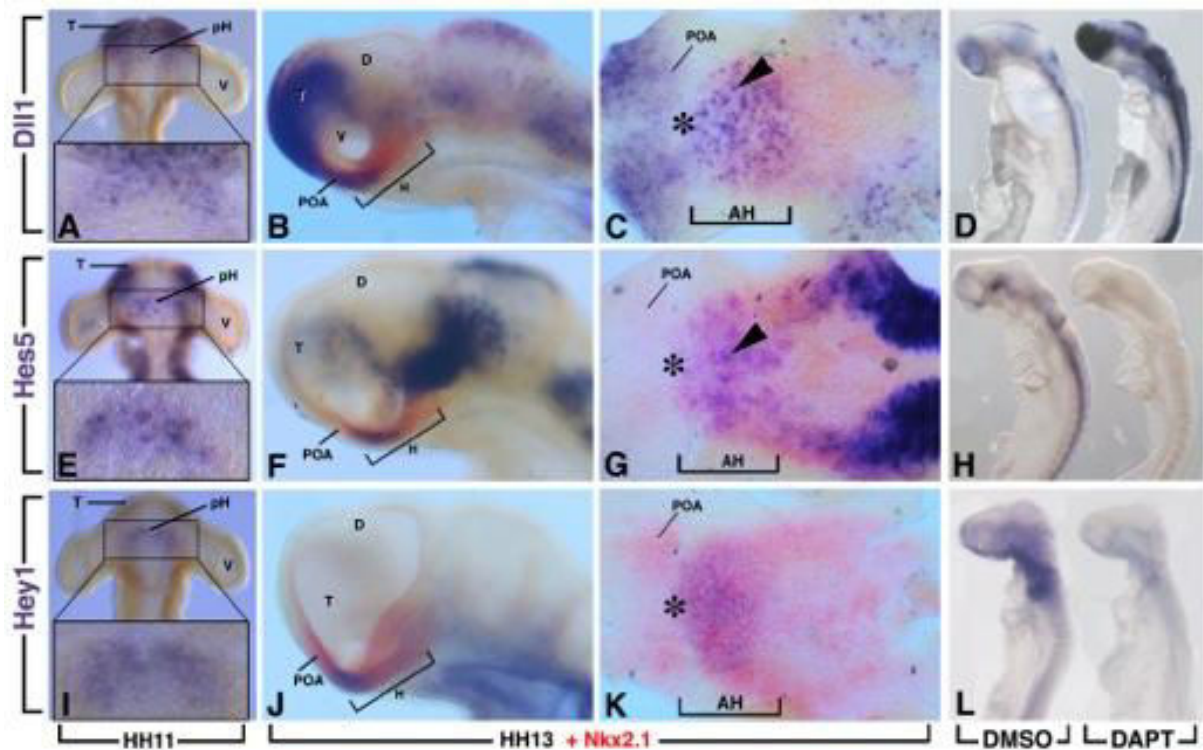


## INTRODUCTION

The hypothalamus influences a broad spectrum of physiological functions, including autonomic nervous system, reproduction and behaviour. Despite its physiological importance, we are only beginning to understand the molecular mechanisms underlying neural differentiation within this organ. In the developing hypothalamus, progenitor domains were characterized by complex patterns of transcription factor gene expression, and an important yet unresolved question concerns the molecular determinants of the neurons produced in each progenitor domain [1, 2].

The hypothalamus develops from the ventral region of the diencephalon and pattern formation depends on the activities of major protein signalling pathways, such as Sonic hedgehog (Shh) and bone morphogenic protein (BMP) [3]. They are involved in patterning, regional identity and cell fate determination. Then, proper development of the hypothalamic axis requires signals, which lead to numerous types of neurons and glia. The temporal control of the transition from cell proliferation to cell differentiation in the nervous system is believed to involve many antagonist factors and a proper balance of their actions is essential for neurogenesis to take place [2, 4].

It has been well described that Notch signalling is an evolutionary conserved mechanism that plays an essential role in maintaining neural progenitor identity and suppressing neuronal differentiation [5, 6]. The transmembrane Notch receptor is activated upon binding to membrane-bound DELTA or SERRATE ligands present in adjacent cells. Upon activation of Notch signalling, the Notch intracellular domain (NICD) is released and forms a complex with the DNA-binding transcription factor RBPJ. This complex induces the transcription of repressor-type basic helix-loop-helix (bHLH) *Hes* and *Hey* genes by binding to their promoters [7, 8]. Gain of function studies have revealed that constitutive Notch signalling leads to cells remaining as progenitors [9, 10]. Whereas loss of NOTCH1 results in the premature differentiation of neurons at the expense of undifferentiated cells in the cerebellum [11]. Similarly, *Hes1* and *Hes3* double null mice show premature neuron formation in the mesencephalon and rhombencephalon [12]. Numerous studies have shown that this premature differentiation of neurons occurs through transient and sequential upregulation of proneural bHLH transcription factor genes [13-16]. From these studies and numerous others, it has been proposed that to maintain neural progenitor cells a regulatory loop takes place between neighbouring cells. This loop involves the upregulation of Delta-ligand expression by proneural genes and downregulation of proneural gene expression by the Notch signalling



**Figure 1:** Regionalized expression of the components of the Notch pathway in the hypothalamus. Expression of *Dll1*, *Hes5* and *Hey1* at HH11 and HH13 as indicated. All genes were detected initially as a crescent region between the two optic vesicles (boxes in A,E,I). (B,C,F,G,J,K) Double expression of *Dll1*, *Hey1* or *Hes5* (blue) with *Nkx2.1* (red) at HH13, showing that the expression of all the genes occupies the rostral region of the hypothalamus. (C,G,K) Hemisected, flatmounted preparation of the ventral diencephalon of the corresponding embryos in B,F,J respectively with the eye removed and viewed from the ventral side. Arrowheads indicate scattered cell expression. Asterisk indicates rostral expression caudal to the prospective chiasmatic area. (D, L) HH10 chick embryos were treated with DAPT or DMSO for 16 hours. (H) Embryos were treated for only 3 hours from HH12. There was downregulation of *Hes5* (H) and *Hey1* (L) expression after DAPT treatment, whereas *Dll1* was upregulated (D). AH, anterior (rostral) hypothalamus; D, diencephalon; H, hypothalamus; pH, hypothalamus primordium; POA, preoptic area; T, telencephalon, V, optic vesicle.

pathway through the repressor *Hes/Hey* genes. This process is called lateral inhibition [13, 17]. Thus in the absence of *Hes* and *Hey* bHLH repressors, proneural genes such as *Ascl1* or *NeuroG* are significantly up-regulated, and induce expression of a wide spectrum of neuron-specific genes leading to premature formation of early-born neurons [18].

Recently, Notch signalling has been strongly implicated in the differentiation of the mouse hypothalamic arcuate neurons (Arc) through a loss of function study in the mouse [16]. This study shows that Notch signalling affects maintenance of hypothalamic neuronal progenitor pool by repressing the proneural gene, *Ascl1*. However, still little is known about the molecular targets of this Notch/proneural network during this process.

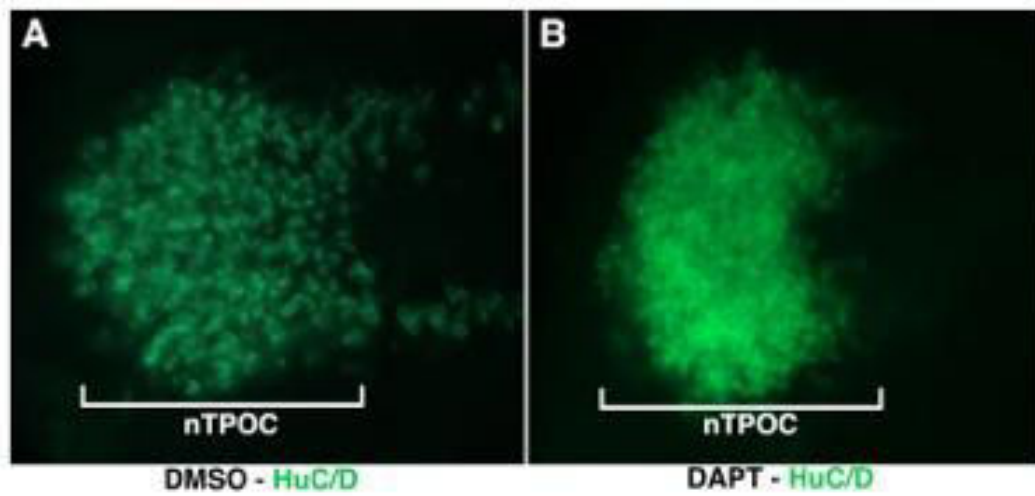
In order to address the extent in which Notch signalling is required for functional neuronal development we have taken advantage of its function in the developing hypothalamus to characterize new target genes. For that a chemical approach was used to inactivate Notch signalling in the chick embryo in a specific time-window corresponding to the early steps of hypothalamic neurogenesis. Microarray analysis has allowed us to describe new critical neuronal precursor-specific markers that may be expressed under the control of the Notch/proneural network.

## RESULTS

### Expression of Notch components during hypothalamus development

To identify the exact time point when the Notch pathway may be required during hypothalamus development, we examined the temporal expression of several Notch components in the developing chick brain between HH8 and HH16 (Fig. 1 and data not shown).

We observed that expression of *Dll1*, *Hes5* and *Hey1* were first detected in and around the ventral midline of the diencephalon just before HH11 with only few marked cells labelled (Fig. 1). At HH11, *Dll1* expression was found from the telencephalon to the rostral region of the diencephalon in scattered cells (Fig. 1A). At this stage, *Hes5* was similarly expressed in the rostral region of the head except at the level of the most anteromedial part of the telencephalon where its transcripts were not found (Fig. 1E). In contrast, *Hey1* expression was restricted to the rostroventral diencephalon between the 2 developing optic vesicles (Fig. 1I). Importantly, ventral views of HH11 dissected neural tube revealed the ventral neurectodermal



**Figure 2:** Immunostaining for HuC/D in the rostral hypothalamus of DMSO and DAPT-treated chick embryos (n=6). (A, B) High magnification of hemisected, flatmounted preparations of the rostral hypothalamus at HH13. The TPOC neurons (nTPOC) were characterized by the expression of the Hu class of RNA-binding proteins that marks post-mitotic neurons. While the neurons were scattered in the DMSO control (A), after DAPT treatment the nTPOC population becomes denser (B).

surface with similar expression patterns in a crescent-shaped area for *Dll1*, *Hes5* and *Hey1* centred around the midline between the optic vesicles (boxes in Fig. 1A, E, I).

As development proceeds, the hypothalamus primordium was morphologically evident from approximately HH13. At this stage, double *in situ* hybridization with *Nkx2.1*, a general early marker of the hypothalamic plate [19], revealed an overlapping expression with *Dll1*, *Hes5* and *Hey1* that was restricted to the rostral region of the hypothalamus (AH) with rostral expression caudal to the prospective chiasmatic area (Fig. 1C, G, K, asterisk). At this stage, *Dll1* displayed a fine salt-and-pepper-like pattern (Fig. 1C arrow head). From HH13, *Nkx2.1* had just started to be expressed separately in the preoptic area (POA) of the basal telencephalon. *Dll1* was also expressed in the POA but not *Hes5* and *Hey1*. *Dll1* and *Hes5* expression were also found overlapping with *Nkx2.1* in the lateral domain of the hypothalamic region.

The rostral hypothalamus gives rise to the nucleus of the tract of the postoptic commissure at HH13 (nTPOC) [20] as shown with the HuC/D-positive cells (Fig. 2A). The members of the Notch signalling pathway that were expressed within the chick diencephalon from HH11 (Fig. 1) mapped to the rostral end of the hypothalamus primordium corresponding to the nTPOC. The specific colocalisation of Notch components with nTPOC at this stage underlines a strong contribution of this pathway during differentiation of hypothalamic neurons.

### **Setting up an experimental strategy to identify Notch response genes in the early developing hypothalamus**

To identify Notch response genes we used a chemical inhibition strategy combined with a global measure of transcript levels using chicken microarrays. The  $\gamma$ -secretase inhibitor N-[3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) provides a powerful tool to inhibit cell differentiation processes regulated by Notch [14]. This treatment caused a rapid down regulation of *Hes5* expression after only 3 hours of DAPT-treatment (Fig. 1H).

Based on our previous observations, showing that Notch components were first detected between HH10 and HH11 in the hypothalamus primordium, the genetic response to an inhibition of the Notch pathway was analysed from HH10 to HH13, corresponding to an overnight culture (16 hours). HH10 embryos were dissected and transferred into roller tubes, in which they were cultured for 16 hours either in DMSO or 40 $\mu$ M DAPT-supplemented medium. With such conditions, the size of the embryos was similar between DAPT-treated



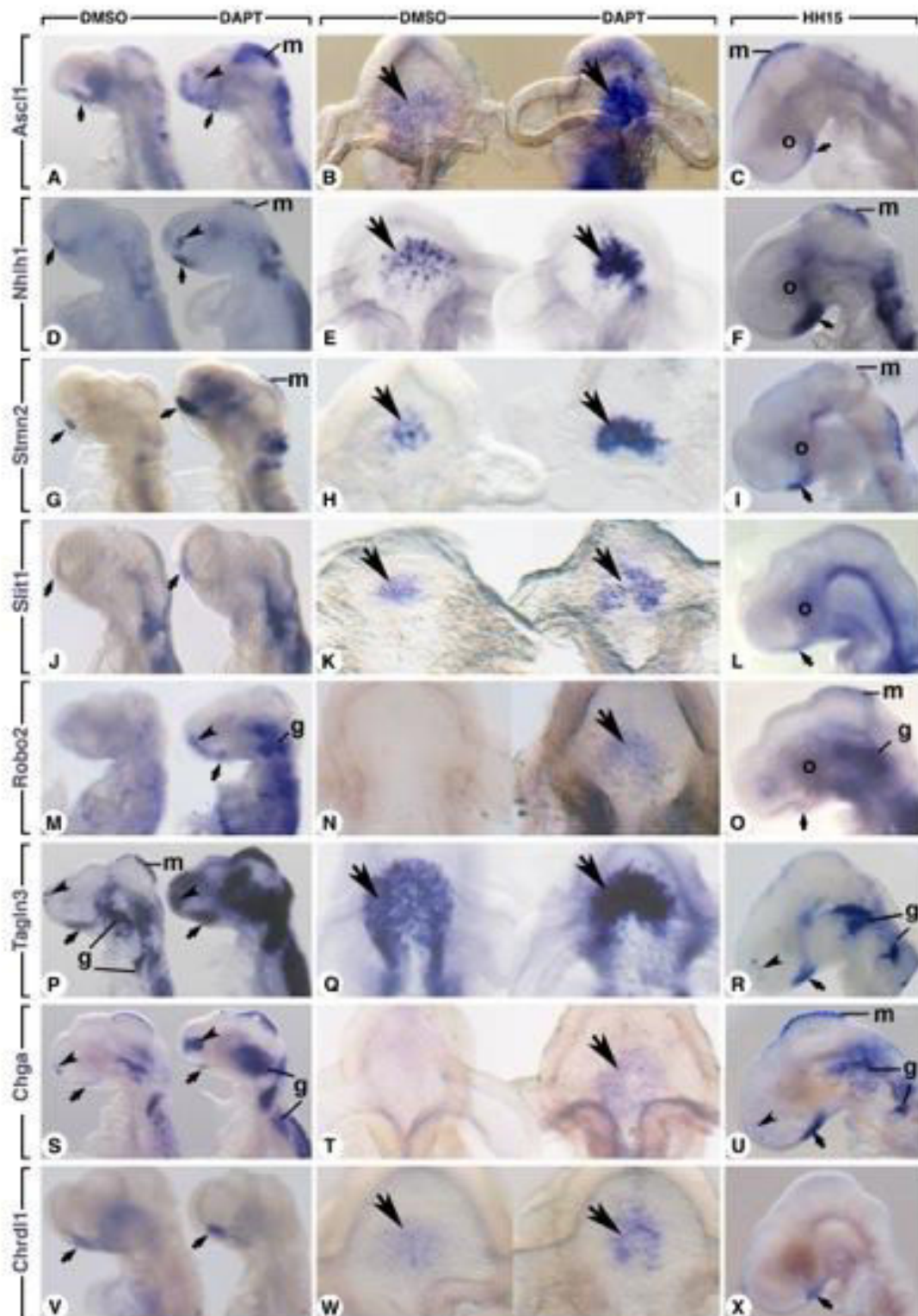


and control embryos with no obvious morphological defects. In all DAPT-treated embryos analysed, the expression of *Hes5* (n=20) and *Hey1* (n=15) was dramatically reduced or abolished in the neural tube and forebrain, including the ventral diencephalon (Fig. 1L). It has been well established that downregulation of *Hes5* derepresses the expression of *Dll1* [18]. Accordingly, the DAPT treated embryos (n=15) exhibit increased expression of *Dll1* after 16 hours of treatment (Fig. 1D). Furthermore, Notch inhibition during this period was associated with an increase of the number of neurons and a loss of the scattered neurons in the rostral hypothalamus (Fig. 2). Therefore, a treatment starting at HH10 and for 16 hours appeared to be appropriate to identify direct or indirect downstream targets of Notch signalling during the first step of hypothalamic neurogenesis.

### **Identification of Notch response genes in the developing forebrain**

HH10 embryos were treated with DAPT and harvested after 16 hours culture, at approximately HH13 for a comparative microarray analysis. To restrict our findings to genes that were controlled by Notch in the prosencephalon-forming region, we dissected a domain that was situated rostral to the mesencephalic region containing the hypothalamic primordium. This domain was chosen because it was morphologically well delimited at the stage of dissection. For each experiment, five prosencephalons from the same culture were dissected and pooled to obtain total RNA. Four different sets of experiments were collected and tested by microarray, using chick genome 4x44k DNA-microarray (Agilent; [21]). The DMSO and DAPT-treated embryos were directly compared by Genespring GX software version 12.0. We opted for a fold-change (FC) of 1.3 cut-off and identified 789 downregulated and 769 upregulated genes in the DAPT-treated forebrain (see Table S1 in the supplemental material).

It was noted that members of the Notch signalling pathway were significantly enriched in Gene Ontology (GO) term analysis. As expected, many Notch transcriptional targets and/or Notch pathway components have their expression consistently modified in our data (Table 1). The direct Notch target gene *Hes5* was highly downregulated with a fold-change of -56.83 (FC -56.83) also downregulated was *Hey1* (FC -2.89). As expected, *Dll1* was upregulated (FC 2.26) [22]. Additionally, we identified changes in expression levels of other components of the Notch pathway: *Jag1* (FC -1.58) [23], *Numb* (FC-1.49) [24], *Lfng* (-1.45), *Notch1* (FC -1.31) and *Nrarp* (FC -2.01) [25] that were downregulated (Table 1). Other components were upregulated, which have not been previously described as Notch targets: *Aph1A* (FC 1.34) and *Mfng* (FC 3.14) [26].



**Figure 5:** regionalized expression of upregulated genes in the hypothalamus in DAPT-treated chick embryos. Whole embryo *in situ* hybridization was performed with *Ascl1* (A-C), *Nhlh1* (D-F), *Stmn2* (G-I), *Slit1* (J-L), *Robo2* (M-O), *Tagln3* (P-R), *Chga* (S-U) and *Chrd11* (V-X) riboprobes on control and DAPT-treated embryos after 16hrs ex-ovo culture and on HH15 embryos as indicated on the figure. In B, E, H, K, N, Q, T and W mesenchymal cells and surface ectoderm were removed to obtain dissected neural tubes (ventral view) from the embryo described on the left side. Small arrows highlighted specific expression of all these probes in the rostral hypothalamus. Arrowheads pointed to the expression in the olfactory epithelium. g, ganglia; m, roof of the mesencephalon; o, optic vesicles.

Enrichment for the GO term *Nervous System Development* that included 271 genes was observed. Several proneural genes normally repressed by the Notch pathway were upregulated [17]. These included *Ascl1* (FC 1.67), *NeuroG1* (FC 8.85) and *NeuroG2* (FC 1.57). Thus, DAPT treatment caused the expected response amongst Notch signalling pathway components, including Notch effector genes and proneural bHLH transcription factors. This demonstrated the validity of the microarray approach for identifying new target genes of the Notch signalling pathway.

### ***In situ* hybridization validation of upregulated genes**

To identify new molecular markers regulated directly or indirectly by Notch signalling we focused our efforts on the upregulated genes. We obtained efficient RNA probes for 23 upregulated markers from the enriched GO term *Nervous system development* (Table 1). These genes represented diverse functional classes and were either uncharacterized or only partially described during hypothalamus development. Some of these genes were already known hypothalamic markers (such as *Robo2* and *Slit1*) or Notch targets in other tissues (such as *Nhlh1* and *Stmn2*) [1, 2, 27]. Most of the selected genes consisted of transcription factors, binding proteins or specific neural progenitor genes.

We systematically compared the expression of these genes in control (DMSO) to DAPT-treated embryos in the same conditions as the microarray (Fig. 3). Remarkably, among the upregulated genes tested, 8 displayed a prominent tightly restricted expression in the rostral hypothalamus in DAPT-treated embryos (Fig. 3). Interestingly, for some of these genes, this upregulation was not just restricted to the hypothalamus but was also within other domains of expression such as the roof of the mesencephalon, the olfactory epithelium or the forming ganglions.

After DAPT-treatment, *Ascl1* expression (n=10) was upregulated in all tissues of the head that normally expressed this gene (Fig. 3A, B). This included the neuroectoderm of the ventral diencephalon corresponding to the developing hypothalamus as shown with the dissected neural tube (Fig. 3B). Expression of *Nhlh1* has been shown to be regulated by *Ascl1* and previously described in the olfactory epithelium, cranial ganglia and dorsal root ganglia [13] but not in the developing hypothalamus. Here, scattered *Nhlh1*-positive cells were found throughout the ventral midline between the 2 optic vesicles of HH13 control embryos (Fig. 3E). In contrast, the density of *Nhlh1*-positive cells appeared higher in DAPT embryos (n=12) at the level of the ventral diencephalon (Fig. 3D, E). Furthermore, *Nhlh1* was aberrantly

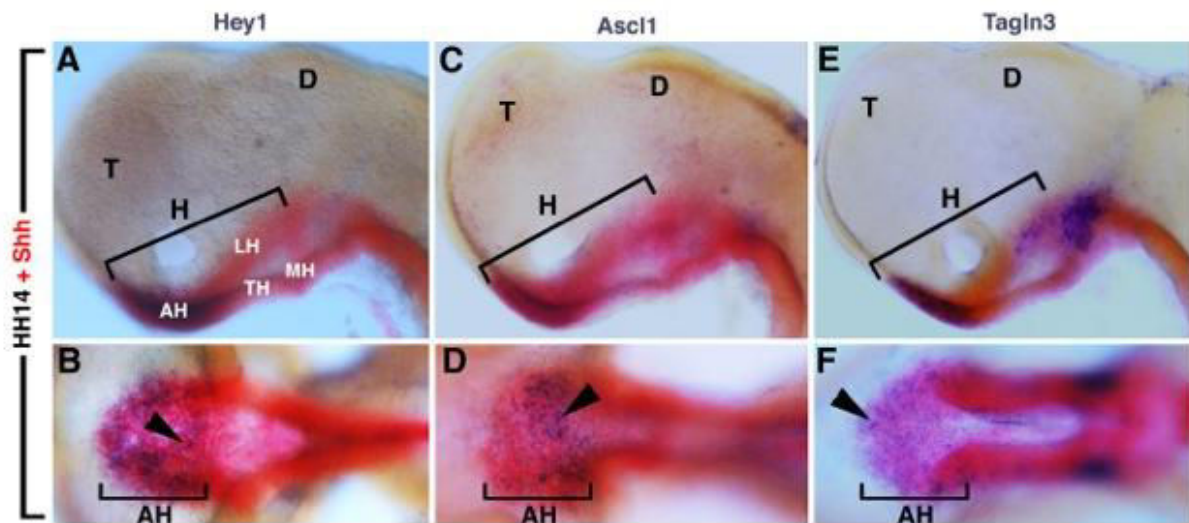


expressed in the olfactory placodes and the roof of the mesencephalon at this stage, whereas only a few scattered cells expressed this gene in the control embryos. Importantly, *Ascl1* and *Nhlh1* displayed the same profile of upregulation in DAPT treated embryos. *Stmn2* (previously called SCG10) codes for a cytoskeletal protein and is an early marker of neuronal phenotype [28]. Here, in DAPT embryos (n=10) this gene was strongly upregulated in the developing hypothalamus, and its scattered distribution was also lost (Fig. 3G, H). This upregulation has been classically associated with upregulation of *Ascl1* and *Nhlh1* [13]. Altogether this signifies a change in the number and density of neurons and a precocious neurogenesis in and around the ventral midline. This was also confirmed using the HuC/D antibody on DAPT-treated embryos (Fig. 2B). These observed effects fit with the expected role of Notch in regulating the number of neuronal precursors by lateral inhibition [17, 29].

Among the other upregulated genes in the ventral diencephalon, 2 have been previously described in the mouse hypothalamus: *Robo2* and *Slit1* [27]. In the control embryos *Slit1* expression was just emerging, whereas after DAPT treatment (n=13), *Slit1* was upregulated in the ventral midline area (Fig. 3J, K). At the same stage, *Robo2* expression was not detectable in the ventral midline of the control embryos whereas DAPT-treated embryos (n=14) expressed this gene (Fig. 3M, N). *Robo2* gene was also upregulated in the forming ganglions and olfactory placodes when Notch signalling was inhibited (Fig. 3M). Notably, all these tissues normally display Notch activity [29].

Most interestingly, *Tagln3*, *Chga* and *Chrdll* were 3 genes that were not well documented. Especially, their expressions have never been described in the developing hypothalamus or dependent of Notch signalling.

TAGLN3, a microtubule-associated protein, has been described as a neuron-specific protein in the developing neural tube [30]. In the control brain (n=17), *Tagln3* was strongly expressed in the ventral diencephalon and showed a scattered mRNA distribution, which was lost after DAPT treatment (Fig. 3P, Q). *Tagln3* was upregulated in all the tissues normally expressing this gene, which includes the olfactory placodes, the ventral diencephalon, the mesencephalic roof, the ganglions and the neural tube (Fig. 3R). *Chga* has been shown to be a member of the granin family of neuroendocrine secretory proteins, located in secretory vesicles of neurons and endocrine cells [31], however little has been discussed about its role during the early embryonic stages. When treated with DAPT, the level of *Chga* expression was increased in all the tissues normally expressing this gene at HH13 (n=19), which includes the ventral diencephalon and the olfactory placodes as for *Tagln3* (Fig. 3S). *Robo2* and *Chga* were



**Figure 4:** (A-F) HH14, dissected chick neural tube. Expression of Notch pathway component, *Hey1* (A, B), the proneural gene *Ascl1* (C, D) and a new putative target gene, *Tagln3* (E, F) in the hypothalamus compared to *Shh* expression at HH14. It shows that these 3 genes were similarly expressed in the rostral region of the hypothalamus (AH). (A, C, E) Lateral views with the rostral region on the left. (B, D, F) Ventral views of the corresponding embryos A, C, E. Arrowheads show the patched expression of *Hey1*, *Ascl1* and *Tagln3*. AH, anterior (rostral) hypothalamus; H, hypothalamus; LH, lateral hypothalamus, MH, mammillary region of the hypothalamus, T, telencephalon, TH, tuberal region of the hypothalamus; D, diencephalon.

expressed in the hypothalamus at HH13 only when Notch activity was inhibited (HH15 in Fig. 3N, T). Nevertheless, when Notch activity was normal these genes were expressed in the ventral hypothalamus from HH15 (HH15 in Fig. 3O, U).

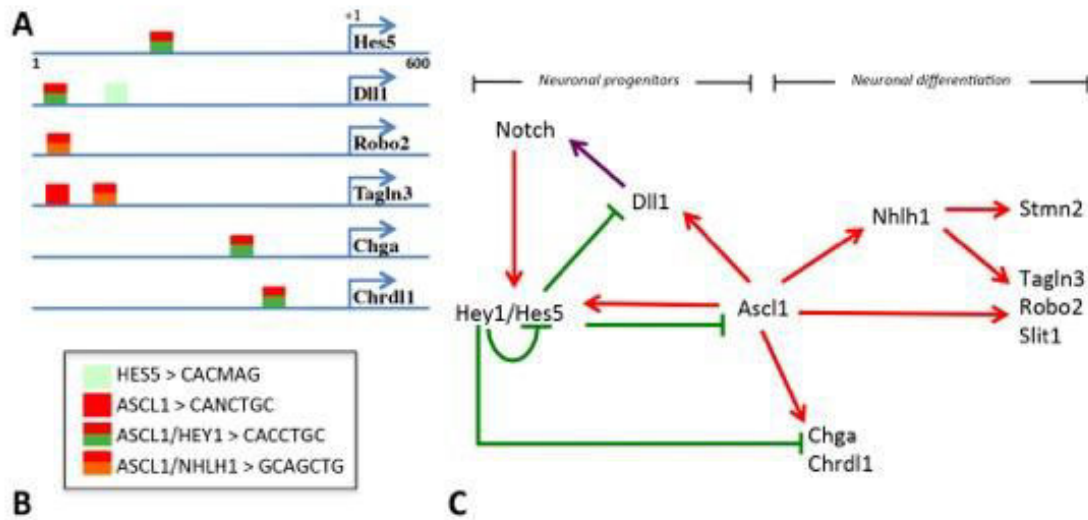
Notably, at HH15 *Tagln3* and *Chga* were similarly expressed in and around the ventral midline of the diencephalon, the forming ganglions and dorsal mesencephalon (Fig. 3R, U). Interestingly, a few scattered cells expressed these genes in the olfactory epithelium (Fig. 3R, U, arrowheads) suggesting a function for these new markers during olfactory sensory neurons differentiation.

Remarkably, *Chrdll1*, a BMP antagonist [32] had its expression restricted to the developing hypothalamus at HH13 and in DAPT treated embryos (n=20) *Chrdll1* expression was clearly upregulated in this area (Fig. 3V, W). At HH15, *Chrdll1* keeps its restricted expression in the rostroventral hypothalamus and expression was not detected in other tissues of HH15 embryos (Fig. 3X).

All 8 genes were visibly expressed ventrally at the level of the midline in the area localized between the two optic vesicles (Fig. 3) corresponding to the expression domain of the Notch components previously described in Figure 1 and the nTPOC (Fig. 2). In order to confirm that these expression domains were restricted to the future rostral hypothalamus, in addition to *Nkx2.1*, *Shh* was also used as a marker. At HH14, *Shh* was expressed exclusively along the ventral midline of the neural tube but contrary to *Nkx2.1* displayed a dynamic distribution at the level of the hypothalamus subregions [33]. As shown by the red staining in Figure 4, the future hypothalamus was arranged rostrocaudally into the anterior (rostral) (AH), tuberal (TH) and mammillary (MH) region (Fig. 4). To compare precisely the expression profiles of *Shh* and *Hey1*, embryos were double labelled at HH14. Expression of *Hey1* was confined to the *Shh*-positive cells of the anterior hypothalamus (AH) in the same region that the proneural gene *Ascl1* and *Tagln3* were expressed (Fig. 4). At this stage, *Hey1*, *Ascl1* and *Tagln3* displayed a salt-and-pepper-like pattern in this area.

### **Identification of a transcriptional program regulated by *Hes5/Hey1*, *Ascl1* and *Nhlh1***

It has been established that a conserved *Ascl1/Dll1/Hes/Hey/Nhlh1* molecular circuitry operates within the progenitor pool to coordinate neurogenesis [34]. In order to test if the new candidate genes characterized in this study could have their expression directly regulated by this network, an *in silico* approach was used to determine DNA-binding signatures for



**Figure 5:** Summary of potential regulatory interaction model of gene regulation for neurogenesis in the hypothalamus revealed by *in silico* analysis and literature.

(A) Schematic of mouse *Hes5*, *Dll1*, *Robo2*, *Tagln3*, *Chga* and *Chrdl1* promoters showing the position of evolutionarily conserved binding motifs for HES5 (light green box), ASCL1 (Red box), antagonist binding sites ASCL1/HEY1 (MHAM, Red and green box) and ASCL1/NHLH1 (MNAM, red and orange box). Regulatory regions comprising 500 bp before to 100 bp after the transcription start site (+1, blue arrow). The schematic represents only the motifs that were conserved among several species. (B) Consensus chick and mouse box sequences from the literature and this study. (C) A model of interaction between the negative regulators HES5 and HEY1 and the positive regulators ASCL1 and NHLH1 based on the literature and present data. Activations were identified with a red arrow and repressions were identified with a green barred line. The purple arrow refers to the activation of NOTCH receptor by its ligand DLL1. (Bertrand, 2002; Gohkle, 2008, Castro, 2006, 2011, de la Pompa 1997, Ma 1998 and present data).



ASCL1, HES5, HEY1 and NHLH1 and to detect the presence or the absence of these sites at the level of the promoter of the genes implicated in this circuitry.

By using the MatInspector (Genomatix) and Evolutionary Conserved Region (ERC) browser software, the available proximal promoter sequences of selected genes were screened for binding sites in numerous organisms in order to find some cross-species genomic conservation. These promoters were defined as sequences 0.5Mb before and 0.1Mb after the transcription start site (+1). Despite a poor degree of nucleotide homology between mouse and chick proximal promoter regions of *Hes5* and *Dll1*, we found a conserved sequence of 7 nucleotides (5'-CACCTGC-3' - MHAM) corresponding to an antagonist-binding site for ASCL1/HEY (Fig. 4). Importantly, this motif allowed us to give a better stringency condition to the *in silico* study compared to degenerated E-box (5'-CANNTG-3') and N-box (5'-CACNAG-3') sequences attributed to ASCL1 or HEY1 alone [13]. Here, we described this motif at the level of the *Chga* and *Chrdll* proximal promoters (Fig. 5). This ASCL1/HEY motif was also found at the level of the *Mnfg* promoter a known direct target of ASCL1 [34]. We also observed another conserved sequence of strict 7-mer nucleotides (5'-GCAGCTG-3' - MNAM) previously described as a direct binding sequence for Ascl1 [35] that corresponds to an antagonist-binding site for ASCL1/NHLH1. This sequence was found conserved in the proximal promoter region of *Robo2* and *Tagln3*.

Therefore it can be proposed that these regulatory elements, which were selected for enrichment in the Ascl1/Dll1/Hes/Hey/Nhlh1 molecular circuitry, may represent signatures to drive expression in some neural tissues. Obviously the functional relevance of this finding has yet to be exhaustively explored. This *in silico* approach along with literature led us to propose a predictive model of gene regulation for neurogenesis in the hypothalamus, but cannot be excluded as a model for other neuronal tissues such as the ganglia where neurons also differentiated during early development and expressed these new target genes (Fig. 5).

## DISCUSSION

In this report, *ex ovo* roller culture of chick embryos has allowed DAPT to be delivered at a specific concentration and time. We show that pharmacological inhibition of Notch signalling can phenocopy the experimental results obtained with other methods, but allowed better temporal control [29]. Treatment with DAPT caused a rapid decline in downstream components of the Notch signalling pathway (i.e. *Hes5*) that initiates the molecular cascade



leading to the upregulation of the proneural bHLH gene, *Ascl1*, and the Notch ligand, *Dll1*. Numerous studies using genetic models have reported the same effect at the level of various developing tissues like the olfactory epithelium, the roof of the mesencephalon and neural tube [18, 29, 36-39]. An example is the phenotype of the null mutant mice for RBPJ, the essential transcription factor mediating signalling of all Notch receptors [29]. *Hes5* transcripts normally present in the brain and spinal cord were completely eliminated in RBPJ mutant embryos, whereas *Dll1* and *Ascl1* were upregulated as well as neuronal differentiation markers such as *Nhlh1* [29]. In our *ex ovo* experiments, this premature neuronal differentiation was similarly observed in the neural tube, mesencephalon and developing cranial placodes and ganglia. This study using RBPJ null mice further highlights the validity of our method.

Surprisingly, an accurate description of Notch activity during the earliest stages of mouse or chick hypothalamus development when the first neurons differentiate was not reported. However scarce studies indicate that *Dll1*, *Notch2* and *Hes5* expression was spatially and temporally restricted to the developing mouse diencephalon from E9.5 (+/- HH11 in chick) [4, 40, 41]. A temporal assessment of Notch pathway effectors (e.g. *Hes5*) indicated high and localized expression within the chick diencephalon in the ventral-most cells as early as HH11. Based on the hypothalamus markers, *Nkx2.1* and *Shh* [19, 33], we concluded that this Notch-positive region corresponds to the hypothalamic cells of the prospective anterior hypothalamus. Because *Hes5* was transcribed in the embryo solely in response to Notch signalling [8], we thus demonstrate that the first evidence of Notch activity in the chick hypothalamus starts very early on during the neuron progenitor expansion [20]. The *Hey1* expression domain overlaps with *Hes5* in the presumptive hypothalamus, further suggesting that these genes may have overlapping functions in this tissue. These results were supported by a study that has shown that a reduction in *Hes/Hey* gene dosage led to an overproduction of neurons during hair cell formation [42].

In agreement with previous studies conducted in vertebrate embryos, the salt-and-pepper-like patterns observed for *Dll1*, *Hes5*, *Hey1* and *Ascl1* in the rostral hypothalamus suggested that lateral inhibition regulates early production of hypothalamic neurons [17, 43]. During this event, scattered cells expressing *Dll1* activate Notch in their neighbouring cells inducing the expression of the transcriptional repressors of the *Hes/Hey* family genes. They repress the expression of proneural bHLH genes that are essential for specifying neural fate [17]. In this



study, by treating chick embryos with DAPT from HH10, *HuC/D*-positive cells were found grouped in a dense cluster of adjacent cells in DAPT treated embryos, whereas they remained scattered in control embryos. Thus an excessive number of cells differentiated into neurons in the ventral hypothalamus in the absence of Notch activity. This precocious neurogenesis was the typical “neurogenic” phenotype expected for the loss of function of Notch if working by lateral inhibition [9, 36]. This was confirmed by the upregulation of *Ascl1* and by the loss of the salt-and-pepper profile of the neuronal markers *Nhlh1* and *Stmn2* in the absence of Notch activity. Thus, we propose for the first time that a mechanism of lateral inhibition operates in the rostral hypothalamus of the vertebrate brain to generate neurons.

This mechanism was most probably mediated by the proneural gene *Ascl1*. At E10.5, *Ascl1* was the major bHLH proneural gene expressed at the level of the mouse basal plate expressing *Nkx2.1*, whereas other proneural genes such as *Neurog1* and *Neurog2* have their expression restricted to the dorsal brain [40]. In the chick brain, *Neurog1* and *Neurog2* expression was not detected during the early phase of ventral hypothalamus development (data not shown) whereas *Ascl1* expression was restricted to the rostral domain of *Shh*. Concordantly, targeted mutagenesis demonstrated an essential role for *Ascl1* during the generation of ventral neuroendocrine neurons as well as playing a central role in subtype specification of these neurons [40].

Loss of function through gene mutations provides an essential tool to confirm whether Notch pathway has an early function during hypothalamus neurogenesis. However, single null mice for components of Notch (ligands or receptors) and their mediators (such as *Hes1*, *Hes5* or *Hey1*) display defects in restricted areas of the developing embryo [36, 44-46]. While *Hes5* mutant mice do not show any gross abnormalities, in the absence of both *Hes1* and *Hes5* genes, cell differentiation was severely accelerated, leading to aberrant neuronal localization [18]. This redundancy between the major genes of the Notch pathway may explain why a role for Notch during the earliest stages of hypothalamus formation has never been strongly attributed to this pathway before. Only recently conditional knockout mice lacking RBPJ in the forming hypothalamus were obtained [16]. But, still no investigations at the early stage of hypothalamus development have been done. However, concordantly, these mice showed an increased proliferation of the Arc neurons at E13.5 that may contribute to the increased body weight phenotype observed in the mutants. This abnormality probably takes place at earlier stages, as the *Nkx2.1-Cre* that has been used to drive Notch gene inactivation was active as early as E10.5 [47].



Other major findings in this paper were the characterization of new components of the differentiation program of neural progenitor cells of the hypothalamus but also of the ganglia and olfactory epithelium. We have independently verified the results of our microarray screen using RNA *in situ* hybridization and demonstrated that many of these genes were specifically expressed in the hypothalamus at HH15. The specific expression of *Chrdl1* in the rostral hypothalamus was very fascinating, as the Bmp pathway has been strongly implicated, coupled with *Shh* for the early patterning of hypothalamus and in neuronal maturation [3]. This suggests that Notch signalling may regulate the activity of Bmp signalling in this area.

We have additionally identified markers of early differentiating neurons such as *Nhlh1*, markers implicated in axon outgrowth such as *Stmn2* and in axon guidance such as *Robo2* and *Slit1*. *Robo2* and *Slit1* were expressed in the mouse developing hypothalamus from E10.5 and were required to maintain proper balance between primary and intermediate neuronal progenitors [27]. This function was probably conserved in the chick.

Most interestingly, characterization of other unknown potential neuronal markers such *Tagln3* and *Chga* in the developing hypothalamus gave us a high level of confidence in our approach to discover new molecules regulated by Notch signalling. TAGLN3 is a microtubule-associated protein [48] and CHGA is a protein released in circulation by neuron that interacts with STMN2 in human neuroendocrine cells [49].

At HH15, the comparison between *Tagln3* and *Chga* expression revealed a virtually identical expression pattern, not only in the hypothalamus but also in the olfactory epithelium and forming ganglions. They were similarly upregulated in all these tissues when Notch activity was blocked. These expression patterns restricted to neural tissue have not been reported before. Therefore, these genes must be considered as important new molecular markers for neurogenesis.

Importantly, *Tagln3*, *Chga*, *Robo2*, *Slit1* and *Chrdl1* expression has been highlighted in this study to be controlled by the Notch/proneural genes network. This cascade of genes allows cells to escape lateral inhibition (neuronal progenitor) to enter the pathway that leads to terminal neuronal differentiation (Fig. 5). It was clear that coordination between numerous proneural factors was necessary for the specification of the neuronal subtypes of the ventral hypothalamus. There are numerous studies in which *Ascl1* has been identified to regulate other bHLH genes (i.e. *Neurog3*, *NeuroD*, *Nhlh1*), which in turn activates neuron-specific structural genes as *Stmn2* [4, 13]. Interestingly, a genome-wide chip assay has shown that ASCL1 directly binds *Tagln3* promoter [50] and ASCL1 and CHGA have the same overexpression profile in small-cell lung cancer [51]. Although we have no *in vitro* or *in vivo*





evidence that HES5, HEY1, ASCL1 and/or NHLH1 directly binds to or regulates the expression of *Chga*, *Chrdll1* and *Robo2* genes, we have found several well conserved putative HEY1-, and ASCL1- and NHLH1-binding sequences located within the 600 bp around their transcription start sites. Certainly, a more detailed fate map study of these neuronal markers will be required to better understand how they contribute to the specification of the hypothalamic sensory territories. In the meantime, our data has been compared with other screens and genome wide chip experiments to build a model of the regulatory cascade [34, 50] that may regulate neurogenesis at the level of the hypothalamus and possibly other regions of the developing embryo (Fig. 5).

Given the almost universal use of Notch/proneural network in cell fate renewal and transition, it was necessary to look for new molecular targets. We uncovered that Notch signalling modulates the generation of neurons in the early developing hypothalamus by lateral inhibition. Most importantly, our global approach allowed us to characterize several new markers expressed in this tissue and that may have their expression under the control of the Notch/proneural genes oscillating regulation. The elucidation of this Notch/proneural transcriptional cascade including these new genes will be a challenge in the future since hypothalamic development has considerable importance for human health. Genetic defects in the development of specific cell subtypes in hypothalamus have already been reported for congenital obesity [52].

## **METHODS**

### **Roller-tube culture and drug treatments**

Isa Brown fertile hen eggs were obtained from Amice-Soquet hatchery (Lanrelas, France) and incubated in a humidified 38°C incubator for the desired stages. Embryos were staged according to Hamburger and Hamilton (HH) [53]. Embryos were collected at HH10 and cultured as described previously [54]. The  $\gamma$ -secretase inhibitor (N-[N-3,5-difluorophenacetyl-1-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester, DAPT; Sigma) was dissolved in DMSO [55]. Embryos were treated with DMSO or 40 $\mu$ M of DAPT in L15 culture medium (supplemented with chick serum and gentamycin). Animal experimentation protocols were conformed to the European Union guidelines. No invasive (pain-inducing) procedure was used for this study.



### **mRNA expression profiling on microarray**

A whole genome microarray analysis was performed on total RNA extracted from 5-pooled prosencephalon. Chick embryonic prosencephalon was dissected after 16 hours roller culture with DMSO or DAPT. Total RNA was immediately extracted. The RNA quality had been controlled by 2100 Bioanalyzer. Total RNA (50µg) from each sample was reverse transcribed and cRNAs were prepared according to the Agilent recommendations and following the one-color protocol to be labelled with Cy3-CTP. Hybridization was accomplished on the Agilent 4x44K whole chicken genome *in situ* oligonucleotide microarray (Agilent - [21]). Image acquisition was performed using the Agilent Scanner (Biogenouest, Rennes) and signals were extracted by Agilent Feature Extraction software. Data normalization was performed by a per-chip 50<sup>th</sup> percentile method by the Genespring Agilent GX12. Gene Ontology (GO) analysis has been performed using Webgestalt online software (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>). The *Homo Sapiens* Genome was selected as a reference set for enrichment analysis. Webgestalt used a hypergeometric statistical method and an adjustment of Benjamini-Hochberg for the Multiple Test with a significance level of 0.05. *Nervous system development* enrichment was significant with adjP=1.55e-22. As far as *Notch signalling pathway* enrichments performed on KEGG and Pathways Commons analysis were significant with respect to: adjP=6.96e-07 and adjP=5.80e-06.

### **Whole-mount *in situ* hybridization and immunohistochemistry**

After harvesting, embryos were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS). Whole-mount *in situ* hybridization was performed as described [56]. All probes, excepted *Dll1*, were generated by PCR which were subcloned in pCR®II-TOPO® and used to transcribe the antisense RNA probes. A plasmid carrying chick *Dll1* (NotI-T3; gift of Frank Schubert, U.K.) was used. Double *in situ* hybridization on whole embryos was done with Digoxigenin (Dig) and Fluorescein (Fluo) labelled RNA probes (Roche). The protocol for immunohistochemistry has been described previously [57]. Whole-mount roller culture embryos were stained using pro-neural antibody, anti-human HuC/D (1:500, Life technologies, 16A11).



## **Design of Transcription Factor Binding Sites and Comparative Genomic of promoters in various species**

Mouse and chick genomic sequences were downloaded from the UCSC Genome Browser and Entrez Gene Databases. Mouse promoters were downloaded from The Eukaryotic promoter database (EPD) and compared to proximal promoters predicted with PromScan Software. Mouse and chick promoters were annotated with different specific motifs such as TATA boxes using YAPP Software Software ([http://www.bioinformatics.org/yapp/cgi-bin/yapp\\_intro.cgi](http://www.bioinformatics.org/yapp/cgi-bin/yapp_intro.cgi)). Predictive transcription factor-binding consensus sequences were obtained using MatInspector Position Specific Scoring Matrix (PSSM) libraries [58]. Relevant binding sites were analysed using multiple alignments and consensus sequences were transformed in IUPAC strings. These strings were reported on selected gene promoters. Finally a comparative genomic study was performed for binding sites between mammal and bird when available.

## **ABBREVIATIONS**

Arc: Hypothalamic arcuate neurons; bHLH: helix-loop-helix; HH: Hamburger and Hamilton; TPOC: tract of the postoptic commissure; NICD: Notch intracellular domain; nTPOC: nucleus of the tract of the postoptic commissure; POA: preoptic area

## **COMPETING INTERESTS**

The authors declare that they have no competing interests

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

L.R, V. David and V. Dupé set up and designed the experiments. L.R, M.W., H.R. and I.G. performed the experiments. L.R and F.B. performed the *in silico* approach. L.R., V. David and C.D. performed the microarray analysis. L.R., M.W., and V. Dupé wrote the manuscript, and all authors read discussed and edited the manuscript.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank the members of the David laboratory for suggestions and comments. We thank the Functional Genomics Platform (Biogenouest, Rennes, France). This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (grant no. ANR-12-BSV1-0007-01, VD).



