



HAL
open science

Rôle morphogénétique de la crête neurale céphalique au cours du développement précoce de l'oeil

Soufien Sghari

► **To cite this version:**

Soufien Sghari. Rôle morphogénétique de la crête neurale céphalique au cours du développement précoce de l'oeil. Morphogenèse. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS053 . tel-01478219

HAL Id: tel-01478219

<https://theses.hal.science/tel-01478219>

Submitted on 28 Feb 2017

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

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

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY

Préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 419

Signalisation et réseaux intégratifs en biologie

Spécialité de doctorat : Neurosciences

Par

Mr Soufien SGHARI

Role morphogénétique de la crête neurale céphalique

Au cours du développement précoce de l'oeil

**Thèse présentée et soutenue à l'institut de neurosciences Paris-saclay, le 29
octobre 2015 :**

Devant le Jury composé de :

Pr. Simon SAULE, président et Examineur

Dr. Heather ETCHEVERS, Rapporteur

Dr. Renata KOZYRAKI, Rapporteur

Dr. Jean-Loup DUBAND, Examineur

Dr. Sophie CREUZET, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens tout d'abord exprimer mes vifs remerciements au Docteur Philippe Vernier pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et qui m'a toujours soutenu intellectuellement, moralement et scientifiquement.

Mes remerciements vont également au Docteur Sophie Creuzet, ma directrice de thèse qui m'a encadré tout au long de ce travail. Je voudrais témoigner ma reconnaissance à l'égard de son amabilité et sa disposition à me faire profiter de sa grande expérience. Elle m'a initiée à l'embryogenèse et c'est grâce à sa vaste culture et sa rigueur scientifique que j'ai pu mener à bout cette recherche.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude au l'équipe du Docteur François Rouyer pour leur disponibilité, ainsi que pour leur remarques et ses conseils fructueux dans la réalisation et l'interprétation des résultats de qPCR.

Je remercie les ex-membres de l'équipe Diego, Sylvie et Philippe sincèrement pour leur aide technique, pour leur sympathie et leur soutien au quotidien. Je remercie aussi tous les stagiaires Fanny, Charlotte, Brigitte et Suzana pour leur sympathie également.

Je remercie plus particulièrement mes amis Aurélie, Adil, Moussab et Florian également pour leur soutien, je n'oublierai jamais les bons moments que j'ai vécus avec vous tous et les échanges fructueux dans tous les domaines. Quevous trouviez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et ma sincère gratitude à toute personne qui s'est donné la peine de lire ce document et l'enrichir par ses commentaires.

Enfin, je dédie ce travail,

A ma femme Rania pour son amour, sa présence et son soutien moral jusqu'à l'aboutissement de ce travail. A mes parents, que cette thèse soit une marque de gratitude et de reconnaissance à l'égard de tous les sacrifices qu'ils ont fait pour moi, de leur soutien permanent et de l'amour qu'ils me portent et qui me permet de surmonter les difficultés.

A mon frère, mes sœurs et toute ma famille et ma belle famille, qu'ils trouvent dans ce travail le témoignage de ma profonde affection.

Avant-propos

Durant mes études cliniques en Orthoptie (sous-spécialité d'ophtalmologie), j'ai été confronté à des maladies oculaires incurables dont la physiopathologie n'a pas encore été comprise telles que le glaucome, le nystagmus et autres malformations congénitales du segment antérieur et postérieur. Ces raisons m'ont amené, après l'obtention de mon diplôme d'orthoptiste, à compléter ma formation scientifique en réorientant mon cursus universitaire vers la recherche en Biologie en travaillant sur les différentes pathologies oculaires. Pendant mon stage de M1 dans le Département Thérapeutique à l'Institut de la Vision à Paris sous la direction du Pr Christophe BAUDOUIN, j'avais travaillé sur le syndrome de l'œil sec, une maladie oculaire qui touche environ 4 millions de Français et se caractérise le plus souvent par un dysfonctionnement des glandes de Meibomius, responsables de la production du film lipidique dont le rôle est d'empêcher l'évaporation des larmes. Pendant mon stage j'ai contribué à la mise en évidence de la toxicité des collyres avec des conservateurs de type chlorure de benzalkonium ainsi que l'élaboration de nouveaux médicaments prometteurs. Malgré la courte durée de mon stage, le milieu de recherche clinique m'a tellement attiré que j'ai continué en Master 2 en travaillant au sein du même institut mais avec une autre équipe sous la direction du Dr Marisol CORRAL-DEBRINSKI qui s'intéressait à la maladie de NOHL (Neuropathie Optique Héritaire de Leber) : Cette pathologie rare touche plus de 5000 personnes en France et se caractérise par la mort sélective des cellules ganglionnaires de la rétine et l'atrophie du nerf optique. Elle entraîne une perte brutale et irréversible de la vision centrale. La NOHL se transmet selon un mode non mendélien ou maternel. Elle est, en effet, due à des mutations dans des gènes portés par le génome mitochondrial comme les gènes ND1, ND4 ou ND6

dans 95% des cas. Mon projet de stage consistait à valider la sureté du vecteur viral « rAAV2 » ainsi que la protéine recombinante ND4 sur la physiologie rétinienne, une étape ultime de validation de la thérapie génique mitochondriale pour la (NOHL) auparavant incurable.

Les malformations oculaires congénitales sont des maladies rares qui peuvent être complexes ou isolées et malgré les avancées de la recherche, on ignore l'étiologie de certaines malformations. Pour répondre à cela, il m'a fallu approfondir mes connaissances sur l'embryologie de l'œil et sur la participation des différents feuillets embryonnaires à ses composantes, et en occurrence la Crête Neurale. Pour cette raison, j'ai poursuivi mon cursus dans le domaine de la Neuro-Ophtalmo-Biologie par la préparation d'une Thèse de Doctorat dans l'équipe « Crête Neurale : Développement et Evolution » sous la direction du Dr Sophie CREUZET afin d'étudier les aspects fondamentaux de la Neurobiologie du Développement et, plus particulièrement, le rôle de la crête neurale céphalique (CNC) dans la spécification des champs optiques et le développement du cerveau antérieur.

Dans mon projet de thèse nous avons découvert que la CNC exerce un rôle trophique au cours de la morphogenèse précoce de l'œil et que la perturbation de la migration de la CNC empêche la séparation des deux vésicules optiques du reste du prosencéphale et induit leur fusion en un seul œil cyclope.

Liste d'abréviation

ADNc : Acide Désoxyribo-Nucléique complémentaire
AJ : Adherens Junction
ANP : Anterior Neural Plate
ANR : Anterior Neural Ridge
Ap2- α : Activating enhancer binding protein 2 alpha
AR: Acide Rétinoïque
Bmp: Bone morphogenetic protein
CCN: Cellule de Crête Neurale
CELSR 1 : Cadherin, Egf Lag Seven-pass G-type Receptor 1 (flamingo homolog, Drosophila)
CGR: Cellule Ganglionnaire de la Rétine
CN: Crête Neurale
CNC: CN Céphalique
CNT: CN Troncale
CNV: CN Vagale
CO: Cupule Optique
CS: Carnegie Stage
Dapi: 4', 6- diamidino-2-phénylindole
Dis: Distal
Die: Diencéphale
Dig: Digoxigénine
dil: 1,10 -dioctadécyl- 3,3,30,30 –tetraméthyl-Indocarbocyanide perchlorate
dsWnt1 : double strand against *Wnt1* RNA
dsWnt2 : double strand against *Wnt2b* RNA
Dvl : dishevelled, dsh homolog
E : Embryonic day
EC : Extension Convergente
ERP : Epithélium Rétinien Pigmentaire
ES : Ectoderme de Surface
Fgf: Fibroblast growth factor
Foxc1: Forkhead box c1
FoxD3: Forkhead box D3
Foxg1: Forkhead box g1
Fz: Frizzled
GFP: Green Fluorescent Protein
GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3
h: heure
H&E: Hématoxylineand Eosine
HH : Hamburger and Hamilton
HNK1 : Human Natural Killer-1
j : jour
KOH : potasse
LiCl : chlorure de lithium

LTR : LysoTracker Red
VC : Vésicule du Cristallin
min : minute
Mitf : Microphthalmia-associated transcription factor
mm : millimètre
ng : nanogramme
nm : nanomètre
Otx2 : Orthodenticle homeobox 2
Pax : Paired box
pb : paire de base
PBS : Phosphate Buffered Saline
PC : Placode du Cristallin
PCP : Polarité Cellulaire Planaire
PPC : Plaque Pré-Chordale
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pitx2 : Paired-like homeodomain 2
Pr : Proximal
RAR : Récepteur de l'Acide Rétinoïque
RN : Rétine Neurale
ROCK 1 : Rho-associated, coiled-coil-containing protein Kinase 1
Rx : Retinal homeobox gene
s : seconde
Sfrp 1 : Secrète frizzled-related protein 1
Shh : Sonic hedgehog
Six : Six homeobox
Slug : Snail homolog
Sox : SRY (sex determining region Y)-box
ss : somite stage
TCF : T-Cell specific transcription Factor
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF-β : Transforming Growth Factor beta
TO : Tige Optique
TR : Transcription Réverse
μM : micromolaire
V : Volt
Vangl2 : Vang-like 2 (van gogh, Drosophila)
VO : Vésicule Optique
Wnt : Wingless
Zic : zinc finger of the cerebellum
RD/T : bordure Rostral Diencéphale/Télocéphale
Tel : Télocéphale
°C : degrés celsius
μg : microgramme
μl : microlitre

3°V : Troisième ventricule

3HTdR : Thymidine tritiée

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
Partie I-Crête Neurale Céphalique (CNC)	2
I.1-Induction de la crête neurale	3
I.1.1-Bmp	5
I.1.2- Wnt	7
I.1.3- Fgf	10
I.2- Signaux de spécification de la CN	11
I.3- Migration et différenciation de la crête neurale céphalique	13
Partie II-Morphogenèse précoce de l'œil	20
II.1-Vue générale sur le développement précoce de l'œil	20
II.2- Signaux de compartimentation de l'œil	23
II.2.1 Fgf	23
II.2.2 Wnt	24
II.2.3 Shh	25
II.2.4 Bmp	26
II.3-Contribution de la crête neurale céphalique aux structures oculaires et péri-oculaires	27
II.3.1-Contributions du mésenchyme céphalique au segment antérieur	28
II.3.2- Contributions de la CNC au segment antérieur	31
II.3.2.a- Désaccords sur les cartographies de CN	31
II.3.2.b-Dérivés oculaires de la CNC chez le poulet	32
II.3.2.c-Dérivés oculaires de la CNC chez la souris	35
Partie III. Neurocristopathies congénitales craniofaciales	39
PROBLEMATIQUES	45
I-Situation du sujet	46
II-Mise en place du projet scientifique	49

MATERIELS ET METHODES _____ **53**

I-Matériel expérimental et molécules biologiques _____ **54**

I.1-Manipulation des embryons d'oiseaux _____ 54

I.2-Préparation de la solution de protéine recombinante de Bmp7 _____ 54

I.3.1-Synthèse des molécules d'ARN interférent _____ 54

I.3.2-Constructions plasmidiques pour les expériences de gain de fonction de la signalisation
Wnt _____ 55

II-Méthodes _____ **56**

II-1- Manipulation de l'expression des gènes et étude de leur activité _____ 56

II-1.1-Injection de la protéine recombinante Bmp7 dans la plaque pré-chordale (PPC) ____ 56

II-1.2-Electroporation in ovo _____ 56

II.1.3-Hybridation in situ sur des embryons entiers et synthèse des ribosondes _____ 58

II.1.4-Synthèse de ribosondes _____ 58

II.1.5-Transcription Reverse et PCR quantitative (qPCR) _____ 59

II.1.5.1-Extraction des ARN totaux et transcription reverse _____ 59

II.1.5.2-Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR _____ 59

II.2. Analyses histochimiques et immunohistochimiques _____ 61

II.2.1-Sur embryons entiers _____ 61

II.2.1.1-Détection de la mort cellulaire _____ 61

II.2.1.b-Eclaircissement des embryons _____ 61

II.2.2-Sur des coupes d'embryons _____ 62

II.2.2.1-Inclusion dans la paraffine et coupes de microtome _____ 62

II.2.2.2-Inclusion dans l'agarose et coupes de vibratome _____ 62

II.2.2.3-Coloration de Crésyl violet _____ 62

II.2.2.4-Détection des protéines par immunofluorescence _____ 63

II.2.2.5-Coloration à l'éosine et à l'hématoxyline _____ 65

II.2.2.6-Visualisations au microscope à fluorescence _____ 65

III. Analyses statistiques	66
RESULTATS	68
I) Du colobome à la cyclopie: rôle morphogénétique de la crête neurale céphalique et de ses médiateurs moléculaires dans la spécification du nerf optique embryonnaire	69
Présentation des résultats	69
Research article 1	79
Abstract	80
Introduction	81
Results	84
Bmp7 injection in Pcp reproduces CNC ablation	84
Cyclopia is preceded by perturbations in the organization of the cephalic neuroepithelium and the dorsal OV apical constriction	84
Bmp7 treatment disturbs early the patterning of the prosencephalon	87
Excess of Bmp7 in Pcp induced alterations of cell migratory behavior of the CNC	88
Analysis of the role of Wnt1 signaling in eye and cephalic development	89
<i>Wnt2b</i> rescue improves almost of the cyclopic phenotype	91
CNC migration is improved early by only <i>dsWnt1</i> rescue	93
Regionalization factors are restored in double rescue	94
DISCUSSIONS	95
MATERIALS AND METHODS	99
Avian embryos and surgical procedures	99
Injection of Bmp7 recombinant proteins solutions	99
In ovo electroporation	100
Nucleic acid preparation	100
In Situ Hybridization of Whole Chick Embryos	101
RNA extraction and qRT-PCR assay	101
Cell death detection	103
Immunohistochemistry	103

Histology _____	104
Acknowledgements _____	104
Competing interests _____	105
Author contributions _____	105
Funding _____	105
References _____	105
Fig. S3 _____	132
II-La Crête neurale faciale contrôle la morphogenèse prosencéphalique et mésencéphalique par la régulation de l'expression de <i>Foxg1</i> à travers la signalisation Smad1 _____	134
DISCUSSION _____	148
I- Modèle expérimental et validation phénotypique _____	149
II- Le défaut de régionalisation du cerveau antérieur précède la cyclopie _____	150
III- L'activité de Bmp7 dans la PCP affecte l'expression des gènes <i>Foxg1</i>, <i>Pax6</i> et <i>Otx2</i> dans le neuroépithélium prosencéphalique _____	152
IV- La mort cellulaire n'est pas la cause première de la cyclopie _____	155
V- la CNC joue un rôle prépondérant dans la séparation des deux VO _____	156
VII- La surexpression de Wnt1 perturbe la migration de la CNC _____	158
VIII- L'expression de Wnt2b dans les VO est indispensable à leur invagination _____	161
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES _____	167
BIBLIOGRAPHIES _____	172

Listedes figures

Figure 1: Les signaux moléculaires et mouvement morphologiques participant à la spécification de la CN.....	6
Figure 2: Cartographie des dérivés de la CN tout au long du tube neural.....	16
Figure 3: Cartographie de la CN céphalique au niveau de la tête et du coeur chez le poulet.....	17
Figure 4: Différents stades de développement de l'œil chez la souris.....	22
Figure 5: Dérivés oculaires et péri-oculaires de la CNC chez le Poulet.....	34
Figure 6: Dérivés de la CNC et du mésoderme chez l'embryon de poulet et de souris respectivement.....	36
Figure 7: Spectre phénotypique de l'HPE chez l'Homme.....	47

Listedes tableaux

Tableau 1: Constructions utilisées pour la synthèse des ribosondes utilisées en hybridation in situ et des ARNdb pour les expériences de perte de fonction par ARN interférence :	57
Tableau 2: Les amorces sens et anti-sens pour les analyses de RT-qPCR ont été synthétisées pour amplifier des séquences de 149-151 pb.....	60
Tableau 3: Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'étude de la migration de la CNC, des marqueurs de polarité cellulaires et de constriction apicale ainsi que des morphogènes	64

Résumé

La crête neurale céphalique (CNC) est une structure pluripotente à l'origine de la totalité du squelette de la face et de la voûte crânienne. L'absence de la CNC est associée à des malformations du cerveau antérieur et des défauts oculaires qui reproduisent les malformations congénitales humaines : microcéphalie, holoprosencéphalie, aniridie, chambre antérieure manquante, colobome congénital, désorganisation du cristallin, agénésie des paupières, strabisme précoce (Alward 2000, Creuzet 2009, Williams and Bohnsack 2015). Dans notre étude, l'augmentation hétérochronique de la signalisation Bmp7 au niveau de la plaque préchordale (PPC) a engendré une perturbation de la migration de la CNC associée à une fusion des deux champs oculaires en un seul œil cyclope. Cette cyclopie, contrairement à ce qui avait été observé dans d'autres études antérieures (Chiang et al. 1996, Golden et al. 1999), a été précédée par une perturbation au stade Hamburger-Hamilton (HH) 12 de la constriction apicale au niveau des vésicules optiques (VO), phénomène responsable de l'invagination dorsale des VO et leur séparation du reste du tube neural. Au niveau moléculaire, nous avons enregistré une augmentation de la signalisation Wnt1 très tôt après le traitement Bmp7 (2h) dans la CNC. Cette augmentation s'est étendue rostralement, ce qui suggère que *Wnt1* pourrait être impliqué dans la perturbation du développement oculaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons mené des expériences de sauvetage en inactivant la signalisation Wnt1 par ARN interférence. Nous avons observé une amélioration du phénotype, même si les yeux sont restés morphologiquement en hypotélorisme, c'est-à-dire trop proches. Des coupes coronales au stade E8 (32-33HH) ont montré que les yeux sont synophtalmiques, deux yeux dans une seule orbite, et sont restés fusionnés au télencéphale. Au niveau moléculaire, nous avons observé aussi au niveau des VO chez l'embryon cyclope une diminution de l'expression de *Wnt2b* qui persiste malgré le sauvetage par *Wnt1*. Pour comprendre cette signalisation, nous avons entrepris une deuxième expérience de sauvetage combinant un ARN interférent contre *Wnt1* dans le tube neural et un vecteur plasmidique exprimant *Wnt2b* dans les VO. Vers E8 l'embryon ressemblait au contrôle mais il persistait une fusion entre les VO et le télencéphale. L'hybridation *in situ* a montré une diminution du niveau d'expression de *Foxg1* à 12HH dans la partie dorsale des VO au niveau de la frontière entre la partie rostrale du diencéphale et le

télocéphale (RD/T) dans les deux tentatives de sauvetage, suggérant que ce gène pourrait être impliqué dans la séparation rostrale des VO du télencéphale.

Abstract

The cephalic neural crest (CNC) is a pluripotent structure giving rise to the entire skeleton of face and skull. Absence of CNC is associated with forebrain and eye defects that mimic human congenital malformations: microcephaly, holoprosencephaly, aniridia, missing anterior chamber, coloboma, congenital dislocation of the lens, agenesis of eyelid and early strabismus. (Alward 2000 Creuzet 2009, Williams and Bohnsack 2015). In our study, heterochronic increased Bmp7 signaling in the prechordal plate (Pcp), caused a disruption of CNC migration associated with fusion of the two optical fields into one cyclopic eye. This cyclopia, unlike what was shown in previous studies (Chiang et al. 1996, Golden et al. 1999), was preceded at Hamburger-Hamilton (HH)12 stage by a disturbance of the apical constriction in optic vesicles, which is responsible for dorsal invagination of OVs and their separation from the rest of the neural tube. At the molecular level, we recorded an increase in *Wnt1* expression very early after Bmp7 treatment (2h) in CNC and this increase extends rostrally suggesting that Wnt1 could be involved in the disturbance of eye development. In order to test this hypothesis, we performed rescue experiments by inactivating Wnt1 signaling using RNA interference and we observed an improvement of the phenotype even if the eyes remained morphologically in hypotelorism, i.e. too close one to another. At E8 (32-33HH) stage, eyes remained fused to the forebrain and were synophthalmic, i.e. two eyes in a single orbit. We also observed in the cyclopic embryo a decrease in *Wnt2b* expression in OV that remained despite *Wnt1* rescue. To understand Wnt2b signaling, we tested a second rescue experience combining RNA interference against *Wnt1* in the CNC and a plasmid vector expressing *Wnt2b* in OV. Coronal sections at E8 stage were similar to the control but with persistence of dorsal fusion between OVs and telencephalon. Using *in situ* hybridization showed, a decrease in *Foxg1* expression at 12HH was observed in the dorsal part of OVs in the RD/T boundary in the two rescue attempts, suggesting that this gene could be involved in the separation of OVs at 12HH stage rostrally from the telencephalon.

INTRODUCTION GENERALE

Partie I-Crête Neurale Céphalique(CNC)

La crête neurale (CN) est une population de cellules pluripotentes unique de l'embryon des vertébrés. Au début de la neurulation, la CN se positionne à la frontière entre l'ectoderme non-neural et la plaque neurale. Ce territoire, également connu sous le nom de bourrelet neural, flanque bilatéralement la plaque neurale.

Les cellules de la CN proviennent du tube neural qui s'étend du diencéphale postérieur jusqu'au niveau sacré. Au cours de la neurulation, la plaque neurale se ferme pour former le tube neural, en réunissant les bourrelets neuraux le long de la ligne médiane dorsale. Au cours de cette étape, les cellules de la CN subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), au cours de laquelle elles se détachent du neuroépithélium pour migrer dans tout l'embryon. La TEM, qui accompagne le processus de neurulation, est initiée au niveau rostral, puis gagne de proche en proche les niveaux plus caudaux. La capacité de TEM est une caractéristique unique de la CN au cours du développement, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude des bases moléculaires de la migration cellulaire dans les conditions physiologiques et pathologiques. Malgré une grande similarité dans les mécanismes de la migration des cellules de la CN entre les espèces, il existe cependant des différences inter-spécifiques. Par exemple, chez le poulet, le poisson, et le xénope, la migration de la CN est initiée à la fermeture du tube neural, tandis que chez la souris, la migration de la CN débute avant que le tube neural ne soit complètement fermé (Kulesa et al. 2004).

La CN a été décrite pour la première fois dans des embryons de poulet par Wilhelm His en 1868 (His 1868) en tant que « corde intermédiaire » (Zwischenstrang), à savoir un

groupe de cellules issues du tube neural et étant à l'origine des ganglions rachidiens et crâniens ([Hörstadius 1950](#)). Depuis, la CN a fasciné des générations de biologistes de Développement.

Alors que dans les deux dernières décennies les mécanismes de la migration de la CN ont été largement documentés, il reste encore beaucoup à savoir sur la spécification des bords de la plaque neurale et sur les processus impliqués dans la détermination et le devenir des progéniteurs de la CN.

I.1-Induction de la crête neurale

L'induction de la CN est un processus organisé en plusieurs étapes, qui débute au stade précoce de la neurulation alors que la gastrulation est encore active à la partie postérieure de l'embryon. Il se poursuit jusqu'à la fermeture du tube neural. L'induction de la CN peut être révélée par l'expression des gènes spécifiques de la CN qui englobent plusieurs familles de régulateurs transcriptionnels. Parmi ces gènes, *Slug*, codant pour un facteur de transcription en doigt de zinc, est considéré comme un marqueur des cellules de CN (CCN) prémigratoires chez le poulet ([Nieto et al. 1994](#)) et l'amphibien ([Mayor et al. 1995](#)).

Au moment de l'induction, le territoire destiné à former la CN est situé à la jonction entre l'ectoderme non neural et l'ectoderme neural. Le tissu sous-jacent est composé du mésoderme paraxial. Du fait de leurs positions relatives vis-à-vis de la CN en formation, chacun de ces tissus a été examiné comme une source potentielle d'induction de la CN. Par des études de transplantation des tissus pratiquées chez

l'embryon amphibien, l'importance des interactions entre le neuroépithélium et l'ectoderme non neural dans la formation de la CN a été établi (Moury and Jacobson 1989). Ainsi, il a été montré que des explants de neuroépithélium greffés sur l'ectoderme non neural chez le xénope (Bastidas et al. 2004) et le poulet (Selleck and Bronner-Fraser 1995) induit l'expression de *slug*.

La participation du mésoderme paraxial dans l'induction de la CN a été mise en évidence chez le poulet (Selleck and Bronner-Fraser 1995), avec comme conséquence à long terme la formation de mélanocytes à partir des explants de neuroépithélium, et chez le xénope (Bonstein et al. 1998, Monsoro-Burq et al. 2003). L'ablation du mésoderme paraxial chez ce dernier entraîne une diminution d'expression de *slug*, alors que la combinaison entre l'ectoderme non neural et mésoderme paraxial permet d'activer l'expression de *slug* et la formation des mélanocytes (Bonstein et al. 1998). Jusqu'à aujourd'hui, la contribution du mésoderme paraxial dans l'induction de la CN chez la souris ou le poisson zèbre n'a pas été mise en évidence. Les expériences de délétion des gènes spécifiques du mésoderme paraxial chez ces deux espèces tel que *Tbx6* (Chapman and Papaioannou 1998) ou d'inhibition de la signalisation Wnt3a (Yoshikawa et al. 1997) n'ont pas d'effets sur le développement de la CN ce qui suggère que le mésoderme paraxial ne semble pas jouer un rôle important durant l'induction de la CN, ou qu'il emprunte d'autres voies de signalisation.

Au cours des dix dernières années, beaucoup d'études ont permis l'identification des molécules impliquées dans l'induction de la CN. Dans cette partie, j'aborde le rôle des trois familles de molécules qui sont les plus étudiées et qui semblent être impliquées

dans ce processus dans différentes espèces. Elles englobent Bmp (Bone morphogenetic protein), Wnt (Wingless) et Fgf (Fibroblast growth factor).

I.1.1-Bmp

Le rôle de Bmp dans l'induction de la CN est étroitement lié à l'induction de la plaque neurale. Au cours de la neurulation, des signaux provenant du mésoderme dorsal induisent la plaque neurale en la distinguant de l'ectoderme non neural adjacent. Des expériences réalisées chez l'embryon de xénope ont montré que les signaux impliqués sont les molécules Follistatin, Noggin et Chordin, qui ont en commun des propriétés de blocage de la signalisation de Bmp4, permettant ainsi la différenciation neurale de l'ectoderme (Weinstein and Hemmati-Brivanlou 1999, Wilson et al. 2000). Chez le poisson zèbre, la mutation du gène *chordin* est responsable d'une réduction du tissu neural (Hammerschmidt et al. 1996) montrant que l'inhibition de la signalisation Bmp dans l'ectoderme est nécessaire pour promouvoir le développement neural.

Chez le poulet et la souris, les antagonistes de Bmp ne sont pas tout à fait indispensables. Par exemple, les souris présentant la double mutation des gènes *Chordin/Noggin* forment une plaque neurale (Bachiller et al. 2000). Chez le poulet, la période de temps pendant laquelle sont exprimés *NOGGIN*, *CHORDIN* (Streit et al. 1998) et *FOLLISTATIN* (Levin 1998) suggère que ces antagonistes sont ni suffisantes ni requises pour induire la formation de la plaque neurale (Storey et al. 1992). Le modèle actuel indique qu'un gradient de concentration de Bmp, généré par des antagonistes de la voie Bmp, définit le

devenir de la plaque neurale. Ainsi les cellules qui reçoivent un taux élevé de Bmp empruntent une voie de différenciation orientée vers l'ectoderme, alors que celles exposées à un faible taux de Bmp sont à l'origine de la plaque neurale. De ce fait, les cellules soumises à un niveau intermédiaire de Bmp se spécifient en bordure de la plaque neurale; une étape qui précède l'acquisition de l'identité de la CN (Figure 1) (Huang and Saint-Jeannet 2004, Schumacher et al. 2011, Tríbulo et al. 2003).

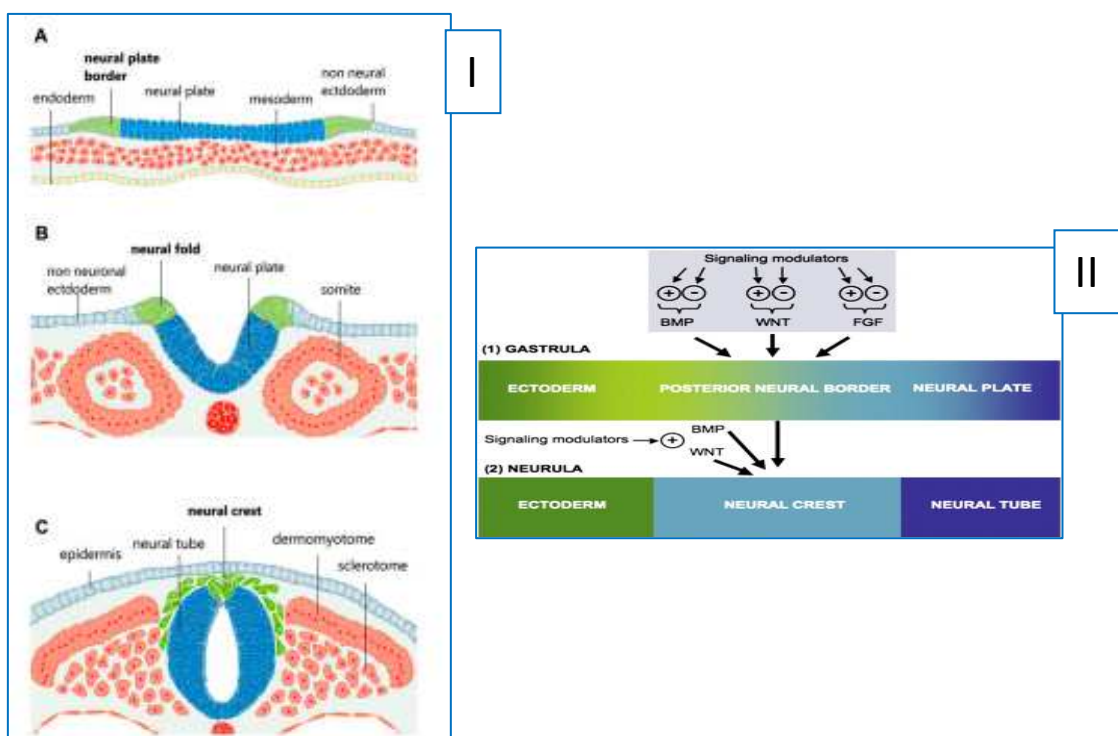


Figure 1: Les signaux moléculaires et mouvements morphologiques participant à la spécification de la CN

I : Mouvements morphogénétiques au cours du développement précoce de la CN : (A) Coupe transversale d'embryon de poulet pendant la neurulation ; les futures CCN sont colorées en vert. (B) Au cours de la neurulation, la plaque neurale s'invagine pour former le tube neural et fait se rapprocher les deux bordures neurales qui donneront la CN qui commence à migrer suite à la fermeture du tube neural (C). (Marcos Simões-Costa 2013)

II : Signaux moléculaires impliqués dans la spécification de la CN, ectoderme et tube neural au cours des stades de gastrulation et neurulation :

Participation collective des trois molécules Bmp, Wnt et Fgf à la spécification des bordures du tube neural (en bleu ciel et vert clair), ectoderme (en vert) et plaque neurale (en bleu) pendant la gastrulation ainsi que la CN (en bleu ciel) au stade de neurulation. ([Milet and Monsoro-Burq 2012](#))

Les études menées chez l'embryon de poulet ont montré que les Bmps exprimées au niveau des bourrelets neuraux peuvent jouer un rôle inducteur de CN. Les milieux conditionnés réalisés à partir des cellules exprimant Bmp4 ou Bmp7 permettent d'induire la CN sur des explants de plaque neurale mimant ainsi la fonction de l'ectoderme non neural ([Liem Jr et al. 1995](#)). Néanmoins, les Bmps sont faiblement et transitoirement exprimées dans l'ectoderme non neural pendant l'induction de la CN ; ceci suggère que le processus est plus compliqué et que Bmp, tout seul, n'est pas suffisant pour induire la CN chez le poulet ([García-Castro et al. 2002](#)).

I.1.2- Wnt

L'implication de la signalisation Wnt dans l'induction de la CN a été documentée chez plusieurs espèces. Chez le xénope, l'expression de quelques molécules de la famille Wnt comme Wnt8 et Wnt7b (Bang et al. 1999, Chang and Hemmati-Brivanlou 1998), ainsi que leurs molécules cibles, augmentent la production des

progéniteurs de CN. Néanmoins l'inhibition de la signalisation bloque l'induction de la CN (LaBonne and Bronner-Fraser 1998) .

Chez la souris, l'inactivation de la β -caténine, une molécule qui agit en aval de la signalisation Wnt, au niveau du tube neural cause des défauts de formation des ganglions spinaux et crâniens et l'absence de plusieurs éléments du squelette crânio-facial d'origine CN (Brault et al. 2001) . Ces résultats ont suggéré que la signalisation Wnt agit via la β -caténine pour la viabilité et la différenciation des cellules de la CNC (Brault et al. 2001) . Des souris mutantes pour les gènes *Wnt3a* et *Wnt1*, qui sont exprimés, dorsalement au niveau du tube neural, ont montré des altérations de certains dérivés de la CN, ce qui indique que la signalisation Wnt est requise pour l'expansion des progéniteurs de la CN (Ikeya et al. 1997) .

Chez l'embryon de xénope, l'augmentation de la signalisation Wnt3a engendre une augmentation des progéniteurs de la CN mise en évidence par une expression accrue de *slug* et *krox20*, et ceci indépendamment des modifications de la prolifération cellulaire (Saint-Jeannet et al. 1997) . Ces données suggèrent que la signalisation Wnt pourrait être impliquée dans la spécification des progéniteurs de la CN chez le xénope.

D'autres études menées chez le poulet ont montré que la signalisation Wnt agit par la voie canonique sur le devenir des CCN (García-Castro et al. 2002) . L'expression un peu tardive de *Wnt1* et *Wnt3a* chez le xénope (Wolda et al. 1993) , le poulet (Hollyday et al. 1995) , le poisson zèbre (Molven et al. 1991) et la souris (Roelink and Nusse 1991) suggère que cette voie est impliquée plutôt

dans le développement de la CN que dans son induction. Chez le xénope, il a été proposé que la source de la signalisation Wnt impliquée dans l'induction de la CN est l'ectoderme non neural (Wnt7b, [\(Chang and Hemmati-Brivanlou 1998\)](#)) et/ ou le mésoderme paraxial (Wnt8, [\(Bang et al. 1999\)](#)). Néanmoins, les travaux de l'équipe de Monsoro-Burq [\(Monsoro-Burq et al. 2003\)](#) ont montré que l'inhibition extracellulaire de la voie Wnt par des antagonistes de la signalisation Wnt entrave la formation de la CN non pas par blocage de la signalisation Wnt secrétée par le mésoderme paraxial mais par le fait que cette inhibition ait un effet sur la spécification et les propriétés de signalisation du mésoderme. Ces données ont été validées par l'absence d'effet de l'inhibition intracellulaire de la signalisation Wnt au niveau du mésoderme paraxial par des antagonistes comme Gsk3 (Glycogen-Synthase-Kinase3) et par des mutations dominantes de *tcf3*[\(Monsoro-Burq et al. 2003\)](#) .

Chez le poisson zèbre, la molécule Wnt8 semble être impliquée dans l'induction de la CN [\(Lewis et al. 2004\)](#) . L'inactivation de la signalisation Wnt8 par des morpholinos empêche l'expression des marqueurs précoces de la CN[\(Lewis et al. 2004\)](#) . Cet effet semble s'opérer de façon indépendante de l'effet caudalisant de la signalisation Wnt [\(McGrew et al. 1995, Villanueva et al. 2002\)](#) qui intervient ultérieurement. Ensemble, ces données suggèrent que la signalisation Wnt joue des rôles multiples durant le développement de la CN.

I.1.3- Fgf

L'induction de la CN dépend aussi de la signalisation Fgf, chez le xénope. La signalisation Fgf-b (Fgf basique), en parallèle d'une atténuation de la signalisation Bmp, permet l'expression du gène *Slug* et l'induction des cellules pigmentaires, dans deux systèmes expérimentaux différents utilisant soit des cellules dissociées (Kengaku and Okamoto 1993), soit des explants d'ectoderme non neural intacte au stade de gastrulation (Mayor et al. 1995). Par ailleurs, les travaux de LaBonne et Bronner Fraser (LaBonne and Bronner-Fraser 1998) ont montré que Fgf-b induit la formation du mésoderme et que, par conséquent, ce dernier pourrait jouer un rôle dans l'induction et la spécification de la CN. La surexpression d'une forme négative dominante du récepteur au Fgf bloque l'expression de *slug* chez des embryons de xénope et ceci sans altérations de la plaque neurale (Mayor et al. 1997). La même équipe a montré que les molécules, agissant en aval de Fgf, sont nécessaires pour induire l'expression de *slug* dans la plaque neurale, ce qui suggère que la signalisation Fgf provient de l'ectoderme non neural adjacent. Au contraire, d'autres études chez le xénope ont montré que le mésoderme paraxial peut être la source de la signalisation Fgf (Monsoro-Burq et al. 2003) permettant l'induction de la CN. En exprimant une forme négative dominante du récepteur Fgf dans des explants d'ectoderme recombinaisonnés avec du mésoderme paraxial, la formation de la CN est stoppée. Ces études proposent que Fgf8, détectée dans le mésoderme paraxial au moment de l'induction de la CN, est un candidat potentiel d'inducteur de la CN (Monsoro-Burq et al. 2003) et que son expression dans l'ectoderme non neural n'induit

que quelques marqueurs spécifiques de CN par rapport à son expression dans le mésoderme. Ceci suggère que d'autres facteurs produits par le mésoderme sont requis, avec la signalisation Fgf, pour induire l'expression de la totalité des marqueurs de la CN.

Ensemble, les études évoquées n'ont cependant pu aboutir à un modèle universel pour l'induction de la CN chez le poulet, le xénope, la souris et le poisson. Les différences observées entre ces espèces reflètent des variations interspécifiques dans les processus d'induction. De plus, les signaux impliqués dans la spécification, la prolifération, la migration et la diversification de la CN ne sont pas tous élucidés.

Par exemple, chez le xénope et le poulet, la signalisation Wnt et Fgf peuvent réguler le taux d'expression de *Bmp* dans l'ectoderme (Baker et al. 1999). Ces observations suggèrent que Fgf et Wnt agissent avec les antagonistes de Bmp pour maintenir un taux intermédiaire permettant la spécification de la CN. Néanmoins, chez le poisson, ce mécanisme n'est pas démontré, ce qui soulève des questions sur l'importance de la signalisation Bmp dans l'induction de la CN.

I.2- Signaux de spécification de la CN

Durant les dernières années, l'identification de facteurs de transcription au niveau des bords du tube neural a augmenté de manière considérable. Ces facteurs appartiennent à plusieurs classes de régulateurs de transcription qui semblent jouer un rôle important au cours de l'embryogenèse.

Dans mon manuscrit, je vais citer quelques molécules qui ont été étudiées chez plusieurs espèces. Par exemple, Slug et Snail, deux répresseurs transcriptionnels semblent impliqués dans le contrôle de la spécification mais aussi de la migration des CCN chez le xénope ([Aybar et al. 2003](#), [LaBonne and Bronner-Fraser 2000](#)).

Chez la souris, l'inactivation du gène *Ap2 α* entraîne des défauts de fermeture des os du crâne qui dérivent de la CNC, ainsi que d'autres défauts de développement ([Schorle et al. 1996](#), [Zhang et al. 1996](#)), ce qui suggère l'importance de *Ap2 α* dans le développement de la CNC. De la même manière, le rôle de *Ap2 α* chez le xénope a été montré dans la spécification et migration de la CN, par l'utilisation des oligonucléotides antisens morpholinos notamment ([Luo et al. 2003](#)). Chez le poisson zèbre *lockjaw* mutant pour le gène *tfap2 α* , un défaut de spécification et de migration de la CN s'accompagne des défauts de différenciation pour certains de ses dérivés ([Knight et al. 2003](#)).

Un autre répresseur de transcription, *Foxd3*, semble jouer un rôle dans la spécification de la CN chez le xénope ([Sasai et al. 2001](#)) et le poulet ([Dottori et al. 2001](#), [Kos et al. 2001](#)) par l'activation de HNK1 (*Human Natural Killer*) et Cad7 qui sont exprimées par les CCN au cours de leur migration.

Parmi les facteurs de transcription de la famille Sox, *Sox9* et *Sox10* sont requis dans la spécification de la CN chez le xénope et chez d'autres espèces ([Honoré et al. 2003](#)). Il a été montré que ces deux facteurs sont respectivement impliqués dans le

développement de la CN céphalique (CNC) et de la CN troncale (CNT)([Honoré et al. 2003](#)).