## REFERENCES

1. Kurrasch DM, Cheung CC, Lee FY, Tran PV, Hata K, Ingraham HA: **The neonatal ventromedial hypothalamus transcriptome reveals novel markers with spatially distinct patterning.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007, **27**(50):13624-13634.
2. Shimogori T, Lee DA, Miranda-Angulo A, Yang Y, Wang H, Jiang L, Yoshida AC, Kataoka A, Mashiko H, Avetisyan M *et al*: **A genomic atlas of mouse hypothalamic development.** *Nat Neurosci* 2010, **13**(6):767-775.
3. Ohyama K, Das R, Placzek M: **Temporal progression of hypothalamic patterning by a dual action of BMP.** *Development* 2008, **135**(20):3325-3331.
4. Pelling M, Anthwal N, McNay D, Gradwohl G, Leiter AB, Guillemot F, Ang SL: **Differential requirements for neurogenin 3 in the development of POMC and NPY neurons in the hypothalamus.** *Developmental biology* 2011, **349**(2):406-416.
5. Bray SJ: **Notch signalling: a simple pathway becomes complex.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**(9):678-689.
6. Kawaguchi A, Ikawa T, Kasukawa T, Ueda HR, Kurimoto K, Saitou M, Matsuzaki F: **Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis.** *Development* 2008, **135**(18):3113-3124.
7. Fisher AL, Ohsako S, Caudy M: **The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**(6):2670-2677.
8. Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R: **Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation.** *Embo J* 1999, **18**(8):2196-2207.
9. Henrique D, Hirsinger E, Adam J, Le Roux I, Pourquie O, Ish-Horowicz D, Lewis J: **Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina.** *Curr Biol* 1997, **7**(9):661-670.
10. Mizutani K, Saito T: **Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex.** *Development* 2005, **132**(6):1295-1304.
11. Lutolf S, Radtke F, Aguet M, Suter U, Taylor V: **Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum.** *Development* 2002, **129**(2):373-385.
12. Hirata H, Tomita K, Bessho Y, Kageyama R: **Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmic organizer and development of the mid/hindbrain.** *Embo J* 2001, **20**(16):4454-4466.
13. Bertrand N, Castro DS, Guillemot F: **Proneural genes and the specification of neural cell types.** *Nat Rev Neurosci* 2002, **3**(7):517-530.
14. Nelson BR, Hartman BH, Georgi SA, Lan MS, Reh TA: **Transient inactivation of Notch signaling synchronizes differentiation of neural progenitor cells.** *Developmental biology* 2007, **304**(2):479-498.
15. Shimojo H, Ohtsuka T, Kageyama R: **Dynamic expression of notch signaling genes in neural stem/progenitor cells.** *Front Neurosci* 2011, **5**:78.
16. Aujla PK, Naratadam GT, Xu L, Raetzman LT: **Notch/Rbpjkappa signaling regulates progenitor maintenance and differentiation of hypothalamic arcuate neurons.** *Development* 2013, **140**(17):3511-3521.
17. Kageyama R, Ohtsuka T, Shimojo H, Imayoshi I: **Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition.** *Nat Neurosci* 2008, **11**(11):1247-1251.





18. Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, Guillemot F, Kageyama R: **Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation.** *Development* 2004, **131**(22):5539-5550.
19. Pera EM, Kessel M: **Demarcation of ventral territories by the homeobox gene NKX2.1 during early chick development.** *Dev Genes Evol* 1998, **208**(3):168-171.
20. Ware M, Schubert FR: **Development of the early axon scaffold in the rostral brain of the chick embryo.** *J Anat* 2011, **219**(2):203-216.
21. Li X, Chiang HI, Zhu J, Dowd SE, Zhou H: **Characterization of a newly developed chicken 44K Agilent microarray.** *BMC Genomics* 2008, **9**:60.
22. Abello G, Khatri S, Giraldez F, Alsina B: **Early regionalization of the otic placode and its regulation by the Notch signaling pathway.** *Mech Dev* 2007, **124**(7-8):631-645.
23. Ross DA, Kadesch T: **Consequences of Notch-mediated induction of Jagged1.** *Exp Cell Res* 2004, **296**(2):173-182.
24. Rebeiz M, Miller SW, Posakony JW: **Notch regulates numb: integration of conditional and autonomous cell fate specification.** *Development* 2011, **138**(2):215-225.
25. Pirot P, van Grunsven LA, Marine JC, Huylebroeck D, Bellefroid EJ: **Direct regulation of the Nrarp gene promoter by the Notch signaling pathway.** *Biochemical and biophysical research communications* 2004, **322**(2):526-534.
26. Johnston SH, Rauskolb C, Wilson R, Prabhakaran B, Irvine KD, Vogt TF: **A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway.** *Development* 1997, **124**(11):2245-2254.
27. Ricano-Cornejo I, Altick AL, Garcia-Pena CM, Nural HF, Echevarria D, Miquelajauregui A, Mastick GS, Varela-Echavarría A: **Slit-Robo signals regulate pioneer axon pathfinding of the tract of the postoptic commissure in the mammalian forebrain.** *J Neurosci Res* 2011, **89**(10):1531-1541.
28. Stein R, Mori N, Matthews K, Lo LC, Anderson DJ: **The NGF-inducible SCG10 mRNA encodes a novel membrane-bound protein present in growth cones and abundant in developing neurons.** *Neuron* 1988, **1**(6):463-476.
29. de la Pompa JL, Wakeham A, Correia KM, Samper E, Brown S, Aguilera RJ, Nakano T, Honjo T, Mak TW, Rossant J *et al*: **Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis.** *Development* 1997, **124**(6):1139-1148.
30. Pape M, Doxakis E, Reiff T, Duong CV, Davies A, Geissen M, Rohrer H: **A function for the calponin family member NP25 in neurite outgrowth.** *Developmental biology* 2008, **321**(2):434-443.
31. Helle KB, Corti A, Metz-Boutigue MH, Tota B: **The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties.** *Cell Mol Life Sci* 2007, **64**(22):2863-2886.
32. Sakuta H, Suzuki R, Takahashi H, Kato A, Shintani T, Iemura S, Yamamoto TS, Ueno N, Noda M: **Ventropin: a BMP-4 antagonist expressed in a double-gradient pattern in the retina.** *Science* 2001, **293**(5527):111-115.
33. Ohyama K, Ellis P, Kimura S, Placzek M: **Directed differentiation of neural cells to hypothalamic dopaminergic neurons.** *Development* 2005, **132**(23):5185-5197.
34. Gohlke JM, Armant O, Parham FM, Smith MV, Zimmer C, Castro DS, Nguyen L, Parker JS, Gradwohl G, Portier CJ *et al*: **Characterization of the proneural gene regulatory network during mouse telencephalon development.** *BMC Biol* 2008, **6**:15.



35. Pacary E, Heng J, Azzarelli R, Riou P, Castro D, Lebel-Potter M, Parras C, Bell DM, Ridley AJ, Parsons M *et al*: **Proneural transcription factors regulate different steps of cortical neuron migration through Rnd-mediated inhibition of RhoA signaling.** *Neuron* 2011, **69**(6):1069-1084.
36. Cau E, Gradwohl G, Casarosa S, Kageyama R, Guillemot F: **Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium.** *Development* 2000, **127**(11):2323-2332.
37. Cau E, Gradwohl G, Fode C, Guillemot F: **Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors.** *Development* 1997, **124**(8):1611-1621.
38. Fior R, Henrique D: **A novel hes5/hes6 circuitry of negative regulation controls Notch activity during neurogenesis.** *Developmental biology* 2005, **281**(2):318-333.
39. Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, Guillemot F: **Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects.** *Genes Dev* 1995, **9**(24):3136-3148.
40. McNay DE, Pelling M, Claxton S, Guillemot F, Ang SL: **Mash1 is required for generic and subtype differentiation of hypothalamic neuroendocrine cells.** *Mol Endocrinol* 2006, **20**(7):1623-1632.
41. Zhu X, Zhang J, Tollkuhn J, Ohsawa R, Bresnick EH, Guillemot F, Kageyama R, Rosenfeld MG: **Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis.** *Genes Dev* 2006, **20**(19):2739-2753.
42. Tateya T, Imayoshi I, Tateya I, Ito J, Kageyama R: **Cooperative functions of Hes/Hey genes in auditory hair cell and supporting cell development.** *Developmental biology* 2011, **352**(2):329-340.
43. Haddon C, Jiang YJ, Smithers L, Lewis J: **Delta-Notch signalling and the patterning of sensory cell differentiation in the zebrafish ear: evidence from the mind bomb mutant.** *Development* 1998, **125**(23):4637-4644.
44. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M, Saga Y, Johnson RL: **Mouse hesr1 and hesr2 genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system.** *Developmental biology* 2005, **278**(2):301-309.
45. Przemeczek GK, Heinzmann U, Beckers J, Hrabe de Angelis M: **Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos.** *Development* 2003, **130**(1):3-13.
46. Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T: **Notch1 is essential for postimplantation development in mice.** *Genes Dev* 1994, **8**(6):707-719.
47. Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S, Rubenstein JL: **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.** *The Journal of comparative neurology* 2000, **424**(3):409-438.
48. Mori K, Muto Y, Kokuzawa J, Yoshioka T, Yoshimura S, Iwama T, Okano Y, Sakai N: **Neuronal protein NP25 interacts with F-actin.** *Neuroscience research* 2004, **48**(4):439-446.
49. Mahapatra NR, Taupenot L, Courel M, Mahata SK, O'Connor DT: **The trans-Golgi proteins SCLIP and SCG10 interact with chromogranin A to regulate neuroendocrine secretion.** *Biochemistry* 2008, **47**(27):7167-7178.
50. Castro DS, Martynoga B, Parras C, Ramesh V, Pacary E, Johnston C, Drechsel D, Lebel-Potter M, Garcia LG, Hunt C *et al*: **A novel function of the proneural factor Ascl1 in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets.** *Genes Dev* 2011, **25**(9):930-945.



51. Ishii J, Sato H, Sakaeda M, Shishido-Hara Y, Hiramatsu C, Kamma H, Shimoyamada H, Fujiwara M, Endo T, Aoki I *et al*: **POU domain transcription factor BRN2 is crucial for expression of ASCL1, ND1 and neuroendocrine marker molecules and cell growth in small cell lung cancer.** *Pathol Int* 2013, **63**(3):158-168.
52. O'Rahilly S: **Human genetics illuminates the paths to metabolic disease.** *Nature* 2009, **462**(7271):307-314.
53. Hamburger V, Hamilton HL: **A series of normal stages in the development of the chick. 1951.** *Dev Dyn* 1992, **195**(4):231-272.
54. Dupé V, Rochard L, Mercier S, Le Petillon Y, Gicquel I, Bendavid C, Bourrouillou G, Kini U, Thauvin-Robinet C, Bohan TP *et al*: **NOTCH, a new signaling pathway implicated in holoprosencephaly.** *Hum Mol Genet* 2011, **20**(6):1122-1131.
55. Geling A, Steiner H, Willem M, Bally-Cuif L, Haass C: **A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish.** *EMBO Rep* 2002, **3**(7):688-694.
56. Chapman SC, Schubert FR, Schoenwolf GC, Lumsden A: **Analysis of spatial and temporal gene expression patterns in blastula and gastrula stage chick embryos.** *Developmental biology* 2002, **245**(1):187-199.
57. Lumsden A, Keynes R: **Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain.** *Nature* 1989, **337**(6206):424-428.
58. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T: **MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites.** *Bioinformatics* 2005, **21**(13):2933-2942.



**TABLE**

Gene Symbol	Accession Number	Description	FC Value
<i>Notch signalling pathway components</i>			
<i>Hes5</i>	NM_001012695	Hairy and enhancer of split 5 ( <i>Drosophila</i> )	-56.83
<i>Hey1</i>	XM_425926	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	-2.89
<i>Nrarp</i>	XM_428951	Notch-regulated ankyrin repeat protein	-2.02
<i>Jag1</i>	XM_415035	Jagged 1	-1.58
<i>Numb</i>	NM_204835	Numb homolog ( <i>Drosophila</i> )	-1.49
<i>Lfng</i>	NM_204948	LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	-1.46
<i>Notch1</i>	XM_415420	Notch 1	-1.31
<i>Notch2</i>	XM_001233595	Notch 2	-1.30
<i>Aph1a</i>	XM_001233301	Anterior pharynx defective 1 homolog A ( <i>C. elegans</i> )	1.34
<i>Dll1</i>	NM_204973	Delta-like 1 ( <i>Drosophila</i> )	2.26
<i>Mfng</i>	XM_416278	MFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	3.15
<i>Nervous system development GO term (upregulated genes)</i>			
<i>Neurog1</i>	NM_204883	Neurogenin 1	8.85
<i>Nhlh2</i>	AF123885	Nescient helix loop helix 2	4.18
<i>Nefm</i>	NM_001101730	Neurofilament, medium polypeptide	4.05
<i>Tagln3</i>	XM_416634	Transgelin 3	3.69
<i>Nhlh1</i>	NM_204121	Nescient helix loop helix 1	3.47
<i>Stmn2</i>	NM_205181	Stathmin-like 2	2.49
<i>Nr5a1</i>	NM_205077	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1	1.87
<i>Nrg1</i>	NM_204117	Neuregulin 1	1.77
<i>Chga</i>	CR523039	Chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)	1.74
<i>Sim1</i>	U40058	Single-minded homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	1.74
<i>Bsx</i>	NM_204512	Brain-specific homeobox	1.68
<i>Ascl1</i>	NM_204412	Achaete-scute complex homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	1.67
<i>Nr5a2</i>	NM_205078	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	1.59
<i>Gap43</i>	XM_425527	Growth associated protein 43	1.57
<i>Neurog2</i>	NM_204796	Neurogenin 2	1.57
<i>Sox14</i>	NM_204761	SRY (sex determining region Y)-box 14	1.51
<i>Robo2</i>	XM_416674	Roundabout, axon guidance receptor, homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )	1.46
<i>Cntn2</i>	NM_001004395	Contactin 2 (axonal)	1.39
<i>Slit1</i>	XM_421715	Slit homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	1.37
<i>Hes6</i>	BX935736	Hairy and enhancer of split 6 ( <i>Drosophila</i> )	1.36
<i>Bdnf</i>	NM_001031616	Brain-derived neurotrophic factor	1.34
<i>Foxn4</i>	NM_001083359	Forkhead box N4	1.31
<i>Chrdl1</i>	NM_204171	Chordin-like 1	1.30

**Table 1:** Example of expression values for genes selected with an absolute fold-change (FC)  $\geq 1.3$  after Gene Ontology (GO) enrichment. HH10 embryos were treated with DAPT or DMSO for 16 hours, and global change in gene expression of the forebrain were compared by microarray analysis. Two GO enriched terms have been selected: *Notch signalling pathway* and *Nervous system development*. This GO term contains 271 enriched genes, 135 were upregulated. Here we have listed the 23 genes for which we have obtained a RNA probes. The title and description for each gene were given as well as the accession number and the FC.





## ◆ EXPRESSION DYNAMIQUE DE NOUVEAUX MARQUEURS DE NEUROGENÈSE DANS LE SYSTEME NERVEUX EMBRYONNAIRE

Notre première étude présentée dans l'Article 1 a permis d'identifier de nouveaux marqueurs de neurogenèse au sein de l'hypothalamus mais qui sont également exprimés dans d'autres territoires neurogéniques tels que l'épithélium olfactif.

Les gènes *Tagln3* et *Chga* sont par ailleurs peu décrits dans la littérature et nous avons entrepris de décrire leur domaine d'expression au cours du développement embryonnaire.

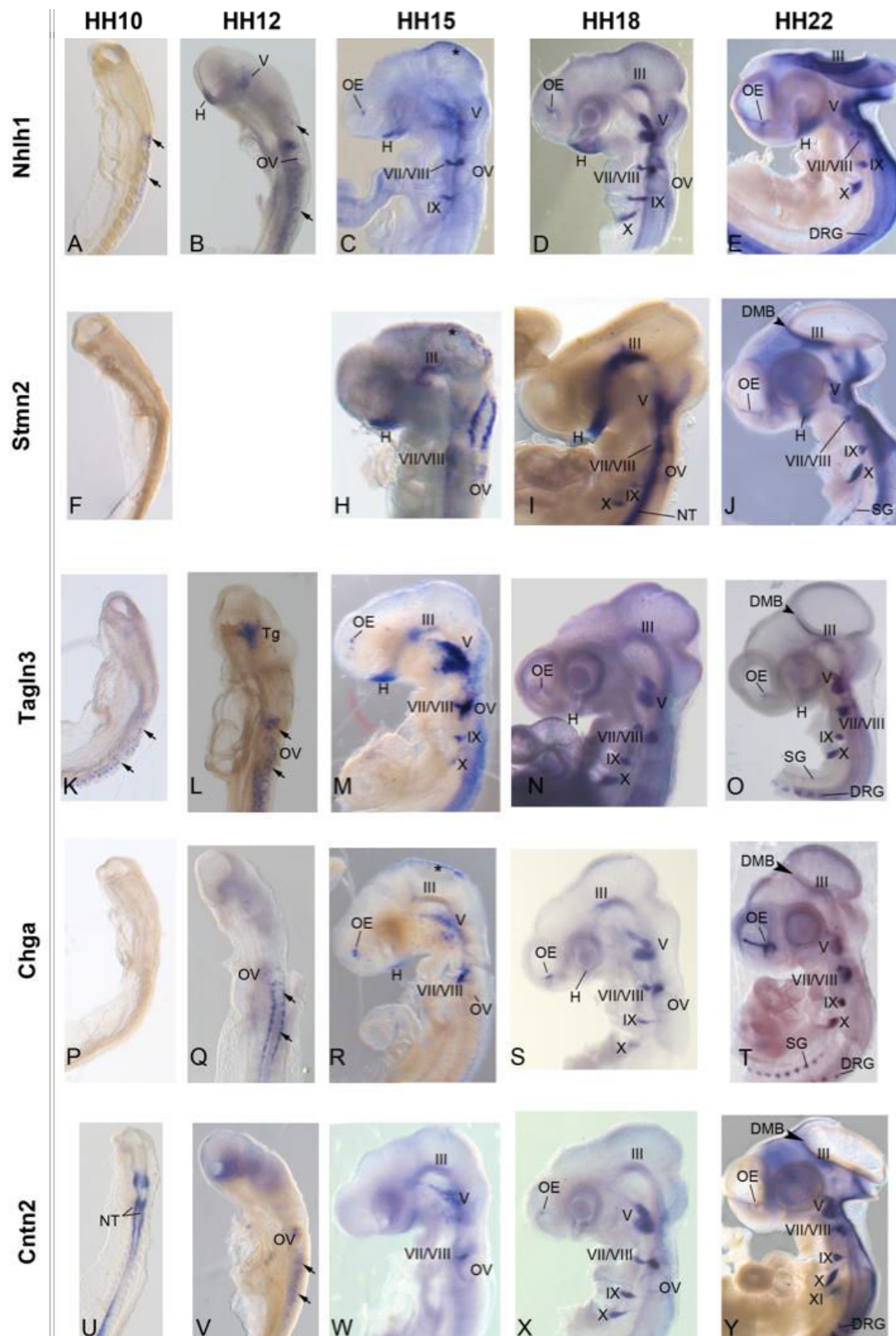
Je présenterai ici les résultats préliminaires obtenus au cours de ma thèse qui font l'objet d'un article en cours de préparation.

### 1. Dynamic expression in placodal cells of markers of later neurogenesis steps, *Nhlh1* and *Stmn2*

*Nhlh1* is an early pan-neuronal marker well known to be expressed in the olfactory epithelium and cranial ganglions (de la Pompa et al., 1997; Ma et al., 1998; Murdoch et al., 1999). The expression of *Nhlh1* is regulated by the Notch pathway and proneural genes as *Ascl1* and *Neurog1*. *Nhlh1* is implicated in neurogenesis within olfactory placodal region (Suzuki et al., 2003). We used *Nhlh1* as a marker of neurogenic regions where neurogenesis was in progress. Moreover, we used *Stmn2* as a late pan-neuronal marker of post-mitotic neurons (Groves et al., 1995; Stein et al., 1988).

The expression pattern of these two markers has not been well described during early embryonic development of the chick embryo. We show their expression patterns from stage HH10 to HH22. Interestingly, they could be implicated in the same neurogenesis process within specific neurogenic territories (Figure 1 A-J).

By HH10, expression of *Nhlh1* started in scattered cells within the rostral two-thirds of the spinal cord (Fig. 1A). This expression was maintained until HH22 where *Nhlh1* was also expressed in dorsal root ganglia (DRG) (Fig. 1E). By HH12, *Nhlh1* started to be expressed in the developing hypothalamus (Fig1. B) and was expanded during development. We observed some *Nhlh1*<sup>+</sup> cells in the trigeminal placode area (Tg), which were superposed to few *Nhlh1*<sup>+</sup> isolated cells in the MLF neurons (data not shown) and in the trigeminal ganglia in R1. *Nhlh1* aggregated at the level of acoustic ganglia (VII/VIII) above the otic vesicles (OV) (Fig. 1B). By HH15, *Nhlh1* was first detected in the olfactory epithelium (OE) (Fig. 1C). The expression of



**Figure 29. Expression of neuronal markers in the developing chick nervous system detected by *in situ* hybridisation.**

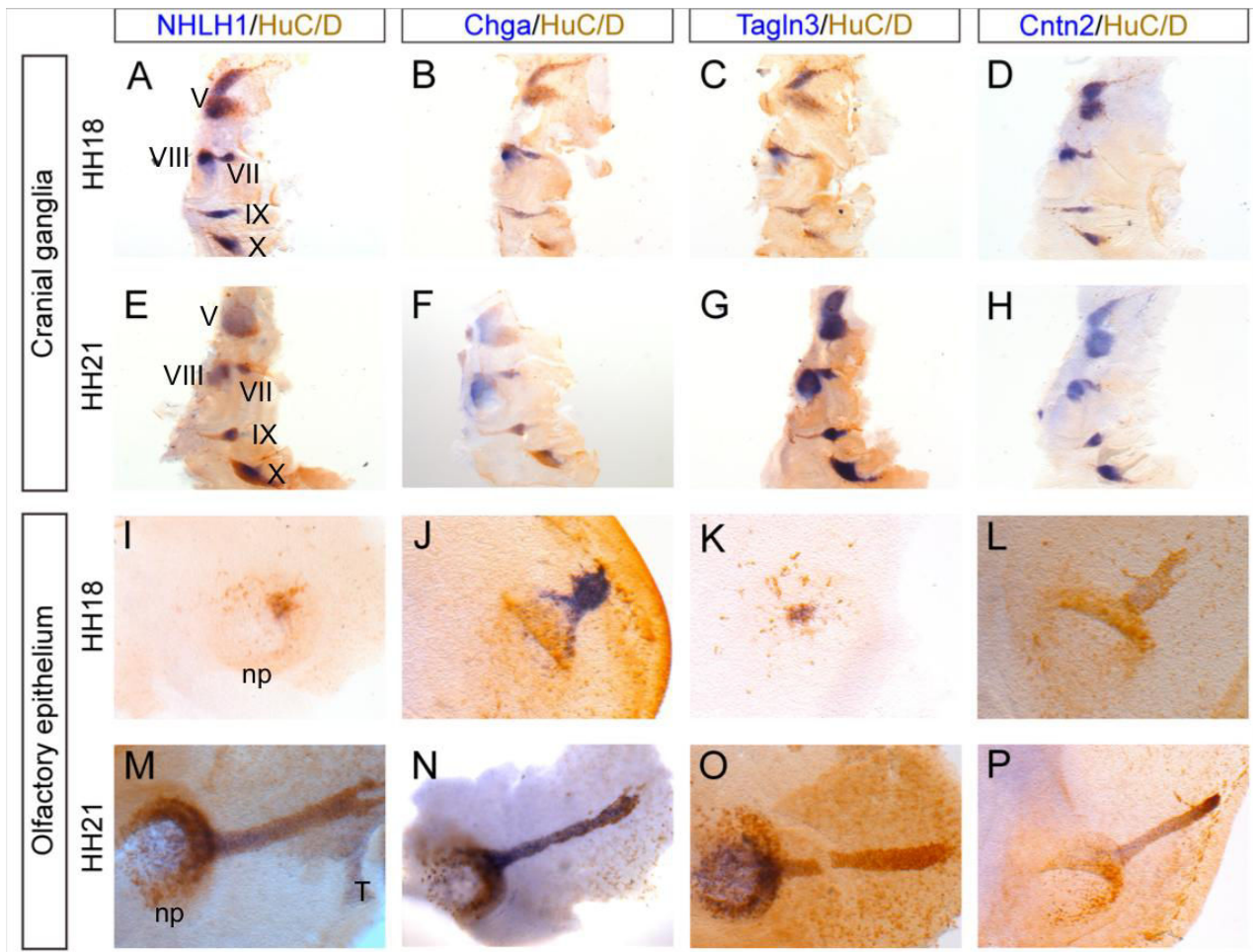
*Nhlh1*, *Stmn2*, *Tagln3*, *Chga* and *Cntn2* mRNA expressions are reported from HH10 to HH22 on whole-mount chick embryo. Roman numerals indicate cranial ganglia that express genes. (DRG: dorsal root ganglia; Hyp: hypothalamus; Nt : neural tube; OE: olfactory epithelium; OV: optic vesicles; SG: sympathetic ganglia; Tg : trigeminal placode; III: oculomotor ; V: trigeminal; VII/VIII: facial/vestibuloacoustic; IX: glossopharyngeal; X: vagus; XI: cranial accessory, \*: nmpesV).

*Nhlh1* persisted until HH22 where some cells of OE contacted the rostral telencephalon by spreading across the forming olfactory bulb. At HH2, *Nhlh1* was still expressed in the cranial ganglia and their respective nerves: trigeminal (V), facial/vestibuloacoustic (VII/VIII), glossopharyngeal (IX) and vagus ganglia (X). By HH18, in a stripe running along the lateral edge of the ventricular zone corresponding to the oculomotor ganglion (III) also expressed *Nhlh1* (Fig. 1D). By HH15, scattered cells in the dorsal mesencephalon expressed transient *Nhlh1* because expression disappeared at HH18.

These expression patterns were coherent with previous studies in mouse that have shown *Nhlh1* was expressed in scattered cells of the neural tube within the brain and rostral two-thirds of the spinal cord and in VII, IX and X cranial ganglia at E9.5 (de la Pompa et al., 1997; Fode et al., 1998). At E10.5, expression also appeared in the dorsal root ganglia (Murdoch et al., 1999). Together these data implicated *Nhlh1* in the formation of a subpopulation of the early migrating neuroblasts.

It was not surprising that *Stmn2* expression was not detected at HH10 (Fig. 1F) considering that is a marker of terminally differentiated neurons (Groves et al., 1995; Stein et al., 1988). Most interestingly, unlike of *Nhlh1*, *Stmn2* was early expressed in the developing hypothalamus namely HH12 (data not shown) and maintained within it until at least HH22 (Fig.1H-J). By HH15, *Stmn2* was expressed in scattered cells of the oculo-motor ganglion domains (Fig. 1H). Stronger expression was detected acoustic ganglia aggregates and dorsal borders of rhombencephalon where are formed later DRG (Fig. 1H). By HH18, *Stmn2* was expressed in more the defined ganglia aggregates (III, V, VII/VIII, IX, X) as at HH22 (Fig1. I-J). Expression within the ventral plate is continuous from the hypothalamus to the mesencephalon (Fig1. H-J). High *Stmn2* expression is also detected along the neural tube. Finally at HH22, *Stmn2* is expressed in the olfactory epithelium and the sympathetic ganglia (Fig. 1J).

In mouse, *Stmn2* was detected at E10 in the dorsal neural-crest derived dorsal portion and in the ventral trigeminal placodes (Streicher et al., 2000). In the *Neurog1* mouse mutant, *Stmn2* allowed to identify differentiated neurons at the level of trigeminal,



**Figure 30. Co-expression of pan-neural marker, HuC/D and novel markers**

*Double labelling for Nhlh1, Tagln3, Chga and Cntn2 by in situ and HuC/D by immunohistochemistry showing the relationship of their expression domains in the cranial ganglia in HH18 (A-C) and HH21 (D-F) as well as in the lateral olfactory tract in HH21 (G-I). Roman numerals indicate cranial ganglia that expressed genes (np: nasal placode, T: rostral telencephalon; V: trigeminal; VII/VIII: facial/vestibuloacoustic; IX: glossopharyngeal; X: vagus)*

geniculate, vestibule-cochlear, nodose, petrosal, accessory ganglia as well as newly motor neurons (Wang and Anderson, 1997).

This study provides additional neurogenic domains not previously described characterized by *Stmn2* such as the hypothalamus, oculomotor nerves and olfactory epithelium. Although *Nhlh1* and *Stmn2* were localized to developing neural structures of the CNS and PNS, it cannot be definitely ascertained by *in situ* hybridization if expression was restricted to developing neurons or to support cells.

## **2. Dynamic expression in placodal cells for three novel neuronal markers, *Chga*, *Tagln3* and *Cntn2***

We previously identified three novel neuronal markers at HH13 in the developing hypothalamus (Ratié et coll., submitted). They have been identified when we compared control embryos versus DAPT treated embryos, where Notch pathway was inhibited. The expression of these genes were not restricted to the hypothalamus and seemed to characterize other neurogenic regions as olfactory epithelium or cranial ganglia. Using expressions of *Nhlh1* and *Stmn2* that were genes considered as differentiated neurons markers, we could describe the expression patterns for *Tagln3*, *Chga* and *Cntn2* from HH10 to HH22.

*Tagln3* was first detected at HH8 in isolated cells within the neural tube (data not shown). The density of staining increased between HH10 to HH15 (Fig. 1K-M) and however expression seemed to decrease from HH18 to give way to expression in DRG and sympathetic ganglia along the spinal cord (Fig. 1N-O). By HH12, *Tagln3* showed a similar expression pattern to *Nhlh1*, except that *Tagln3* expression was absent in the hypothalamus (Fig. 1L). *Tagln3* expression began between HH12 and HH15 in the hypothalamus as well as in the olfactory epithelium (Fig. 1M). Moreover, *Tagln3* was expressed in cranial ganglia and respective nerves (III, V, VII/VIII, IX and X) from HH15 to HH22 where staining became more restricted to ganglia domains (Fig. 1M-O). Then, *Tagln3* decreased at the hypothalamus but maintained in olfactory epithelium at HH18 and HH22 (Fig. 1N-O). Finally, *Tagln3* was observed at HH22 along the diencephalic-mesencephalic boundary (DMB) (Fig. 1O).

These results were coherent with the previous study of Butchova and collaborateurs (2010) that showed the same expression pattern at HH20 in cranial ganglia, DRG and spinal



ganglia (Buchtova et al., 2010). Our report showed the dynamic of *Tagln3* expression in different neurogenic territories and the overlap with neuronal markers presented arguments in favour of its role in neurogenesis discussed in our previous study (Ratié et al, submitted).

Generally, we observed a similar expression pattern for *Chga*. In the whole embryo, its expression began à HH12 in scattered cells along the spinal cord but not as diffuse as the expression of *Nhlh1*, *Stmn2* and *Tagln3* (Fig. 1P-Q). Indeed, *Chga* was expressed in two vertical lines starting below otic vesicles (OV) (Fig.1 Q, arrows) that were denser at HH15 then expression decreased (Fig. 1R-T). Therefore, *Chga* was expressed in each sympathetic ganglion and DRG unlike *Tagln3* at HH22 (Fig. 1T). Expression of *Chga* was detected in the developing hypothalamus from HH12 to HH15 (Fig. 1Q-S) and in the olfactory epithelium from HH13 to HH22 (Fig. 1R-T) where some cells followed the same way towards the telencephalon as for *Nhlh1*, *Stmn2* and *Tagln3*. Only at HH15, could *Chga* be detected in the dorsal mesencephalon corresponding to the npmesV neurones (nucleus of the descending tract of the mesencephalic tract of the trigeminal nerve) (Fig. 1R, asterisk). In the cranial ganglia, *Chga* expression began in the trigeminal placode and acoustic ganglia at HH15 to give more defined expression domains in III, V, VII/VIII, IX and X ganglia from HH18 (Fig. 1R-T).

In zebrafish, *Chga* was expressed in the otic and trigeminal placodes as well as in DRG precursors at early stages of development (Xie et al., 2008). Later *Chga* was described in cranial ganglia, in each somatic segment and stronger in DRG. Few studies reported an expression pattern for *Chga* that making it interesting challenge for us to described *Chga* expression in chick embryo. Together these data suggest that *Chga* such as *Tagln3*, involved in neurogenesis of the olfactory epithelium, cranial and spinal ganglia and DRG.

At HH10, *Cntn2* presented a slightly different expression compared to the others genes described in this report (Fig. 1U). Indeed, we observe a strong staining in the neural tube borders at the level of the rhombomères 3 and below to the otic vesicles at HH10 (Fig.1U). Along the spinal cord, scattered *Cntn2*<sup>+</sup> cells were observed still below otic vesicles and give rise to acoustic ganglia above (Fig. 1X). *Cntn2* was expressed in the trigeminal placode at HH15 unlike genes reported down here (Fig1. W). Moreover, by HH18 *Cntn2* appeared in the olfactory epithelium and persisted until HH22 to highlight the cell line that





contacted the rostral telencephalon (Fig. 1X-Y). At this stage, cranial nerves and ganglia (III, V, VII/VIII, IX, X and XI) expressed *Cntn2* as well as DRG (Fig. 1 Y). We could also distinguish *Cntn2* in the DMB and MLF neurons (data not shown).

*Cntn2* was expressed in neurons of the central and peripheral nervous system in rodents. More precisely, *Cntn2* was detected in commissural neurons, motor neurons, cranial ganglia and DRG neurons (Hadas et al., 2013; Wolfer et al., 1998). Interestingly, a recent study identified on the *Cntn2* mouse promoter was a binding site for bHLH transcription factors (E-box), suggesting a potential regulation by proneural or Hes/Hey transcription factors (Hadas et al., 2013). *Cntn2* affects neural differentiation before exit of the cell cycle and modulate postmitotic neurons generation (Ma et al., 2008a; Ma et al., 2008b; Xenaki et al., 2011) by antagonising between others members of CNTN family. With this report we provide the neurogenic potential of *Cntn2* in early developing central nervous system in the vertebrate embryo.

### **3. Coexpression of *Nhlh1*, *Chga* and *Tagln3* and *Cntn2* in epibranchial-derived ganglia**

HuC/D is a pan-neural marker that labels neuronal cell bodies. The use of this antibody could be used to confirm the expression of these markers within the neurons. Here, the cranial ganglia and olfactory epithelium were used to highlight this observation.

First we observe an overlapping between HuC/D and *Nhlh1*, *Tagln3*, *Chga* and *Cntn2* in the five cranial ganglia (V, VII, VIII, IX, X) at HH18 and HH21 (Fig. 2A-H). By HH18, the olfactory placode began to invaginate and by HH22 the olfactory pothas formed in a bowl-like shape. Our results indicated that these four genes are expressed in neurons. By HH22 the expression of the markers, *Nhlh1*, *Tagln3*, *Chga* and *Cntn2* within the cranial ganglia was much more concentrated to the ganglia (Fig. 2E-H).

Cranial ganglia are different embryonic origins, they came from neural crest, epibranchial, hyoid and otic placode (Morales et al., 2007). The trigeminal ganglia and their associated nerves V, is composed of two patches from epibranchial placode and one from neural crest. The geniculate ganglion (VII) derived from epibranchial placode as the petrosal



(IX) and nodose (X) ganglia unlike facial ganglia that derived from otic placode. Finally ciliary (III), superior (IX-p) and jugular (X-p) ganglia derived from neural crest.

Interestingly, the neuronal makers, *Tagln3*, *Chga* and *Cntn2* seem to be expressed only in epibranchial parts of different ganglia. To confirm this hypothesis, a co-expression between the markers and HNK-1 a specific marker of neural crest cells (Morales et al., 2007) is in progress.

#### **4. Coexpression of *Nhlh1* and *Chga* in cells of lateral olfactory tract**

Neurons projections produced primary axons from the olfactory bulb (OB) that grows preferentially into the ventro-lateral part of the telencephalon to form the lateral olfactory tract (LOT). Olfactory sensory neurons can be characterized by HuC/D expression that marked post-mitotic neurons (Fornaro et al., 2003; Maier and Gunhaga, 2009).

Within the olfactory epithelium all the markers presented here were expressed and we observed an overlap between *Nhlh1* and *Chga* expression in the nasal pit as well as in the LOT with HuC/D staining (Fig. 2M, N). Interestingly, within the migratory stream of neurons that are migrating towards the telencephalon, *Tagln3* was not present within these neurons like *Nhlh1* and *Chga* (Fig2. O). At the opposite, *Cntn2* was only expressed in the migratory stream of neurones (Fig2. P)

In this study, we have analysed the temporal and spatial expression of *Stmn2*, *Nhlh1*, *Chga*, *Tagln3*, *Cntn2* and *HuC/D* during the early development of the cranial ganglia and olfactory placode. The expression of *Tagln3*, *Chga* and *Cntn2* was partially described before in cranial ganglia (Buchtova et al., 2010; Hadas et al., 2013; Wolfer et al., 1998; Xie et al., 2008). At the opposite, these markers were never described before during olfactory placode neurogenesis.



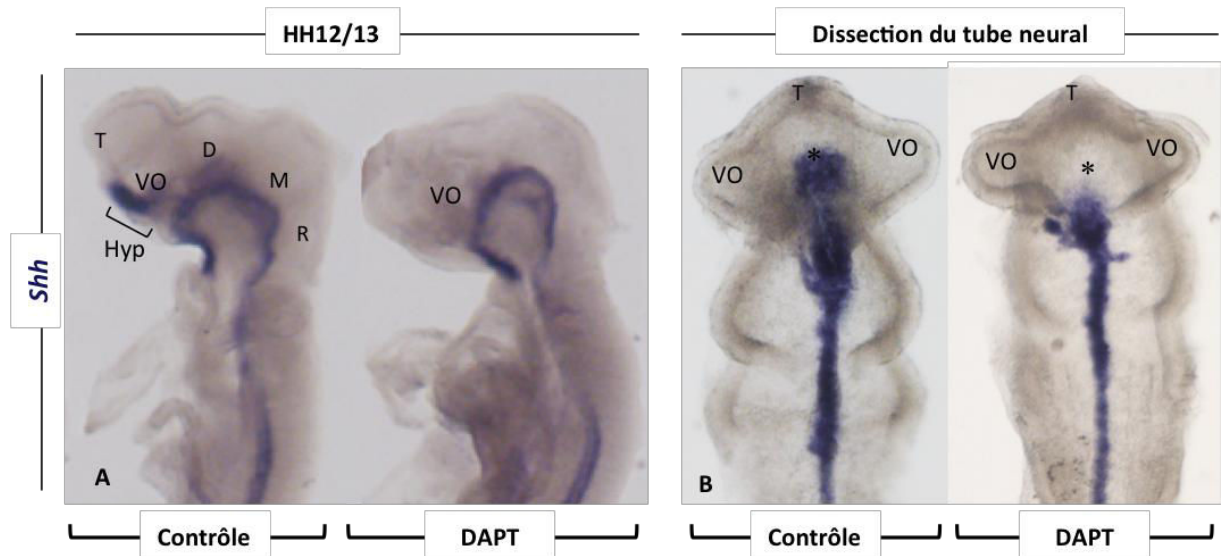
## ◆ LE GÈNE *SHH* EST RÉGULÉ PAR LA VOIE NOTCH AU NIVEAU DE LA LIGNE MÉDIANE

Notre analyse transcriptomique réalisée à partir d'ARNs extraits du cerveau antérieur des embryons a révélé, notamment, une forte diminution de l'expression du gène *Shh*. Or, ce gène est considéré comme le gène majeur impliqué dans l'HPE (Mercier et al., 2011).

Chez l'embryon de poulet, *Shh* est exprimé au niveau du Nœud de Hensen dès le stade HH5, qui correspond au début de la gastrulation (Aglyamova and Agarwala, 2007) puis à partir de HH6, la molécule SHH est sécrétée par la plaque préchordale et la notochorde pour induire la plaque neurale. A partir du stade HH10, *Shh* est spécifiquement exprimé dans l'hypothalamus en développement avec une limite antérieure qui correspond à l'hypothalamus antérieur (Bardet et al., 2010; Ratié et al., accepté pour *Neural Development*).

Dans cette région, l'activité de SHH est nécessaire à l'expression du gène *Nkx2.1*, un marqueur spécifique des précurseurs hypothalamiques (Dale et al., 1997; Ohyama et al., 2005). Nous avons précédemment montré que cette expression dans l'hypothalamus antérieur était chevauchante avec l'expression des acteurs de la voie Notch (Ratié et al., accepté pour *Neural Development*). L'induction et le maintien de l'expression de *Shh* dans cette région dépendent de nombreux facteurs de signalisation comme Nodal, BMP ou Fgf (Manning et al., 2006; Mathieu et al., 2002; Ohyama et al., 2008; Pearson et al., 2011; Rohr et al., 2001) qui sont également des voies impliquées dans l'apparition de l'HPE (Arauz et al., 2010; Klingensmith et al., 2010; McCabe et al., 2011; Yang et al., 2010).

Pour tester si l'expression de *Shh* était également sous la dépendance de la voie Notch, nous avons évalué son expression par hybridation *in situ* en condition d'inhibition de la voie Notch. Ces résultats qui sont préliminaires vous sont présentés ci-après.



**Figure 31. Une perte systématique de l'expression de *Shh* dans l'hypothalamus en développement**

*Validation de l'expression différentielle de *Shh* chez des embryons traités au DAPT au stade HH10 puis cultivés pendant 16h. A. Vue latérale B. Vue ventrale du tube neural disséqué des embryons présentés en A. On observe une absence d'expression de *Shh* au niveau de l'hypothalamus (\*) alors qu'elle est conservée dans le reste du tube neural.*

*D : diencéphale ; M : mésencéphale ; R : rhombencéphale ; T : télencéphale ; VO : vésicules optiques*

## 1. Plusieurs marqueurs de l'identité hypothalamique sont sous-exprimés en absence d'activité Notch.

Les territoires hypothalamiques du prosencéphale naissent d'une région caractérisée par l'expression de *Shh*, *Nkx2.1* et *Nkx2.2* (Marin et al., 2002; Pan et al., 2004; Szabo et al., 2009).

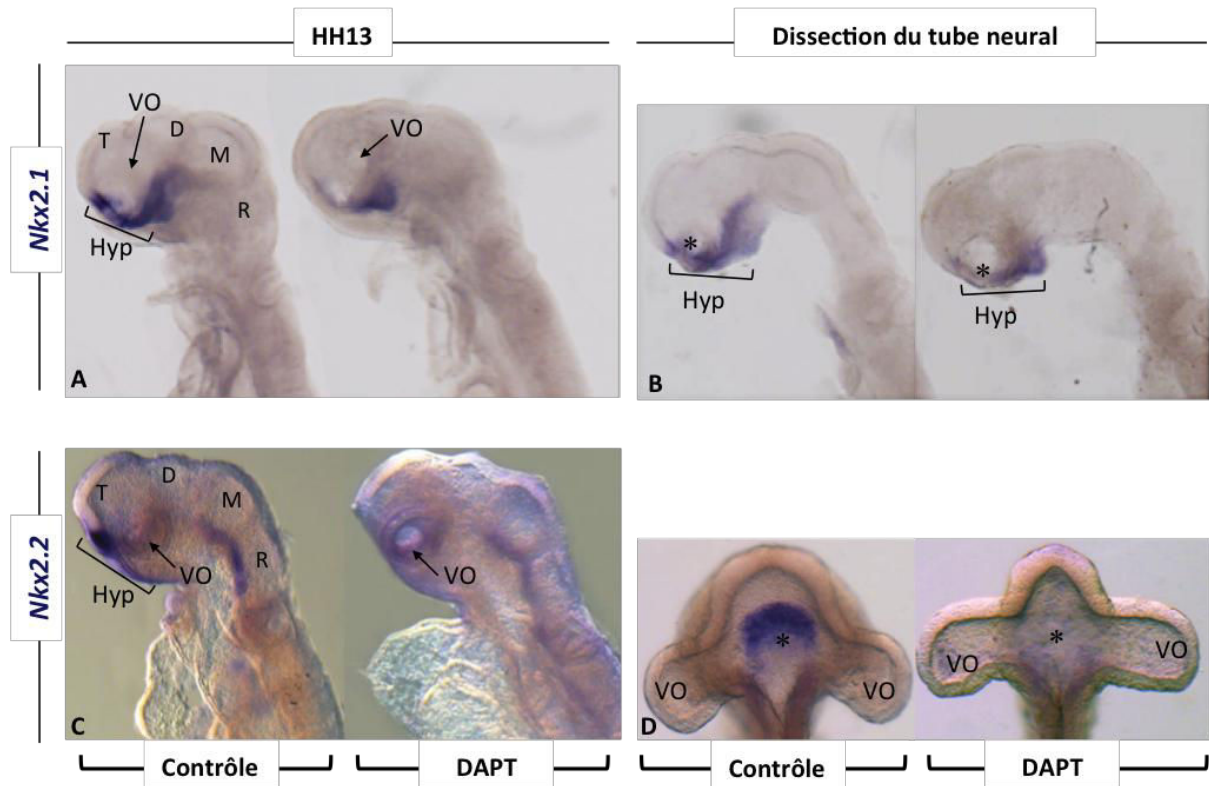
D'après l'enrichissement par Gene Ontology pour le terme *Développement du système nerveux*, 136 gènes présentent un profil de sous-expression en condition d'inhibition de la voie Notch dans le cerveau antérieur. Parmi ces gènes, on retrouve le gène *Shh* (FC=-2,42) mais également deux de ses principales cibles *Nkx2.1* (FC=-3,64) et *Nkx2.2* (FC=-1,33) (Briscoe et al., 2000; Gulacsi and Anderson, 2006).

Nous avons souhaité valider la dérégulation de l'expression de ces trois gènes par hybridation *in situ* chez l'embryon de poulet dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour l'analyse du transcriptome. Des embryons au stade HH10 ont été disséqués et cultivés selon la méthode de culture roller (Figure 28) soit en présence de DMSO soit en présence de l'inhibiteur de la voie Notch, le DAPT à 40 $\mu$ M (Ratié et al., accepté pour *Neural Development*).

Dans ces conditions nous avons observé que l'expression de *Shh* était anormalement absente spécifiquement dans la région antérieure de son domaine normal d'expression (Figure 31). En effet, la vue latérale présentée dans la Figure 31 montre que chez les embryons traités au DAPT, *Shh* est spécifiquement absent dans la région la plus rostrale de son expression (Figure 31A). A contrario, son expression est conservée dans les régions plus postérieures correspondant au plancher du mésencéphale, du rhombencéphale et de la moelle épinière chez les embryons traités au DAPT (Bardet et al., 2010; Persson et al., 2002; Ribes and Briscoe, 2009).

Cette sous expression est totalement pénétrante (n=20). La vue ventrale du tube neural disséqué montre que cette région correspond au diencephale ventral situé dans l'axe des deux vésicules optiques (Figure 31B).

Chez les embryons traités au DAPT, le même type de sous expression est observé pour *Nkx2.1* et *Nkx2.2*. Après le traitement au DAPT, l'expression de ces deux gènes est clairement diminuée voire absente au niveau du primordium de l'hypothalamus qui exprime



**Figure 32. Validation de l'expression différentielle de *Nkx2.1* et *Nkx2.2* chez des embryons traités au DAPT**

**A.** Vue latérale **B.** Vue latérale du tube neural disséqué. Expression de *Nkx2.1* chez des embryons contrôles (DMSO) ou traités au DAPT au stade HH10 puis cultivés pendant 16h. On observe une perte de l'expression de *Nkx2.1* au niveau de la partie antérieure de l'hypothalamus chez les embryons traités au DAPT.

**C.** Vue latérale **D.** Vue ventrale du tube neural disséqué. Expression de *Nkx2.2* chez des embryons contrôles (DMSO) ou traités au DAPT au stade HH10 puis cultivés pendant 16h. On observe une très forte diminution de l'expression de *Nkx2.2* au niveau de l'hypothalamus antérieur chez les embryons traités au DAPT.

D : diencephale ; Hyp : hypothalamus ; LH : hypothalamus latéral ; M : mésencéphale ; PH : hypothalamus postérieur ; R : rhombencéphale ; T : télencéphale ; VO : vésicules optiques ; \* partie antérieure de l'hypothalamus



ordinairement ces gènes (Figure 32A et B). *Nkx2.1* est normalement détecté dans la région ventrale du cerveau antérieur au niveau de l'hypothalamus antérieur, latéral et postérieur chez les embryons contrôles (Bardet et al., 2010). Son expression est spécifiquement absente dans la région antérieure chez les embryons traités au DAPT (Figure 32B) alors qu'elle est maintenue dans les autres domaines de l'hypothalamus.

De même, *Nkx2.2* est exprimé dans la région ventrale du cerveau antérieur au niveau de la partie antérieure de l'hypothalamus chez les embryons contrôles (Figure 32C). Son expression est très fortement diminuée dans cette région dans les embryons traités au DAPT (Figure 32D). Son expression au niveau du tube neural est quant à elle maintenue (Figure 32C) (Holz et al., 2010; Schafer et al., 2005).

Ces résultats bien que préliminaires sont essentiels car ils vont clairement dans le sens d'un rôle de la voie Notch au cours de la mise en place de la ligne médiane antérieure, la structure responsable de l'apparition d'HPE. Il est important de rappeler à ce stade qu'une perte d'expression spécifique de *Shh* et *Nkx2.1* dans cette région de la ligne médiane est caractéristique d'un phénotype HPE (Allen et al., 2007; Anderson et al., 2002; Higashiyama et al., 2007; Lowe et al., 2001; Vincent et al., 2003; Yang et al., 2010).

Plusieurs cascades de signalisation, dont Notch et Shh, interagissent au cours de la prolifération et de la différenciation neuronale (Agarwala et al., 2001; Aglyamova and Agarwala, 2007; Komada et al., 2008; Lardelli et al., 1996). Cependant, peu d'études ont porté sur l'interaction entre ces cascades de signalisation en particulier au niveau du plancher du diencephale (Crawford and Roelink, 2007; Schafer et al., 2005; Schafer et al., 2007).

Actuellement, nous ne sommes pas en mesure de conclure sur le mécanisme d'inhibition de l'expression de *Shh* en absence d'activité Notch dans l'hypothalamus antérieur. Plusieurs pistes peuvent-être suivies:

a) Nous avons montré dans l'Article 1 que cette même région présentait une neurogenèse précoce en absence d'activité Notch (Ratié et al., accepté). L'absence de *Shh* peut donc être

Gènes	Numéro d'accension	Description	Valeur du FC
<i>Acteurs de la voie Sonic Hedgehog</i>			
<i>Shh</i>	NM_204821	Sonic hedgehog	-2,26
<i>Nkx2.1</i>	NM_204616	NK2 homeobox 1	-3,64
<i>Nkx2.2</i>	NM_426104	NK2 homeobox 2	-1,33
<i>Gli1</i>	U60762	Zinc finger protein GLI1 Fragment (GLI)	-1,27
<i>Gli2</i>	NM_001098851	GLI-Kruppel family member GLI2	-1,05
<i>Gli3</i>	AF222990	GLI-Kruppel family member GLI3	1,59
<i>Gènes identifiés dans l'hypothalamus en développement</i>			
<i>Ascl1</i>	NM_204412	Achaete-scute complex homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )	-1,21
<i>Chga</i>	CR523039	Chromogranin A (parathyroïde secretory protein 1)	-1,56
<i>Tagln3</i>	XM_416634	Transgelin 3	-1,66
<i>Cntn2</i>	NM_001004395	Contactin 2 (axonal)	-3,1
<i>Chrdl1</i>	NM_204171	Chordin-like 1	-1,46

**Tableau 5 : Valeurs d'expression différentielles obtenues lors de l'analyse transcriptomique sur des embryons traités à la cyclopamine.**

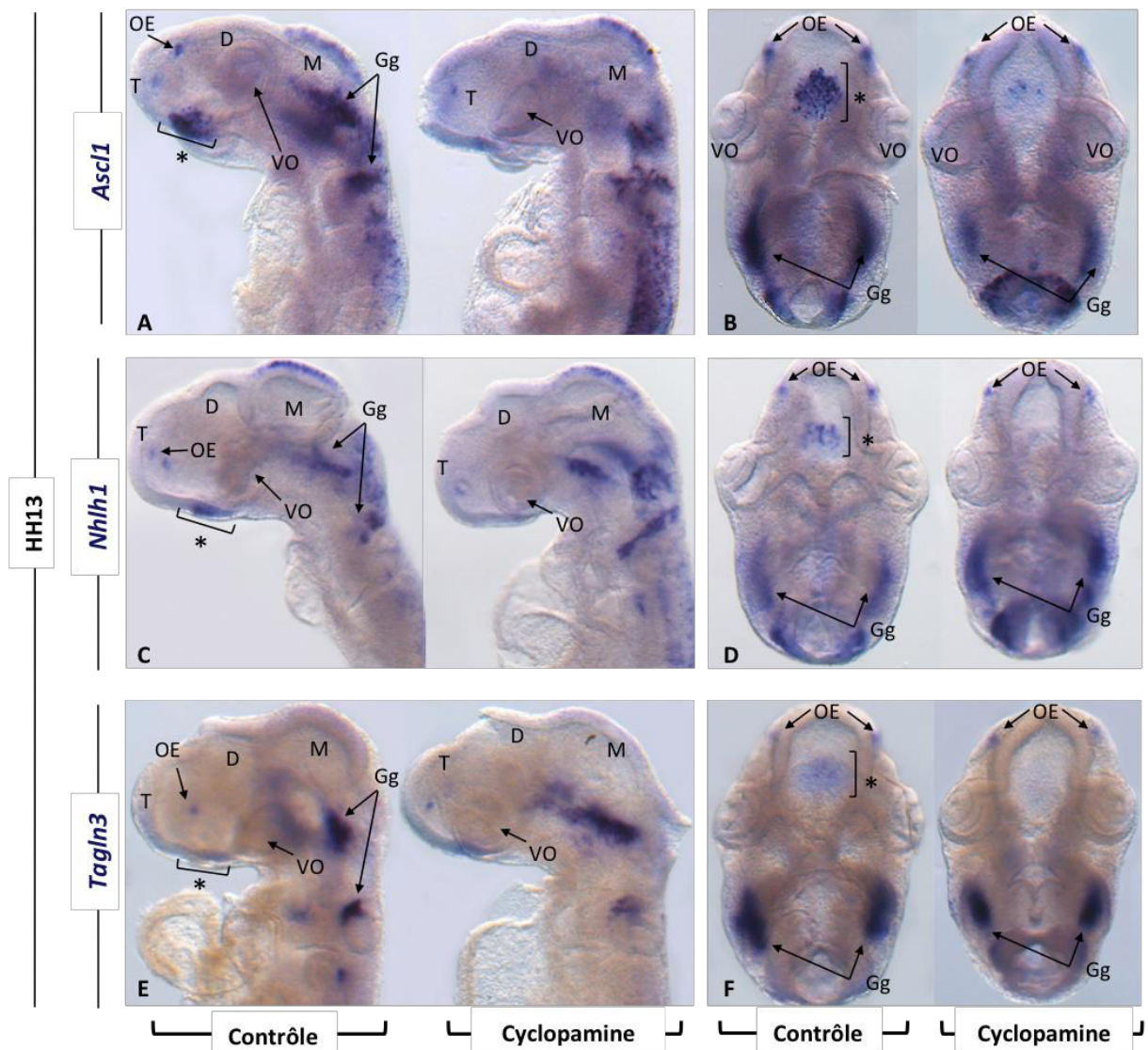
consécutives à la phase post-mitotique découlant de la neurogenèse précoce. En effet, *Shh* est nécessaire à l'activation de la cycline D1 dans la plaque neurale et contribue ainsi à la maturation progressive du tube neural en maintenant l'activité mitotique (Ishibashi and McMahon, 2002; Lobjois et al., 2004). La signalisation Shh par l'intermédiaire des protéines GLI, régule la phase G1 du cycle cellulaire des cellules neurales progénitrices. La voie de signalisation Shh régule finalement de façon indépendante l'établissement, la prolifération et la survie des cellules neurales en activant par exemple l'expression de gènes anti apoptotiques tel *Bcl2* (Cayuso et al., 2006). La diminution du signal *Shh* dans nos expériences pourrait donc être secondaire à la différenciation précoce des neurones hypothalamiques.

b) Il est également envisageable qu'une interaction directe entre la voie Notch et la voie Shh existe et soit nécessaire pour la différenciation neuronale au sein de l'hypothalamus. (Dominguez et al., 2010; Marin et al., 2002; van den Akker et al., 2008). Dans ce cas, *Shh* serait donc régulé par la voie Notch au cours de la différenciation de la ligne médiane antérieure.

## **2. Les marqueurs de neurogenèse sont sous exprimés en présence de cyclopaamine**

En parallèle, nous avons entrepris de réaliser une analyse transcriptomique après inhibition de la voie Shh, selon le même protocole que lors de l'inhibition de la voie Notch. Pour cela, les embryons ont été cultivés comme précédemment (Ratié et al., accepté pour *Neural Development*) mais en présence de l'inhibiteur de la voie Shh, la cyclopaamine (Chen et al., 2002a; Incardona et al., 1998; Mercier et al., 2013). Les méthodes de prélèvement, d'hybridation sur puce Agilent 4x44k de génome de poulet ainsi que d'analyse des résultats sont effectuées de façon strictement identique à celle décrite dans l'Article1 (Ratié et coll., soumis). Ce traitement n'entraîne pas de malformation morphologique notable.

En accord avec la littérature, nous observons que *Nkx2.1* et *Nkx2.2* sont fortement sous exprimés chez les embryons traités à la cyclopaamine (Dale et al., 1997; Ericson et al., 1995) (Tableau 5). D'autres gènes apparentés à la voie Shh révèlent également des variations d'expression attendues : *Gli1*, *Gli2* et *Gli3* (Borycki et al., 2000; Dai et al., 1999; Lipinski et al., 2006) (Tableau 5).



**Figure 33. Localisation de la perte d'expression d'*Ascl1*, *Nhlh1* et *Tagln3* chez des embryons traités à la cyclopamine**

*Hybridation in situ* réalisées sur des embryons contrôles et traités à la cyclopamine à HH10. **A,C,E** Vues latérales. **B,D,F** Vues ventrales de la tête embryons présentés en **A,C, E**.

*D* : diencephale ; *Hyp* : hypothalamus ; *OE* : épithélium olfactif ; *Gg* : ganglions craniaux ; *M* : mésencéphale ; *T* : télencéphale ; *VO* : vésicules optiques

Cependant, nous avons été surpris de constater que le gène proneural *Ascl1* et le gène neural *Nhlh1* étaient également sous exprimés lors de l'inhibition de la voie Shh. Ceci est contradictoire avec une étude récente suggérant qu'*Ascl1* pourrait être une cible directe de GLI2 (Voronova et al., 2011).

De même, les gènes *Tagln3*, *Chga*, *Cntn2* ou encore *Chrdl1* présentent tous une sous expression chez les embryons traités à la cyclopropamine (Tableau 5). Cette sous-expression en présence de cyclopropamine a été confirmée par hybridation *in situ* pour les gènes *Ascl1*, *Nhlh1* et *Tagln3* sur des embryons cultivés dans les mêmes conditions que pour l'analyse transcriptomique (Figure 33). Il est intéressant de noter que ces gènes sont spécifiquement sous exprimés dans l'hypothalamus antérieur en absence d'activité Shh. Par ailleurs, leur expression au niveau du mésencéphale dorsal, de l'épithélium olfactif et des ganglions trijumeaux est conservée (Figure 33).

Très récemment nous avons observé qu'en présence de cyclopropamine le gène *Hes5* était sous exprimé dans le prosencéphale d'embryon de poulet au stade HH13. Ce résultat placerait la voie Shh en amont de la voie Notch (données non présentées).

A ce stade de notre étude, nous pouvons conclure qu'il existe une interaction entre la voie Notch et Shh au niveau de la ligne médiane. Cependant, notre étude montre que cet événement implique des interactions moléculaires qui sont probablement multiples et associées à des processus de différenciation cellulaire.



## Partie 2.

### ◆ Article 2. NOUVELLES DONNÉES CONCERNANT LES CORRÉLATIONS GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE DANS UNE SÉRIE EUROPÉENNE DE CAS D'HOLOPROSENCÉPHALIE

*Journal of Medical Genetics*

Mercier S, Dubourg C, Garcelon N, Campillo-Gimenez B, Gicquel I, Belleguic M, Ratié L, Pasquier L, Loget P, Bendavid C, Jaillard S, Rochard L, Quélin C, Dupé V, David D, Odent S.

A partir de données cliniques et moléculaires de la cohorte de patients présentant un phénotype HPE, établie à Rennes depuis 1996, Sandra Mercier a réalisé une étude de corrélation génotype-phénotype.

Mon rôle dans cette étude a été de répertorier les données de l'étude pangénomique par CGH-array sur l'ensemble de plus de 300 patients analysés au Centre Hospitalier Universitaire de Rennes. Cela m'a permis d'établir une liste des délétions et amplifications identifiées chez les patients et d'y associer leur phénotype HPE. Ces données ont été enregistrées dans la base de données répertoriant l'ensemble des patients de la cohorte de Rennes. Ce regroupement de données cliniques et moléculaires, a permis à Sandra Mercier d'établir des corrélations génotype-phénotype par des analyses statistiques.

Les données moléculaires regroupent non seulement les analyses de CGH-array mais aussi le résultat des études moléculaires systématiques des 4 principaux gènes pour l'HPE, soit *SHH*, *ZIC2*, *SIX3* et *TGIF*, ainsi que l'étude du gène *GLI2* pour 208 proposant.

La fréquence des mutations a été répertoriée et est comparable à celle de la littérature pour les gènes *SHH* (10,4%), *ZIC2* (8,2%), *SIX3* (5,1%) et *TGIF* (1,7%). Ajouté à cela un taux élevé d'héritabilité des mutations ponctuelles a été retrouvé pour *SHH*, *SIX3* et *TGIF* (>70%) et un taux plus faible pour *SIX3* (30%). Une analyse du sexe-ratio a également été réalisée, démontrant une prédominance féminine plus marquée pour les gènes *ZIC2* et *SIX3*. De la même façon, des mutations des gènes *SIX3* et *ZIC2* s'avèrent représentatifs dans les formes les plus sévères d'HPE alors que les microformes sont plus souvent associées aux formes mineures.





Par la suite, nous avons défini quatre catégories de malformations cranio-faciales allant des formes les plus sévères (1) jusqu'aux formes moins sévères et moins spécifiques (4). Il est apparu une corrélation significative pour les proposants porteurs des gènes *SHH*, *SIX3* et *TGIF* avec ces différentes catégories.

Ce travail a également permis de détailler des malformations cérébrales comme des cas de rhombencéphalosynapsis (RES). Cette pathologie est considérée comme l'équivalent de l'HPE au niveau du cervelet. L'étude du RES est également un projet de l'équipe, abordé ici dans l'Annexe 1. Des troubles de la migration neuronale et des anomalies de fermeture du tube neural ont été retrouvés dans ces cas porteurs de mutations du gène *ZIC2*. Enfin, les anomalies extra-craniofaciales ont été relevées et indiquent qu'une importante proportion de ces anomalies est associée au gène *ZIC2*.

Grâce à l'analyse de ces corrélations génotype-phénotype, un modèle algorithmique a pu être construit pour objectif de préciser la stratégie moléculaire à adopter ainsi que le conseil génétique. Cependant, l'HPE possède une origine multifactorielle ce qui rend les corrélations génotypes-phénotypes délicates. En effet, de par son hétérogénéité phénotypique et l'influence de facteurs génétiques comme environnementaux, le modèle de pathologie dite « multi-hit » a été évoqué pour l'Holoprosencéphalie (Ming et al., 2002). La variabilité observée résulterait de la combinaison d'au moins deux événements indépendants et non d'un événement unique (Roessler and Muenke, 2010).

Nous avons vu précédemment que plusieurs voies de signalisation interagissaient entre elles au cours des processus de développement perturbés dans le cas d'une Holoprosencéphalie. L'observation de patients porteurs de doubles mutations associées à des réarrangements suggère une réalité du modèle multi-hit.

Afin d'étudier la perturbation de différentes voies de signalisation au cours du développement précoce du cerveau, Sandra Mercier a également utilisé le modèle d'embryon de poulet pour tenter de reproduire les conditions physiopathologiques de l'HPE (cf : Article 3).



## ORIGINAL ARTICLE

## New findings for phenotype—genotype correlations in a large European series of holoprosencephaly cases

Sandra Mercier,<sup>1,2</sup> Christèle Dubourg,<sup>2,3</sup> Nicolas Garcelon,<sup>4</sup> Boris Campillo-Gimenez,<sup>4</sup> Isabelle Gicquel,<sup>2</sup> Marion Belleguic,<sup>1</sup> Leslie Ratié,<sup>2</sup> Laurent Pasquier,<sup>1</sup> Philippe Loget,<sup>5</sup> Claude Bendavid,<sup>2</sup> Sylvie Jaillard,<sup>2</sup> Lucie Rochard,<sup>2</sup> Chloé Quélin,<sup>1</sup> Valérie Dupé,<sup>2</sup> Véronique David,<sup>2</sup> Sylvie Odent<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Service de Génétique Clinique, CLAD Ouest, CHU Rennes, Rennes, France

<sup>2</sup>Faculté de Médecine, Institut de Génétique et Développement de Rennes, Université de Rennes 1, Rennes, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Rennes, Rennes, France

<sup>4</sup>Laboratoire d'Informatique Médicale, CHU Rennes, Rennes, France

<sup>5</sup>Service d'Anatomie Pathologique, CHU Rennes, Rennes, France

**Correspondence to**

Professor Sylvie Odent, Service de Génétique Clinique, CLAD Ouest, CHU Rennes, Hôpital sud, 16 Bd de Bulgarie BP 90347, Rennes 35203, France; [sylvie.odent@chu-rennes.fr](mailto:sylvie.odent@chu-rennes.fr)

Received 12 July 2011

Revised 1 September 2011

Accepted 2 September 2011

Published Online First

22 September 2011

**ABSTRACT**

**Background** Holoprosencephaly (HPE) is the most common forebrain defect in humans. It results from incomplete midline cleavage of the prosencephalon.

**Methods** A large European series of 645 HPE probands (and 699 relatives), consisting of 51% fetuses and 49% liveborn children, is reported.

**Results** Mutations in the four main genes involved in HPE (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF*) were identified in 25% of cases. The *SHH*, *SIX3*, and *TGIF* mutations were inherited in more than 70% of these cases, whereas 70% of the mutations in *ZIC2* occurred *de novo*. Moreover, rearrangements were detected in 22% of the 260 patients screened by array comparative genomic hybridisation. 15 probands had two mutations providing additional support for the 'multiple-hit process' in HPE. There was a positive correlation between the severity of the brain malformation and facial features for *SHH*, *SIX3*, and *TGIF*, but no such correlation was found for *ZIC2* mutations. The most severe HPE types were associated with *SIX3* and *ZIC2* mutations, whereas microforms were associated with *SHH* mutations. The study focused on the associated brain malformations, including neuronal migration defects, which predominated in individuals with *ZIC2* mutations, and neural tube defects, which were frequently associated with *ZIC2* (rachischisis) and *TGIF* mutations. Extracraniofacial features were observed in 27% of the individuals in this series (up to 40% of those with *ZIC2* mutations) and a significant correlation was found between renal/urinary defects and mutations of *SHH* and *ZIC2*.

**Conclusions** An algorithm is proposed based on these new phenotype—genotype correlations, to facilitate molecular analysis and genetic counselling for HPE.

**INTRODUCTION**

Holoprosencephaly (HPE; MIM 236100) is the most common brain malformation in humans. It results from incomplete midline division of the prosencephalon between days 18 and 28 of gestation.<sup>1–2</sup> The estimated prevalence of HPE in liveborn children is less than 1/10 000, but the incidence may be as high as 1/250 in first trimester conceptuses.<sup>3–4</sup> HPE is usually associated with facial abnormalities, such as cyclopia, proboscis, or cleft lip/palate in cases of severe HPE. It has been said that "the face predicts the brain" but this rule is not applicable in all cases.<sup>5–6</sup> Three classical

anatomical classes have been described, in increasing order of severity: lobar, semi-lobar, and alobar HPE. The full spectrum of HPE also includes middle interhemispheric variants (MIH) or synte-lencephaly, septopreoptic HPE and microforms characterised by midline defects (eg, single maxillary median incisor (SMMI) or hypotelorism) without the brain malformations typical of HPE.<sup>7–10</sup>

Not only is HPE phenotypically highly variable, its aetiology has also been shown to be very heterogeneous.<sup>11–13</sup> Indeed, HPE may be caused by chromosome abnormalities, such as trisomy 13, 18, and triploidy in particular, or may be one of the components of a multiple malformation syndrome, such as Smith—Lemli—Opitz or CHARGE syndrome. HPE may also result from exposure to maternal diabetes or hypocholesterolaemia during gestation.<sup>14–15</sup> Four major genes responsible for HPE have been characterised—*SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, and *TGIF*—and another nine seem to play a lesser role in the occurrence of HPE.<sup>13–49</sup> The 'multiple-hit hypothesis' is now the most widely accepted model of HPE. According to this hypothesis, combinations of mutations in major and/or minor HPE genes lead to the occurrence of HPE and may account for variability in terms of severity.<sup>16</sup> Genetic counselling thus remains very complex for families affected by HPE.<sup>17</sup> There are clearly many interactions between the various signalling pathways involved in forebrain development that remain to be elucidated.

It is therefore difficult to establish phenotype—genotype correlations for this disease, due to the large number of interacting factors. Studies of large series are therefore required. We and others have reported specific findings, including in particular the description of particular microforms often associated with *SHH*, the predominance of severe forms in subjects with *SIX3* mutations, and a *ZIC2* specific phenotype with minor facial features.<sup>6–9, 18–21</sup>

We report here clinical and molecular data for the largest ever European series, including 645 probands and their relatives and a high proportion of fetuses; only one larger series has been described, based solely on children with HPE (National Institutes of Health, Muenke's team).<sup>21</sup> We aimed to identify new phenotype—genotype correlations in an updated large series of probands with at least one



mutation in an HPE related gene and/or at least one rearrangement identified on array comparative genomic hybridisation (CGH) analysis. Our statistical analyses confirm previous reports and focus, for the first time, on additional features, such as associated brain malformations, neural tube defects, and extracraniofacial defects. We propose a new algorithm based on these phenotype–genotype correlations, with the aim to guide molecular analysis strategies.

## PATIENTS AND METHODS

In 1996, a European network for HPE was set up in Rennes, France.<sup>1 9 18 22</sup> Clinical data for about 1500 patients, including 645 HPE probands and 699 relatives, were analysed and DNA was prospectively collected. All the data were input into a specific secure online database.

This study was approved by the institutional review board. All samples and clinical data were collected after informed consent had been obtained.

## Molecular analyses

The four major HPE associated genes (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF*) were routinely analysed by denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC) and/or direct sequencing in probands. The mode of inheritance was determined in cases in which samples from the parents were available. We analysed the *GLI2* gene in 208 HPE patients selected on the basis of a pituitary gland defect.<sup>23–25</sup>

We also searched for microcytogenetic rearrangements by multiplex ligation probe amplification (MRC-Holland) on the four genes. Array CGH was performed with the Agilent Human Genome Microarray 44A and 244A kits (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), for 260 patients.<sup>26</sup>

## Clinical data

We collected data relating to facial morphology and associated features. This study focused on HPE patients without known chromosomal abnormalities that could be picked up by standard cytogenetic analysis and without identified syndromes.

We defined four categories of facial abnormality, in descending order of medical severity: (1) very severe phenotypes, such as cyclopia, ethmocephaly (proboscis), cebocephaly; (2) premaxillary agenesis, cleft lip or palate, and less severe eye abnormalities (coloboma, retinal dysplasia); (3) mild midface malformations, such as pyriform sinus stenosis and choanal stenosis; (4) the mildest abnormalities, hypotelorism, and other mild non-specific defects such as SMMI and normal faces.

Associated brain malformations not included in the typical spectrum of HPE were also considered. These malformations included, in particular, posterior fossa abnormalities, such as rhombencephalosynapsis (RES), cerebellar hypoplasia, and agenesis, but also pituitary defects and gyral and neuronal abnormalities. Neural tube defects, such as myelomeningocele, rachischisis, and spina bifida, were considered independently of the associated brain malformations.

Extracraniofacial defects were essentially classified into six groups: (1) heart defects; (2) visceral malformations (abnormal lung lobulation, lung hypoplasia, thymus hypoplasia, adrenal hypoplasia, adrenal cytomegaly, common mesentery, single umbilical artery, diaphragmatic hernia, exomphalos, inguinal hernia, oesophageal atresia, intestinal stenosis); (3) genital malformations (micropenis, hypospadias, external and internal genital organs); (4) renal/urinary abnormalities (ureteral dilatation, renal hypoplasia); (5) skeletal abnormalities (sacral agenesis

and costovertebral abnormalities); (6) abnormalities of the extremities (club hand or foot, postaxial polydactyly, brachydactyly, clinodactyly or simian crease).

## Statistical analysis

The percentages in this report were calculated for the patients with documented data, as exhaustive clinical data were not available for all cases.

Variables are expressed as numbers and percentages. Comparisons were based on Pearson's  $\chi^2$  test and Fisher's exact tests, as appropriate. Correlations between ordinal variables were analysed by calculating Spearman's rank correlation coefficient and Goodman and Kruskal's  $\gamma$ . We used a type I error of 0.05, by convention, and all analyses were studied carried out with R software V2.12.2.<sup>27</sup>

## RESULTS

The main data, including HPE type, facial abnormality category, associated brain malformations, neural tube defects, and extracraniofacial malformations, are shown in table 1.

## The series

The series contained 645 probands, including 51% fetuses, and 699 relatives. The sex ratio of 1.2:1 (female:male) was consistent with a slight female predominance.

Systematic molecular analyses showed point mutations or deletions in the four major genes involved in HPE (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF*) in 25.4% of the subjects (164 probands; figures 1 and 2).<sup>6 18 21 28–30</sup> More fetuses than children were found to carry an HPE associated gene deletion (68% vs 32%). Previous array CGH analysis showed rearrangement rates as high as 25% in an initial study of 120 patients.<sup>26</sup> We describe here an additional 140 undergoing screening, with rearrangements identified in 22% (n=56) of the total of 260 probands (table 1).

The most severe cases of HPE were assigned to facial defect category 1 or 2, whereas most of the microforms were classified as category 3 or 4 (figure 3). As expected, category 4 included all cases of MIH and, surprisingly, a relatively high proportion of the cases of alobar or semilobar HPE. RES, the equivalent of HPE in the cerebellum, was described in six HPE cases and schizencephaly was reported as potentially associated in only three cases.<sup>31</sup> Extracraniofacial features were observed in 70 cases, including 13 cases of multiple congenital malformations mostly concerning abnormalities of the extremities, such as club hand or foot, simian crease, postaxial polydactyly (five cases), and visceral malformations, frequently with lung defects. Furthermore, three cases of situs inversus were observed.

An HPE spectrum disorder was reported in 79 of the 699 relatives (29% in parents and 71% in other relatives). All affected parents were diagnosed with brain microforms, which accounted for 44% of the abnormalities in these 79 relatives. More severe forms were reported in other relatives, such as siblings or cousins: 26% alobar HPE, 13% semi-lobar HPE, and 7% lobar HPE. Facial abnormalities were correlated with HPE severity: 26% category 1, 13% category 2, 10% category 3, and 51% category 4. Associated brain malformations were observed in 6% of the affected relatives and neural tube defects were found in 8%. Extracraniofacial malformations were reported in 16% of relatives, including only two cases of multiple congenital malformations.

## SHH

*SHH* mutations were found in 67 probands (10.4%) and in 47 relatives from 59 different families, confirming that *SHH* was the gene most frequently mutated in HPE. An HPE spectrum



## Genotype-phenotype correlations

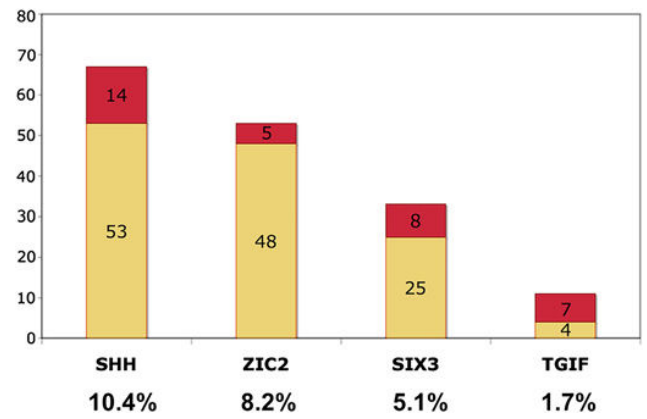
**Table 1** Clinical data for the entire series, probands with alterations to the four main holoprosencephaly (HPE) associated genes (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF*) and with abnormal array comparative genomic hybridisation (CGH) data

HPE type	Face defect category										Extracraniofacial defects								
	Probands	Alobar	Semilobar	Lobar	MIH	Microform	Cat I	Cat II	Cat III	Cat IV	Associated brain malformations	Neural tube defect	% of probands	Heart	Visceral	Genital	Renal/urinary	Skeletal	Extremities
Total cohort	645	25%+1% atelencephaly	28%	19%	2%	25%	27%	19%	14%	40%	13%	4%	27%	19%	23%	11%	11%	8%	27%
<i>SHH</i>	67 (10.4%)	28%†	34%†	4%	0%†	34%†	38%†	22%†	26%†	14%†	9%	5%	24%	8%	24%	8%	28%†	16%	16%
<i>ZIC2</i>	53 (8.2%)	30%†	45%†	15%†	8%†	2%†	8%†	8%†	3%†	81%†	21% (15% neuronal migration)	9%	40%	14%	20%	17%	14%†	9%	26%
<i>SIX3</i>	33 (5.1%)	52%†+7% atelencephaly	15%†	11%†	0%†	15%†	45%†	24%†	10%†	21%†	7%	7%	24%	0%	22%	11%	0%†	22%	45%
<i>TGIF</i>	11 (1.7%)	43%†	14%†	29%†	0%†	14%†	55%†	27%†	0%†	18%†	9%	9%	27%	25%	50%	12%	0%†	0%	13%
CGH	56* (22%)	19%	37%	17%	0%	27%	8%	38%	8%	46%	11%	4%	26%	19%	22%	17%	11%	11%	20%

Percentages are expressed according to the data recorded (500 probands for HPE type and face defect category) and correspond to the ratio of each feature reported in the probands of the group concerned, with the exception of detailed extracraniofacial defects, which are expressed as a proportion of the total of extracraniofacial defects in each group.

\*Array CGH was performed on 260 probands. In addition to the HPE types mentioned in the table, septo-optic dysplasia and atelencephaly were reported in 1.4% and in 0.6%, respectively, of the cases in this series. Statistical analyses were carried out by comparing the *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, and *TGIF* subgroups and probands without modifications to any of the four genes.

†Significant differences were found for of the distribution of HPE type ( $p=3.8 \times 10^{-10}$ ), face defect category ( $p=9 \times 10^{-10}$ ), and renal/urinary defects ( $p=0.03$ ) in Fisher's exact tests. MIH, middle interhemispheric variants.

**Figure 1** Schematic representation of point mutations and deletions in the *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF* genes. Point mutations are represented in yellow and gene deletions are shown in red, with the corresponding number of probands. The percentage of probands (/645 probands) with a particular point mutation or a deletion is noted below each gene.

disorder was described in 13 relatives: one lobar case and 11 microforms (one non-documented). We found that 23% of the parents with *SHH* mutations presented a microform. Brain MRI revealed the presence of midline defects, such as an abnormal corpus callosum in the mother of one proband.

The sex ratio (female:male) was more balanced in *SHH* probands than in the series as a whole (0.9:1). The four categories of facial features were evenly distributed and microforms were, above all, associated with pyriform sinus and choanal stenosis (74% category 3). The proportion of coloboma cases was relatively high (15% of the series as a whole). Associated brain malformations mostly concerned posterior fossa abnormalities (7%). Extracraniofacial abnormalities included five cases of multiple congenital malformations, mostly visceral and renal/urinary defects. Sacral agenesis was also observed (associated in one case with costovertebral abnormalities) in several probands with large 7q36 deletions, including the *HLXB9* gene in particular (Currarino syndrome, MIM 176450).

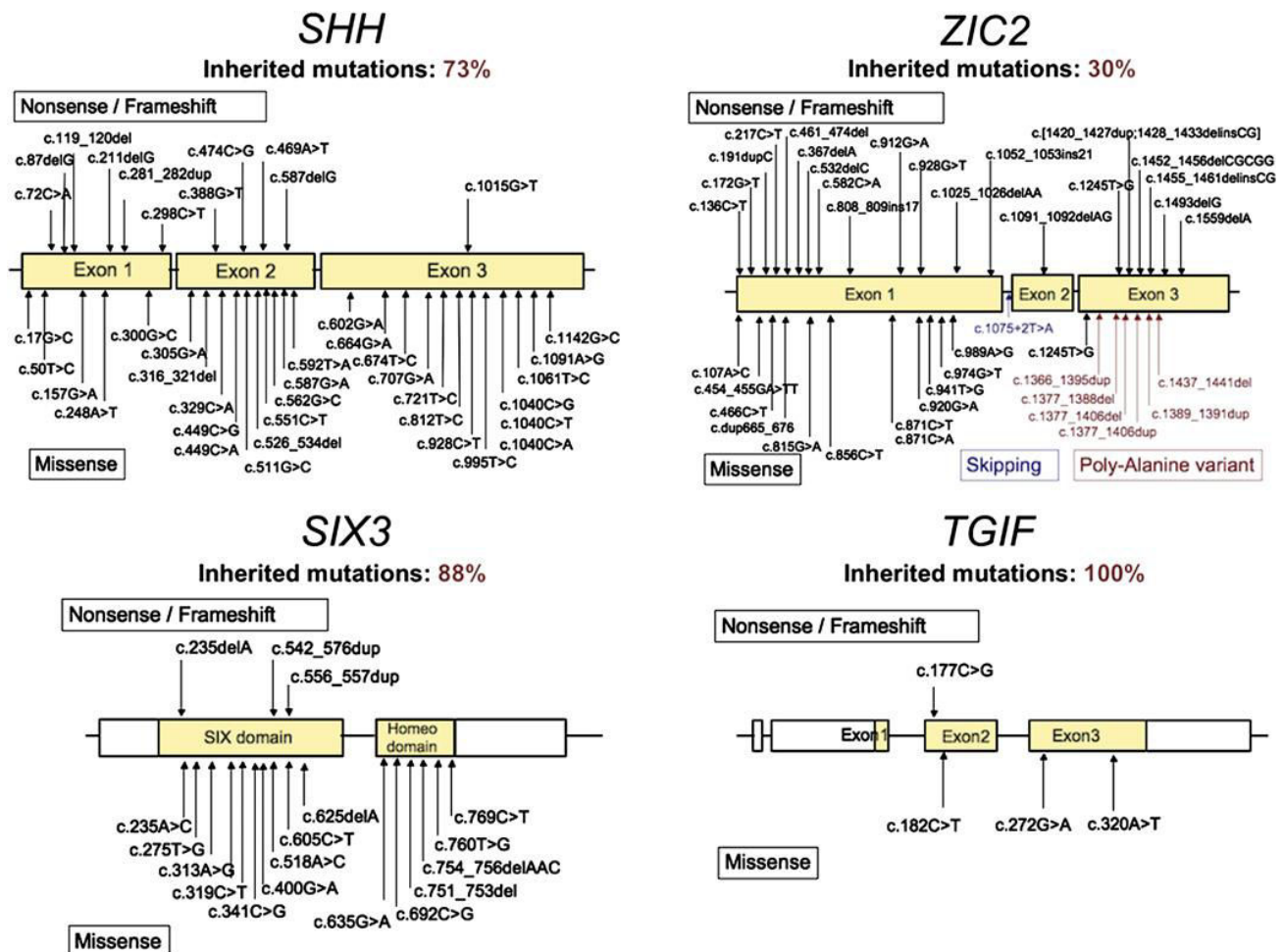
**ZIC2**

*ZIC2* mutations were identified in 53 probands (8.2%) and 14 relatives. Microforms were reported in 36% of the parents with *ZIC2* mutations (4/11). The sex ratio (female:male) of 1.8:1 was consistent with a notable predominance of female subjects. HPE tended to be alobar or semilobar (72%). Furthermore, only two HPE related gene mutations were found in the 11 MIH cases in the total series, and both were *ZIC2* mutations.

The probands of the *ZIC2* group tended to have a combination of severe HPE with few facial features. Other specific findings were obtained for associated brain malformations, neural tube defects, and extracraniofacial malformations. The neuronal migration abnormalities (15%) detected were lissencephaly, polymicrogyria or pachygyria in four cases and heterotopia in white matter and/or in the cerebellum in another four cases. One fetus with lobar HPE had heterotopia and gyration abnormalities among other multiple congenital anomalies (rachischisis, cleft palate, visceral and extremity abnormalities). Neural tube defects were reported in five cases, including two cases of rachischisis: one combined with pseudoanencephaly and the other with anencephaly with facial clefting in a monozygous twin previously reported by Lazaro *et al.*<sup>9</sup> Both the cases of rachischisis in the overall series were found to have a *ZIC2* mutation. A high proportion of extracraniofacial abnormalities,







**Figure 2** Point mutations and inheritance of the *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, and *TGIF* genes. *SHH*: 41 different variations (73% missense, 27% nonsense or frameshift mutations); 73% inherited point mutations, predominantly of maternal (67%) rather than paternal (33%) origin. *ZIC2*: 44 different point mutations (29% missense, 55% nonsense or frameshift, 13% polyalanine tract, 3% splice alterations) with 70% occurring 'de novo' and two cases of probable germline mosaicism. *SIX3*: 18 different point mutations (78% missense, 22% nonsense or frameshift). *TGIF*: three missense mutations and one nonsense mutation. The pathogenicity of these alterations has been confirmed by predictive or functional studies.<sup>6 18 28–30</sup> GenBank accession numbers are NM\_00193.2 for *SHH* cDNA, NM\_007129.2 for *ZIC2* cDNA, NM\_005413.2 for *SIX3* cDNA, and NM\_003244.2 for *TGIF* cDNA.

mostly visceral abnormalities and abnormalities of the extremities, was associated with *ZIC2* mutations, including eight cases of multiple congenital malformations.

### SIX3

*SIX3* mutations were identified in 33 probands (5.1%) and 21 relatives. Microforms were found in three of the 17 parents. The sex ratio was in favour of a higher proportion of females. Very severe HPE, such as alobar HPE and atelencephaly, was described in 57% of cases. In one family, a missense mutation was found in a mother and her three fetuses with alobar HPE or atelencephaly.<sup>32 33</sup>

Probands with *SIX3* mutations mostly had severe facial features (category 1 or 2). Severe ophthalmological defects were often reported with *SIX3* mutations, as shown by a high percentage of category 1 abnormalities, and coloboma was found in two category 2 cases. Associated brain malformations were mentioned in only 6% of the probands with *SIX3* mutations, including one case of gyrus abnormality associated with heterotopia. Finally, only one case of multiple congenital malformations was reported, with no heart defects among the extracraniofacial features.

### TGIF

*TGIF* mutation was found in only 11 probands (1.7%) and eight relatives, including five parents with no reported HPE spectrum disorder. The sex ratio (1.3:1) was similar to that for the series as a whole. HPE tended to be of the alobar type, and facial defects were mostly severe: 82% of probands were classified as category 1 or 2. Associated brain malformation was reported in only one case of ectopic posterior pituitary gland. The extracraniofacial abnormalities were not specific (one case of multiple congenital malformations).

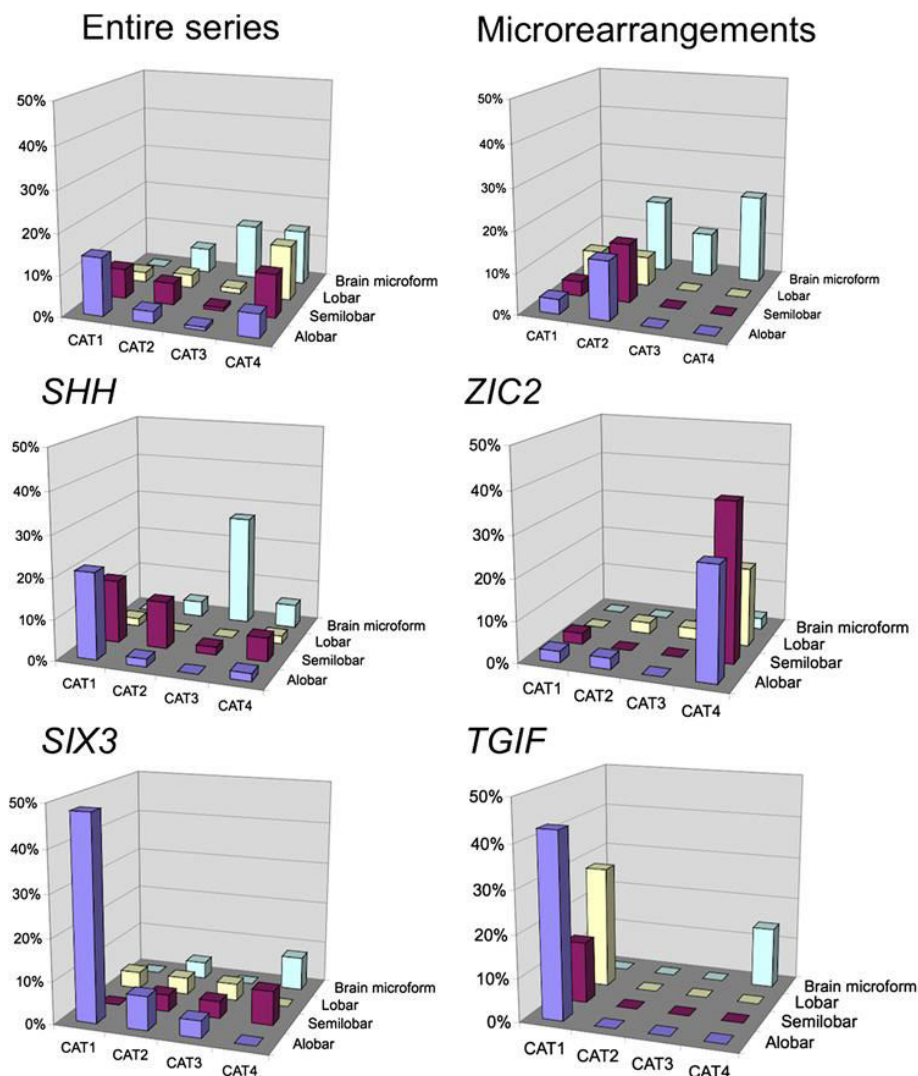
### GLI2

Evidence for a minor role of *GLI2* was provided by the very low rate of mutations in this gene in HPE spectrum disorders. Indeed, *GLI2* mutation was found in only three probands (1.4% in selected patients) and three relatives. Two of these missense mutations may be involved in the disorder, but the pathogenicity of the third mutation could not be established with certainty. Samples from the parents were available for one patient, and analysis of these samples showed the mutation to be inherited. The brain malformations observed were lobar,



## Genotype-phenotype correlations

**Figure 3** Face defect category, as a function of holoprosencephaly (HPE) type, for the series as a whole, probands with abnormal array comparative genomic hybridisation findings, and with altered *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, and *TGIF* genes. The results presented are based on the data for 369 informative probands. Considering a positive gradient of severity from category 1 to category 4 in Spearman's rank correlation test, we found a significant correlation between the severity of HPE type and facial features for the entire series ( $p < 0.001$ ) and for the *SHH* ( $p < 0.001$ ), *SIX3* ( $p < 0.001$ ), and *TGIF* ( $p < 0.001$ ) subgroups, but not for the *ZIC2* subgroup ( $p = 0.5$ ).



semi-lobar and alobar HPE with facial abnormalities of category 2 or 4 (one undocumented case).

Interestingly, one fetus presented the combination of a *GLI2* missense mutation, inherited from an asymptomatic mother, with a *de novo* 13q deletion including the *ZIC2* gene. The proband had alobar HPE with complex heart malformations, bilobulated lung, gallbladder agenesis, hypospadias, no thumb or first metacarpal, and unguinal hypoplasia.

### Microrearrangements

Array CGH analysis identified rearrangements in 22% (56 cases) of the 260 probands. These rearrangements had arisen *de novo* in 14% and were inherited in 8%. They consisted of 45 isolated microdeletions (80%), including one ring chromosome and 19 microduplications (20%), with double rearrangements in eight cases. The rearrangement included one of the main HPE genes (*SHH*, *ZIC2* or *TGIF*) in eight probands. Recurrent rearrangements, involving *MACROD2* (20p) in seven cases and *PATCHD3* (10p) in six cases, were found to occur at a higher rate than in the general population.

The 56 probands with rearrangements included 59% fetuses and 41% liveborn children, with a balanced sex ratio (1.04:1). HPE types and facial features were evenly distributed, but with a higher frequency of semilobar forms or microforms and of

category 2 (38%) or 4 (46%) than in the global series (table 1, figure 3). Extracraniofacial malformations included four multiple congenital abnormalities with no pronounced association.

Finally, we report seven cases in which a deletion or duplication was associated with a single mutation in an HPE related gene (*SHH*, *ZIC2*, and *SIX3*) (table 2). The three fetuses and four children concerned had either isolated or syndromic HPE, with very various phenotypes in terms of HPE type and facial features.

### Statistical analyses

We carried out statistical analyses to identify significant phenotype-genotype correlations. The population of probands with rearrangements was highly heterogeneous. We therefore decided to focus on probands with mutations in *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, and *TGIF*, comparing these probands with those with no mutation in these genes.

### Proportions of fetuses and children

As expected, the fetuses were significantly more likely to have severe types of HPE, whereas the liveborn children tended to have microforms ( $p < 0.0001$ ). However, although there were more fetuses with HPE associated gene deletions or array CGH rearrangements, these differences were not statistically significant ( $p = 0.09$  and  $p = 0.2$ , respectively).



**Table 2** Clinical and molecular data for the eight probands with double mutations: rearrangement detected on array comparative genomic hybridisation and holoprosencephaly (HPE) gene mutation

Proband no.	Fetus (F)/child (C)	Sex	Form	HPE type	Facial defects category	Rearrangement		
						Type (inheritance)	Significant gene	Mutation (inheritance)
1	F	M	Syndromic	Semilobar	2	Dup 3p14.3 (paternal)		<i>SHH</i> c.388G>T (paternal)
2	F	M	Isolated	Lobar	2	Del 10p12.1 (paternal)	<i>PATCHD3</i>	<i>SHH</i> c.305G>A (paternal)
3	C	M	Isolated	Microform	2	Del 10p12.1	<i>PATCHD3</i>	<i>SHH</i> c.1040C>G (de novo)
4	C	F	Isolated	Microform	3	Del 2q13	<i>NPHP1</i>	<i>SHH</i> c.707G>A (maternal)
5	C	F	Isolated	Semilobar	4	Del 21q21.1 (de novo)		<i>ZIC2</i> c.1025_1026delAA (de novo)
6	C	F	Isolated	Semilobar	3	Del 20p12.1	<i>MACROD2</i>	<i>SIX3</i> c.760T>G (maternal)
7	F	M	Syndromic	Alobar	4	Del 13q31.1 q34 (de novo)	<i>ZIC2</i>	<i>GLI2</i> c.2717C>G (maternal)

The inheritance of rearrangements and mutations is reported in all cases in which molecular analysis of the parents of the proband was possible. The GenBank accession numbers are NM\_00193.2 for *SHH* cDNA, NM\_007129.2 for *ZIC2* cDNA, NM\_005413.2 for *SIX3* cDNA, NM\_003244.2 for *TGIF* cDNA, and NM\_005270.4 for *GLI2* cDNA.

### HPE types

Studies of the distribution of HPE types between the five subgroups provided evidence for a highly significant correlation ( $p < 0.0001$ ). Alobar HPE tended to be associated with *SIX3*, semilobar HPE with *ZIC2*, and microform with *SHH* mutations. Lobar HPE did not seem to be particularly associated with any specific HPE gene in these analyses.

### Facial defect categories

Facial features were studied as a function of the severity of the brain malformation. The findings for the *ZIC2* subgroup differed significantly from those for the other genes, as no correlation was found between the HPE severity type and the severity of facial defects category (figure 3).

We also analysed the facial defects categories independently. A significant difference in the distributions of categories 1 and 4 was found, with a low frequency of probands with *ZIC2* mutations in category 1 and a very high frequency of such probands in category 4. A significant correlation was also found between *SHH* microforms and category 3 ( $p = 0.01$ ).

### Brain associated malformations, neural tube defects

No significant overall correlation was found between associated brain malformations or neural tube defects and molecular data, although these defects did appear to be more frequent in individuals with *ZIC2* and *TGIF* mutations ( $p = 0.18$ ).

### Extracraniofacial defects

A correlation between renal/urinary malformations and certain mutations ( $p = 0.03$ ) was found. Renal/urinary defects were significantly more frequent in probands with *SHH* and *ZIC2* than in the probands of other subgroups. No significant difference was found in the distribution of the other extracraniofacial defects.

## DISCUSSION

HPE is a very complex disorder in terms of both clinical variability and genetic signalling pathways. We report here the clinical and molecular data for the largest ever European series, encompassing 645 probands and 699 relatives, with a higher proportion of fetuses (51%) than in previous series.<sup>19–21</sup> The large number of patients included in this series resulted in sufficient power for the detection of statistically significant phenotype–genotype correlations.

In the series as a whole, the sex ratio (female:male) was 1.2:1, in favour of a slight predominance of female subjects. Female subjects were in the minority among probands with *SHH* mutations, for which the sex ratio was 0.9:1, whereas a high predominance of female subjects (sex ratio of 1.8:1) was observed among those with *ZIC2* and *SIX3* mutations. The

*SIX3* sex ratio was consistent with that reported by Lacbawan.<sup>19</sup> This suggests that mutations in *ZIC2* or *SIX3* may be embryonic-lethal in males.