I.3-Migration et différenciation de la crête neurale céphalique

Les premières techniques permettant de suivre la migration de la CN au cours du développement ont été utilisées au cours de la première moitié du XXème siècle et étaient menées exclusivement chez les Vertébrés inférieurs. Dans les années soixante, Weston([Weston 1963.](#)) et Chibon([Chibon 1964.](#)) utilisèrent un marquage avec des isotopes radioactifs du noyau avec de la Thymidinetritiée(³HTdR) chez le poulet et l'amphibien. Cette technique souffrait malheureusement de quelques inconvénients : le marquage se diluait au cours de la prolifération cellulaire et, en cas de mort cellulaire, il risquait d'être incorporé par les cellules voisines. Par conséquent, en dépit de son utilité à suivre la migration et le destin des CCN sur une courte période de temps, cette technique ne remplissait pas parfaitement les critères de stabilité et de spécificité requis. Grâce aux techniques plus modernes de marquage cellulaire, tel que le Rhodamine-LysineDextran(RLD) ou le colorant vital dil (1,10 -dioctadecyl- 3,3,30 ,30 -tetramethylindocarbocycamide perchlorate), le marquage transitoire des lignées cellulaires issues de la CNa été facilité.L'avantage de l'utilisation de ces marqueurs extrinsèques est leur innocuité du fait que leur utilisation ne nécessite pas d'opération chirurgicale. Néanmoins, ces techniques souffrent également d'un manque de stabilité, comparable à celui du marquage avec le³HTdR.

Des greffes Caille-Poulet, mises au point par [Nicole Le Douarin](#) en 1969([Le Douarin 1969.](#)), ont également changé les connaissances scientifiques sur la migration des CCN

en permettant un suivi à long terme de ces cellules. Ce système consiste à réaliser des xénogreffes entre la Caille japonaise (*Coturnix japonica*), dont les cellules sont facilement repérables du fait de la condensation de l'hétérochromatine dans le nucléoplasme, et le poulet (*Gallus gallus*), où l'hétérochromatine est dispersée en petites masses dans le noyau des cellules. Ceci permet de distinguer les cellules des deux espèces sur des coupes colorées par la coloration de Feulgen-Rossenbeck (Le Douarin 1969.) pour suivre leur devenir chez l'embryon. Les avantages de ce système sont nombreux par rapport aux autres techniques citées précédemment. D'une part, il n'y a pas de dilution de marquage avec la prolifération des CCN ce qui permet de suivre la destinée des cellules greffées jusqu'à leur différenciation. D'autre part, l'organisme chimère poursuit son développement normalement jusqu'à l'éclosion, ce qui permet d'étudier les mécanismes d'induction dans lesquelles ces cellules greffées sont impliquées avant de se différencier en plusieurs dérivés.

En plus de ses capacités migratoires, l'une des caractéristiques les plus fascinantes de la CN est sa capacité à générer de multiples lignées cellulaires. Les CCN provenant des différents niveaux le long de l'axe antéro-postérieur forment un ensemble distinct de dérivés, selon leur origine sur l'axe antéro-postérieur (Figure.2). La CN troncale (CNT) qui prend naissance à la gouttière neurale correspondante de la future moelle épinière, va donner les ganglions spinaux (ou rachidiens) ainsi que les ganglions sympathiques et parasympathiques du système nerveux périphérique et également la médullosurrénale (Le Douarin et al. 2004, Le Douarin and Teillet 1974). La CN vagale (CNV), qui dérive du rhombencéphale caudal, contribue au développement du cœur

ainsi que les ganglions entériques. La troisième division de la CN est la CN céphalique ou crâniale (CNC).

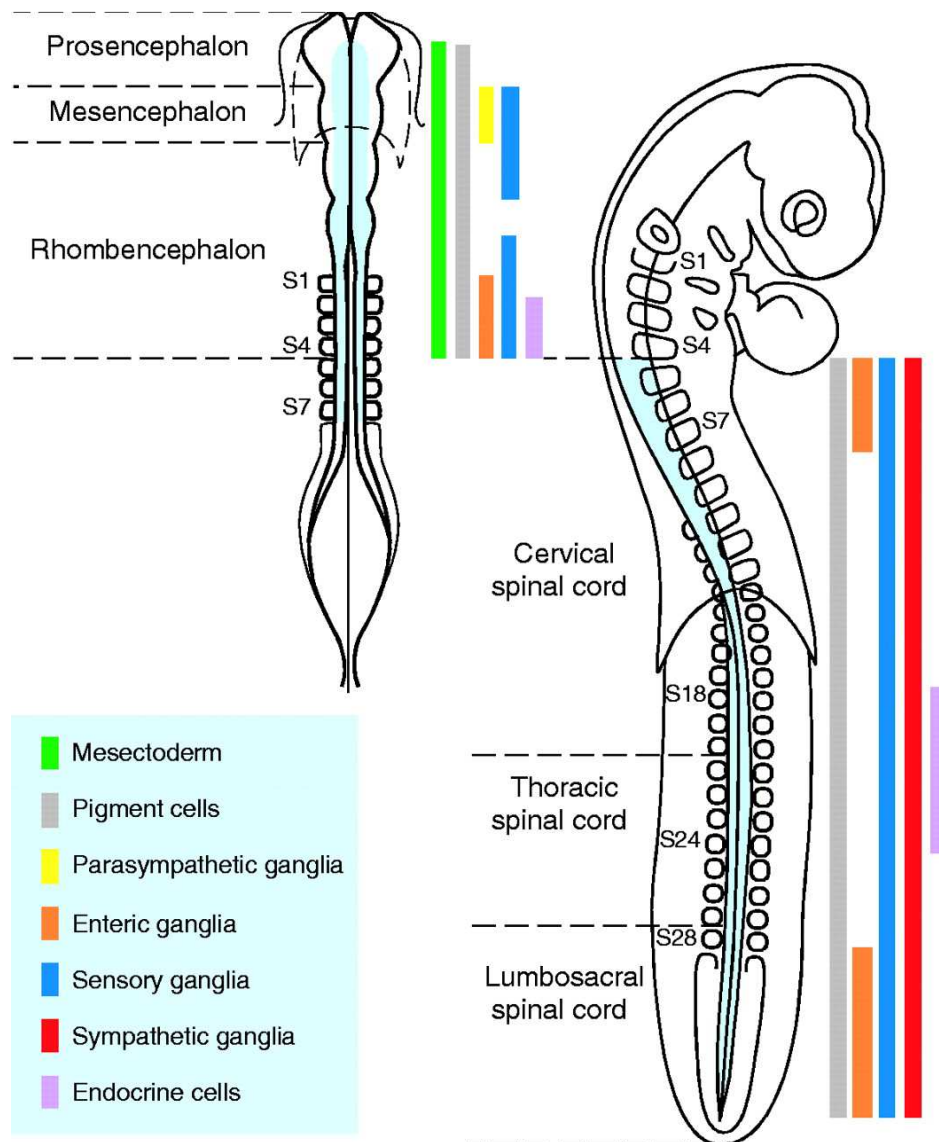


Figure 2: Cartographie des dérivés de la CN tout au long du tube neural.

Les différents dérivés fournis par la CN (en bleu clair) selon les différents niveaux antéro-postérieurs chez l'embryon de poulet. A gauche, les tissus dérivant de la CNC, à droite les dérivés de la CN issus du niveau cervical, thoracique et sacré de la moelle épinière. Le mésectoderme (en vert) comprend la CNC ([Le Douarin et al. 2004](#))

Les cellules de la CNC migrent en suivant différents courants de migration selon leur niveau d'origine. Les CCN qui dérivent de la partie postérieure du diencephale migrent antérieurement vers les processus naso-frontaux et latéraux. Les CCN, qui dérivent du mésencéphale et de la partie antérieure du rhombencéphale (r1-r2), migrent en direction de la région rétro-oculaire et contribuent au processus maxillo-mandibulaire pour former le squelette des mâchoires et de la face ([Couly et al. 1996](#), [Kontges and Lumsden 1996](#), [Le Lievre 1974](#)). La CNC donne au niveau de la tête les cellules gliales des nerfs crâniens, excepté le nerf optique, et de certains ganglions ([Couly et al., 1993](#); [Köntges and Lumsden, 1996](#); [Noden 1983](#)). Elle forme également les structures oculaires et péri-oculaires ([Creuzet et al. 2005](#), [Gage et al. 2005](#), [Johnston Mc Fau - Noden et al. 1979](#)), les muscles lisses et les tissus conjonctifs des vaisseaux sanguins et des muscles extra-oculaires. La CN est à l'origine des mélanocytes, les cellules pigmentaires de la peau. De plus, la CNC donne les tissus conjonctifs des muscles striés qui dérivent du mésoderme ([Noden and Trainor 2005](#)). Au niveau des méninges, la CNC est à l'origine de la pie-mère et de l'arachnoïde ([Etchevers et al. 2001](#)). La participation de la CNC aux vaisseaux sanguins céphaliques a été bien documentée

(Etchevers et al. 1999, Le Lièvre and Le Douarin 1975) . Elle donne des cellules péri-vasculaires et des péricytes qui entourent l'endothélium des vaisseaux sanguins, dérivé du mésoderme, et la tunique des grandes artères jusqu'à leur très fines ramifications capillaires (Etchevers et al. 2001) . Les CCN qui dérivent du rhombencéphale post-otique forment une sous population de la CNC, aussi appelée CN cardiaque, qui contribue au développement du cœur en donnant des cellules musculaires lisses qui forment la couche moyenne de la paroi aortique et des gros vaisseaux artériels ainsi que la cloison aortico-pulmonaire (Etchevers et al. 2001, Kirby Ml Fau - Gale et al. 1983 , Snider et al. 2007).

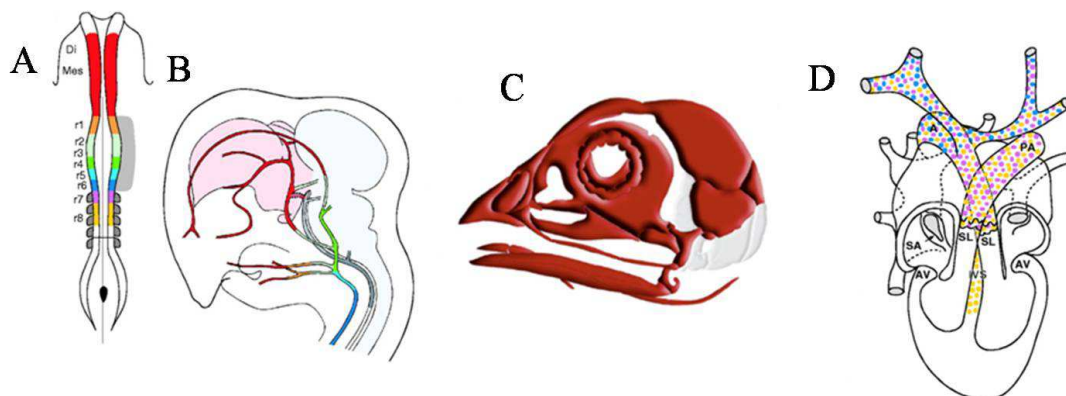


Figure 3: Cartographie de la CN céphalique au niveau de la tête et du cœur chez le poulet

(A) code couleur représentant la contribution respective des différents niveaux de la CNC. (B) Contribution de la CNC aux structures musculo-conjonctives des vaisseaux sanguins de la tête. Les méninges du prosencéphale (en rose) dérivent de la CNC alors que celles du mésencéphale caudal (en gris) dérivent du mésoderme. (C) Le squelette de la tête dérive en grande partie de la CNC, excepté l'os occipital qui

dérive du mésoderme. (D) Une sous-population de la CNC, dite CN cardiaque, participe au développement du cœur en donnant les muscles lisses du réseau vasculaire aortique ainsi que la cloison aortico-pulmonaire ([Couly 1993](#), [Etchevers et al. 1999](#), [Etchevers et al. 2001](#))

Partie II-Morphogenèse précoce de l'œil

II.1-Vue générale sur le développement précoce de l'oeil

L'œil des Vertébrés est une structure sensorielle dont les composantes ont des origines embryologiques multiples. L'œil se développe au cours d'une série d'événements, comprenant notamment la spécification et la régionalisation de la plaque neurale antérieure, l'évagination de la vésicule optique (VO), et le développement de trois structures optiques distinctes: la rétine neurale (RN), la tige optique (TO), et l'épithélium rétinien pigmentaire (ERP). On distingue la contribution neuroépithéliale, à l'origine de la rétine neurale et pigmentée, de la contribution ectodermique, à l'origine du cristallin et de l'endothélium de la cornée. De plus, le mésenchyme, constitué majoritairement par les cellules de la CNC, contribue de façon essentielle à la physiologie et à l'homéostasie de la fonction visuelle, à travers la formation de dérivés oculaires et péri-oculaires. Les composantes oculaires issues du mésenchyme de la CNC sont détaillées dans la suite du manuscrit.

Chez l'embryon de souris, le développement oculaire commence par l'évagination bilatérale des cellules diencephaliques vers le huitième jour du développement embryonnaire E8 (8HH chez le poulet et 3^{ème} semaine chez l'Homme) (Chow and Lang 2001, Fuhrmann 2010). Ces cellules sont formées par un seul neuroépithélium pseudo-stratifié entouré par le mésenchyme céphalique. Ensuite, la VO s'étend latéralement vers l'ectoderme de surface (ES) pour donner le cristallin et l'épithélium de la cornée qui organisent le segment antérieur de l'œil. Le

mésenchyme céphalique migre plus tard entre la VO et l'ES (visible chez les mammifères et les oiseaux), après que les deux tissus en contact étroit latéralement se soient associés au moyen d'un réseau fibrillaire de collagène. Au stade E9.5 (13HH chez le poulet et 4^{ème} semaine chez l'Homme) et lors du contact avec la VO, l'ES épaisit et donne lieu à la placode du cristallin (PC). Par la suite, la VO et la PC subissent une invagination simultanée. La PC devient le cristallin par l'intermédiaire de la vésicule de cristallin, alors que la VO se développe en cupule optique (CO) (Figure 4). A partir de E10 (E8 chez le poulet et 2^{ème} mois chez l'Homme), la couche externe de la rétine devient l'ERP, tandis que la couche interne donne la RN qui, à l'issue d'une cascade de différenciation, conduit à six types de neurones de la rétine : les photorécepteurs (cônes et bâtonnets), les cellules bipolaires, horizontales, amacrines, ganglionnaires et les cellules gliales de Muller (Cepko et al. 1996, Harris 1997). Les axones des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) demeurent dans la couche de surface de la RN et vont se rejoindre au niveau du disque optique, une région circulaire non pigmentée de la rétine formant la tête du nerf optique et qui est appelé dans le jargon médical la tache aveugle, et se dirigent alors vers le cerveau en traversant la TO.

La partie ventrale de la VO subit en core des changements structurels plus complexes donnant lieu à la fissure optique (appelée aussi fissure choroïde) à la partie distale et aux astrocytes du nerf optique à la partie proximale (Morcillo et al. 2006).

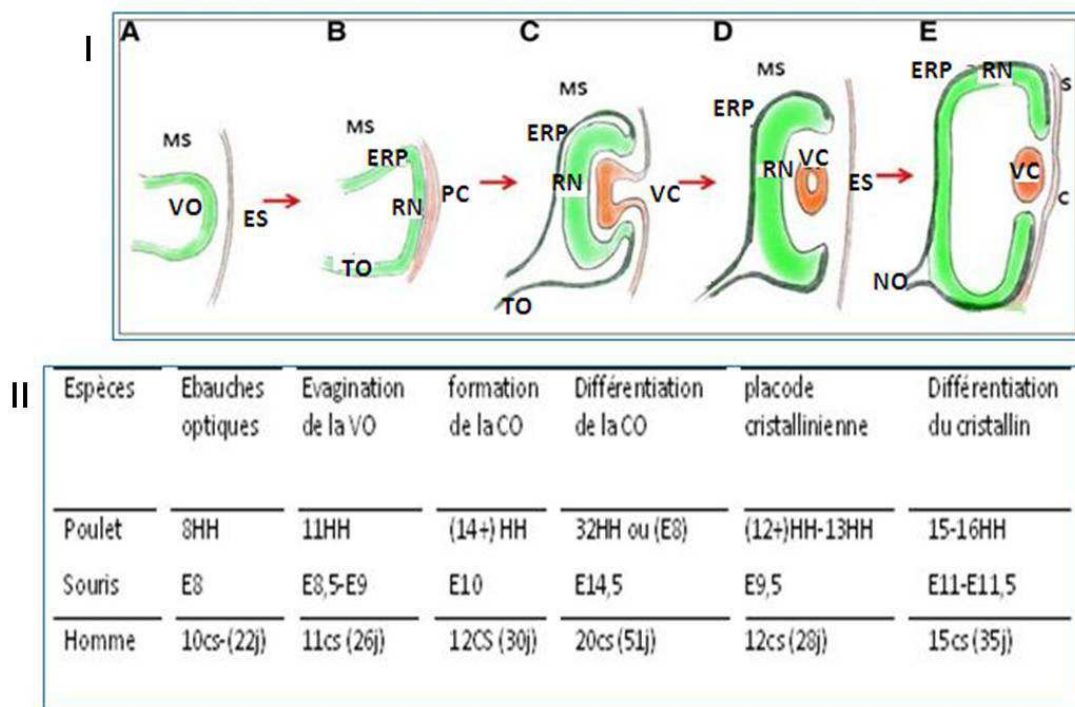


Figure 4: Différents stades de développement de l'œil chez la souris

I- Le développement de l'œil chez la souris commence vers E8,5(stade embryonnaire 8,5 jours de développement)par l'évagination bilatérale du diencephale(A). La VO et l'ES se trouvent en contact vers E9,5(B) suivie de l'évagination concomitante des deux tissus formant la VC et la CO vers E10 (C,D) puis de la différenciation en RN, ERP et nerf optique (NO).Figure extraite de (Kim and Kim 2012) .MS : Mesenchyme, ERP: Epithélium Retinien Pigmentaire, TO : Tige Optique, RN : Rétine Neurale, C : Corneé, S : Sclère, VO : Vésicule Optique, ES : Ectoderme de Surface, PC : Placode de Cristallin, NO : Nerf Optique

II-Tableau de comparaison des stades de développement entre la souris, poulet et l'Homme.HH : Hamburger and Hamilton, CS : Carnegie Stage, j : jour, E : Embryonic day

II.2- Signaux de compartimentation de l'oeil

Le développement des trois compartiments de l'œil qui sont la rétine neurale (RN), l'épithélium rétinien pigmentaire (ERP) et la tige optique (TO), est régi par un certain nombre de voies de signalisation dont chacune est activée à des endroits différents et pendant une fenêtre de temps étroite au cours de la morphogenèse de l'œil. Des facteurs, tels que Bmp, Shh, Fgf et Wnt sont sécrétés par plusieurs sources telles que le mésenchyme de la tête et principalement la CN, l'ES, la plaque basale, et la VO elle-même. Ils sont particulièrement critiques pour la détermination des compartiments de la VO. Les signaux inductifs contribuent à la compartimentation de la VO en activant ou réprimant certains facteurs de transcription spécifiques de chaque compartiment primitif.

II.2.1 Fgf

Au cours du développement oculaire, les Fgf sont normalement exprimées dans l'ectoderme de surface (ES) et la partie distale de la VO et contribuent à la détermination de l'identité de la RN (Pittack et al. 1997). L'expression de Fgf1 ou Fgf2 dans la PC chez le poulet a été montrée suffisante pour induire l'expression de Vsx2, marqueur spécifique de la RN (Pittack et al. 1997). Chez la souris, l'absence de la PC perturbe la formation de frontière entre la RN et l'ERP. Cette perturbation est annulée par l'ajout de Fgf1 ou Fgf2 (Nguyen and Arnheiter 2000). L'isoforme Fgf9 semble critique pour la détermination de la RN. Chez la souris mutante pour *Fgf9*, la RN se transdifférencie en ERP (Zhao et al. 2001) alors que l'expression ectopique de *Fgf9* dans l'ERP le transforme en RN (Zhao and Overbeek 1999), ce qui se traduit par la

diminution du taux d'expression de deux gènes spécifique de l'ERP, à savoir, *Mitf* et *Otx2*. Les mêmes résultats ont été obtenus par l'expression d'une forme active de Ras (Rat sarcoma) ou par l'activation constitutive de l'allèle *MAPKK1* (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 1) dans l'ERP (Galy et al. 2002), ce qui suggère que ces derniers agissent en aval de la signalisation Fgf dans l'inhibition de différenciation de l'ERP.

II.2.2 Wnt

La voie canonique de la signalisation Wnt est impliquée dans plusieurs étapes au cours du développement oculaire. Elle joue un rôle important dans l'établissement du champ oculaire, le maintien des cellules souches rétiniennes, l'inhibition de spécification neurale au niveau la zone marginale ciliaire et le développement de la cornée, de l'ERP et du cristallin (de longh et al. 2006, Lad et al. 2008). Chez le poisson zèbre, l'inhibition de cette voie soit par l'inactivation de la signalisation de Wnt8b ou son récepteur Fz8b (Cavodeassi et al. 2005), soit par l'expression de *Sfrp1*, gène codant pour uneprotéineantagoniste de la signalisation Wnt(Esteve et al. 2011, Kim et al. 2007), est requise pour permettre la spécification du champ oculaire dans la région diencephalique. Au contraire la voie non canonique agit via Wnt11 et son récepteur Fz5 pour induire les caractéristiques oculaires (Cavodeassi et al. 2005). Après la spécification du champ oculaire, la voie canonique de la signalisation Wnt joue un rôle dans le sort de la RN. Par exemple, chez le xénope, le poulet et la souris, Fz4 et Fz5 sont exprimées dans la partie distale de la VO et participent à la spécification de la RN (Van Raay et al. 2005, van Raay and Vetter 2004). Un peu plus tard dans le développement, Wnt2b et Wnt13 seront exprimées dans la zone marginale ciliaire et

permettront la formation de l'iris et du corps ciliaire (Cho and Cepko 2006, Fokina and Frolova 2006) .

II.2.3 Shh

Chez le poulet, la protéine Shh est exprimée dans la ligne médiane ventrale du diencephale et il a été montré qu'elle contrôle la polarité dorso-ventrale ainsi que la polarité proximo-distale au stade de vésicule optique (VO) (Zhang and Yang 2001) . Cette signalisation semble favoriser la spécification des structures oculaires proximales ventrales qui donneront la tige optique ventrale. Au contraire, cette signalisation inhibe le développement des structures dorsales distales qui donneront la RN et l'ERP.

Evidemment, des études chez le xénope ont montré que l'inactivation de la signalisation de Shh génétiquement ou chimiquement perturbe le développement de la partie ventrale de la CO. Cette perturbation est associée à des défauts dans l'axe proximo-distal qui se caractérise par des yeux trop petits et complètement pigmentés (Chiang et al. 1996, Perron et al. 2003) . Les défauts de développement de la partie ventrale de la CO chez une souris mutante pour *Shh* ont été partiellement améliorés lors de l'inactivation de l'allèle *Gli3* (GLI family zinc finger 3), qui code pour un facteur de transcription agissant en aval de la signalisation Shh, ce qui suggère que la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de Shh est importante pour d'abord la spécification des champs oculaires et ensuite la détermination du bon développement de la partie ventrale de la CO (Furimsky and Wallace 2006) .

Il est généralement admis que Shh a un effet ventralisant dans la CO en induisant l'expression des gènes impliqués dans le développement ventral et la fermeture de la CO comme par exemple *Pax2* (Paired box gene 2) et *Vax1* (Ventral anterior homeobox 1), alors que la même molécule réprime l'expression des gènes déterminant l'identité neurale de la rétine comme *Rx/Rax* (Retina and anterior neural fold homeobox) et *Pax6*. Il a été montré chez le poulet, la souris, le xénope et le poisson zèbre que dans la partie distale de la VO qui donnera la future RN, *Vsx2* limite l'expression de *Mitf* et *Otx2* uniquement dans la partie dorsale alors que *Pax6* limite celle de *Pax2*, *Vax1* et *Vax2*, qui sont induites par Shh, seulement dans la partie ventrale et par conséquent ces gènes contrôlent la spécification du futur EPR (Perron et al. 2003).

II.2.4 Bmp

Plusieurs molécules de la famille Bmp, membres de la superfamille TGF- β (Tumor Growth Factor beta), ainsi que leurs récepteurs correspondants, sont exprimées dans les tissus adjacents de la VO (Chow and Lang 2001). Chez la souris, Bmp4 est détectée dans la partie distale de la VO (Furuta and Hogan 1998) alors que Bmp7 est détectée dans la partie dorsale de la VO ainsi que l'ES (Dudley and Robertson 1997). Les deux molécules permettent l'induction du cristallin et la morphogenèse correcte de l'œil par la bonne interaction entre le futur cristallin et la partie distale de la VO.

Au stade de CO, chez le poulet, les molécules de Bmp sont exprimées dans la partie dorsale de la RN permettant l'expression de *Tbx5*. L'expression de *Tbx5* est restreinte dans la partie dorsale grâce à la protéine *Vax2* exprimée dans la partie ventrale de la CO (Koshiba-Takeuchi et al. 2000). Chez l'embryon de poulet, la Ventroptin, qui est une

protéine anatagoniste de la signalisation Bmp4, est détectée dans la partie ventrale de la rétine. L'expression du gène codant pour la Ventroptin dans la rétine d'un embryon au stade E3 inhibe la signalisation Bmp4 et par conséquent affecte l'identité dorsale de la rétine (Sakuta and S. (2001).). Ceci suggère que la signalisation Bmp est requise seulement pour la partie dorsale de la rétine.

Des expériences de gain de fonction ont montré que les Bmps sont suffisantes pour le développement de l'ERP. Muller et ses collaborateurs (Müller et al. 2007) ont montré que l'expression ectopique de Bmp 4 et Bmp7 au stade de VO au niveau la RN et la future TO induit l'expression de *Mitf* qui est un marqueur spécifique de l'ERP. Néanmoins la perturbation de l'expression des Bmps au cours du stade de VO entrave la formation de l'ERP et induit l'expression des marqueurs de la RN. Chez le poulet il a été montré que l'Activin, un autre membre de la superfamille de TGF- β , est secrétée par le mésenchyme péri-oculaire, qui est potentiellement la CNC. Elle contribue à la formation de l'ERP (Fuhrmann et al. 2000). Ces données suggèrent que la signalisation Bmp est nécessaire et suffisante pour l'établissement de l'identité de l'ERP.

II.3-Contribution de la crête neurale céphalique aux structures oculaires et péri-oculaires

Les études approfondies sur le développement et l'évolution de la CNC au cours de la morphogenèse du cerveau antérieur ont permis à partir des années 2000 de découvrir

de nouvelles contributions de la CNCAux segments antérieur et postérieur au cours de la morphogenèse de l'œil.

II.3.1-Contributions du mésenchyme céphalique au segment antérieur

Au cours du développement du segment antérieur qui suit la séparation de la VC de la future cornée, les cellules du mésenchyme périoculaire commencent à migrer dans l'espace entre le cristallin et l'ES. Chez l'embryon de souris ces cellules arrivent vers le 12^{ème} jour de développement embryonnaire (E12) (Haustein 1983;). Les cellules commencent à proliférer continuellement et se condensent de plus en plus pour former des cellules planes et reliées entre elles par une matrice extracellulaire fine. Parallèlement, la VC se referme complètement. Dans les jours qui suivent (E14,5-E15,5), les cellules du mésenchyme deviennent étroitement liées entre elles et commencent à former l'endothélium cornéen (Flügel-Koch et al. 2002, Pei Yf Fau - Rhodin and Rhodin 1970). Ensuite, la partie antérieure de la cornée va se développer en épithélium cornéen à partir de l'ectoderme non neural. Une nouvelle condensation de cellules de mésenchyme donne le stroma cornéen qui s'accumule sur l'endothélium cornéen. Les cellules du stroma cornéen se différencient en fibroblastes et kératocytes. Ces derniers sont responsables de la synthèse d'une matrice extracellulaire hautement spécialisée permettant une transparence totale de la cornée.

Les observations initiales du développement du segment antérieur chez les mammifères ont été réalisées chez la souris, mais ont été confortées par des études

chez d'autres espèces telles que le chat, la vache, le rat et le porc (Dublin 1970) . Chez l'Homme, les cellules mésenchymateuses sont détectées vers la 6^{ème} semaine de développement embryonnaire, et forment plusieurs couches cellulaires faiblement reliées à l'ES et le cristallin (Kolmer 1936) . Les étapes qui suivent sont un peu différentes de celles de souris. Au moment de la condensation des cellules destinées à former l'endothélium cornéen, les cellules qui occupent l'espace stromal, s'accroissent jusqu'à atteindre la partie postérieure de l'épithélium cornéen. Un processus similaire a été observé dans les yeux chez le singe (Ozanics V Fau - Rayborn et al. 1977) .

Il faut noter que le développement du segment antérieur chez les oiseaux diffère de celui chez les mammifères. Chez le poulet, une couche acellulaire, qui n'est pas été mise en évidence dans l'œil des mammifères, et correspondant au stroma coréen primaire, est constituée de fibrilles de collagène qui se positionnent entre la cornée et le cristallin (Dublin 1970, Pei Yf Fau - Rhodin and Rhodin 1970) . Les cellules de mésenchyme migrent le long de la partie intérieure du stroma cornéen primaire pour donner l'endothélium cornéen. Secondairement, le stroma cornéen primaire est colonisé par une vague de cellules mésenchymateuse à l'origine du stroma cornéen définitif.

Au cours de la différenciation de l'endothélium cornéen, la cornée se détache progressivement du reste du cristallin. Des études chez la souris ont montré que la différenciation de l'endothélium cornéen semble jouer un rôle essentiel dans la séparation entre le cristallin et la cornée. La cornée de souris porteuse d'une mutation

homozygote du gène *Mf1*, qui code pour un facteur de transcription exprimé dans les cellules mésenchymateuses péri-oculaires et dans la cornée, reste attachée au cristallin et compromet la formation de la chambre antérieure (Kidson et al. 1999). L'endothélium cornéen chez ces souris ne subit pas de différenciation ce qui suggère que sa spécification est une étape requise pour la formation du segment antérieur.

Ensuite, les bords de la CO s'étendent jusqu'à la cavité ménagée entre la cornée et le cristallin. La formation de l'iris et la différenciation des corps ciliaires de part et d'autre du cristallin, respectivement dans la chambre antérieure et postérieure, est accompagné par un flux de cellules mésenchymateuses qui migrent le long des cellules épithéliales de l'iris et des corps ciliaires pour former les stromas correspondants.

Les dernières structures formées au cours du développement du segment antérieur sont des tissus impliqués dans le drainage de l'humeur aqueuse, à savoir le trabéculum et le canal de Schlemm. Tous deux se développent dans l'angle irido-cornéen chez la souris (Smith et al. 2001) et chez l'Homme (Reme C Fau - d'Epinay and d'Epinay 1981). Le développement du trabéculum commence chez la souris vers E17-19 (entre la 15^{ème} et 20^{ème} semaine chez l'Homme) par une condensation des cellules mésenchymateuses qui s'allongent, s'aplatissent, et entre lesquelles des fibres de matrice extracellulaire sont interposées. Ces dernières vont ensuite s'organiser en lamelles couvertes de cellules endothéliales permettant le drainage de l'humeur aqueuse, et celles interposées entre les lamelles du trabéculum et l'endothélium du canal du Schlemm forment une lame cribreuse ou lame juxta-canaliculaire du trabéculum. A la face postérieure et dans la zone équatoriale, le mésenchyme

périoculaire donne les muscles extra-oculaires (dérivé du mésoderme) et leurs tissus conjonctifs (dérivés de la crête neurale) correspondants. Avant la fermeture de la fissure choroïde, le mésenchyme périoculaire participe à la vascularisation des différentes composantes de l'œil. Il donne les cellules endothéliales et les péricytes qui les entourent (Etchevers et al. 2001, Gage et al. 2005, Trost et al. 2013) .

II.3.2- Contributions de la CNC au segment antérieur

II.3.2.a- Désaccords sur les cartographies de CN

De nombreuses d'études ont montré une variation dans la contribution des dérivés de la CN et de ceux issus du mésoderme, de l'ectoderme et du neuroépithélium. D'une part, des variations existent au sein de la même espèce comme par exemple chez le poulet domestique (*gallus-gallus*) : ceci pourrait s'expliquer par la différence des procédures de greffe ainsi que la variation au niveau du stade de développement choisi pour les greffes (Couly 1993, Le Lievre 1974) . La deuxième source de variation est la contamination des greffons par d'autres cellules. Le groupe de Schneider (Schneider 1999) a montré que la greffe de CCNs à la place du mésoderme a donné des dérivés cartilagineux de la paroi de la boîte crânienne qui dérivent normalement du mésoderme. Ceci indique que la CNC peut répondre à des signaux locaux et se substituer au mésoderme pour la formation de pièces squelettiques.

Ces données suggèrent qu'une petite contamination par des CCN au greffon de mésoderme, ou vice versa, peut fausser les résultats de cartographie chez un embryon

chimère. Ceci souligne l'importance de l'utilisation d'autres méthodes alternatives pour éviter tout artefact expérimental.

Pour résoudre cette variation de cartographie entre les espèces, plusieurs équipes ont utilisé chez la souris des constructions basées sur la *Cre*-recombinase dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la CN. Malheureusement ces approches expérimentales ne sont pas exemptes d'artefact expérimental. Par exemple, le groupe de Jiang (Jiang et al. 2002) utilisant la construction *Wnt1-Cre* chez la souris, sensée conduire l'activité du gène rapporteur de façon spécifique dans le lignage des CNC, a mis en évidence un marquage « mosaïque » au niveau du cartilage de Meckel. Ceci suggère que la fiabilité de cette approche est limitée (Barriga et al., 2015) et que le recours à d'autres méthodes est requis pour éviter les artefacts expérimentaux. Pour résoudre ces problèmes de variations, des études ont utilisé l'injection de marqueurs fluorescents tels que le Dil ou le dextran ou de construction exprimant la GFP, en combinaison avec les xénogreffes pour permettre un suivi plus fin de dérivés de la CNC dans la spécification du maxillaire et de mandibule chez l'embryon de poulet et de l'Axolotl (Cerny et al. 2004, Lee et al. 2004).

II.3.2.b-Dérivés oculaires de la CNC chez le poulet

Des études de cartographie réalisées avec le modèle des chimères caille-poulet ont montré que la CNC contribue à la formation des segments antérieur et postérieur de l'œil (Creuzet et al. 2005, Johnston Mc Fau - Noden et al. 1979). En utilisant la

coloration de Feulgen, ainsi que l'anticorps QCPN (Qail/Chicken PeriNuclear) qui reconnaît des antigènes des cellules de caille et non du poulet, le suivi du devenir des cellules de la CNC a permis de montrer la contribution de ce feuillet au cours de la morphogenèse de l'œil. A partir de E3, la CNC envahit la région péri-oculaire, à proximité de la VO sous l'ectoderme, et également en restant à proximité de la paroi du diencephale jusqu'au niveau de la TO. A E5.5, au niveau du segment postérieur, elle entoure l'ERP où elle donne les péricytes des vaisseaux sanguins de la membrane choroïde. A ce niveau, elle donne aussi les cellules pigmentaires de la membrane choroïde. Simultanément, une couche superficielle, entourant la membrane choroïde, se forme et est à l'origine de la sclère, tunique superficielle cartilagineuse et blanchâtre (figure 5).

Au niveau du segment antérieur, la CNC forme le limbe scléro-cornéen, une future niche de cellules souches. Elle s'interpose entre l'ES et le cristallin pour donner l'endothélium et le stroma cornéens. Ultérieurement, grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre des marqueurs spécifiques des muscles (MyoD, 13F4 et SMA), il a été montré que la CNC donne au niveau de l'iris les muscles iriens, à savoir le muscle dilatateur et le sphincter, et qu'au niveau du corps ciliaire, elle forme les muscles ciliaires responsables du changement de courbure de cristallin, et par conséquent de l'accommodation. Un peu plus tard, la CNC donne le mésenchyme des paupières et des glandes lacrymales, ainsi que tous les péricytes des artères oculaires (Creuzet et al. 2005) (figure 5).

Il a été proposé que la pigmentation du corps ciliaire viendrait des cellules épithéliales rétiniennes qui elles aussi participeraient partiellement à la formation des muscles ciliaires (Barrio-Asensio et al. 1999). De la même manière, il a été suggéré que les muscles iriens dériveraient du mésenchyme et des cellules épithéliales rétiniennes (Barrio-Asensio et al. 1999 , Barrio-Asensio et al. 2002) . Cependant, les précédents travaux de l'équipe ont montré que la pigmentation du corps ciliaire et de tous les muscles de l'iris ont pour origine la CNC (Creuzet et al. 2005) .

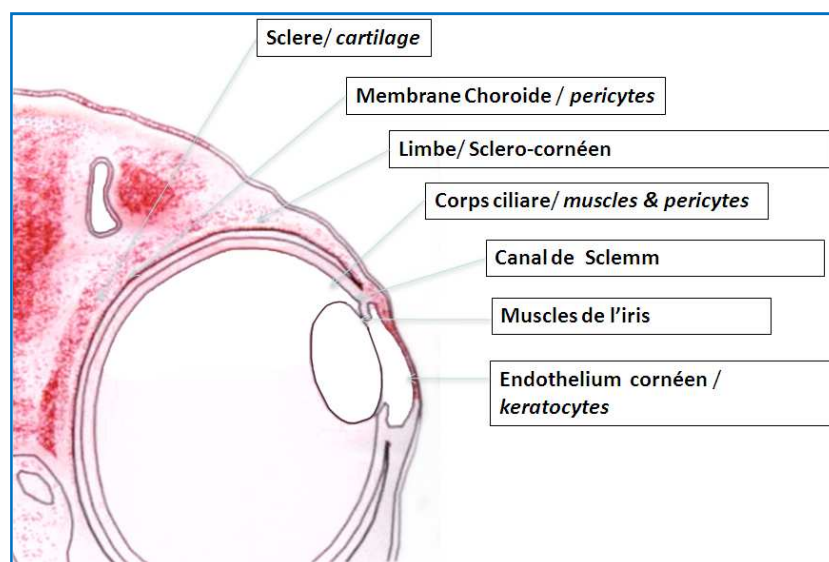


Figure 5: Dérivés oculaires et péri-oculaires de la CNC chez le Poulet.

Les CNC sont à l'origine des cellules cartilagineuses de la sclère, des péricytes de la membrane choroïde, des cellules souches du limbe scléro-cornéen, des muscles ciliaires et iriens, ainsi que de l'endothélium et le stroma cornéen (Creuzet et al. 2005)

II.3.2.c-Dérivés oculaires de la CNC chez la souris

Il a été admis que les résultats obtenus chez le poulet sur la contribution de la CNC aux structures oculaires et péri-oculaires sont identiques chez les mammifères. Des études plus récentes réalisées chez la souris confirment les observations menées chez le poulet, mais en soulignant une contribution mineure du mésenchyme paraxial au niveau du segment antérieur. En utilisant des constructions permettant de suivre, d'une part, les cellules dérivant de la CN et, d'autre part, les cellules dérivant du mésoderme et exprimant le gène de la β -galactosidase exprimé sous le contrôle du promoteur du gène *Wnt1*, et du promoteur du gène α -*GSU* respectivement, la contribution respective de la CNC et du mésoderme paraxial dans les structures oculaires et péri-oculaires a pu être étudiée (Gage et al. 2005). Ainsi, il a été montré que certains marqueurs sont exprimés à la fois dans la CN et le mésoderme paraxial. Par exemple, contrairement à ce qui est observé chez le poulet, *Pitx2* et *Foxc1*, qui sont essentiels pour le développement du segment antérieur, sont exprimés dans les deux types de dérivés cellulaires chez la souris. De plus, des cellules mésodermiques ont pu être détectées dans la cornée à partir de E12 et persistent jusqu'à l'âge adulte, ce qui suggère que chez la souris une minorité de cellules de l'endothélium cornéen, du limbe, du stroma et du trabéculum dérivent de ces cellules mésodermiques et qu'elles coopèrent avec les cellules dérivant de la CNC, à ce niveau.

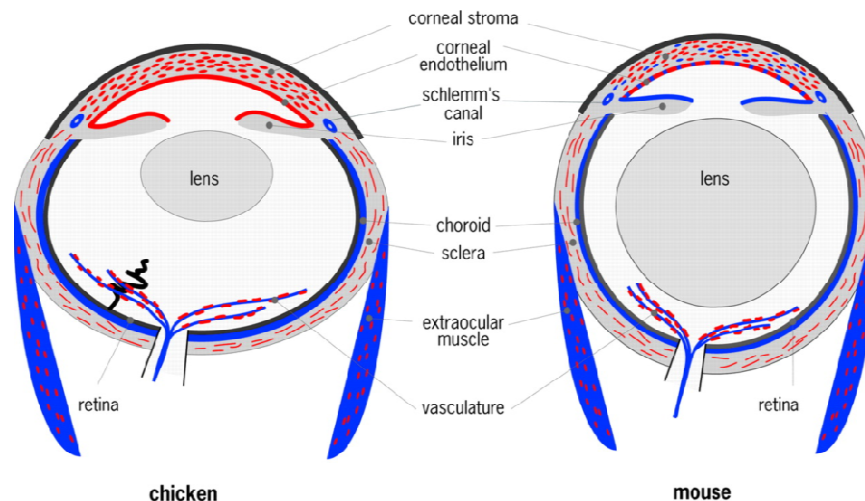


Figure 6: Dérivés de la CNC et du mésoderme chez l'embryon de poulet et de souris respectivement

Schéma résumant les différences de cartographie entre la contribution de la CNC (en rouge) et du mésoderme (en bleu) chez le poulet (à gauche) et chez la souris (à droite) adultes en se basant sur les études chez la souris (Gage et al. 2005, Kulesa et al. 2004) et le poulet (Johnston Mc Fau - Noden et al. 1979, NodenDM. 1982;), avant les nouvelles contributions de l'équipe de Sophie Creuzet (Creuzet et al. 2005) pour les dérivés au niveau du l'endothélium du canal de Schlemm. Les principales différences sont au niveau du segment antérieur. (Gage et al. 2005) .