Screening for mutations in the major genes *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, and *TGIF* and the minor gene *GLI2* in this large series gave an estimated global mutation rate of 25.8%, with specific mutation rates of 10.4% (*SHH*), 8.2% (*ZIC2*), 5.1% (*SIX3*), 1.7% (*TGIF*), and 0.4% (*GLI2*). These results are consistent with our previous findings for smaller series.<sup>1 9 18 34</sup> Point mutations in *SHH*, *SIX3*, and *TGIF* were highly heritable, with heritabilities of 73%, 88%, and 100%, respectively, whereas most *ZIC2* mutations were *de novo* (70% of cases).<sup>6 20</sup> This may be due to a higher penetrance and the high frequency of severe HPE in individuals with *ZIC2* mutations, resulting in the identification of a larger number of sporadic cases. By contrast to what was reported by Lacbawan *et al*,<sup>19</sup> no predominance of maternal inheritance was observed for *SIX3* mutations in our series, whereas such a pattern of inheritance was observed for *SHH* mutations.

Overall, more severe types of HPE (atelencephaly, alobar or semilobar HPE) were reported in individuals with *SIX3* (74%) and *ZIC2* (75%) mutations than in individuals with *SHH* (62%) and *TGIF* (57%) mutations. Moreover, atelencephaly/aprosencephaly was associated exclusively with *SIX3* mutations. Pasquier *et al* reported this particular association and other teams have reported a high proportion of severe cases in subjects with *SIX3* mutations, including ophthalmological defects in particular.<sup>19 20 35</sup> Thus, alobar HPE tends to be associated with *SIX3*, semilobar HPE with *ZIC2*, and microforms with *SHH*, consistent with the findings of Solomon *et al*.<sup>21</sup> Furthermore, our findings confirmed the specific association of MIH or synte-lencephaly with *ZIC2*, as the mutations identified in four of the 11 cases of MIH in the series concerned the *ZIC2* gene.<sup>6</sup>

This study highlights the considerable intra- and interfamilial phenotypic variability in *SHH* probands.<sup>35</sup> We report here, for the first time, the high prevalence of brain microforms (74%) in probands with *SHH* mutations presenting, essentially, pyriform sinus and choanal stenosis (category 3). Associations with midline defects, coloboma, and sacral agenesis (systematically linked to a large 7q36 deletion) were also observed. By contrast, facial morphology in subjects with *ZIC2* mutations was generally characterised by moderate facial dysmorphia or even a normal face (category 4), associated with alobar or semilobar HPE. This feature seems to be specific to *ZIC2* mutations and has also been reported by other teams.<sup>6 20</sup> Solomon *et al*<sup>6</sup> mentioned a particular facial phenotype found in some of the cases in our series, with a high proportion of abnormal noses (nine cases), usually short, sometimes flat or large, and ear dysplasia (four cases). Furthermore, statistical analyses revealed a lack of correlation between the severity of HPE brain malformation and facial features in probands with *ZIC2*



## Genotype-phenotype correlations

mutations, but not in those with *SHH*, *SIX3*, and *TGIF* mutations.

We also considered other associated brain malformations, focusing in particular on RES, which was associated with HPE in six of the 645 HPE probands. This extremely rare malformation is the histological equivalent of HPE for the cerebellum. The signalling pathways involved in this disease have yet to be identified, but we suggest that there may be interactions with HPE signalling pathways, as a *ZIC2* mutation has been reported in two siblings with partial RES and HPE.<sup>36 37</sup> *SHH* and *SIX3* mutations have recently been associated with schizencephaly, but only three cases of schizencephaly were reported in our series, with no mutation identified in the probands concerned.<sup>31</sup>

We also identified two other previously unknown associations with *ZIC2* mutations: rachischisis, and neuronal migration abnormalities. Neural tube defects are frequently reported in HPE, but rachischisis seems to be more specifically associated with *ZIC2* mutation, as such mutations were found in the only two cases of rachischisis in our series. In addition, neuronal migration abnormalities have already been described, but without phenotype-genotype correlations.<sup>2 38 39</sup> We focus here on neuronal migration abnormalities, such as gyral pattern abnormalities and heterotopia, which were almost exclusively restricted to probands with *ZIC2* mutations (eight cases). Hahn *et al* found subcortical heterotopic grey matter or cortical dysplasia in two thirds of MIH cases.<sup>38</sup> In our series, neuronal migration abnormalities were observed in two of 11 cases of MIH, but no *ZIC2* mutation was identified in these cases.

We report here, for the first time, the frequency and variety of extracraniofacial malformations in a large series, together with the corresponding molecular data. Molecular defects were more frequent in *ZIC2* than in the other three main genes. We found a higher frequency of extracraniofacial defects than reported by Solomon, probably because his study focused on children, rather than fetuses.<sup>6</sup> Renal/urinary defects were significantly associated with *SHH* or *ZIC2* mutations and no such defects were found in probands with *SIX3* or *TGIF* mutations. *SIX3* was the only gene for which no heart defect was reported.

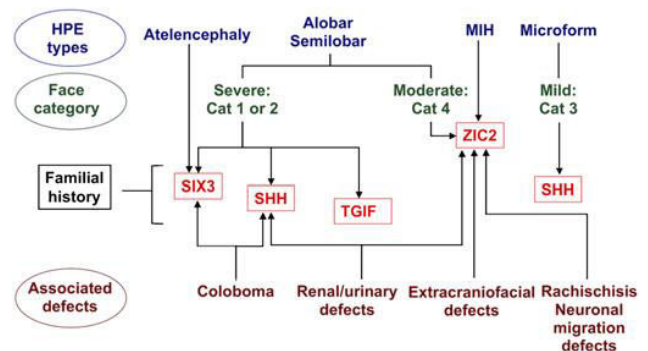
The data for *TGIF* and, above all, for *GLI2* revealed no significant phenotype-genotype correlations, but alobar HPE with severe facial features (category 1) seemed to be more frequent in probands with *TGIF* mutations, although phenotypic variability was high. We suggest that phenotype-genotype correlations for *TGIF* and *GLI2* should be analysed in larger series. Another disease spectrum, characterised by anterior pituitary insufficiency and polydactyly, seems to be more specifically linked to *GLI2* mutations<sup>25 40</sup> (C Dubourg, unpublished data).

Several signalling pathways are known to be involved in HPE, and the various mechanisms underlying HPE may account for the observed phenotypic variability. Indeed, *SIX3* is involved in eye development, consistent with the eye defects observed in probands with *SIX3* mutations, and in ventral forebrain development, through regulation of the *SHH* signalling pathway. Furthermore, *ZIC2* significantly differs from the other HPE related genes, as shown in phenotype-genotype correlations, and its product also acts by different mechanisms. Indeed, *ZIC2* is known to act both at the early stage, in upstream *SHH* signalling during mid-gastrulation, and at later stages, in the development of the dorsal telencephalon, potentially accounting for the specific occurrence of MIH and neural tube defects in *ZIC2* probands.

Array CGH studies in this series confirmed the high frequency of rearrangements reported in a preliminary study.<sup>26</sup>

Indeed, rearrangements were identified in 22% of the 260 patients studied (14% *de novo* and 8% inherited). The proportion of fetuses and the severity of HPE phenotype (extracraniofacial malformations included) were not significantly higher in probands with rearrangements than in the series as a whole, as might have been expected. The higher frequency of category 2 and 4 probands may reflect more common features, such as cleft lip or palate (category 2) or mild non-specific features (category 4). This population seemed to be heterogeneous and an understanding of the molecular basis of this heterogeneity should facilitate the definition of more homogeneous subgroups. Indeed, the high frequency of rearrangements was consistent with there being a large number of loci corresponding to new candidate genes. The recurrent regions included the *MACROD2* and *PATCHD3* loci, in particular. Furthermore, recurrent deletion 6qter led to the identification of *DLL1* as a new HPE associated gene and of *NOTCH* as a new signalling pathway involved in HPE.<sup>41</sup>

It has already been suggested that HPE involves a multiple-hit process.<sup>26 42</sup> Animal models have provided evidence of digenism, by implicating either the same or two different signalling pathways. Genetic background also played an important role in determining the severity of the phenotype.<sup>43–45</sup> In humans, low penetrance or variable levels of expression in HPE multiplex families and reports of patients with two different mutations support this hypothesis.<sup>16 24 46 47</sup> Furthermore, mutations in the *GAS1* gene have been recently identified in human HPE, which highlights the key role of modifier genes in clinical variability.<sup>48 49</sup> Our series included up to 15 cases of double mutation: eight cases of double rearrangements and seven cases of rearrangement associated with a mutation in an HPE related gene (six rearrangements associated with a mutation in *SHH*, *ZIC2* or *SIX3* and one *ZIC2*



**Figure 4** Algorithm for molecular analysis in holoprosencephaly (HPE). In cases of familial HPE, analyses of *SHH*, *SIX3* or *TGIF* should be given priority over *ZIC2* analysis. Very severe forms of HPE, such as alobar and semilobar HPE, should lead to analyses of the *SIX3* (particularly in cases of atelencephaly/aprosencephaly) and *ZIC2* genes, but facial features may provide useful information. Indeed, probands with category 1 or 2 facial features associated with severe HPE, such as alobar or semilobar HPE, are more likely to display mutations in *SIX3* or *SHH*. By contrast, probands with severe brain malformations and category 4 facial features are likely to have mutations in *ZIC2*. No particular association with lobar HPE was found. Thus, if associated brain malformations are described, particularly in cases of neuronal migration abnormalities, and in cases of neuronal tube defects (rachischisis in particular), *ZIC2* gene analysis should be performed as a matter of priority. Moreover, *ZIC2* mutations are the principal cause of extracraniofacial malformations. Renal/urinary malformations are found preferentially in patients with *ZIC2* or *SHH* mutations and coloboma tends to be found in patients with *SHH* or *SIX3* mutations.





deletion associated with a *GLI2* mutation). These findings provide solid support for the multiple-hit hypothesis in HPE.

In conclusion, even if the identification of an HPE gene mutation cannot provide a precise prognosis, the new phenotype-genotype correlations identified here should facilitate the definition of a better molecular analysis strategy. We propose a new algorithm based on these correlations (figure 4). Evidence of double mutations in HPE probands provides support for the HPE multiple-hit hypothesis underlying the complexity of genetic counselling and research on this disorder. The known clinical variability of HPE also suggests an overlap between environmental and genetic mechanisms. A combination of clinical and functional studies should help to improve our understanding of the complex interactions between the various signalling pathways involved in HPE and brain development.

**Acknowledgements** We would like to thank the families for their participation in the study and the geneticists, pathologists (SOFFOET), obstetricians and paediatricians all over Europe who referred them. We particularly thank all members of the Molecular Genetics Laboratory (CHU, Rennes) and of the Department of Genetics and Development (UMR6061 CNRS, Université Rennes1) for their help and advice.

**Funding** This study was supported by GIS Maladies Rares, grant number GISMR0701.

**Competing interests** None.

**Ethics approval** This study was approved by the Ethics Committee (CHU of Rennes): CCPPRB.

**Contributors** SM did most of the work on phenotype-genotype correlations and wrote the article. CD performed the molecular analyses. NG set up the secure online database. BCG worked on statistical studies. CB, IG, LR, LR and SJ contributed to array CGH analyses. MB contributed to the updating of the database. LP and CQ are genetic physicians who contributed to the recruitment of patients. PL is our referent in fetal pathology. V Dupé and V David are in the charge of the team research and reviewed the article. SO directed this work.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

## REFERENCES

- Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V. Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare Dis* 2007;**2**:8.
- Marcorelles P, Laquerriere A. Neuropathology of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;**154C**:109–19.
- Matsunaga E, Shiota K. Holoprosencephaly in human embryos: epidemiologic studies of 150 cases. *Teratology* 1977;**16**:261–72.
- Orioli IM, Castilla EE. Epidemiology of holoprosencephaly: prevalence and risk factors. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;**154C**:13–21.
- Demyer W, Zeman W, Palmer CG. The face predicts the brain: diagnostic significance of median facial anomalies for holoprosencephaly (arhinencephaly). *Pediatrics* 1964;**34**:256–63.
- Solomon BD, Lachawan F, Mercier S, Clegg NJ, Delgado MR, Rosenbaum K, Dubourg C, David V, Olney AH, Wehner LE, Hehr U, Bale S, Paulussen A, Smeets HJ, Hardisty E, Tylki-Szymanska A, Pronicka E, Clemens M, McPherson E, Hennekam RC, Hahn J, Stashinko E, Levey E, Wiczorek D, Roeder E, Schell-Apacic CC, Booth CW, Thomas RL, Kenwright S, Cummings DA, Bous SM, Keaton A, Balog JZ, Hadley D, Zhou N, Long R, Velez JI, Pineda-Alvarez DE, Odent S, Roessler E, Muenke M. Mutations in *ZIC2* in human holoprosencephaly: description of a novel *ZIC2* specific phenotype and comprehensive analysis of 157 individuals. *J Med Genet* 2009;**47**:513–24.
- Hahn JS, Barnes PD, Clegg NJ, Stashinko EE. Septopreoptic holoprosencephaly: a mild subtype associated with midline craniofacial anomalies. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010;**31**:1596–601.
- Barkovich AJ, Quint DJ. Middle interhemispheric fusion: an unusual variant of holoprosencephaly. *AJNR Am J Neuroradiol* 1993;**14**:431–40.
- Lazaro L, Dubourg C, Pasquier L, Le Duff F, Blayau M, Durou MR, de la Pintiére AT, Aguilera C, David V, Odent S. Phenotypic and molecular variability of the holoprosencephalic spectrum. *Am J Med Genet A* 2004;**129A**:21–4.
- Simon EM, Hevner RF, Pinter JD, Clegg NJ, Delgado M, Kinsman SL, Hahn JS, Barkovich AJ. The middle interhemispheric variant of holoprosencephaly. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002;**23**:151–6.
- Bendavid C, Dupe V, Rochard L, Gicquel I, Dubourg C, David V. Holoprosencephaly: an update on cytogenetic abnormalities. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;**154C**:86–92.
- Pineda-Alvarez DE, Dubourg C, David V, Roessler E, Muenke M. Current recommendations for the molecular evaluation of newly diagnosed holoprosencephaly patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;**154C**:93–101.
- Roessler E, Muenke M. The molecular genetics of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;**154C**:52–61.
- Johnson CY, Rasmussen SA. Non-genetic risk factors for holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;**154C**:73–85.
- Miller EA, Rasmussen SA, Siega-Riz AM, Frias JL, Honein MA. Risk factors for non-syndromic holoprosencephaly in the National Birth Defects Prevention Study. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;**154C**:62–72.
- Ming JE, Muenke M. Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet* 2002;**71**:1017–32.
- Mercier S, Dubourg C, Bellecig M, Pasquier L, Loget P, Lucas J, Bendavid C, Odent S. Genetic counseling and “molecular” prenatal diagnosis of holoprosencephaly (HPE). *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;**154C**:191–6.
- Dubourg C, Lazaro L, Pasquier L, Bendavid C, Blayau M, Le Duff F, Durou MR, Odent S, David V. Molecular screening of *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, and *TGF* genes in patients with features of holoprosencephaly spectrum: mutation review and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 2004;**24**:43–51.
- Lachawan F, Solomon BD, Roessler E, El-Jaick K, Domene S, Velez JI, Zhou N, Hadley D, Balog JZ, Long R, Fryer A, Smith W, Omar S, McLean SD, Clarkson K, Lichty A, Clegg NJ, Delgado MR, Levey E, Stashinko E, Potocki L, Vanallen MI, Clayton-Smith J, Donnai D, Bianchi DW, Juliusson PB, Njolstad PR, Brunner HG, Carey JC, Hehr U, Musebeck J, Wieacker PF, Postra A, Hennekam RC, van den Boogaard MJ, van Haeringen A, Paulussen A, Herbergs J, Schrandt-Stumpel CT, Janecke AR, Chitayat D, Hahn J, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Dobyns WB, Muenke M. Clinical spectrum of *SIX3*-associated mutations in holoprosencephaly: correlation between genotype, phenotype and function. *J Med Genet* 2009;**46**:389–98.
- Paulussen AD, Schrandt-Stumpel CT, Tserpelis DC, Spee MK, Stegmann AP, Mancini GM, Brooks AS, Collee M, Maat-Kievit A, Simon ME, van Bever Y, Stolte-Dijkstra I, Kerstjens-Frederikse WS, Herkert JC, van Essen AJ, Lichtenbelt KD, van Haeringen A, Kwee ML, Lachmeijer AM, Tan-Sindhunata GM, van Maarle MC, Arens YH, Smeets EE, de Die-Smulders CE, Engelen JJ, Smeets HJ, Herbergs J. The unfolding clinical spectrum of holoprosencephaly due to mutations in *SHH*, *ZIC2*, *SIX3* and *TGF* genes. *Eur J Hum Genet* 2010;**18**:999–1005.
- Solomon BD, Mercier S, Velez JI, Pineda-Alvarez DE, Wyllie A, Zhou N, Dubourg C, David V, Odent S, Roessler E, Muenke M. Analysis of genotype-phenotype correlations in human holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;**154C**:133–41.
- Odent S, Le Marec B, Munnich A, Le Merrer M, Bonaiti-Pellie C. Segregation analysis in nonsyndromic holoprosencephaly. *Am J Med Genet* 1998;**77**:139–43.
- Bertolacini C, Ribeiro-Bicudo L, Petrin A, Richieri-Costa A, Murray J. Clinical findings in patients with *GLI2* mutations - phenotypic variability. *Clin Genet*. Published Online First: 6 December 2010. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01606.x.
- Rahimov F, Ribeiro LA, de Miranda E, Richieri-Costa A, Murray JC. *GLI2* mutations in four Brazilian patients: how wide is the phenotypic spectrum? *Am J Med Genet A* 2006;**140**:2571–6.
- Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillissen-Kaesbach G, Roeder ER, Ming JE, Ruiz i Altaba A, Muenke M. Loss-of-function mutations in the human *GLI2* gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:13424–9.
- Bendavid C, Rochard L, Dubourg C, Seguin J, Gicquel I, Pasquier L, Vigneron J, Laquerriere A, Marcorelles P, Jeanne-Pasquier C, Rouleau C, Jaillard S, Mosser J, Odent S, David V. Array-CGH analysis indicates a high prevalence of genomic rearrangements in holoprosencephaly: an updated map of candidate loci. *Hum Mutat* 2009;**30**:1175–82.
- R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2009. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>.
- Roessler E, El-Jaick KB, Dubourg C, Velez JI, Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Lachawan F, Zhou N, Ouspenskaia M, Paulussen A, Smeets HJ, Hehr U, Bendavid C, Bale S, Odent S, David V, Muenke M. The mutational spectrum of holoprosencephaly-associated changes within the *SHH* gene in humans predicts loss-of-function through either key structural alterations of the ligand or its altered synthesis. *Hum Mutat* 2009;**30**:E921–35.
- Roessler E, Lachawan F, Dubourg C, Paulussen A, Herbergs J, Hehr U, Bendavid C, Zhou N, Ouspenskaia M, Bale S, Odent S, David V, Muenke M. The full spectrum of holoprosencephaly-associated mutations within the *ZIC2* gene in humans predicts loss-of-function as the predominant disease mechanism. *Hum Mutat* 2009;**30**:E541–54.
- Traiffort E, Dubourg C, Faure H, Rognan D, Odent S, Durou MR, David V, Ruat M. Functional characterization of sonic hedgehog mutations associated with holoprosencephaly. *J Biol Chem* 2004;**279**:42889–97.
- Hehr U, Pineda-Alvarez DE, Uyanik G, Hu P, Zhou N, Hehr A, Schell-Apacic C, Altus C, Daumer-Haas C, Meiner A, Steuernagel P, Roessler E, Winkler J, Muenke M. Heterozygous mutations in *SIX3* and *SHH* are associated with schizencephaly and further expand the clinical spectrum of holoprosencephaly. *Hum Genet* 2010;**127**:555–61.
- Pasquier L, Dubourg C, Blayau M, Lazaro L, Le Marec B, David V, Odent S. A new mutation in the six-domain of *SIX3* gene causes holoprosencephaly. *Eur J Hum Genet* 2000;**8**:797–800.



## Genotype-phenotype correlations

33. **Pasquier L**, Dubourg C, Gonzales M, Lazaro L, David V, Odent S, Encha-Razavi F. First occurrence of aprosencephaly/atelencephaly and holoprosencephaly in a family with a SIX3 gene mutation and phenotype/genotype correlation in our series of SIX3 mutations. *J Med Genet* 2005;**42**:e4.
34. **Dubourg C**, David V, Gropman A, Mercier S, Muenke M, Odent S, Pineda-Alvarez DE, Roessler E. Clinical utility gene card for: Holoprosencephaly. *Eur J Hum Genet* 2010;**19**:118–20.
35. **Hehr U**, Gross C, Diebold U, Wahl D, Beudt U, Heidemann P, Hehr A, Mueller D. Wide phenotypic variability in families with holoprosencephaly and a sonic hedgehog mutation. *Eur J Pediatr* 2004;**163**:347–52.
36. **Pasquier L**, Marcocelles P, Loget P, Pelluard F, Carles D, Perez MJ, Bendavid C, de La Rochebrochard C, Ferry M, David V, Odent S, Laquerriere A. Rhombencephalosynapsis and related anomalies: a neuropathological study of 40 fetal cases. *Acta Neuropathol* 2009;**117**:185–200.
37. **Ramocki MB**, Scaglia F, Stankiewicz P, Belmont JW, Jones JY, Clark GD. Recurrent partial rhombencephalosynapsis and holoprosencephaly in sibs with a mutation of ZIC2. *Am J Med Genet A* 2011;**155A**:1574–80.
38. **Hahn JS**, Plawner LL. Evaluation and management of children with holoprosencephaly. *Pediatr Neurol* 2004;**31**:79–88.
39. **Jellinger K**, Gross H, Kaltenback E, Grisold W. Holoprosencephaly and agenesis of the corpus callosum: frequency of associated malformations. *Acta Neuropathol* 1981;**55**:1–10.
40. **Franca MM**, Jorge AA, Carvalho LR, Costalonga EF, Vasques GA, Leite CC, Mendonca BB, Arnhold LJ. Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;**95**:E384–91.
41. **Dupé V**, Rochard L, Mercier S, Le Petillon Y, Gicquel I, Bendavid C, Bourrouillou G, Kini U, Thauvin-Robinet C, Bohan TP, Odent S, Dubourg C, David V. NOTCH, a new signaling pathway implicated in holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 2011;**20**:1122–31.
42. **Rosenfeld JA**, Ballif BC, Martin DM, Aylsworth AS, Bejjani BA, Torchia BS, Shaffer LG. Clinical characterization of individuals with deletions of genes in holoprosencephaly pathways by aCGH refines the phenotypic spectrum of HPE. *Hum Genet* 2010;**127**:421–40.
43. **Cole F**, Krauss RS. Microform holoprosencephaly in mice that lack the Ig superfamily member Cdon. *Curr Biol* 2003;**13**:411–15.
44. **Geng X**, Speirs C, Lagutin O, Inbal A, Liu W, Solnica-Krezel L, Jeong Y, Epstein DJ, Oliver G. Haploinsufficiency of Six3 fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly. *Dev Cell* 2008;**15**:236–47.
45. **Pei W**, Feldman B. Identification of common and unique modifiers of zebrafish midline bifurcation and cyclopia. *Dev Biol* 2009;**326**:201–11.
46. **Nanni L**, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, Die-Smulders C, Giannotti A, Imaizumi K, Jones KL, Campo MD, Martin RA, Meinecke P, Pierpont ME, Robin NH, Young ID, Roessler E, Muenke M. The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 1999;**8**:2479–88.
47. **Wannasilp N**, Solomon BD, Warren-Mora N, Clegg NJ, Delgado MR, Lacbawan F, Hu P, Winder TL, Roessler E, Muenke M. Holoprosencephaly in a family segregating novel variants in ZIC2 and GLI2. *Am J Med Genet A* 2011;**155A**:860–4.
48. **Ribeiro LA**, Quiezi RG, Nascimento A, Bertolacini CP, Richieri-Costa A. Holoprosencephaly and holoprosencephaly-like phenotype and GAS1 DNA sequence changes: Report of four Brazilian patients. *Am J Med Genet A* 2010;**152A**:1688–94.
49. **Pineda-Alvarez DE**, Roessler E, Hu P, Srivastava K, Solomon BD, Siple CE, Fan CM, Muenke M. Missense substitutions in the GAS1 protein present in holoprosencephaly patients reduce the affinity for its ligand, SHH. *Hum Genet*. Published Online First: 13 August 2011. doi:10.1002/ajmg.a.33466.

## Journal of Medical Genetics impact factor

**Journal of Medical Genetics** is delighted to announce that its latest impact factor has been published in the 2010 Journal Citation report (Thomson Reuters, 2011) as 7.037 — an increase from 5.751 last year, which reflects the high quality of the publication in the genetics field. If you would like to add to this quality, then submit your paper at [jmg.bmj.com](http://jmg.bmj.com).



### ◆ Article 3. L'INHIBITION DOSE-DÉPENDANTE DE NODAL ET SHH CONDUIT A UN PHÉNOTYPE DE TYPE HPE CHEZ L'EMBRYON DE POULET

*Disease Models and Mechanisms*

Mercier S, Gicquel I, Ratié L, Odent S, David V, Dupé V.

Au cours du développement du cerveau antérieur, de nombreuses voies de signalisation agissent via l'activité de plusieurs morphogènes. Nous avons émis l'hypothèse que la perturbation partielle cumulée de ces molécules peut conduire à l'apparition de l'HPE. Dans ce modèle, des modulations spatio-temporelles des acteurs de la mise en place du cerveau antérieur entraîneraient une dérégulation globale des processus de régionalisation et de spécification.

Dans le cadre du modèle multi-hit de l'Holoprosencéphalie, nous avons souhaité valider l'hypothèse selon laquelle une perturbation conjointe de deux voies de signalisation pouvait conduire à une malformation de type HPE. Plus précisément, nous avons couplé une inhibition partielle des deux voies majeures, Nodal et Shh, pour déterminer si cette double inhibition pouvait potentialiser la survenue et/ou la sévérité d'un phénotype HPE dans notre modèle.

J'ai donc participé à la mise en place des cultures roller selon la méthode décrite précédemment (cf : Article 1 et Figure 28) sur des embryons de poulet prélevés aux stades HH4 ainsi qu'à la mise au point de l'inhibition des voies Nodal et Shh.

Etant donné les multiples rôles de la voie Nodal au cours du développement, il s'avère qu'une inactivation majeure de la voie entraîne un effet drastique à un stade précoce du développement embryonnaire. Chez la souris Nodal<sup>-/-</sup> une létalité embryonnaire survient dès la gastrulation. Nous avons donc dû obtenir son inactivation partielle pour dépasser le stade de la gastrulation. L'inhibiteur pharmacologique SB-505124 a été utilisé dont l'efficacité d'inactivation est dépendante de sa concentration. Le SB-505124 inhibe la voie Nodal/Activine par inactivation des récepteurs TGF- $\beta$  de type I, ALK4, 5 et 7 (DaCosta Byfield et al., 2004) sans affecter les autres récepteurs ALK, nécessaires à la voie des BMP au cours de la régionalisation dorso-ventrale du système nerveux.

L'inhibition partielle de la voie Nodal a été obtenue dans d'autres modèles animaux comme le xénope et le poisson-zèbre, où elle conduit à un défaut de développement du



cerveau antérieur (Hagos and Dougan, 2007; Luxardi et al., 2010). Des doses graduelles d'inhibiteur SB-505124 (10 $\mu$ M à 75 $\mu$ M) ont été ajoutées au milieu de culture pendant la fenêtre d'action connue pour l'activité de Nodal dans l'induction du cerveau antérieur (HH4-HH6). Les variations du stade de traitement et de la concentration ont permis d'obtenir différents phénotypes et Sandra Mercier a établi un classement selon trois catégories (Catégorie1 à Catégorie3) basées sur la morphologie de la tête embryonnaire ainsi que sur l'expression de trois gènes, *Pax6* un marqueur des vésicules optiques, *Shh* et *Nkx2.1* deux marqueurs de la ligne médiane ventrale du cerveau.

Les embryons de la Cat3 présentent un défaut important de développement de l'extrémité céphalique avec une absence de formation des vésicules optiques et une diminution importante de l'expression de *Shh* et *Nkx2.1*. Au début de la gastrulation (HH4+), une période critique pour la survenue d'une HPE, nous avons observé un effet sévère de l'inhibition de la voie Nodal à des concentrations supérieures ou égales à 50 $\mu$ M (Cat3) alors qu'un traitement à des concentrations inférieures ne provoquait pas de phénotypes de Cat3. Nos résultats ont permis de déterminer la période critique d'action de Nodal pour le développement du cerveau antérieur avant HH5.

Pour la voie *Shh*, nous avons également utilisé un inhibiteur pharmacologique, la cycloamine, très bien caractérisée dans divers modèles animaux pour son activité inhibitrice (Cooper et al., 2003; Dunn et al., 1995; Lipinski et al., 2008; Welch et al., 2009). La cycloamine agit de façon dose-dépendante et est capable de se fixer directement sur le récepteur SMOOTHENED influant sur sa conformation (Chen et al., 2002a; Chen et al., 2002b). Précédemment, l'inhibition graduelle par la cycloamine a montré une sévérité croissante du phénotype HPE dans les modèles d'embryons de souris et de poulet (Cooper et al., 1998; Cooper et al., 2003; Cordero et al., 2004; Lipinski et al., 2008). Il s'avère, comme pour la voie Nodal, que la sévérité et la survenue d'un phénotype HPE sont dépendantes du stade de traitement par l'inhibiteur (Cordero et al., 2004; Welch et al., 2009).

Les embryons sont traités à partir de HH4 avec des concentrations croissantes de cycloamine (0,006 $\mu$ M à 2,5 $\mu$ M). Une fusion progressive des vésicules optiques est observée jusqu'à la cyclopie correspondant à un signe caractéristique de l'HPE dans la forme la plus sévère. Sandra Mercier a également établi un classement des phénotypes obtenus de la Catégorie I à II.





Par la suite, Sandra Mercier a combiné les inhibitions partielles des voies Nodal et Shh chez l'embryon de poulet à HH4+ en utilisant des infraconcentrations de SB-505124 et de cyclopamine. De nouveaux phénotypes sont observés et classés en trois catégories. L'ensemble de nos résultats a montré que la survenue d'un phénotype de type HPE était significativement augmentée par la double inhibition comparée aux simples inhibitions.

Etant donné que la voie Nodal agit en amont de la voie Hedgehog au cours du développement du cerveau antérieur (cf. chapitre II-C Voies de signalisation), ces expériences montrent qu'une inhibition partielle d'une voie dont l'action est plus précoce, associée à une inhibition partielle d'une voie agissant en aval, peut conduire à un phénotype de type HPE dans notre modèle. Cette observation démontre que l'accumulation de plusieurs défauts mineurs de signalisation peut conduire à une malformation du cerveau antérieur ce qui conforte l'hypothèse « multi-hit » de l'HPE.



# NODAL and SHH dose-dependent double inhibition promotes an HPE-like phenotype in chick embryos

Sandra Mercier<sup>1</sup>, Véronique David<sup>1,2</sup>, Leslie Ratié<sup>1</sup>, Isabelle Gicquel<sup>1</sup>, Sylvie Odent<sup>1,3</sup> and Valérie Dupé<sup>1,\*</sup>

## SUMMARY

Holoprosencephaly (HPE) is a common congenital defect that results from failed or incomplete forebrain cleavage. HPE is characterized by a wide clinical spectrum, with inter- and intrafamilial variability. This heterogeneity is not well understood and it has been suggested that HPE involves a combination of multiple gene mutations. In this model, several mutated alleles or modifying factors are presumed to act in synergy to cause and determine the severity of HPE. This could explain the various clinical phenotypes. Screening for HPE-associated genes in humans suggests the involvement of NODAL or SHH signaling, or both. To test this multigenic hypothesis, we investigated the effects of chemical inhibition of these two main HPE signaling pathways in a chick embryo model. SB-505124, a selective inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  type I receptors was used to inhibit the NODAL pathway. Cyclopamine was used to inhibit the SHH pathway. We report that both inhibitors caused HPE-like defects that were dependent on the drug concentration and on the developmental stage at the time of treatment. We also investigated double inhibition of NODAL and SHH pathways from the onset of gastrulation by using subthreshold inhibitor concentrations. The inhibitors of the NODAL and SHH pathways, even at low concentration, acted synergistically to promote an HPE-like phenotype. These findings support the view that genetic heterogeneity is important in the etiology of HPE and may contribute to the phenotypic variability.

## INTRODUCTION

Holoprosencephaly (HPE) is the most common congenital forebrain defect in humans. It results from failed or incomplete forebrain cleavage between days 18 and 28 of gestation (Dubourg et al., 2007; Marcorelles and Laquerriere, 2010).

The clinical presentation of HPE is remarkably variable, and the severity of the defects observed is evenly distributed along the HPE spectrum. The etiology is very complex and heterogeneous, involving chromosomal anomalies, multiple malformation syndromes and environmental factors. Fourteen genes are known to be involved in non-syndromic human HPE (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF*, *DISP1*, *NODAL*, *GLI2*, *PTCH1*, *TDGF1*, *FOXH1*, *FGF8*, *GAS1*, *DLL1* and *CDON*), but they explain only 30% of HPE cases (Mercier et al., 2011). All mutations are found in the heterozygous state in HPE patients, and most are loss-of-function mutations (Dubourg et al., 2004; Arauz et al., 2010; Ribeiro et al., 2010; Roessler and Muenke, 2010; Bae et al., 2011; Dupé et al., 2011). The correlation between the HPE phenotype and genotype is poor, and both sporadic cases and pedigrees display the extensive HPE phenotype variability. This suggests that heterozygous mutations of HPE genes might be insufficient to produce severe anomalies, and that HPE is the consequence of a complex interplay of

developmental, genetic and environmental factors. To date, given the relatively low percentage of cases for which causative mutations have been identified, additional studies are undoubtedly warranted.

From animal model studies, multifactorial inheritance disorder has been proposed to contribute to the phenotype heterogeneity of the disorder. For example, heterozygous mutation of several genes belonging to the same or different pathways could lead to phenotypic heterogeneity. Mouse models have provided evidence, by implicating either one or two different signaling pathways [*Nodal*<sup>+/+</sup>; *Smad2*<sup>+/+</sup> (Nomura and Li, 1998); *Cdo*<sup>-/-</sup>; *Boc*<sup>-/-</sup> (Zhang et al., 2011); and *Ctvd*<sup>-/-</sup>; *Nodal*<sup>+/+</sup> (Yang et al., 2010)]. The genetic background also plays an important role in determining the severity of the phenotype, suggesting the existence of modifier genes (Cole and Krauss, 2003; Krauss, 2007; Geng et al., 2008; Pei and Feldman, 2009). Furthermore, observation of some HPE patients with two different genetic alterations are consistent with a multigenic process (Mercier et al., 2011; Ming and Muenke, 2002). Thus, the diversity of combinations of mutations in HPE genes and/or modifier genes belonging to different pathways could contribute to the wide spectrum of HPE phenotypes.

HPE genes belong to various different signaling pathways regulating forebrain development, including the Hedgehog (HH), NODAL, BMP and FGF pathways. The role of these pathways during forebrain development has been extensively studied, especially the SHH and NODAL pathways, the two major pathways implicated in the pathogenesis of HPE (Roessler and Muenke, 2010). However, the interactions between these pathways, in terms of spatial and temporal regulation during the development of HPE, need to be clarified.

The NODAL signaling pathway has been implicated in cases of human HPE with or without congenital heart defects and/or left-right disturbances (Roessler et al., 2008; Roessler et al., 2009). NODAL is a transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) -related signaling molecule that is essential during the initiation of

<sup>1</sup>Institut de Génétique et Développement, CNRS UMR6290, Université de Rennes 1, IFR140 GFAS, Faculté de Médecine, 35043 Rennes, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Pontchaillou, 35043 Rennes Cedex, France

<sup>3</sup>Service de Génétique Clinique, Hôpital Sud, 35203 Rennes, France

\*Author for correspondence (valerie.dupe@univ-rennes1.fr)

Received 3 May 2012; Accepted 29 November 2012

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Share Alike License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly cited and all further distributions of the work or adaptation are subject to the same Creative Commons License terms.



## TRANSLATIONAL IMPACT

**Clinical issue**

Holoprosencephaly (HPE), a remarkably common human birth defect, is caused by a failure to form the midline of the forebrain and midface. Its clinical presentation is extremely variable, ranging from alobar HPE (where there is a complete failure to divide the forebrain) to microform (where there are mild craniofacial features but no forebrain defects). Various craniofacial defects (from none to cyclopia) and other extra-craniofacial defects are observed. HPE is probably caused by both environmental and genetic factors; with respect to the latter, heterozygous mutations in components or regulators of the Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway are often associated. The phenotypic heterogeneity seen in carriers of SHH pathway mutations, ranging from no clinical manifestation to alobar HPE, implicates other modifier genes in forebrain development.

**Results**

In addition to SHH signaling, several other pathways regulate forebrain development, such as the NODAL pathway. Here, the authors established a chick embryo culture model to investigate the effects of chemical inhibition of SHH and NODAL pathways during forebrain development. They report that inhibition of either pathway caused HPE-like defects with phenotypic variability. Inhibition of both pathways using subthreshold inhibitor concentrations acted synergistically to promote severe HPE-like phenotypes. These findings support the view that genetic heterogeneity plays a key role in HPE etiology and contributes to the phenotypic variability.

**Implications and future directions**

Because HPE arises from a complex interplay of developmental, genetic and environmental factors, it is difficult to study the condition using genetic approaches in a mouse model. By comparison, it is simpler to use cultured chick embryos for testing the multi-genetic hypothesis of human HPE and for validating new candidate genes. The identification of new modifier genes by whole exome sequencing will aid in the understanding HPE etiology, and provide new direction to mechanistic studies in the chick and in other model organisms.

gastrulation. NODAL signals act in the formation of mesoderm and are required later for correct positioning of the anteroposterior axis, midline patterning and left-right specification (Iannaccone et al., 1992; Zhou et al., 1993; Conlon et al., 1994; Lowe et al., 2001; Roessler et al., 2008; Roessler et al., 2009). The NODAL signaling pathway has been extensively studied during cleavage and blastula stages in zebrafish; NODAL acts in a dose-dependent and time-dependent manner during the mid-to-late blastula stage to specify most mesodermal and endodermal cell types (Hagos and Dougan, 2007; Gritsman et al., 2000). The total absence of NODAL is embryonically lethal, whereas a hypomorphic allele of *Nodal* or chemical inactivation results in anterior patterning defects including cyclopia in mice, zebrafish and *Xenopus* (Lowe et al., 2001; Vincent et al., 2003; Hagos and Dougan, 2007; Luxardi et al., 2010). These defects are strictly dependent on the degree of NODAL inactivation and on the embryonic stage. Consistent with the importance of this pathway during development, inactivation at early stages leads to very severe phenotypes, and the critical time-window of requirement for NODAL activity during forebrain formation is difficult to define (Shen, 2007; Luxardi et al., 2010).

Disruption of SHH signaling is a common major event in the development of HPE. Mice lacking SHH function have a severe HPE-like phenotype involving the absence of ventral forebrain structures and cyclopia (Chiang et al., 1996). Studies with model

organisms demonstrate that SHH produced by the prechordal mesendoderm is required for initiating the development of the midline of the forebrain and the midface (Rubenstein and Beachy, 1998; Muenke and Beachy, 2000; Kiecker and Niehrs, 2001). Abnormal activity of the SHH signaling pathway at particular periods of embryonic development might account for the phenotypic spectrum of HPE (Cordero et al., 2004). There is a progressive mechanism whereby SHH produced by one midline structure induces *Shh* expression in successive midline structures. Most human HPE genes either encode components of the SHH pathway, or directly or indirectly affect *Shh* expression in either the prechordal mesendoderm or the developing ventral forebrain (Hu and Helms, 1999; Marcucio et al., 2005; Dubourg et al., 2007; Geng and Oliver, 2009).

SHH and NODAL signals interact and Hedgehog signaling acts downstream from NODAL activity to pattern the ventral telencephalon (Müller et al., 2000; Rohr et al., 2001). Indeed, expression of *Shh* is severely reduced in mutants for the NODAL pathway, particularly in anterior regions (Strähle et al., 1997; Hagos and Dougan, 2007). The mechanisms by which NODAL signaling regulates SHH activity in axial tissues have yet to be determined, but NODAL signals can cell-autonomously promote floorplate-specific expression of *Shh* (Müller et al., 2000). The interaction between SHH and NODAL pathways takes place during gastrulation as the floorplate is established. The description of heterozygous mutations of *SHH* and *TGIF* (which interact with TGF- $\beta$ -activated Smad proteins) in the same HPE patient is further evidence for there being interaction between SHH and NODAL (Nanni et al., 1999). However, it is not known whether the association of effects in each of these two pathways can cause HPE.

Here, we studied partial chemical inhibition of these two pathways during chick forebrain development. Our aim was to evaluate the interaction between NODAL and SHH pathways and to investigate the HPE multiple-genetic process in an animal model using a dose- and time-dependent approach. We demonstrate that phenotypic severity was dependent on the stage of treatment and on the concentration of the chemical inhibitors of the NODAL and SHH signaling pathways. Subthreshold concentrations of the two inhibitors in combination caused severe effects. These investigations show that the partial inhibition of two pathways can have a cumulative effect in determining an HPE-like phenotype and support a genetic heterogeneity hypothesis for HPE.

**RESULTS****Inactivation of the NODAL signaling pathway from the stage of gastrulation onset leads to severe forebrain defects**

The chemical inhibitor SB-505124 was used to inactivate NODAL signaling (Hagos and Dougan, 2007). This compound has been used previously to dissect the complex pathway of the TGF- $\beta$  superfamily and has been validated for inhibition of the activin receptor-like kinase (ALK)4/5/7-dependent activation (DaCosta Byfield et al., 2004).

To analyze the effect of SB-505124 on chick forebrain during its formation, we studied three molecular markers: *Pax6*, *Shh* and *Nkx2.1*. The *Pax6* homeobox gene is specifically expressed in developing optic vesicles, making it a good indicator of eye defects, from hypotelorism to cyclopia, one of the main features of the HPE spectrum (Incardona et al., 1998). *Shh* and *Nkx2.1* are ventral



markers of the developing forebrain (Crossley et al., 2001): they are targets of NODAL signaling during forebrain development and are specifically downregulated in animal models of HPE (Müller et al., 2000; Rohr et al., 2001).

We used *ex ovo* chick embryo cultures (so-called roller cultures) to test the effects of NODAL signaling inhibition during early brain formation (Dupé and Lumsden, 2001). The NODAL signaling pathway was inactivated in whole embryos from the onset of gastrulation (between stage 4 and stage 6 in the chick) until the primary regionalization of the forebrain (stage 12). The NODAL pathway is required during early gastrulation (Shen, 2007), so a concentration and a stage of treatment allowing gastrulation to occur but causing a forebrain phenotype had to be determined.

Whole chick embryos ( $n=317$ ) from stage 4 to stage 6 were exposed to one of a series of SB-505124 concentrations: 10, 25, 50 or 75  $\mu\text{M}$ . At least five different experiments were run for each condition. Because we clearly observed a phenotypic heterogeneity, we individualized three distinct phenotypes on the basis of the morphology and gene expression (arbitrarily classified as categories 1, 2 and 3) (Fig. 1A).

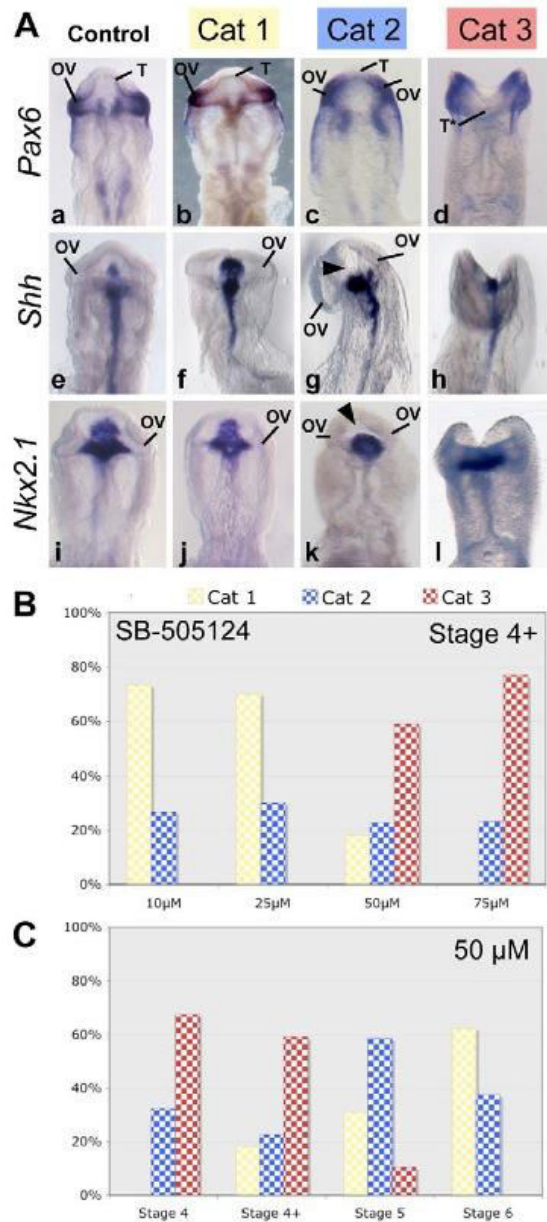
At the onset of the gastrulation (Stage 4+), most embryos (70%) treated with 25  $\mu\text{M}$  SB-505124 were similar to controls (DMSO-treated embryos) in terms of morphology and expression of *Pax6*, *Shh* and *Nkx2.1* (Fig. 1A, category 1). However, 30% of the embryos displayed a mild phenotype, involving forebrain hypoplasia (Fig. 1A, category 2). In these category 2 embryos, optic vesicles were formed, as shown by *in situ* hybridization for *Pax6*, but they were in a more ventral position than in controls. They were fused only in rare cases. Importantly, expression of both *Nkx2.1* and *Shh* was specifically downregulated in the rostral diencephalic ventral midline (Fig. 1A, arrowheads) similar to that described in several HPE models (Allen et al., 2007; Higashiyama et al., 2007), including hypomorph mutants for NODAL signaling (Lowe et al., 2001; Vincent et al., 2003). At SB-505124 concentrations of 50  $\mu\text{M}$  or 75  $\mu\text{M}$  administered from stage 4+ (Fig 1B), forebrain defects were severe (category 3) and characterized by anterior truncation with non-fused neural folds (Fig. 1Ad, T\*), no formation of optic vesicles and downregulation of the expression of *Shh* and *Nkx2.1* in the rostral midline (Fig. 1Ah,AI). This category 3 phenotype was observed in 59% and 77% of the embryos treated with 50  $\mu\text{M}$  and 75  $\mu\text{M}$ , respectively, from stage 4+.

We tested the response of chick embryos to SB-505124 according to the stage of treatment. The category 3 phenotype was frequent among embryos treated with 50  $\mu\text{M}$  from stage 4 (68%) or 4+ (59%) (Fig 1C), but this severe phenotype was significantly less frequent when the treatment was started at stage 5 (10%). After stage 5, severe phenotypes were not observed: category 2 was more frequent for stage 5 (59%) and category 1 for stage 6 (63%).

In conclusion, category 3 (severe) phenotypes were mainly observed at a drug concentration over 25  $\mu\text{M}$  initiated at stages 4 or 4+, just at the onset of gastrulation.