En plus d'être à l'origine de plusieurs dérivés, la CNC joue un rôle essentiel dans le développement oculaire. Elle fournit des signaux nécessaires pour la spécification des tissus oculaires comme l'ERP (Fuhrmann et al. 2000), l'induction des glandes lacrymales dans l'ES (Kao et al. 2013) et la spécification de la TO (Gage et al. 2005). Elle participe également au développement des paupières (Le Lièvre and Le Douarin 1975) .

Au cours de ces dernières années, des études ont souligné les corrélations qui existent entre les défauts dans la formation de la CNC et des malformations congénitales crâniofaciales et oculaires qui en résultent. Ces notions ont conduits certains auteurs à considérer que l'œil agit, en soi, comme un centre organisateur pour le développement crâniofacial (Kish et al. 2011). La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction entre la CNC et l'œil lors du développement embryonnaire pourrait contribuer à mieux comprendre la complexité sous-jacente des malformations congénitales oculaires.

Partie III. Neurocristopathies congénitales craniofaciales

Du fait de sa capacité à donner une multitude de dérivés, la perturbation du développement de la CNC et de ses dérivés pourrait avoir de lourdes conséquences sur le développement craniofacial. Les malformations associées sont appelées alors neurocristopathies. Par exemple, des perturbations de l'induction de la prolifération ou de la viabilité des CCN peuvent causer une dysplasie (développement anormal d'un organe ou d'une partie du corps) comme dans le cas du syndrome Treacher-Collins décrit pour la première fois par (Collins 1900). Il s'agit d'une anomalie congénitale due à une perturbation du développement cranio-facial qui se caractérise par une dysplasie oto-mandibulaire bilatérale et symétrique associée à d'autres malformations de la tête et du cou (Trainor 2010, Walker and Trainor 2006). L'incidence annuelle à la naissance de ce syndrome est de 1/50000 (<http://www.orpha.net>).

La perturbation de la migration de la CNC peut causer aussi des malformations au niveau des fentes labiales ou palatines, une surdité associée à une anomalie de la pigmentation et un colobome choroïdien, symptômes qui sont tous documentés dans le syndrome de Waardenburg, touchant 1 sur 270 000 nouveaux nés (<http://www.orpha.net>), le syndrome de DiGeorge (Wurdak et al. 2006), concernant entre 1/2000 et 1/4000 des naissances vivantes, et le syndrome de Goldenhar (Cohen Jr 1990, LeDouarin 1999).

Au niveau de l'oeil, les dernières études approfondies ont montré qu'il y a une relation mutuelle reliant la migration du mésenchyme périoculaire et le développement oculaire. Cette relation permet d'abord la migration de la CNC vers l'œil et puis sa

différentiation en certains dérivés oculaires et extra-oculaires. Ces dérivés dépendent également des signalisations venant de l'ES, du neuroépithélium oculaire et de la CNC (Chow and Lang 2001). Toute perturbation d'une de ces signalisations peut causer des malformations oculaires isolées ou associées à d'autres malformations craniofaciales. Au cours du développement oculaire, la partie ventrale de la CO se rétrécit pour former la fissure optique (nommée aussi fissure choroïde). Cette dernière est essentielle au passage du mésenchyme périoculaire qui donnera par la suite les vaisseaux sanguins nécessaires à la nutrition de l'œil (Harada et al. 2007). Des défauts de fermeture de la fissure choroïde peuvent causer des colobomes affectant l'iris, le cristallin, le corps ciliaire, la rétine et le nerf optique. Chez l'Homme cette malformation touche 1/ 10000 nouveaux nés (Shah et al. 2011). Le colobome apparaît soit isolé soit associé à d'autres malformations oculaires comme la microphthalmie, le glaucome, l'anomalie de Peters ou la cataracte (Chang et al. 2006, Shah et al. 2011). Le syndrome CHARGE, caractérisé par des défauts affectant l'œil, le cœur, le cerveau, des structures craniofaciales et le système urinaire (Eccles and Schimmenti 1999, Porges et al. 1992), est la malformation la plus associée au colobome. L'association des malformations oculaires aux malformations craniofaciales a suggéré l'implication de la CNC dans l'étiologie du colobome (Gregory-Evans et al. 2004, Morrison et al. 2002). Bien que les études génétiques chez l'Homme et chez la souris aient identifié un certain nombre de gènes associés au colobome, les mécanismes cellulaires détaillés sous-jacents à la fermeture de la fissure optique et à la formation du colobome restent largement indéfinis.

Des études sur l'acide rétinoïque (AR) ont montré des défauts oculaires congénitaux sévères causés par une déficience en AR ou en vitamine A (See and Clagett-Dame 2009, Warkany J Fau - Schraffenberger and Schraffenberger 1946). Le segment antérieur chez ces individus développe une agénésie du cristallin, de l'iris et de la cornée. La chambre antérieure est quasi-, avec un colobome du nerf optique. Le Récepteur de l'Acide Rétinoïque (RAR), exprimé par les CNC, est requis pour la morphogénèse ventrale de la CO ainsi que pour la fermeture de la fissure choroïde. Mais le mécanisme par lequel cette signalisation régule le développement ventral est controversé et moins compris. Matt (Matt et al. 2005, Matt et al. 2008) a montré aussi que l'œil, en sécrétant l'acide rétinoïque (AR), oriente la migration de la CNC qui exprime des RAR, ce qui permet la fermeture de la fissure choroïde et le développement correct des structures péri-oculaires. Lupo (Lupo et al. 2011) a montré que la signalisation RAR régule la fermeture de la fissure choroïde chez le poisson zèbre en agissant sur la CO ventralement et sur le mésenchyme péri-oculaire en contrôlant l'expression de certains marqueurs de la CNC comme Pitx2, Foxc1 et Eya2. Pitx2 joue un rôle essentiel dans la fermeture de la fissure choroïde (Gage et al. 1999). Des souris mutantes pour le gène *Pitx2* ont des défauts de fermeture de la fissure choroïde (Kumar and Duester 2010, See and Clagett-Dame 2009). De plus, l'inactivation conditionnelle de *Pitx2* spécifiquement dans la CNC cause un colobome (Gage et al. 2005, Sclafani et al. 2006). Ces données suggèrent que l'AR et *Pitx2* sont nécessaires à la morphogénèse de la cupule optique par la fermeture de la fissure choroïde.

Le développement du segment antérieur de l'œil dépend aussi du bon fonctionnement de deux facteurs de transcription, Foxc1 et Pitx2, dans le

mésenchymepérioculaire et principalement dans la CNC chez le poulet. Chez l'Homme, les mutations hétérozygotes dans l'un des gènes codant pour ces deux facteurs conduit à l'anomalie d'Axenfeld-Rieger (Alward 2000), Chez l'Homme cette anomalie touche 1/200000 nouveaux nés, (<http://www.orpha.net>), et affecte d'autres organes que l'œil en causant des défauts au niveau du système cardiovasculaire, des dents, du cordon ombilical, de la glande pituitaire (Bohnsack et al. 2012, Evans and Gage 2005, MacDonald et al. 2004). Au niveau de l'œil, elle se manifeste de façon très variable par des signes oculaires et extra-oculaires. Les anomalies oculaires touchent principalement l'iris (hypoplasie, ectopie ou formation de trous dans l'iris), la cornée (proéminence avec déplacement antérieur de la ligne de Schwalbe) et la chambre antérieure (brides iriennes en pont de l'angle iridocornéen au réseau trabéculaire). La dysgénésie oculaire peut entraîner une augmentation de la pression intra-oculaire à l'origine d'un glaucome.

Chez la souris la mutation au niveau du gène *Foxc1* ou *Pitx2* affecte la formation du segment antérieur d'une manière similaire à celle observée dans l'anomalie d'Axenfeld-Rieger chez l'Homme. Grâce aux études réalisées sur des chimères caille-poulet, il a été mis en évidence que les cellules exprimant *Foxc1* et *Pitx2*, qui sont responsables de la spécification de la cornée en différentes couches pendant la morphogenèse du segment antérieur, dérivent de la CNC (Ittner et al. 2005). Considérant que les facteurs oculaires qui sont en aval de *Foxc1* sont supposés être impliqués dans la modulation de la pression intra-oculaire et le développement oculaire (Tamimi et al. 2004), les gènes cibles de *Pitx2* ont été associés à la synthèse et

à la stabilité des composants de la matrice extracellulaire (Hjalt et al. 2001). Par contre, les régulateurs en amont des deux gènes *Foxc1* et *Pitx2* restent à déterminer.

Il a été montré aussi que la migration de la CNC dépend des signaux intrinsèques de l'œil permettant son guidage spatio-temporel. La signalisation de la protéine TGF β , sécrétée par le cristallin, oriente la migration de la CNC vers ses tissus cibles et dirige sa différenciation en endothélium cornéen et stroma. Ces dernières structures, via l'expression de *Pitx2* et *Foxc1*, contribuent au développement du segment antérieur et postérieur. La perturbation de cette signalisation cause une malformation très proche de l'anomalie d'Axenfeld-Rieger chez l'Homme au niveau antérieur de l'œil, avec une chambre antérieure réduite, un stroma cornéen anormal et l'absence de séparation entre le cristallin et le reste de la cornée, ainsi que la persistance du vitré primitif au niveau du segment postérieur qui se caractérise par une spécification incomplète de la rétine (Ittner et al. 2005).

Enfin, l'équipe d'Andréa Streita éclairé le rôle qu'exerce la CNC sur le positionnement correct du cristallin en se basant sur des résultats montrant la formation de cristallin ectopique en absence de CN. Elle a montré que la CN, via la signalisation TGF β et la voie canonique de la signalisation Wnt, participe à la formation de la placode cristallinienne au bon endroit (Grocott et al. 2011). Malgré les avancées, l'hétérogénéité phénotypique et génotypique pose des défis continus pour comprendre les mécanismes responsables de la complexité des troubles de dysgénésie du segment antérieur et postérieur.

PROBLEMATIQUES

I-Situation du sujet

L'holoprosencéphalie (HPE) est une malformation congénitale rare causée par des défauts de développement et de séparation des structures médianes du système nerveux central (Belloni et al. 1996, Roessler et al. 1996). Elle touche 1 embryon sur 250 et 1 nouveau-né sur 16000 (<http://www.orpha.net/>). Elle se caractérise par une variabilité phénotypique qui la divise en quatre principales formes (Barkovich and Quint 1993, Demyer W Fau - Zeman and Zeman 1963). La forme la plus légère, appelée variante interhémisphérique, se caractérise par la séparation presque complète des deux hémisphères associés à une hypoplasie des structures corticales. Au niveau phénotypique elle comprend une microcéphalie associée à un léger hypotélorisme, deux yeux rapprochés, une unique incisive centrale et d'autres malformations faciales (ME 1977). La deuxième forme, dite HPE lobaire, se caractérise par un développement total des lobes cérébraux, une division interhémisphérique distincte mais l'absence du corps calleux. La troisième forme, l'HPE semi-lobaire, se caractérise par des lobes cérébraux rudimentaires, une division interhémisphérique incomplète et l'absence du corps calleux. La dernière forme, l'HPE alobaire, est la forme la plus sévère et c'est elle qui est responsable le plus souvent de la mort néonatale due à cette pathologie. Elle se caractérise par la non bifurcation des deux hémisphères cérébraux, ce qui donne lieu à un holosphère (ME 1977).

Phénotypiquement, elle se manifeste par une cyclopie, i.e. une fusion des deux champs oculaires en un seul œil central, associée à une structure primitive nasale appelée proboscis et/ou une fente médiane faciale.

Parmi les facteurs responsables de l'HPE, on distingue les facteurs environnementaux et génétiques. Les facteurs environnementaux consistent en l'exposition de la mère pendant la grossesse aux molécules tératogènes comme l'alcool (Aoto et al. 2008, Cohen and Shiota 2002) et les rétinoïdes (Cohen and Shiota 2002). Le diabète de grossesse peut aussi causer l'HPE, 1 à 2% des nouveaux nés de mère diabétique pendant la grossesse développant une HPE (Barr M Jr (1983)).

Génétiquement, l'HPE est une malformation hétérogène et jusqu'à aujourd'hui au moins 12 gènes sont impliqués. Les principales voies de signalisation concernées sont les voies Bmp, Nodal, Zic, Six et Shh (Wallis and Muenke 2000). Le point commun entre ces voies est qu'elles sont essentielles dans le développement de la ligne médiane ventrale et des autres structures médianes du cerveau antérieur.

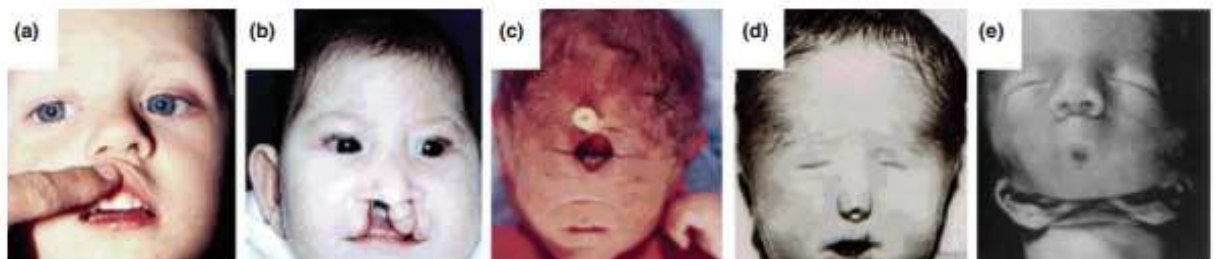


Figure 7: Spectre phénotypique de l'HPE chez l'Homme

Un enfant né avec une seule incisive centrale, (b) une microcéphalie, hypoplasie faciale et des fentes labiales et palpébrales bilatérales, (c) cyclopie avec un proboscis au-dessus de l'œil, (d) hypotélorisme et une seule narine, (e) agnathie,

absence de la mâchoire inférieure, avec des oreilles déplacées en bas. Figure extraite de (Petryk et al. 2015)

Plusieurs études ont essayé de créer un modèle animal mimant l'HPE humaine. Par exemple, une mutation homozygote de *Shh* chez la souris est associée à des défauts de l'établissement des structures médianes comprenant la notochorde, la partie basale du diencephale et d'autres malformations comprenant la cyclopie, ainsi que l'absence des structures distales des membres, des cellules ventrales du tube neural et de la colonne vertébrale (Chiang et al. 1996). La souris mutante a développé une mort cellulaire au niveau de la ligne médiane ventrale qui sépare les deux champs oculaires. Par conséquent, les deux yeux ont été remplacés par un seul œil cyclopie. L'étude de quelques marqueurs précoces de la régionalisation du prosencéphale chez ces souris mutantes a montré que le transcrite de *Fgf8*, gène essentiel à la morphogenèse du télencéphale (Ohkubo et al. 2002), a été détecté dans le neuropore antérieur au stade E8.5, et que son expression a été perdue vers le stade E9. Au niveau des arcs branchiaux, de l'isthme et des ébauches des membres, l'expression de *Fgf8* est restée intacte à ce stade. La mort cellulaire a été détectée à partir de E9 dans la région télencéphalique où *Fgf8* s'exprime, ce qui suggère que la diminution du transcrite de *Fgf8* est due à la mort cellulaire et non pas directement à la diminution de l'expression de *Shh*.

Dans une autre étude sur la signalisation Bmp dans la cyclopie, Golden (Golden et al. 1999) a montré que l'augmentation de la signalisation de Bmp5 dans la lumière du tube neural au stade 9-12HH chez le poulet a engendré une cyclopie. Au niveau moléculaire, *Shh* a été perdu au niveau de la ligne médiane ventrale dans les 60h qui

suivent le traitement. Néanmoins, la mort cellulaire a été détectée juste dans les 36h après le traitement, ce qui suggère que Bmp5 agit comme un facteur pro-apoptotique et que la diminution de *Shh* est probablement causée par la mort cellulaire au niveau de la ligne médiane ventrale et n'est pas directement liée à l'augmentation de la signalisation Bmp5. Le groupe de Ohkubo ([Ohkubo et al. 2002](#)) a montré que l'augmentation de la signalisation de Bmp4 à la surface dorsale du prosencéphale au stade 10HH chez le poulet a causé une diminution de l'expression de *Shh* dans les 6h après le traitement, suivie de l'apoptose dans les 10h post-traitement. Ceci suggère que l'influence de l'augmentation de Bmp4 au niveau de la surface du prosencéphale diffère de celle de Bmp5 dans la lumière de tube neural par le fait que Bmp4 a causé une diminution d'expression de *Shh* dans la ligne médiane ventrale et *Fgf8* dans le prosencéphale, ce qui a probablement causé la mort cellulaire au niveau du futur télencéphale et de la ligne médiane et par conséquent l'apparition de la cyclopie. Golden a supposé que la molécule Bmp4 intervient dans la régionalisation du prosencéphale par la suppression du caractère rostral, c'est-à-dire le télencéphale, excepté l'ERP car elle est impliquée dans sa formation. L'inhibition de la formation du télencéphale d'après eux se fait par la diminution de l'expression de *Fgf8* au niveau du neuropore antérieur, cette inhibition se traduisant par une mort cellulaire des futures cellules télencéphaliques.

II-Mise en place du projet scientifique

Les travaux antérieurs à 2009 de notre équipe ont montré que l'ablation de la CNC au stade 4ss cause une malformation craniofaciale caractéristique de l'HPE ([Creuzet 2009](#)). Ainsi, l'embryon ayant subi une ablation de la CNC a développé une cyclopie

précédée par une augmentation de l'expression de Bmp7 au niveau de la plaque préchordale (PPC). Ceci suggère une relation d'antagonisme entre la CNC dorsalement et la PPC ventralement, interaction indispensable à la morphogénèse du prosencéphale. Mon projet de thèse vise à mieux étudier cette relation entre la CNC et la PPC et à évaluer son impact sur la régionalisation du prosencéphale en télencéphale, œil et tige optique. Pour cela, nous avons augmenté la signalisation de Bmp7 dans la plaque préchordale d'une manière hétérochronique chez l'embryon de poulet au stade 8HH (5ss). L'objectif est d'abord de reproduire les effets générés par l'ablation de la CNC au stade 4ss et qui sont suivis d'une cyclopie (Creuzet 2009). Ensuite, avec ce modèle, nous avons tenté d'étudier les médiateurs moléculaires en aval du traitement par Bmp7 qui sont responsables de la perturbation de la migration de la CNC antérieurement, empêchant ainsi la séparation des champs oculaires du reste du tube neural et par conséquent l'inhibition de la régionalisation précoce du prosencéphale.

Nos principaux objectifs sont :

1. Comprendre l'étiologie de la cyclopie causée par la signalisation hétérochronique de Bmp7 dans la plaque préchordale (PPC) tout en gardant la CNC intacte.
2. Étudier les effets de l'augmentation de la signalisation de Bmp7 sur le développement et la migration de la CNC.
3. Identifier de nouveaux candidats agissant en aval de la signalisation de Bmp7 et responsables du phénotype de la cyclopie.

MATERIELS ET METHODES

I-Matériel expérimental et molécules biologiques

I.1-Manipulation des embryons d'oiseaux

Les embryons de Poulet ont été utilisés comme modèle tout au long de cette étude et les stades de développement sont fixés selon la table de développement de Hamburger et Hamilton (HH) et selon le nombre de paires de somites (ss : somite stage) (Hamburger et Hamilton, 1951). Après une incubation de 30 à 32h dans un incubateur humidifié à 38°C, les expériences ont été effectuées au stade 5ss pour l'électroporation et l'injection de la protéine exogène Bmp7 *in ovo*.

I.2-Préparation de la solution de protéine recombinante de Bmp7

Une solution de protéine Bmp7 humaine (0,6 µg / µl; R & D Systems) est injectée dans les cellules de la PPC au stade de 5ss. Cette concentration a été précédemment montrée comme étant efficace pour affecter le développement du cerveau antérieur (Creuzet 2009). Pour visualiser le site d'injection de la protéine, un produit contrastant, le Fast Green FCF (Sigma), est ajouté à cette solution à une concentration de 0,01%.

I.3.1-Synthèse des molécules d'ARN interférent

Pour les expériences de perte de fonction, des brins sens et anti-sens d'ARN sont synthétisés à partir de la molécule d'ADN complémentaire (ADN_c) codant pour les gènes cibles.

La première étape consiste à faire la linéarisation de 10 µg de plasmides contenant l'ADN_c des gènes d'intérêt, par des enzymes de restriction, pendant 2h30 à 37°C, suivie d'une inactivation de l'enzyme de restriction pendant 10 min à 70°C.

L'ADN_c linéarisé est utilisé pour permettre la transcription *in vitro* des brins sens et anti-sens pendant 4h à 37°C. Après élimination de la matrice d'ADN_c par la DNase/RNase free (Promega), la purification des deux brins est réalisée par la méthode de précipitation à l'aide de LiCl (0,5M) suivie d'une centrifugation à 12000 g.

Pour la synthèse de l'ARN double brin (ARN_{db}), les brins simples d'ARN sont chauffés pendant 5 minutes à 95 ° C puis laissés pendant 15 min à température ambiante, suivie d'un traitement avec RNase I_f (New England Biolabs) pour éliminer les ARNs simples brins non hybridés. La mesure de concentration est faite à l'aide d'un appareil nanodrop et la taille est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (Creuzet et al. 2004, Pekarik et al. 2003). Selon ce protocole, des ARN_{db} des ADN_c codant pour Wnt1 (Hollyday et al. 1995) et Wnt2b (Kawakami et al. 2001) ont été obtenus et utilisés aux concentrations suivantes: ds *Wnt1* : 0,4 µg/µl, ds *Wnt2b* : 0,3 µg/µl.

I.3.2-Constructions plasmidiques pour les expériences de gain de fonction de la signalisation Wnt

Les expériences de gain de fonction sont effectuées en utilisant les constructions plasmidiques: pCAGGS-GFP-WNT2B et pCAGGS-GFP-WNT1 (Imagif, France) utilisées à 1 µg / µl.

II-Méthodes

II-1- Manipulation de l'expression des gènes et étude de leur activité

II-1.1-Injection de la protéine recombinante Bmp7 dans la plaque pré-chordale (PPC)

Pour reproduire l'effet de l'ablation de CNC, la protéine Bmp7 exogène a été administrée à 0,6 µg/µl (R &D systems) au niveau de la PPC au stade 5 ss avant la migration de la CNC.

II-1.2-Electroporation *in ovo*

L'électroporation a été utilisée pour délivrer des séquences nucléiques exogènes aux cellules prémigratoires de la CNC à l'aide d'une micropipette étirée à la flamme. Une solution de FCF (Sigma) à 0,01% est additionnée à la solution d'acides nucléiques pour visualiser le site d'injection.

L'électroporation est réalisée en utilisant un système de trois électrodes placées sur la membrane vitelline: les deux anodes sont placées de part et d'autre du tube neural afin de transférer les deux côtés de CNC simultanément avec un écart de 5 mm, la cathode étant placée en regard du futur neuropore antérieur. Pour nos expériences, des séquences nucléiques exogènes sont délivrées vers les tissus cibles par une série de cinq impulsions électrique rectangulaires de 27V (T830 BTX, Genetronics, CA).

Après l'électroporation, les œufs sont scellés et incubés à 38°C jusqu'au stade requis pour l'analyse.

Gènes	vecteur	Linéarisation Anti-sens	Transcription Anti-sens	Linéarisation Sens	Transcription Sens	Taille en Pb	Auteurs
Pax6	pBSKS	EcoR1	T7	-----	-----	500	P.Guess
Foxg1	pBSKS	Xba1	T7	-----	-----	1356	Chapman
Wnt1	pBS KS	EcoR1	T7	Hind 3	SP6	450	Hollyday
Wnt2b	PBSKS	EcoR1	T3	Not1	T3	1000	Kawakami
FGF8	pBS KS	EcoR1	T7	-----	-----	800	Crossley
Six3	pBSKS	Hind3	T3	-----	-----	1000	Geng
Otx2	pBSKS	Xho1	T3	-----	-----	1600	Boncinelli
Shh	pBSKS	Hind3	T3	-----	-----	1300	Riddle
Slug	pBSKS	EcoR1	T7	-----	-----	700	J.Cooke
Bmp7	pBSKS	Xho1	T3	-----	-----	1000	-----
Mitf	pBSKS	EcoR1	T7	-----	-----	2880	Makotomochii

Tableau 1: Constructions utilisées pour la synthèse des ribosondes utilisées en hybridation in situ et des ARNdb pour les expériences de perte de fonction par ARN interférence :

II.1.3-Hybridation *in situ* sur des embryons entiers et synthèse des ribosondes

Selon la nomenclature de stade de développement de Hamburger et Hamilton en 1951, les embryons sont prélevés puis fixés soit à température ambiante pendant 2 heures soit pendant une nuit à 4°C dans une solution de formaldéhyde 4% diluée dans du tampon phosphate salin (PBS) . Après fixation, les embryons sont hybridés avec les ribosondes marquées par la digoxigénine (UTP-Dig). La procédure pour les hybridations *in situ* est réalisée selon le protocole décrit précédemment (Creuzet et al. 2006) .

II.1.4-Synthèse de ribosondes

Pour la synthèse de ribosonde destinée à l'étude du niveau d'expression de certains gènes ainsi que leur distribution tissulaire, le même protocole utilisé dans la synthèse d'ARN interférence a été utilisé jusqu'à la purification de sonde. La seule différence se présente au niveau de la nature d'UTP qui est fusionné à la Digoxigénine, l'UTP-Dig (Roche), (Dig : Digoxigénine) pour la synthèse de sonde.

II.1.5-Transcription Reverse et PCR quantitative (qPCR)

II.1.5.1-Extraction des ARN totaux et transcription reverse

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit Nucleospin RNA II (MACHEREY- NAGEL, France) suivi d'un traitement à la DNase sur colonne dont le protocole est fourni par le même fournisseur. La quantité d'ARN obtenu est déterminée par la mesure de l'absorbance optique à 260 nm. La qualité et l'intégrité des ARN obtenus sont contrôlées par une migration électrophorétique de 200 ng après leur dénaturation pendant 15 min à 65°C. 2 ug d'ARN totaux extraits sont utilisés pour la synthèse d'ADNc simple brin utilisant une Reverse Transcriptase (MMLV reverse transcriptase (PROMEGA, Madison, Wi USA) et des oligo-dTs comme amorces.

II.1.5.2-Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

25ng d'ADNc synthétisés sont utilisées pour étudier le taux d'ARNm des différents gènes testés par PCR quantitative en temps réel réalisée avec le système LightCycler® FastStart. DNA Master SYBR Green I (Roche, Version 15.0) conformément au protocole fourni par le fournisseur. La q-PCR se fait comme suit : - Dénaturation initiale de 5 min à 95°C suivie de 40 cycles : - Dénaturation pendant 15 s à 95°C suivie d'1 min d'hybridation à 60°C et élongation à 72°C. La quantification utilisée est une quantification relative $2^{-\Delta CT}$ avec *Gapdh* comme gène standard. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le **Tableau 3**.

Gènes	Amorces sens	Amorces anti-sens	Gènes	Amorces sens	Amorces anti-sens
<i>GAPDH</i>	caiccaaggagtgagccagg	aatlgaggagtggggaga	<i>LAMI</i>	ggacatctctgtggggca	ggttctgtaggtaccaccg
<i>MMP2</i>	tggcagttctgggcagaat	atgatactgttcggcagcca	<i>INTEG4</i>	gaicgccactacgtggaca	cagagcctcttccactgca
<i>RAC1</i>	tcagcacttacacagcgagg	cttgagcaaaagcacagggtt	<i>RhoA</i>	ggcaaagaccaaagacgggtg	tactcaagtgacagggtctg
<i>WNT1</i>	ctgacagttggtctggag	acgaictgccaagaatgttg	<i>ROCK1</i>	cicatgggagcggtctgaa	ccicagtgctcttctgtgcc
<i>PAX6</i>	tcagcacaagcgtttaccag	ggttgcataggcagggtgtt	<i>BMP7</i>	tgggggagcattgacagagag	cttgagggaacctgtagaca
β <i>CATENIN</i>	gggttgattcgcactctgc	acaaactgctgttcggttc	<i>NOTCH1</i>	tacaaa tgcctctgccccag	atgcagctgtagccactac
<i>SHH</i>	cgctgcaaggacaagctgaa	gggccagcattcctacttg	<i>ABLIM1</i>	gccccatcaccatctgaaa	aaagcctctgtgccaagt
<i>NOTCH2</i>	gtggcagctctggaicact	cttctccaactggctccct	<i>FOXG1</i>	ccctactggcccattgicc	gagtgatgttccccaaagga
<i>EFNB1</i>	ccaactacatggggccctggag	tggatctgcccacttct	<i>MITF</i>	ccaagcctcccttaagctcc	gctgacgggaactctctgtt
<i>TBOX5</i>	tgttaccagcggatgaccac	tggaaaggaaaccaactgcct	<i>MYH9</i>	gcaatggagtggtggaggga	tcatagcacacaggctgtt
<i>OTX2</i>	accaggeatcaggttacag	gaggctggagactgggtgag	<i>FGF8</i>	caagaaaatcaatgcgatgg	actcttgcctgacagttcc
<i>BMP4</i>	gctaccaggcgtttactgc	ttttagcacacactgtgca	<i>WNT11</i>	agtgcctaggagttctggg	cacgaggtatttgcgtgtgc
<i>MMP2</i>	atggacagccctgcaagttt	tggcagttctgggcagaat	<i>IGF2</i>	acacactgcagtcgtctgt	cggacttggc acagtaggtt
<i>P120-CATENIN</i>	ccctgggtcagatacagtg	aattgctcctgctgaagcct	<i>ACTN2</i>	ttgagagcgattggtctgt	aaagtgtcccaagctgtccc
<i>PITX2</i>	tacaa caactgggcagccaa	tgttgacatgctcaatg	<i>ADAM33</i>	gactgc caactacgtggaca	cagagcctcttccaactgca
<i>SEC24B</i>	cctcaacctctactacgca	gctgcttctctatctctctc	<i>PFM2</i>	gcaagaaagggtcctatgga	aggtttaaagctcaccgcca
<i>nCFL2</i>	attctgggtctctgaaagcg	tctctcagtggtgaaegg	<i>PITX1</i>	aaetctggcctcaacaacat	atttcaagctgaggtctggcc
			<i>CELSR1</i>	aaeggagaaatggggaggta	gcacacaggtctgtggat

Tableau 2: Les amorces sens et anti-sens pour les analyses de RT-qPCR ont été synthétisées pour amplifier des séquences de 149-151 pb

II.2. Analyses histochimiques et immunohistochimiques

II.2.1-Sur embryons entiers

II.2.1.1-Détection de la mort cellulaire

Les principaux sites de la mort cellulaire ont été mis en évidence sur les embryons entiers en utilisant la coloration de LysoTracker (Life technologies). Cette molécule permet de révéler les territoires où s'accumulent les phagolysosomes. Les embryons sont prélevés et incubés dans une solution de 2,5 uM de LysoTracker en PBS pendant 15 min à température ambiante suivie d'une étape de rinçage avec du PBS et fixation dans du formaldéhyde 4% (Schaefer et al., 2004).

II.2.1.b-Eclaircissement des embryons

La technique d'éclaircissement est utilisée dans notre laboratoire pour observer le développement cartilagineux et osseux des embryons ayant subi le traitement par Bmp7. Après prélèvement, les embryons ont été rincés au PBS 1X puis fixés dans la solution composée d'éthanol 80% acide acétique 20% et à laquelle a été ajouté du Bleu Alcian 0,015% permettant de colorer le cartilage en bleu. Pour les stades tardifs (E9), nous avons utilisé l'Alizarine red 0,01% ajoutée à une solution de potasse (KOH) afin de colorer les os en rouge. Après différents temps d'incubation selon les stades, les cartilages et/ou les os peuvent être visualisés.

II.2.2-Sur des coupes d'embryons

II.2.2.1-Inclusion dans la paraffine et coupes de microtome

Après prélèvement, les embryons ont été fixés avec 4% de formaldéhyde pendant 2 h et ensuite ont été déshydratés à l'éthanol absolu puis brièvement lavés deux fois dans du toluène et incubés dans un moule contenant de la paraffine à 60 ° C (entre une nuit et 2-3 jours selon les stades). Les embryons ont été sectionnés en rubans avec une épaisseur de 7 microns et disposés en rangées sur une lame de verre. La lame a été ensuite placée dans une couveuse durant la nuit à 37 ° pour fermement fixer les tissus à la lame.

II.2.2.2-Inclusion dans l'agarose et coupes de vibratome

Pour des coupes plus épaisses nous avons utilisé le vibratome. Les embryons fixés au formaldéhyde 4% sont ensuite positionnés dans un moule contenant de l'agarose 3% puis laissés refroidir à température ambiante. Ensuite, le bloc d'agarose contenant l'embryon a été taillé en forme de carré et puis collé sur un support noir pour avoir plus de contraste et coupé au vibratome.

II.2.2.3-Coloration de Crésyl violet

Afin d'étudier les conséquences des traitements sur le développement de certains dérivés de la CNC aux stades tardifs (à partir de E6), une solution à 0,1% de crésyl

violet (ou le violet de crésyl) a été utilisée dans afin de colorer le cytoplasme en bleu, la chromatine des noyaux en rouge violet, le collagène en rouge clair, le cartilage en rouge.

Après une incubation de 5 minutes, les coupes ont été rincées et ont subi une déshydratation progressive dans des bains d'éthanol 70%, éthanol absolu suivi de deux bains de toluène et montage en milieu Entellan (MerckMillipore)

II.2.2.4-Détection des protéines par immunofluorescence

Les coupes obtenues au cryostat ou au vibratome ont subi le protocole suivant. La perméabilisation est réalisée dans une solution de PBS (1X) contenant 0,1 % de Triton pendant 10 min. La saturation des liaisons aspécifiques dans une solution de PBS, BSA 1% et Tween 20 à 0,05 % pendant 1 heure à température ambiante. L'incubation avec les anticorps primaires (le Tableau 1 indique la nature et la concentration utilisées) est réalisée sur la nuit à 4°C. Trois lavages de 5 min sont effectués avant incubation avec les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes et le Dapi (4', 6-diamidino-2-phénylindole, 1,5 µg/ml; Sigma) qui permet la visualisation de noyaux cellulaires. Après une incubation de deux heures dans l'obscurité, trois lavages de 5 min au PBS sont effectués. Les lames sont montées avec des lamelles après un rinçage à l'eau en utilisant le milieu de montage VECTASHIELD® (H-1200 Vector Laboratory) contenant du Dapi. Après séchage à température ambiante les lames sont conservées à 4°C.

Anticorps primaires	Anticorps secondaires conjugués au fluorochromes
Anti-phospho-histone H3 : 1/100 (sigma-aldrich) antiVangl2/1/100 (Santa Cruz)	Alexa fluor Anti-IgG lapin au 1/500 (life technologies)
Anti-HNK1: 1/200 (Santa Cruz biotechnology) Anti-β-Caténine: 1/200 (DSHB)	Alexa fluor Anti-IgM souris au 1/500 (life technologies)
Anti-Wnt2b: 1/200 (Santa Cruz biotechnology)	Alexa fluor anti-IgG2b souris au 1/500 (life technologies)
Anti-N-Cadhérine: 1/200 (DSHB)	Alexa fluor anti-IgG1 souris au 1/500 (life technologies)

Tableau 3: Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'étude de la migration de la CNC, des marqueurs de polarité cellulaire et de constriction apicale ainsi que des morphogènes

II.2.2.5-Coloration à l'éosine et à l'hématoxyline

La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine est une méthode de coloration de tissus très utilisée en histologie. Cette méthode colore le noyau en bleu-noir (hématoxyline) alors que le cytoplasme et la matrice extracellulaire sont colorés en rose (éosine)

Le protocole utilisé est comme suit. Les coupes sont d'abord rincées dans l'eau distillée pendant 5 minutes (min), puis elles sont colorées par l'hématoxyline de Harris (Sigma HHS-16) à (2%) pendant 6 min, rincées de nouveau et incubées dans l'acide alcool 1% pendant 5 secondes pour décolorer. Après un rinçage à l'eau distillée, une contre coloration à l'éosine Y (Sigma HT110-2-16) à 1% pendant 5 minutes est réalisée, suivie d'un dernier rinçage et d'une étape de déshydratation avant montage avec le milieu Entellan (Merck).

II.2.2.6-Visualisations au microscope à fluorescence

Un microscope à fluorescence (Leica DM 5500 B) est utilisé pour évaluer la fluorescence après marquage immunohistochimique des coupes d'embryons ; les acquisitions des images observées sont obtenues avec le logiciel AF 6000 Modular system (LAS AF version : 3.1.0 build 8587). Pour des coupes d'embryons plus épaisses, un microscope confocal (Leica TCS SP8) est également utilisé. L'analyse des images et leur montage définitif sont réalisés à l'aide des programmes Adobe® Photoshop® CS et ImageJ (National Institute of Health).

III. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées sous la forme \pm SEM(standard error of the mean). Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism5.04 avec un intervalle de confiance de 95%. Les résultats collectés, à partir des observations indépendantes, sont comparés en utilisant le test **non** de Mann-Whitney U (* \leq 0.05, ** \leq 0.01 and *** \leq 0.001).

Pour la PCR quantitative, la méthode de calcul du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ est utilisée pour l'analyse des variations relatives d'expression génétique en utilisant le gène *Gapdh* comme gène normalisateur.

RESULTATS

I) Du colobome à la cyclopie: rôle morphogénétique de la crête neurale céphalique et de ses médiateurs moléculaires dans la spécification du nerf optique embryonnaire

[Sghari S](#)¹, [Creuzet S](#)²

¹Institut de Neurobiologie, Laboratoire de Neurobiologie et Développement, Avenue de la Terrasse, Gif-sur-Yvette 91198, France.

²Institut de Neurobiologie, Laboratoire de Neurobiologie et Développement, Avenue de la Terrasse, Gif-sur-Yvette 91198, France sophie.creuzet@inaf.cnrs-gif.fr.

Présentation des résultats

I- Validation du modèle expérimental par injection de Bmp7

Nous avons tout d'abord cherché à valider notre modèle expérimental. Nous avons ainsi pu montrer que l'activation hétérochronique de Bmp7 dans la PPC, par micro-injection de la protéine dès le stade de 5ss s'accompagne d'une cyclopie qui peut être mise en évidence dès E4.5. Cette cyclopie s'accompagne d'une inhibition de la croissance latéro-dorsale des hémisphères cérébraux dont le territoire présomptif est indistinguable des deux ébauches optiques initiales et est alors incorporé un champ rétinien « cyclopie », unique et pigmenté (Fig.1 ;I,J), de l'article I).

Par contre, si on réalise une injection de Bmp7 dans la PPC à 7ss, stade auquel, la protéine est normalement produite à ce niveau, les conséquences sur la morphologie cérébro-faciale sont mineures, et entraînent simplement une légère hypoplasie de l'ethmoïde.

II- La cyclopie est précédée de perturbations de l'organisation du neuroépithélium céphalique

Afin de rechercher les premières perturbations tissulaires responsables de ce phénotype sévère, nous avons réalisé des coupes histologiques au stade de 12ss, c'est-à-dire 15 heures après l'injection. Nous avons alors observé qu'au cours du développement normal à ce stade, le neuroépithélium céphalique se ségrège en trois domaines : latéralement la rétine, médialement le prosencéphale, et interposé entre les 2 précédents, le futur nerf optique —*tige optique*— au niveau duquel le neuroépithélium présente des constriction qui délimitent ses différents territoires. Chez les embryons expérimentaux, dans les heures qui suivent l'injection de Bmp7, ces constriction ne se forment pas : le neuroépithélium s'organise en une vésicule unique, où l'absence de spécification de l'optic stalk entraîne la formation d'un colobome géant.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de la cyclopie, nous avons réalisé des coupes coronales sur des embryons de 12HH, stade qui précède l'apparition du phénotype de cyclopie. Nous observons que l'excès de Bmp7 affecte l'invagination de la partie dorsale de la vésicule optique([Fig.1 ;Q-T](#)), de l'article [I](#)).

Or, dans la littérature des études ont montré que la fermeture du tube neural se fait par constriction apicale et que cette dernière est impliquée dans plusieurs processus de morphogenèse. Nous avons donc cherché à déterminer si l'absence d'invagination du neuroépithélium de l'optic stalk qui précède la formation du colobome géant, était due à un manque de constriction apicale des cellules neuroépithéliales. Le territoire de *l'optic stalk* est alors « éverté », et cette éversion précède la formation d'un colobome géant

A l'aide de la technique d'immunofluorescence en utilisant la molécule de phalloïdine qui marque les filaments d'actine, nous avons trouvé que chez les embryons témoins, les filaments d'actine sont disposés au niveau apical de l'épithélium rétinien alors que chez l'expérimental les filaments d'actine ne se localisent pas au niveau apical (Fig.3 ;M-R), de l'article I).

En plus la distribution des noyaux au niveau de la partie proximale dorsale de la VO est inversée ce qui explique la déformation observée sur les coupes chez l'embryo cyclope à 12HH (Fig.3 ;Y-ii), de l'article I). Ceci suggère que la polarité de l'épithélium dorsal de la VO a été perturbée par le traitement par Bmp7.

L'étude par PCR quantitative a révélé une diminution d'expression de certains gènes choisis pour leur implication dans la polarité apico-basale et la constriction apicale des cellules épithéliales (*RhoA*, *ROCK1*, *MYH9*...) (Fig.4 ;ii), de l'article I) ce qui suggère que l'inhibition de la constriction apicale de l'épithélium apical pourrait être la cause de la non-invagination de la vésicule optique et l'apparition de la cyclopie. De même, la distribution des protéines Vangl2

(Fig.3 ;S-X), de l'article I). et Mucine1, deux marqueurs de polarité cellulaire, s'avère également affectée par l'injection de Bmp7, ce qui tend à montrer que la polarité cellulaire à ce niveau est l'enjeu de régulations antagonistes entre les signaux produits par la CNC et la PPC.

III- L'excès de Bmp7 dans la PPC induit des altérations du comportement migratoire des cellules de la CNC.

Nous avons alors cherché à comprendre si le déficit de formation de la tige optique, et plus généralement de spécification du neuroépithélium antérieur, coïncide avec des modifications du comportement migratoire des cellules de la CNC. Nous avons réalisé des séries de marquages avec l'Ac HNK1 à divers stades du développement entre le moment de l'injection (5ss) et les premières manifestations morphologiques (12ss), afin de définir la cinétique de leur profil migratoire entre la situation « témoin » et expérimentale. Nous avons pu constater qu'entre les stades de 7ss et de 12ss, les cellules de la CNC marquées chez l'embryon expérimental montrent un défaut de migration rostrale en regard du territoire destiné à former l'optic stalk(Fig.5 ;A-H), de l'article I). Sur ces mêmes stades, nous avons parallèlement considéré la prolifération et la mort cellulaire entre ces deux séries expérimentales. Nos résultats tendent à montrer que l'excès de Bmp7 affecte la prolifération cellulaire mais pas la viabilité(Fig.2 ;A-B, L-Q), de l'article I).

IV- Analyse du rôle de la signalisation Wnt1 dans le développement oculaire et céphalique.

Suite à l'injection de Bmp7 dans la PPC au stade de 5ss, nous avons observé une surexpression du gène *Wnt1* qui est normalement exprimé de façon transitoire par les cellules de la CN céphalique au début de leur migration, dès le stade de 7ss(Fig.6 ;A-B), de l'article I). Afin de comprendre la signification de la surexpression de *Wnt1* sur le devenir du prosencéphale, nous avons tenté de restaurer la morphogenèse oculaire en testant les effets de la transfection de molécules ARN-doubles brins (*dsRNA*) dans les cellules de la CN avant début de leur migration.

Les expériences de perte de fonction de *Wnt1* chez des embryons supplémentés en Bmp7 dans la PPC montrent un sauvetage significatif du développement neural et sensoriel: l'inhibition de la signalisation Wnt1 suffit à bloquer la transdifférenciation du télencéphale induite par Bmp7(Fig.6 ; L-S, X-Z), de l'article I). Ceci permet de restaurer le développement des hémisphères télencéphaliques et de la chambre antérieure de l'œil. Ceci suggère que la signalisation ventrale de Bmp7 subit un gradient de concentration finement régulé afin de maintenir la polarité dorso-ventrale du cerveau antérieur et un développement correct des organes sensoriels.

Cependant, la morphogenèse de l'œil reste imparfaite : la partie dorso-latérale des vésicules optiques est en grande partie récupérée, mais nous notons persistance de la fissure choroïde et leur nerf optique reste désorganisé(Fig.6 ;T-

W), de l'article I). Ceci suggère que d'autres gènes puissent être plus particulièrement impliqués dans le développement de la partie ventro-médiane oculaire.

La question était alors de savoir si l'augmentation de signalisation dorsale de *Wnt1* entrave la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules de la CNC ou inhibe la migration cellulaire. Nous avons étudié par immunofluorescence in toto d'un marqueur de migration cellulaire HNK1 deux heures après l'injection de *Bmp7* dans la PPC et quelques heures après. Nous avons trouvé que les cellules de CNC commencent à migrer à partir du stade 9HH chez le contrôle et entourent les vésicules optiques vers 10HH et jusqu'à la partie la plus rostrale, l'*anterior neural ridge* (ANR) vers 12HH alors que chez l'embryon expérimental une petite quantité de CNC commencent à migrer vers 9HH et le marquage HNK1 s'affaiblit considérablement au niveau des vésicules optiques à 10HH et au niveau de l'ANR à 12HH ce qui suggère que la surexpression de *Wnt1* perturbe la TEM ainsi que la migration des CNC vers leur site d'interaction avec les vésicules optiques et l'ANR, avec pour conséquence des défauts majeurs, neural et sensoriel (Fig.5 ;I-T), de l'article I). L'étude moléculaire des transcrits de certains gènes de migration cellulaire par PCR quantitative a révélé une diminution de niveau d'expression des gènes de *Integrin a 4 (ITGA4)*, *ADAM33*, *MMP2*, *N-cadherin (CDH2)* et *LAM1* ce qui a confirmé notre hypothèse (Fig.5 ;Y), de l'article I).

V- Etude de l'implication du signal Wnt2b dans la polarité apico-basale des cellules de la tige optique.

Pour savoir si les marqueurs responsables de l'inhibition de la constriction apicale ainsi que la polarité cellulaire nous avons réalisé une PCR quantitative au stade 12HH sur certains gènes susceptibles de jouer un rôle dans la morphogenèse oculaire et cérébrale et nous avons trouvé que certains gènes étaient surexprimés. Il s'agit notamment des gènes codant pour *IGF2*, *EFNB1*, *TBX5*, *ABLIM1*, *NOTCH2*, *P120catenin*, *ACTN2*, *nCFL2*, *PFN2*, alors que d'autres gènes sont réprimés tels que *WNT2B*, *FOXG1*, *SHH* et *OTX2* (Fig.4 ;ii-v), de l'article I).

Pour confirmer les résultats de l'analyse en PCR quantitative, nous avons réalisé des hybridations in situ (Fig.4 ;A-Z), de l'article I). Nous avons trouvé chez l'embryon expérimental, une diminution d'expression d'*Otx2* et *Pax6* au niveau de la partie dorsale et distale de la VOce qui suggère que ces gènes pourraient interagir avec *ROCK1* et *RhoA*, deux effecteurs de la constriction apicale pendant l'invagination, au niveau dorsal de la vésicule optique.

Les changements dans le niveau d'expression du gène *Wnt2b* ont plus particulièrement retenu notre attention. L'analyse par hybridation in situ a montré que *Wnt2b* est normalement exprimé par cellules de la CNC au tout début de leur migration, ainsi que dans le tube neural et au niveau de la vésicule optique (Fig.7(a) ;A-J), de l'article I). En condition expérimentale, son expression est diminuée dans les cellules de la CNC. Ceci pourrait expliquer la perturbation

de la polarité du neuroépithélium responsable de la malformation obtenue. Nous avons donc posé l'hypothèse que les modifications dans l'expression du gène *Wnt2b* pourraient expliquer les altérations du nerf optique. Pour tester cette hypothèse nous avons tenté des expériences de sauvetage dans lesquelles nous avons traité l'embryon par *Bmp7* au stade de 8HH suivi de double électroporation de *dsWnt1* au niveau des futures CCNs et un vecteur plasmidique exprimant le gène *Wnt2b* fusionné au gène codant pour la GFP (*pWnt2b-GFP*). L'électroporation de *pWnt2b-GFP* au niveau de la CNC seulement n'a pas amélioré le phénotype obtenu par BMP7. Néanmoins, lorsque nous avons électroporé le neuroépithélium dorsal des VO, l'embryon a développé un phénotype très proche du contrôle ce qui suggère *Wnt2b* agit au niveau de la VO dorsalement et que son expression dans la CNC semble sans effet sur l'amélioration du phénotype (Fig.7(b) ;O-S), de l'article I).

Des coupes coronales au stade de E8 (32-33HH) avec du crésyl violet ont montré que les yeux sont restés fusionnés dorsalement au télencéphale avec absence du septum inter-orbitaire. Plus ventralement, les yeux sont séparés par le septum nasal avec apparition des fibres du nerf optique (Fig.8 ;K-N), de l'article I).

Au niveau moléculaire, nous avons constaté une amélioration de distribution des deux protéines Vangl2 et les F-actin au niveau apical des VO (Fig.9 ;M-X), de l'article I). Ainsi la distribution des noyaux au niveau de la partie proximale de la VO a été rétablie (Fig.9 ; i,ii), de l'article I). Les analyses de la qPCR ont montré une amélioration de l'expression de *Shh*, *Wnt2b*, *N-cadhérin (CDH2)*, *Mitf* et le trio (*RhoA-MYH9-ROCK1*) (Fig.9 ;iii), de l'article I). Le troisième potentiel candidat

responsable du phénotype de la cyclopie est *Foxg1*. Des coupes transversales au stade 12HH ont montré que ce gène s'exprime au niveau des futures cellules télencéphaliques (ANR) mais également dans la partie proximale des vésicules optiques au niveau des bords entre le diencephale rostral et le télencéphale (Fig.9 ;G-I), de l'article I). Le double sauvetage a permis l'amélioration de l'expression du *Foxg1* au niveau de l'ANR. Néanmoins, la diminution d'expression de *Foxg1* au niveau des bords entre le diencephale rostral et le télencéphale reste inchangée malgré l'amélioration de la migration de la CNC. Ceci suggère que l'expression de *Foxg1* à cette région semble être cruciale pour la séparation des VO du télencéphale et que son activité pourrait dépendre d'autres signalisations.

VI-Restauration du comportement migratoire des cellules de la CNC dans les expériences de sauvetage

L'apparition des structures médianes dérivant de la CNC comme le septum nasal et la mâchoire supérieure indique que la CNC est capable de migrer antérieurement dans les expériences de sauvetage. Pour confirmer les changements dans le comportement migratoire des cellules de la CNC, nous avons étudié leur migration par immuno-histochimie en utilisant l'Ac anti-HNK1 ainsi que par hybridation in situ du gène *Slug*, spécifique de la CN, et nous avons constaté que le double sauvetage des signaux *Wnt1* et *Wnt2b* normalise la migration de la CNC (Fig.7 (b) ;A,N), de l'article I).

Afin de déterminer si cette amélioration est due à l'inactivation de *Wnt1* ou à l'expression de *Wnt2b* ou les deux ensembles, nous avons réalisé des immunomarquages à l'aide l'Ac anti-HNK1 au stade de 9HH, nous avons trouvé que seulement l'inactivation de la signalisation Wnt1 permet de restaurer la migration de la CNC et que *Wnt2b* n'a pas un effet précoce sur le comportement de la CNC.

Research article 1

(En préparation pour soumission)

THE CEPHALIC NEURAL CREST CONTROLS CELL POLARITY IN THE OPTIC STALK TO PREVENT CONGENITAL COLOBOMA AND CYCLOPIA

Soufien SGHARI, and Sophie E. CREUZET

NEURO-PSI / INSTITUT des NEUROSCIENCES PARIS-SACLAY

UMR 9197 CNRS / Université Paris-Saclay

CNRS - Délégation Ile-de-France Sud - 1, Avenue de la Terrasse - 91190 GIF-SUR-YVETTE,
FRANCE

Abstract

To reproduce the effects of CNC ablation in the chick embryo model, an injection of human Bmp7 protein was performed in the prechordal plate (Pcp) of 5ss (8HH) embryos. Morphological analysis of chick embryos showed that this Bmp7 heterochronic signaling in the Pcp perturbed CNC migration and caused fusion of the two OV, leading to cyclopia. Cyclopia was due to failure of dorsal OV evagination via apical constriction. Indeed incomplete apical constriction was associated with an altered expression and distribution of some actin-binding proteins involved in adherens junction and of the apico-basal nuclei distribution in the OV neuroepithelium, as evidenced by RT-qPCR and immunolabeling respectively. By combining *in situ* hybridization and RT-qPCR techniques, we detected an early disturbance of the expression of major genes implicated in morphogenesis, pre-patterning of prosencephalon and forebrain, and CNC migration in 9HH chick embryos. Besides, Bmp7 ectopic signaling upregulated *Wnt1* expression in CNC, which expanded rostrally, and hampered the rostral feature of prosencephalon. Rescue experiments by RNA interference against *Wnt1* partially restored cyclopic phenotype, but eyes were still incompletely separated. Another gene, *Wnt2b*, was downregulated by Bmp7 treatment in dorsal OV. Strikingly, following double rescue by RNA interference against *Wnt1* and *Wnt2b* expressing construct, the phenotype of the embryo was almost totally rescued, even though rostrally the eyes were still fused to telencephalon,

in association with a persistent downregulation of *Foxg1* expression, a telencephalon marker, in the rostral dorsal OV.

KEY WORDS: Cephalic neural crest, Cyclopia, Holoprosencephaly, RNAi, Electroporation, Chick

Introduction

The vertebrate eye is a sensory structure whose components have multiple embryological origins (Chow and Lang 2001, Fuhrmann 2010). A significant neuroepithelial contribution gives rise to neural and retinal pigmented epithelia, while the surface ectodermal (SE) contribution generates the lens and the corneal epithelium. Eye development proceeds through a series of events, including the specification and regionalization of the anterior neural plate (ANP), the evagination of the optic vesicle (OV) and the development of three distinct optical structures: the neural retina (Nr), optic stalk (OS) and the retinal pigmented epithelium (RPE). Upon contact with the OV (de Jongh et al. 2004, Furuta and Hogan 1998), the SE thickens and gives rise to the lens placode (LP). Thereafter, the OV and the LP undergo simultaneous invagination and undergo sophisticated organogenesis to become fully individualized from the diencephalic vesicle (Cepko et al. 1996, Harris 1997).

In addition, the ocular anlagen early benefit from a massive mesenchymal contribution chiefly made of cephalic neural crest (CNC) cells. At neurula stage, CNC cells (CNCCs) delaminating from the edges of the diencephalic and mesencephalic neural plate, migrate towards the OV and SE. Comprehensive

studies on the development of the CNC during the morphogenesis of the developing head (Creuzet 2009, Le Douarin et al. 2012) have documented and unraveled the contribution from the CNC to eye morphogenesis. CNCCs that at the origin of the periocular mesenchyme, make critical contributions to eye morphogenesis and organogenesis (Creuzet et al. 2005, Gage et al. 2005, Kish et al. 2011). Through its derivatives, which include the corneal endothelium, irideal muscles, ciliary body and muscles, Schlemm's canal, the CNC regulates the homeostasis of the anterior optic chamber. It also gives rise to the posteriorophtalmic pericytes, the sclera, choroid tendons and connective tissues of extra-ocular muscles, on the latero-posterior aspects of eyeballs. The absence or improper migration and differentiation of CNCCs to peri-ocular region have been implicated in severe human malformations and diseases, such as congenital glaucoma and anterior segment dysgenesis syndromes, Peter's and Axenfeld-Rieger's anomalies, aniridia, anterior chamber lack, coloboma, congenital lens disorganization, agenesis of eyelids and early strabismus (Alward 2000, Casteels 2005, Creuzet 2009, Ittner et al. 2005, Williams and Bohnsack 2015). Notably, it has been also shown that migrating CNCCs participate to the proper positioning of LP close to OV and their respective alignment by secretion of TGF- β which inhibits Pax6 signaling in the SE and by consequent inhibition of ectopic LP induction (Grocott et al. 2011). Reciprocally, the migration of CNCCs to peri-ocular region depends on eye chemotaxis. In *chokh* mutants, the dorso-anterior stream of NCCs migration is significantly reduced and severely disorganized (Ittner et al. 2005, Langenberg et al. 2008)

It has been previously demonstrated that the pre-chordal plate (Pcp) is a potent signaling center for eye morphogenesis. The lack of the Pcp or defective cognate signaling essentially results in a massive cell death at the ventral diencephalic midline hence leading to cyclopia (Chiang et al. 1996, Golden et al. 1999, Ohkubo et al. 2002). In this context, Bmp7 impinges on CNCCs migration at the level of the OS. The defective migration of CNCCs around the OS affects the cell polarity of OS epithelium, which normally undergoes an invagination leading to the shrinkage of the OS. When Bmp7 is up-regulated in the Pcp, the OS epithelium appears “everted” and such an “eversion” stems from a failure of apical constriction of OS cells. This phenotype ends up in a giant coloboma that eventually degenerates into a cyclopean condition. We show that these defects coincide with the loss of *Wnt1* expression in migrating CNCCs. To get insight into the functional significance of Wnt signaling for the polarity of OS epithelium, we performed rescue experiments based on *Wnt1* silencing in CNCCs, specifically. Under this condition, we have obtained a spectacular but partial restoration of the phenotype. Another gene to be modulated in migrating CNCCs after Bmp7 treatment was *Wnt2b*. Strikingly, when we challenged the double-rescue of Bmp7 treatment by transfecting CNCCs with *Wnt1* ARN interference plus *Wnt2b* expressing construct, a bilateral ocular phenotype was restored. Altogether, our experiments reveal that the migrating CNCCs exert a paracrine control of cell polarity in the presumptive OS. In this process, CNCCs operate through the production of Wnt molecules, which turn out to be critical for the apical constriction in OS, and, by the way, for the individualization of the optic field from the diencephalic territory.

Results

Bmp7 injection in Pcp reproduces CNC ablation

To reproduce the effects of CNC ablation (Creuzet 2009), we co-injected a solution of Bmp7 recombinant protein contrasted with neutral red in the Pcp of 5ss (8HH) embryos (n=302) (Fig.1 A-D). The site of injection was visualized by neutral red (Fig.1 B-D). After 24h of Bmp7 treatment, the embryo develops with two close OV's (Fig.1 F) regarding to the control (n=65, Fig.1E). At E8 the embryo undergoes a cyclopic phenotype with fused eyes into one central eye (n=55, Fig.1I,J). It develops without upper jaw and appearance of non functional nose, proboscis, under the cyclopic eye (Fig.1J,L arrows). Coronal sections with cresyl violet staining showed transformation of telencephalic vesicles to retinal pigmented epithelium (RPE) (n=11, Fig.1M,O) and more ventrally completely cyclopic eye (Fig.1 N,P).

Cyclopia is preceded by perturbations in the organization of the cephalic neuroepithelium and the dorsal OV apical constriction

To further investigate the mechanisms underlying the effects of Bmp7, we studied the impact of cell death using whole-mount staining with LysoTracker red (LTR) at 11HH (n=13, Fig.2. A-C) and 24h (E2) post-treatment with Bmp7 (n=12, Fig.2 D-I). We did not detect any increase of apoptosis at the ventral midline but

only in the anterior neural ridge (ANR) at 11HH (n=12, Fig2. B, C) and at E2 (n=13, Fig.2I arrow).

To understand the phenotype of cyclopia, we did some transverse sections at 12HH and surprisingly we observed that the dorsal OV undergoes in the control (n=21, Fig.1 Q,S, U,W) a dorso-ventral invagination in caudalo-rostral direction leading to shrinkage of optic stalk (OS). Nevertheless, the cyclopic embryo does'nt have this shrinkage and the eye are still fused to the neural tube rostrally and caudally giving rise to huge OS coloboma preceding cyclopia (, Fig.1 R,T,V,X asterisks).

We tried to verify wether failure of apical constriction, implicated in tissue morphogenesis (Martin and Goldstein 2014, Sawyer et al. 2010) is the cause of OV invagination defeat, to do this we did transverse sections at 12HH by immunolabeling of some actin binding proteins implicated in adherens junction (AJ) (Chen et al. 2012, Harris and Tepass 2010, Hartsock and Nelson 2008), crucial for apical constriction, like β -catenin (n=11, Fig3. A-F) and N-cadherin (n=11, Fig3. G-L) which showed a perturbed distribution in treated OV (Fig.3 D-F) and an apical accumulation in the control. We studied the distribution of F-actin, principal element of apical constriction, showing a complete disruption in the treated OV (n=12, Fig. 3 M-R).

Cell polarity is also disrupted in the treated OV by absence of Vangl2 staining (n=13, Fig.3 S-X), planar cell polarity (PCP) component, and also the apico-basal

distribution of nuclei in OV have shown a complete inversion in the proximal edges of OV in the treated embryos (Fig.3 i,ii ; P<0,01).

The study by RT-qPCR at 12HH (n= 15) showed misregulation of actin binding protein encoding genes essential for apical constriction (Martin and Goldstein 2014, Sawyer et al. 2010) like upregulation of *ABLIM1* (2,3 fold, P<0,001), *β-CATENIN* (1,3 fold, P<0,01), *N-cadherin* (2 fold, P< 0,001), *p120-CATENIN* (1,45 fold, P<0,001) and downregulation of *ROCK1* (60%, P<0,001), *RhoA* (65%, P< 0,001) and *MYH9* (65%, P<0,001). Other genes implicated in PCP essential in morphogenesis (Merte et al. 2010, Murdoch et al. 2014) like *CELSR1* (1,15 fold, P<0,05), *VANGL2* (1,15 fold, P<0,05), *SEC24B* (1,55, P<0,01). Cell communication markers (Krupke and Burke 2014, Schwanbeck 2015, Wu et al. 2013) are misregulated also like *EFNB1* (2,2 fold, P<0,001), *IGF2* (2,6 fold, P<0,001), *NOTCH1* (1,5 fold, P<0,001) and *NOTCH2* (4,6 fold, P<0,001) (Fig4, ii).

These data demonstrate that Bmp7 treatment disturbed the expression of genes essential for cell communication and polarity and by consequent genes implicated in apical constriction. The question arises whether failure of OV dorsal invagination is due to early disruption of forebrain regionalization markers.

Bmp7 treatment disturbs early the patterning of the prosencephalon

To investigate the impact of Bmp7 treatment in the patterning of the prosencephalon, we studied by in situ hybridization the expression of *Foxg1*, telencephalon marker (Chapman et al. 2002, Martynoga et al. 2005, Xuan et al. 1995), which is downregulated at 9HH (2-3h) post-treatment (n=12, Fig.4 A,B). The second gene is *Pax6*, diencephalic marker at 9HH (Osumi et al. 2008, Walther and Gruss 1991), which is expanded anteriorly(n=11, Fig.4 C,D) at the expense of *Foxg1* expression (Fig.4 E,F).

At 12HH (15h post treatment) coronal sections proved that *Foxg1* is expressed in the future telencephalon but also in the dorsal OV in the control. However we did not detect any transcript neither in the future telencephalon nor in the dorsal OV after Bmp7 treatment (n=10, Fig.4K-N). *Pax6* has shown an apical distribution in the apical side of OV in the control and a complete disruption in the treated embryos (n=9, Fig.4 O-R).

We studied other early morphogenes at 9HH like *Otx2*, essential to prosencephalon development in this stage (Acampora et al. 1998, Plouhinec et al. 2005), and we found an absence of transcripts in the rostral half of the prosencephalon (n=13, Fig.4 G,H). *Shh* is also downregulated at 9HH (n=11, Fig.4 I,J). At 12HH, *Otx2* has shown an absence of transcripts in the distal edges of OV (n=9, Arrow, Fig.4 S,T), *Shh* downregulation persists (n=8, Fig.4 U,V). *Mitf*, an RPE

marker (Tsukiji et al. 2009) , is ectopically expressed in the future telencephalon (n=10, Fig.4 W,X).

Six3 hybridization has shown a steady expression of *Six3*, essential to forebrain development (Lagutin et al. 2003) in the OV but also in the ventral midline to confirm that there is no cell death in this side after treatment (n=12, Fig.4 Y-Z').

RT-qPCR analysis have shown at 9HH (n=25) misregulation of essential regionalization genes. *Bmp7* treatment upregulates *PAX6* (1,4 fold, P<0,001), *BMP4* (1,15 fold, P=0,04) and *WNT1* (2,8 fold, P<0,001). In the other hand it downregulates *SHH* (30%, P<0,001), *FOXP1* (60%, P<0,001) (Fig.4,i). Exogenous *Bmp7* injection did not change its endogenous expression (Fig.4i, P=0,9).

At 12HH RT-qPCR (n=15) analysis have shown upregulation of *PAX6* (2 fold, P<0,001), *MITF* (2 fold, P<0,01) and downregulation of *WNT2B* (45%, P<0,001), *SHH* (35%, P<0,01), *FOXP1* (60%, P<0,001) and *OTX2* (25%, P<0,01). These results demonstrate that *Bmp7* treatment perturbed forebrain regionalization very early and by consequent failure of OV separation from the diencephalon. It remains to study wether CNC migration is also hampered.

Excess of Bmp7 in Pcp induced alterations of cell migratory behavior of the CNC

Bmp7 treatment has also increased cell death in the mesenchymal cells encircling the eye (n=12, Asterisk, Fig.2,H) which corresponds to CNC and also a decrease in proliferation of the same population (n=14, Fig2.J-K) compared to

the control (Fig.2 E and Fig.2 L-N respectively) which suggest that Bmp7 injection in Pcp could affect CNC migration. We decided to study CNC behaviour after Bmp7 injection in Pcp by immunohistochemistry with HNK1. In the control CNC started to migrate anterolaterally at 9HH (n=42, Fig.5 A) and it began to surround the OV at 10HH (n=21, Fig.5 B, arrow in fig.5, K) and at 12HH the OVs were surrounded dorsoventrally by CNC (n=36, Fig.5E,G,P). In the treated embryo, CNC failed to migrate anterolaterally at 9HH (n=35, Fig.5B) and 10HH (n=17, Fig.5 D, arrow in fig.5, N) and to surround OVs at 12HH (n=27, asterisks, Fig.5 F,H,S).

The in situ hybridization has shown downregulation of *Slug*, specific marker of neural crest (NC) (Meulemans and Bronner-Fraser 2004), at 9HH (n=12, Fig.5 V) and 12HH (n=10, red asterisk, Fig.5 X). We studied with RT-qPCR some genes implicated in delamination and migration of CNC (Bronner-Fraser et al. 1992, Mayor and Theveneau 2013, Theveneau and Mayor 2012, Tucker 2004), *LAM1* (30%, P<0,001), *IINTEGA4* (35%, P<0,001), *ADAM33* (30%, P<0,001), *MMP2* (20%, P<0,001) which were all downregulated at 9HH (Fig.5 Y). These data confirm that Bmp7 treatment affects delamination and migration of CNC. The question arises whether Bmp7 treatment misregulates dorsal genes implicated in failure of CNC migration and probably OV separation.

Analysis of the role of Wnt1 signaling in eye and cephalic development

To further investigate failure of CNC migration, we decided to study *Wnt1* expression, essential gene for specification and migration of CNC (Milet and Monsoro-Burq 2012) and that its increased levels are associated with inhibition of NC migration (de Melker et al. 2004), in the dorsal neural tube after Bmp7 treatment. 1h30 after, we observed a slight upregulation of *Wnt1* (n=15, Fig.6B,D) and at 11HH we observed an ectopic transcripts rostrally (n=17, Fig.6F) compared to the control (Fig.6E). RT-qPCR analysis have shown at 9HH an upregulation of *Wnt1* (2,8 fold, P<0,001) relating to the control (Fig.6i).

To verify whether *Wnt1* misregulation could be responsible of cyclopic phenotype, we tried to rescue the phenotype by injection of Bmp7 in the Pcp and silencing *Wnt1* expression in the dorsal neural tube by bilateral co-electroporation of CNC at 5ss with double strand RNA molecules designed against chick *Wnt1* (*dsWnt1*) with *GFP* construct. At 12HH, CNC have migrated laterally, but telencephalic neural tube is devoid of GFP labeling (n=120, Fig.6 G-I). In situ hybridizations have shown downregulation of *Wnt1* following the rescue experiment (n=11, Fig.6J,K) and also by RT-qPCR (60%, P<0,001).

Morphologically, the rescued embryos differed from the cyclopic phenotype since E2 by a slight separated OV by telencephalic pit (n=18, Fig.6L, arrow M). Strikingly at E4,5 the two telencephalic vesicles were rescued (n=42, Fig.6 N,O), they became evident at E6 (n=26) and E8 (n=30) respectively (Fig.6 P-S). The eyes were separated but were in hypotelorism (Arrows, Fig.6 O). At E8 (n=13) coronal sections stained with cresyl violet have shown rescued telencephalic vesicles (Fig.6T) but the eyes were synophthalmics and fused to

telencephalon (Arrow, Fig.6 U) with absence of inter-orbital septum (Fig.6 V). More ventrally the lenses developed correctly but the two eyes were completely disorganised (Fig.6W). At E9, we observed that the upper jaw is rescued (Fig.6 Z) relating to cyclopic embryos (Fig.6X) but it was distorted (Arrow, Fig.-Z).

RT-qPCR analysis at 12HH (n=10) have shown recovering of expression of some transcription factors like *PAX6* (P=0,37), *MITF* (P=0,55) and *OTX2* (P=0,07) and other cell communications genes like *EFNB1* (P=0,67), *IGF2* (P=0,15), *Notch1* (P=0,25) and *NOTCH2* (P=0,21). Only *CELSR1*, PCP gene, retained its expression after ds*Wnt1* rescue (P=0,056). Actin binding protein encoding genes like *ABLIM1* (P=0,11) and β -*CATENIN* (P=0,13) retained also their expressions (Fig.6 ii). These results demonstrate that *Wnt1* misregulation is implicated in cyclopic phenotype but it is not the only responsible.

***Wnt2b* rescue improves almost of the cyclopic phenotype**

RT-qPCR analysis have shown downregulation of *Wnt2b* expression after Bmp7 treatment (Fig.4i) and this downregulation persisted despite ds*Wnt1* rescue (Fig.9 iii). *Wnt2b* play an essential role in lens placode placement (Grocott et al. 2011) in the surface ectoderm (SE) and also expressed in the dorsal OV and participate to specification of the RPE (Steinfeld et al. 2013) To test whether it could play a role in cyclopic phenotype, we observed its expression at 9HH and we found that this gene in the control was expressed in the dorsal neural tube at the diencephalic territory but also in the dorsal SE and migrating CNC (n=12,

Fig.7a; A,C,L). In the treated embryo, *Wnt2b* transcripts were disappeared from both dorsal neural tube and CNC (n=12, Fig.7a; C,D) while maintaining its expression in the SE (Fig.7a; D, O) and anterior intestinal portal (AIP) (Fig.7a; E,F). At 12HH, *Wnt2b* is expressed in the control in both SE and neural tube (n=15, Fig.7a; G) but surprisingly we detected apical transcripts of *Wnt2b* in the neural tube and especially in the apical side of OV's epithelia (Fig.7a; I,R). This demonstrates that Bmp7 treatment has downregulated *Wnt2b* expression in apical side of neural tube and OV's epithelia with no effect in the SE (Fig.7a; H,J,U).

We examined whether p*Wnt2b* rescue together with ds*Wnt1* (n=256) could improve eye organogenesis besides to telencephalic vesicle which were restored by ds*Wnt1* rescue alone. We collected embryos at E4,5 and we observed that the telencephalic vesicles were restored (n=38, asterisk, Fig.8 I) but the eyes seem to be restored with evident optic cup (Fig.8 D) resembling to the control (Fig.8 A,F) compared to ds*Wnt1* rescue (Fig.8 C,H) and Bmp7 treated embryo (Fig.8 B,G).

At E8 embryo looks like normal (n=31, Fig.8 E,J) but when we did coronal sections we observed that dorsally the two hemispheres are partially separated (n=19, Fig.8 K) and ventrally we observed that eyes and telencephalon were still fused with no formation of third ventricle (Fig.8 L,O) which resemble to corpus callosum Agensis diseases (Chiappedi and Bejor 2010) In the diencephalic level the two eyes were synophthalmic with absence of inter-orbital septum resembling also to septo-optic dysplasia (Chiappedi and Bejor 2010) The fibers of the optic nerve developed but they were disorganized which suggests that neural retina

organogenesis has occurred but their migration to chiasmatic level were disrupted. More ventrally the two eyes were completely separated by the nasal septum (Fig.8 N,P).

Clarification and alcian blue staining have shown that in the *dsWnt1* rescue the choroid fissure was still unclosed (n=11, asterisk, Fig.8 S) and the eyes did not constrict dorsally and still fused to the telencephalon (asterisk, Fig.8 T) compared to the control (Fig.8 Q,R). The double rescue improved partially the closure of the choroid fissure (n=15, asterisks, Fig.8 U,X)but the eyes were still fused to the telencephalon dorsally (Asterisk, Fig.8. V).

These observations demonstrate that *Wnt2b* rescue concurs in separating OV rostrally from the rest of the diencephalon.

CNC migration is improved early by only *dsWnt1* rescue

In *dsWnt1* rescue, we observed appearance of structures which derive from CNC like the upper jaw and in the double rescue we observed restoration of the nasal septum which suggests that CNC migration was restored in rescue experiments. To confirm this, we studied the effect of double rescue in CNC migration and we found improvement in HNK1 staining(Fig.7b; (A-F)) and also *slug* expression (n=14, Arrow, Fig.7b; H).To investigate whether *dsWnt1* or *pWnt2b* is responsible for CNC migration or both of them, we studied separately the effects of *dsWnt1* and *pWnt2b* rescues in CNC migration and we found that early after treatment at 9HH only *dsWnt1*(n=12, Fig.7b; (L-N))improved CNC migration regarding to *pWnt2b* (n=15, Fig.7b; (I-K)).

In the other hand we found also that when we electroperated *pWnt2b-GFP* either in OV (n=25, Fig.7b; Q) or both in CNC and OV (n=36, Fig.7b; P), the embryo has shown a rescued morphology at E2 with almost closed OC ventrally (Arrow, Fig.7b; O). Nevertheless, electroperation of only CNC (n=31, Fig.7b; S) did not improve the morphology at E2 with OC fused to the neural tube ventrally (Arrow, Fig.7b; R). This suggests that *Wnt2b* acts only in the dorsal OV and did not have an early effect on CNC migration.

Regionalization factors are restored in double rescue

To further understand how *dsWnt1+pWnt2b* rescue restored the cyclopic phenotype, we studied at 9HH and 12HH by in situ hybridization the expression of *Otx2* which retained much of its level (n=14, Fig.9C, F) and we did not detect ectopic expression of *Mitf* at 12HH (n=13, Fig.9L) compared to *Bmp7* treated embryo (Arrow, Fig.9K).

We studied by immunohistochemistry of F-actin and *Vangl2* which retained their apical distribution in the double rescue (n=9, Fig.9 M-R) and (n=11, Fig.9 S-X) respectively. Apico-basal distribution of nuclei in the OVs were restored (n=12, P=0,19) demonstrating that *Wnt2b* plays an important role in maintaining cell polarity and apical constriction in OVs.

RT-qPCR analysis (n=10, Fig.9 iii) have shown improvement of the expression of genes of interest in the double rescue compared to *dsWnt1* rescue respectively like *N-CADHERIN* (P=0,75, P<0,001), *RhoA* (P=0,13, P<0,001), *SHH* (P=0,16, P<0,05) and *WNT2B* (P=0,11, P<0,01).

We observed also partial amelioration of *p120-CATENIN* ($P < 0,01$), *ROCK1* ($P < 0,001$) and *MYH9* ($P < 0,01$) and that the double rescue restored *FOXP1* expression in the future telencephalon but its expression in the dorsal OV was not retained ($n=15$, Fig.9I) as demonstrated by RT-qPCR ($P < 0,01$)) which suggest that these genes could play essential role in the separation of OV from the telencephalon. This data demonstrate that *Wnt2b* is the second candidate, together with *Wnt1*, responsible for cyclopic phenotype and *Foxg1* may play an important role in separating rostral part of OV from the future telencephalon.

DISCUSSIONS

Our work reproduces the effects of CNC ablation early in development (4ss) (Creuzet 2009) and that increase in *Bmp7* signaling in *Pcp* reveals that this latter exerts an opposite signaling to CNC in forebrain development.

Previous studies have shown that cyclopia in *Shh* mutant mice is associated with cell death in rostral ventral midline (VM), hypothalamus precursors, (Chiang et al. 1996) causing unseparation of OVs ventrally and appearance of cyclopia. Other teams have shown in chick that *Bmp 5* treatment in neural tube lumen at prosencephalic level at 12HH causes also cell death in the VM and cyclopia. They explained this by pro-apoptotic feature of *Bmp* signaling (Golden et al. 1999). Nevertheless Ohkubo team (Ohkubo et al. 2002) has shown in chick that *Bmp4* treatment in the dorsal neural tube of the prosencephalon at 10HH downregulate *Shh* and *Foxg1* signaling in the VM and future telencephalon respectively between 6 and 9h and that cell death was detected 12h after treatment which suggest that *Bmp* signaling in this case did not act as apoptotic

factor and they explained that Bmp has a role in regionalization of the forebrain by suppression of most prosencephalic characteristics, except RPE because Bmp4 expression is essential in RPE specification.

Morphology of Bmp4 treated embryos resembles to our Bmp7 treatment, but in our study we didn't detect any cell death neither in the VM nor in OV's but only in CNC and in the anterior neural ridge (ANR) 24h after treatment. This suggests that increase of Bmp7 signaling in Pcp hampers CNC migration to developing OV at 12HH and perturbs their dorsal invagination leading to huge optic stalk (OS) preceding cyclopia.

In Vertebrates it has been shown that planar cell polarity (PCP) is co-opted to regulate « convergent extension » responsible for forebrain morphogenesis by a process called apical constriction (Chu et al. 2013 , Itoh et al. 2014) and also adherens junction (Harris and Tepass 2010) Disruption of these process leads to neural tube defects and improper regionalization of forebrain (Murdoch et al. 2014, Ueno and Greene 2003). Here we observed that Bmp7 treatment is associated with F-actin, N-cadherin, Vangl2 and β -catenin disruptions in the apical side of OV. We observed also that nuclei distribution in the proximal edges of dorsal OV is completely everted which explain its deformation in transverse sections.

It has been shown that Wnt signaling undergoes a rostro-caudal gradient to allow caudal diencephalon development (Nordstrom et al. 2002 Jun, Shariatmadari et al. 2005, Yamaguchi 2001) . In our study we observed increase

in *Wnt1* signaling in CNC just before their delamination and it expanded rostrally at 10HH. This increase is associated with misregulation of *Shh*, *Otx2*, *Foxg1* but also expansion of *Pax6* expression rostrally which suggests that *Bmp7* treatment has a caudalizing effect on forebrain and this effect could be carried out by *Wnt1*. To test this hypothesis we performed rescue experiments by treating embryos with *Bmp7* and *ARN* interference to inactivate *Wnt1* signaling. Morphologically we observed restoration of cephalic phenotype with appearance of telencephalic vesicles at E4,5-E5. We observed improvement of *Pax6*, *Otx2* and *Mitf* expression after *Wnt1* inactivation. Rostrally The eyes are synophthalmics and fused to the telencephalon at the rostral diencephalon/telencephalon (RD/T) boundary resembling to human Rett syndrome (Olson et al. 2015) and corpus callosum agenesis (Chiappedi and Bejor 2010). Ventrally the eyes are separated but very disorganized with no identifiable optic nerve due probably to unclosure of choroid fissure. The rescue didn't restore expression of *Wnt2b*, *Foxg1*, *N-cadherin* and apical constriction trio (*RhoA*, *ROCK1*, *Myh9*) suggesting that *Wnt1* inactivation restored only caudal OV with no effect in the rostral OV and RD/T boundary.

Wnt2b drew our attention by its implication in eye development (Grocott et al. 2011, Steinfeld et al. 2013) In our study, its expression is detected in apical side of OV at 12HH which still unchanged with *dsWnt1* rescue. We tended to double rescue the phenotype with *ARN* interference against *Wnt1* and *Wnt2b* expressing vector associated to *Bmp7* treatment, surprisingly embryo develops normal phenotype. The double rescue improved PCP protein Vangl2, F-actin

accumulation in the apical OV and also improvement in *ROCK1-Rho1-Myh9* expressions which suggests that *Wnt2b* could act in OV invagination by regulating cell polarity and apical constriction. Coronal sections have shown that ventrally the eyes are separated by nasal septum and optic nerves are restored but they still disorganized. More dorsally the eyes are still fused to telencephalon in RD/T boundary associated with absence of intr-orbital septum and persistence in *Foxg1* downregulation in this region of embryo. This suggests that *Foxg1* could act independently of *Wnt1* and *Wnt2b* in the separation of the OV from the telencephalon. To test this hypothesis we performed an experiment to silence *Wnt2b* in OV and overexpressing *Wnt1* in the future CNC. Surprisingly, the embryo developed cyclopia but it differed from *Bmp7* phenotype by appearance of proboscis above the eyes (supplementary fig.1). Coronal sections have shown that eyes are fused ventrally and telencephalon is completely separated from OVs in the RD/T boundary but is holoprosencephalic, undivided into two hemispheres. This treatment is associated with downregulation of *Otx2* at 9HH and disruption of F-actin distribution in the OVs responsible for posteriorization of forebrain and OV apical constriction disruption respectively.