**Cyclopamine causes progressive cyclopia in a dose-dependent manner**

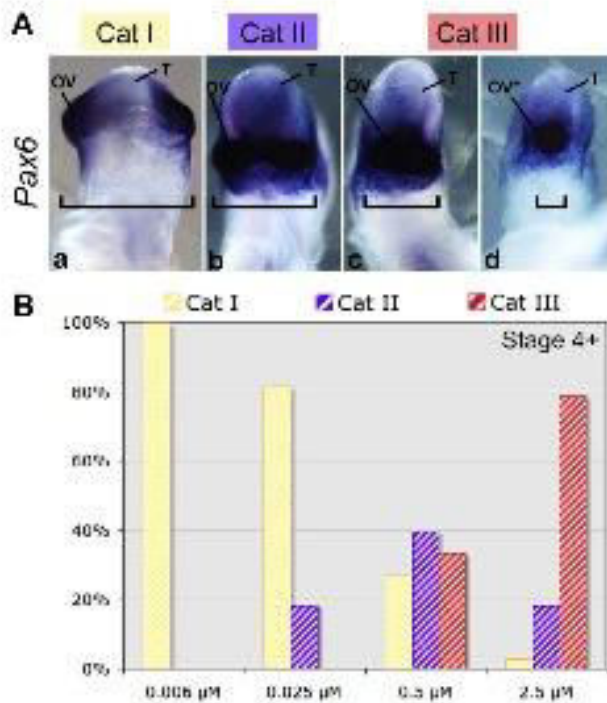
Cyclopamine is a well-characterized chemical inhibitor of the SHH signaling pathway (Cooper et al., 1998; Incardona et al., 1998): it inhibits the morphogenetic activity of the SHH pathway by binding



**Fig. 1. NODAL signal inhibition by SB-505124 treatment leads to severe forebrain defects; the dose-response relationship is nonlinear.** (A) Ventral views of chick embryo heads at stage 12. Control embryos ( $n=150$ ) were treated with DMSO (Aa, Ae, Ai). Other embryos were treated with one of a series of SB-505124 concentrations (10–75  $\mu\text{M}$ ) between stage 4 and stage 6 ( $n=317$ ). Resulting phenotypes were classified into three categories according to morphology and *in situ* hybridization for *Pax6* ( $n=111$ ) (Aa–Ad), *Shh* ( $n=107$ ) (Ae–Ah) and *Nkx2.1* ( $n=99$ ) (Ai–Al). The order of increasing severity was: category 1, category 2 and category 3. Arrowheads show the downregulation of *Shh* (Ag) and *Nkx2.1* (Ak) expression in the ventral forebrain. (B) Distribution of the phenotypes of stage 4+ embryos treated with one of a series of SB-505124 concentrations: 10  $\mu\text{M}$  ( $n=15$ ), 25  $\mu\text{M}$  ( $n=20$ ), 50  $\mu\text{M}$  ( $n=22$ ) or 75  $\mu\text{M}$  ( $n=26$ ). (C) Distribution of the phenotypes of embryos treated with 50  $\mu\text{M}$  SB-505124 starting at various stages: from stage 4 ( $n=40$ ), stage 4+ ( $n=22$ ), stage 5 ( $n=29$ ) and stage 6 ( $n=16$ ). OV, optic vesicles; T, telencephalon; T\*, non-fused telencephalon; Cat, category.







**Fig. 2. Cyclopamine causes cyclopia in a dose-dependent manner.** (A) Ventral views of chick embryo heads at stage 12. Three phenotypes were distinguished morphologically. *Pax6* mRNA was used as a marker for optic vesicles ( $n=70$ ). The order of increasing severity was: category I, category II and category III. (B) Distribution of the phenotypes observed for embryos treated at stage 4+ by one of a series of concentrations of cyclopamine: 0.006  $\mu\text{M}$  ( $n=30$ ), 0.025  $\mu\text{M}$  ( $n=38$ ), 0.5  $\mu\text{M}$  ( $n=48$ ) or 2.5  $\mu\text{M}$  ( $n=33$ ). OV, optic vesicles; OV\*, single optic vesicle; T, telencephalon; Cat, category. Brackets highlight the distance between optic vesicles.

to and preventing activation of the transmembrane protein, Smoothed (Smo) (Chen et al., 2002; Lipinski et al., 2008). First, as for SB-505124, we identified the stages and concentrations at which cyclopamine caused HPE-like defects.

Chick embryos were exposed to cyclopamine concentrations between 0.006  $\mu\text{M}$  and 2.5  $\mu\text{M}$  at stage 4+ (Fig. 2). After 24 hours of culture, the embryos were individually scored for morphological abnormalities and *Pax6* expression. A phenotypic index was calculated and the phenotypes were classified into three categories, from normal embryo, category I to embryos with fused optic vesicles, category III.

All embryos treated with 0.006  $\mu\text{M}$  of cyclopamine at stage 4+, showed normal head development (category I). Normal head development was similarly observed in 85% of the embryos treated with 0.025  $\mu\text{M}$  cyclopamine. The other 15% showed partial fusion of the optic evaginations ventrally, as confirmed by analysis of *Pax6* expression. This was defined as the category II phenotype (Fig. 2A). At a higher cyclopamine concentration (0.5  $\mu\text{M}$ ), we observed a new phenotype (category III) characterized by optic vesicle fusion, from partial fusion to cyclopia, associated with an elongated forebrain (35%) (Fig. 2A). At the highest concentration of cyclopamine tested (2.5  $\mu\text{M}$ ), 75% of the embryos displayed a category III phenotype (Fig. 2B).

To determine when Shh-dependent forebrain patterning occurs, embryos were treated with 2.5  $\mu\text{M}$  cyclopamine at various stages. Exposure at stage 5 or 6 resulted in a high proportion of cyclopic embryos (data not shown). However, following treatment with 2.5  $\mu\text{M}$  cyclopamine starting at stage 7, none of the embryos developed cyclopia.

These experiments describe the relationship between cyclopia and both the stage of treatment and cyclopamine concentration. They confirm the involvement of SHH in the ventralization of the forebrain during early gastrulation (stages 5 and 6) (Pera and Kessel, 1997). These experiments also identified a subthreshold concentration (0.006  $\mu\text{M}$ ) of cyclopamine that has no apparent morphological effect on either head development or fusion of the optic vesicles.

### Combined partial inhibition of SHH and NODAL signals leads to cyclopic embryos

We studied the effects of combined treatment with the inhibitors of the NODAL and SHH signaling pathways, at subthreshold concentrations. SHH signal inactivation between stages 4 and 6 was required to obtain cyclops (see above). NODAL inactivation before stage 5 was required to cause a forebrain phenotype. Therefore, we used stage 4+ embryos for these experiments.

Stage 4+ chick embryos (total  $n=187$ ) in roller cultures were exposed to 0.006  $\mu\text{M}$  cyclopamine or 25  $\mu\text{M}$  SB-505124 or both. *Pax6* expression was studied in these embryos.

We defined three new phenotypic categories (I\* to III\*) to score the degree of fusion of optic vesicles. These categories are similar to those defined for cyclopamine treatment, but include progressive forebrain hypoplasia (Fig. 3A). Thus, category I\* was defined as embryos with non-fused expression of *Pax6* in the optic vesicles (Fig. 3Aa), and included morphologically normal embryos and embryos with slightly ectopic optic vesicles. Category II\* (Fig. 3Ab) embryos displayed a phenotype with ectopic optic vesicles (ventral position) with continuous expression of *Pax6*. Category III\* was a severely affected phenotype with partial or complete fusion of the optic vesicle (cyclopia) associated with marked forebrain hypoplasia (Fig. 3Ac,Ad). We scored the severity of the phenotypes after the three treatments (Fig. 3B).

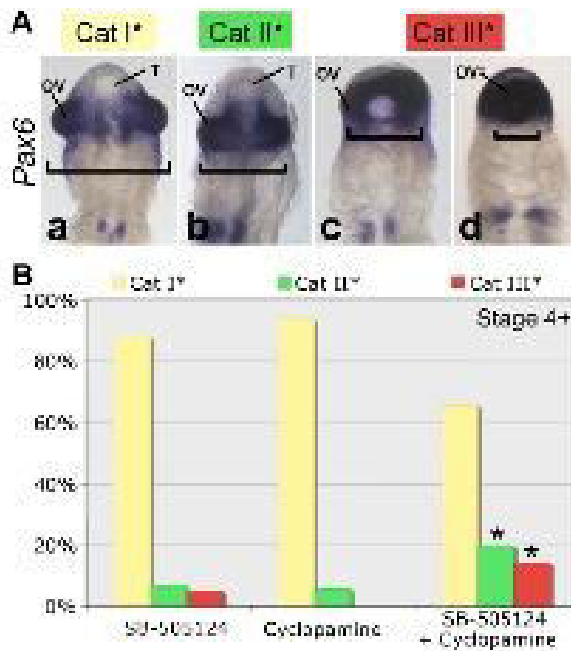
The most severe phenotype, category III\*, was never observed following treatment with 0.006  $\mu\text{M}$  cyclopamine alone, and only 6% of these embryos displayed a category II\* phenotype (Fig. 3B). Following treatment with 25  $\mu\text{M}$  SB-505124 alone, 7% of the embryos were category II\* and 5% category III\*. About 20% of the embryos subjected to the double treatment were category II\* and 14% category III\*. The proportions of categories II\* and III\* differed significantly between combined and single inactivation groups ( $P=4 \times 10^{-4}$ ).

Therefore, combination of the two inhibitors at subthreshold concentrations caused more severe midline abnormalities than either inhibitor alone. These findings suggest that abnormal NODAL and SHH signals interact to produce various HPE-spectrum phenotypes. Similar double treatment started at stage 5 ( $n=49$ ) or stage 6 ( $n=20$ ) did not have a greater effect than single treatments (data not shown).

### DISCUSSION

The molecular basis for the variable expressivity and reduced penetrance of HPE has not yet been identified. However, the





**Fig. 3. Simultaneous partial inhibition of NODAL and SHH causes HPE-like anterior neural defects in chick embryos.** (A) Ventral views of chick embryo heads at stage 12. Embryos were treated with SB-505124 (25  $\mu$ M) and cyclopamine (0.006  $\mu$ M) at stage 4+ ( $n=187$ ). Three phenotypes were distinguished using *Pax6* in situ hybridization. The order of increasing severity was: category I\*, category II\* and category III\*. (B) Phenotype distributions among embryos treated with cyclopamine ( $n=32$ ), SB-505124 ( $n=59$ ) or both ( $n=76$ ) at stage 4+. The asterisks show the significant cumulative effect of the double treatment leading to the HPE-like phenotype ( $P=4 \times 10^{-4}$ ). OV, optic vesicles; OV\*, single optic vesicle; T, telencephalon; Cat, category.

digenism described in animal models for HPE supports the existence of a heterogeneous and multigenic mechanism in some human cases, in which the penetrance and expressivity of heterozygous loss-of-function mutations can be modulated by one or more other mutations (Mercier et al., 2011; Roessler et al., 2012). Here, we report the development of an animal model in which various signaling pathways can be simultaneously and partially inhibited. We used this model to inactivate the NODAL and SHH pathways, both major pathways implicated in human HPE, during forebrain development.

In knockout models, the loss of NODAL signaling blocks gastrulation and is embryonically lethal (Lowe et al., 2001). However, analysis of *Nodal*-insufficient embryos revealed that although the gastrulation takes place, eye field and forebrain fail to develop properly and a HPE-like phenotype develops (Lowe et al., 2001; Vincent et al., 2003; Andersson et al., 2006; Yang et al., 2010). Here, we used the ALK4/5/7 receptor inhibitor, SB-505124, for partial inhibition of the NODAL pathway during chick development. It was previously shown that this drug added to developing zebrafish at various stages of development causes a spectrum of phenotypes, including cyclopia, that are phenocopies of NODAL component mutants (Hagos and Dougan, 2007). Even though multiple ligands can activate the ALK4/5/7 receptors, our

phenotypes resemble those resulting from reductions in nodal-related gene function (Vincent et al., 2003; Andersson et al., 2006; Yang et al., 2010). This suggests that the other activin-like ligands are either not implicated during the stages we examined or act downstream of Nodal signals.

It has not yet been established when NODAL signals contribute to the anterior midline specification in chick embryos. In our experiments, embryos were treated in roller culture with various concentrations of SB-505124 at the onset of gastrulation. The severity of the resulting defects in forebrain development depended both on the concentration of the inhibitor and the stage at which treatment started. NODAL is essential for gastrulation through the regulation of several major genes; however, the difficulty was to find a window and concentration at which the inhibition was strong enough to induce an HPE-like phenotype (category 2) without causing a phenotype that was too severe (category 3). During our SB-505124 treatment, analysis of *Pax6* expression did not reveal any typical cyclopic phenotype, whereas *in situ* hybridization evidenced reduced, or loss of, *Shh* and *Nkx2.1* expression in the rostral midline region. Despite the lack of the typical HPE phenotype, this absence of expression of *Shh* and *Nkx2.1* at the anterior boundary of expression support the idea that these category 2 embryos display a HPE-like phenotype (Lowe et al., 2001; Anderson et al., 2002; Vincent et al., 2003; Allen et al., 2007; Higashiyama et al., 2007). The crucial stage for NODAL signaling in our model is before stage 5, which is consistent with the description of NODAL expression: *Nodal* is expressed in the middle three-quarters of the primitive streak, excluding Hensen's node, up to stage 5; *Nodal* expression then ceases in the midline (Lawson et al., 2001).

Cyclopamine treatment caused, in a dose-dependent manner, fusion of the optic vesicles up to cyclopia, the most severe typical craniofacial defect in HPE. Interestingly, in HPE patients with altered SHH signaling, midline malformation ranges from hypotelorism to complete cyclopia (Muenke and Beachy, 2000). The features of our model are consistent with the demonstration by Cordero et al. of a relationship between the timing of Hedgehog disruption and the severity of the facial phenotype (Cordero et al., 2004). Interestingly, embryos subjected to cyclopamine treatment starting as late as stage 7 developed a cyclopic phenotype. This is in agreement with the continuous expression of *Shh* throughout the node at stage 4 and subsequently in the prechordal mesendoderm at stage 7, the crucial structure for ventral forebrain patterning (Crossley et al., 2001).

We investigated whether minor defects in NODAL and SHH pathways can synergize to produce HPE disorders. Our preliminary experiments indicated that stage 4+ embryos were suitable for these experiments for two reasons. First, SB-505124 had the largest effect on head development when administered at stage 4 and 4+. Second, the stage 4+ is easy to distinguish, but also very transient, leading to less variability in the results. We used concentrations of inhibitors that in isolation did not cause any severe forebrain defect or severe optic vesicle fusion (25  $\mu$ M SB-505124 and 0.006  $\mu$ M cyclopamine). The proportion of embryos with ventralized optic vesicles (category II\*) and fusion (category III\*) was substantially higher following double treatment than single treatment. An optic vesicle phenotype was observed in 34% of double-treated embryos, and optic vesicle fusion up to cyclopia in 15%. This effect was not



reproduced when embryos were treated slightly later, at stage 5. These experiments show that minor inhibition of both SHH and NODAL pathways can lead to abnormal development of the forebrain midline, whereas similar inhibition of one or other in isolation does not. The penetrance of the phenotypes obtained was incomplete and variable, which is a common feature of most HPE models described (Lowe et al., 2001; Allen et al., 2007; Zhang et al., 2011; Cordero et al., 2004).

Cyclopamine and SB-505124 single treatments as a combination of both inhibitors generated phenotypic heterogeneity. This variability, from no morphological anterior deficit to severe anterior truncation, is greater with intermediate concentration of inhibitors (50  $\mu$ M for SB-505124 and 0.5  $\mu$ M for cyclopamine at stage 4+); it reflects the importance of the quantitative requirement of the level of NODAL and SHH signaling during forebrain development.

NODAL and SHH signaling are decisive in forebrain fate determination and the corresponding genes are expressed simultaneously in the primitive streak and the prechordal plate. The mechanism by which NODAL signaling regulates SHH activity during gastrulation has yet to be determined. However, several studies have indicated that the NODAL pathway regulates ventral forebrain patterning through SHH-independent mechanisms (Rohr et al., 2001; Monuki, 2007). SHH might have to reach a threshold concentration to ensure proper forebrain development (Young et al., 2010). The dose- and stage-dependent relationship we observe here is consistent with a threshold effect: slightly reduced NODAL signaling might cause a small downregulation of SHH, which produces a HPE phenotype only when associated with another small decrease in SHH signaling.

Overall, we demonstrate that weak inhibition of two signaling pathways, one downstream of the other, can lead to an HPE-like phenotype. A similar interaction between NODAL and BMP has also been demonstrated in forebrain development (Yang et al., 2010). Therefore, several independent genetic events influencing different signaling pathways involved in forebrain development, acting at the same or different embryonic stages, can cause the HPE phenotype, most probably through regulation of the main HPE signaling pathway, SHH. This could be the basis for the phenotypic heterogeneity observed in families segregating mutations in SHH. This is coherent with the systematic decrease of *Shh* in animal models with partial inhibitions of various signaling pathways (Krauss, 2007; Fernandes and Hébert, 2008; Geng and Oliver, 2009; Yang et al., 2010). These observations are consistent with a 'multi-signaling pathways-hit' model. It is likely that as-yet unidentified polymorphisms contribute to the hypomorphic effects involved in HPE. Further work with whole exome sequencing would help confirm this theory.

## MATERIALS AND METHODS

### Roller-tube culture and chemical inhibition in chick

Fertile hens' eggs were incubated in a humidified room at 38°C. The embryos were staged according to Hamburger and Hamilton (Hamburger and Hamilton, 1992). They were collected at stages 4, 4+, 5 and 6 and cultured as described elsewhere (Dupé and Lumsden, 2001). Five embryos, folded and sealed along the longitudinal axis, were transferred to a 5-ml plastic bottle containing 500  $\mu$ l of Liebovitz medium. The bottles were placed on a roller apparatus rotating at 30 revolutions/minute, inclined at

an angle of about 10° in a 38°C incubator. Development was then allowed to proceed for 24 hours. The embryos were treated with the following compounds: cyclopamine (Sigma) from a stock solution of 1 mg/ml in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HBC, Sigma); and SB-505124 (Sigma-Aldrich), from a stock solution of 24 mg/ml in DMSO. No toxicity was observed up to 100  $\mu$ M for SB-505124 (DaCosta Byfield et al., 2004). Embryos were treated with cyclopamine, SB-505124 or both included in the culture medium continuously, starting from stage 4 to stage 6. Control embryos were treated with DMSO ( $n=352$ ) or HBC ( $n=115$ ). In our culture conditions, about 90% of the embryos were morphologically normal; the only visible abnormalities in the other 10% were localized failures of neural tube closure. However, the anatomical regionalization and gene expression of *Pax6*, *Nkx2.1* and *Shh* were in all cases apparently normal.

### Whole-mount *in situ* hybridization

Antisense digoxigenin-labeled riboprobes were used for whole-mount *in situ* hybridization on chicken embryos as previously described (Chapman et al., 2002). Plasmids carrying chick *Shh*, *Nkx2.1* and *Pax6* were used as templates to generate the antisense riboprobes.

### Statistical analysis

Variables are expressed as numbers and percentages. Fisher's exact tests were used for comparisons. We used a type I error of 0.05, by convention.

### COMPETING INTERESTS

The authors declare that they do not have any competing or financial interests.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.R., I.G. and V. Dupé set up and designed the experiment. S.M. and I.G. performed the experiments. S.M., V. Dupé and V. David wrote the manuscript, and all authors read, discussed and edited the manuscript.

### FUNDING

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the University of Rennes.

### REFERENCES

- Allen, B. L., Tenzen, T. and McMahon, A. P. (2007). The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes Dev.* **21**, 1244-1257.
- Anderson, R. M., Lawrence, A. R., Stottmann, R. W., Bachiller, D. and Klingensmith, J. (2002). Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse. *Development* **129**, 4975-4987.
- Andersson, O., Reissmann, E., Jönvall, H. and Ibáñez, C. F. (2006). Synergistic interaction between Gdf1 and Nodal during anterior axis development. *Dev Biol.* **293**, 370-381.
- Arauz, R. F., Solomon, B. D., Pineda-Alvarez, D. E., Gropman, A. L., Parsons, J. A., Roessler, E. and Muenke, M. (2010). A hypomorphic allele in the FGF8 gene contributes to holoprosencephaly and is allelic to gonadotropin-releasing hormone deficiency in humans. *Mol. Syndromol.* **1**, 59-66.
- Bae, G. U., Doméné, S., Roessler, E., Schachter, K., Kang, J. S., Muenke, M. and Krauss, R. S. (2011). Mutations in CDON, encoding a hedgehog receptor, result in holoprosencephaly and defective interactions with other hedgehog receptors. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 231-240.
- Chapman, S. C., Schubert, F. R., Schoenwolf, G. C. and Lumsden, A. (2002). Analysis of spatial and temporal gene expression patterns in blastula and gastrula stage chick embryos. *Dev. Biol.* **245**, 187-199.
- Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K. and Beachy, P. A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* **16**, 2743-2748.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-413.



- Cole, F. and Krauss, R. S. (2003). Microform holoprosencephaly in mice that lack the Ig superfamily member Cdon. *Curr. Biol.* **13**, 411-415.
- Conlon, F. L., Lyons, K. M., Takaesu, N., Barth, K. S., Kispert, A., Herrmann, B. and Robertson, E. J. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* **120**, 1919-1928.
- Cooper, M. K., Porter, J. A., Young, K. E. and Beachy, P. A. (1998). Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* **280**, 1603-1607.
- Cordero, D., Marcucio, R., Hu, D., Gaffield, W., Tapadia, M. and Helms, J. A. (2004). Temporal perturbations in sonic hedgehog signaling elicit the spectrum of holoprosencephaly phenotypes. *J. Clin. Invest.* **114**, 485-494.
- Crossley, P. H., Martinez, S., Ohkubo, Y. and Rubenstein, J. L. (2001). Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* **108**, 183-206.
- DaCosta Byfield, S., Major, C., Laping, N. J. and Roberts, A. B. (2004). SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* **65**, 744-752.
- Dubourg, C., Lazaro, L., Pasquier, L., Bendavid, C., Blayau, M., Le Duff, F., Durou, M. R., Odent, S. and David, V. (2004). Molecular screening of SHH, ZIC2, SDC3, and TGF genes in patients with features of holoprosencephaly spectrum: Mutation review and genotype-phenotype correlations. *Hum. Mutat.* **24**, 43-51.
- Dubourg, C., Bendavid, C., Pasquier, L., Henry, C., Odent, S. and David, V. (2007). Holoprosencephaly. *Orphanet J. Rare Dis.* **2**, 8.
- Dupé, V. and Lumsden, A. (2001). Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling. *Development* **128**, 2199-2208.
- Dupé, V., Rochard, L., Mercier, S., Le Pétilon, Y., Gicquel, I., Bendavid, C., Bourrouillou, G., Kini, U., Thauvin-Robinet, C., Bohan, T. P. et al. (2011). NOTCH, a new signaling pathway implicated in holoprosencephaly. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1122-1131.
- Fernandes, M. and Hébert, J. M. (2008). The ups and downs of holoprosencephaly: dorsal versus ventral patterning forces. *Clin. Genet.* **73**, 413-423.
- Geng, X. and Oliver, G. (2009). Pathogenesis of holoprosencephaly. *J. Clin. Invest.* **119**, 1403-1413.
- Geng, X., Speirs, C., Lagutin, O., Inbal, A., Liu, W., Solnica-Krezel, L., Jeong, Y., Epstein, D. J. and Oliver, G. (2008). Haploinsufficiency of *Six3* fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly. *Dev. Cell* **15**, 236-247.
- Gritsman, K., Talbot, W. S. and Schier, A. F. (2000). Nodal signaling patterns the organizer. *Development* **127**, 921-932.
- Hagos, E. G. and Dougan, S. T. (2007). Time-dependent patterning of the mesoderm and endoderm by Nodal signals in zebrafish. *BMC Dev. Biol.* **7**, 22.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L. (1952). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev. Dyn.* **195**, 231-272.
- Higashiyama, D., Saitou, H., Komada, M., Takigawa, T., Ishibashi, M. and Shiota, K. (2007). Sequential developmental changes in holoprosencephalic mouse embryos exposed to ethanol during the gastrulation period. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* **79**, 513-523.
- Hu, D. and Helms, J. A. (1999). The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development* **126**, 4873-4884.
- Iannaccone, P. M., Zhou, X., Khokha, M., Boucher, D. and Kuehn, M. R. (1992). Insertional mutation of a gene involved in growth regulation of the early mouse embryo. *Dev. Dyn.* **194**, 198-208.
- Incardona, J. P., Gaffield, W., Kapur, R. P. and Roelink, H. (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* **125**, 3553-3562.
- Kiecker, C. and Niehrs, C. (2001). The role of prechordal mesoderm in neural patterning. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 27-33.
- Krauss, R. S. (2007). Holoprosencephaly: new models, new insights. *Expert Rev. Mol. Med.* **9**, 1-17.
- Lawson, A., Colas, J. F. and Schoenwolf, G. C. (2001). Classification scheme for genes expressed during formation and progression of the avian primitive streak. *Anat. Rec.* **262**, 221-226.
- Lipinski, R. J., Hutson, P. R., Hannam, P. W., Nydza, R. J., Washington, I. M., Moore, R. W., Girdaukas, G. G., Peterson, R. E. and Bushman, W. (2008). Dose- and route-dependent teratogenicity, toxicity, and pharmacokinetic profiles of the hedgehog signaling antagonist cyclopamine in the mouse. *Toxicol. Sci.* **104**, 189-197.
- Lowe, L. A., Yamada, S. and Kuehn, M. R. (2001). Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development* **128**, 1831-1843.
- Luxardi, G., Marchal, L., Thomé, V. and Kodjabachian, L. (2010). Distinct *Xenopus* Nodal ligands sequentially induce mesoderm and control gastrulation movements in parallel to the Wnt/PCP pathway. *Development* **137**, 417-426.
- Marcocelles, P. and Laquerriere, A. (2010). Neuropathology of holoprosencephaly. *Am. J. Med. Genet.* **154C**, 109-119.
- Marcucio, R. S., Cordero, D. R., Hu, D. and Helms, J. A. (2005). Molecular interactions coordinating the development of the forebrain and face. *Dev. Biol.* **284**, 48-61.
- Mercier, S., Dubourg, C., Garcelon, N., Campillo-Gimenez, B., Gicquel, I., Belleguic, M., Ratié, L., Pasquier, L., Loget, P., Bendavid, C. et al. (2011). New findings for phenotype-genotype correlations in a large European series of holoprosencephaly cases. *J. Med. Genet.* **48**, 752-760.
- Monuki, E. S. (2007). The morphogen signaling network in forebrain development and holoprosencephaly. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 566-575.
- Muenke, M. and Beachy, P. A. (2000). Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 262-269.
- Müller, F., Albert, S., Blader, P., Fischer, N., Hallonet, M. and Strähle, U. (2000). Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development* **127**, 3889-3897.
- Nanni, L., Ming, J. E., Bocian, M., Steinhaus, K., Bianchi, D. W., Die-Smulders, C., Giannotti, A., Imaizumi, K., Jones, K. L., Campo, M. D. et al. (1999). The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 2479-2488.
- Nomura, M. and Li, E. (1998). *Smad2* role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature* **393**, 786-790.
- Pei, W. and Feldman, B. (2009). Identification of common and unique modifiers of zebrafish midline bifurcation and cyclopia. *Dev. Biol.* **326**, 201-211.
- Pera, E. M. and Kessel, M. (1997). Patterning of the chick forebrain anlage by the prechordal plate. *Development* **124**, 4153-4162.
- Ribeiro, L. A., Quiezi, R. G., Nascimento, A., Bertolacini, C. P. and Richieri-Costa, A. (2010). Holoprosencephaly and holoprosencephaly-like phenotype and GAS1 DNA sequence changes: Report of four Brazilian patients. *Am. J. Med. Genet.* **152A**, 1688-1694.
- Roessler, E. and Muenke, M. (2010). The molecular genetics of holoprosencephaly. *Am. J. Med. Genet.* **154C**, 52-61.
- Roessler, E., Ouspenskaia, M. V., Karkera, J. D., Vélez, J. I., Kantipong, A., Lacbawan, F., Bowers, P., Belmont, J. W., Towbin, J. A., Goldmuntz, E. et al. (2010). Reduced NODAL signaling strength via mutation of several pathway members including *FOXP1* is linked to human heart defects and holoprosencephaly. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 18-29.
- Roessler, E., Pei, W., Ouspenskaia, M. V., Karkera, J. D., Veléz, J. I., Banerjee-Basu, S., Gibney, G., Lupo, P. J., Mitchell, L. E., Towbin, J. A. et al. (2009). Cumulative ligand activity of NODAL mutations and modifiers are linked to human heart defects and holoprosencephaly. *Mol. Genet. Metab.* **98**, 225-234.
- Roessler, E., Vélez, J. I., Zhou, N. and Muenke, M. (2012). Utilizing prospective sequence analysis of SHH, ZIC2, SDC3 and TGF1 in holoprosencephaly probands to describe the parameters limiting the observed frequency of mutant gene-gene interactions. *Mol. Genet. Metab.* **105**, 658-664.
- Rohr, K. B., Barth, K. A., Varga, Z. M. and Wilson, S. W. (2001). The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron* **29**, 341-351.
- Rubenstein, J. L. and Beachy, P. A. (1998). Patterning of the embryonic forebrain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 18-26.
- Shen, M. M. (2007). Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* **134**, 1023-1034.
- Strähle, U., Jesuthasan, S., Blader, P., Garcia-Villalba, P., Hatta, K. and Ingham, P. W. (1997). one-eyed pinhead is required for development of the ventral midline of the zebrafish (*Danio rerio*) neural tube. *Genes Funct.* **1**, 131-148.
- Vincent, S. D., Dunn, N. R., Hayashi, S., Norris, D. P. and Robertson, E. J. (2003). Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals. *Genes Dev.* **17**, 1646-1662.
- Yang, Y. P., Anderson, R. M. and Klingensmith, J. (2010). BMP antagonism protects Nodal signaling in the gastrula to promote the tissue interactions underlying mammalian forebrain and craniofacial patterning. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3030-3042.
- Young, N. M., Chong, H. J., Hu, D., Hallgrímsson, B. and Marcucio, R. S. (2010). Quantitative analyses link modulation of sonic hedgehog signaling to continuous variation in facial growth and shape. *Development* **137**, 3405-3409.
- Zhang, W., Hong, M., Bae, G. U., Kang, J. S. and Krauss, R. S. (2011). *Boc* modifies the holoprosencephaly spectrum of *Cdo* mutant mice. *Dis. Model. Mech.* **4**, 368-380.
- Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B. L. and Kuehn, M. R. (1993). Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* **361**, 543-547.





# DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

L'objectif de ma thèse s'inscrivait dans le travail global de l'équipe sur une pathologie du développement du cerveau antérieur, l'Holoprosencéphalie. Dernièrement, l'équipe a mis en évidence l'implication de la voie de signalisation Notch dans l'HPE, ce qui m'a amenée à tenter de déterminer le rôle de la voie Notch au cours du développement précoce du cerveau antérieur.

## **La voie de signalisation Notch agit par inhibition latérale au sein de l'hypothalamus en développement**

Au cours du développement embryonnaire, j'ai montré que les acteurs de la voie Notch, ligand et effecteurs, s'exprimaient spécifiquement au sein de l'hypothalamus, une structure se développant au niveau de la ligne médiane du cerveau antérieur. De plus, les profils d'expression en « poivre et sel » de ces gènes suggèrent fortement un mode d'action de la voie Notch par inhibition latérale (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006). Ce mécanisme bien connu de la voie Notch n'avait pas été précédemment décrit au sein de l'hypothalamus en développement.

En effet, de nombreuses études effectuées dans différents tissus tels que l'oreille interne, l'épithélium olfactif, la rétine ou la moelle épinière montrent que la neurogenèse se déroule grâce à une boucle de régulation entre la voie Notch et les gènes proneuraux, se traduisant par la mise en place du mécanisme d'inhibition latérale. Mon travail de thèse a mis en évidence qu'au sein de l'hypothalamus, la voie Notch utiliserait les mêmes mécanismes pour maintenir l'état indifférencié des progéniteurs hypothalamiques neuraux.



- **Action de la voie Notch dans le développement de l'hypothalamus**

Jusqu' à très récemment, très peu de travaux faisaient état d'une implication de la voie de signalisation Notch au niveau de la formation des premiers neurones de l'hypothalamus.

Cependant il existe des études d'expression chez plusieurs modèles animaux. Chez le poisson-zèbre, les différents ligands *delta A*, *B* et *D* et le récepteur *notch1* au stade 20 (HH13 chez le poulet) présentent un patron d'expression « poivre et sel » au niveau de l'hypothalamus, caractéristique du mode d'action de la voie Delta/Notch par inhibition latérale (Dutta et al., 2008). Chez la souris, il n'existe pas d'étude montrant la présence de l'activité Notch au cours des premiers stades du développement de l'hypothalamus, c'est à dire au stade E9.5. Cependant, HES1 et ASCL1 ont déjà été identifiés au sein de progéniteurs hypothalamiques de l'Arc (Blackshaw et al., 2010; Kele et al., 2006; Kita et al., 2007; Pelling et al., 2011).

Chez l'embryon de poulet, deux récepteurs Notch sont identifiés (NOTCH1 et NOTCH2) ainsi que quatre ligands (DLL1, DLL4, JAGGED1 et JAGGED2). Leur expression lors de la neurogenèse a été principalement caractérisée au niveau de la moelle épinière et du cerveau postérieur mais très peu détaillée au niveau du cerveau antérieur (Myat et al., 1996). DLL1 a été mis en évidence au niveau des premiers neurones prospectifs apparaissant avant la fermeture du tube neural où il permet l'inhibition de la différenciation neuronale des cellules voisines (Chitnis, 1995; Henrique et al., 1995). Dans notre étude, nous nous sommes placés au stade de l'induction de l'hypothalamus comme le révèle l'analyse d'expression de *Nkx2.1*, marqueur de l'hypothalamus prospectif (Aoto et al., 2009; Marin et al., 2002; Pera and Kessel, 1997; Sussel et al., 1999; Xu et al., 2008). Nous avons pu définir que l'expression du ligand *Dll1* et de deux effecteurs de la voie Notch *Hes5* et *Hey1* au niveau de l'hypothalamus débutait peu avant le stade HH11 chez l'embryon de poulet. Ces gènes présentent un patron d'expression caractéristique de type « poivre et sel » qui persiste jusqu'au stade HH15 au niveau de la partie antérieure de l'hypothalamus. Ceci suggère que la voie de signalisation Notch jouerait un rôle dans le développement de l'hypothalamus dès le stade HH11. Par ailleurs, la distribution caractéristique en « poivre et



sel » de *Dll1* implique un rôle de NOTCH dans le développement des neurones de l'hypothalamus.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, il n'existait pas d'étude fonctionnelle réalisée chez la souris impliquant la voie Notch dans le développement précoce de l'hypothalamus.

Le mutant pour le gène *Rbpj* étant létal à E9.5, aucune fonction de la voie Notch au cours du développement de la ligne médiane n'avait été observée.

Seule une étude menée à un stade tardif du développement hypothalamique (E13.5) montrait que la voie Notch était nécessaire à la spécification des neurones hypothalamiques synthétisant l'arginine vasopressine (AVP) et l'ocytocine (OT) et la somatostatine (SS) au sein de différents noyaux hypothalamique (PVN, SO, aPV) (Aujla et al., 2011). Les auteurs ont utilisé des souris déficientes pour un effecteur de la voie Notch, *Hes1*. Ces souris survivent jusqu'au 18<sup>ème</sup> jour et présentent une réduction de la taille de l'hypophyse antérieure. Or c'est cette structure, régulatrice de l'homéostasie, qui reçoit les axones terminaux des neurones AVP, OT de l'hypothalamus. Les auteurs ont également montré qu'au stade E16.5 et E18.5, les neurones (AVP) sont formés dans les noyaux PVN et SO, mais qu'ils sont anormalement localisés et que leurs projections axonales dans l'hypophyse sont anormales. De plus la perte de fonction de *Hes1* provoque une réduction des neurones SS dans l'aPV associée à une orientation aberrante de leurs axones vers la glande pituitaire. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de HES1 dans le guidage des axones hypothalamiques et plus généralement que la voie de signalisation Notch faciliterait la migration des neurones hypothalamiques. Cependant, chez la souris, la différenciation des neurones hypothalamiques débute entre les stades E10.5 et E12 (Ishii and Bouret, 2012). Or, dans l'étude menée par Aujla et coll., aucun résultat n'est décrit à ce stade.

Dans les derniers mois de ma thèse, les mêmes auteurs ont publié une étude fonctionnelle permettant de confirmer le rôle de la voie Notch au cours du développement de l'hypothalamus (Aujla et al., 2013). Pour cela, Aujla et coll. ont utilisé des souris avec une mutation perte de fonction conditionnelle pour l'effecteur de la voie Notch, RBPJk (Han et al., 2002). En utilisant le promoteur de *Nkx2.1* exprimant la Cre, ils ont pu obtenir l'inactivation de la voie Notch restreinte aux tissus exprimant *Nkx2.1* (*RBPJ<sup>fl/fl</sup> ; Nkx2.1<sup>-Cre</sup>*).



Les auteurs ont ensuite focalisé l'étude du phénotype sur le contrôle de la différenciation des neurones du noyau arqué (Arc) de l'hypothalamus.

Le noyau Arc, contenant des pro-opiomelanocortin (POMC), le neuropeptide Y (NPY) et l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH), régule l'alimentation, l'équilibre énergétique et la taille du corps. Chez les souris *RBPJK<sup>fl/fl</sup>;Nkx2.1<sup>-Cre</sup>*, l'étude menée à E13.5, montre qu'une augmentation de l'expression du gène *Ascl1* coïncide avec l'augmentation de la prolifération et l'accumulation des neurones de l'Arc (Aujla et al., 2013). Plus tardivement à E18.5, le nombre de neurones POMC, NPY et GHRH est fortement augmenté chez les mutants. Ce travail montre qu'en l'absence d'activité Notch, une neurogenèse précoce prend place au niveau des tissus hypothalamiques, associée à une surexpression d'*Ascl1*.

Ce travail s'avère complémentaire à celui que j'ai réalisé au cours de ma thèse. Il constitue une étude fonctionnelle qui permet de confirmer le rôle de la voie Notch au cours du développement de l'hypothalamus. En complément, notre étude montre d'une part que cette fonction de Notch prend place dès les tous premiers stades de la neurogenèse de l'hypothalamus, et d'autre part qu'elle fait appel au mécanisme d'inhibition latérale.

Cependant, il existe une divergence concernant la fonction exercée par les gènes *Hes* lors de ce processus. Aujla et coll. attribuent la présence de la neurogenèse précoce chez les mutants RBPJ à l'absence du gène *Hes1* dans les neurones de l'Arc. Inversement dans le modèle poulet, l'utilisation du DAPT tend à démontrer que l'effecteur principal de la voie Notch dans l'hypothalamus serait HES5. En effet, l'expression de *Hes5* est totalement absente alors que l'expression de *Hes1* reste inchangée au stade impliqué dans notre étude (HH11 chez le poulet). Cependant, de façon similaire les analyses réalisées au stade E9.0 chez les mutants *RBPJ<sup>-/-</sup>* et *Notch1<sup>-/-</sup>* implique le gène *Hes5* (de la Pompa et al., 1997; Yang et al., 2006).

A l'avenir, il sera donc très important d'étudier le phénotype de l'hypothalamus de ces souris conditionnelles *RBPJK<sup>fl/fl</sup>;Nkx2.1<sup>-Cre</sup>* (Aujla et al., 2013) à un stade plus précoce, c'est à dire entre E9.0 et E11. Ces stades sont équivalents chez le poulet à ceux auxquels nous avons mené notre étude et fondamentalement ils correspondent à l'apparition des premiers neurones dans l'hypothalamus chez la souris (Mastick and Easter, 1996).





En particulier, cela permettra de montrer si la différenciation des neurones chez le modèle souris se fait également par le processus d'inhibition latérale impliquant le réseau Notch/gènes proneuraux comme nous l'avons décrit chez l'embryon de poulet.

- **Une déficience de la voie Notch entraîne une neurogenèse précoce par perte de l'inhibition latérale**

Aujourd'hui, nous disposons de beaucoup d'éléments de réponse concernant les mécanismes nécessaires à l'induction des précurseurs neuraux au sein des cellules neuroépithéliales. En effet, le mécanisme d'inhibition latérale de la voie Delta/Notch a été très bien décrit chez la *Drosophile* pour expliquer la différenciation des neuroblastes (Cabrera, 1990; Muskavitch, 1994; Simpson, 1990). Chez la *Drosophile*, avant que ne débute l'inhibition latérale, toutes les cellules d'un cluster proneural expriment de façon ubiquitaire et transitoirement Delta et Notch. Un déséquilibre spontané de leur expression survient alors lors du processus d'inhibition latérale. Les cellules qui se différencient en neuroblastes expriment les ligands DELTA et inhibent la différenciation des cellules voisines en neuroblastes. Ce mécanisme génère alors un patron d'expression en « poivre et sel » pour les différents acteurs de la voie Notch. Bien que la régulation de la différenciation cellulaire soit plus complexe chez les vertébrés, l'inhibition latérale survient de la même façon dans les territoires des progéniteurs neuraux. Par exemple, il a été démontré que les gènes proneuraux sous la dépendance de la voie Delta/Notch permettaient la production de progéniteurs neuraux au niveau de l'oreille interne (Adam et al., 1998; Kiernan, 2013; Neves et al., 2013), de l'épithélium olfactif (Cau et al., 2002; Shaker et al., 2012), de la rétine (Hatakeyama et al., 2001; Henrique et al., 1997; Ma et al., 2009), de la moelle épinière (Bae et al., 2005; Sugimori et al., 2007) ou du télencéphale (Casarosa et al., 1999; Imayoshi et al., 2013). Se met donc en place une régulation réciproque, similaire à celle observée chez la *Drosophile*, entre la voie Notch et les gènes proneuraux qui permettra aux progéniteurs neuraux d'acquiescer un destin cellulaire spécifique.

Il est établi aujourd'hui que c'est une surexpression de gènes proneuraux qui entraîne une neurogenèse précoce lors d'une inhibition de la voie Notch (Bertrand et al., 2002). En effet, différents modèles de souris mutantes pour des acteurs de la voie Notch montrent des



phénotypes de neurogenèse précoce associés à une surexpression de gènes proneuraux. Lors de pertes de fonction affectant les récepteurs *Notch1*, *2* et *3*, le cofacteur *Rbpjk* et le ligand *Dll1*, des perturbations de la neurogenèse sont observées à plusieurs stades du développement (de la Pompa et al., 1997; Hamada et al., 1999; Hrabe de Angelis et al., 1997; Mason et al., 2005; Oka et al., 1995; Przemeck et al., 2003; Yun and Bevan, 2003). La plupart du temps, *Hes5* y est sous exprimé, alors que les facteurs proneuraux tels que *Ascl1* et *Neurog* sont surexprimés, à l'exception des mutants *Notch2* où aucun changement d'expression des gènes *Hes*, *Ascl1* et *Neurog1/2* n'est détecté (Hamada et al., 1999). De même chez les mutants pour les gènes *Hes*, principales cibles de la voie Notch, une différenciation neuronale précoce caractérise un défaut d'activité de la voie Notch (Cau et al., 2000; Imayoshi et al., 2008; Ishibashi et al., 1995; Nakamura et al., 2008). Ce phénotype est accentué chez des doubles ou triples mutants pour les gènes *Hes*, confirmant leur redondance d'activité au sein des populations neuroépithéliales (Hatakeyama et al., 2006; Hirata et al., 2002; Imayoshi et al., 2008; Ohtsuka et al., 1999; Ohtsuka et al., 2001). Par ailleurs, chez le triple mutant *Hes1; Hes3; Hes5* l'expression du gène *Hey1* est fortement augmentée mais ne suffit pas à compenser la perte de fonction des protéines HES (Imayoshi et al., 2008). A l'opposé, les mutants concernant les gènes proneuraux présentent des défauts de différenciation neuronale. En effet, les mutants homozygotes pour les trois gènes proneuraux *Ascl1*, *Neurog1* et *Neurog2* présentent une diminution des précurseurs neuraux et des défauts dans différents territoires neurogéniques tels que les ganglions craniaux, l'épithélium olfactif, la rétine ou la moelle épinière (Fode et al., 2000; Guillemot and Joyner, 1993; Guillemot et al., 1993; Ma et al., 1998). Les doubles mutants générés pour ces facteurs proneuraux et facteurs neuraux (famille des *NeuroD*) présentent logiquement des phénotypes sévères au niveau des territoires neurogéniques, avec un arrêt de différenciation neuronale comme c'est le cas au niveau de l'épithélium olfactif (Casarosa et al., 1999; Cau et al., 2002; Ma et al., 1996; Nieto et al., 2001; Tomita et al., 2000). Il est donc établi que la cascade d'activation de la voie Notch et des facteurs proneuraux est essentielle à la formation correcte des territoires neurogéniques comme à la spécification des neurones sensoriels ou neurosécréteurs.

A ce jour, le rôle de la voie Notch au sein de l'hypothalamus n'est identifié que tardivement au cours du développement embryonnaire. En effet, les études réalisées chez la souris ne permettent pas de décrypter le mode d'action de la voie Notch et son rôle dans la



neurogenèse primaire au sein de l'hypothalamus (Aujla et al., 2011; Aujla et al., 2013). L'identification des patrons d'expression avec un profil « poivre et sel » des gènes *Dll1*, *Hes5*, *Hey1*, *Ascl1* et *Nhlh1* au niveau de l'hypothalamus en développement est associée à une neurogenèse précoce en présence de DAPT ce qui se traduit par une augmentation de la densité neuronale.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement un mode d'action de la voie Notch par inhibition latérale impliquant la boucle de régulation entre la voie Notch et les gènes proneuraux.

## Caractérisation de nouvelles cibles de la boucle de régulation Notch/gènes proneuraux dans des territoires neurogéniques

- **Ascl1 orchestre la neurogenèse de l'hypothalamus**

Plusieurs études ont démontré que le gène *Ascl1* agissait de façon dominante par rapport aux autres gènes proneuraux dans l'épithélium olfactif chez la souris (Cau et al., 2002; Cau et al., 1997; Guillemot and Joyner, 1993). Inversement, ce sont les facteurs de transcription NEUROG1 et NEUROG2 qui jouent un rôle plus prédominant dans le développement des ganglions rachidiens et de la population d'interneurones dl2 dans le tube neural en développement, ainsi que ATOH1 au niveau des interneurones dl1 (Gowan et al., 2001; Kriks et al., 2005; Lai et al., 2011; Ma et al., 1999; Powell and Jarman, 2008). Au niveau de la moelle épinière et du télencéphale dorsal, ASCL1 et NEUROG2 possèdent des fonctions divergentes pour la spécification de sous-types neuronaux bien que dépendantes de la présence de déterminants d'identité neuronale (Nieto et al., 2001; Parras et al., 2002; Sun et al., 2001). A l'opposé, certaines études ont mis en évidence les régulations croisées entre les facteurs proneuraux dans plusieurs tissus neuraux dont le télencéphale, l'oreille interne et le cerveau moyen (Fode et al., 2000; Raft et al., 2007).

Ajouté à cette combinatoire, une régulation avec des facteurs de « patterning » est essentielle pour la détermination du lignage des progéniteurs multipotents du système nerveux. En effet, il a été montré par exemple que dans la moelle épinière, PAX6 associé à



ASCL1 ou NEUROG1 et 2 favorise la formation de neurones, alors que l'association entre ASCL1 et OLIG2 ou NKX2.2 favorise la formation d'oligodendrocytes. Ces combinaisons sont très finement régulées dans le temps et l'espace (Sugimori et al., 2007). De plus, il s'avère que cette régulation combinatoire est également contexte dépendant. En effet, au niveau de la rétine chez la souris et le xénope, c'est l'association entre ASCL1 et CHX10 qui permet le choix du destin cellulaire des progéniteurs rétiniens (Hatakeyama et al., 2001).

Bien que les facteurs proneuraux agissent par combinaison et coopération pour activer les programmes de différenciation neuronale, ils semblent exclusifs dans certains territoires neurogéniques.

Nos résultats suggèrent que c'est le gène proneural *Ascl1* qui dirige la neurogenèse au sein de l'hypothalamus via le mécanisme d'inhibition latérale. De façon similaire, le travail de Aujla et coll. (2013) réalisée sur les mutants conditionnels *RBPJK<sup>-fl/fl</sup>;Nkx2.1<sup>-Cre</sup>* implique essentiellement ASCL1 (Aujla et al., 2013). Notre étude transcriptomique par puces à ADN réalisée sur l'ensemble du prosencéphale indique que les trois gènes proneuraux *Ascl1*, *Neurog1* et *Neurog2*, sont surexprimés lors de l'inhibition de la voie Notch à partir du stade HH10. Cependant, nos études par hybridation *in situ* montrent que seul *Ascl1* est exprimé dans l'hypothalamus à ce stade. Les gènes *Neurog1* et *Neurog2* sont quant à eux exprimés dans d'autres territoires neurogéniques du prosencéphale, comme l'épithélium olfactif et les ganglions craniaux (données non montrées). Ceci est en accord avec la présence de neurogenèse précoce que nous observons dans ces tissus lorsque nous cultivons les embryons en présence de DAPT.

Ces résultats suggèrent donc que le mécanisme de détermination neurale nécessaire à la neurogenèse précoce de l'hypothalamus dépendrait essentiellement d'une boucle de régulation entre la protéine proneurale ASCL1 et la voie Notch. Ceci est cohérent avec l'étude du mutant *Ascl1<sup>-/-</sup>* qui démontre qu'ASCL1 régule la formation du pool neuronal ainsi que la spécification de sous types neuronaux (GHRH, TH et NPY) (McNay et al., 2006). Cependant, une étude montre que les gènes proneuraux de la famille des *Neurog* ont également une fonction dans la différenciation neurale hypothalamique, mais elle est plus tardive. En effet, il a été montré récemment que *Neurog3* sous la dépendance d'ASCL1, est exprimé au niveau des progéniteurs mitotiques des régions VMH/ARC de l'hypothalamus et





y est nécessaire pour le développement correct de ses sous types neuronaux (NPY et POMC) (Anthwal et al., 2013; McNay et al., 2006; Pelling et al., 2011).