Together our data put forward a scenario whereby early heterochronic *Bmp7* treatment in *Pcp* upregulates in the caudal diencephalon *Wnt1* signaling in the future CNC, This inhibits their migration and directly/indirectly misregulates *Pax6*, *Otx2* and *Mitf* expressions. *Bmp7* treatment downregulates also *Wnt2b* signaling in OV in the rostral diencephalon and, by consequent, it

inhibits apical constriction and separation of OV from the neural tube. This latter hampers probably attraction of CNC to OV side where they contribute to *Wnt2b* stabilization by opposing to *Pcp* signaling. *Bmp7* downregulated also *Foxg1* in the ANR, future telencephalon, but also in the RD/T boundary where its expression was not retained in the double rescue despite CNC migration. It remains to test later whether persistence of downregulation of *Foxg1* expression in the RD/T boundary was caused by change in polarity of CNC despite improvement of their migration or its local expression may depend on other molecules. It remains to verify in the future also whether *Wnt1* inactivation, by improving CNC migration, restores regionalization marker *Pax6*, *Mitf* and *Otx2* directly or by the means of CNCCs.

MATERIALS AND METHODS

Avian embryos and surgical procedures

Chick embryos were used as a model throughout this study and staged according to the number of somite pairs (ss). Depending on the series, experiments were performed at 5ss for in ovo electroporation and protein injections.

Injection of *Bmp7* recombinant protein solutions

A solution of *Bmp7* protein in PBS (0.6 µg/µl; R&D Systems) was injected in the prechordal plate (*Pcp*) cells at 5ss. To visualize the site of protein injection, the

solution was contrasted with 0.01% Fast Green FCF (Sigma). This concentration has been shown to be efficient.

In ovo electroporation

The electroporation was used to deliver exogenous nucleic sequences to premigratory CNC cells. The electroporation was achieved using a triple electrode system that was placed on the vitelline membrane: the two anodes flanking the developing head with a gap of 5 mm, the cathode facing the anterior neuropore (Creuzet et al. 2002). Exogenous nucleic sequences were headed for the targeted tissues by a series of five 27V square pulses (T830 BTX, Genetronics, CA). After electroporation, eggs were sealed and incubated at 38°C until reaching the stage required for analysis. Before electroporation, nucleic acids were contrasted with a solution of 0.01% Fast Green FCF (Sigma) to carefully control the site of injection depending on the experimental series.

Nucleic acid preparation

For loss-of-function experiments, sense and antisense strands of RNA were synthesized from the full length cDNA encoding for the targeted genes. After elimination of the cDNA template, strands of RNA were annealed for 5 minutes at 95°C and then purified (Pekarik et al. 2003). According to this protocol, dsRNA designed from the cDNA encoding Wnt1 (Hollyday et al. 1995) and Wnt2b (Hyer et al.,1996) were obtained and used at the following concentrations: ds *Wnt1*, 0.4

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ds*Wnt2b*, 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Gain of- function experiments were carried out by using the plasmidic constructs: pCAGGS-GFP ([Momose et al. 1999](#)), pCAGGS-GFP-Wnt2b (Imagif, France) and pCAGGS-GFP-Wnt1 (Imagif, France) used all at 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

In Situ Hybridization of Whole Chick Embryos

Following the developmental stage nomenclature of Hamburger and Hamilton (1951), embryos were separated from the yolk and albumen under saline, then fixed in 4% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) at room temperature for 2 h or overnight. After fixation, embryos hybridized with digoxigenin-tagged riboprobes. Whole-mount in situ hybridizations was performed as previously described ([Creuzet et al. 2006](#)). Gene expression was analyzed during chick development using the following probes: Bmp7, Fgf8 ([Crossley and Martin 1995](#)), Foxg1 ([Li and Vogt 1993](#)), Pax6 ([Walther and Gruss 1991](#)), Shh ([Riddle et al. 1993](#)), Wnt1, Wnt3a ([Hollyday et al. 1995](#)) and Wnt2b kindly provided by Dr. Hyer ([Hyer et al.,1996](#)).

RNA extraction and qRT-PCR assay

Total RNA from 9HH (n=25) and 12HH (n=15) stage embryos heads was extracted using RNeasy Plus Mini kit from machery-Nagel. 2 μg of total RNA was reverse transcribed with oligo-dT primers using Reverse Transcriptase (MMLV reverse transcriptase (PROMEGA, Madison, Wi USA) following the manufacturer's instructions.

Primers were customized to be specific for each mRNA species and synthesized by Invitrogen. Quantitative PCR reactions were performed using LightCycler® carousel-based system (Roche). ([Supplementary information Table1](#)).

The equivalent of 10 ng of cDNAs was used per gene as template for qPCR reactions with LightCycler® FastStart. DNA Master SYBR GreenI (Roche, Version 15.0) as recommended by the manufacturer. Each biological sample was subjected to the assay in triplicates per gene. Ct values were obtained by using promega software (v.2.0.4) and Relative fold variations were calculated using the relative quantification ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) determine relative gene expression levels across multiple samples and the *Gapdh* gene was selected to normalize in order to obtain relative mRNA amount quantifications of each studied gene. A negative control was routinely used omitting mRNA from the Reverse Transcription reaction mixture.

Values are expressed as means±SEM (standard error of the mean). Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism5.04 assuming a confidence interval of 95%. Data collected for all the independent observations were compared using the non parametric significance test of Mann–Whitney U ($*\leq 0.05$, $**\leq 0.01$ and $***\leq 0.001$). The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to analyze the relative changes in gene expression

Cell death detection

The major sites of cell death were evidenced on whole-mount embryos using Lysotracker staining (Molecular probes). The embryos were dissected and incubated in a 2.5 μ M Lysotracker solution for 15 min in RT, prior to fixation in 4% formaldehyde.

Immunohistochemistry

After fixation, embryos were embedded in agarose 3% and then sectioned with vibratome to obtain 25 micron thick sections which are mounted in a glass slide and placed on a 37°C heating block overnight to evaporate water and permit the attachment of the tissue to the slide.

Sections were collected and processed for immunohistochemistry by blocking in PBS:1% bovine serum albumin for 1 h and incubating in primary antibody overnight and then secondary antibody for 2 h at the indicated dilutions into the blocking solution and finally mounting in DAPI (4',6- diamidino-2-phenylindole) containing mounting medium Vectashield (Vector laboratories,Inc.). Primary antibodies used were rabbit anti-PH3 (Sigma Aldrich), rabbit anti-Vangl2 (Santa Cruz), mouse anti-HNK1 (Santa Cruz biotechnology), mouse Anti- β catenin (DSHB), mouse IgG2B anti-Wnt2b (Santa Cruz biotechnology) and mouse IgG1 anti-N-cadherin (DSHB) diluted to 1:100, 1:100, 1:200, 1:200, 1:200, 1:200, respectively. Antibody labeling was visualized using complimentary secondary

antibodies conjugated with either Alexa488 or 594 (Molecular Probes), diluted to 1:500. To label F-actin, we used Phalloidin conjugated to 594 nm fluorochrome.

Fluorescence labeling was monitored with Fluorescence microscope (LEICA DM5500B), acquisitions were done with AF6000 Modular system software (LAS AF version: 3.1.0 build 8587). Finally, all the images were analyzed with Adobe® Photoshop® CS and the quantification of nuclei distribution was performed with ImageJ 1.48V (National Institute of Health).

Histology

Whole aged Embryos (from E8) were fixed in a solution of 80% ethanol, 20% acetic acid and 0,015% of alcian blue to stain cartilage followed by 0,01% of Alizarine red to stain bones. KOH was added to clarify embryos. Dehydrated embryos were briefly washed twice in toluene and incubated overnight in embedding mold containing fresh paraffin at 60°C for 1 hr.

Embryos were serially sectioned into ribbons 7 µm thick and arranged as rows on a glass slide. The slide was then placed on a 37°C heating block overnight to remove wrinkles and firmly attach the tissue to the slide. Sections were stained whether with Eosin and hemotoxylin or Cresyl violet solutions.

Acknowledgements

The authors thank Dr Hyer for kindly providing *Wnt2b* constructs. They also thank Drs Chapman, Kiecker, Lough and Widelitz for providing plasmids.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

S.G. performed experiments and data analysis, and prepared the manuscript; S.C. developed concepts and approaches, performed experiments and data analysis, and prepared the manuscript.

Funding

S.G. received fellowships from Fondation Berthe Fouassier - Fondation de France and Société Française d'ophtalmologie. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and grant from the Fondation pour le Recherche Médicale (FRM-VisualSystem).

References

- Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Briata P, Corte G, et al. (1998) Visceral endoderm-restricted translation of *Otx1* mediates recovery of *Otx2* requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation. *Development* 125: 5091-5104.
- Alward WLM (2000) Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. *American journal of ophthalmology* 130: 107-115.
- Bronner-Fraser M, Wolf JJ, Murray BA (1992) Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. *Developmental Biology* 153: 291-301.
- Casteels ID, K. (2005) Unilateral Peters' anomaly in a patient with DiGeorge syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 42(5):311-3.

- Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D (1996) Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 589-595.
- Chapman SC, Schubert FR, Schoenwolf GC, Lumsden A (2002) Analysis of Spatial and Temporal Gene Expression Patterns in Blastula and Gastrula Stage Chick Embryos. *Developmental Biology* 245: 187-199.
- Chen S, Lewis B Fau - Moran A, Moran A Fau - Xie T, Xie T (2012) Cadherin-mediated cell adhesion is critical for the closing of the mouse optic fissure. *PLoS One* 7(12).
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, et al. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383: 407-413.
- Chiappedi M, Bejor M (2010) Corpus callosum agenesis and rehabilitative treatment. *Italian Journal of Pediatrics* 36: 64-64.
- Chow RL, Lang RA (2001) Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 255-296.
- Chu CW, Gerstenzang E Fau - Ossipova O, Ossipova O Fau - Sokol SY, Sokol SY (2013) Lulu regulates Shroom-induced apical constriction during neural tube closure. *PLoS One* 8(11):e81854. doi: 10.1371.
- Creuzet S, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM (2002) Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development* 129: 4301-4313.
- Creuzet S, Vincent C Fau - Couly G, Couly G (2005) Neural crest derivatives in ocular and periocular structures. *Int J Dev Biol* 49: 161-171.
- Creuzet SE (2009) Regulation of pre-otic brain development by the cephalic neural crest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 15774-15779.
- Creuzet SE, Martinez S, Le Douarin NM (2006) The cephalic neural crest exerts a critical effect on forebrain and midbrain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 14033-14038.
- Crossley PH, Martin GR (1995) The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121: 439-451.
- de Iongh RU, Chen Y Fau - Kokkinos MI, Kokkinos Mi Fau - McAvoy JW, McAvoy JW (2004) BMP and activin receptor expression in lens development. *Mol Vis* 10: 566-576.

- de Melker AA, Desban N, Duband J-L (2004) Cellular localization and signaling activity of β -catenin in migrating neural crest cells. *Developmental Dynamics* 230: 708-726.
- Fuhrmann S (2010) Chapter Three - Eye Morphogenesis and Patterning of the Optic Vesicle. In: Ross LC, Thomas AR, editors. *Current Topics in Developmental Biology*: Academic Press. pp. 61-84.
- Furuta Y, Hogan BLM (1998) BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes & Development* 12: 3764-3775.
- Golden JA, Bracilovic A, McFadden KA, Beesley JS, Rubenstein JLR, et al. (1999) Ectopic bone morphogenetic proteins 5 and 4 in the chicken forebrain lead to cyclopia and holoprosencephaly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 2439-2444.
- Grocott T, Johnson S, Bailey AP, Streit A (2011) Neural crest cells organize the eye via TGF- β and canonical Wnt signalling. *Nat Commun* 2: 265.
- Harris TJC, Tepass U (2010) Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 502-514.
- Harris WA (1997) Cellular diversification in the vertebrate retina. *Current Opinion in Genetics & Development* 7: 651-658.
- Hartsock A, Nelson WJ (2008) Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* 1778: 660-669.
- Hollyday M, McMahon JA, McMahon AP (1995) Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mechanisms of Development* 52: 9-25.
- Itoh K, Ossipova O, Sokol SY (2014) GEF-H1 functions in apical constriction and cell intercalations and is essential for vertebrate neural tube closure. *Journal of Cell Science* 127: 2542-2553.
- Ittner LM, Wurdak H, Schwerdtfeger K, Kunz T, Ille F, et al. (2005) Compound developmental eye disorders following inactivation of TGF β signaling in neural-crest stem cells. *Journal of Biology* 4: 11-11.
- Kish PE, Bohnsack BL, Gallina DD, Kasprick DS, Kahana A (2011) The eye as an organizer of craniofacial development. *Genesis (New York, NY : 2000)* 49: 222-230.
- Krupke OA, Burke RD (2014) Eph-Ephrin signaling and focal adhesion kinase regulate actomyosin-dependent apical constriction of ciliary band cells. *Development* 141: 1075-1084.

- Lagutin OV, Zhu CC, Kobayashi D, Topczewski J, Shimamura K, et al. (2003) Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes & Development* 17: 368-379.
- Langenberg T, Kahana A, Wszalek JA, Halloran MC (2008) The Eye Organizes Neural Crest Cell Migration. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237: 1645-1652.
- Le Douarin NM, Couly G, Creuzet SE (2012) The neural crest is a powerful regulator of pre-otic brain development. *Developmental Biology* 366: 74-82.
- Li J, Vogt PK (1993) The retroviral oncogene qin belongs to the transcription factor family that includes the homeotic gene fork head. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 4490-4494.
- Manuel M, Martynoga B, Yu T, West JD, Mason JO, et al. (2010) The transcription factor Foxg1 regulates the competence of telencephalic cells to adopt subpallial fates in mice. *Development (Cambridge, England)* 137: 487-497.
- Martin AC, Goldstein B (2014) Apical constriction: themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* 141: 1987-1998.
- Martynoga B, Morrison H, Price DJ, Mason JO (2005) Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Developmental Biology* 283: 113-127.
- Mayor R, Theveneau E (2013) The neural crest. *Development* 140: 2247-2251.
- Merte J, Jensen D, Wright K, Sarsfield S, Wang Y, et al. (2010) Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure. *Nature cell biology* 12: 41-48.
- Meulemans D, Bronner-Fraser M (2004) Gene-Regulatory Interactions in Neural Crest Evolution and Development. *Developmental Cell* 7: 291-299.
- Milet C, Monsoro-Burq AH (2012) Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Developmental Biology* 366: 22-33.
- Momose T, Tonegawa A, Takeuchi J, Ogawa H, Umesono K, et al. (1999) Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Development, Growth & Differentiation* 41: 335-344.

- Murdoch JN, Damrau C, Paudyal A, Bogani D, Wells S, et al. (2014) Genetic interactions between planar cell polarity genes cause diverse neural tube defects in mice. *Disease Models & Mechanisms* 7: 1153-1163.
- Nordstrom U, Jessell Tm Fau - Edlund T, Edlund T (2002) Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nat Neurosci* ;5(6): :525-532.
- Ohkubo Y, Chiang C, Rubenstein JLR (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.
- Olson HE, Tambunan D, LaCoursiere C, Goldenberg M, Pinsky R, et al. (2015) Mutations in epilepsy and intellectual disability genes in patients with features of Rett syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*: n/a-n/a.
- Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M (2008) Concise Review: Pax6 Transcription Factor Contributes to both Embryonic and Adult Neurogenesis as a Multifunctional Regulator. *STEM CELLS* 26: 1663-1672.
- Pekarik V, Bourikas D, Miglino N, Joset P, Preiswerk S, et al. (2003) Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat Biotech* 21: 93-96.
- Plouhinec JL, Leconte L, Sauka-Spengler T, Bovolenta P, Mazan S, et al. (2005) Comparative analysis of gnathostome Otx gene expression patterns in the developing eye: implications for the functional evolution of the multigene family. *Developmental Biology* 278: 560-575.
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-1416.
- Sawyer JM, Harrell JR, Shemer G, Sullivan-Brown J, Roh-Johnson M, et al. (2010) Apical constriction: A cell shape change that can drive morphogenesis. *Developmental Biology* 341: 5-19.
- Schwanbeck R (2015) The Role of Epigenetic Mechanisms in Notch Signaling During Development. *Journal of Cellular Physiology* 230: 969-981.
- Shariatmadari M, Peyronnet J, Papachristou P, Horn Z, Sousa KM, et al. (2005) Increased Wnt levels in the neural tube impair the function of adherens junctions during neurulation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 30: 437-451.

- Steinfeld J, Steinfeld I, Coronato N, Hampel M-L, Layer PG, et al. (2013) RPE specification in the chick is mediated by surface ectoderm-derived BMP and Wnt signalling. *Development* 140: 4959-4969.
- Tao W, Lai E (1992) Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain. *Neuron* 8(5):957-66.
- Theveneau E, Mayor R (2012) Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology* 366: 34-54.
- Tsukiji N, Nishihara D, Yajima I, Takeda K, Shibahara S, et al. (2009) Mitf functions as an in ovo regulator for cell differentiation and proliferation during development of the chick RPE. *Developmental Biology* 326: 335-346.
- Tucker RP (2004) Antisense knockdown of the β 1 integrin subunit in the chicken embryo results in abnormal neural crest cell development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 1135-1139.
- Ueno N, Greene NDE (2003) Planar cell polarity genes and neural tube closure. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 69: 318-324.
- Walther C, Gruss P (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113: 1435-1449.
- Williams AL, Bohnsack BL (2015) Neural crest derivatives in ocular development: Discerning the eye of the storm. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 105: 87-95.
- Wu L, Wang L Fau - Shangguan S, Shangguan S Fau - Chang S, Chang S Fau - Wang Z, Wang Z Fau - Lu X, et al. (2013) Altered methylation of IGF2 DMR0 is associated with neural tube defects. *Mol Cell Biochem* 380(1-2):33-42.
- Xuan S, Baptista CA, Balas G, Tao W, Soares VC, et al. (1995) Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron* 14: 1141-1152.
- Yamaguchi TP (2001) Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Current Biology* 11: R713-R724.

Figure legends

Fig.1 : Bmp7 injection in Pcp reproduces CNC ablation

(A-D) Injection of human Bmp7 protein with Neutral red (in red) in Pcp of 8HH embryo. (B) within the egg, (C) out of the egg, (D) Ventral view. (E-J) Morphology of control and Bmp7 treated embryos at 14HH (E,F) and E8 (G-J) respectively. Arrows in (I,J) show absence of the upper jaw and in (J) cyclopean eye with proboscis below. (K,L) Alizarine red (in red) and alcian blue (in blue) staining of Control and Bmp7 treated embryos respectively. (M-P) Coronal sections of Cresyl violet stained embryos in control (M,N) and Bmp7 treated embryos (O,P). (M, O) Telencephalic level, (N,P) diencephalic level. (Q-T) Transversel sections stained with H&E in control (Q,S) and Bmp7 treated (S,T) embryos at 12HH illustrated in anterior (Q,R) and psoterior (S,T) views. Asterisks show a huge OS in the treated embryo preceding cyclopia. (U-X) Transversel sections at 13HH in control (U,W) and Bmp7 treated (V,X) embryos stained with Dapi illustrated in anterior (U,V) and posterior (W,X) views. Arrow shows failure of the proximal part of optic vesicles to invaginate. 3°V: third ventricle, Tel: Telencephalon, Die: Diencephalon, OS: optic stalk, H&E: Hematoxylin and eosin. Scale bar (M-P): 300um; (Q-T): 25um; (U-X): 50um

Fig.2 : Bmp7 treatment affect proliferation and viability

(A-C) LTR staining of control (A) and Bmp7 treated embryo (B) with quantification of cell death percentages (C) at 11HH. Whole mount LTR (D,G), Lateral (E,H) and medial (F,I) views at 14HH of control and Bmp7 treated embryos respectively. Whole mount immunolabeling of PH3 (J,K) and coronal sections (L,Q) of control and Bmp7 treated embryos at 14HH. (L,O) Dapi, (M,P) PH3 and (N,Q) merged channels of control and Bmp7 treated embryos. Scale bar (E,F,G,H): 100 um, (L-Q): 50um,

Fig.3 : Bmp7 affects epithelial polarity

(A-X) Immunolabeling of cell polarity markers β -catenin (A-F), N-cadherin (G-L), F-actin (M-R) and Vangl2 (S-X) of control and Bmp7 treated embryos. (Y,Z) Transverse sections stained with Dapi of control and Bmp7 treated embryos. (i,ii) Percentages of apico-basal distributions of nuclei in dorsal optic vesicle in control (i) and Bmp7 treated embryos (ii). Pr: Proximal , Di (s): Distal part of optic vesicle, Nr: Neural retina. Scale bar: 25um

Fig.4 : Regionalization markers of the forebrain are misregulated

(A-J) Whole mount hybridizations at 9 HH of *Foxg1* (A,B), *Pax6* (C,D) , superposition of *Pax6* and *Foxg1* hybridizations (E,F), *Otx2* (G,H) and *Shh* (I,J) in control and Bmp7 treated embryos. Whole mount Hybridizations of *Foxg1* (K,L),

Pax6 (O,P), *Shh* (U,V), *Mitf* (W,X) and *Six3* (Y,Z) and transverse sections of *Foxg1* (M,N), *Pax6* (Q,R), *Otx2* (S,T) and *Six3* ((Y',Z')) in control and Bmp7 treated embryos at 12HH. (i) Quantification of mRNA levels of genes of interest by RT-qPCR. ((mean \pm SEM presented, *** = $p \leq 0.001$, ** = $p \leq 0.01$ and * = $p \leq 0.05$). Relative level variations were calculated using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method and the *Gapdh* gene as a normalizing gene. (ii-iv) mRNA ratios in Bmp7 treated embryos at 12HH. OV: Optic Vesicle, VM:Ventral Midline. Scale bar (M,N): 50um, (Q-T, Y',Z'): 25um

Fig.5 : CNC migration is perturbed early after Bmp7 treatment

(A-H) Whole mount immunolabeling of HNK1 at 9HH (A,B), 10HH (C,D), 12HH in dorsal (E,F) and lateral (G,H) views of control and Bmp7 treated embryos. (I-N) Sagittal section of HNK1 of control (I-K) and Bmp7 treated (L-N) embryos at 9HH. Arrows in (K,N) show failure of ventral migration of CNC (N) in Bmp7 treated embryos regarding to the control (K). (O-T) Transverse sections of HNK1 in control ((O-Q) and Bmp7 (R-T) at 12HH. (U-X) Whole mount hybridization at 9HH of *Slug* (U, V) in control and Bmp7 treated embryos. (W,X) Sagittal sections at 12HH of *Slug* hybridization control and Bmp7 treated embryos respectively. Asterisk in (X) shows absence of *Slug* Transcripts in lateral neural tube. (Y) Quantification of mRNA levels of genes of interest by RT-qPCR. ((mean \pm SEM presented, *** = $p \leq 0.001$, ** = $p \leq 0.01$ and * = $p \leq 0.05$). Relative level

variations were calculated using the comparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ method and the *Gapdh* gene as a normalizing gene. Scale bar (I-T, W,X): 25um

Fig.6: Wnt1 upregulation is implicated in cyclopia.

(A-F) Whole mount hybridizations of *Wnt1* at 8HH (A,B),9HH (C,D) and 11HH (E,F) of control and *Bmp7* treated embryos respectively. (G-I) Bilateral electroporation of CNC with *dsWnt1* and pCAGGS-GFP construct (G) and GFP positive migrating CNC (H) at 12HH. (I) Transverse section at the diencephalic level showing GFP positive CNC; The neuroepithelium and superficial ectoderm are devoid of any labeling. (J,K) Hybridization of *Wnt1* after bilateral silencing by *dsWnt1* electroporation in CNC. (L-M) Morphology of control (L) and rescued embryos with *dsWnt1* at 14HH. (N-S) Morphology of rescued embryos at E4,5 (N,O), E6 (P,Q) and E8 (R,S). Arrows (O, in red) show that eyes are separated but still in hypotelorism. (T-W) Coronal sections of cresyl violet stained rescued embryos showing the rescue of telencephalon (T), but eyes appeared synophthalmics and fused to telencephalon (U) and they are separated but disorganized more ventrally (V,W). (X-Z) Alcian blue (in blue) and alizarine red (in red) staining showing an upper jaw and eyes partially restored (arrow in Z) regarding to *Bmp7* treated embryos (asterisk in Y). (i,ii) Quantification of mRNA levels of genes of interest by RT-qPCR. ((mean \pm SEM presented, *** = $p \leq 0.001$, ** = $p \leq 0.01$ and * = $p \leq 0.05$). Relative level variations were calculated using the

comparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ method and the *Gapdh* gene as a normalizing gene. opt: optic vesicle, Tel: Telencephalon, Opt : optic vesicle. Scale bar (I): 50um, T-W):300um.

Fig.7: (a) Wnt2b is downregulated early in OV

Whole mount in situ Hybridization ((A,B), (G,H)) and transverse sections ((C-F), I,J) of Wnt2b in control and Bmp7 treated embryos at 9HH and 12HH respectively. Transverse section of Wnt2b immunolabeling of control (K-M), (Q-S) and Bmp7 treated embryos (N-P),(T-V) at 9HH and 12 HH respectively. (K,N,Q,T) are Dapi staining, (L,O,R,U) are Wnt2b staining. AIP: Anterior intestinal portal.

(b) Inactivation of Wnt1 signaling can restore early CNCCs migration.

(A,B) HNK1 labeling is restored in lateral (A) and frontal (B) views in double rescued embryos at 13HH. (C-F) transverse sections showing Dapi (C), GFP positive OV (D,in green) and migrating CNC (E,HNK1 in red) and merged sections (F) of double rescued embryos at 12HH. (G,H) Sagittal section of *Slug* hybridization in control (G) and double rescued embryos (H) at 12HH. Arrow in (H) highlights ventral CNC migration. (I-N) Bright field (I, L) and HNK1 labeling (J, M) and their supepositions (K,N) of *pWnt2b* and *dsWnt1* rescued embryos. (O, R)Morphology of *pWnt2b* rescued embryos. (P,Q,S) GFP positive electroporated tissues. Scale bar (a-C-F; I, J; K-P): 50um, (a- Q-V): 25um, (b- C-F; P,Q,S): 50um, (b- G,H): 25um

Fig.8 Modulation of Wnt1 and Wnt2b signalings restores almost of the phenotype

(i-iii) double treatment of CNC and OV with *dsWnt1* and pCAGGS-*Wnt2b*-GFP construct. Positive CNC and OV are shown in transverse sections (iii) at 12HH. Morphology at E4,5-E5 of control (A,F), *Bmp7* (B,G), *dsWnt1* rescue (C,H) and double rescue (D,I) embryos. Arrow in (D) shows how the eyes are restored in the double treatment comparing to *dsWnt1* rescue and *bmp7* treatments. Asterisks show the rescue of telencephalic vesicles in *dsWnt1* (H) and p*Wnt2b* (I) treatments. (E,J) Morphology of double treated embryos at E8 in whole mount (E,J), from dorsal to ventral in coronal section (K-N) of E8 double rescued embryos and frontal anterior (O) and posterior (P) sections. Coronal sections indicate that the ventral telencephalon (L) is still fused to the eyes in the RD/T boundary and absence of inter-orbital septum (M) and only nasal septum is restored (N). Alcian blue at E8 showing closed choroid fissure in control (Q) and optic cup completely constricted in contact with the neural tube (R). In *dsWnt1* rescue choroid fissure is still opened (S) and the RPE is still fused to the neural tube (T) but in the double treatment the choroid fissure is almost closed (U,X) but the RPE is still fused to the neural tube (V). Lateral view at E8 of alcian blue stained double treated embryos shows restored upper jaw (W,X) with a slight colobomatous eye (asterisk in X). 3°V: Third ventricle, Tel: Telencephalon, Vent

Tel: Ventral Telencephalon, RD/T: rostral diencephalon/telencephalon boundary, OV: optic vesicle, RPE: retinal pigment epithelium. Scale bar (iii): 50um, (K-P):300um

Fig.9: Regionalization markers and cell polarity are restored by modulation of the Wnt signalings

(A-L) Whole mount Hybridization of regionalization markers *Otx2* (A-C) at 10HH and *Mitf* (J-L) at 12HH. transverse section of *Otx2* (D-F) and *Foxg1* (G-I) at 12HH. (M-X) Immunolabeling of Neuroepithelium polarity markers. F-actin (M-R) and Vangl2 (S-X) of control and double rescued embryos at 12HH. Dapi (M,P,S,Y), F-actin (N,Q) and Vangl2 (T,W). (i,ii) Apico-basal nuclei distribution quantification of control (i) and double rescued (ii) embryos at 12HH. (iii) Quantification of *mRNA* levels of genes of interest by RT-qPCR. ((mean \pm SEM presented, *** = $p \leq 0.001$, ** = $p \leq 0.01$ and * = $p \leq 0.05$). Relative level variations were calculated using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method and the *Gapdh* gene as a normalizing gene. Scale bar (D-I):50um, (M-X): 25um