- **De nouveaux gènes cibles d'Ascl1 sont des marqueurs de l'hypothalamus**

On connaît la complexité de mise en place de la neurogenèse ainsi que l'existence des cascades d'activation entre les gènes anti-neuraux, proneuraux, neuraux et pan-neuraux (Cau et al., 2000, pour revue (Kintner, 2002)).

Des analyses à grande échelle ont déterminé un grand nombre de cibles potentielles des facteurs proneuraux. Par exemple, une étude par CHIP-Chip (hybridation des ADNc immunoprécipités sur des puces à ADN de promoteurs) chez les mammifères a permis de caractériser le programme génétique régulé par ASCL1 au niveau du cerveau embryonnaire (Castro et al., 2011). Ce travail apporte une nouvelle preuve du rôle d'ASCL1 au cours de la spécification des progéniteurs neuraux comme des étapes tardives de différenciation neuronale et de la croissance des neurites. En effet, ASCL1 régule directement des gènes associés aux éléments et étapes majeures de la neurogenèse : la voie Notch, la spécification cellulaire, la prolifération cellulaire, la différenciation neuronale et la morphogénèse des neurites. Par ailleurs, les auteurs démontrent également qu'ASCL1 peut réguler des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire tels que la cycline *Cdca7*, les kinases cyclines-dépendantes *Cdk1* et *Cdk2*, ou *Fbxw7*, *Gadd45g*, *Ccng2*, *Hipk2* et *Prmt2* impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Castro et al., 2011).

Une identification de cibles transcriptionnelles directes des NEUROG et des NeuroD a également été effectuée chez le xénope (Seo et al., 2007). Les auteurs ont combiné une approche transcriptomique et une étude de promoteurs pour caractériser les cibles directes de ces facteurs de transcription. Cette étude met également en évidence le fait que les NEUROG et NEUROD partagent des cibles communes dont la plupart sont des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation neuronale tels NHLH1, EBF2, EBF3 et HES6 (Seo et al., 2007).

Une étude transcriptomique réalisée chez l'embryon de poulet s'est focalisée sur les cibles du gène proneural, *Neurog2* (Lacomme et al., 2012). NEUROG2 exerce en partie sa fonction d'activateur de la neurogenèse en agissant sur l'expression de gènes tels *Ccnd1*, *Ccne*. *Neurog2* va accélérer la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux provoquant



l'arrêt du cycle cellulaire en réprimant des cyclines requises pour les différentes phases (Lacomme et al., 2012). De façon plus localisée, des gènes cibles de NEUROG2 ont été identifiés au sein du néocortex murin en utilisant une approche soustractive d'expression entre des cellules corticales de souris sauvages et mutantes pour *Neurog2* et *Neurog1* ; *Neurog2* (Mattar et al., 2004).

Les cibles identifiées dans ces différentes approches sont nombreuses mais restent cependant différentes. Ceci peut s'expliquer par l'action contexte-dépendante des facteurs proneuraux évoquée précédemment ((Guillemot, 2007) ; pour revue (Powell and Jarman, 2008)) ainsi que par les capacités d'hétérodimérisation des protéines proneurales (Henke et al., 2009). On comprend alors que les gènes proneuraux disposent d'une impressionnante diversité de cibles qui vont leur permettre de réguler finement les étapes de la neurogenèse. Il apparaît donc, vu la complexité spatiotemporelle de la neurogenèse, que de nombreux gènes restent encore à identifier.

Dans ce sens, les données transcriptomiques générées lors de ma thèse fournissent un outil puissant permettant d'identifier de nouvelles cibles des cascades d'activation essentielles à la détermination et à la spécification des précurseurs neuronaux.

L'analyse de nos résultats a mis en évidence une perte de l'expression des gènes *Hes5* et *Hey1* au niveau de l'hypothalamus antérieur. Ceci est associé à une surexpression de leur principale cible, le gène proneural *Ascl1*. Afin d'identifier de nouvelles cibles des répresseurs transcriptionnels HES/HEY, nous nous sommes focalisé sur les gènes présentant un profil de surexpression lors de l'inhibition de la voie Notch. Parmi les 1558 gènes dérégulés de façon significative dans notre étude, la moitié étaient surexprimés. Pour restreindre notre étude à des gènes pertinents, une analyse selon les termes ontologiques a été réalisée et nous a permis d'isoler des gènes reliés au développement du système nerveux. Par la suite, des recherches bibliographiques ont été nécessaires pour sélectionner les meilleurs gènes candidats. Une cinquantaine de sondes ribonucléotidiques nécessaires à l'analyse d'expression par hybridation *in situ* ont ensuite été produites. Seules celles révélant une expression différentielle au cours du développement du cerveau antérieur ont été conservées.

Plus particulièrement, 8 gènes ont montré une expression spécifique au niveau de l'hypothalamus en développement à HH15: *Ascl1*, *Nhlh1*, *Stmn2*, *Robo2*, *Slit1*, *Chga*, *Tagln3* et *Chrdl1*. A l'exception d'*Ascl1* (Buchtova et al., 2010; McNay et al., 2006), aucun de ces



gènes n'avaient été décrit précédemment comme ayant une expression spécifique et aussi précoce au niveau de l'hypothalamus antérieur de l'embryon de poulet.

Les gènes *Nhlh1* et *Stmn2* relatifs à des étapes de la neurogenèse sont des cibles connues d'ASCL1 (Bao et al., 2000; Camoletto et al., 2001).

*Slit1* et *Robo2* sont également exprimés au niveau de l'hypothalamus antérieur dès le stade E9.5 chez l'embryon de souris (Ricano-Cornejo et al., 2011). Les gènes *Slit* et *Robo* sont normalement identifiés dans les neurones post-mitotiques et y régulent le guidage axonal (Marillat et al., 2002) mais récemment il a été montré qu'il étaient également présents au niveau des progéniteurs du cortex cérébral pour favoriser leur renouvellement et cela en synergie avec la voie Notch (Borrell et al., 2012). Cependant, la surexpression de *Slit1* et *Robo2* que nous observons chez les embryons traités au DAPT est probablement liée à l'état post-mitotique des neurones précocement différenciés. Leurs expressions conjointes avec les facteurs proneuraux dans cette structure en fait des cibles du réseau voie Notch/gènes proneuraux et favorise une fonction dans le guidage axonal pour SLIT1 et ROBO2.

Nous avons identifié trois autres nouveaux marqueurs jamais décrits dans l'hypothalamus en développement, *Chga*, *Tagln3* et *Chrdl1*. Par ailleurs le gène *Chrdl1* présente un patron d'expression très intéressant car il est le seul à posséder une expression restreinte à l'hypothalamus antérieur entre HH11 à HH18.

Le travail de Shimogori et collaborateurs (2010) a permis d'identifier précisément des marqueurs spécifiques des noyaux hypothalamiques au cours du développement embryonnaire chez la souris à E12.5. Il serait donc intéressant de définir si nos trois nouveaux marqueurs sont spécifiques de certains noyaux de l'hypothalamus antérieur. Pour cela, il s'agirait de réaliser une colocalisation avec par exemple avec le gène *Lhx1* spécifique du noyau suprachiasmatique (Sch), et les gènes *Otp* et *Sim1* spécifiques des noyaux paraventriculaire (PVN) et supraoptique (SON) (Shimogori et al., 2010).



- **Nouveaux acteurs généraux de la neurogenèse**

Dans notre étude, il s'est avéré que les gènes *Tagln3* et *Chga* présentaient un patron d'expression similaire au niveau de l'hypothalamus. Par ailleurs ces gènes sont également exprimés au niveau des ganglions craniaux et spinaux, de l'épithélium olfactif, du mésencéphale dorsal et du nerf oculo-moteur (III). Bien que la neurogenèse de ces structures soit bien décrite dans la littérature, les gènes *Tagln3* et *Chga* n'y ont pas été associés. Seule une étude précédente avait associé le gène *Tagln3* au développement de la face chez le poulet (Buchtova et al., 2010). De façon pertinente, un des cribles d'*Ascl1* montre que *Tagln3* pourrait être régulé directement par ASCL1 (Castro et al., 2011).

Ces deux gènes, constituent donc de nouveaux marqueurs généraux de la neurogenèse.

Nous avons ajouté à cette liste le gène *Cntn2* (TAG1/Axonin1), car bien qu'absent de l'hypothalamus, son profil d'expression est similaire à celui de *Tagln3* et *Chga* dans les autres domaines. *Cntn2* est décrit dans la littérature pour son expression tardive dans des structures du système nerveux central et périphérique. Au stade HH28, son expression a été détectée au niveau des neurones moteurs, des ganglions craniaux et rachidiens (Hadas et al., 2013; Wolfer et al., 1998). Nous avons observé une expression de *Cntn2* dès HH18 ainsi au niveau de l'épithélium olfactif. *Cntn2* est connu pour moduler la génération des neurones post-mitotiques et influencer les neurones spinaux matures (Ma et al., 1998; Xenaki et al., 2011).

D'autre part, outre son rôle dans l'hypothalamus antérieur, *Chrdl1* pourrait avoir un rôle au niveau du développement de l'épiphyse, de la rétine ventrale et des bourgeons des membres antérieurs et postérieurs. Ce gène codant pour une molécule antagoniste de BMP4 permet l'établissement d'un gradient au sein de la rétine pour l'établissement de l'axe dorso-ventral ainsi que pour l'orientation des projections axonales (Sakuta et al., 2001). Au niveau de l'épiphyse, la voie Notch est décrite pour réguler la spécification des deux sous-types cellulaires neuronaux qui la composent : les photorécepteurs et les neurones de projection (Cau et al., 2008). Il a été montré que la voie Notch agirait de façon synergique avec la voie des BMP au niveau de la spécification du type neuronal au sein de l'épiphyse.





La voie des BMP semble moduler l'activité transcriptionnelle du NICD (domaine intracellulaire du récepteur Notch) (Quillien et al., 2011). CHRDL1, en tant qu'antagoniste des BMP, pourrait exercer une fonction dans la spécification des sous-types neuronaux de l'épiphyse où il interagirait avec la voie Notch.

- **Perspectives**

Ce travail a permis d'identifier des régulations potentielles entre des acteurs transcriptionnels impliqués dans la neurogenèse et en particulier dans la boucle de régulation Notch/gènes proneuraux. Notre étude *in silico* suggère une régulation complexe entre ces acteurs, faisant intervenir des répresseurs et activateurs qui pourraient posséder des effets antagonistes. Ce qui pourrait être le cas pour ASCL1 et HEY1 lors de la régulation de ces nouveaux gènes cibles (e.g. *Chga*, *Tagnl3*, *Chrdl1*). En tenant compte de ces motifs et des autres sites de liaison strictement attribués à ASCL1 et NHLH1 nous avons créé un profil de régulation.

A l'avenir, nous souhaitons utiliser ces séquences nucléotidiques conservées pour tenter d'isoler de nouveaux gènes cibles de ce réseau à partir de nos données transcriptomiques. D'autres filtres pourront être également appliqués sur les données transcriptomiques. Par exemple, le gène *Rest* (*repressor element transcription factor*) apparaît sous exprimé dans nos données transcriptomiques lors de l'inhibition de la voie Notch dans le cerveau antérieur. Etant donné que ce type de facteurs de transcription est capable de se lier à des séquences nucléotidiques promotrices très spécifiques (NRSE : neuronal restrictive silencer element) (Yamada et al., 2010; Zuccato et al., 2007), il serait pertinent de rechercher si des sites de liaison pour ce facteur de transcription existent sur nos nouveaux gènes de neurogenèse et d'autres gènes qui restent à extraire de l'analyse transcriptomique.

A la vue de ce travail réalisé chez l'embryon de poulet, il est approprié de confirmer nos résultats chez l'embryon de souris. Pour cela nous hébergeons actuellement les souris *Rbpj*<sup>flox/flox</sup> (Oka et al., 1995) dans notre animalerie. Ces souris sont croisées avec une lignée exprimant Rosa26<sup>CRE-ert</sup> un promoteur ubiquitaire inductible par le tamoxifène (Soriano, 1999) Julien et al., 2008). Le traitement au tamoxifène des mères gestantes à E8 nous



permettra d'inactiver la voie Notch à partir du stade E8.5. Ces modalités nous permettent d'échapper à la létalité embryonnaire précoce qui limiterait l'analyse phénotypique.

C'est également dans l'objectif de s'affranchir du défaut potentiel de spécificité d'inhibition du DAPT que nous mettons en place l'utilisation de l'inactivation génique chez la souris. En effet, cette molécule est fréquemment utilisée dans de nombreux modèles animaux pour inhiber l'activité de la voie Notch mais son action au niveau de la  $\gamma$ -sécrétase est susceptible d'influer le clivage d'autres substrats comme Erbb4 (Rochette and Murphy, 2002) E-Cadhérine, N-Cadhérine et Nectine-1 (Park et al., 2008; Selkoe and Kopan, 2003).

L'expression des différents acteurs de la voie Notch comme *Dll1*, *Hes1*, *Hey2*, *Hes1* et *Hes5* a déjà été analysée sur des embryons souris contrôles au stade E9.5, nous permettant de nous assurer de l'activité de la voie Notch à ce stade. Actuellement, nous produisons les sondes ARN pour étudier l'expression chez la souris des nouvelles cibles de la voie Notch identifiées au cours de mon travail de thèse. Notre objectif est d'étudier le comportement de ces gènes chez les embryons *Rbpj*<sup>flox/flox</sup> /*Rosa26*<sup>CRE-erT</sup> induits par le tamoxifène afin d'entériner les résultats obtenus chez l'embryon de poulet.



# Notch, une nouvelle voie de signalisation dans l'Holoprosencéphalie

L'Holoprosencéphalie est considérée comme la malformation congénitale majeure affectant le développement du cerveau antérieur. La plupart du temps, les cliniciens vont avoir recours à l'imagerie médicale pour établir un diagnostic. En ce sens, l'identification des cas d'HPE a été favorisée par des progrès en imagerie via l'IRM cérébrale (Hahn and Barnes, 2010). Par ailleurs, de nombreux outils diagnostiques génotypiques ont été développés au cours des dernières années dont la recherche systématique de mutations ou microdélétions dans les quatre gènes « majeurs » de l'HPE (Bendavid et al., 2010; Dupé et al., 2011; Huang et al., 2006; Mercier et al., 2011). L'objectif majeur de notre équipe est de chercher à identifier les bases moléculaires des cas d'HPE non-chromosomiques non-syndromiques encore non élucidés. La recherche de nouveaux gènes candidats se complexifie car les gènes à effet majeur ont été préalablement identifiés et les gènes restants à découvrir sont probablement des gènes à caractère mineur.

- **La voie de signalisation Notch et l'Holoprosencéphalie**

Au sein de l'équipe, des analyses de comparaison génomique ont permis de mettre en évidence une délétion redondante d'une région chromosomique chez cinq patients HPE. L'exploration de cette région a permis d'identifier un nouveau gène candidat pour l'Holoprosencéphalie, *DLL1*, codant un ligand du récepteur NOTCH (Dupé et al., 2011). La récurrence de la délétion, la présence d'une mutation ponctuelle chez un patient HPE, ainsi que l'expression de *Dll1* compatible avec un rôle précoce au cours du développement du cerveau antérieur, nous ont permis d'émettre l'hypothèse qu'une dérégulation de la voie Notch pouvait conférer une susceptibilité à la survenue d'un phénotype HPE.

Dans le but de répondre à cette question, il était tout d'abord nécessaire de connaître la fonction de cette voie de signalisation au niveau des tissus embryonnaires affectés dans l'HPE. Dans un premier temps, ce travail m'a conduit à m'intéresser au rôle exercé par cette voie au cours du développement des neurones de l'hypothalamus. Ainsi, comme je l'ai discuté précédemment, j'ai montré que la voie Notch exerçait effectivement une fonction précoce au cours du développement de la ligne médiane du cerveau antérieur.



Cette fonction semble être restreinte à la région qui formera l'hypothalamus antérieur, ce qui est montré par les doubles hybridations avec *Shh* et *Nkx2.1*, deux marqueurs très bien caractérisés de l'hypothalamus ventral (Brand et al., 1996; Dale et al., 1997; Manning et al., 2006; Marin et al., 2002; Sussel et al., 1999).

La morphologie de l'hypothalamus évaluée par IRM est un élément important dans le diagnostic de l'HPE (Simon et al., 2000). En effet, dans le cas d'une fusion de la région préoptique et ou de l'hypothalamus, la dysplasie septo-optique entre dans le spectre des phénotypes HPE (Hahn et al., 2005; Volpe et al., 2009). Chez les patients HPE, l'absence de division de l'hypothalamus entraîne des défauts secondaires tels qu'une dérégulation du cycle veille-sommeil, de la température corporelle ainsi que de la sensation d'appétit et de soif (Plawner et al., 2002).

Les patients HPE porteurs d'une mutation du gène *FGF8* présentent des défauts de l'hypothalamus (McCabe et al., 2011) qui sont retrouvés chez les souris porteuses de l'allèle hypomorphe *Fgf8*. Ces souris présentent des déficiences endocriniennes révélatrices d'un dysfonctionnement de l'hypothalamus (McCabe et al., 2011).

A ce stade de notre étude, nous pouvons formuler l'hypothèse qu'une neurogenèse précoce lors de l'inactivation de la voie Notch pourrait entraîner une perte de tissu au niveau de la ligne médiane. En effet, chez des patients porteurs d'une anomalie de la voie Notch, les précurseurs neuronaux se différencieraient alors trop rapidement empêchant l'étape de prolifération nécessaire à la formation normale du tissu. Cette perte de tissu au niveau de la ligne médiane du cerveau antérieur pourrait contribuer à l'apparition d'un phénotype HPE.

Cependant, il semble qu'au niveau de la ligne médiane, la neurogenèse précoce ne soit pas le seul phénotype produit par l'absence d'activité Notch. En effet, l'étude de l'identité moléculaire de cette région avec des marqueurs spécifiques de la ligne médiane, tel que *Shh* (Pera and Kessel, 1997 ; Aoto et al., 2009) suggère un rôle pour Notch dans la régulation de l'expression de ce morphogène.





- **Notch régule l'expression de *Shh* dans la plaque neurale antérieure**

Nos résultats préliminaires montrent que lors de l'inhibition de la voie de signalisation Notch, l'expression de *Shh* est absente au niveau du primordium de l'hypothalamus, dans sa région la plus antérieure, alors qu'elle continue d'être présente au niveau du cerveau médian et postérieur et dans la moelle épinière.

Comme nous l'avons introduit dans ce manuscrit, *Shh* est le gène majeur de l'holoprosencéphalie. Ce qui est confirmé par les modèles de souris transgéniques. Certes la souris *Shh*<sup>-/-</sup> présente une HPE caractéristique (Chiang et al., 1996) mais c'est surtout l'absence localisée de *Shh* dans son domaine antérieur d'expression qui est caractéristique de tous les modèles murins d'HPE. Par exemple, chez les doubles mutants pour la voie Nodal et BMP (*Chrd;Nodal, Nog;Smad3*), l'expression de *Shh* est absente dans la région la plus antérieure du prosencéphale, alors qu'elle est conservée dans le reste de la ligne médiane (Yang et al., 2010).

C'est ce que nous montrons également dans l'article 3 qui décrit une inhibition simultanée de *Nodal* et *Shh* et présente également une diminution spécifique de *Shh* dans son domaine d'expression antérieur, associée à l'apparition de cyclopie.

Cette observation préliminaire suggère qu'à l'instar de la voie Nodal et Fgf, Notch pourrait contribuer au maintien de l'expression de *Shh* dans la région ventrale du cerveau antérieur. Cependant, nos embryons traités au DAPT ne présentent pas de défauts morphologiques sévères entrant dans le spectre du phénotype HPE. De la même façon, les mutants conditionnels *RbpJ*<sup>fl/fl</sup> *Nkx2.1*<sup>-Cre</sup>, qui ne présentent plus d'activité Notch spécifiquement dans la ligne médiane antérieure, ne présentent pas non plus de phénotype HPE apparent, et seule une obésité a été décrite (Aujla et al., 2013). De façon plus générale, à ce jour aucun phénotype morphologique caractéristique de l'HPE (e.g. absence de division du prosencéphale, hypotélorisme) n'a été décrit chez des embryons déficients pour la voie Notch.

L'absence de phénotype HPE caractéristique reste donc un frein dans la validation de l'implication de la voie Notch dans cette pathologie. Nos résultats préliminaires suggèrent que la voie Notch régule l'expression de *Shh* en maintenant son expression dans la région antérieure à partir du stade HH11. Ceci est probablement trop tardif pour obtenir un



phénotype sévère puisque *Shh* est nécessaire à l'induction du cerveau antérieur dès le stade HH5 (Gimeno and Martinez, 2007; Mercier et al., 2013).

D'autre part, plusieurs études montrent que Notch et Shh sont deux voies simultanément impliquées dans la différenciation neuronale sans qu'une interaction entre elles n'ait été abordée. En effet, plusieurs études présentent les signalisations Notch et Shh comme majeures pour la différenciation des précurseurs neuronaux du tube neural (Gray and Dale, 2010; Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006; Roelink et al., 1995). Cependant, il a aussi été démontré que les activités de ces deux voies pourraient agir séparément, Notch étant impliqué dans la maintenance des précurseurs alors qu'en parallèle Shh induit l'identité neuronale ventrale (Crawford and Roelink, 2007).

Nos résultats préliminaires suggèrent donc pour la première fois l'existence d'une interaction entre ces deux voies au niveau de la ligne médiane antérieure. Cependant ils soulèvent de nombreuses questions sur le mécanisme d'interaction entre la voie Shh et la voie Notch. En particulier, nos expériences d'inhibition des voies Notch et Shh montrent des résultats contradictoires. En effet, d'une part l'inhibition de la voie Notch entraîne une surexpression des marqueurs de neurogenèse, associée à une diminution de l'expression de *Shh*. Alors que d'autre part, l'inhibition de la voie Shh entraîne une diminution de l'expression des marqueurs de neurogenèse. Il est évident, à ce stade, que l'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de l'expression de *Shh* par Notch au niveau de la plaque neurale antérieure sera un défi dans l'avenir pour comprendre la physiopathologie de l'HPE.

- **Le caractère « multi-hit » de l'Holoprosencéphalie**

Les études moléculaires réalisées dans l'HPE humaine et animale ont apporté des arguments dans le sens d'une hypothèse de pathologie multi-hit, et donc dans la nécessité de plusieurs évènements pour conduire à un phénotype HPE. Etant donné l'absence de défauts sévères caractéristiques d'un phénotype HPE lors d'une inactivation de la voie Notch, nous envisageons que des évènements moléculaires supplémentaires soient nécessaires pour obtenir un phénotype HPE.

Cette hypothèse est soutenue par de nombreux exemples chez les modèles souris. En effet, la nécessité d'un digénisme pour obtenir un phénotype HPE a pu être montrée dans de



nombreux modèles transgéniques (Krauss, 2007). Certains gènes identifiés récemment, comme *CDON* ou *GAS1*, se sont avérés avoir un effet mineur, mais pouvant potentialiser la formation d'une HPE si des mutations dans ces gènes étaient associées à d'autres mutations pathogènes ou un fond génétique différent (Geng et al., 2008; Pineda-Alvarez et al., 2011; Ribeiro et al., 2010; Zhang et al., 2006).

En parallèle, l'équipe souhaite générer des doubles mutants chez la souris en utilisant le mutant *Shh*<sup>+/-</sup> et le mutant *RBPJ*<sup>flox/flox</sup> (Chiang et al., 1996; Mourikis et al., 2012). Seul le mutant homozygote pour *Shh* présente une HPE sévère et ce phénotype n'est jamais observé chez les *Shh*<sup>+/-</sup>. Ainsi, l'objectif est d'inactiver spécifiquement l'activité Notch au cours du développement de la ligne médiane dans un fond génétique *Shh*<sup>+/-</sup>. Dans ce contexte, un phénotype de type HPE pourrait être obtenu. Un tel résultat pourrait entériner l'hypothèse d'une synergie entre ces deux voies pour la spécification du cerveau antérieur. Cela conforterait donc l'implication de la voie Notch dans l'apparition de l'HPE.



# CONCLUSION

---

Depuis l'identification du gène majeur, *SHH*, il y a près de 20 ans, l'état des connaissances sur l'origine de l'HPE a considérablement progressé. L'étude de l'HPE pose ainsi la problématique d'une pathologie complexe qui est déterminée à un stade embryonnaire précoce. L'étude de sa physiopathologie nécessite donc l'utilisation de modèles animaux. Cependant cette pathologie implique de nombreuses voies de signalisation, ce qui rend l'utilisation du modèle souris transgénique complexe.

Dans mon travail de thèse, l'utilisation du modèle poulet m'a permis de montrer que Notch exerçait une fonction au cours du développement de la ligne médiane antérieure. Nous avons ainsi augmenté la complexité du réseau de voies de signalisation déjà impliquées dans la spécification du cerveau antérieur. Par ailleurs, au travers des résultats d'expériences d'inhibition couplées, ce travail démontre que le phénotype HPE résulterait de l'addition de dérégulations de plusieurs signaux orchestrant le développement du cerveau antérieur. L'ensemble de ce travail a donc permis d'apporter de nouvelles données fonctionnelles sur le développement précoce du cerveau antérieur en conditions normales et pathologiques.

Toutefois, de véritables enjeux attendent encore les équipes de recherche pour comprendre précisément la physiopathologie de l'HPE et pour définir, au mieux, les mécanismes embryologiques à l'origine du développement de l'encéphale.





# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abdelhamed, Z.A., Wheway, G., Szymanska, K., Natarajan, S., Toomes, C., Inglehearn, C., Johnson, C.A., 2013. Variable expressivity of ciliopathy neurological phenotypes that encompass Meckel-Gruber syndrome and Joubert syndrome is caused by complex de-regulated ciliogenesis, Shh and Wnt signalling defects. *Human molecular genetics* 22, 1358-1372.
- Adam, J., Myat, A., Le Roux, I., Eddison, M., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., Lewis, J., 1998. Cell fate choices and the expression of Notch, Delta and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with *Drosophila* sense-organ development. *Development (Cambridge, England)* 125, 4645-4654.
- Aerts, S., Lambrechts, D., Maity, S., Van Loo, P., Coessens, B., De Smet, F., Tranchevent, L.C., De Moor, B., Marynen, P., Hassan, B., Carmeliet, P., Moreau, Y., 2006. Gene prioritization through genomic data fusion. *Nature biotechnology* 24, 537-544.
- Agarwala, S., Sanders, T.A., Ragsdale, C.W., 2001. Sonic hedgehog control of size and shape in midbrain pattern formation. *Science (New York, N.Y)* 291, 2147-2150.
- Aglyamova, G.V., Agarwala, S., 2007. Gene expression analysis of the hedgehog signaling cascade in the chick midbrain and spinal cord. *Dev Dyn* 236, 1363-1373.
- Allen, B.L., Tenzen, T., McMahon, A.P., 2007. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes & development* 21, 1244-1257.
- Anderson, D.J., Groves, A., Lo, L., Ma, Q., Rao, M., Shah, N.M., Sommer, L., 1997. Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 62, 493-504.
- Anderson, R.M., Lawrence, A.R., Stottmann, R.W., Bachiller, D., Klingensmith, J., 2002. Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse. *Development (Cambridge, England)* 129, 4975-4987.
- Andrews, G.L., Mastick, G.S., 2003. R-cadherin is a Pax6-regulated, growth-promoting cue for pioneer axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 9873-9880.
- Anthwal, N., Pelling, M., Claxton, S., Mellitzer, G., Collin, C., Kessar, N., Richardson, W.D., Gradwohl, G., Ang, S.L., 2013. Conditional deletion of neurogenin-3 using Nkx2.1Cre results in a mouse model for the central control of feeding, activity and obesity. *Disease models & mechanisms* 6, 1133-1145.
- Aoto, K., Shikata, Y., Imai, H., Matsumaru, D., Tokunaga, T., Shioda, S., Yamada, G., Motoyama, J., 2009. Mouse Shh is required for prechordal plate maintenance during brain and craniofacial morphogenesis. *Developmental biology* 327, 106-120.
- Arauz, R.F., Solomon, B.D., Pineda-Alvarez, D.E., Gropman, A.L., Parsons, J.A., Roessler, E., Muenke, M., 2010. A Hypomorphic Allele in the FGF8 Gene Contributes to Holoprosencephaly and Is Allelic to Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency in Humans. *Molecular syndromology* 1, 59-66.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., Fortini, M.E., 1995. Notch signaling. *Science (New York, N.Y)* 268, 225-232.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J., 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, N.Y)* 284, 770-776.



Aujla, P.K., Bora, A., Monahan, P., Sweedler, J.V., Raetzman, L.T., 2011. The Notch effector gene *Hes1* regulates migration of hypothalamic neurons, neuropeptide content and axon targeting to the pituitary. *Developmental biology* 353, 61-71.

Aujla, P.K., Naratadam, G.T., Xu, L., Raetzman, L.T., 2013. Notch/Rbpjkappa signaling regulates progenitor maintenance and differentiation of hypothalamic arcuate neurons. *Development (Cambridge, England)* 140, 3511-3521.

Bae, G.U., Domene, S., Roessler, E., Schachter, K., Kang, J.S., Muenke, M., Krauss, R.S., 2011. Mutations in *CDON*, encoding a hedgehog receptor, result in holoprosencephaly and defective interactions with other hedgehog receptors. *American journal of human genetics* 89, 231-240.

Bae, Y.K., Shimizu, T., Hibi, M., 2005. Patterning of proneuronal and inter-proneuronal domains by hairy- and enhancer of split-related genes in zebrafish neuroectoderm. *Development (Cambridge, England)* 132, 1375-1385.

Baladron, V., Ruiz-Hidalgo, M.J., Nueda, M.L., Diaz-Guerra, M.J., Garcia-Ramirez, J.J., Bonvini, E., Gubina, E., Laborda, J., 2005. *dlk* acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Experimental cell research* 303, 343-359.

Bao, J., Talmage, D.A., Role, L.W., Gautier, J., 2000. Regulation of neurogenesis by interactions between HEN1 and neuronal LMO proteins. *Development (Cambridge, England)* 127, 425-435.

Bardet, S.M., Ferran, J.L., Sanchez-Arrones, L., Puelles, L., 2010. Ontogenetic expression of sonic hedgehog in the chicken subpallium. *Frontiers in neuroanatomy* 4.

Baron, M., 2003. An overview of the Notch signalling pathway. *Seminars in cell & developmental biology* 14, 113-119.

Barr, M., Jr., Hanson, J.W., Currey, K., Sharp, S., Toriello, H., Schmickel, R.D., Wilson, G.N., 1983. Holoprosencephaly in infants of diabetic mothers. *The Journal of pediatrics* 102, 565-568.

Bassett, E.A., Wallace, V.A., 2012. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends in neurosciences* 35, 565-573.

Beddington, R.S., Robertson, E.J., 1999. Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96, 195-209.

Bellavia, D., Campese, A.F., Alesse, E., Vacca, A., Felli, M.P., Balestri, A., Stoppacciaro, A., Tiveron, C., Tatangelo, L., Giovarelli, M., Gaetano, C., Ruco, L., Hoffman, E.S., Hayday, A.C., Lendahl, U., Frati, L., Gulino, A., Screpanti, I., 2000. Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *The EMBO journal* 19, 3337-3348.

Belloni, E., Muenke, M., Roessler, E., Traverso, G., Siegel-Bartelt, J., Frumkin, A., Mitchell, H.F., Donis-Keller, H., Helms, C., Hing, A.V., Heng, H.H., Koop, B., Martindale, D., Rommens, J.M., Tsui, L.C., Scherer, S.W., 1996. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nature genetics* 14, 353-356.

Ben-Arie, N., Hassan, B.A., Bermingham, N.A., Malicki, D.M., Armstrong, D., Matzuk, M., Bellen, H.J., Zoghbi, H.Y., 2000. Functional conservation of *atonal* and *Math1* in the CNS and PNS. *Development (Cambridge, England)* 127, 1039-1048.

Ben-Haim, N., Lu, C., Guzman-Ayala, M., Pescatore, L., Mesnard, D., Bischofberger, M., Naef, F., Robertson, E.J., Constam, D.B., 2006. The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4. *Developmental cell* 11, 313-323.

Bendavid, C., Dubourg, C., Gicquel, I., Pasquier, L., Saugier-veber, P., Durou, M.R., Jaillard, S., Frebourg, T., Haddad, B.R., Henry, C., Odent, S., David, V., 2006. Molecular evaluation of fetuses with holoprosencephaly shows high incidence of microdeletions in the HPE genes. *Human genetics* 119, 1-8.

Bendavid, C., Dupe, V., Rochard, L., Gicquel, I., Dubourg, C., David, V., 2010. Holoprosencephaly: An update on cytogenetic abnormalities. *American journal of medical genetics* 154C, 86-92.

Bendavid, C., Pasquier, L., Watrin, T., Morcel, K., Lucas, J., Gicquel, I., Dubourg, C., Henry, C., David, V., Odent, S., Leveque, J., Pellerin, I., Guerrier, D., 2007. Phenotypic variability of a 4q34-->qter inherited deletion: MRKH syndrome in the daughter, cardiac defect and Fallopian tube cancer in the mother. *European journal of medical genetics* 50, 66-72.

Beres, B.J., George, R., Lougher, E.J., Barton, M., Verrelli, B.C., McGlade, C.J., Rawls, J.A., Wilson-Rawls, J., 2011. Numb regulates Notch1, but not Notch3, during myogenesis. *Mechanisms of development* 128, 247-257.

Berezovska, O., Jack, C., McLean, P., Aster, J.C., Hicks, C., Xia, W., Wolfe, M.S., Weinmaster, G., Selkoe, D.J., Hyman, B.T., 2000. Rapid Notch1 nuclear translocation after ligand binding depends on presenilin-associated gamma-secretase activity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 920, 223-226.

Bertolacini, C.D., Richieri-Costa, A., Ribeiro-Bicudo, L.A., 2010. Sonic hedgehog (SHH) mutation in patients within the spectrum of holoprosencephaly. *Brain & development* 32, 217-222.

Bertrand, N., Castro, D.S., Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature reviews* 3, 517-530.

Bertrand, N., Dahmane, N., 2006. Sonic hedgehog signaling in forebrain development and its interactions with pathways that modify its effects. *Trends in cell biology* 16, 597-605.

Bishop, K.M., Goudreau, G., O'Leary, D.D., 2000. Regulation of area identity in the mammalian neocortex by Emx2 and Pax6. *Science (New York, N.Y)* 288, 344-349.

Blackshaw, S., Scholpp, S., Placzek, M., Ingraham, H., Simerly, R., Shimogori, T., 2010. Molecular pathways controlling development of thalamus and hypothalamus: from neural specification to circuit formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 14925-14930.

Borrell, V., Cardenas, A., Ciceri, G., Galceran, J., Flames, N., Pla, R., Nobrega-Pereira, S., Garcia-Frigola, C., Peregrin, S., Zhao, Z., Ma, L., Tessier-Lavigne, M., Marin, O., 2012. Slit/Robo signaling modulates the proliferation of central nervous system progenitors. *Neuron* 76, 338-352.

Borycki, A., Brown, A.M., Emerson, C.P., Jr., 2000. Shh and Wnt signaling pathways converge to control Gli gene activation in avian somites. *Development (Cambridge, England)* 127, 2075-2087.

Brand, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Beuchle, D., Lun, K., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J., van Eeden, F.J., Nusslein-Volhard, C., 1996. Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development (Cambridge, England)* 123, 179-190.

Briscoe, J., Ericson, J., 1999. The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling. *Seminars in cell & developmental biology* 10, 353-362.

Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M., Ericson, J., 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435-445.

Briscoe, J., Therond, P.P., 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 416-429.

Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., Israel, A., 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular cell* 5, 207-216.

Buchtova, M., Kuo, W.P., Nimmagadda, S., Benson, S.L., Geetha-Loganathan, P., Logan, C., Au-Yeung, T., Chiang, E., Fu, K., Richman, J.M., 2010. Whole genome microarray analysis of chicken embryo facial prominences. *Dev Dyn* 239, 574-591.

Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.A., Dickson, B.J., Basler, K., 1999. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99, 803-815.

Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B.G., Muhr, J., 2003. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nature neuroscience* 6, 1162-1168.

Cabrera, C.V., 1990. Lateral inhibition and cell fate during neurogenesis in *Drosophila*: the interactions between scute, Notch and Delta. *Development (Cambridge, England)* 110, 733-742.

Cabrera, C.V., Alonso, M.C., 1991. Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*. *The EMBO journal* 10, 2965-2973.

Caggiano, M., Kauer, J.S., Hunter, D.D., 1994. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron* 13, 339-352.

Cai, L., Morrow, E.M., Cepko, C.L., 2000. Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival. *Development (Cambridge, England)* 127, 3021-3030.

Camoletto, P., Colesanti, A., Ozon, S., Sobel, A., Fasolo, A., 2001. Expression of stathmin and SCG10 proteins in the olfactory neurogenesis during development and after lesion in the adulthood. *Brain research bulletin* 54, 19-28.

Campos-Ortega, J.A., 1998. The genetics of the *Drosophila* achaete-scute gene complex: a historical appraisal. *The International journal of developmental biology* 42, 291-297.

Caqueret, A., Coumilleau, P., Michaud, J.L., 2005. Regionalization of the anterior hypothalamus in the chick embryo. *Dev Dyn* 233, 652-658.

Carmona-Fontaine, C., Acuna, G., Ellwanger, K., Niehrs, C., Mayor, R., 2007. Neural crests are actively precluded from the anterior neural fold by a novel inhibitory mechanism dependent on Dickkopf1 secreted by the prechordal mesoderm. *Developmental biology* 309, 208-221.

Carp, H.J., 2008. Recurrent miscarriage: genetic factors and assessment of the embryo. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 10, 229-231.

Casarosa, S., Fode, C., Guillemot, F., 1999. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development (Cambridge, England)* 126, 525-534.

Caspary, T., Garcia-Garcia, M.J., Huangfu, D., Eggenschwiler, J.T., Wyler, M.R., Rakeman, A.S., Alcorn, H.L., Anderson, K.V., 2002. Mouse Dispatched homolog1 is required for long-range, but not juxtacrine, Hh signaling. *Current biology : CB* 12, 1628-1632.

Castro, D.S., Guillemot, F., 2011. Old and new functions of proneural factors revealed by the genome-wide characterization of their transcriptional targets. *Cell cycle* 10, 4026-4031.

Castro, D.S., Martynoga, B., Parras, C., Ramesh, V., Pacary, E., Johnston, C., Drechsel, D., Lebel-Potter, M., Garcia, L.G., Hunt, C., Dolle, D., Bithell, A., Ettwiller, L., Buckley, N., Guillemot, F., 2011. A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation

identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes & development* 25, 930-945.

Castro, D.S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I.J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J.A., Nguyen, L., Gossler, A., Gottgens, B., Matter, J.M., Guillemot, F., 2006. Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Developmental cell* 11, 831-844.

Cau, E., Casarosa, S., Guillemot, F., 2002. Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development (Cambridge, England)* 129, 1871-1880.

Cau, E., Gradwohl, G., Casarosa, S., Kageyama, R., Guillemot, F., 2000. Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Development (Cambridge, England)* 127, 2323-2332.

Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C., Guillemot, F., 1997. Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development (Cambridge, England)* 124, 1611-1621.

Cau, E., Quillien, A., Blader, P., 2008. Notch resolves mixed neural identities in the zebrafish epiphysis. *Development (Cambridge, England)* 135, 2391-2401.

Cayouette, M., Raff, M., 2002. Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from *Drosophila* to mammals. *Nature neuroscience* 5, 1265-1269.

Cayuso, J., Ulloa, F., Cox, B., Briscoe, J., Marti, E., 2006. The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development (Cambridge, England)* 133, 517-528.

Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M., Ezzeddine, D., 1996. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 589-595.

Chapman, G., Liu, L., Sahlgren, C., Dahlqvist, C., Lendahl, U., 2006. High levels of Notch signaling down-regulate Numb and Numbl-like. *The Journal of cell biology* 175, 535-540.

Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., Beachy, P.A., 2002a. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & development* 16, 2743-2748.

Chen, J.K., Taipale, J., Young, K.E., Maiti, T., Beachy, P.A., 2002b. Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14071-14076.

Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., Beachy, P.A., 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.

Chitnis, A.B., 1995. The role of Notch in lateral inhibition and cell fate specification. *Molecular and cellular neurosciences* 6, 311-321.

Cohen, M.M., Jr., 1989. Holoprosencephaly and cytogenetic findings: further information. *Am J Med Genet* 34, 265.

Cohen, M.M., Jr., Shiota, K., 2002. Teratogenesis of holoprosencephaly. *Am J Med Genet* 109, 1-15.

Conlon, F.L., Lyons, K.M., Takaesu, N., Barth, K.S., Kispert, A., Herrmann, B., Robertson, E.J., 1994. A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development (Cambridge, England)* 120, 1919-1928.

Conlon, R.A., Reaume, A.G., Rossant, J., 1995. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development (Cambridge, England)* 121, 1533-1545.

Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E., Beachy, P.A., 1998. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science (New York, N.Y)* 280, 1603-1607.

Cooper, M.K., Wassif, C.A., Krakowiak, P.A., Taipale, J., Gong, R., Kelley, R.I., Porter, F.D., Beachy, P.A., 2003. A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nature genetics* 33, 508-513.

Cordero, D., Marcucio, R., Hu, D., Gaffield, W., Tapadia, M., Helms, J.A., 2004. Temporal perturbations in sonic hedgehog signaling elicit the spectrum of holoprosencephaly phenotypes. *The Journal of clinical investigation* 114, 485-494.

Crawford, T.Q., Roelink, H., 2007. The notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling. *Dev Dyn* 236, 886-892.

Croizier, S., Amiot, C., Chen, X., Presse, F., Nahon, J.L., Wu, J.Y., Fellmann, D., Risold, P.Y., 2011. Development of posterior hypothalamic neurons enlightens a switch in the prosencephalic basic plan. *PLoS one* 6, e28574.

Crossley, P.H., Martinez, S., Ohkubo, Y., Rubenstein, J.L., 2001. Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* 108, 183-206.

Culi, J., Modolell, J., 1998. Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes & development* 12, 2036-2047.

Currle, D.S., Cheng, X., Hsu, C.M., Monuki, E.S., 2005. Direct and indirect roles of CNS dorsal midline cells in choroid plexus epithelia formation. *Development (Cambridge, England)* 132, 3549-3559.

DaCosta Byfield, S., Major, C., Laping, N.J., Roberts, A.B., 2004. SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology* 65, 744-752.

Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M., Ishii, S., 1999. Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *The Journal of biological chemistry* 274, 8143-8152.

Dale, J.K., Maroto, M., 2003. A Hes1-based oscillator in cultured cells and its potential implications for the segmentation clock. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 25, 200-203.

Dale, J.K., Vesque, C., Lints, T.J., Sampath, T.K., Furley, A., Dodd, J., Placzek, M., 1997. Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell* 90, 257-269.

Davis, R.L., Turner, D.L., 2001. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20, 8342-8357.

de la Cruz, J.M., Bamford, R.N., Burdine, R.D., Roessler, E., Barkovich, A.J., Donnai, D., Schier, A.F., Muenke, M., 2002. A loss-of-function mutation in the CFC domain of TDGF1 is associated with human forebrain defects. *Human genetics* 110, 422-428.

de la Pompa, J.L., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T.W., Rossant, J., Conlon, R.A., 1997. Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development (Cambridge, England)* 124, 1139-1148.

de Souza, F.S., Niehrs, C., 2000. Anterior endoderm and head induction in early vertebrate embryos. *Cell and tissue research* 300, 207-217.

Demyer, W., Zeman, W., 1963. Alobar holoprosencephaly (arhinencephaly) with median cleft lip and palate: clinical, electroencephalographic and nosologic considerations. *Confinia neurologica* 23, 1-36.

Dias, M.S., Partington, M., 2004. Embryology of myelomeningocele and anencephaly. *Neurosurgical focus* 16, E1.

Dominguez, L., Gonzalez, A., Moreno, N., 2010. Sonic hedgehog expression during *Xenopus laevis* forebrain development. *Brain Res* 1347, 19-32.

Dovey, H.F., John, V., Anderson, J.P., Chen, L.Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L.Y., Freedman, S.B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E.J., Hu, K.L., Johnson-Wood, K.L., Kennedy, S.L., Kholodenko, D., Knops, J.E., Latimer, L.H., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I.M., Motter, R.N., Mutter, L.C., Nietz, J., Quinn, K.P., Sacchi, K.L., Seubert, P.A., Shopp, G.M., Thorsett, E.D., Tung, J.S., Wu, J., Yang, S., Yin, C.T., Schenk, D.B., May, P.C., Altstiel, L.D., Bender, M.H., Boggs, L.N., Britton, T.C., Clemens, J.C., Czilli, D.L., Dieckman-McGinty, D.K., Droste, J.J., Fuson, K.S., Gitter, B.D., Hyslop, P.A., Johnstone, E.M., Li, W.Y., Little, S.P., Mabry, T.E., Miller, F.D., Audia, J.E., 2001. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *Journal of neurochemistry* 76, 173-181.

Dubourg, C., Bendavid, C., Pasquier, L., Henry, C., Odent, S., David, V., 2007. Holoprosencephaly. *Orphanet journal of rare diseases* 2, 8.

Dubourg, C., David, V., Gropman, A., Mercier, S., Muenke, M., Odent, S., Pineda-Alvarez, D.E., Roessler, E., 2011. Clinical utility gene card for: Holoprosencephaly. *European journal of human genetics : EJHG* 19, preceeding 118-120.

Dunn, M.K., Mercola, M., Moore, D.D., 1995. Cyclopamine, a steroidal alkaloid, disrupts development of cranial neural crest cells in *Xenopus*. *Dev Dyn* 202, 255-270.

Dupé, V., Lumsden, A., 2001. Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling. *Development (Cambridge, England)* 128, 2199-2208.

Dupé, V., Rochard, L., Mercier, S., Le Petillon, Y., Gicquel, I., Bendavid, C., Bourrouillou, G., Kini, U., Thauvin-Robinet, C., Bohan, T.P., Odent, S., Dubourg, C., David, V., 2011. NOTCH, a new signaling pathway implicated in holoprosencephaly. *Human molecular genetics* 20, 1122-1131.

Dutta, S., Dietrich, J.E., Westerfield, M., Varga, Z.M., 2008. Notch signaling regulates endocrine cell specification in the zebrafish anterior pituitary. *Developmental biology* 319, 248-257.

Easter, S.S., Jr., Ross, L.S., Frankfurter, A., 1993. Initial tract formation in the mouse brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13, 285-299.

Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., Sklar, J., 1991. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649-661.

Epstein, C.J., Seto, S., Golabi, M., 1988. Chance vs. causality in the association of Down syndrome and holoprosencephaly. *Am J Med Genet* 30, 939-942.

Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T.M., Edlund, T., 1995. Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81, 747-756.

Farah, M.H., Olson, J.M., Sucic, H.B., Hume, R.I., Tapscott, S.J., Turner, D.L., 2000. Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development (Cambridge, England)* 127, 693-702.



Fernandes, M., Gutin, G., Alcorn, H., McConnell, S.K., Hebert, J.M., 2007. Mutations in the BMP pathway in mice support the existence of two molecular classes of holoprosencephaly. *Development (Cambridge, England)* 134, 3789-3794.

Fernandes, M., Hebert, J.M., 2008. The ups and downs of holoprosencephaly: dorsal versus ventral patterning forces. *Clinical genetics* 73, 413-423.

Ferri, A., Favaro, R., Beccari, L., Bertolini, J., Mercurio, S., Nieto-Lopez, F., Verzeroli, C., La Regina, F., De Pietri Tonelli, D., Ottolenghi, S., Bovolenta, P., Nicolis, S.K., 2013. Sox2 is required for embryonic development of the ventral telencephalon through the activation of the ventral determinants Nkx2.1 and Shh. *Development (Cambridge, England)* 140, 1250-1261.

Fior, R., Henrique, D., 2005. A novel hes5/hes6 circuitry of negative regulation controls Notch activity during neurogenesis. *Developmental biology* 281, 318-333.

Fischer, A., Gessler, M., 2003. Hey genes in cardiovascular development. *Trends in cardiovascular medicine* 13, 221-226.

Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M., Gessler, M., 2004. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes & development* 18, 901-911.

Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMeur, M., Goridis, C., Guillemot, F., 1998. The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 20, 483-494.

Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.L., Anderson, D.J., Guillemot, F., 2000. A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes & development* 14, 67-80.

Fornaro, M., Geuna, S., Fasolo, A., Giacobini-Robecchi, M.G., 2003. HuC/D confocal imaging points to olfactory migratory cells as the first cell population that expresses a post-mitotic neuronal phenotype in the chick embryo. *Neuroscience* 122, 123-128.

Fotaki, V., Price, D.J., Mason, J.O., 2011. Wnt/beta-catenin signaling is disrupted in the extra-toes (Gli3(Xt/Xt) ) mutant from early stages of forebrain development, concomitant with anterior neural plate patterning defects. *The Journal of comparative neurology* 519, 1640-1657.