Figure 2

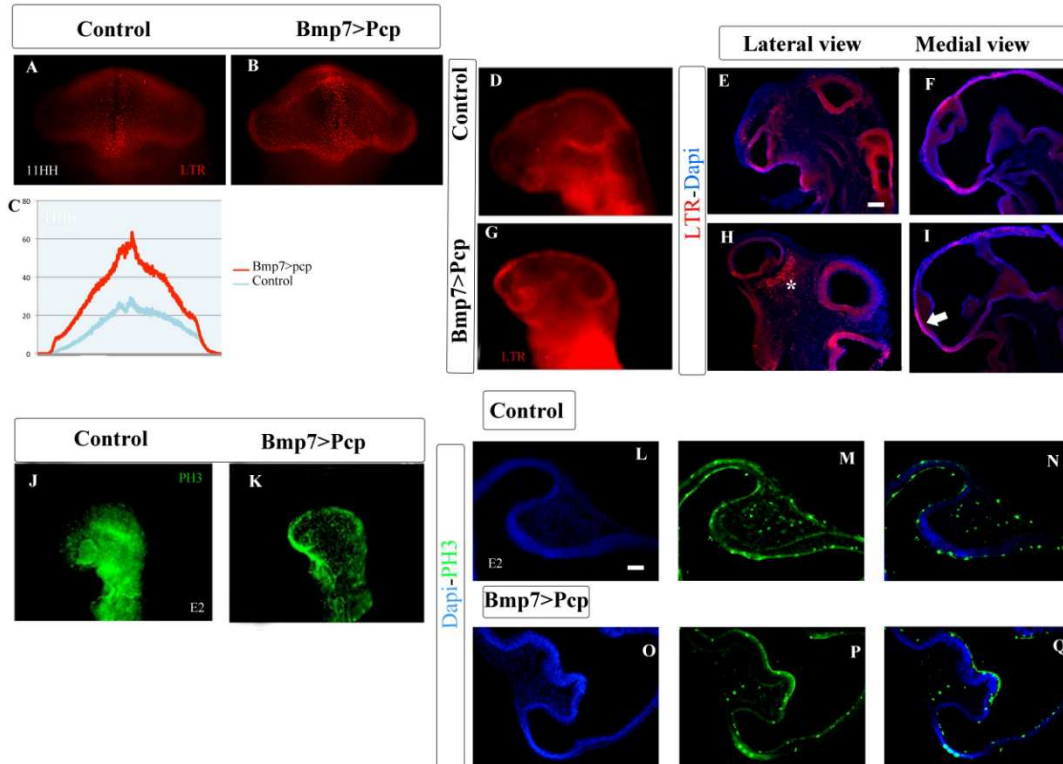


Figure 3

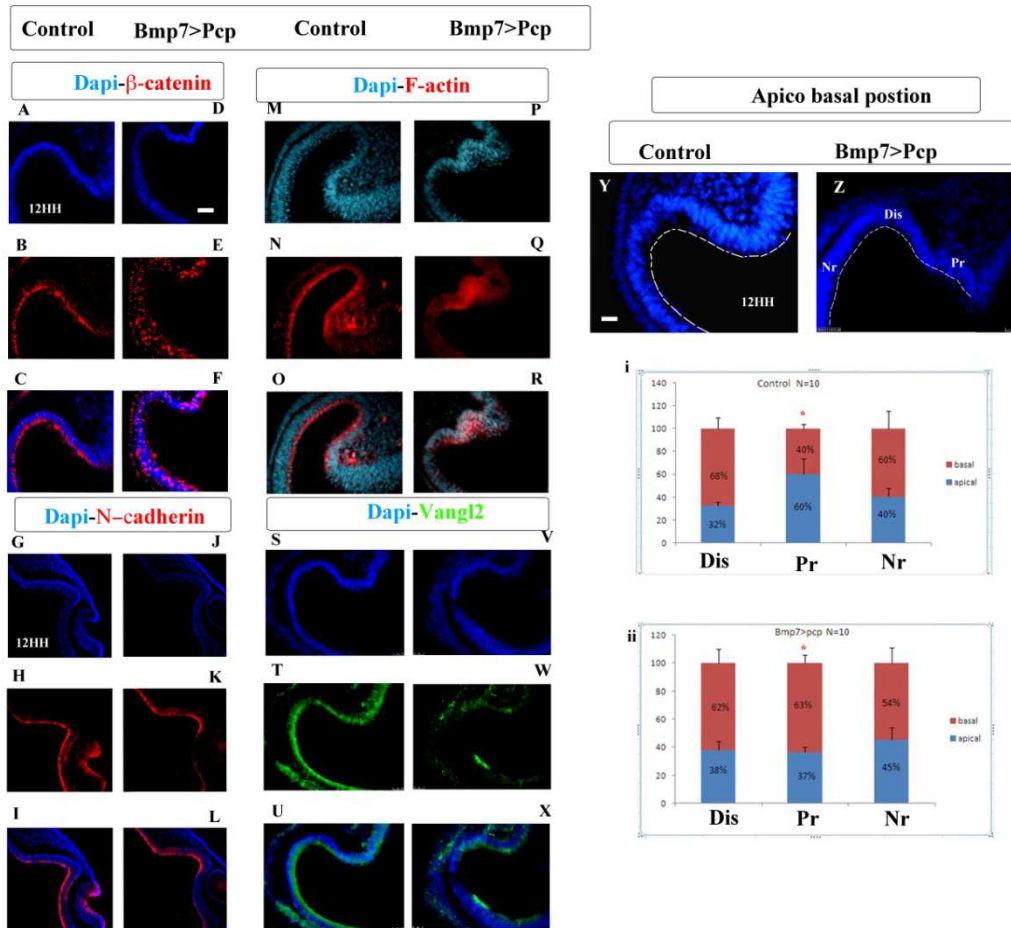


Figure 4

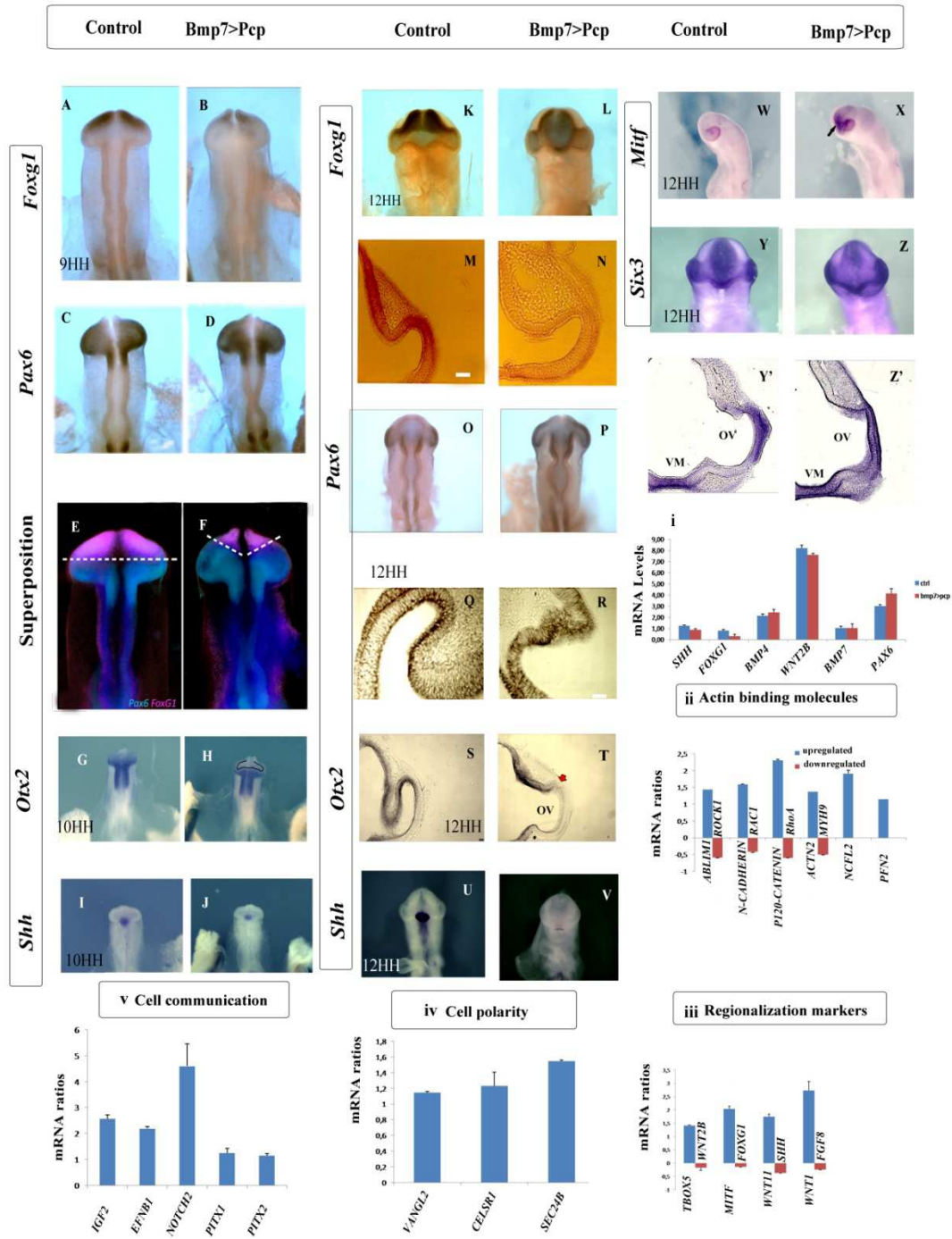


Figure 5

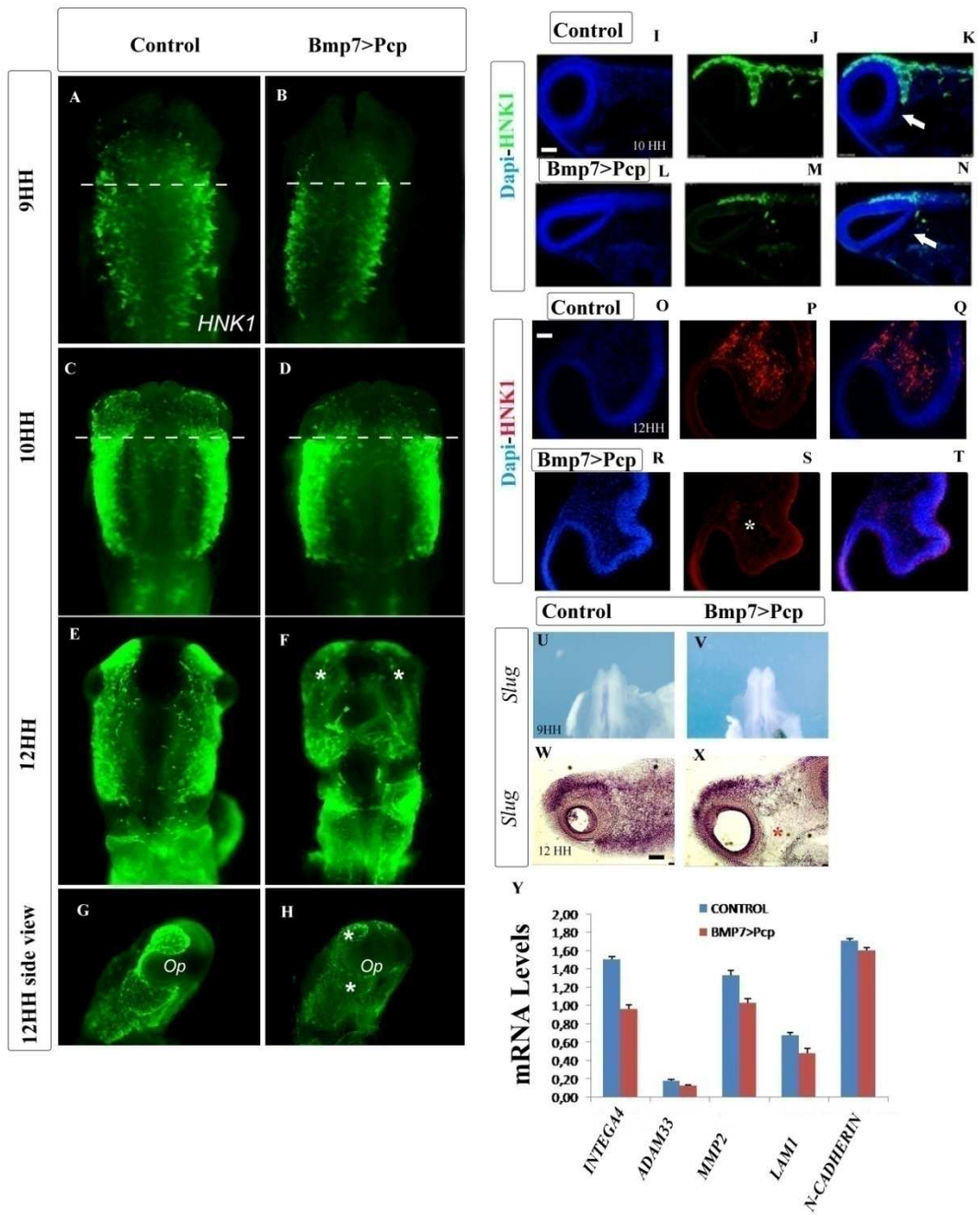


Figure 6

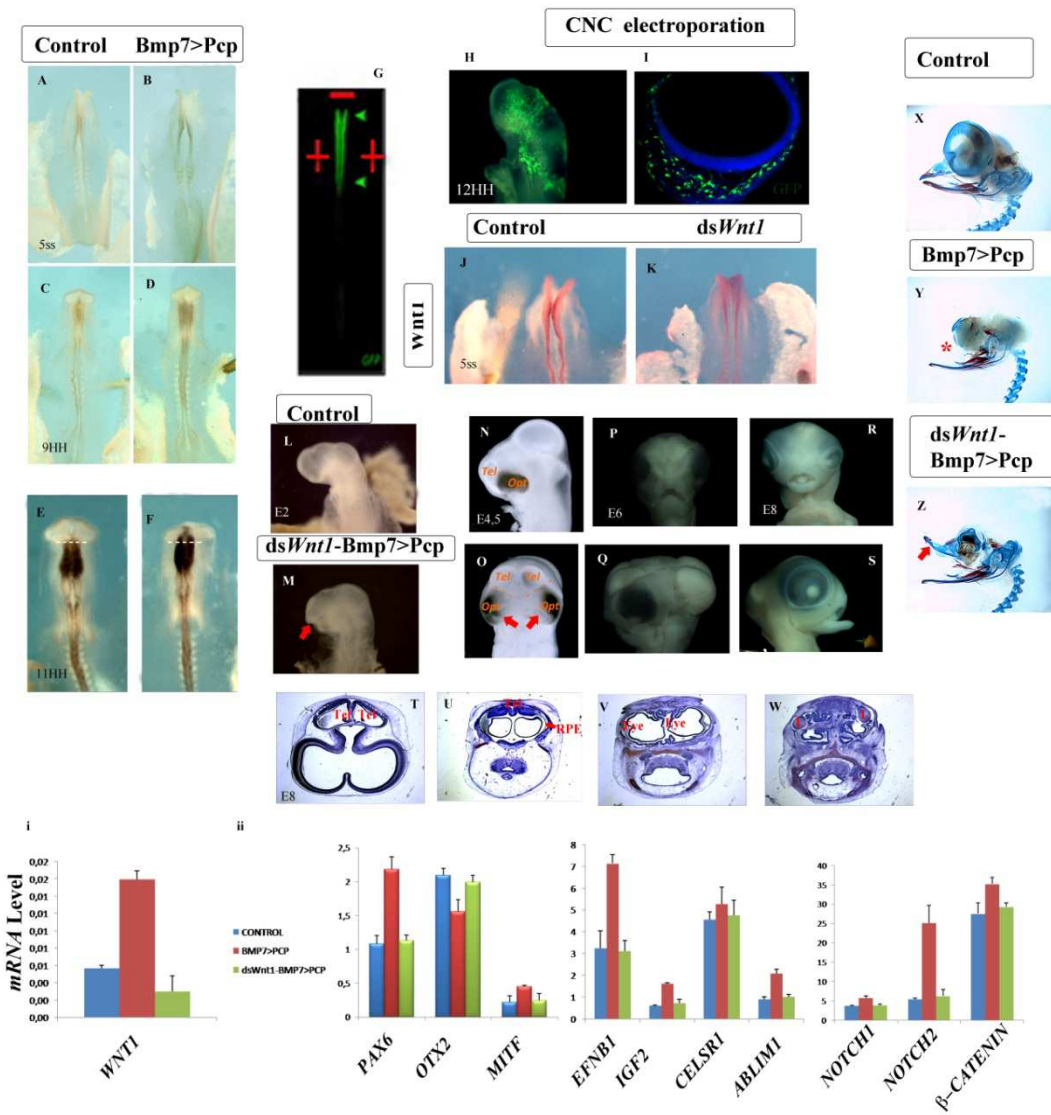


Figure 7

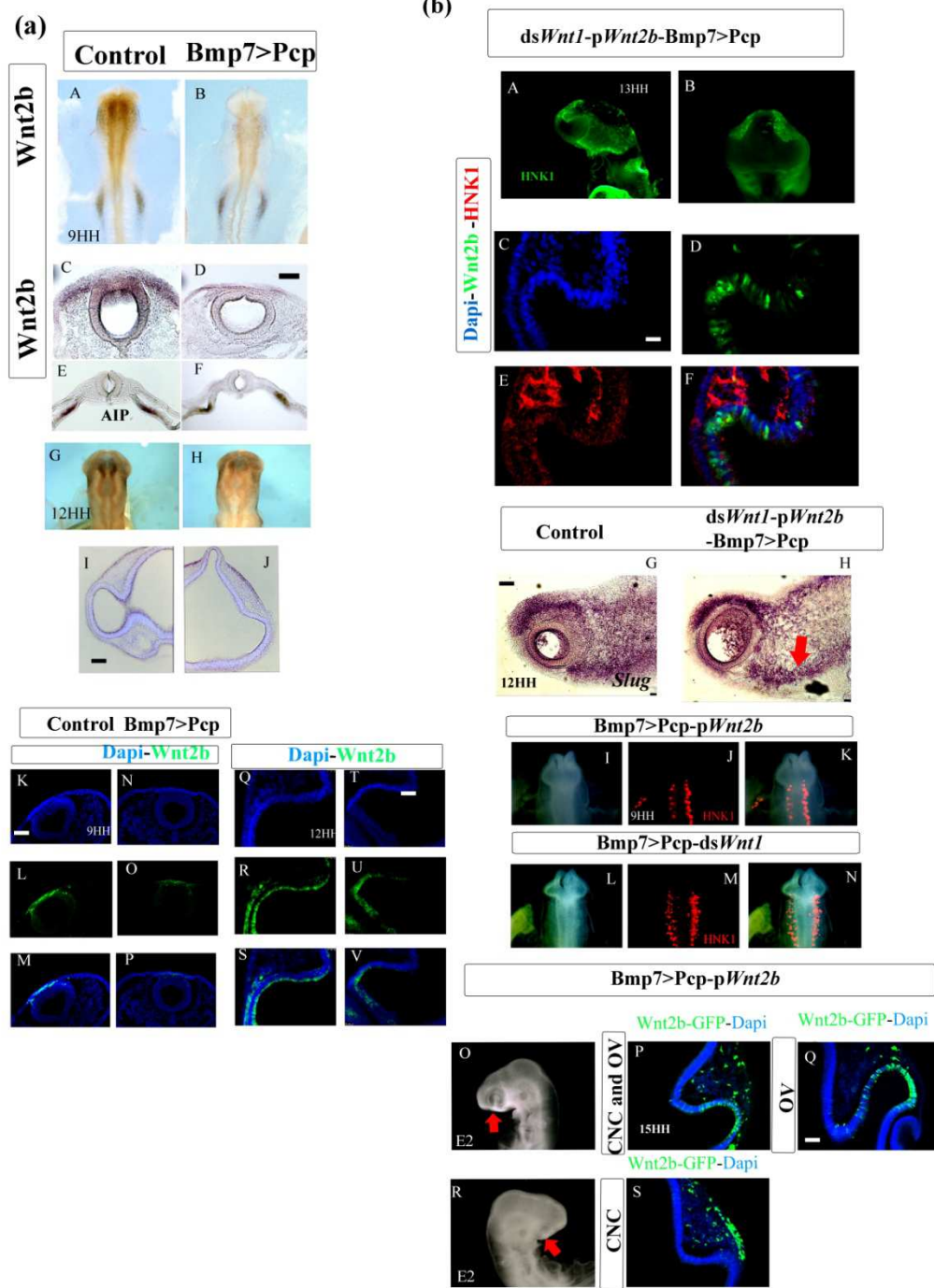


Figure 8

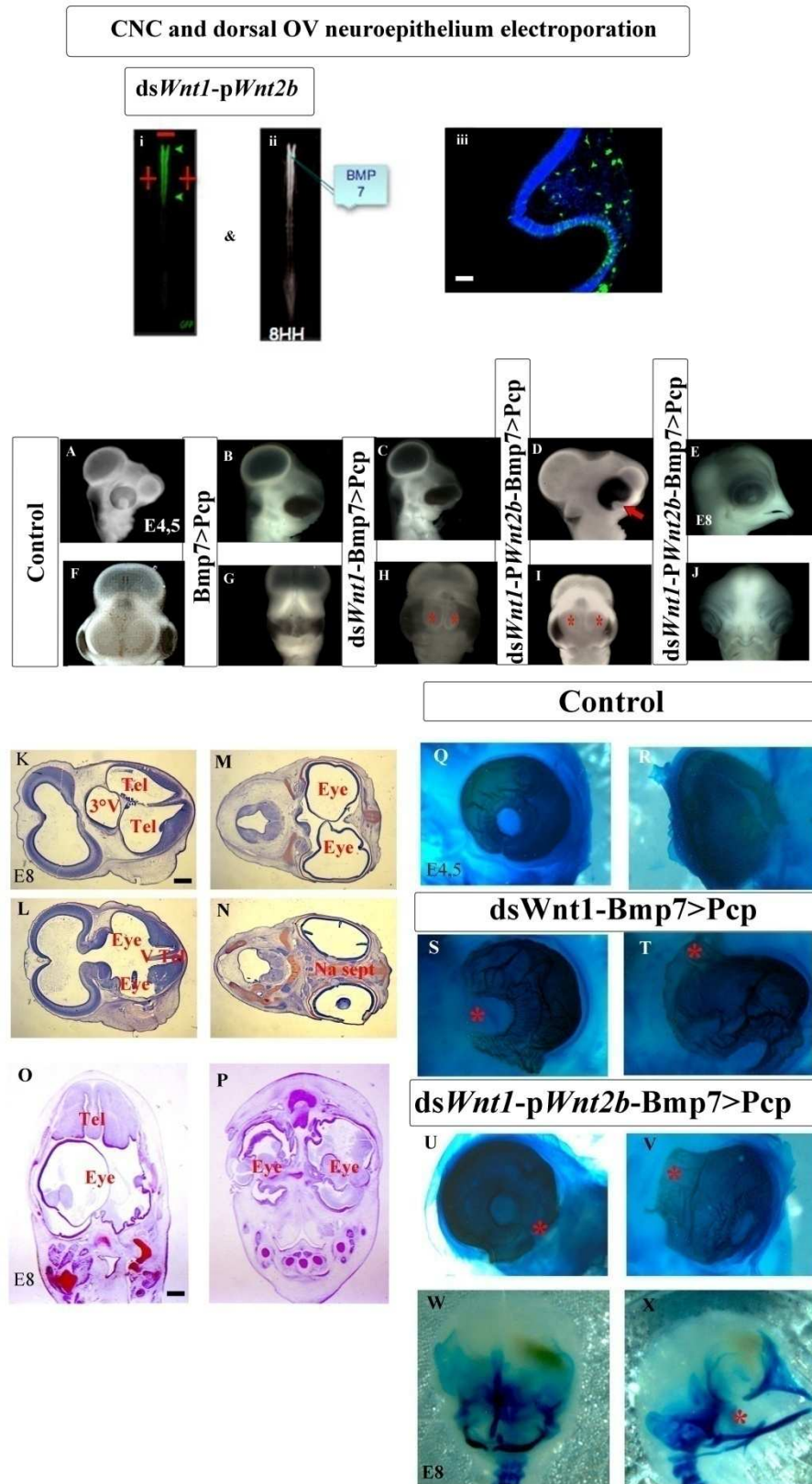
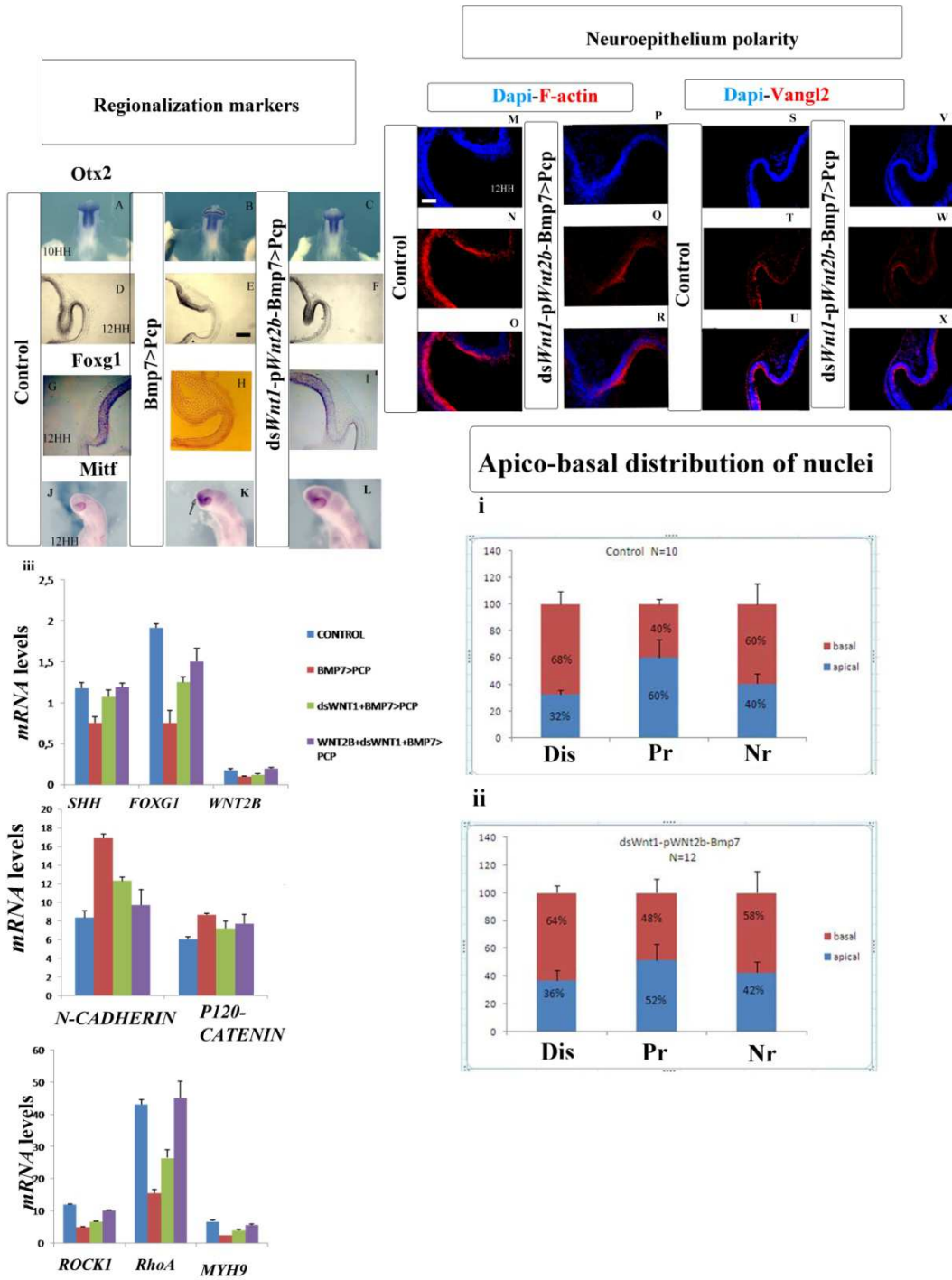


Figure 9



Supplementary informations

Fig; S1 Modulation of Wnt signaling in CNC and OV reproduces cyclopia

(A-C) GFP positive OV and SE. Morphology of control (D,E) and *dsWnt2b-pWnt1* treated embryos (F,G). Arrowheads show appearance of probosis above the cyclopic eyes at E6. (H-J) coronal sections with cresyl violet staining showing holoprosencephalic telencephalon (H,I) and cyclopic eyes in the dorsal diencephalon level (J) at E6. Hybridization of *Otx2* at 9HH of control (K) and *dsWnt2b-pWnt1* treated embryos (L). (M-R) Immunolabeling of F-actin of control (L-N) and *dsWnt2b-pWnt1* treated (O-Q) embryos at 12HH. OV: optic vesicle, SE: surface ectoderm, 3°V: third ventricle, Tel : telencephalon. Scale bar (A-C): 50um, (H-J): 300um, (M-R):25um.

Fig.S2 : Tables A and B of primers sequences used in RT-qPCR to amplify 149-151bp of amplicon

Fig. S3: Proposed model : Heterochronic upregulation of Bmp7 in the Pcp (in Blue) upregulated very early Wnt1 signaling (a) in the dorsal neural tube which gives rise to the future CNC (in red). This upregulation hampered CNC migration and by consequent misregulated Pax6, MITF and OTX2 signaling in the caudal OV. Increase in Bmp7 downregulated WNT2B signalling in the rostral OV (b) and also FOXG1 signaling (c) in the ANR which caused early failure of forebrain regionalization and fusion of the eyes to diencephalon and telencephalon preceding cyclopia phenotype. Inhibition of CNC migration to OV and to ANR

could be responsible for downregulation of Wnt2B and FOXG1 signaling respectively and highlighted that CNC could stabilize their levels by opposing to Bmp7 signaling coming from Pcp. Pcp: Prechordal plate, CNC: Cephalic neural crest, OV: Optic vesicle, ANR: Anterior neural ridge

FIG. S1

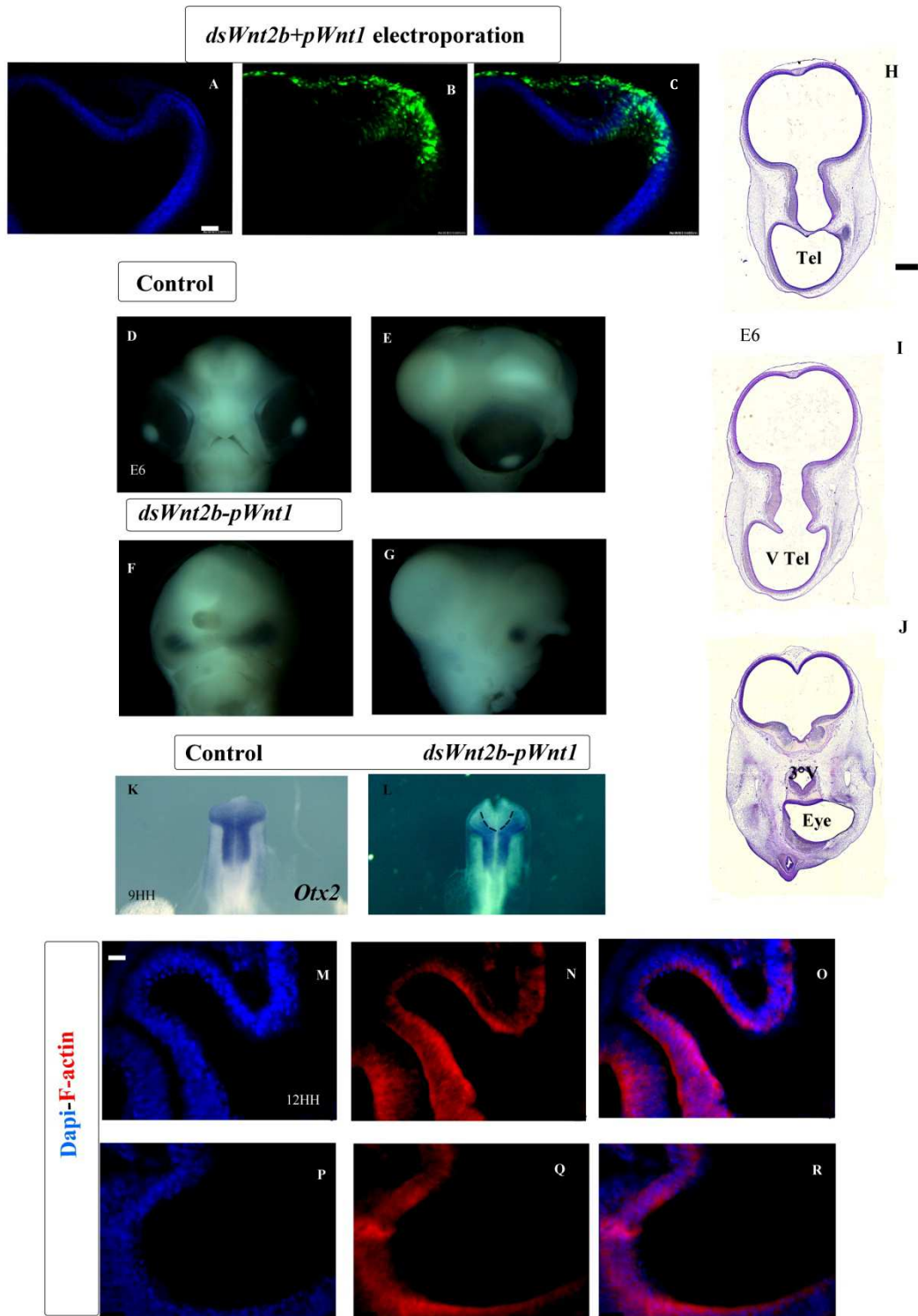


FIG. S2

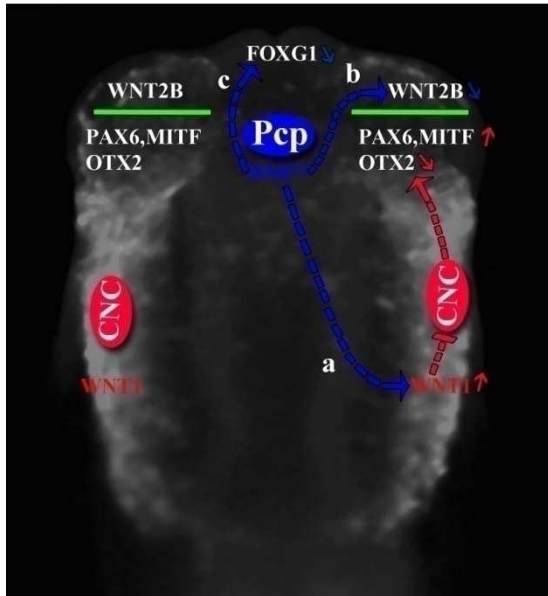
A

Genes	Fo primers	Re primers
<i>GAPDH</i>	catccaaggagtgagccagg	aattggaggagtgggggaga
<i>MMP2</i>	tggcagtttctgggcagaat	atgatcatgttcggcagcca
<i>RAC1</i>	tcagcacttacacagcgagg	tctgagcaaagcacagggtt
<i>WNT1</i>	cgtgacagttggtctggag	acgatcttgccaagatggtg
<i>PAX6</i>	tcagca caagcgtttaccag	ggttgcataggcaggttgtt
<i>β-CATENIN</i>	gggttgattcgcaatctcgc	acaaactgctgttgcttcc
<i>SHH</i>	cgctgcaaggacaagctgaa	gggccagcattccgtacttg
<i>NOTCH2</i>	gtggcagctctggatcatcct	tcttctcaaactggctcct
<i>EFNB1</i>	ccaactacatggggcctggag	ttggatctgcccacttcc
<i>TBOX5</i>	ttgtaccagcggatgaccac	tggaaggaaaccaaactgcct
<i>OTX2</i>	accaggcatcagggtacag	gaggctggagactggttgag
<i>BMP4</i>	gctaccaggcgtttactgc	tttcagcaccacctgtca
<i>MMP2</i>	atggacagccctgcaagttt	tggcagtttctgggcagaat
<i>P120-CATENIN</i>	ccctgggtgcagatacagtgg	aattgctctgctgaagcct
<i>PITX2</i>	tacaacaactgggcagccaa	tgctggacatgctcaatg
<i>SEC24B</i>	cctcaccctccattacgcag	gctgcttctcatctctctc
<i>nCFL2</i>	attctgggctcctgaaagcg	tctctccgagtgttgaacgg

B

Genes	Fo primers	Re primers
<i>LAM1</i>	ggacatctctgttggaggca	ggtttctgatggtacccgg
<i>INTEGA4</i>	gatcgccaactacgtggaca	cagagccttcttccaactgca
<i>RhoA</i>	ggcaaagaccaaagacggg	tactcaagtgcagggtgctg
<i>ROCK1</i>	ctcatgggatgacggctgaa	cctcagtgtcctttgtgcc
<i>BMP7</i>	tggtggagcatgacagagag	cctggaggacctggtagaca
<i>NOTCH1</i>	tacaatgctcctgccccag	atgcagctgtagccacctac
<i>ABLIM1</i>	gccccatcaccatctgaaa	aaagcctccttggccaagt
<i>FOXG1</i>	cctctactggcccatgtcc	gagtgattgtccccaagga
<i>MITF</i>	ccaagcctcccttaagctcc	gctgacgggaaactctctgtt
<i>MYH9</i>	gcaatggagtggtggaggga	tcatcagcacacaggcttgt
<i>FGF8</i>	caagaaaatcaatgcatgg	actcttgccgatcagttcc
<i>WNT11</i>	agtgccatggagtttctggg	cacgaggtatttgcgtgtgc
<i>IGF2</i>	acacactgcagttcgtctgt	cggacttggcacagtaggtt
<i>ACTN2</i>	ttgagagcgatttggctgct	aaagttcccaagctgtccc
<i>ADAM33</i>	gatcgccaactacgtggaca	cagagccttcttccaactgca
<i>PFN2</i>	gcaaagaagggtccaaggga	aggtttaaagctcacgcca
<i>PITX1</i>	aactcggcctcaacaacat	atttcagctcaggctggcc
<i>CELSR1</i>	aacgggagaaatggggaggta	gccaccaagttcttgggat

Fig. S3



**II-La Crête neurale faciale contrôle la morphogenèse
proscéphalique et mésencéphalique par la régulation de
l'expression de *Foxg1* à travers la signalisation Smad1**

Présentation conjointe de l'article de ([Aguiar et al. 2014](#))

RESEARCH ARTICLE

The facial neural crest controls fore- and midbrain patterning by regulating *Foxg1* expression through *Smad1* activity

Diego P. Aguiar*, Soufien Sghari and Sophie Creuzet†

ABSTRACT

The facial neural crest (FNC), a pluripotent embryonic structure forming craniofacial structures, controls the activity of brain organisers and stimulates cerebrum growth. To understand how the FNC conveys its trophic effect, we have studied the role of *Smad1*, which encodes an intracellular transducer, to which multiple signalling pathways converge, in the regulation of *Foxg1*. *Foxg1* is a transcription factor essential for telencephalic specification, the mutation of which leads to microcephaly and mental retardation. *Smad1* silencing, based on RNA interference (RNAi), was performed in pre-migratory FNC cells. Soon after electroporation of RNAi molecules, *Smad1* inactivation abolished the expression of *Foxg1* in the chick telencephalon, resulting in dramatic microcephaly and partial holoprosencephaly. In addition, the depletion of *Foxg1* activity altered the expression *Otx2* and *Foxa2* in di/mesencephalic neuroepithelium. However, when mutated forms of *Smad1* mediating Fgf and Wnt signalling were transfected into FNC cells, these defects were overcome. We also show that, downstream of *Smad1* activity, *Dkk1*, a Wnt antagonist produced by the FNC, initiated the specification of the telencephalon by regulating *Foxg1* activity. Additionally, the activity of *Cerberus* in FNC-derived mesenchyme synergised with *Dkk1* to control *Foxg1* expression and maintain the balance between *Otx2* and *Foxa2*.

KEY WORDS: Neural crest, Telencephalic hemispheres, RNAi, Holoprosencephaly, Electroporation, Chick

INTRODUCTION

The telencephalon is the most evolutionarily recent part of the central nervous system (CNS), and represents a salient trait of the vertebrate phylum. The specification of the telencephalon primarily relies on the transcription factor *Foxg1* (Tao and Lai, 1992; Xuan et al., 1995; Hanashima et al., 2004; Martynoga et al., 2005; Manuel et al., 2010), which is expressed in the prosencephalic neuroepithelium and is involved in segregating the telencephalon from the diencephalon. Investigations directed towards understanding forebrain regionalisation have demonstrated the importance of the anterior neural ridge (ANR) as the 'prosencephalic brain organiser', through the production of Fgf8 signal (Shimamura and Rubenstein, 1997; Houart et al., 1998; Shanmugalingam et al., 2000; Storm et al., 2006). Removal of ANR completely inhibits *Foxg1* expression and leads to the loss of telencephalic structures. Deficits can be overcome by supplying an exogenous source of Fgf8 (Shimamura and Rubenstein, 1997). Other brain-organising centres secreting Wnt and Shh molecules along the

dorsal and ventral midlines are also required for brain development (McMahon and Bradley, 1990; Kim et al., 2001; Chang et al., 2004; Danesin et al., 2009; Vieira et al., 2010). Collectively, these factors generate a matrix of combinatorial morphogenetic factors, which governs planar specification and imparts a certain degree of molecular regionalisation to the cerebral neuroepithelium (Echevarria et al., 2003; Hoch et al., 2009).

Embryological studies have shown that the cephalic neural crest, which develops concomitantly to the formation of the CNS in vertebrates, is essential for brain development (Creuzet, 2009; Le Douarin et al., 2012). Neural crest cells originating from the posterior diencephalon down to rhombomere 2 (*r2*) provide the skeletogenic cells that build the facial structures and generate the musculo-connective cells lining the endothelium of blood vessels of the face and forebrain. This domain is here designated as FNC (facial neural crest). Absence of FNC prevents the formation of facial structures and also results in anencephaly: agenesis of telencephalic vesicles, thalamic and pre-tectal nuclei ensue (Creuzet et al., 2004, 2006). Brain defects occurring in the absence of the FNC stem from perturbations in the morphogenetic activities of secondary brain organisers: FNC ablation is promptly followed by loss of *Fgf8* in the ANR, loss of *Wnt* activity dorsally, and expansion of *Shh* ventrolaterally (Creuzet et al., 2006). It turns out that, during their migration, FNC cells shield and protect the brain against the detrimental effects of bone morphogenetic proteins (Bmps) secreted by neighbouring tissues, and promote *Fgf8* activity in ANR (Creuzet, 2009). However, to a large extent, the repertoire of the FNC-produced molecules required for brain patterning remain unknown.

To explore this mechanism further, we have focused our interest on *Smad1*, which is expressed in pre-migratory FNC cells. *Smad1* acts like a 'platform' upon which multiple signals converge: it is a transducer of the Bmp pathway and it mediates Fgf and Wnt signalling (Gont and Lough, 2000; Fuentealba et al., 2007). Here, we show that *Smad1* silencing in chick FNC cells inhibits *Foxg1* activity in the telencephalon and causes a severe microcephaly and partial holoprosencephaly. At the di/mesencephalic level, *Smad1* silencing reduces *Otx2* expression and triggers a concomitant expansion of *Foxa2* ventrolaterally, molecular changes that are attributable to the loss of *Foxg1* in the telencephalon. We have sought downstream effectors and identified two modulators of the Wnt pathway, *Dkk1* and *Cerberus*. Analysis of their epistatic relationships shows that these molecules, produced by the migratory FNC cells, cooperate under the control of *Smad1* activity to control *Foxg1* expression in the telencephalon and regulate the balance between *Otx2* and *Foxa2* at the di/mesencephalic level.

RESULTS

Smad1 is expressed in pre-migratory FNC cells

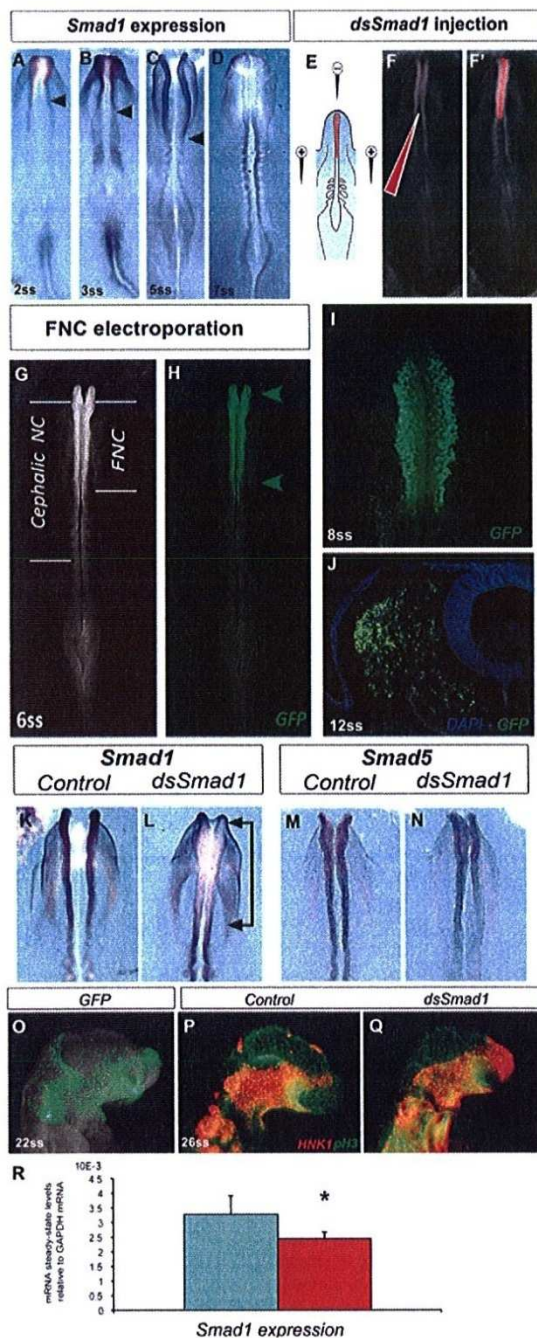
Smad1 gene expression pattern was analysed by whole-mount *in situ* hybridisation in chick embryos from the neurula stage

Institut de Neurobiologie, Laboratoire de Neurobiologie et Développement, Avenue de la Terrasse, Gif-sur-Yvette 91198, France.

*Present address: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil.

†Author for correspondence (sophie.creuzet@inaf.cnrs-gif.fr)

Received 26 July 2013; Accepted 22 April 2014



onwards. In early neurula (2-somite stage; ss), *Smad1* transcripts were detected at the margin of the neural plate in the presumptive diencephalon and mesencephalon, and, to a lesser extent, in cephalic superficial ectoderm (Fig. 1A). Before neural tube closure, *Smad1* expression gained in intensity in the neural fold (NF) and was extended down to the anterior rhombencephalic NF at 3ss (Fig. 1B), and further down to the level of r6 at 5ss (Fig. 1C). At 7ss,

Fig. 1. Specificity of *Smad1* silencing in FNC cells. (A-D) *Smad1* expression at 2ss, 3ss, 5ss and 7ss. Arrowheads indicate the caudal limit of gene expression. (E-F') Injection of *dsSmad1* plus Rhodamine Dextran (in red) and a pCAGGS-GFP construct in the neural tube at 4ss. (G,H) Whole-mount embryo at 6ss (G) and GFP labelling of FNC cells at 6ss after bilateral electroporation (H). NC, neural crest. Arrowheads indicate the limits of the transfected territory. (I) GFP-positive migrating cells in the maxillo-mandibular and nasofrontal buds at 8ss, and the telencephalon remains untransfected. (J) Transverse section at the mesencephalic level showing GFP-positive FNC cells; the neuroepithelium and superficial ectoderm are devoid of any labelling. (K-N) *In situ* hybridisation for *Smad1* (K,L) and *Smad5* (M,N) at 5ss, 90 min after electroporation. Arrows in L indicate the FNC where *Smad1* is silenced. (O-Q) Lateral views of 26ss embryos. (O) GFP-positive migrating cells in the maxillo-mandibular and nasofrontal buds. (P,Q) Immunolabelling with HNK1 (in red) and anti-pH3 (in green) antibodies in control (P) and *dsSmad1*-electroporated (Q) embryos. (R) Quantification of *Smad1* expression in control (blue) and *dsSmad1*-treated (red) embryos by qRT-PCR at 25ss (mean \pm s.e.m.; * P <0.0125).

Smad1 expression was rapidly switched off in FNC cells that had emigrated from the cephalic NF (Fig. 1D). Caudally, where the neural plate was still open, the accumulation of *Smad1* transcripts was intense. Later on, *Smad1* expression was observed in the FNC-derived mesenchymal cells that had colonised naso-frontal and maxillo-mandibular buds at 26ss.

***Smad1* silencing in FNC cells results in morphological defects of brain development**

To unravel the role of *Smad1* expression in FNC cell on brain development, double-stranded RNA molecules were designed against chick *Smad1* (*dsSmad1*), and bilaterally electroporated into the FNC cells at 4ss, when *Smad1* expression is maximal in the cephalic NF. FNC cells were specifically transfected, as attested by the co-electroporation of Rhodamine Dextran and a GFP construct (Fig. 1E-H). At 8ss, FNC cells have migrated laterally, but the telencephalic territory is devoid of GFP labelling (Fig. 1I). At 12ss, the transfected FNC cells that have emigrated from the neural plate border are GFP positive, but the roof plate and the alar plate of the brain are GFP negative (Fig. 1J). The efficacy of *Smad1* silencing was tested by whole-mount hybridisation (Fig. 1K-N). Ninety minutes after electroporation (i.e. 5ss), *Smad1* expression was abolished in FNC cells (Fig. 1K,L), but the expression of other *Smad* genes, such as *Smad5*, were unaffected (Fig. 1M,N). At 22ss, GFP-labelled FNC cells have colonised the naso-frontal and maxillo-mandibular buds (Fig. 1O). Co-immunostaining with HNK1 and anti-phosphorylated histone3 (pH3) antibodies to demonstrate FNC cell migration and cell proliferation, respectively, confirmed that *Smad1* silencing did not affect the capacities of FNC cells to populate the facial processes (Fig. 1P,Q). qRT-PCR assays were carried out with total RNAs extracted from pre-otic heads harvested 20 h after electroporation, to determine the steady-state levels of *Smad1* mRNAs (Fig. 1R). In the *dsSmad1*-treated series, *Smad1* transcript accumulation shrank to 30% relative to controls.

The morphological changes after *Smad1* silencing were observed at 26ss. Compared with controls, we noted that repression of *Smad1* activity in FNC cells caused severe fore- and midbrain malformations ($n=76$; Fig. 2A,B). Cephalic vesicles were atrophied and the subdivision of prosencephalon into tel- and diencephalon was no longer visible (Fig. 2B, arrowheads). At embryonic day (E) 4 ($n=14$), head morphogenesis in experimental embryos was affected by severe telencephalic atrophy: the development of the nasofrontal and mandibular processes was reduced. Notably, the telencephalic territory displayed a partial holoprosencephaly (Fig. 2C,D, asterisk). To characterise brain defects further, morphometric analysis was performed by measuring the impact of *Smad1* silencing on the growth

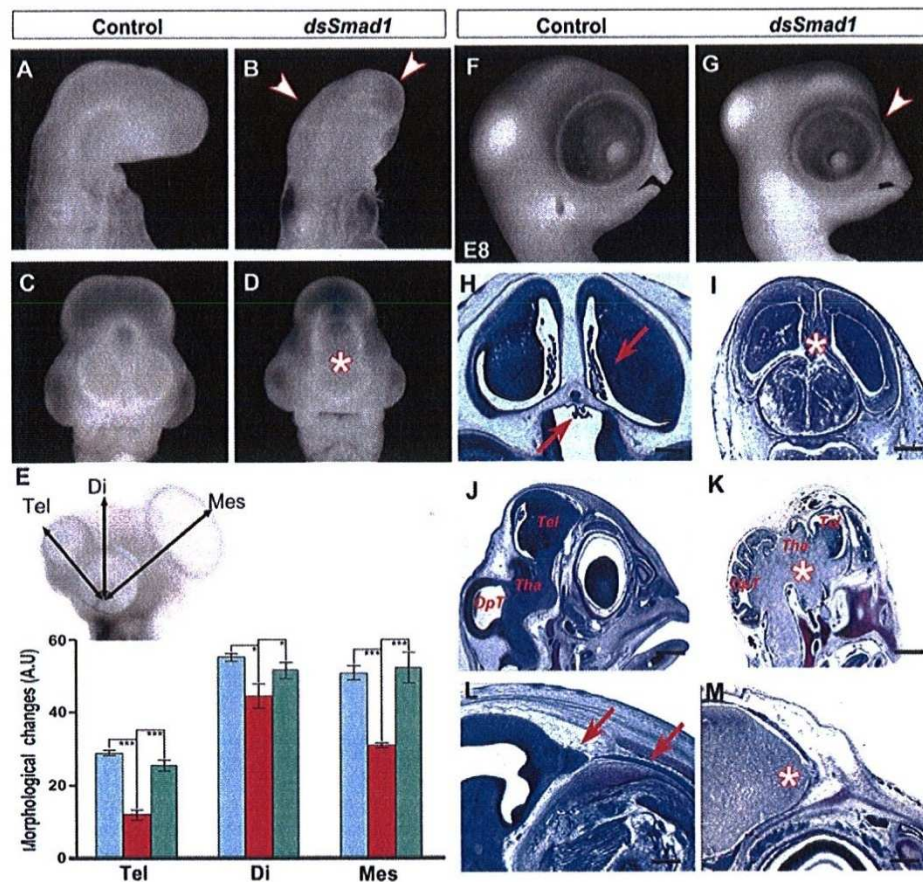


Fig. 2. *Smad1* silencing in FNC cells results in brain malformations. (A-D) Morphology of control and *dsSmad1*-electroporated embryos at 24ss (A,B; lateral view) and E4 (C,D; frontal view). Arrowheads and asterisk indicate the cephalic atrophy. (E) Morphometric analysis of brain development: distance between the lens and the dorsal telencephalon (Tel), the epiphysis (Di) and the optic tectum (Mes) in control (blue), *dsSmad1*-transfected (red) and *dsSmad1/hSmad1* co-electroporated (green) embryos (mean \pm s.e.m.; * P <0.0125, *** P <0.0001). (F,G) Morphology of control and *dsSmad1*-transfected embryos at E8 showing fronto-nasal defects on lateral view (G; arrowhead). (H,I) Coronal sections of control (H) and *dsSmad1*-electroporated (I) embryos. Note that the choroid plexuses (arrows in H) are reduced (asterisk in I) and the ventricles collapsed after *Smad1* silencing. (J-M) Para-sagittal sections of E8 control (J,L) and *dsSmad1*-transfected (K,M) embryos showing ventral expansion of the brain (K, asterisk). On mesial sections, the olfactory bulbs and nerves, present in control (L; arrows), are missing in *dsSmad1*-transfected embryos (M; asterisk). OpT, optic tectum; Tel, telencephalon; Tha, thalamus. Scale bars: 1 mm (J-O); 300 μ m (H,I).

of tel-, di- and mesencephalic vesicles (Fig. 2E). The microcephalic phenotype was particularly pronounced anteriorly, where the telencephalic hemispheres only represented 40% of the normal size (Fig. 2C). In addition, the optic vesicles were also hypoplastic in *dsSmad1*-electroporated embryos.

Induction of long-term defects in cephalic development by *Smad1* loss of function in FNC cells at E8 (Fig. 2F,G) were examined through structural staining of coronal sections (Fig. 2H,I). Telencephalic hemispheres exhibited severe disorganisation: the lateral and third ventricles were collapsed and the choroid plexi were hypoplastic (Fig. 2H,I), and the septal region was atrophied (Fig. 2I, asterisk). Para-sagittal sections revealed that the ventrolateral part of the pre-otic brain, from the thalamus down to the level of the anterior rhombencephalon was considerably expanded in *dsSmad1*-treated embryos compared with controls (Fig. 2J,K, asterisk). In addition, on mesial sections, in the olfactory bulbs, the olfactory nerves (Fig. 2L, arrows) were missing

(Fig. 2M, asterisk). Altogether, these observations showed that repressing *Smad1* activity in FNC cells had adverse effects on brain development.

To show that the morphological defects were specifically due to *Smad1* inactivation, we tried to rescue cephalic development by co-electroporating *dsSmad1* with a construct driving the expression of a wild-type form of human *SMAD1* (*hSmad1*). We first tested the innocuity of the *hSmad1* construct on cephalic development by transfecting this plasmid alone. We observed that *hSmad1* did not cause any alteration of head morphogenesis at 26ss (*dsSmad1/hSmad1*; $n=22$). In a next step, *hSmad1* construct was co-electroporated with *dsSmad1* in the FNC at 4ss ($n=42$). Twenty-four hours post-transfection, *dsSmad1/hSmad1* embryos showed a significant rescue of their cephalic development compared with *dsSmad1*-electroporated embryos (Fig. 3). Hence, the heterospecific restoration of *Smad1* activity was sufficient to overcome defects resulting from *Smad1* silencing.

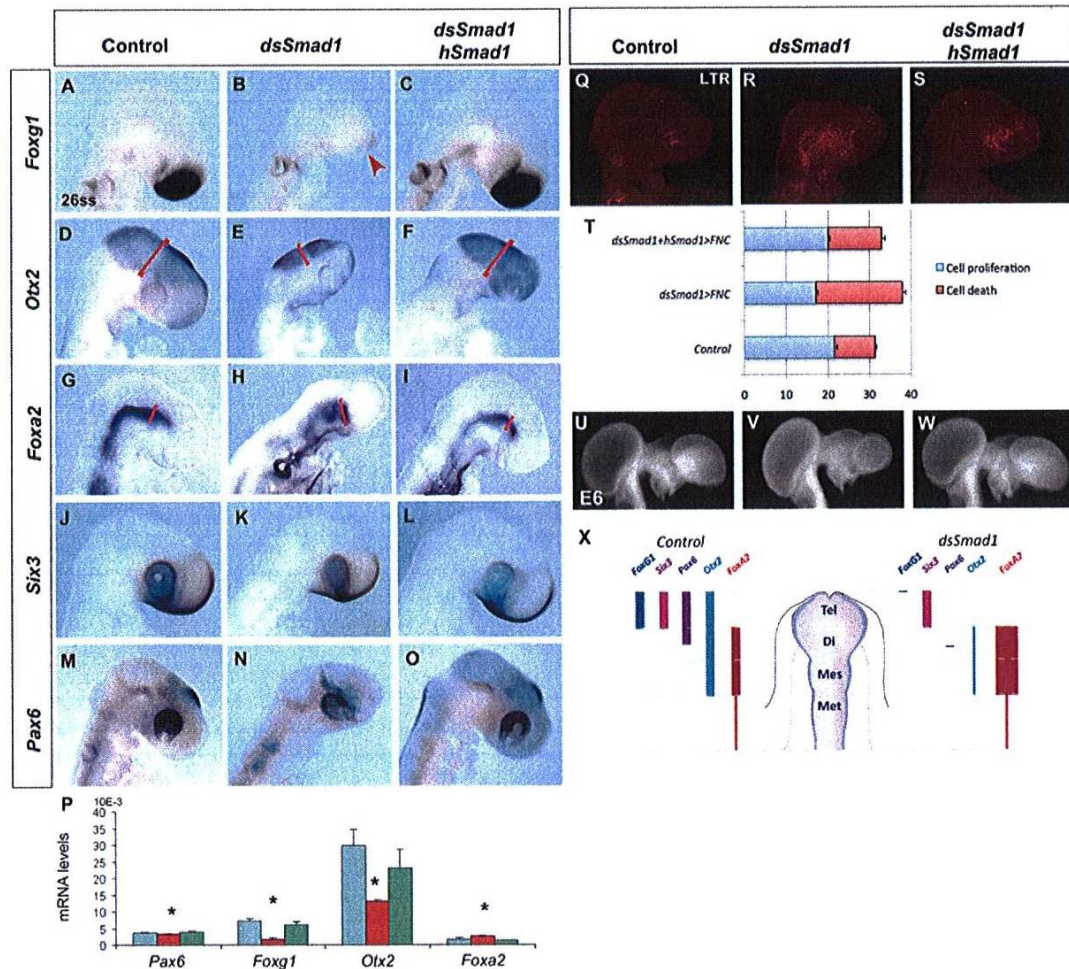


Fig. 3. *Smad1* silencing alters brain patterning. (A–O) Lateral views of 26ss control (A,D,G,J,M), *dsSmad1*-transfected (B,E,H,K,N) and *dsSmad1/hSmad1*-transfected (C,F,I,L,O) embryos. Hybridisation for *Foxg1* (A–C), *Otx2* (D–F), *Foxa2* (G–I), *Six3* (J–L) and *Pax6* (M–O). Red brackets in D–I point to changes in *Otx2* and *Foxa2* expression. Arrowhead in B indicates the loss of *Foxg1* expression in the telencephalon. (P) Quantification of *Pax6*, *Foxg1*, *Otx2* and *Foxa2* expression by qRT-PCR in control (blue) and *dsSmad1*-silenced (red) embryos. These changes tend to normalise when *dsSmad1* molecules are co-electroporated with *hSmad1* constructs (green) (mean±s.e.m.; * $P < 0.0125$). (Q–S) LTR staining of control (Q), *dsSmad1*-treated (R) and *dsSmad1/hSmad1*-transfected (S) embryos. *Smad1* silencing in the FNC augments cell death in the developing head. (T) Quantification of cell proliferation (blue) and cell death (red) in control and experimental series (mean±s.e.m.). (U–W) Side views showing brain morphology of E6 control (U), *dsSmad1*-transfected (V) and *dsSmad1/hSmad1* co-electroporated (W) embryos. (X) Diagram recapitulating molecular changes in brain patterning after *Smad1* silencing. Coloured bars represent expression domains of the listed genes. Di, diencephalon; Mes, mesencephalon; Met, metencephalon; Tel, telencephalon.

***Smad1* silencing in FNC cells entails molecular changes in brain development**

In our experiments, perturbations of brain development in *dsSmad1*-depleted embryos were first observed at 26ss. To elucidate the molecular mechanisms involved in cephalic hypoplasia, expression of transcription factors involved in brain patterning were analysed at 26ss. *Foxg1*, which is the earliest marker of telencephalic vesicles (Xuan et al., 1995; Chapman et al., 2002), was strongly expressed in control embryos (Fig. 3A). Knocking down *Smad1* abrogated its expression (Fig. 3B, red arrowhead; $n=30$), but the co-electroporation of a *dsSmad1* and *hSmad1* construct normalised *Foxg1* activity and forebrain development (Fig. 3C; $n=25$).

Otx2 expression, which characterises the anterior neural plate at neurula stage (Acampora et al., 1998; Plouhinec et al., 2005), is

detected in the telencephalon, and in the alar plate of the di- and mesencephalon at 26ss (Fig. 3D). In absence of *Smad1* in FNC cells, *Otx2* domain expression was reduced and limited at the dorsal midline of the di- and mesencephalon (Fig. 3E; $n=20$). Strikingly, *Otx2* expression was completely lost in the telencephalic vesicles of *Smad1*-silenced embryos. Electroporation of the *hSmad1* construct tended to normalise *Otx2* activity in the fore- and midbrain (Fig. 3F; $n=15$). We also looked at the expression of *Foxa2*, a marker of di- and mesencephalic basal plate (Ruiz i Altaba et al., 1995) (Fig. 3G). In *dsSmad1*-electroporated embryos, *Foxa2* expression was considerably expanded dorsally (Fig. 3H; $n=18$), and also upregulated in foregut endoderm. When *Smad1* activity was restored by the co-electroporation of *hSmad1*, its expression was restricted to the basal plate (Fig. 3I; $n=16$). *Six3* is strongly

expressed along the anteroventral midline of the telencephalon in normal embryos (Geng et al., 2008). *Six3* expression was not significantly perturbed by the loss of function of *Smad1* in FNC cells (in comparison with the absence of *Foxg1* activity) or by the co-electroporation of *hSmad1* (Fig. 3J-L). We also looked at the expression of *Pax6*, as a marker of the retinal primordium (Walther and Gruss, 1991), transcripts of which are accumulated in the optical vesicles and in the epithalamus (Fig. 3M). In the absence of *Smad1*, the hypoplasia of developing eyes coincided with severe reduction of *Pax6* (Fig. 3N; $n=12$), but this default was rescued by co-electroporating *hSmad1* (Fig. 3O; $n=10$). Molecular changes occurring in cephalic vesicles after *Smad1* silencing in FNC cells were quantified by qRT-PCR performed on developing heads 20 h post-electroporation (Fig. 3P). The quantification of gene expression revealed that *dsSmad1* altered the activity of *Pax6* ($Pax6\Delta=11\%$), *Foxg1* ($Foxg1\Delta=75\%$) and *Otx2* ($Otx2\Delta=55\%$). By contrast, in *Smad1*-silenced embryos, *Foxa2* expression was significantly increased up to 1.5-fold compared with controls. As expected from whole-mount hybridisations, in embryos co-electroporated with a *dsSmad1* and *hSmad1* construct, gene expression was restored to the levels detected in controls. To see if cellular events could account for the molecular changes, whole-mount detection of cell death was performed. In controls, punctate Lysotracker Red (LTR) labelling was scarcely observed in the retroocular region, where FNC cells migrate (Fig. 3Q). In *dsSmad1*-treated embryos, LTR staining was considerably expanded (Fig. 3R), but electroporation with *hSmad1* alleviated cell death (Fig. 3S). Whatever the series, the dorsal aspects of the fore- and midbrain remained unaffected. Quantifications on sections further documented the impact of *Smad1* silencing on cell proliferation and death, and the restoration after *hSmad1* electroporation (Fig. 3T). Normalisation of cellular events in embryos and the molecular profile of the developing brains at 26ss after the co-electroporation of *dsSmad1* and *hSmad1* ended up with a significant restoration of prosencephalic development at E6 (Fig. 3U-W).

Here, we show that silencing *Smad1* activity in FNC cells is sufficient to turn off *Foxg1* activity. More caudally, in the di- and mesencephalon, *Smad1* inactivation also resulted in a dramatic reduction of *Otx2* and the expansion of *Foxa2* (Fig. 3X). The mutual opposition of these two genes has been previously documented and accounted for by a balance between 'dorsalising' versus 'ventralising' processes of the pre-otic neuroepithelium (Nakano et al., 2000; Ang et al., 1996). In our experiments, the misregulation of *Smad1* in FNC cells turns out to favour *Foxa2* expansion and *Otx2* reduction: this condition ends up with a potent ventralisation of the di- and mesencephalic territory.

Changes in signalling triggered by *Smad1* silencing

Perturbations in the expression of transcription factors suggested that crucial changes in the morphogenetic activity of 'secondary brain organisers' had occurred in absence of *Smad1* activity in FNC cells. Production of *Fgf8* in the ANR has been shown to play a leading role in telencephalic patterning (Shimamura and Rubenstein, 1997; Houart et al., 1998; Shanmugalingam et al., 2000). In controls, *Fgf8* domain of expression is maximal at 26ss. In *dsSmad1*-electroporated embryos, a weak reduction of its domain was observed (Fig. 4A-C; $n=15$). *Bmp4* expression, normally present in the superficial naso-frontal ectoderm surrounding the ANR (Fig. 4D), was upregulated in the retroocular (i.e. presumptive maxillary) region after *dsSmad1* silencing (Fig. 4E,F; $n=10$). In the basal plate, *Shh* is the major signal to be produced and has a deep

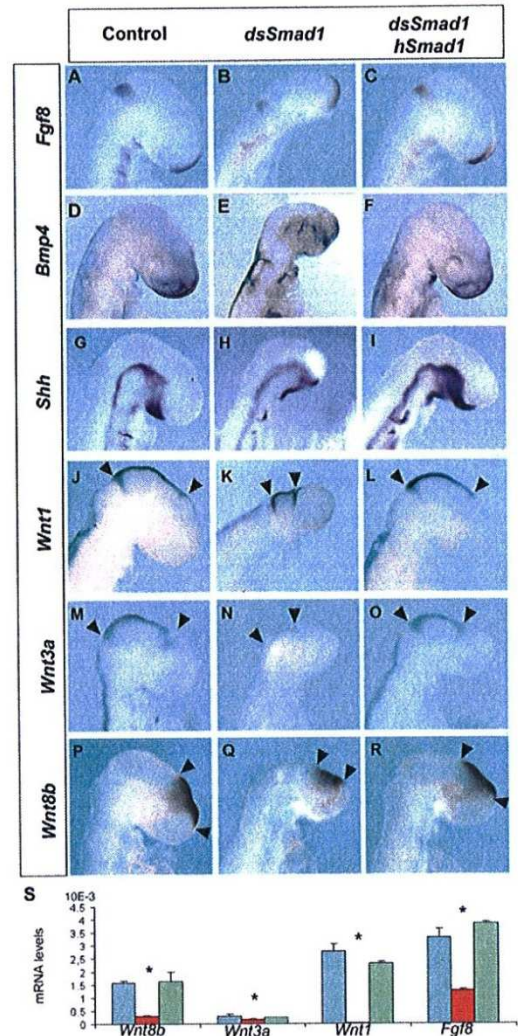


Fig. 4. Modulation of morphogen activity after *Smad1* silencing.

(A-R) Lateral views of hybridisations in control, *dsSmad1*- and *dsSmad1+hSmad1*-transfected embryos for *Fgf8* (A-C), *Bmp4* (D-F), *Shh* (G-I), *Wnt1* (J-L), *Wnt3a* (M-O) and *Wnt8b* (P-R). Arrowheads indicate the domain of expression. (S) Quantification of *Wnt8b*, *Wnt3a*, *Wnt1* and *Fgf8* expression in control (blue), *dsSmad1*-treated (red) and *dsSmad1+hSmad1*-transfected (green) embryos determined by qRT-PCR (means \pm s.e.m.; * $P < 0.0125$).

impact on brain patterning (Vieira and Martinez, 2006). In *dsSmad1*-treated embryos, *Shh* expression was not reduced, but was maintained in proportion with the global prosencephalic hypoplasia (Fig. 4G-I; $n=12$).

At the dorsal midline, Wnt signalling is essential for fore- and midbrain patterning (Erter et al., 2001; Braun et al., 2003; Creuzet et al., 2004). *Wnt1*, which is expressed at the dorsal midline and by a strand of cells adjacent to the isthmus, was reduced dorsally in *dsSmad1*-electroporated embryos (Fig. 4J-L, arrowheads). *Wnt3a*, which has an overlapping domain of expression with *Wnt1* at the midline, was absent in *dsSmad1*-electroporated embryos (Fig. 4M-O, arrowheads; $n=13$). *Wnt8b*, expression of which dorsally straddles

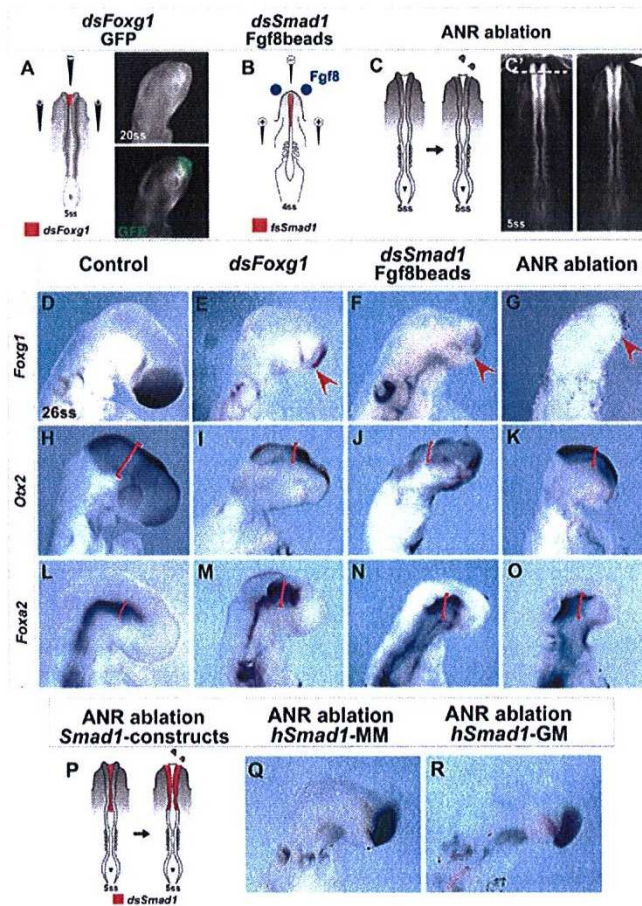


Fig. 5. Control of *Foxg1* expression by *Smad1* activity in the FNC. (A) Bilateral electroporation of *dsFoxg1* in the telencephalon at 5ss (left). GFP labelling of electroporated site on lateral view at 20ss (right). (B) *dsSmad1* bilateral electroporation in the FNC (red) and Fgf8-soaked beads implantation in the ANR (blue). (C, C') ANR ablation (dashed line; arrowhead) at 5ss. (D-O) Hybridisation at 26ss for *Foxg1* (D-G), *Otx2* (H-K) and *Foxa2* (L-O) in control (D, H, L), *dsFoxg1*-transfected (E, I, M), *dsSmad1*-transfected+Fgf8-supplemented (F, J, N) and ANR-ablated embryos (G, K, O). (P) ANR ablation and FNC electroporation with constructs driving mutated forms of *Smad1* at 5ss (red). (Q, R) Hybridisation for *Foxg1* in *hSmad1*-MM- (Q) and *hSmad1*-GM- (R) transfected embryos at 26ss.

the anterior diencephalon and posterior telencephalon, was decreased in both vesicles after *Smad1* silencing (Fig. 4P-R; $n=12$). Changes in gene expression were quantified by qRT-PCR (Fig. 4S): *Smad1* silencing significantly affected the activity *Fgf8* ($Fgf8\Delta=60\%$), *Wnt1* ($Wnt1\Delta=40\%$), *Wnt3a* ($Wnt3a\Delta=80\%$) and *Wnt8b* ($Wnt8b\Delta=30\%$). Therefore, these results indicated that *Smad1* silencing primarily affected Fgf and Wnt production in the developing brain.

***Foxg1* loss of function reproduces *Smad1* silencing in the FNC**

To explore whether the loss of *Foxg1*, on its own, can have an effect on the expression of *Otx2* and *Foxa2*, *Foxg1* expression was silenced in the telencephalon, specifically, leaving FNC cells unperturbed. dsRNA designed against *Foxg1* (*dsFoxg1*) was bilaterally electroporated at 5ss (Fig. 5A). At 26ss, *Foxg1* activity was abrogated in the prosencephalon (Fig. 5D,E; $n=18$); additionally, *Otx2* expression was limited to the roof-plate (Fig. 5H,I, red brackets; $n=12$) and *Foxa2* expression expanded in the lateral aspects of the di- and mesencephalon (Fig. 5L,M, red brackets; $n=13$). So, *Foxg1* silencing in telencephalon interfered with the patterning of more caudal structures, the thalamus and the optic tectum through the regulation of *Otx2* and *Foxa2*. This condition virtually recapitulated the molecular changes resulting

from *Smad1* inactivation in FNC cells (compare with Fig. 3). These observations indicated that, in normal development, the regulation of *Foxg1* activity is central to the molecular patterning of the pre-otic brain.

Dissecting the interactions involved in *Foxg1* expression

Current understanding of prosencephalon development suggests a direct relationship between *Fgf8* activity from the ANR and the induction of *Foxg1* expression in the ANR and its expansion to the entire telencephalon (Shimamura and Rubenstein, 1997; Houart et al., 1998; Hoch et al., 2009; Anderson et al., 2002). Therefore, we tested if supplying *Fgf8* could bypass the effect of *Smad1* silencing and rescue *Foxg1* expression in *dsSmad1*-electroporated embryos. Beads soaked with Fgf8 recombinant protein (0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) were implanted in contact with the ANR in a 4ss embryo subjected to *Smad1* silencing (Fig. 5B). This concentration has been previously shown to restore cephalic development efficiently when endogenous expression of Fgf8 in ANR was abolished after FNC ablation (Creuzet et al., 2006). Here, despite Fgf8 supplementation, no restoration of telencephalic development occurred and *Foxg1* expression was absent, as in *Smad1*-silenced embryos (Fig. 5D,F; $n=9$). In addition, the domain of *Otx2* expression exhibited no restoration and remained similar to that in *dsSmad1*-electroporated embryos, and *Foxa2* expression did not

tend to normalise (Fig. 5H,J,L,N; $n=9$). Altogether, our results indicated that *Foxg1* activity in the telencephalon does not solely depend on the production of *Fgf8* in ANR, but relies on a more complex mechanism, which involves FNC cells, for its induction and expansion.

Stimulating *Smad1* activity in FNC cells can rescue *Foxg1* expression in the telencephalon

To decipher the mechanisms responsible for *Foxg1* expression in the telencephalon, we performed surgical ablation of the ANR at 5ss, before FNC cell migration (Fig. 5C,C'). At 26ss, the morphology of the telencephalon was atrophied, and *Foxg1* expression was abolished in ANR-ablated embryos (Fig. 5G), as previously reported (Shimamura and Rubenstein, 1997). Additionally, *Otx2* and *Foxa2* expressions were perturbed and displayed a pattern similar to that observed in *dsSmad1*- and *dsFoxg1*-electroporated embryos (Fig. 5I,K,M,O; compare with Fig. 3E,H).

To examine if FNC cells could regulate *Foxg1* expression in the telencephalon independently of the production of *Fgf8* in the ANR, we transfected mutated forms of *hSmad1* in FNC cells to rescue the molecular patterning of the pre-otic brain in ANR-ablated embryos (Fig. 5P). These constructs have been previously designed to mimic constitutive activation in the linker region for the Mapk (*hSmad1*-MM) and Gsk3 (*hSmad1*-GM) pathways, respectively (Fuentealba et al., 2007). When electroporated in FNC cells of ANR-ablated embryos, these constructs generated a potent restoration of *Foxg1* activity in the telencephalon (Fig. 5Q,R). Hence, the regulation of *Smad1* activity by the Fgf and Wnt pathways in FNC cells is essential to establish the domain of *Foxg1* expression in the developing prosencephalon.

Smad1 regulates the activity of Bmp antagonists in FNC cells

Previously, we have demonstrated that FNC cells play a crucial role in brain development by counteracting Bmp activity through the production of Bmp inhibitors (Creuzet, 2009). *Noggin*, a potent antagonist of Bmps is expressed in FNC cells before their migration and in FNC-derived mesenchyme of the naso-frontal and the retroocular region (Tzahor et al., 2003). In *Smad1*-silenced embryos, a strong reduction of *Noggin* activity was shown by RT-PCR at 26ss (Fig. 6A,B). This change was correlated with the loss of *Foxg1* and the misexpression of *Otx2* and *Foxa2* (Fig. 6B). RT-PCR and whole-mount hybridisation also revealed that *Smad1* silencing affected *Noggin* activity: its expression was downregulated as early as 5ss (2 h after *dsSmad1* electroporation; Fig. 6C,D). In the same way, *Gremlin*, another potent Bmp inhibitor (Merino et al., 1999), was also downregulated after *Smad1* silencing (Fig. 6E,F). Altogether, these observations showed that *Smad1* expression in FNC was crucial for the regulation of Bmp inhibitors from neurula stage up to 26ss.

To test the possible role of Bmp signalling in regulating *Foxg1* expression, the activity of *Noggin* and *Gremlin* was simultaneously silenced (*dsNoggin/dsGremlin*) in the FNC at 4ss. The joint inactivation of *Noggin* and *Gremlin* resulted in loss of *Foxg1* expression, together with misexpression of *Otx2* and *Foxa2* (Fig. 6G-N; $n=9$). These experiments indicated that loss of *Noggin* and *Gremlin* expression in FNC cells are involved in the molecular changes consecutive to *Smad1* silencing, therefore showing that *Smad1* expression controls the expression of Bmp antagonists produced by migratory FNC cells.

We then tried to rescue *Smad1* silencing with the joint electroporation of retroviral RCAS constructs driving *Gremlin* and *Noggin* expression (Fig. 6O). As a consequence, the cephalic

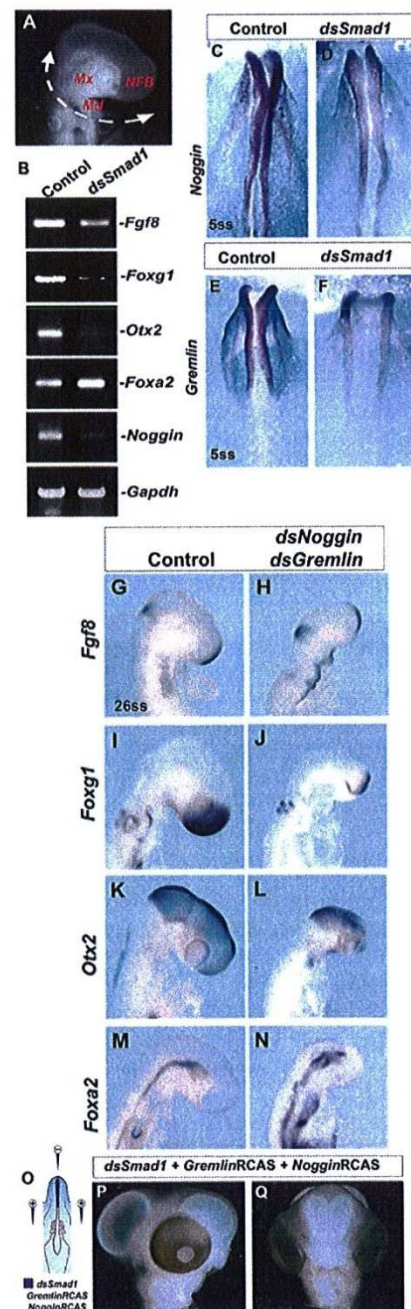


Fig. 6. *Smad1* expression controls *Noggin* and *Gremlin* activity. (A,B) Pre-otic head taken from a 26ss embryo (A) and subjected to RT-PCR analysis (B). (C-F) Hybridisation for *Noggin* (C,D) and *Gremlin* (E,F) in control and *dsSmad1*-silenced embryos. (G-N) Side views showing hybridisations for *Fgf8* (G,H), *Foxg1* (I,J), *Otx2* (K,L) and *Foxa2* (M,N) in controls and *Noggin*- and *Gremlin*-silenced embryos. (O-Q) Co-electroporation (O) of *dsSmad1*-, *Gremlin*+*Noggin*-RCAS. (P,Q) Profile (P) and frontal (Q) views showing rescued phenotype: *Gremlin*-*Noggin* expression bypass *Smad1* silencing to restore development of telencephalic hemispheres at E5. NFB, fronto-nasal bud; Md, mandibular process; Mx, maxillary process.

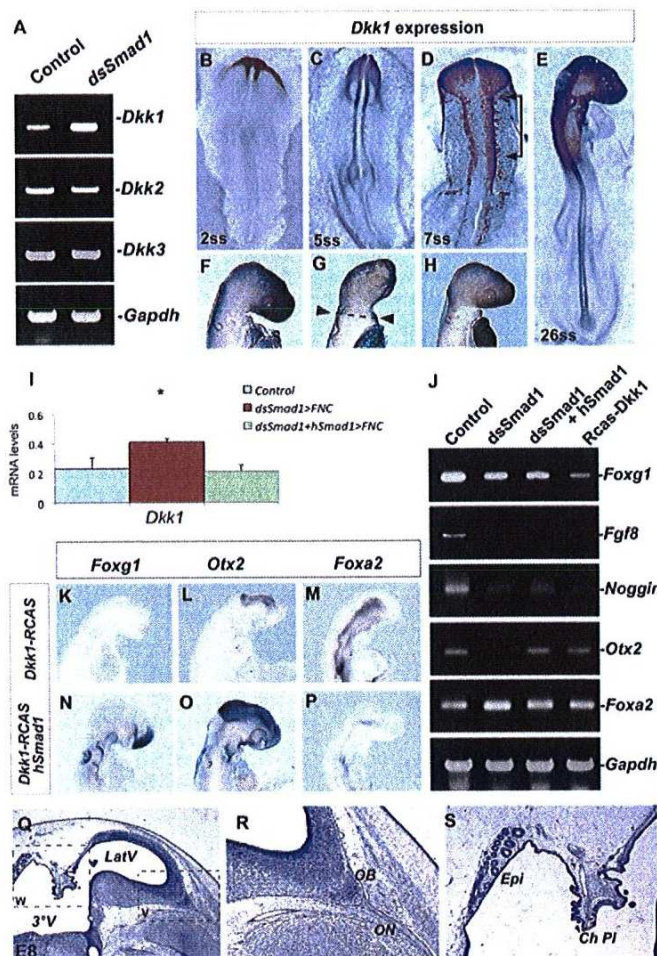


Fig. 7. Control of *Dkk1* expression by *Smad1* is essential for telencephalic development. (A) RT-PCR analysis of *Dkk1*, *Dkk2*, *Dkk3* gene expression in control and *dsSmad1*-treated embryos. (B-E) *Dkk1* is expressed in the head process at 2ss (B) and in the FNC and surface ectoderm at 5ss (C). *Dkk1* is expressed in migratory FNC cells at 7ss (D; arrow) and in FNC-derived mesenchyme at 26ss (E). (F-H) Lateral view showing hybridisation for *Dkk1* in control (F), *dsSmad1*-transfected (G) and *dsSmad1/hSmad1*-transfected (H) embryos. Dashed line in G delineates the distinct levels of *Dkk1* expression in pre-otic versus post-otic territories. (I) Quantification of *Dkk1* expression in control (blue), *dsSmad1*-treated (red) and *dsSmad1+hSmad1*-treated (green) embryos (mean±s.e.m.; * $P < 0.0125$). (J) RT-PCR showing expression of *Foxg1*, *Fgf8*, *Noggin*, *Otx2* and *Foxa2* in control and *dsSmad1*-, *dsSmad1+hSmad1*-, *Dkk1*-RCAS-transfected embryos. *Gapdh* is used as a normalizing gene. (K-P) Side view of hybridisation for *Foxg1* (K,N), *Otx2* (L,O) and *Foxa2* (M,P) in *Dkk1*-RCAS-electroporated (K-M) and *Dkk1*-RCAS/*hSmad1*-co-electroporated (N-P) embryos. (Q-S) Para-sagittal sections of *Dkk1*-RCAS/*hSmad1*-co-electroporated embryos showing rescued brain at E8. (R) The olfactory bulb (OB) and nerve (ON) have developed. (S) Along the diencephalic roof plate, choroid plexi (Ch PI) and epiphysis (Epi) have formed. LatV, lateral ventricle; 3^oV, third ventricle.

development tended to normalise: the telencephalon was no longer a holoprosencephalic vesicle, but developed as two hemispheres (Fig. 6P,Q; $n=8$). The rescued phenotypes showed that restoration of *Gremlin* and *Noggin* expression could bypass the defects of *Smad1* silencing. Altogether, these experiments bring compelling evidence that *Gremlin* and *Noggin* can together restore normal head and brain development, and act downstream of *Smad1* in FNC cells in this process.

***Dkk1* expression in the FNC is subjected to *Smad1* activity**

Another consequence of *Smad1* silencing was the upregulation of *Dkk1* expression in the FNC cell population at 26ss, while the level of *Dkk2* and *Dkk3* remained unchanged (Fig. 7A). *Dkk1*, a potent Wnt inhibitor, is required for the development of the anterior cephalic structures (Mukhopadhyay et al., 2001). In chick, *Dkk1* transcripts were detected in the NF and emigrating FNC cells (Fig. 7B-E), then became evenly distributed in the FNC-derived mesenchyme populating facial processes, thus leading to homogeneous staining of the developing head at 26ss (Fig. 7F). In *Smad1*-silenced embryos, increased activity of *Dkk1* was also demonstrated by *in situ* hybridisation: embryos exhibited a sharp difference in the level of *Dkk1* expression between the pre-otic head and the more caudal branchial arches, which were left unperturbed

after *Smad1* silencing (Fig. 7G, dashed line; $n=7$). The upregulation of *Dkk1* was further confirmed by qRT-PCR analysis at 26ss ($Dkk1\Delta=1.8$ -fold higher than in control; Fig. 7I).

To understand the functional significance of *Dkk1* upregulation for brain patterning, a construct driving *Dkk1* expression (*Dkk1*-RCAS) was transfected into FNC cells at 5ss. Under this condition, the upregulation of *Dkk1* induced the same alterations in *Foxg1*, *Otx2* and *Foxa2* expression (Fig. 6 and Fig. 7J-M; $n=9,7,8$, respectively) as those triggered by *Smad1* silencing, thus indicating that changes in *Dkk1* activity in *dsSmad1* embryos accounted for the defects in brain patterning.

To explore the epistatic relationship between *Smad1* and *Dkk1* activity, we tried to restore brain patterning by forcing the expression of *hSmad1* in combination with *Dkk1*-RCAS in FNC cells at 5ss. When analysed at 26ss, embryos showed a significant rescue of *Foxg1*, *Otx2* and *Foxa2* expression (Fig. 7N-P). Restoration of the development of anterior and dorsal structures at the tel- and diencephalic level occurred at E8 (Fig. 7Q-S; compare with Fig. 2J,L). Therefore, we show that *Dkk1* expression in the FNC-derived mesenchyme is regulated by *Smad1* activity. These results also indicated that the adverse effects of *Smad1* silencing on brain development were due to the increased expression of *Dkk1* in FNC cells.

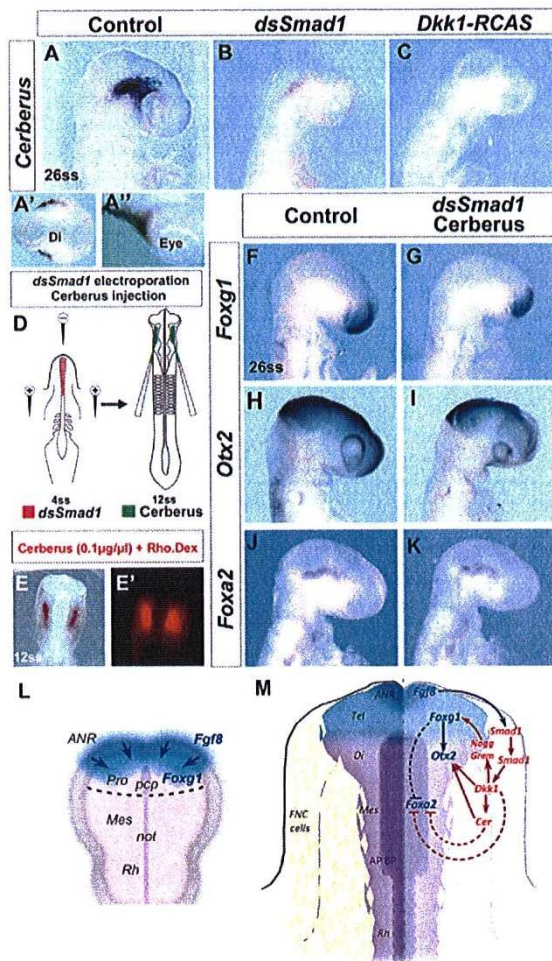


Fig. 8. Cerberus supplementation overcomes brain defects of *Smad1* silencing. (A-C) Side view of hybridisation for *Cerberus* in control, *dsSmad1*- and *Dkk1*-RCAS-transfected embryos at 26ss. (A', A'') Vibratome section showing *Cerberus* expression in peri-ocular mesenchyme at 26ss. (D) *Smad1* silencing in the FNC at 4ss followed by bilateral injection of Cerberus protein into FNC-derived mesenchyme at 12ss. (E, E') Cerberus protein contrasted with Rhodamine Dextran. (F-K) Hybridisation for *Foxg1* (F, G), *Otx2* (H, I) and *Foxa2* (J, K) in control and *dsSmad1*-transfected+*Cerberus*-injected embryos. Note the significant rescue of the gene expression in the developing forebrain after *Cerberus* injection. (L) Model of interactions adapted from Shimamura and Rubenstein (Shimamura and Rubenstein, 1997) suggesting a direct induction of *Foxg1* in the neuroepithelium by *Fgf8* from the ANR. (M) Proposed model for the regulation of *Foxg1* expression by the FNC cells. For clarity, anatomical structures are on the left and interactions are on the right. *Fgf8* from the ANR interacts with *Smad1* in FNC cells, which controls *Dkk1* expression, acting upstream of *Noggin* and *Gremlin* for the induction of *Foxg1* expression in the telencephalon. *Foxg1* expression maintains the balance between *Otx2* and *Foxa2*. *Dkk1* also controls *Cerberus* activity in the retroocular region, which regulates *Otx2* and *Foxa2* expression in the *dl* mesencephalon. Positive and negative regulations are indicated with solid and dashed lines, respectively. Regulations originating from the neuroepithelium are in dark blue; regulations by the FNC cells are in red. ANR, anterior neural ridge; AP, alar plate; BP, basal plate; Di, diencephalon; FNC, facial neural crest; Grem, Gremlin; Mes, mesencephalon; Nogg, Noggin; not, notochord; pcp, pre-chordal plate; Pro, prosencephalon; Rh, rhombencephalon; Tel, telencephalon.

2502

Regulation of *Cerberus* expression by *Dkk1* is required for *Otx2* and *Foxa2* expression

In *Smad1*-depleted embryos, the activity of *Cerberus*, which is known to interfere with Bmp and Wnt signalling (Bouwmeester et al., 1996), was examined at 26ss; its transcripts are normally accumulated in FNC cells that populate the retro- and peri-ocular region (Fig. 8A). After *Smad1* silencing, *Cerberus* activity was totally inhibited (Fig. 8B; $n=10$). Similarly, when *Dkk1* was over-expressed in FNC cells, the expression of *Cerberus* totally disappeared from the retroocular region (Fig. 8C; $n=8$). Together, these experiments indicated that *Smad1* expression in FNC impinges on *Dkk1* activity, which, in turn, interferes with *Cerberus* expression.