Franca, M.M., Jorge, A.A., Carvalho, L.R., Costalonga, E.F., Vasques, G.A., Leite, C.C., Mendonca, B.B., Arnhold, I.J., 2010. Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95, E384-391.

Fuccillo, M., Rutlin, M., Fishell, G., 2006. Removal of Pax6 partially rescues the loss of ventral structures in Shh null mice. *Cerebral cortex* 16 Suppl 1, i96-102.

Gallahan, D., Callahan, R., 1997. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* 14, 1883-1890.

Ge, W., Martinowich, K., Wu, X., He, F., Miyamoto, A., Fan, G., Weinmaster, G., Sun, Y.E., 2002. Notch signaling promotes astroglialogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation. *Journal of neuroscience research* 69, 848-860.

Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L., Haass, C., 2002. A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO reports* 3, 688-694.

Geng, X., Oliver, G., 2009. Pathogenesis of holoprosencephaly. *The Journal of clinical investigation* 119, 1403-1413.

Geng, X., Speirs, C., Lagutin, O., Inbal, A., Liu, W., Solnica-Krezel, L., Jeong, Y., Epstein, D.J., Oliver, G., 2008. Haploinsufficiency of *Six3* fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly. *Developmental cell* 15, 236-247.

Gimeno, L., Martinez, S., 2007. Expression of chick *Fgf19* and mouse *Fgf15* orthologs is regulated in the developing brain by *Fgf8* and *Shh*. *Dev Dyn* 236, 2285-2297.

Gooley, J.J., Schomer, A., Saper, C.B., 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nature neuroscience* 9, 398-407.

Gowan, K., Helms, A.W., Hunsaker, T.L., Collisson, T., Ebert, P.J., Odom, R., Johnson, J.E., 2001. Crossinhibitory activities of *Ngn1* and *Math1* allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* 31, 219-232.

Gray, S.D., Dale, J.K., 2010. Notch signalling regulates the contribution of progenitor cells from the chick Hensen's node to the floor plate and notochord. *Development (Cambridge, England)* 137, 561-568.

Greenwald, I., Rubin, G.M., 1992. Making a difference: the role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells. *Cell* 68, 271-281.

Gritsman, K., Talbot, W.S., Schier, A.F., 2000. Nodal signaling patterns the organizer. *Development (Cambridge, England)* 127, 921-932.

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

Guillemot, F., 2007. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development (Cambridge, England)* 134, 3771-3780.

Guillemot, F., Joyner, A.L., 1993. Dynamic expression of the murine *Achaete-Scute* homologue *Mash-1* in the developing nervous system. *Mechanisms of development* 42, 171-185.

Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, A., Anderson, D.J., Joyner, A.L., 1993. Mammalian *achaete-scute* homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476.

Gulacsi, A., Anderson, S.A., 2006. *Shh* maintains *Nkx2.1* in the MGE by a *Gli3*-independent mechanism. *Cerebral cortex* 16 Suppl 1, i89-95.

Gunhaga, L., Jessell, T.M., Edlund, T., 2000. Sonic hedgehog signaling at gastrula stages specifies ventral telencephalic cells in the chick embryo. *Development (Cambridge, England)* 127, 3283-3293.

Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israel, A., Brou, C., 2004. Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. *The Journal of cell biology* 166, 73-83.

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

Hadas, Y., Nitzan, N., Furley, A.J., Kozlov, S.V., Klar, A., 2013. Distinct cis regulatory elements govern the expression of *TAG1* in embryonic sensory ganglia and spinal cord. *PLoS one* 8, e57960.

Hagos, E.G., Dougan, S.T., 2007. Time-dependent patterning of the mesoderm and endoderm by Nodal signals in zebrafish. *BMC developmental biology* 7, 22.

Hahn, J.S., Barnes, P.D., 2010. Neuroimaging advances in holoprosencephaly: Refining the spectrum of the midline malformation. *American journal of medical genetics* 154C, 120-132.

Hahn, J.S., Hahn, S.M., Kammann, H., Barkovich, A.J., Clegg, N.J., Delgado, M.R., Levey, E., 2005. Endocrine disorders associated with holoprosencephaly. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 18, 935-941.

Halilagic, A., Zile, M.H., Studer, M., 2003. A novel role for retinoids in patterning the avian forebrain during presomite stages. *Development (Cambridge, England)* 130, 2039-2050.

Hamada, Y., Kadokawa, Y., Okabe, M., Ikawa, M., Coleman, J.R., Tsujimoto, Y., 1999. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development (Cambridge, England)* 126, 3415-3424.

Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 195, 231-272.

Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K., Honjo, T., 2002. Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *International immunology* 14, 637-645.

Hashimoto-Torii, K., Motoyama, J., Hui, C.C., Kuroiwa, A., Nakafuku, M., Shimamura, K., 2003. Differential activities of Sonic hedgehog mediated by Gli transcription factors define distinct neuronal subtypes in the dorsal thalamus. *Mechanisms of development* 120, 1097-1111.

Hassan, B.A., Bermingham, N.A., He, Y., Sun, Y., Jan, Y.N., Zoghbi, H.Y., Bellen, H.J., 2000. atonal regulates neurite arborization but does not act as a proneural gene in the Drosophila brain. *Neuron* 25, 549-561.

Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., Kageyama, R., 2004. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development (Cambridge, England)* 131, 5539-5550.

Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Kageyama, R., 2006. Hes1 and Hes5 regulate the development of the cranial and spinal nerve systems. *Developmental neuroscience* 28, 92-101.

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

Hatayama, M., Ishiguro, A., Iwayama, Y., Takashima, N., Sakoori, K., Toyota, T., Nozaki, Y., Odaka, Y.S., Yamada, K., Yoshikawa, T., Aruga, J., 2011. Zic2 hypomorphic mutant mice as a schizophrenia model and ZIC2 mutations identified in schizophrenia patients. *Scientific reports* 1, 16.

Hayhurst, M., McConnell, S.K., 2003. Mouse models of holoprosencephaly. *Current opinion in neurology* 16, 135-141.

Hebert, J.M., Mishina, Y., McConnell, S.K., 2002. BMP signaling is required locally to pattern the dorsal telencephalic midline. *Neuron* 35, 1029-1041.

Heitzler, P., 2010. Biodiversity and noncanonical Notch signaling. *Current topics in developmental biology* 92, 457-481.

Heitzler, P., Simpson, P., 1991. The choice of cell fate in the epidermis of Drosophila. *Cell* 64, 1083-1092.

Helms, J.A., Cordero, D., Tapadia, M.D., 2005. New insights into craniofacial morphogenesis. *Development* 132, 851-861.

Henke, R.M., Meredith, D.M., Borromeo, M.D., Savage, T.K., Johnson, J.E., 2009. Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube. *Developmental biology* 328, 529-540.

Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., 1995. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-790.

Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D., Lewis, J., 1997. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Current biology : CB* 7, 661-670.

Higashiyama, D., Saitsu, H., Komada, M., Takigawa, T., Ishibashi, M., Shiota, K., 2007. Sequential developmental changes in holoprosencephalic mouse embryos exposed to ethanol during the gastrulation period. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 79, 513-523.

Hirata, H., Yoshiura, S., Ohtsuka, T., Bessho, Y., Harada, T., Yoshikawa, K., Kageyama, R., 2002. Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. *Science (New York, N.Y)* 298, 840-843.

Hoch, R.V., Rubenstein, J.L., Pleasure, S., 2009. Genes and signaling events that establish regional patterning of the mammalian forebrain. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 378-386.

Holz, A., Kollmus, H., Ryge, J., Niederkofler, V., Dias, J., Ericson, J., Stoeckli, E.T., Kiehn, O., Arnold, H.H., 2010. The transcription factors Nkx2.2 and Nkx2.9 play a novel role in floor plate development and commissural axon guidance. *Development (Cambridge, England)* 137, 4249-4260.

Hong, M., Krauss, R.S., 2012. Cdon mutation and fetal ethanol exposure synergize to produce midline signaling defects and holoprosencephaly spectrum disorders in mice. *PLoS genetics* 8, e1002999.

Hoodless, P.A., Pye, M., Chazaud, C., Labbe, E., Attisano, L., Rossant, J., Wrana, J.L., 2001. FoxH1 (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse. *Genes & development* 15, 1257-1271.

Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Kawauchi, S., Ema, M., Yamamoto, M., Fujii-Kuriyama, Y., 2001. Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 6, 361-374.

Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M., Wilson, S., 2002. Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* 35, 255-265.

Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd, Gossler, A., 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386, 717-721.

Hu, Q., Ueno, N., Behringer, R.R., 2004. Restriction of BMP4 activity domains in the developing neural tube of the mouse embryo. *EMBO reports* 5, 734-739.

Huang, H.P., Liu, M., El-Hodiri, H.M., Chu, K., Jamrich, M., Tsai, M.J., 2000. Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Molecular and cellular biology* 20, 3292-3307.

Huang, J., Hoffman, J.D., Zhang, Y., Maisenbacher, M.K., Zackai, E.H., Weber, B.L., Ming, J.E., 2006. Identification of a submicroscopic deletion of SHH associated with the holoprosencephaly spectrum by array-based CGH. *Clinical genetics* 69, 367-369.

Imayoshi, I., Shimogori, T., Ohtsuka, T., Kageyama, R., 2008. Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. *Development (Cambridge, England)* 135, 2531-2541.

Imayoshi, I., Shimojo, H., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Kageyama, R., 2013. Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 70, 2045-2057.

Incardona, J.P., Gaffield, W., Kapur, R.P., Roelink, H., 1998. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development (Cambridge, England)* 125, 3553-3562.

Ishibashi, M., Ang, S.L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R., Guillemot, F., 1995. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes & development* 9, 3136-3148.

Ishibashi, M., McMahon, A.P., 2002. A sonic hedgehog-dependent signaling relay regulates growth of diencephalic and mesencephalic primordia in the early mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* 129, 4807-4819.

Iso, T., Kedes, L., Hamamori, Y., 2003. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *Journal of cellular physiology* 194, 237-255.

Iso, T., Sartorelli, V., Poizat, C., Iezzi, S., Wu, H.Y., Chung, G., Kedes, L., Hamamori, Y., 2001. HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling. *Molecular and cellular biology* 21, 6080-6089.

Jacob, J., Kong, J., Moore, S., Milton, C., Sasai, N., Gonzalez-Quevedo, R., Terriente, J., Imayoshi, I., Kageyama, R., Wilkinson, D.G., Novitsch, B.G., Briscoe, J., 2013. Retinoid acid specifies neuronal identity through graded expression of *Ascl1*. *Current biology : CB* 23, 412-418.

Jalali, A., Bassuk, A.G., Kan, L., Israsena, N., Mukhopadhyay, A., McGuire, T., Kessler, J.A., 2011. *HeyL* promotes neuronal differentiation of neural progenitor cells. *Journal of neuroscience research* 89, 299-309.

Jarriault, S., Greenwald, I., 2005. Evidence for functional redundancy between *C. elegans* ADAM proteins SUP-17/Kuzbanian and ADM-4/TACE. *Developmental biology* 287, 1-10.

Jeong, Y., Leskow, F.C., El-Jaick, K., Roessler, E., Muenke, M., Yocum, A., Dubourg, C., Li, X., Geng, X., Oliver, G., Epstein, D.J., 2008. Regulation of a remote *Shh* forebrain enhancer by the *Six3* homeoprotein. *Nature genetics* 40, 1348-1353.

Jimenez, F., Campos-Ortega, J.A., 1990. Defective neuroblast commitment in mutants of the achaete-scute complex and adjacent genes of *D. melanogaster*. *Neuron* 5, 81-89.

Johnson, J.E., Birren, S.J., Anderson, D.J., 1990. Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346, 858-861.

Kageyama, R., Ohtsuka, T., 1999. The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell research* 9, 179-188.

Kageyama, R., Ohtsuka, T., Kobayashi, T., 2007. The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development (Cambridge, England)* 134, 1243-1251.

Kageyama, R., Sasai, Y., Akazawa, C., Ishibashi, M., Takebayashi, K., Shimizu, C., Tomita, K., Nakanishi, S., 1995. Regulation of mammalian neural development by helix-loop-helix transcription factors. *Critical reviews in neurobiology* 9, 177-188.

Kapsimali, M., Caneparo, L., Houart, C., Wilson, S.W., 2004. Inhibition of Wnt/Axin/beta-catenin pathway activity promotes ventral CNS midline tissue to adopt hypothalamic rather than floorplate identity. *Development (Cambridge, England)* 131, 5923-5933.

Kawaguchi, D., Yoshimatsu, T., Hozumi, K., Gotoh, Y., 2008. Selection of differentiating cells by different levels of delta-like 1 among neural precursor cells in the developing mouse telencephalon. *Development (Cambridge, England)* 135, 3849-3858.

Kawakami, T., Kawcak, T., Li, Y.J., Zhang, W., Hu, Y., Chuang, P.T., 2002. Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling. *Development (Cambridge, England)* 129, 5753-5765.

Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A.L., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., Ang, S.L., 2006. Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development (Cambridge, England)* 133, 495-505.

Kelemenova, S., Ostatnikova, D., 2009. Neuroendocrine pathways altered in autism. Special role of reelin. *Neuro endocrinology letters* 30, 429-436.

Kiernan, A.E., 2013. Notch signaling during cell fate determination in the inner ear. *Seminars in cell & developmental biology* 24, 470-479.

Kintner, C., 2002. Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 639-643.

Kita, A., Imayoshi, I., Hojo, M., Kitagawa, M., Kokubu, H., Ohsawa, R., Ohtsuka, T., Kageyama, R., Hashimoto, N., 2007. Hes1 and Hes5 control the progenitor pool, intermediate lobe specification, and posterior lobe formation in the pituitary development. *Molecular endocrinology* 21, 1458-1466.

Klingensmith, J., Matsui, M., Yang, Y.P., Anderson, R.M., 2010. Roles of bone morphogenetic protein signaling and its antagonism in holoprosencephaly. *American journal of medical genetics* 154C, 43-51.

Knepper, J.L., James, A.C., Ming, J.E., 2006. TGIF, a gene associated with human brain defects, regulates neuronal development. *Dev Dyn* 235, 1482-1490.

Kobayashi, T., Yasuda, K., Araki, M., 2010. Coordinated regulation of dorsal bone morphogenetic protein 4 and ventral Sonic hedgehog signaling specifies the dorso-ventral polarity in the optic vesicle and governs ocular morphogenesis through fibroblast growth factor 8 upregulation. *Development, growth & differentiation* 52, 351-363.

Komada, M., Saito, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., Ishibashi, M., 2008. Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development (Cambridge, England)* 135, 2717-2727.

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

Krauss, R.S., 2007. Holoprosencephaly: new models, new insights. *Expert reviews in molecular medicine* 9, 1-17.

Kriks, S., Lanuza, G.M., Mizuguchi, R., Nakafuku, M., Goulding, M., 2005. Gsh2 is required for the repression of Ngn1 and specification of dorsal interneuron fate in the spinal cord. *Development (Cambridge, England)* 132, 2991-3002.

Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., Gruters, A., 1998. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature genetics* 19, 155-157.

Lacbawan, F., Solomon, B.D., Roessler, E., El-Jaick, K., Domene, S., Velez, J.I., Zhou, N., Hadley, D., Balog, J.Z., Long, R., Fryer, A., Smith, W., Omar, S., McLean, S.D., Clarkson, K., Lichty, A., Clegg, N.J., Delgado, M.R., Levey, E., Stashinko, E., Potocki, L., Vanallen, M.I., Clayton-Smith, J., Donnai, D., Bianchi, D.W., Juliusson, P.B., Njolstad, P.R., Brunner, H.G., Carey, J.C., Hehr, U., Musebeck, J., Wieacker, P.F., Postra, A., Hennekam, R.C., van den

Boogaard, M.J., van Haeringen, A., Paulussen, A., Herbergs, J., Schrandt-Stumpel, C.T., Janecke, A.R., Chitayat, D., Hahn, J., McDonald-McGinn, D.M., Zackai, E.H., Dobyns, W.B., Muenke, M., 2009. Clinical spectrum of SIX3-associated mutations in holoprosencephaly: correlation between genotype, phenotype and function. *Journal of medical genetics* 46, 389-398.

Lacomme, M., Liaubet, L., Pituello, F., Bel-Vialar, S., 2012. NEUROG2 drives cell cycle exit of neuronal precursors by specifically repressing a subset of cyclins acting at the G1 and S phases of the cell cycle. *Molecular and cellular biology* 32, 2596-2607.

Lai, H.C., Klisch, T.J., Roberts, R., Zoghbi, H.Y., Johnson, J.E., 2011. In vivo neuronal subtype-specific targets of Atoh1 (Math1) in dorsal spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 10859-10871.

Lana-Elola, E., Tylzanowski, P., Takatalo, M., Alakurtti, K., Veistinen, L., Mitsiadis, T.A., Graf, D., Rice, R., Luyten, F.P., Rice, D.P., 2011. Noggin null allele mice exhibit a microform of holoprosencephaly. *Human molecular genetics* 20, 4005-4015.

Lardelli, M., Williams, R., Mitsiadis, T., Lendahl, U., 1996. Expression of the Notch 3 intracellular domain in mouse central nervous system progenitor cells is lethal and leads to disturbed neural tube development. *Mechanisms of development* 59, 177-190.

Latasa, M.J., Cisneros, E., Frade, J.M., 2009. Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *The International journal of developmental biology* 53, 895-908.

Le Bras, S., Loyer, N., Le Borgne, R., 2011. The multiple facets of ubiquitination in the regulation of notch signaling pathway. *Traffic* 12, 149-161.

Le Moigne, A., 1997. *Biologie du développement*. Paris: Masson, 4e édition.

Lee, S.Y., Kumano, K., Nakazaki, K., Sanada, M., Matsumoto, A., Yamamoto, G., Nannya, Y., Suzuki, R., Ota, S., Ota, Y., Izutsu, K., Sakata-Yanagimoto, M., Hangaishi, A., Yagita, H., Fukayama, M., Seto, M., Kurokawa, M., Ogawa, S., Chiba, S., 2009. Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer science* 100, 920-926.

Lewis, J., 1996. Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis. *Current opinion in neurobiology* 6, 3-10.

Li, H., Zeitler, P.S., Valerius, M.T., Small, K., Potter, S.S., 1996. Gsh-1, an orphan Hox gene, is required for normal pituitary development. *The EMBO journal* 15, 714-724.

Li, X., Chiang, H.I., Zhu, J., Dowd, S.E., Zhou, H., 2008. Characterization of a newly developed chicken 44K Agilent microarray. *BMC genomics* 9, 60.

Lin, A.E., Siebert, J.R., Graham, J.M., Jr., 1990. Central nervous system malformations in the CHARGE association. *Am J Med Genet* 37, 304-310.

Lipinski, R.J., Gipp, J.J., Zhang, J., Doles, J.D., Bushman, W., 2006. Unique and complimentary activities of the Gli transcription factors in Hedgehog signaling. *Experimental cell research* 312, 1925-1938.

Lipinski, R.J., Hutson, P.R., Hannam, P.W., Nydza, R.J., Washington, I.M., Moore, R.W., Girdaukas, G.G., Peterson, R.E., Bushman, W., 2008. Dose- and route-dependent teratogenicity, toxicity, and pharmacokinetic profiles of the hedgehog signaling antagonist cyclopamine in the mouse. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 104, 189-197.

Liu, A., Niswander, L.A., 2005. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nature reviews* 6, 945-954.

Liu, K.J., Harland, R.M., 2003. Cloning and characterization of *Xenopus* Id4 reveals differing roles for Id genes. *Developmental biology* 264, 339-351.

Liu, M., Pleasure, S.J., Collins, A.E., Noebels, J.L., Naya, F.J., Tsai, M.J., Lowenstein, D.H., 2000. Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 865-870.

Lobjois, V., Benazeraf, B., Bertrand, N., Medevielle, F., Pituello, F., 2004. Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and Shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development. *Developmental biology* 273, 195-209.

Long, H., Sabatier, C., Ma, L., Plump, A., Yuan, W., Ornitz, D.M., Tamada, A., Murakami, F., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., 2004. Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42, 213-223.

Louvi, A., Artavanis-Tsakonas, S., 2006. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nature reviews* 7, 93-102.

Louvi, A., Artavanis-Tsakonas, S., 2012. Notch and disease: a growing field. *Seminars in cell & developmental biology* 23, 473-480.

Lowe, L.A., Yamada, S., Kuehn, M.R., 2001. Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* 128, 1831-1843.

Lu, C.C., Robertson, E.J., 2004. Multiple roles for Nodal in the epiblast of the mouse embryo in the establishment of anterior-posterior patterning. *Developmental biology* 273, 149-159.

Lutolf, S., Radtke, F., Aguet, M., Suter, U., Taylor, V., 2002. Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development (Cambridge, England)* 129, 373-385.

Luxardi, G., Marchal, L., Thome, V., Kodjabachian, L., 2010. Distinct *Xenopus* Nodal ligands sequentially induce mesendoderm and control gastrulation movements in parallel to the Wnt/PCP pathway. *Development (Cambridge, England)* 137, 417-426.

Lyden, D., Young, A.Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B.L., Hynes, R.O., Zhuang, Y., Manova, K., Benezra, R., 1999. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401, 670-677.

Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J.L., Anderson, D.J., 1998. neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20, 469-482.

Ma, Q., Fode, C., Guillemot, F., Anderson, D.J., 1999. Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes & development* 13, 1717-1728.

Ma, Q., Kintner, C., Anderson, D.J., 1996. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.

Ma, Q.H., Bagnard, D., Xiao, Z.C., Dawe, G.S., 2008a. A TAG on to the neurogenic functions of APP. *Cell adhesion & migration* 2, 2-8.

Ma, Q.H., Futagawa, T., Yang, W.L., Jiang, X.D., Zeng, L., Takeda, Y., Xu, R.X., Bagnard, D., Schachner, M., Furley, A.J., Karagogeos, D., Watanabe, K., Dawe, G.S., Xiao, Z.C., 2008b. A TAG1-APP signalling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis. *Nature cell biology* 10, 283-294.

Ma, W., Yan, R.T., Mao, W., Wang, S.Z., 2009. Neurogenin3 promotes early retinal neurogenesis. *Molecular and cellular neurosciences* 40, 187-198.



Macdonald, R., Barth, K.A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I., Wilson, S.W., 1995. Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development (Cambridge, England)* 121, 3267-3278.

Maier, E., Gunhaga, L., 2009. Dynamic expression of neurogenic markers in the developing chick olfactory epithelium. *Dev Dyn* 238, 1617-1625.

Maier, E., Nord, H., von Hofsten, J., Gunhaga, L., 2011. A balance of BMP and notch activity regulates neurogenesis and olfactory nerve formation. *PLoS one* 6, e17379.

Manning, L., Ohyama, K., Saeger, B., Hatano, O., Wilson, S.A., Logan, M., Placzek, M., 2006. Regional morphogenesis in the hypothalamus: a BMP-Tbx2 pathway coordinates fate and proliferation through Shh downregulation. *Developmental cell* 11, 873-885.

Manuel, M.N., Martynoga, B., Molinek, M.D., Quinn, J.C., Kroemmer, C., Mason, J.O., Price, D.J., 2011. The transcription factor Foxg1 regulates telencephalic progenitor proliferation cell autonomously, in part by controlling Pax6 expression levels. *Neural development* 6, 9.

Marillat, V., Cases, O., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., Chedotal, A., 2002. Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *The Journal of comparative neurology* 442, 130-155.

Marin, O., Baker, J., Puellas, L., Rubenstein, J.L., 2002. Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. *Development (Cambridge, England)* 129, 761-773.

Martinez-Ferre, A., Martinez, S., 2012. Molecular regionalization of the diencephalon. *Frontiers in neuroscience* 6, 73.

Mason, H.A., Rakowiecki, S.M., Raftopoulou, M., Nery, S., Huang, Y., Gridley, T., Fishell, G., 2005. Notch signaling coordinates the patterning of striatal compartments. *Development (Cambridge, England)* 132, 4247-4258.

Mastick, G.S., Easter, S.S., Jr., 1996. Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain. *Developmental biology* 173, 79-94.

Mathieu, J., Barth, A., Rosa, F.M., Wilson, S.W., Peyrieras, N., 2002. Distinct and cooperative roles for Nodal and Hedgehog signals during hypothalamic development. *Development (Cambridge, England)* 129, 3055-3065.

Mattar, P., Britz, O., Johannes, C., Nieto, M., Ma, L., Rebeyka, A., Klenin, N., Polleux, F., Guillemot, F., Schuurmans, C., 2004. A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex. *Developmental biology* 273, 373-389.

McArthur, T., Ohtoshi, A., 2007. A brain-specific homeobox gene, Bsx, is essential for proper postnatal growth and nursing. *Molecular and cellular biology* 27, 5120-5127.

McCabe, M.J., Alatzoglou, K.S., Dattani, M.T., 2011. Septo-optic dysplasia and other midline defects: the role of transcription factors: HESX1 and beyond. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 25, 115-124.

McGill, M.A., Dho, S.E., Weinmaster, G., McGlade, C.J., 2009. Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. *The Journal of biological chemistry* 284, 26427-26438.

McNay, D.E., Pelling, M., Claxton, S., Guillemot, F., Ang, S.L., 2006. Mash1 is required for generic and subtype differentiation of hypothalamic neuroendocrine cells. *Molecular endocrinology* 20, 1623-1632.

Mercier, S., David, V., Ratie, L., Gicquel, I., Odent, S., Dupe, V., 2013. NODAL and SHH dose-dependent double inhibition promotes an HPE-like phenotype in chick embryos. *Disease models & mechanisms* 6, 537-543.

Mercier, S., Dubourg, C., Garcelon, N., Campillo-Gimenez, B., Gicquel, I., Belleguic, M., Ratie, L., Pasquier, L., Loget, P., Bendavid, C., Jaillard, S., Rochard, L., Quelin, C., Dupe, V., David, V.,

Odent, S., 2011. New findings for phenotype-genotype correlations in a large European series of holoprosencephaly cases. *Journal of medical genetics* 48, 752-760.

Mesnard, D., Guzman-Ayala, M., Constam, D.B., 2006. Nodal specifies embryonic visceral endoderm and sustains pluripotent cells in the epiblast before overt axial patterning. *Development (Cambridge, England)* 133, 2497-2505.

Meyer, N.P., Roelink, H., 2003. The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord. *Developmental biology* 257, 343-355.

Michaud, J.L., 2001. The developmental program of the hypothalamus and its disorders. *Clinical genetics* 60, 255-263.

Ming, J.E., Kaupas, M.E., Roessler, E., Brunner, H.G., Golabi, M., Tekin, M., Stratton, R.F., Sujansky, E., Bale, S.J., Muenke, M., 2002. Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. *Human genetics* 110, 297-301.

Ming, J.E., Muenke, M., 1998. Holoprosencephaly: from Homer to Hedgehog. *Clinical genetics* 53, 155-163.

Ming, J.E., Roessler, E., Muenke, M., 1998. Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Molecular medicine today* 4, 343-349.

Miyata, T., Maeda, T., Lee, J.E., 1999. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes & development* 13, 1647-1652.

Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y., Shimamura, K., Nakafuku, M., 2001. Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* 31, 757-771.

Monuki, E.S., 2007. The morphogen signaling network in forebrain development and holoprosencephaly. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 66, 566-575.

Morales, A.V., Perez-Alcala, S., Barbas, J.A., 2007. Dynamic Sox5 protein expression during cranial ganglia development. *Dev Dyn* 236, 2702-2707.

Morcillo, J., Martinez-Morales, J.R., Trousse, F., Fermin, Y., Sowden, J.C., Bovolenta, P., 2006. Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development (Cambridge, England)* 133, 3179-3190.

Morohashi, Y., Kan, T., Tominari, Y., Fuwa, H., Okamura, Y., Watanabe, N., Sato, C., Natsugari, H., Fukuyama, T., Iwatsubo, T., Tomita, T., 2006. C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic gamma-secretase-specific inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). *The Journal of biological chemistry* 281, 14670-14676.

Mourikis, P., Sambasivan, R., Castel, D., Rocheteau, P., Bizzarro, V., Tajbakhsh, S., 2012. A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem cells* 30, 243-252.

Muenke, M., Cohen, M.M., Jr., 2000. Genetic approaches to understanding brain development: holoprosencephaly as a model. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 6, 15-21.

Mui, S.H., Kim, J.W., Lemke, G., Bertuzzi, S., 2005. Vax genes ventralize the embryonic eye. *Genes & development* 19, 1249-1259.

Muller, F., Albert, S., Blader, P., Fischer, N., Hallonet, M., Strahle, U., 2000. Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development (Cambridge, England)* 127, 3889-3897.

Murdoch, J.N., Eddleston, J., Leblond-Bourget, N., Stanier, P., Copp, A.J., 1999. Sequence and expression analysis of *Nhlh1*: a basic helix-loop-helix gene implicated in neurogenesis. *Developmental genetics* 24, 165-177.

Murray, R.C., Navi, D., Fesenko, J., Lander, A.D., Calof, A.L., 2003. Widespread defects in the primary olfactory pathway caused by loss of *Mash1* function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 1769-1780.

Muskavitch, M.A., 1994. Delta-notch signaling and *Drosophila* cell fate choice. *Developmental biology* 166, 415-430.

Mutoh, H., Naya, F.J., Tsai, M.J., Leiter, A.B., 1998. The basic helix-loop-helix protein *BETA2* interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes & development* 12, 820-830.

Myat, A., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., Lewis, J., 1996. A chick homologue of *Serrate* and its relationship with Notch and Delta homologues during central neurogenesis. *Developmental biology* 174, 233-247.

Nakagawa, O., McFadden, D.G., Nakagawa, M., Yanagisawa, H., Hu, T., Srivastava, D., Olson, E.N., 2000. Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13655-13660.

Nakai, S., Kawano, H., Yudate, T., Nishi, M., Kuno, J., Nagata, A., Jishage, K., Hamada, H., Fujii, H., Kawamura, K., et al., 1995. The POU domain transcription factor *Brn-2* is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes & development* 9, 3109-3121.

Nakamura, T., Ohtsuka, T., Sekiyama, E., Cooper, L.J., Kokubu, H., Fullwood, N.J., Barrandon, Y., Kageyama, R., Kinoshita, S., 2008. *Hes1* regulates corneal development and the function of corneal epithelial stem/progenitor cells. *Stem cells* 26, 1265-1274.

Nakano, Y., Kim, H.R., Kawakami, A., Roy, S., Schier, A.F., Ingham, P.W., 2004. Inactivation of *dispatched 1* by the chameleon mutation disrupts Hedgehog signalling in the zebrafish embryo. *Developmental biology* 269, 381-392.

Nelson, B.R., Hartman, B.H., Georgi, S.A., Lan, M.S., Reh, T.A., 2007. Transient inactivation of Notch signaling synchronizes differentiation of neural progenitor cells. *Developmental biology* 304, 479-498.

Neves, J., Abello, G., Petrovic, J., Giraldez, F., 2013. Patterning and cell fate in the inner ear: a case for Notch in the chicken embryo. *Development, growth & differentiation* 55, 96-112.

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

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.

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

Nosedá, M., Fu, Y., Niessen, K., Wong, F., Chang, L., McLean, G., Karsan, A., 2006. Smooth Muscle alpha-actin is a direct target of Notch/CSL. *Circulation research* 98, 1468-1470.

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

Nural, H.F., Mastick, G.S., 2004. *Pax6* guides a relay of pioneer longitudinal axons in the embryonic mouse forebrain. *The Journal of comparative neurology* 479, 399-409.

O'Rahilly, S., 2009. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature* 462, 307-314.

Ohkubo, Y., Chiang, C., Rubenstein, J.L., 2002. Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* 111, 1-17.

Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., Kageyama, R., 1999. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *The EMBO journal* 18, 2196-2207.

Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F., Kageyama, R., 2001. Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. *The Journal of biological chemistry* 276, 30467-30474.

Ohyama, K., Das, R., Placzek, M., 2008. Temporal progression of hypothalamic patterning by a dual action of BMP. *Development (Cambridge, England)* 135, 3325-3331.

Ohyama, K., Ellis, P., Kimura, S., Placzek, M., 2005. Directed differentiation of neural cells to hypothalamic dopaminergic neurons. *Development (Cambridge, England)* 132, 5185-5197.

Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T.W., Honjo, T., 1995. Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development (Cambridge, England)* 121, 3291-3301.

Orioli, I.M., Castilla, E.E., 2010. Epidemiology of holoprosencephaly: Prevalence and risk factors. *American journal of medical genetics* 154C, 13-21.

Osborne, B.A., Minter, L.M., 2007. Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nature reviews. Immunology* 7, 64-75.

Pan, Q., Li, C., Xiao, J., Kimura, S., Rubenstein, J., Puellas, L., Minoo, P., 2004. In vivo characterization of the Nkx2.1 promoter/enhancer elements in transgenic mice. *Gene* 331, 73-82.

Park, C.S., Kim, O.S., Yun, S.M., Jo, S.A., Jo, I., Koh, Y.H., 2008. Presenilin 1/gamma-secretase is associated with cadmium-induced E-cadherin cleavage and COX-2 gene expression in T47D breast cancer cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 106, 413-422.

Parks, A.L., Curtis, D., 2007. Presenilin diversifies its portfolio. *Trends in genetics : TIG* 23, 140-150.

Parks, A.L., Stout, J.R., Shepard, S.B., Klueg, K.M., Dos Santos, A.A., Parody, T.R., Vaskova, M., Muskavitch, M.A., 2006. Structure-function analysis of delta trafficking, receptor binding and signaling in *Drosophila*. *Genetics* 174, 1947-1961.

Parras, C.M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D.J., Guillemot, F., 2002. Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes & development* 16, 324-338.

Patten, B.A., Sardi, S.P., Koirala, S., Nakafuku, M., Corfas, G., 2006. Notch1 signaling regulates radial glia differentiation through multiple transcriptional mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 3102-3108.

Pearson, C.A., Ohyama, K., Manning, L., Aghamohammadzadeh, S., Sang, H., Placzek, M., 2011. FGF-dependent midline-derived progenitor cells in hypothalamic infundibular development. *Development (Cambridge, England)* 138, 2613-2624.

Pelling, M., Anthwal, N., McNay, D., Gradwohl, G., Leiter, A.B., Guillemot, F., Ang, S.L., 2011. Differential requirements for neurogenin 3 in the development of POMC and NPY neurons in the hypothalamus. *Developmental biology* 349, 406-416.

Pera, E.M., Kessel, M., 1997. Patterning of the chick forebrain anlage by the prechordal plate. *Development (Cambridge, England)* 124, 4153-4162.

Perea-Gomez, A., Vella, F.D., Shawlot, W., Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Meno, C., Pfister, V., Chen, L., Robertson, E., Hamada, H., Behringer, R.R., Ang, S.L., 2002. Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Developmental cell* 3, 745-756.

Pereira, P.N., Dobрева, M.P., Maas, E., Cornelis, F.M., Moya, I.M., Umans, L., Verfaillie, C.M., Camus, A., de Sousa Lopes, S.M., Huylebroeck, D., Zwijsen, A., 2012. Antagonism of Nodal signaling by BMP/Smad5 prevents ectopic primitive streak formation in the mouse amnion. *Development (Cambridge, England)* 139, 3343-3354.

Persson, M., Stamataki, D., te Welscher, P., Andersson, E., Bose, J., Ruther, U., Ericson, J., Briscoe, J., 2002. Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes & development* 16, 2865-2878.

Pineda-Alvarez, D.E., Roessler, E., Hu, P., Srivastava, K., Solomon, B.D., Siple, C.E., Fan, C.M., Muenke, M., 2012. Missense substitutions in the GAS1 protein present in holoprosencephaly patients reduce the affinity for its ligand, SHH. *Human genetics* 131, 301-310.

Pineda-Alvarez, D.E., Solomon, B.D., Roessler, E., Balog, J.Z., Hadley, D.W., Zein, W.M., Hadsall, C.K., Brooks, B.P., Muenke, M., 2011. A broad range of ophthalmologic anomalies is part of the holoprosencephaly spectrum. *American journal of medical genetics. Part A* 155A, 2713-2720.

Pirot, P., van Grunsven, L.A., Marine, J.C., Huylebroeck, D., Bellefroid, E.J., 2004. Direct regulation of the Nrarp gene promoter by the Notch signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 322, 526-534.

Plawner, L.L., Delgado, M.R., Miller, V.S., Levey, E.B., Kinsman, S.L., Barkovich, A.J., Simon, E.M., Clegg, N.J., Sweet, V.T., Stashinko, E.E., Hahn, J.S., 2002. Neuroanatomy of holoprosencephaly as predictor of function: beyond the face predicting the brain. *Neurology* 59, 1058-1066.

Pontecorvi, M., Goding, C.R., Richardson, W.D., Kessar, N., 2008. Expression of Tbx2 and Tbx3 in the developing hypothalamic-pituitary axis. *Gene expression patterns : GEP* 8, 411-417.

Porter, J.A., Ekker, S.C., Park, W.J., von Kessler, D.P., Young, K.E., Chen, C.H., Ma, Y., Woods, A.S., Cotter, R.J., Koonin, E.V., Beachy, P.A., 1996. Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 86, 21-34.

Powell, L.M., Jarman, A.P., 2008. Context dependence of proneural bHLH proteins. *Current opinion in genetics & development* 18, 411-417.

Powers, S.E., Taniguchi, K., Yen, W., Melhuish, T.A., Shen, J., Walsh, C.A., Sutherland, A.E., Wotton, D., 2010. Tgif1 and Tgif2 regulate Nodal signaling and are required for gastrulation. *Development (Cambridge, England)* 137, 249-259.

Przemeck, G.K., Heinzmann, U., Beckers, J., Hrabe de Angelis, M., 2003. Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos. *Development (Cambridge, England)* 130, 3-13.

Puelles, L., Rubenstein, J.L., 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends in neurosciences* 26, 469-476.

Quillien, A., Blanco-Sanchez, B., Halluin, C., Moore, J.C., Lawson, N.D., Blader, P., Cau, E., 2011. BMP signaling orchestrates photoreceptor specification in the zebrafish pineal gland in collaboration with Notch. *Development (Cambridge, England)* 138, 2293-2302.

Raft, S., Koundakjian, E.J., Quinones, H., Jayasena, C.S., Goodrich, L.V., Johnson, J.E., Segil, N., Groves, A.K., 2007. Cross-regulation of Ngn1 and Math1 coordinates the production of neurons and sensory hair cells during inner ear development. *Development (Cambridge, England)* 134, 4405-4415.

Rallu, M., Corbin, J.G., Fishell, G., 2002a. Parsing the prosencephalon. *Nature reviews* 3, 943-951.

Rallu, M., Machold, R., Gaiano, N., Corbin, J.G., McMahon, A.P., Fishell, G., 2002b. Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both Gli3 and Hedgehog signaling. *Development (Cambridge, England)* 129, 4963-4974.

Ribeiro, L.A., Queizi, R.G., Nascimento, A., Bertolacini, C.P., Richieri-Costa, A., 2010. Holoprosencephaly and holoprosencephaly-like phenotype and GAS1 DNA sequence changes: Report of four Brazilian patients. *American journal of medical genetics. Part A* 152A, 1688-1694.

Ribes, V., Briscoe, J., 2009. Establishing and interpreting graded Sonic Hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a002014.

Ricano-Cornejo, I., Altick, A.L., Garcia-Pena, C.M., Nural, H.F., Echevarria, D., Miquelajauregui, A., Mastick, G.S., Varela-Echavarria, A., 2011. Slit-Robo signals regulate pioneer axon pathfinding of the tract of the postoptic commissure in the mammalian forebrain. *Journal of neuroscience research* 89, 1531-1541.

Robert-Moreno, A., Espinosa, L., de la Pompa, J.L., Bigas, A., 2005. RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development (Cambridge, England)* 132, 1117-1126.

Rochette, M.J., Murphy, M.P., 2002. Gamma-secretase: substrates and inhibitors. *Molecular neurobiology* 26, 81-95.

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

Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S.W., Tsui, L.C., Muenke, M., 1996. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nature genetics* 14, 357-360.

Roessler, E., Du, Y.Z., Mullor, J.L., Casas, E., Allen, W.P., Gillessen-Kaesbach, G., Roeder, E.R., Ming, J.E., Ruiz i Altaba, A., Muenke, M., 2003. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13424-13429.

Roessler, E., El-Jaick, K.B., Dubourg, C., Velez, J.I., Solomon, B.D., Pineda-Alvarez, D.E., Lacbawan, F., Zhou, N., Ouspenskaia, M., Paulussen, A., Smeets, H.J., Hehr, U., Bendavid, C., Bale, S., Odent, S., David, V., Muenke, M., 2009a. The mutational spectrum of holoprosencephaly-associated changes within the SHH gene in humans predicts loss-of-function through either key structural alterations of the ligand or its altered synthesis. *Human mutation* 30, E921-935.

Roessler, E., Lacbawan, F., Dubourg, C., Paulussen, A., Herbergs, J., Hehr, U., Bendavid, C., Zhou, N., Ouspenskaia, M., Bale, S., Odent, S., David, V., Muenke, M., 2009b. The full spectrum of holoprosencephaly-associated mutations within the ZIC2 gene in humans predicts loss-of-function as the predominant disease mechanism. *Human mutation* 30, E541-554.

Roessler, E., Muenke, M., 2010. The molecular genetics of holoprosencephaly. *American journal of medical genetics* 154C, 52-61.

Roessler, E., Ouspenskaia, M.V., Karkera, J.D., Velez, J.I., Kantipong, A., Lacbawan, F., Bowers, P., Belmont, J.W., Towbin, J.A., Goldmuntz, E., Feldman, B., Muenke, M., 2008. Reduced NODAL signaling strength via mutation of several pathway members including FOXH1 is linked to human heart defects and holoprosencephaly. *American journal of human genetics* 83, 18-29.

Rogers, J.M., Brannen, K.C., Barbee, B.D., Zucker, R.M., Degitz, S.J., 2004. Methanol exposure during gastrulation causes holoprosencephaly, facial dysgenesis, and cervical vertebral malformations in C57BL/6J mice. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 71, 80-88.

Rohr, K.B., Barth, K.A., Varga, Z.M., Wilson, S.W., 2001. The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron* 29, 341-351.

Rubenstein, J.L., Martinez, S., Shimamura, K., Puellas, L., 1994. The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science (New York, N.Y)* 266, 578-580.

Sakamoto, M., Hirata, H., Ohtsuka, T., Bessho, Y., Kageyama, R., 2003. The basic helix-loop-helix genes *Hesr1/Hey1* and *Hesr2/Hey2* regulate maintenance of neural precursor cells in the brain. *The Journal of biological chemistry* 278, 44808-44815.

Sakuta, H., Suzuki, R., Takahashi, H., Kato, A., Shintani, T., Iemura, S., Yamamoto, T.S., Ueno, N., Noda, M., 2001. Ventroptin: a BMP-4 antagonist expressed in a double-gradient pattern in the retina. *Science (New York, N.Y)* 293, 111-115.

Saper, C.B., 2004. Hypothalamus. In : *The Human Nervous system* (George Paxinos JKM,ed). San Diego, CA : Elsevier Academic Press.

Saper, C.B., 2009. Hypothalamus. In; *Scholarpedia*.

Satow, T., Bae, S.K., Inoue, T., Inoue, C., Miyoshi, G., Tomita, K., Bessho, Y., Hashimoto, N., Kageyama, R., 2001. The basic helix-loop-helix gene *hesr2* promotes gliogenesis in mouse retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 1265-1273.

Schafer, M., Kinzel, D., Neuner, C., Scharl, M., Volff, J.N., Winkler, C., 2005. Hedgehog and retinoid signalling confines *nkx2.2b* expression to the lateral floor plate of the zebrafish trunk. *Mechanisms of development* 122, 43-56.

Schafer, M., Kinzel, D., Winkler, C., 2007. Discontinuous organization and specification of the lateral floor plate in zebrafish. *Developmental biology* 301, 117-129.

Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Harvey, M., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stainier, D.Y., Zwartkuis, F., Abdelilah, S., Stemple, D.L., Rangini, Z., Yang, H., Driever, W., 1996. Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development (Cambridge, England)* 123, 165-178.

Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Helde, K.A., Talbot, W.S., Driever, W., 1997. The one-eyed pinhead gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with no tail. *Development (Cambridge, England)* 124, 327-342.

Schier, A.F., Shen, M.M., 2000. Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* 403, 385-389.

Schonemann, M.D., Ryan, A.K., McEvelly, R.J., O'Connell, S.M., Arias, C.A., Kalla, K.A., Li, P., Sawchenko, P.E., Rosenfeld, M.G., 1995. Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor *Brn-2*. *Genes & development* 9, 3122-3135.

Schuermans, C., Arment, O., Nieto, M., Stenman, J.M., Britz, O., Klenin, N., Brown, C., Langevin, L.M., Seibt, J., Tang, H., Cunningham, J.M., Dyck, R., Walsh, C., Campbell, K., Polleux, F., Guillemot, F., 2004. Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *The EMBO journal* 23, 2892-2902.

Schwarting, G.A., Gridley, T., Henion, T.R., 2007. Notch1 expression and ligand interactions in progenitor cells of the mouse olfactory epithelium. *Journal of molecular histology* 38, 543-553.

Seiffert, D., Bradley, J.D., Rominger, C.M., Rominger, D.H., Yang, F., Meredith, J.E., Jr., Wang, Q., Roach, A.H., Thompson, L.A., Spitz, S.M., Higaki, J.N., Prakash, S.R., Combs, A.P., Copeland, R.A., Arneric, S.P., Hartig, P.R., Robertson, D.W., Cordell, B., Stern, A.M., Olson, R.E., Zaczek, R., 2000. Presenilin-1 and -2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 275, 34086-34091.

Selkoe, D., Kopan, R., 2003. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annual review of neuroscience* 26, 565-597.

Seo, S., Lim, J.W., Yellajoshiyula, D., Chang, L.W., Kroll, K.L., 2007. Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers. *The EMBO journal* 26, 5093-5108.

Shaker, T., Dennis, D., Kurrasch, D.M., Schuurmans, C., 2012. Neurog1 and Neurog2 coordinately regulate development of the olfactory system. *Neural development* 7, 28.

Shen, J., Walsh, C.A., 2005. Targeted disruption of Tgif, the mouse ortholog of a human holoprosencephaly gene, does not result in holoprosencephaly in mice. *Molecular and cellular biology* 25, 3639-3647.

Shen, M.M., 2007. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development (Cambridge, England)* 134, 1023-1034.

Shimogori, T., Lee, D.A., Miranda-Angulo, A., Yang, Y., Wang, H., Jiang, L., Yoshida, A.C., Kataoka, A., Mashiko, H., Avetisyan, M., Qi, L., Qian, J., Blackshaw, S., 2010. A genomic atlas of mouse hypothalamic development. *Nature neuroscience* 13, 767-775.

Simon, E.M., Hevner, R., Pinter, J.D., Clegg, N.J., Miller, V.S., Kinsman, S.L., Hahn, J.S., Barkovich, A.J., 2000. Assessment of the deep gray nuclei in holoprosencephaly. *AJNR. American journal of neuroradiology* 21, 1955-1961.

Simpson, F., Kerr, M.C., Wicking, C., 2009. Trafficking, development and hedgehog. *Mechanisms of development* 126, 279-288.

Simpson, P., 1990. Notch and the choice of cell fate in *Drosophila* neuroepithelium. *Trends in genetics : TIG* 6, 343-345.

Solomon, B.D., Lacbawan, F., Jain, M., Domene, S., Roessler, E., Moore, C., Dobyns, W.B., Muenke, M., 2009. A novel SIX3 mutation segregates with holoprosencephaly in a large family. *American journal of medical genetics. Part A* 149A, 919-925.

Solomon, B.D., Mercier, S., Velez, J.I., Pineda-Alvarez, D.E., Wyllie, A., Zhou, N., Dubourg, C., David, V., Odent, S., Roessler, E., Muenke, M., 2010. Analysis of genotype-phenotype correlations in human holoprosencephaly. *American journal of medical genetics* 154C, 133-141.

Sommer, L., Ma, Q., Anderson, D.J., 1996. neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Molecular and cellular neurosciences* 8, 221-241.

Soriano, P., 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics* 21, 70-71.



Steidl, C., Leimeister, C., Klamt, B., Maier, M., Nanda, I., Dixon, M., Clarke, R., Schmid, M., Gessler, M., 2000. Characterization of the human and mouse HEY1, HEY2, and HEYL genes: cloning, mapping, and mutation screening of a new bHLH gene family. *Genomics* 66, 195-203.

Stein, R., Mori, N., Matthews, K., Lo, L.C., Anderson, D.J., 1988. The NGF-inducible SCG10 mRNA encodes a novel membrane-bound protein present in growth cones and abundant in developing neurons. *Neuron* 1, 463-476.

Stern, C.D., 2002. Induction and initial patterning of the nervous system - the chick embryo enters the scene. *Current opinion in genetics & development* 12, 447-451.

Stern, C.D., 2005. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development (Cambridge, England)* 132, 2007-2021.

Storm, E.E., Garel, S., Borello, U., Hebert, J.M., Martinez, S., McConnell, S.K., Martin, G.R., Rubenstein, J.L., 2006. Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development (Cambridge, England)* 133, 1831-1844.

Stoykova, A., Treichel, D., Hallonet, M., Gruss, P., 2000. Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 8042-8050.

Streicher, J., Donat, M.A., Strauss, B., Sporle, R., Schughart, K., Muller, G.B., 2000. Computer-based three-dimensional visualization of developmental gene expression. *Nature genetics* 25, 147-152.

Streit, A., Berliner, A.J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., Stern, C.D., 2000. Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* 406, 74-78.

Struhl, G., Greenwald, I., 1999. Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522-525.

Stump, G., Durrer, A., Klein, A.L., Lutolf, S., Suter, U., Taylor, V., 2002. Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mechanisms of development* 114, 153-159.

Sugimori, M., Nagao, M., Bertrand, N., Parras, C.M., Guillemot, F., Nakafuku, M., 2007. Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord. *Development (Cambridge, England)* 134, 1617-1629.

Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., Greenberg, M.E., 2001. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365-376.

Sussel, L., Marin, O., Kimura, S., Rubenstein, J.L., 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 (Cambridge, England)* 126, 3359-3370.

Suzuki, Y., Tsuruga, E., Yajima, T., Takeda, M., 2003. Expression of bHLH transcription factors NSCL1 and NSCL2 in the mouse olfactory system. *Chemical senses* 28, 603-608.

Szabo, N.E., Zhao, T., Cankaya, M., Theil, T., Zhou, X., Alvarez-Bolado, G., 2009. Role of neuroepithelial Sonic hedgehog in hypothalamic patterning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 6989-7002.

Tagami, S., Okochi, M., Yanagida, K., Ikuta, A., Fukumori, A., Matsumoto, N., Ishizuka-Katsura, Y., Nakayama, T., Itoh, N., Jiang, J., Nishitomi, K., Kamino, K., Morihara, T., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Chiba, S., Takeda, M., 2008. Regulation of Notch

signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. *Molecular and cellular biology* 28, 165-176.

Tanabe, Y., Jessell, T.M., 1996. Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science (New York, N.Y)* 274, 1115-1123.

Tole, S., Ragsdale, C.W., Grove, E.A., 2000. Dorsoventral patterning of the telencephalon is disrupted in the mouse mutant extra-toes(J). *Developmental biology* 217, 254-265.

Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., Kageyama, R., 2000. Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *The EMBO journal* 19, 5460-5472.

Tomita, T., Tanaka, S., Morohashi, Y., Iwatsubo, T., 2006. Presenilin-dependent intramembrane cleavage of ephrin-B1. *Molecular neurodegeneration* 1, 2.

van den Akker, N.M., Caolo, V., Wisse, L.J., Peters, P.P., Poelmann, R.E., Carmeliet, P., Molin, D.G., Gittenberger-de Groot, A.C., 2008. Developmental coronary maturation is disturbed by aberrant cardiac vascular endothelial growth factor expression and Notch signalling. *Cardiovascular research* 78, 366-375.

Van Doren, M., Bailey, A.M., Esnayra, J., Ede, K., Posakony, J.W., 1994. Negative regulation of proneural gene activity: hairy is a direct transcriptional repressor of achaete. *Genes & development* 8, 2729-2742.

Vann, S.D., Aggleton, J.P., 2004. The mammillary bodies: two memory systems in one? *Nature reviews* 5, 35-44.

Varga, Z.M., Amores, A., Lewis, K.E., Yan, Y.L., Postlethwait, J.H., Eisen, J.S., Westerfield, M., 2001. Zebrafish smoothed functions in ventral neural tube specification and axon tract formation. *Development (Cambridge, England)* 128, 3497-3509.

Vincent, S.D., Dunn, N.R., Hayashi, S., Norris, D.P., Robertson, E.J., 2003. Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals. *Genes & development* 17, 1646-1662.

Volpe, P., Campobasso, G., De Robertis, V., Rembouskos, G., 2009. Disorders of prosencephalic development. *Prenatal diagnosis* 29, 340-354.

Voronova, A., Fischer, A., Ryan, T., Al Madhoun, A., Skerjanc, I.S., 2011. Ascl1/Mash1 is a novel target of Gli2 during Gli2-induced neurogenesis in P19 EC cells. *PloS one* 6, e19174.

Wallis, D.E., Roessler, E., Hehr, U., Nanni, L., Wiltshire, T., Richieri-Costa, A., Gillessen-Kaesbach, G., Zackai, E.H., Rommens, J., Muenke, M., 1999. Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. *Nature genetics* 22, 196-198.

Walther, C., Gruss, P., 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development (Cambridge, England)* 113, 1435-1449.

Walther, C., Guenet, J.L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M.D., Plachov, D., Balling, R., Gruss, P., 1991. Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* 11, 424-434.

Wang, H.U., Anderson, D.J., 1997. Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron* 18, 383-396.

Wang, N.J., Sanborn, Z., Arnett, K.L., Bayston, L.J., Liao, W., Proby, C.M., Leigh, I.M., Collisson, E.A., Gordon, P.B., Jakkula, L., Pennypacker, S., Zou, Y., Sharma, M., North, J.P., Vemula, S.S., Mauro, T.M., Neuhaus, I.M., Leboit, P.E., Hur, J.S., Park, K., Huh, N., Kwok, P.Y., Arron, S.T., Massion, P.P., Bale, A.E., Haussler, D., Cleaver, J.E., Gray, J.W., Spellman, P.T., South, A.P., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Cho, R.J., 2011a. Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 17761-17766.

Wang, W., Lufkin, T., 2000. The murine *Otp* homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Developmental biology* 227, 432-449.

Wang, Y., Song, L., Zhou, C.J., 2011b. The canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway regulates *Fgf* signaling for early facial development. *Developmental biology* 349, 250-260.

Ware, M., Schubert, F.R., 2011. Development of the early axon scaffold in the rostral brain of the chick embryo. *Journal of anatomy* 219, 203-216.

Warr, N., Powles-Glover, N., Chappell, A., Robson, J., Norris, D., Arkell, R.M., 2008. *Zic2*-associated holoprosencephaly is caused by a transient defect in the organizer region during gastrulation. *Human molecular genetics* 17, 2986-2996.

Weaver, D.D., Solomon, B.D., Akin-Samson, K., Kelley, R.I., Muenke, M., 2010. Cyclopia (synophthalmia) in Smith-Lemli-Opitz syndrome: First reported case and consideration of mechanism. *American journal of medical genetics* 154C, 142-145.

Welch, K.D., Panter, K.E., Lee, S.T., Gardner, D.R., Stegelmeier, B.L., Cook, D., 2009. Cycloamine-induced synophthalmia in sheep: defining a critical window and toxicokinetic evaluation. *Journal of applied toxicology : JAT* 29, 414-421.

Wilson, L., Gale, E., Maden, M., 2003. The role of retinoic acid in the morphogenesis of the neural tube. *Journal of anatomy* 203, 357-368.

Wilson, S.W., Houart, C., 2004. Early steps in the development of the forebrain. *Developmental cell* 6, 167-181.

Wolfe, M.S., Citron, M., Diehl, T.S., Xia, W., Donkor, I.O., Selkoe, D.J., 1998. A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's gamma-secretase activity. *Journal of medicinal chemistry* 41, 6-9.

Wolfer, D.P., Giger, R.J., Stagliar, M., Sonderegger, P., Lipp, H.P., 1998. Expression of the axon growth-related neural adhesion molecule TAG-1/axonin-1 in the adult mouse brain. *Anatomy and embryology* 197, 177-185.

Wullmann, M.F., 2009. Secondary neurogenesis and telencephalic organization in zebrafish and mice: a brief review. *Integrative zoology* 4, 123-133.

Xenaki, D., Martin, I.B., Yoshida, L., Ohyama, K., Gennarini, G., Grumet, M., Sakurai, T., Furley, A.J., 2011. *F3/contactin* and *TAG1* play antagonistic roles in the regulation of sonic hedgehog-induced cerebellar granule neuron progenitor proliferation. *Development (Cambridge, England)* 138, 519-529.

Xie, J., Wang, W.Q., Liu, T.X., Deng, M., Ning, G., 2008. Spatio-temporal expression of chromogranin A during zebrafish embryogenesis. *The Journal of endocrinology* 198, 451-458.

Xu, Q., Tam, M., Anderson, S.A., 2008. Fate mapping *Nkx2.1*-lineage cells in the mouse telencephalon. *The Journal of comparative neurology* 506, 16-29.

Yamada, Y., Aoki, H., Kunisada, T., Hara, A., 2010. *Rest* promotes the early differentiation of mouse ESCs but is not required for their maintenance. *Cell stem cell* 6, 10-15.

Yang, X., Tomita, T., Wines-Samuels, M., Beglopoulos, V., Tansey, M.G., Kopan, R., Shen, J., 2006. *Notch1* signaling influences *v2* interneuron and motor neuron development in the spinal cord. *Developmental neuroscience* 28, 102-117.

Yang, Y.P., Anderson, R.M., Klingensmith, J., 2010. BMP antagonism protects *Nodal* signaling in the gastrula to promote the tissue interactions underlying mammalian forebrain and craniofacial patterning. *Human molecular genetics* 19, 3030-3042.

Yokota, Y., 2001. *Id* and development. *Oncogene* 20, 8290-8298.

Yokota, Y., Mori, S., Narumi, O., Kitajima, K., 2001. In vivo function of a differentiation inhibitor, *Id2*. *IUBMB life* 51, 207-214.

Yoshida, M., Suda, Y., Matsuo, I., Miyamoto, N., Takeda, N., Kuratani, S., Aizawa, S., 1997. Emx1 and Emx2 functions in development of dorsal telencephalon. *Development (Cambridge, England)* 124, 101-111.

Yu, T., Fotaki, V., Mason, J.O., Price, D.J., 2009. Analysis of early ventral telencephalic defects in mice lacking functional Gli3 protein. *The Journal of comparative neurology* 512, 613-627.

Yun, K., Potter, S., Rubenstein, J.L., 2001. Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development (Cambridge, England)* 128, 193-205.

Yun, T.J., Bevan, M.J., 2003. Notch-regulated ankyrin-repeat protein inhibits Notch1 signaling: multiple Notch1 signaling pathways involved in T cell development. *Journal of immunology* 170, 5834-5841.

Zeng, X., Goetz, J.A., Suber, L.M., Scott, W.J., Jr., Schreiner, C.M., Robbins, D.J., 2001. A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 411, 716-720.

Zhang, W., Kang, J.S., Cole, F., Yi, M.J., Krauss, R.S., 2006. Cdo functions at multiple points in the Sonic Hedgehog pathway, and Cdo-deficient mice accurately model human holoprosencephaly. *Dev Cell* 10, 657-665.

Zhao, L., Saitsu, H., Sun, X., Shiota, K., Ishibashi, M., 2010. Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain. *Mechanisms of development* 127, 62-72.

Zhao, L., Zevallos, S.E., Rizzoti, K., Jeong, Y., Lovell-Badge, R., Epstein, D.J., 2012. Disruption of SoxB1-dependent Sonic hedgehog expression in the hypothalamus causes septo-optic dysplasia. *Developmental cell* 22, 585-596.

Zhou, Q., Wang, S., Anderson, D.J., 2000. Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* 25, 331-343.

Zuccato, C., Belyaev, N., Conforti, P., Ooi, L., Tartari, M., Papadimou, E., MacDonald, M., Fossale, E., Zeitlin, S., Buckley, N., Cattaneo, E., 2007. Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 6972-6983.

# ANNEXES

---

## Annexe 1.

- ◆ Article 4. Des analyses de CGH-array suggèrent une hétérogénéité génétique du Rhombencéphalosynapsis.

*Molecular Syndromology*

Demurger F., Pasquier L., Dubourg C., Dupé V., Jaillard S., Beri M., Lespinasse J., Loget P., Marcorelles P., Laquerrière A., Bendavid C., Odent S., David V., Gicquel I., Martin-Coignard D., Mercier S., Ratié L., Leheup B., Quélin C.



# Array-CGH Analysis Suggests Genetic Heterogeneity in Rhombencephalosynapsis

F. Démurger<sup>a,b</sup> L. Pasquier<sup>a</sup> C. Dubourg<sup>b,c</sup> V. Dupé<sup>b</sup> I. Gicquel<sup>b</sup> C. Evain<sup>b</sup>  
L. Ratié<sup>b</sup> S. Jaillard<sup>e</sup> M. Beri<sup>h</sup> B. Leheup<sup>h</sup> J. Lespinasse<sup>i</sup> D. Martin-Coignard<sup>i</sup>  
S. Mercier<sup>a,b</sup> C. Quelin<sup>a</sup> P. Loget<sup>d</sup> P. Marcorelles<sup>f</sup> A. Laquerrière<sup>g</sup> C. Bendavid<sup>b</sup>  
S. Odent<sup>a,b</sup> V. David<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Service de Génétique Clinique, CHU Hôpital Sud, <sup>b</sup>Equipe Génétique des Pathologies Liées au Développement, UMR6290 CNRS, IFR 140 GFAS, Université de Rennes 1, Faculté de Médecine, and Laboratoires de <sup>c</sup>Génétique Moléculaire, <sup>d</sup>Anatomopathologie, and <sup>e</sup>de Cytogénétique, CHU Pontchaillou, Rennes, <sup>f</sup>Laboratoire d'Anatomopathologie, CHU Morvan, Brest, <sup>g</sup>Laboratoire d'Anatomopathologie et INSERM EA 4309, IFRPM 23, Université de Rouen, Rouen, <sup>h</sup>Service de Médecine Infantile III et Génétique, Pôle Enfants, CHU de Nancy et Unité INSERM U954, Université de Lorraine, Nancy, <sup>i</sup>Laboratoire de Cytogénétique, CH de Chambéry, Chambéry, and <sup>j</sup>Service de Génétique, CH, Le Mans, France

## Key Words

Array-CGH · Copy Number Variation · NDE1 · Rhombencephalosynapsis

## Abstract

Rhombencephalosynapsis is an uncommon, but increasingly recognized, cerebellar malformation defined as vermian agenesis with fusion of the hemispheres. The embryologic and genetic mechanisms involved are still unknown, and to date, no animal models are available. In the present study, we used Agilent oligonucleotide arrays in a large series of 57 affected patients to detect candidate genes. Four different unbalanced rearrangements were detected: a 16p11.2 deletion, a 14q12q21.2 deletion, an unbalanced translocation t(2p;10q), and a 16p13.11 microdeletion containing 2 candidate genes. These genes were further investigated by sequencing and in situ hybridization. This first microarray screening of a rhombencephalosynapsis series suggests that there may be heterogeneous genetic causes.

©2013 S. Karger AG, Basel

Rhombencephalosynapsis (RS) is a rare congenital defect of the cerebellum. It is classically defined as vermian agenesis or hypogenesis with fusion of the cerebellar hemispheres. Since the first description by Obersteiner [1914], less than 200 cases have been reported. Magnetic resonance imaging (MRI) of a series of 3,000 consecutive paediatric brains led to its frequency being estimated at 0.13% [Sener, 2000]. However, the systematic use of MRI in the prenatal period suggests that the frequency of RS may be much higher: we have observed 40 foetal cases over 15 years [Pasquier et al., 2009]. Ishak et al. [2012] identified RS in almost 10% of patients with aqueductal stenosis, indicating that RS is more common than previously thought.

The severity of the clinical presentation is highly variable. In the prenatal period, RS is usually suggested by ventriculomegaly. Complete autopsy allows pure neurological phenotypes and those associated with extraneural anomalies to be distinguished from syndromic forms Gomez-Lopez-Hernandez (GLH) syndrome (MIM 601853) [Lopez-Hernandez, 1982; Poretti et al., 2008]

KARGER

©2013 S. Karger AG, Basel  
1651-8761/13/0045-0267\$38.00/0

E-Mail karger@karger.com  
www.karger.com/mj

Laurent Pasquier  
Service de Génétique Clinique, CHU Hôpital Sud  
16 boulevard de Bulgarie, BP 90347  
FR-35203 Rennes Cedex 2 (France)  
E-Mail laurent.pasquier@chu-rennes.fr





and VACTERL-H syndrome (MIM 276950) [Michaud et al., 1982; Pasquier et al., 2009]. In foetal cases, isolated RS without fusion of the colliculi (also named mesencephalosynapsis) or aqueductal anomalies are never observed; various associated supratentorial abnormalities, such as agenesis of the corpus callosum, atresia of the third ventricle and holoprosencephaly, have been described [Pasquier et al., 2009; Mercier et al., 2011; Ishak et al., 2012]. In the postnatal period, there is impaired neurological function in most cases [Romanengo et al., 1997; Danon et al., 2000], although in some cases of RS cognitive functions are normal [Obersteiner, 1914; Bell et al., 2005; Poretti et al., 2009]. The neurological outcome is difficult to predict during pregnancy, but supratentorial [Sandalcioglu et al., 2006] and chromosomal anomalies [Lespinasse et al., 2004] are each always associated with poor prognosis. This has been confirmed by a large series of 42 postnatal cases [Ishak et al., 2012]. The imaging features that correlated with poor neurodevelopmental outcome were holoprosencephaly, severity of ventriculomegaly, aqueductal stenosis, fused colliculi, and abnormal temporal cortex.

RS is considered to be a sporadic condition and its aetiology remains poorly understood. Several factors have been suggested to be involved, including teratogenic agents like phencyclidine [Michaud et al., 1982; Sergi et al., 1997], chromosomal [Truwit et al., 1991; Lespinasse et al., 2004] and genetic [Yachnis, 2002] factors. Reviews of foetal cases led to the suggestion that RS may be the result of defects in genes regulating the formation of the roof plate and development of the midline cerebellar primordium at the junction of the mesencephalon and the first rhombomere between 28 and 42 days post-conception [Utsunomiya et al., 1998; Pasquier et al., 2009]. Genes implicated in early development have also been discussed as candidates, but no animal models have been described [Millonig et al., 2000]. It has not been possible to perform linkage analyses because familial cases are rare.

Only 2 different chromosomal abnormalities have previously been reported to be associated with RS. We therefore performed a genome-wide screening for submicroscopic anomalies in our RS cohort with no known karyotype alterations, using array comparative genomic hybridization (array-CGH). Four microrearrangements were identified, and 2 of them were demonstrated to be *de novo*. For the best candidate genes, we performed *in situ* hybridization to localize gene expression in the chick embryo model and screened for mutations.

## Methods

### *Patients*

We studied 57 cases (from 56 families) with normal karyotypes including 49 fetuses and 8 children or adults; these cases were identified and included through a collaborative study involving several French centres over the last 2 decades. We searched for consanguinity and recurrences as often as possible.

In all foetal cases, pregnancy was terminated either for hydrocephalus or RS discovered by ultrasound or MRI screening, according to the French law. These fetuses underwent a complete autopsy by standardized protocols. The pathological findings were reviewed systematically and have been reported previously [Pasquier et al., 2009].

The diagnosis of RS in live-born patients was supported by brain MRI screening performed for mental retardation or neurological symptoms.

Parents of all patients gave their informed consent.

### *Array-CGH*

Blood samples, chorionic villi, amniotic fluid or foetal tissues were processed by the Molecular Genetic Laboratory of Rennes for microarray analysis.

Oligonucleotide array-CGH was performed after DNA extraction using the Agilent Human Genome CGH microarrays 44K (44 patients) and 180K (13 patients) (Agilent Technologies). Reference genomic DNAs from male and female controls were used to characterize copy number polymorphisms (CNPs). Microarrays were scanned using the Agilent scanner of the Biogenouest® Genomic Platform of Rennes. Images were analysed with Agilent Feature Extraction Software version 10.5.

Rearrangements identified by array-CGH were confirmed either by fluorescence *in situ* hybridization (FISH), multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) or multiplex PCR liquid chromatography (MPLC).

### *Sequencing*

The 5 coding exons of the *C16orf45* gene were amplified by PCR and analysed by direct sequencing using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and the ABI Prism 3130 Genetic Analyzer on the whole cohort.

The 8 coding exons of the *NDE1* gene were amplified by PCR and analysed as well only on case 4.

### *Whole-Mount in situ Hybridization*

To characterize the spatiotemporal expression of the candidate genes suspected after microarray analysis, we performed whole-mount *in situ* hybridization on chick embryos using antisense digoxigenin-labelled riboprobes as previously described [Chapman et al., 2002]. In order to clone the chick orthologs of the candidate genes, we used sequence-specific primers for each of the genes designed according to the chick reference sequences ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). *NDE1* cDNA was obtained from the total RNA isolated from chicken brain (Zyagen Laboratories) by reverse transcription PCR using left (CAGAACCTCCTCCAAGCAAG) and right (GCATTGGGTGGCTAATGTCT) primers for *C16orf45* and left (TCCCTCAGTGTTAGGGTTTGG) and right (GTGAAGGATG-GCTATTGGT) primers for *NDE1*. The amplified product was cloned into the PCR II TOPO vector (Invitrogen) and sequenced at the Institute of Genetics and Development of Rennes. For the



**Table 1.** Clinical and molecular features of the patients with pathogenic CNPs

Case	Sex	Child/foetus	Clinical features	Chromosomal rearrangement (size)	Inheritance	Breakpoints (hg19)
1	F	C	partial RS, growth retardation, developmental delay, dysmorphism	2pter duplication (10.5 Mb) 10qter deletion (9 Mb)	paternally balanced translocation	38,993–10,587,646 126,261,414–135,404,671
2	M	FOE	complete RS, hemivertebrae, costal anomalies	16p11.2 deletion (446 kb)	paternally inherited	29,673,754–30,119,912
3	F	FOE	complete RS, partial agenesis of corpus callosum	14q12q21.2 deletion (16 Mb)	de novo	27,867,357–44,582,530
4	M	C	partial RS, Gomez-Lopez-Hernandez syndrome	16p13.11 deletion (2.7 Mb)	de novo	15,256,486–18,012,602

C = Child; FOE = foetus.

construction of the sense probe, the plasmid was digested with *Bam*H1, while for the antisense probe the plasmid was digested using *Eco*RV. Riboprobes were transcribed from 1 µg of the linearized plasmids in the presence of DIG RNA labelling mix (Roche) and 20 U RNA polymerase (Roche), Sp6 for antisense and T7 for sense probes used as controls.

## Results

### Array-CGH

Thirty-four patients were male and 23 female (sex ratio 1.5). Two patients were siblings, and there was evidence of parental consanguinity in 2 other cases.

Chromosomal imbalances not described in the database of genomic variants (DGV) were detected in 4 (2 foetuses, 2 children) of the 57 patients (7%) (table 1), leading to the identification of new candidate loci. Additional copy number variants (CNVs) were discarded after interrogation of the DGV.

### Case 1

Trisomy 2pter associated with monosomy 10qter was identified by multi-telomeric FISH in a 2-year-old girl with partial RS and growth and developmental delay associated with dysmorphic features. During the prenatal period, increased nuchal translucency, a slight hypoplastic cerebellum and intrauterine growth retardation had been observed. The rearrangement was found to be inherited from the father who carried a balanced subtelomeric translocation t(2p;10q) [Lespinasse et al., 2004]. The sizes of the rearrangements were determined from the 44K oligonucleotide Agilent array as 10.5 Mb for the 2pter duplication and 9 Mb for the 10qter deletion. Surprisingly, chromosome analysis using standard (450 bands) and high-resolution (800 bands) procedures showed a normal

karyotype probably because of the similar size of the rearranged telomeric regions.

### Case 2

A heterozygous deletion of the region 16p11.2 was identified in a male foetus with a 44K microarray. The pregnancy was terminated medically at 19 weeks of gestation for hydrocephaly, cerebellar hypoplasia and a hemivertebra. The autopsy revealed complete RS, costo-vertebral abnormalities and dysmorphic features, as described previously [Pasquier et al., 2009]. This 446-kb deletion covering 27 genes was confirmed by MLPA (SALSA P343 kit, MRC Holland). The deletion was inherited from the phenotypically normal father.

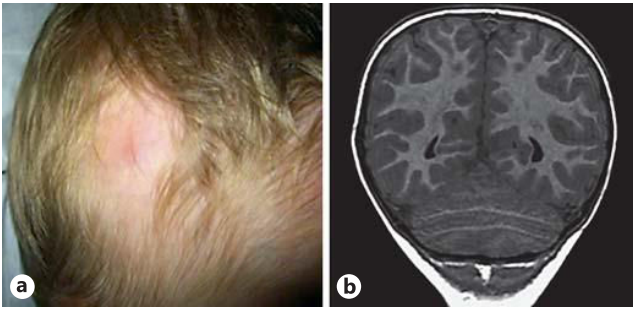
### Case 3

A de novo heterozygous deletion of 16 Mb in 14q12 encompassing more than 40 OMIM genes was detected in a female foetus (105K microarray). Hydrocephalus was diagnosed by the ultrasound scan during the second trimester. Morphological analysis of the foetus after medical termination of the pregnancy confirmed the typical cerebellar malformation associated with marked aqueductal stenosis and partial agenesis of the corpus callosum.

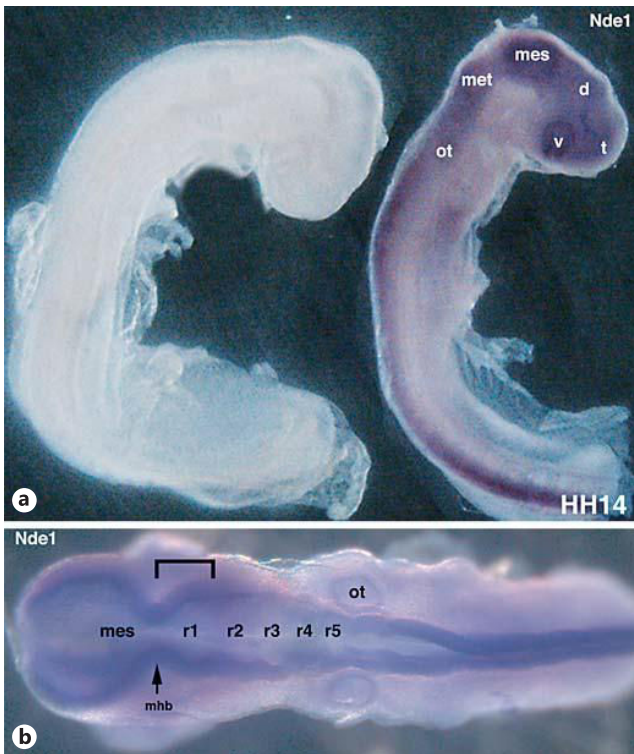
### Case 4

A 2.7-Mb de novo deletion of the region 16p13.11 was identified by array-CGH using a 44K microarray in a 5-year-old boy who presented with learning difficulties. He had bilateral temporal alopecia and partial RS (fig. 1), strongly suggestive of GLH syndrome. This deletion covered 19 genes. Two of the deleted genes, *NDE1* and *C16orf45*, were selected as candidates and were further investigated by sequencing and in situ hybridization.





**Fig. 1.** Patient 4. **a** Bilateral alopecia. **b** Abnormal transverse folial running across the midline.



**Fig. 2.** Expression of chick *NDE1* at stage HH14 in whole embryos. **a** Lateral view. Left: in situ expression with the sense probe; right: in situ expression with the antisense probe. **b** Dorsal view. d = Diencephalon; mes = mesencephalon; met = metencephalon; mhb = midbrain-hindbrain boundary; ot = otic vesicle; r1–r5 = rhombomeres; t = telencephalon; v = optic vesicle. Bracket indicates the cerebellar territory in the hindbrain (metencephalon part).

#### Sequencing of *C16orf45* and *NDE1*

All 57 patients of the cohort were analysed for mutations in the 5 coding exons of *C16orf45*, including patient 4 with the deletion of one of the alleles. No mutation was found. Only 2 polymorphisms listed in the NCBI database were found in RS patients with the expected rate. The sequencing of the 8 coding exons of *NDE1* did not reveal any mutation of the remaining allele in case 4 (data not shown).

#### *NDE1* and *C16orf45* mRNA in situ Hybridization Studies

We examined the expression pattern of *NDE1* and *C16orf45* in chick embryos during the characterization of the cerebellar territory in the hindbrain corresponding to Hamburger and Hamilton stage 14 (HH14). We observed no signal with the sense probes for *NDE1* and *C16orf45*, but with the antisense probe, we did observe strong specific expression of *NDE1* in the nervous system (fig. 2), whereas expression of *C16orf45* was ubiquitous (data not shown).

#### Discussion

We report the first large series of RS patients analyzed by array-CGH. Microrearrangements were detected in 7% of the RS cases. The microarray analysis did not identify recurrent rearrangements or deletions of regions encompassing genes known to be involved in embryogenesis of the cerebellum.

No patients with 10qter monosomy or 2pter trisomy have been reported in the literature to have RS [Courtens et al., 2006; Bonaglia et al., 2009]. The very large size of genomic regions involved did not allow us to highlight a particular candidate gene.

Microdeletions of a ~600-kb genomic region on chromosome 16p11.2, as in case 2, have been shown to be associated with a wide spectrum of neurobehavioral abnormalities, including developmental delay, autism, seizures [Shinawi et al., 2010], and obesity [Walters et al., 2010]. Congenital malformations have been reported in 30–50% of patients with CNVs of 16p11.2. The incidence of structural brain malformations is high among patients with the 16p11.2 deletion, but it is the first time that such a deletion is described in association with RS, suggesting either fortuitous association or low penetrance (the deletion is inherited from the healthy father – cerebral MRI not made) possibly through unmasking of recessive mutations.



Array-CGH analysis identified a chromosome 14 interstitial deletion of about 16 Mb in a foetus presenting partial agenesis of corpus callosum and complete RS associated with aqueductal stenosis. The deleted region encompasses the gene *FOXG1* which encodes a brain-specific transcriptional repressor that is essential for early development of the telencephalon. Mutations and deletions at this locus have been associated with congenital variant of Rett syndrome consisting of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis [Kortum et al., 2011], but no RS has been described.

The 16p13.11 deletion we report is particularly interesting because it was de novo; the patient shows features of the GLH syndrome whose aetiology remains unknown to date. Note that the 16p13.11 microdeletion syndrome is associated with neuropsychiatric disorders including schizophrenia [Ingason et al., 2011], developmental delay [Ullmann et al., 2007] and epilepsy [de Kovel et al., 2010]. Two candidate genes emerge from our study. The *NDE1* gene (nuclear distribution gene E nude homologue 1) seems to be a good candidate for the developmental delay of the patient. Indeed, whole-mount in situ hybridization for *NDE1* in chick embryos using antisense digoxigenin-labelled riboprobes showed strong and specific expression of *NDE1* in the nervous system, in particular at the mesencephalic-metencephalic junction during the development of the cerebellar territory in the hindbrain, corresponding to stage HH14 (fig. 2). This protein is essential for microtubule organization, mitosis and neuronal migration. Pawlisz et al. [2008] showed that *NDE1* interacts with *LIS1* to determine cerebral cortical size and lamination. Bakircioglu et al. [2011] recently described a human developmental disease involving extreme primary microcephaly with disordered cortical lamination (micro-lissencephaly) caused by biallelic *NDE1* mutations. The sequencing of the 8 coding exons of *NDE1* did not

reveal any mutation of the remaining allele in our case 4, excluding the possibility of its involvement following recessive inheritance. The second gene, *C16orf45*, is significantly expressed in the cerebellum according to the 'Gene Expression Omnibus' (GEO, NCBI) database and was expressed ubiquitously in the chick embryo at stage HH14 (data not shown). It encodes a protein that interacts with Enog, a protein with neurotrophic and neuroprotective properties [Hattori et al., 1995]. In this case, unmasking a recessive mutation by deletion of the second allele may have been the mechanism explaining the occurrence of GLH syndrome. However, this analysis failed to reveal deleterious mutations.

All cases with chromosomal anomalies presented with either supratentorial anomalies (hydrocephaly) or neurological disabilities. Therefore, it would be valuable to offer microarray screening during pregnancy when the diagnosis is suspected in order to predict the neurodevelopmental outcome as precisely as possible. Also, as RS is a multigenic disease with variable expressivity, inherited genetic anomalies may contribute to a RS genetic background, and thus these inherited deletions should be recorded.

The identification and characterisation of more genomic imbalances associated with RS will allow further delineation of minimal critical RS loci, which is the first step towards the identification of new RS genes.

Thus, total exome sequencing for cases of GLH and RS would be valuable and informative.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the families, geneticists and pathologists, especially Dr. J. Martinovic who participated in this study. This work is supported by grants from the French Hospital Clinical Research Program 2008 (PHRC inter-régional ARM 08/242).

## References

- Bakircioglu M, Carvalho OP, Khurshid M, Cox JJ, Tuysuz B, et al: The essential role of centrosomal *NDE1* in human cerebral cortex neurogenesis. *Am J Hum Genet* 88:523–535 (2011).
- Bell BD, Stanko HA, Levine RL: Normal IQ in a 55-year-old with newly diagnosed rhombencephalosynapsis. *Arch Clin Neuropsychol* 20: 613–621 (2005).
- Bonaglia MC, Giorda R, Massagli A, Galluzzi R, Ciccone R, Zuffardi O: A familial inverted duplication/deletion of 2p25.1–25.3 provides new clues on the genesis of inverted duplications. *Eur J Hum Genet* 17:179–186 (2009).
- Chapman SC, Schubert FR, Schoenwolf GC, Lumsden A: Analysis of spatial and temporal gene expression patterns in blastula and gastrula stage chick embryos. *Dev Biol* 245:187–199 (2002).
- Courtens W, Wuyts W, Rooms L, Pera SB, Wauters J: A subterminal deletion of the long arm of chromosome 10: a clinical report and review. *Am J Med Genet A* 140:402–409 (2006).
- Danon O, Elmaleh M, Boukobza B, Fohlen M, Hadjnader K, Hassan M: Rhombencephalosynapsis diagnosed in childhood: clinical and MRI findings. *Magn Reson Imaging* 18:99–101 (2000).





- de Kovel CG, Trucks H, Helbig I, Mefford HC, Baker C, et al: Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain* 133:23–32 (2010).
- Hattori T, Takei N, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S: Neurotrophic and neuroprotective effects of neuron-specific enolase on cultured neurons from embryonic rat brain. *Neurosci Res* 21:191–198 (1995).
- Ingason A, Rujescu D, Cichon S, Sigurdsson E, Sigmundsson T, et al: Copy number variations of chromosome 16p13.1 region associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 16:17–25 (2011).
- Ishak GE, Dempsay JC, Shaw DW, Tully H, Adam MP, et al: Rhombencephalosynapsis: a hindbrain malformation associated with incomplete separation of midbrain and forebrain, hydrocephalus and a broad spectrum of severity. *Brain* 135:1370–1386 (2012).
- Kortum F, Das S, Flindt M, Morris-Rosendahl DJ, Stefanova I, et al: The core *FOXP1* syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis. *J Med Genet* 48:396–406 (2011).
- Lespinasse J, Testard H, Nagues F, Till M, Cordier MP, et al: A submicroscopic unbalanced subtelomeric translocation t(2p;10q) identified by fluorescence in situ hybridization: fetus with increased nuchal translucency and normal standard karyotype with later growth and developmental delay, rhombencephalosynapsis (RES). *Ann Genet* 47:405–417 (2004).
- Lopez-Hernandez A: Craniosynostosis, ataxia, trigeminal anaesthesia and parietal alopecia with pons-vermis fusion anomaly (atresia of the fourth ventricle). Report of two cases. *Neuropediatrics* 13:99–102 (1982).
- Mercier S, Dubourg C, Garcelon N, Campillo-Gimenez B, Gicquel I, et al: New findings for phenotype-genotype correlations in a large European series of holoprosencephaly cases. *J Med Genet* 48:752–760 (2011).
- Michaud J, Mizhari EM, Ulrich H: Agenesis of the vermis with fusion of the cerebellar hemispheres, septo-optic dysplasia and associated anomalies. Report of a case. *Acta Neuropathol* 56:161–166 (1982).
- Millonig JH, Millen KJ, Hatten ME: The mouse *Dreher* gene *Lmx1a* controls formation of the roof plate in the vertebrate CNS. *Nature* 403:764–769 (2000).
- Obersteiner H: Ein Kleinhirn ohne Wurm. *Arb Neurol Inst (Wien)* 21:124–136 (1914).
- Pasquier L, Marcocelles P, Loget P, Pelluard F, Carles D, et al: Rhombencephalosynapsis and related anomalies: a neuropathological study of 40 fetal cases. *Acta Neuropathol* 117:185–200 (2009).
- Pawlisz AS, Mutch C, Wynshaw-Boris A, Chenn A, Walsh CA, Feng Y: *Lis1-Nde1*-dependent neuronal fate control determines cerebral cortical size and lamination. *Hum Mol Genet* 17:2441–2455 (2008).
- Poretti A, Bartholdi D, Gobara S, Alber FD, Boltshauser E: Gomez-Lopez-Hernandez syndrome: an easily missed diagnosis. *Eur J Med Genet* 51:197–208 (2008).
- Poretti A, Alber FD, Bürki S, Toelle SP, Boltshauser E: Cognitive outcome in children with rhombencephalosynapsis. *Eur J Paediatr Neurol* 13:28–33 (2009).
- Romanengo M, Tortori-Donati P, Di Rocco M: Rhombencephalosynapsis with facial anomalies and probable autosomal recessive inheritance: a case report. *Clin Genet* 52:184–186 (1997).
- Sandalcioglu IE, Gasser T, van de Nes JA, Menken U, Stolke D, Wiedemayer H: Fusion of the cerebellar hemispheres ventral to the brainstem: a rare hindbrain-related malformation. *Childs Nerv Syst* 22:73–77 (2006).
- Sener RN: Unusual MRI findings in rhombencephalosynapsis. *Comput Med Imaging Graph* 24:277–282 (2000).
- Sergi C, Hentze S, Sohn C, Voigtländer T, Jung C, Schmitt HP: Telencephalosynapsis (synencephaly) and rhombencephalosynapsis with posterior fossa ventriculocele ('Dandy-Walker cyst'): an unusual aberrant syngenetic complex. *Brain Dev* 19:426–432 (1997).
- Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, et al: Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet* 47:332–341 (2010).
- Truwit CL, Barkovich AJ, Shanahan R, Maroldo TV: MR imaging of rhombencephalosynapsis: report of three cases and review of the literature. *AJNR Am J Neuroradiol* 12:957–965 (1991).
- Ullmann R, Turner G, Kirchoff M, Chen W, Tonge B, et al: Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat* 28:674–682 (2007).
- Utsunomiya H, Takano K, Ogasawara T, Hashimoto T, Fukushima T, Okazaki M: Rhombencephalosynapsis: cerebellar embryogenesis. *AJNR Am J Neuroradiol* 19:547–549 (1998).
- Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A, de Smith AJ, Martinet D, et al: A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 463:671–675 (2010).
- Yachnis AT: Rhombencephalosynapsis with massive hydrocephalus: case report and pathogenetic considerations. *Acta Neuropathol* 103:301–304 (2002).



## Annexe 2.

- ◆ Poster présenté lors du congrès « British societies of Cellular Biology and Developmental Biology », Coventry, Angleterre.



# Notch signalling governs neuronal differentiation in the developing hypothalamus

Leslie Ratié<sup>1</sup>, Véronique David<sup>1,2</sup>, Frédérique Hubler<sup>1</sup>, Isabelle Gicquel<sup>1</sup> and Valérie Dupé<sup>1</sup>  
 (1) UMR 6290, Université de Rennes, France ; (2) Génétique Moléculaire, CHU, Rennes, France

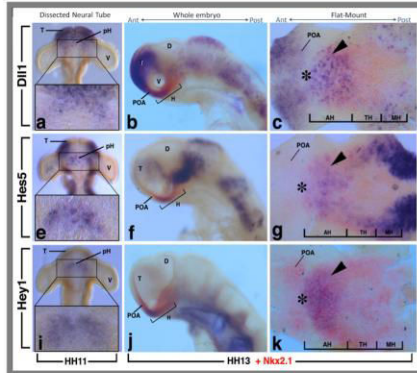
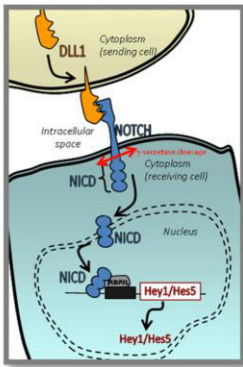
## Introduction

The generation of diverse neuronal types and subtypes from multipotent progenitors during development is crucial for assembling functional neural circuits in the adult central nervous system. Although it is well known that Notch pathway is a key regulator of neurogenesis in the vertebrate central nervous system, its potential role during hypothalamus formation remains poorly defined as well as its downstream effectors. To address whether NOTCH pathway could play a role in influencing the cell fate choice that occurs during hypothalamic development, we used a pharmacological approach to inhibit NOTCH signalling in chick embryos using a  $\gamma$ -secretase inhibitor (DAPT). We have tested the molecular reprogramming of the brain during midline specification using a transcriptomic approach. Among the genes found to be severely repressed were *Hes5* and *Hey1* known to be direct targets of NOTCH. It demonstrates the validity of our microarray approach to identify new target genes for NOTCH signalling. Then, we characterized neural precursor genes specifically expressed at the very first stages of hypothalamus development and which are Notch dependent.

## Methods

- Ex ovo roller culture and pharmacological treatment: Chick embryos are cultured 16h at 38°C from HH9 with  $\gamma$ -secretase inhibitor (DAPT)
- Transcriptomic analysis on anterior brain samples:
  - Agilent microarray-whole chicken genome (13517 unique genes)
  - Genespring GX software
- RNA *in situ* hybridization on Whole-Mount chick embryo

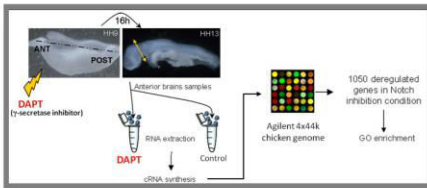
## Regionalized expression of components of the NOTCH pathway in hypothalamus primordium in chick embryo



- At stage 11:
  - A specific ventral midline expression for two direct targets genes (*Hes5* and *Hey1*) and *Dll1*
  - Crescent moon between the 2 OV in the hypothalamus primordium
- At stage 13:
  - Nkx2.1* is a marker of the developing hypothalamus
  - Overlapping expression of *Nkx2.1* and Notch components restricted to the anterior region of hypothalamus

AH: Anterior hypothalamus  
 D: Diencephalon  
 T: Telencephalon  
 H: Hypothalamus  
 MH: Mammillary region of the hypothalamus  
 pH: Primordium hypothalamus  
 POA: Preoptic area of the basal telencephalon  
 TH: Tubular region of the hypothalamus  
 V: Optic Vesicles  
 -: Chiasmata plate midline

## Notch response genes in the developing forebrain and *in situ* hybridization validation for genes expressed in the developing hypothalamus

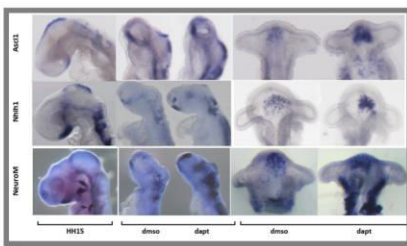


Gene Title	Gene Description	Accession Number	FC	Expression values
<i>HES5</i>	Helix and enhancer of split 5 (Drosophila)	NM_001022095	-6.47	Control: 0.0, Treated: 2.7
<i>HEY1</i>	Helix and enhancer of split 1 (Drosophila)	U031374	-2.68	
<i>ZAG1</i>	Notch-regulated inhibitor repeat protein	NM_128951	-2.59	
<i>JAG1</i>	Jagged 1 (Alagille syndrome)	N09293	-1.57	
<i>LFN3</i>	LEF3 (Drosophila) 3 beta-N-acetylglucosaminyltransferase	NM_204848	-1.52	
<i>NTM8</i>	Notch homolog (Drosophila)	NM_204835	-1.48	
<i>LEF1</i>	Lymphoid enhancer-binding factor 1	NM_205013	-1.32	
<i>DTEL</i>	Delta 3-like (Drosophila)	BC091444	-1.31	
<i>NOTCH1</i>	Notch 1	AJ152251	-1.23	
<i>DLL1</i>	Delta like 1 (Drosophila)	NM_204873	-1.27	
<i>LARG1</i>	LRM domain only 2 (Drosophila like 1)	NM_204271	-1.08	
<i>DLL3</i>	Distal-less homolog 1	NM_001045842	-1.91	
<i>RRPE</i>	Recombination signal binding protein for Ig kappa J region-like	NM_011761.3	1.73	
<i>APPL4</i>	Antennaplex class-defector 1 homolog A.C. (mouse)	NM_002133081	1.25	
<i>FOXO4</i>	Forkhead box N4	NM_001063359	1.34	
<b>Nervous system development</b>				
<i>NEUROG1</i>	Neurogenin 1	NM_204883	0.91	
<i>TAGLN3</i>	Transglutinin 3	BC059918	0.93	
<i>NRX1E2</i>	Neurexin helix loop helix 2	AF121885	0.82	
<i>NEFM</i>	Neurofilament, medium polypeptide 1/8kDa	N02058	0.69	
<i>CHGA</i>	Chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)	NM_021310	0.14	
<i>NEUROG2</i>	Neurogenin 2	NM_204821	0.98	
<i>ITIH2</i>	Integrin-like 2	NM_205181	2.50	
<i>GLP4</i>	Glycylglycyl-associated protein 43	NM_225257	2.02	
<i>ECNMA1</i>	Potassium conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha 1	NM_204224	1.84	
<i>NRX1</i>	Neurexin 1	NM_204117	1.79	
<i>SRG1</i>	Single-minded homolog 1 (Drosophila)	U03058	1.75	
<i>BX1</i>	Brain-specific homeobox	NM_204812	1.69	
<i>ASCL1</i>	Achaete-scute complex homolog 1 (Drosophila)	NM_204412	1.68	
<i>NEUROG2</i>	Neurogenin 2	NM_204796	1.58	
<i>ROBO2</i>	Roundabout, axon guidance receptor, homolog 2 (Drosophila)	NM_204761	1.47	
<i>CNTN2</i>	Connexin 2 (mouse)	NM_001064995	1.41	
<i>HEX3</i>	Helix and enhancer of split 6 (Drosophila)	BC091718	1.39	
<i>SLIT1</i>	Slit homolog 1 (Drosophila)	GU20460	1.37	
<i>BRINP</i>	Brain-derived neurotrophic factor	NM_001104026	1.31	
<i>CHRD1</i>	Chordin like 1	NM_204171	1.31	

### Gene Ontology analysis performed using Webqstalt online software

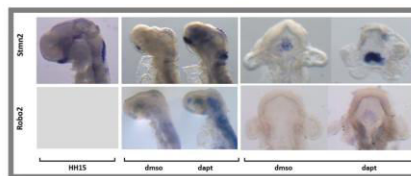
- Transcriptional targets and/or Notch components regulated as expected
- 76 genes related to *Nervous system development*
  - Neurogenesis markers are upregulated
- Selection of 45 upregulated genes
- 20 of them have specific staining in the ventral forebrain by *in situ* hybridization and are classified in 3 classes:

### 1. Genes previously known to be regulated by Notch



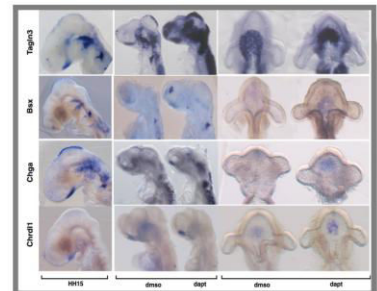
- Overexpression of proneural genes in the anterior ventral telencephalon
- Increase of neuron densities in the ventral midline
- Early neurogenesis in the hypothalamus

### 2. Known Hypothalamic markers but not known as Notch target



- Overexpression in the anterior ventral telencephalon
- Hypothalamic markers under the control of Notch pathway/proneural genes regulation loop

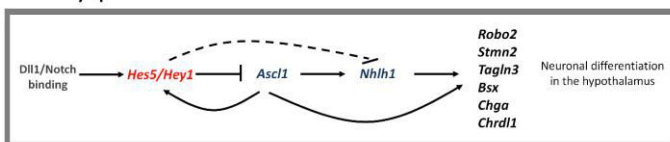
### 3. Genes not related to Notch signalling and not described in the forming hypothalamus



- Characterization of several new neuronal markers regulated by Notch
- Some are expressed in inner ear, olfactory epithelium and ganglionic precursors: *Tagln3/Bsx/Chga*
- Crucial role of Notch signalling during the hypothalamus development

## Conclusion

- Contribution of Notch pathway to initial steps during hypothalamus patterning
- Similar regulation process of neurogenesis between the hypothalamus and olfactory epithelium



## Ongoing

- Promoter study: identification of potential regulation program of the identified neuronal markers
  - Design of consensus sequence binding for transcriptional factors: Ascl1, Hes5, Hey1, Neurog1/2
- Mouse study



VU :

**Le Directeur de Thèse**

VU :

**Le Responsable de l'Ecole Doctorale**

**VU pour autorisation de soutenance  
Rennes, le**

**Le Président de l'Université de Rennes 1**

**Guy CATHELINÉAU**

**VU après soutenance pour autorisation de publication :**

**Le Président de Jury,**