To see if the loss of *Cerberus* activity can have an effect on brain patterning, we tried to rescue the defects generated by *Smad1* silencing on brain development by injecting *Cerberus* protein. After electroporation of *dsSmad1* molecules at 4ss (Fig. 8D), we injected a solution of *Cerberus* recombinant protein (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) contrasted with Rhodamine Dextran at 12ss (Fig. 8D,E). Injection was performed bilaterally in a sub-ectodermal location in order to deliver *Cerberus* protein into the migration routes of FNC cells.

Supplying *dsSmad1*-treated embryos with *Cerberus* resulted in a potent rescue of the morphological defects: development of the pre-otic vesicles was significantly restored. At 26ss, the expression of *Foxg1* tended to normalise (Fig. 8F,G; $n=9$). Furthermore, *Otx2* and *Foxa2* expression nearly recovered a normal pattern in the di- and mesencephalon (Fig. 8H-K). Hence, *Cerberus* activity in FNC cells is required for *Foxg1* regulation in the telencephalon and maintains *Otx2* and *Foxa2* expression at di/mesencephalic level.

DISCUSSION

In this work, we have explored the role of the FNC in brain development by knocking down the expression of a signalling transducer, *Smad1*, which complexes with specific DNA-binding proteins to regulate gene expression. *Smad1* belongs to a large family of cytoplasmic mediators for which translocation to the nucleus is triggered by the activity of $\text{Tg}\beta\text{f}$ signalling. *Smad1* expression, strongly detected in the FNC at the neural plate border, declines while FNC cells migrate, then increases in intensity and persists in the FNC-derived mesenchyme populating facial processes until E5.

To investigate the molecular mechanisms by which *Smad1* expression in the FNC affects the developmental programme of cephalic vesicles, we silenced its activity, when its expression is maximal in FNC cell population. dsRNA-driven silencing had efficiently inhibited *Smad1* activity in FNC cells by 1.5 hours following electroporation, and generated conspicuous defects in brain development 24 h later (at 25ss). These defects included microcephaly, which encompasses fore- and midbrain but was particularly pronounced at telencephalic level. The telencephalon dramatically drops to 40% of its normal size. Hemispheres display partial holoprosencephaly, with a vestigial septal region and atrophied choroid plexi. Additionally, *Smad1*-depleted embryos display severe microphthalmia.

These early morphological defects coincide with the downregulation of *Fgf8* in the ANR and the complete loss of *Foxg1* expression in the prosencephalon. *Foxg1* is an early marker of cephalic development, which features the anterior neural plate at gastrula stage in chordates (Merino et al., 1999; Toresson et al., 1998). However, the expansion of its expression to the entire telencephalon is specific to vertebrates.

The effect of ANR in telencephalic specification was first investigated by explants and microsurgical experiments showing the leading role played by this discrete territory in forebrain

specification (Shimamura and Rubenstein, 1997) (Fig. 8L). The morphogenetic action of what was then referred to as the 'prosencephalic organiser' was assigned to the production of *Fgf8* at this level (Shimamura and Rubenstein, 1997; Houart et al., 1998; Shanmugalingam et al., 2000; Storm et al., 2006). The cooperation between *Fgf8* and *Foxg1* allows for the telencephalon to become secondarily specified from the primary prosencephalon (Rubenstein et al., 1998; Rubenstein and Beachy, 1998; Vieira and Martinez, 2006).

The cerebral defects encountered in our *Smad1*-depleted embryos virtually reproduce the anomalies encountered in *Foxg1* mutants (Xuan et al., 1995). However, in *Smad1*-depleted embryos, supplementation with *Fgf8* recombinant protein has no effect on *Foxg1* expression and telencephalic development. This indicates that the morphogenetic regulation exerted by FNC cells is crucial for specification of the rostral prosencephalon by stimulation of *Foxg1* expression.

To unravel the involvement of the FNC in the regulation of *Foxg1*, we performed ablation of the ANR at 5ss, before the onset of FNC cell migration: the predictable loss of *Foxg1* expression ensued. By contrast, when mutated forms of *Smad1*, which mimic the activation of the *Fgf8* or *Wnt* pathways, were transfected into the FNC cells at the time of ANR ablation, a potent rescue of telencephalic development occurred together with restoration of *Foxg1* expression.

Additionally, misregulation of *Foxg1* in the telencephalon was accompanied by perturbations in *Otx2* and *Foxa2* activity in thalamus and tectum, where their expression pattern characterises the alar and basal plate, respectively. *Otx2* is an important marker of dorsal patterning of the fore- and midbrain (Kimura et al., 2001, 2005). Its activity is antagonised by the expression of *Foxa2* in the di/mesencephalic basal plate (Weinstein et al., 1994; Nakano et al., 2000).

In the absence of the FNC, a considerable expansion of *Shh* expression occurs along with a conspicuous ventralisation of the cephalic neuroepithelium (Creuzet et al., 2004). Similarly in the present experiments, *Smad1* silencing also results in a potent ventralisation of the pre-otic brain, as attested by the thickening of the ventral structures at E8. This early phenotype coincides with the lateral expansion of *Foxa2* at the expense of *Otx2* expression, dorsally. Surprisingly, the domain of *Shh* expression remains unchanged whatever the experimental conditions examined. Hence, *Smad1* depletion in FNC decouples *Foxa2* and *Shh* expression in the di- and mesencephalic floor plate, and unmasks the divergent regulation of these two 'basal' markers.

Compared with the phenotype of *dsSmad1*-treated embryos, the outcome of cerebral structures in *Foxg1*-depleted embryos was similar, indicating that the molecular changes in *Otx2* and *Foxa2* primarily stem from the downregulation of *Foxg1*. So, our data uncover an unappreciated role of *Foxg1* in the patterning of the thalamus and tectum through the regulation of *Otx2* and *Foxa2*. These observations reveal that these two genes are subjected to regulation by the telencephalic neuroepithelium. The loss of *Foxg1* function in the telencephalon prejudices the relationship between *Otx2* and *Foxa2* expression, hence reproducing the effects of *Smad1* silencing in FNC cells.

In humans, mutations in *FOXG1* are causally linked to microcephaly and mental retardation, regression of language and manual skills, in atypical Rett and 14q12 microdeletion syndromes (Papa et al., 2008; Allou et al., 2012). But, the cerebral phenotype resulting from *Smad1* silencing in the FNC is also evocative of the deficits encountered in septo-ocula dysplasia (de Morsier, 1956). This syndrome may be caused by heterozygous mutations of *OTX2* (Ragge et al., 2005). Under this condition, syndromic phenotypes encompass severe microphthalmia and cerebral midline defects; these include agenesis of the septum and/or corpus callosum, which

together lead to cortical malformations and intellectual deficits. Therefore, our results suggest that atypical Rett syndromes and some related disorders, which involve misregulations of *FOXG1* and *OTX2*, could be neurocristopathic in origin. The overlapping spectrum of cephalic defects encountered in these congenital disorders hints at convergent mechanisms responsible for the clinical pictures of these syndromes and their variant forms. However, the rationale accounting for the shared defects generated by different mutations remain unknown. Here, we show that the FNC exerts a key role in controlling the telencephalic expression of *Foxg1*, which then impinges on *Otx2* activity in the pros- and mesencephalon. Our data put forward an ontogenic scenario, which sheds a new light on the molecular control of these transcription factors by the FNC (Fig. 8M). By building up a network of patterning interactions between the FNC and the developing brain, this study may open new avenues for understanding the aetiology of related intellectual deficits in the light of FNC dysfunctions.

MATERIALS AND METHODS

Avian embryos and surgical procedures

Chick embryos used as a model throughout this study were staged according to the number of somite pairs (ss). Experiments were performed either at 4ss for *in ovo* electroporation of premigratory FNC cells, at the 5- to 6-somite stage for ANR ablation or at 10ss for Cerberus protein supplementation. Ablation of the ANR was achieved by using glass micro-scalpels, and was performed either alone or immediately after FNC electroporation. The limit of excision was defined according to the fate map of the cephalic NF (Couly and Le Douarin, 1985, 1987).

In ovo electroporation

Electroporation was achieved using a triple electrode system placed on the vitelline membrane with the two cathodes flanking the developing head with a gap of 5 mm, and the anode facing the anterior neuropore (Creuzet et al., 2002). Before electroporation, nucleic acids were contrasted with a solution of 0.01% Fast Green FCF (Sigma) to control the site of injection, then headed for the targeted tissues by a series of five square pulses of 27 V (T830 BTX, Genetronics). After electroporation, eggs were sealed and incubated at 38°C until reaching the stage required for analysis.

Nucleic acid preparation

Gene silencing was performed by electroporating dsRNA. In mammals, dsRNA yields a non-specific blockade of protein synthesis (Billy et al., 2001; Elbashir et al., 2001). However, in chick, no such effects were ever detected; dsRNA electroporation resulted in highly specific gene inactivation (Pekarik et al., 2003; Stoeckli, 2003). For each series, efficacy of the silencing was analysed by *in situ* hybridisation, RT-PCR and qRT-PCR.

Sense and antisense strands of RNA were synthesised from the cDNA encoding for the targeted gene (Pekarik et al., 2003). After elimination of the cDNA template, single strands were purified and annealed for 5 min at 95°C. dsRNA against *Smad1*, *Foxg1*, *Noggin* and *Gremlin* (Gont and Lough, 2000; Bardot et al., 2001; Li and Vogt, 1993; Osorio et al., 2009) were used at 0.33 µg/µl, 0.4 µg/µl, 0.25 µg/µl and 0.25 µg/µl, respectively. In the control series, solutions of non-annealed sense and anti-sense RNA strands of the targeted genes were transfected at the same concentration as in the experimental series.

For gain-of-function experiments, the following plasmid and RCAS constructs were used: pCAGGS-GFP (Momose et al., 1999), *hSmad1* (human *SMAD1* wild type) at 1.1 µg/µl, *hSmad1-MM* (human *SMAD1* mutated in the three MAPK sites of the linker region) at 1.25 µg/µl, *hSmad1-GM* (human *SMAD1* mutated in the four Gsk3 sites of the linker region) at 1.25 µg/µl (Fuentelba et al., 2007), *Dkk1-RCAS* at 1.1 µg/µl (Chang et al., 2004), *Gremlin-* and *Noggin-RCAS* at 1 µg/µl (Creuzet, 2009). RCAS constructs used in this study allow for the overexpression of the insert but do not produce viral particles. The ectopic gene activity is therefore restricted to the FNC cells and their progenies.

Supplementation with recombinant proteins

Depending on the series, protein supplementation of *dsSmad1*-electroporated embryos was delivered by either injecting a solution or implanting soaked beads. A solution of Cerberus protein (0.100 µg/µl in PBS; R&D Systems) contrasted with 0.01% Rhodamine Dextran (Sigma) was bilaterally injected into the migration routes of FNC cells, adjacent to the di- and mesencephalic vesicles. For Fgf8 supplementation, beads were soaked in a solution of Fgf8 recombinant protein (0.125 µg/µl; R&D Systems) overnight at 4°C, then bilaterally implanted in contact with the ANR. This concentration has been shown to induce a potent rescue of head and brain development after FNC ablation (Creuzet et al., 2004).

In situ hybridisation

Whole-mount *in situ* hybridisations (Creuzet et al., 2006) were performed using the following probes: *Bmp4* (Francis et al., 1994), *Cerberus* (provided by Dr Ricardo Garcez, Institut de Neurobiologie, France), *Smad1*, *Smad5* (Gont and Lough, 2000), *Foxg1* (Chapman et al., 2002), *Six3* (Geng et al., 2008), *Pax6* (Walther and Gruss, 1991), *Foxa2* (Ruiz i Altaba et al., 1995), *Fgf8* (Crossley et al., 1996), *Gremlin*, *Noggin* (Connolly et al., 1997), *Otx2* (Boncinelli et al., 1993), *Shh* (Riddle et al., 1993), *Wnt1*, *Wnt3a* (Hollyday et al., 1995), *Wnt8b* (Garcia-Lopez et al., 2004).

Whole-mount staining and immunocytochemistry

FNC cell migration and cell proliferation were demonstrated by immunocytochemistry with monoclonal antibodies against HNK1 (CD57; Santa Cruz Biotechnology) and pH3 (Sigma), and detected with Alexa Fluor 488- and Alexa Fluor-594-labelled secondary antibodies (Life Technology, Invitrogen). Cell death was detected by Lysotracker Red (LTR; Invitrogen) staining prior to fixation (Garcez et al., 2014). Quantification of cell proliferation and death was performed on vibratome sections using ImageJ software.

Histology

Embryos were fixed in a solution of 60% ethanol, 30% formaldehyde (37%, stock solution) and 10% acetic acid (100%, stock solution), for 24 h, dehydrated in ethanol, permeabilised in toluene and embedded in paraffin. Cresyl Violet staining was performed on 7-µm-thick sections.

RT-PCR analysis and *Dkk1* probe construction

Total RNA was isolated from 25ss pre-otic heads in Trizol Reagent (Invitrogen). cDNA was obtained with MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) and oligodT12-18 primers. Amplification was performed from 1 µg cDNA, using specific primer pairs for *Fgf8* (For: cctctcctctctctctcag; Rev: ctctcgggtgaagggtga), *Foxg1* (For: ctccgtgaacctctctgccc; Rev: ggccc-tggcctcatcgaag), *Otx2* (For: accaaaccgctctctggaagt; Rev: cccacggcctc-acaacct), *Foxa2* (For: cctctcgtctcctcaggtggt; Rev: aaggcaaacgggggaccc), *Noggin* (For: agctcgcaggaagctcag; Rev: acgtaccggggccaaaagc), *Dkk1* (For: gcaacttccagcggcact; Rev: ctccacagcggggctaga), *Dkk2* (For: aggtga-tcctctcctcgggt; Rev: agcagcagcaccattgtgaa) and *Dkk3* (For: gctcgtatggagg-acacga; Rev: tgcacatggcagcgtctca).

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis of gene expression

Quantifications were performed on seven control, six *dsSmad1*-treated and seven rescued embryos. Primer pairs (Invitrogen) were designed specifically for each gene: *Smad1* (For: aacatgatgccaccggaat; Rev: gatcgttgga-agagggcat), *Fgf8* (For: gtacgagggctgtatcag; Rev: cggttgaagggtatgtgag), *Foxg1* (For: caacgcctcatcatgatg; Rev: ttgagagagaggtgtgctg), *Otx2* (For: accagcgcaggttttag; Rev: gaggctggagactggttag), *Foxa2* (For: cctctaccg-ccagaaccag; Rev: caaacatgttcccagctc), *Pax6* (For: tcagcacaagcgtttaccag; Rev: ggttcatagggcaggtttg), *Wnt1* (For: aatgggcaactgggtgtct; Rev: cctcaggg-gtcatctacgg), *Wnt3a* (For: ggagatcatgccagcgtag; Rev: gcgattcctgttag-cttt), *Wnt8b* (For: gaactgcagcctggagatt; Rev: tctccagggcattccacaac) and *Dkk1* (For: ccggagcagaaggttttct; Rev: gtaccagctcccctctg). Quantitative PCR reactions were performed using LightCycler (Roche), and sample analysis was carried out in triplicate. Ct values were obtained by using Promega software (v.2.0.4) and relative quantifications ($\Delta\Delta Ct$) normalised

to *Gapdh* gene activity. Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism5.0 software assuming a confidence interval of 95%, and compared using the non-parametric Mann-Whitney U-test.

Morphometric analysis

Brain growth was estimated on E4 embryos by measuring the distance from the optic stalk to the top of each cephalic vesicle: telencephalon, thalamus and optic tectum. Data from control, *dsSmad1*-electroporated and *dsSmad1/hSmad1*-co-transfected embryos were compared using one-way ANOVA and analysed with the GraphPad Prism 4.0 software.

Acknowledgements

The authors thank Profs Le Douarin and Moura Neto for their support, advices and critical reading of the manuscript and to Prof. De Robertis for kindly providing *Smad* constructs. They also thank Drs Chapman, Kiecker, Lough and Wideltz for providing plasmids.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

D.P.A. performed experiments and data analysis, and prepared the manuscript; S.G. performed experiments and data analysis; S.C. developed concepts and approaches, performed experiments and data analysis, and prepared the manuscript.

Funding

D.P.A. held fellowships from CAPES-College Doctoral Franco-Brésilien, Fondation des Treilles and Institut Necker Paris. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and grants from the National Funding Agency for Research (ANR) [ANR-Bian-0153], Soutien à l'Encadrement de Thèse en Colutelle (SETC) (Ile-de-France) and Association Française du Syndrome de Rett (AFSR) [2012-05].

References

- Acamora, D., Avantsgiato, V., Tuorto, F., Briata, P., Corte, G. and Simeone, A. (1998). Visceral endoderm-restricted translation of *Otx1* mediates recovery of *Otx2* requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation. *Development* **125**, 5091-5104.
- Allou, L., Lambert, L., Amsalem, D., Bieth, E., Edery, P., Destree, A., Rivier, F., Amor, D., Thompson, E., Nicholl, J. et al. (2012). 14q12 and severe Rett-like phenotypes: new clinical insights and physical mapping of FOXP1 regulatory elements. *Eur. J. Hum. Genet.* **20**, 1216-1223.
- 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.
- Ang, S. L., Jin, O., Rhinn, M., Daigle, N., Stevenson, L. and Rossant, J. (1996). A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* **122**, 243-252.
- Bardot, B., Lecoq, L., Huillard, E., Calothy, G. and Marx, M. (2001). Expression pattern of the *drm/gremlin* gene during chicken embryonic development. *Mech. Dev.* **101**, 263-265.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Müller, U. and Filipowicz, W. (2001). Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14428-14433.
- Boncinelli, E., Gulisano, M. and Broccoli, V. (1993). *Emx* and *Otx* homeobox genes in the developing mouse brain. *J. Neurobiol.* **24**, 1356-1366.
- Bouwmeester, T., Kim, S. H., Sasaki, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**, 595-601.
- Braun, M. M., Etheridge, A., Bernard, A., Robertson, C. P. and Roelink, H. (2003). Wnt signaling is required at distinct stages of development for the induction of the posterior forebrain. *Development* **130**, 5579-5587.
- Chang, C.-H., Jiang, T.-X., Lin, C.-M., Burrus, L. W., Chuong, C.-M. and Wideltz, R. (2004). Distinct Wnt members regulate the hierarchical morphogenesis of skin regions (spinal tract) and individual feathers. *Mech. Dev.* **121**, 157-171.
- 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.
- Connolly, D. J., Patel, K. and Cooke, J. (1997). Chick noggin is expressed in the organizer and neural plate during axial development, but offers no evidence of involvement in primary axis formation. *Int. J. Dev. Biol.* **41**, 389-396.
- Couty, G. F. and Le Douarin, N. M. (1985). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev. Biol.* **110**, 422-439.

- Couly, G. F. and Le Douarin, N. M. (1987). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev. Biol.* **120**, 198-214.
- Creuzet, S. E. (2009). Regulation of pre-otic brain development by the cephalic neural crest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 15774-15779.
- Creuzet, S., Couly, G., Vincent, C. and Le Douarin, N. M. (2002). Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development* **129**, 4301-4313.
- Creuzet, S., Schuler, B., Couly, G. and Le Douarin, N. M. (2004). Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 4843-4847.
- Creuzet, S. E., Martínez, S. and Le Douarin, N. M. (2006). The cephalic neural crest exerts a critical effect on forebrain and midbrain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 14033-14038.
- Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A. and Martin, G. R. (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **84**, 127-136.
- Danesin, C., Peres, J. N., Johansson, M., Snowden, V., Cording, A., Papalopulu, N. and Houart, C. (2009). Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by Foxg1. *Dev. Cell* **16**, 576-587.
- de Morsier, G. (1956). Études sur les dysraphies, crâniocéphaliques. III. Agénésie du septum pellucidum avec malformation du tractus optique. La dysplasie septo-optique. *Schweiz. Arch. Neurol. Psychiatr.* **77**, 267-292.
- Echevarría, D., Vieira, C., Gimeno, L. and Martínez, S. (2003). Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Res. Rev.* **43**, 179-191.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Erter, C. E., Wilm, T. P., Basler, N., Wright, C. V. and Solnica-Krezel, L. (2001). Wnt8 is required in lateral mesodermal precursors for neural posteriorization in vivo. *Development* **128**, 3571-3583.
- Francis, P. H., Richardson, M. K., Brickell, P. M. and Tickle, C. (1994). Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* **120**, 209-218.
- Fuentealba, L. C., Elvers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E. M. and De Robertis, E. M. (2007). Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* **131**, 980-993.
- Garcez, R. C., Le Douarin, N. M. and Creuzet, S. E. (2014). Combinatorial activity of Six1-2-4 genes in cephalic neural crest cells controls craniofacial and brain development. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2149-2164.
- García-López, R., Vieira, C., Echevarría, D. and Martínez, S. (2004). Fate map of the diencephalon and the zona limitans at the 10-somites stage in chick embryos. *Dev. Biol.* **268**, 514-530.
- 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.
- Gont, L. and Lough, J. (2000). Differential expression of cSmad1 and cSmad5 in the primitive streak during chick embryo gastrulation. *Anat. Rec.* **260**, 102-105.
- Hanashima, C., Li, S. C., Shen, L., Lai, E. and Fishell, G. (2004). Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science* **303**, 56-59.
- Hoch, R. V., Rubenstein, J. L. and Pleasure, S. (2009). Genes and signaling events that establish regional patterning of the mammalian forebrain. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 378-386.
- Hollyday, M., McMahon, J. A. and McMahon, A. P. (1995). Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mech. Dev.* **52**, 9-25.
- Houart, C., Westerfield, M. and Wilson, S. W. (1998). A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature* **391**, 788-792.
- Kim, A. S., Lowenstein, D. H. and Pleasure, S. J. (2001). Wnt receptors and Wnt inhibitors are expressed in gradients in the developing telencephalon. *Mech. Dev.* **103**, 167-172.
- Kimura, C., Shen, M. M., Takeda, N., Aizawa, S. and Matsuo, I. (2001). Complementary functions of Obx2 and Cripto in initial patterning of mouse epiblast. *Dev. Biol.* **235**, 12-32.
- Kimura, J., Suda, Y., Kurokawa, D., Hossain, Z. M., Nakamura, M., Takahashi, M., Hara, A. and Aizawa, S. (2005). Emx2 and Pax6 function in cooperation with Obx2 and Obx1 to develop caudal forebrain primordium that includes future archipallium. *J. Neurosci.* **25**, 5097-5108.
- Le Douarin, N. M., Couly, G. and Creuzet, S. E. (2012). The neural crest is a powerful regulator of pre-otic brain development. *Dev. Biol.* **366**, 74-82.
- Li, J. and Vogt, P. K. (1993). The retroviral oncogene qin belongs to the transcription factor family that includes the homeotic gene fork head. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 4490-4494.
- Manuel, M., Martynoga, B., Yu, T., West, J. D., Mason, J. O. and Price, D. J. (2010). The transcription factor Foxg1 regulates the competence of telencephalic cells to adopt subpallial fates in mice. *Development* **137**, 487-497.
- Martynoga, B., Morrison, H., Price, D. J. and Mason, J. O. (2005). Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev. Biol.* **283**, 113-127.
- McMahon, A. P. and Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **62**, 1073-1085.
- Merino, R., Rodríguez-León, J., Macías, D., Ganay, Y., Economides, N. A. and Hurler, J. M. (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* **126**, 5515-5522.
- Momose, T., Tonegawa, A., Takouchi, J., Ogawa, H., Umehara, K. and Yasuda, K. (1999). Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev. Growth Differ.* **41**, 335-344.
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodríguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D. W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S. P. et al. (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev. Cell* **1**, 423-434.
- Nakano, T., Murata, T., Matsuo, I. and Aizawa, S. (2000). OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 64-70.
- Osoario, L., Teillet, M.-A. and Catala, M. (2009). Role of noggin as an upstream signal in the lack of neuronal derivatives found in the avian caudal-most neural crest. *Development* **136**, 1717-1726.
- Papa, F. T., Mencarelli, M. A., Caselli, R., Katzaki, E., Sampleri, K., Meloni, I., Ariani, F., Longo, L., Maggio, A., Balestri, P. et al. (2008). A 3 Mb deletion in 14q12 causes severe mental retardation, mild facial dysmorphism and Rett-like features. *Am. J. Med. Genet. A.* **146**, 1994-1998.
- Pekarik, V., Bourikas, D., Miglino, N., Joset, P., Preiswerk, S. and Stoeckli, E. T. (2003). Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat. Biotechnol.* **21**, 93-96.
- Plouhinec, J. L., Leconte, L., Sauka-Spengler, T., Bovolenta, P., Mazan, S. and Saule, S. (2005). Comparative analysis of gnathostome Otx gene expression patterns in the developing eye: implications for the functional evolution of the multigene family. *Dev. Biol.* **278**, 560-575.
- Ragge, N. K., Brown, A. G., Poloschek, C. M., Lorenz, B., Henderson, R. A., Clarke, M. P., Russell-Eggitt, I., Fielder, A., Gerrelli, D., Martínez-Barbera, J. P. et al. (2005). Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 1008-1022.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Lauffer, E. and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-1416.
- Rubenstein, J. L. R. and Beachy, P. A. (1998). Patterning of the embryonic forebrain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 18-26.
- Rubenstein, J. L. R., Shimamura, K., Martínez, S. and Puelles, L. (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**, 445-477.
- Ruiz i Altaba, A., Placzek, M., Baldassare, M., Dodd, J. and Jessell, T. M. (1995). Early stages of notochord and floor plate development in the chick embryo defined by normal and induced expression of HNF-3 beta. *Dev. Biol.* **170**, 299-313.
- Shanmugalingam, S., Houart, C., Pickler, A., Reifers, F., MacDonald, R., Barth, A., Griffin, K., Brand, M. and Wilson, S. W. (2000). Ace/Fgf8 is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon. *Development* **127**, 2549-2561.
- Shimamura, K. and Rubenstein, J. L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124**, 2709-2718.
- Stoeckli, E. T. (2003). RNAi in avian embryos. In *RNAi: A Guide to Gene Silencing* (ed. G. J. Hannon), pp. 297-312. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Storm, E. E., Garet, S., Borello, U., Hebert, J. M., Martínez, S., McConnell, S. K., Martin, G. R. and Rubenstein, J. L. R. (2006). Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development* **133**, 1831-1844.
- Tao, W. and Lai, E. (1992). Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain. *Neuron* **8**, 957-966.
- Torsson, H., Martínez-Barbera, J. P., Bardsley, A., Caubit, X. and Krauss, S. (1998). Conservation of BF-1 expression in amphioxus and zebrafish suggests evolutionary ancestry of anterior cell types that contribute to the vertebrate telencephalon. *Dev. Genes. Evol.* **208**, 431-439.
- Tzahor, E., Kempf, H., Mootooosamy, R. C., Poon, A. C., Abzhanov, A., Tabin, C. J., Dietrich, S. and Lassar, A. B. (2003). Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle. *Genes. Dev.* **17**, 3087-3099.
- Vieira, C. and Martínez, S. (2006). Sonic hedgehog from the basal plate and the zona limitans intrathalamica exhibits differential activity on diencephalic molecular regionalization and nuclear structure. *Neuroscience* **143**, 129-140.
- Vieira, C., Pombero, A., García-López, R., Gimeno, L., Echevarría, D. and Martínez, S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 7-20.
- Walther, C. and Gruss, P. (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**, 1435-1449.
- Weinstein, D. C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W. S., Hoodless, P., Prezioso, V. R., Jessell, T. M. and Darnell, J. E., Jr (1994). The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* **78**, 575-588.
- Xuan, S., Baptista, C. A., Balas, G., Tao, W., Soares, V. C. and Lai, E. (1995). Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron* **14**, 1141-1152.

DISCUSSION

I- Modèle expérimental et validation phénotypique

Au cours du XX^{ème} siècle, un grand nombre d'études scientifiques ont révélé le rôle qu'exerce la CNC au cours du développement embryonnaire chez les vertébrés. Il a été montré que la CNC contribue au développement crânio-facial en donnant la totalité du squelette facial et de la voûte crânienne. Il a été montré également qu'elle participe au développement de l'œil en jouant un rôle essentiel dans la formation des structures péri-oculaires (Creuzet et al. 2005, Gage et al. 2005).

En 2009, les travaux de l'équipe ont révélé qu'en plus de sa contribution structurale au développement oculaire à travers ses dérivés variés, la CNC exerce également un rôle majeur morphogénétique vis-à-vis des structures oculaires. L'ablation de la CNC, avant la migration de ces cellules, au stade de 5ss, entraîne une malformation cérébrale connue sous le nom d'holoprosencéphalie et qui se caractérise par un défaut de séparation précoce du télencéphale en deux hémisphères. De plus, ce défaut est associé conjointement à une absence de séparation des deux champs oculaires bilatéraux, conduisant ainsi à une cyclopie (Creuzet 2009). Au niveau moléculaire, l'ablation de la CNC est précédée par l'expression hétérochronique de *Bmp7* dans la plaque pré-chordale (PPC; Creuzet 2009). Cette observation suggère qu'une relation réciproque entre la CNC dorsalement et la PPC ventralement contrôle la régionalisation dorsoventrale du cerveau antérieur, et des champs sensoriels.

Dans notre étude, l'objectif était, tout d'abord, de vérifier si l'augmentation de la signalisation Bmp7 au niveau de la PPC, induite de façon hétérochronique reproduisait l'effet de l'ablation de la CNC. Pour répondre à cette question nous avons réalisé des micro-injections de la protéine humaine recombinante de Bmp7 au stade de 5ss au niveau de la PPC, visant ainsi à reproduire les excès de Bmp7 consécutifs à l'ablation de la CNC. A E8, l'embryon injecté a développé une cyclopie similaire à celle obtenue après l'ablation de CNC, ce qui a validé notre modèle expérimental. L'avantage de notre modèle est de pouvoir suivre le développement et l'évolution de la CNC après le traitement par Bmp7 et d'identifier ses médiateurs moléculaires impliqués dans la cyclopie.

II- Le défaut de régionalisation du cerveau antérieur précède la cyclopie

Dans notre étude, la cyclopie se manifeste entre les stades 12HH-13HH (E2), soit 20 heures après l'injection. Juste avant l'apparition du phénotype, une absence d'invagination dorso-ventrale des deux VO est associée à un défaut de constriction apicale qui se manifeste dans un sens caudalo-rostral. Nous avons constaté aussi qu'il existe deux régions susceptibles de jouer un rôle critique dans l'invagination dorsale du futur ERP. L'invagination, qui commence à la région distale de l'ERP, entraîne le rapprochement des deux tissus, dorsal et ventral, de l'ERP jusqu'à leur fusion. Ce processus très dynamique permet la séparation bilatérale des champs optiques du reste du diencephale, et conduit à l'individualisation des deux VO. Les cellules de la région proximale semblent

jouer un rôle important à cet égard en assurant la fusion des cellules de la même région proximale ventrale. Dans nos expériences, chez l'embryon traité, l'épithélium adjacent aux deux VO ne parvient pas à s'invaginer, qui restent alors indivisés du diencéphale. Dans cette situation, le neuroépithélium de la région proximale reste « éverté », ce qui compromet le rapprochement et la fusion des deux feuilletts, dorsal et ventral, normalement destinés à former la tige optique. Nous montrons ici que cette déformation est due aux perturbations de la polarité cellulaire au niveau des VO qui se manifeste par un défaut de constriction apicale des cellules à ce niveau.

Dans la littérature, il a été montré le rôle de la constriction apicale dans la fermeture du tube neural ainsi que la morphogénèse du cerveau (Chu et al. 2013 , Itoh et al. 2014). Dans notre étude, nous avons étudié un certain nombre de marqueurs effecteurs de la constriction apicale. Plus particulièrement, les filaments d'actine (F-actine), protéine structurale essentielle dans ce mécanisme, présentent une accumulation chez l'embryon contrôle au niveau apical des VO, alors que, chez l'embryon traité, la distribution est complètement perturbée.

Nous avons également considéré la distribution de la N-cadhérine, élément clé des jonctions adhérentes. Elle constitue une plateforme de transmission des tensions de surface d'une cellule à une autre, indispensable à la constriction apicale (Harris and Tepass 2010) Cette protéine est localisée au niveau apical chez l'embryon contrôle, par contre chez l'embryon traité avec Bmp7, nous avons observé une absence de marquage au niveau de la partie proximale du neuroépithélium dorsal.

Dans notre étude, nous avons analysé la distribution de la protéine Vangl2, une composante essentielle de la polarité planaire cellulaire (PCP) activée par la voie non-canonique de la signalisation Wnt. Nous avons pu montrer que son accumulation était absente chez l'embryon traité, par rapport à la distribution apicale observée chez l'embryon contrôle. En outre, la position apico-basale des noyaux après le traitement avec la protéine Bmp7 est complètement inversée dans la région proximale de l'ERP, ce qui a conforté notre hypothèse et suggère que la polarité cellulaire des cellules à ce niveau joue un rôle critique dans l'invagination dorso-ventrale des tissus destinés à former la tige optique.

III- L'activité de Bmp7 dans la PCP affecte l'expression des gènes *Foxg1*, *Pax6* et *Otx2* dans le neuroépithélium prosencéphalique

Comme nous venons de l'évoquer, notre étude a montré qu'une altération de la polarité cellulaire fait suite à l'injection de Bmp7 dans la PCP, et se manifeste juste avant que débute la séparation des deux champs optiques (12-13HH). Nous avons aussi montré que ce traitement altère l'activité de quelques marqueurs précoces des différents territoires du prosencéphale vers le stade 9HH (2h-3h après injection de Bmp7), notamment l'expression du gène *Foxg1*, marqueur précoce du télencéphale, et du gène *Pax6*, marqueur du diencephale. Ainsi, nous avons observé une expansion antérieure du patron d'expression de *Pax6* au détriment de celui de *Foxg1* dont le niveau d'expression diminue et le domaine

se restreint. Ceci pourrait expliquer les mécanismes de « postériorisation » du cerveau antérieur et de l'acquisition par le futur télencéphale de caractères moléculaires propres au diencéphale, qui se manifeste par expression ectopique de *Mitf*, facteur de transcription spécifique de l'ERP, dans les futures cellules télencéphaliques.

Quinze heures après l'injection (aux stades 12-13HH), nous avons constaté une expression de *Foxg1* dans le futur télencéphale, mais aussi au niveau de l'ERP dorsal chez l'embryon contrôle. Néanmoins, chez l'embryon traité, la diminution de son expression persiste et aucun transcrit n'a été détecté ni dans le futur télencéphale ni dans l'ERP ce qui laisse suggérer un rôle fondamental du gène *Foxg1* dans la séparation rostrale entre les VO et le reste du prosencéphale.

En ce qui concerne *Pax6*, nous avons observé une localisation apicale de transcrit tout au long de la VO chez l'embryon contrôle alors que la distribution chez l'embryon traité semble être perturbée. Cette observation suggère que la signalisation Pax6 joue un rôle dans l'évagination dorsale de l'ERP, d'autant que la même molécule semble être impliquée dans l'invagination de la placode du cristallin et dans sa maturation ([Klimova and Kozmik 2014](#)).

De plus, nous montrons que l'expression du gène *Otx2* indispensable au développement du prosencéphale (vers le stade 9HH) et du futur ERP (vers 12HH-13HH) est également perturbée. Dans notre étude, nous avons observé une diminution de son expression au pôle antérieur du prosencéphale, alors que l'expression diencéphalique caudale semble inchangée. Vers 12HH, nous avons noté une diminution de l'expression d'*Otx2* au niveau de la région distale de

l'ERP chez l'embryon traité par rapport au contrôle, ce qui suggère que l'expression d'*Otx2* pourrait participer à l'évagination de la partie distale de l'ERP. Par conséquent, son absence dans cette région serait responsable du défaut de la constriction apicale qui normalement commence au niveau de cette région de la VO.

L'ensemble de ces données suggère que l'injection de Bmp7 dans la PPC semble perturber la régionalisation du cerveau antérieur de manière précoce en modulant l'expression des gènes spécifiques des différents territoires télencéphalique et diencephalique, et que cette modulation semble affecter l'expression de ces marqueurs quelques heures plus tard (12HH-13HH) en compromettant la formation de la constriction apicale au niveau des deux VO et leur séparation du reste du tube neural prosencéphalique.

Dans la littérature, les études de corrélation entre les excès de Bmp et la cyclopie ont attribué un rôle pro-apoptotique non spécifique aux protéines de cette famille. C'est notamment le cas lorsque l'injection de Bmp5 est réalisée dans la lumière du prosencéphale (Golden et al. 1999). Il a été également rapporté un effet suppresseur de Bmp4 sur l'acquisition des caractéristiques prosencéphaliques. Toutefois, dans cette situation, l'ERP reste intacte (Ohkubo et al. 2002). Le phénotype qui en résulte est très semblable à la cyclopie que nous obtenons. Cependant, ces auteurs attribuent le phénotype de cyclopie à un effet apoptotique sur le neuroépithélium. Dans notre étude, nous montrons l'effet hétéro-chronique de la signalisation de Bmp7 dans la PPC qui engendre une perturbation de la signalisation des molécules impliquées dans la polarité

cellulaire indispensable à la constriction des VO ; la dégénérescence du prosencéphale est une conséquence très secondaire d'un défaut initial de polarité cellulaire.

IV-La mort cellulaire n'est pas la cause première de la cyclopie

Dans la littérature des études portant sur des souris mutantes pour le gène *Shh* ont montré que la mutation de ce gène cause la mort des cellules de la ligne médiane ventrale par apoptose (Chiang et al. 1996) et entraîne le rapprochement des deux vésicules optiques ventralement, générant ainsi une cyclopie. Une autre étude dans laquelle des embryons de poulet sont traités avec du Bmp5 au stade 11-12HH dans la lumière du prosencéphale, met en évidence un accroissement de la mort cellulaire de la ligne médiane ventrale et aboutit au même phénotype que celui observé par Chiang en 1996 (Golden et al. 1999) . Cependant, l'injection de Bmp4 dans le tube neural, plus précocement, au stade de 10HH, entraîne une diminution du transcrite de *Shh* au niveau de la PPC dès 6h après le traitement, alors que la mort cellulaire n'est mise en évidence qu'entre 9h et 12h après le traitement (14-15HH). Ces observations suggèrent que la diminution d'expression de *Shh* n'est pas due à la mort cellulaire mais à l'augmentation de la signalisation de Bmp4 au niveau dorsal (Ohkubo et al. 2002) .

Dans notre étude, nous notons une diminution de l'expression de *Shh* deux à trois heures après le traitement et une apoptose du prosencéphale manifeste à partir de 14-15HH, soit 24h après. Néanmoins, dans notre modèle, nous n'avons

pas mis en évidence d'apoptose au niveau de la ligne médiane ventrale. De manière concomitante, nous ne notons aucun changement dans le patron d'expression du gène *Six3* tant à la partie ventrale du prosencéphale qu'au niveau des VO au stade de 12HH. Ces deux arguments plaident en faveur du fait que la partie ventrale du diencephale n'est pas touchée mais que seule la partie dorsale semble être altérée.

Ensemble, ces observations suggèrent que la signalisation hétérochronique de *Bmp7* perturbe l'expression de *Shh* au niveau de la PPC de manière très précoce par rapport à ce qui a été observé dans les différentes études citées précédemment. Cette perturbation semble se traduire par un effet « caudalisant » par répression des facteurs de transcription spécifiant le cerveau antérieur, plutôt que strictement « ventralisant ». Nous pensons que cette diminution est sans effet direct sur l'évagination dorsale de la VO, mais qu'elle exerce un effet inhibiteur sur la spécification du prosencéphale, dont le programme de développement en étant retardé, s'en trouve compromis.

V- la CNC joue un rôle prépondérant dans la séparation des deux

VO

Dans notre étude, nous avons constaté aussi que la fermeture des VO suit la cinétique de migration des cellules de la CNC. A ce titre, le marquage HNK1 montre que les cellules de CNC entourent précocement la partie distale et proximale de l'ERP. Cette observation suggère que la CNC pourrait être

impliquée dans l'individualisation des deux VO du reste de diencephale. Ainsi, l'absence de CNC pourrait causer le défaut de séparation des deux champs optiques.

L'augmentation de la signalisation de Bmp7 au niveau de la PPC a un effet délétère sur le développement de la CNC et sur la migration de ses cellules. L'excès de Bmp7 entraîne une diminution de l'expression des gènes indispensables à la délamination et à l'émigration des cellules de la CNC tels que l'*intégrine $\alpha 4$* , *MMP2*, *ADAM13* et *Slug*. A 12HH, les marquages avec l'Ac HNK1 montrent que les cellules de la CNC migrent rostralement selon une trajectoire dorso-ventrale et encerclent les VO chez l'embryon contrôle. Par contre, chez l'embryon expérimental, nous observons une diminution drastique du marquage HNK1 au niveau antérieur et autour des vésicules optiques, ce qui suggère que l'injection de Bmp7 au niveau de la PPC est capable d'altérer à distance le comportement migratoire de la CNC dorsalement.

Dans la littérature, des études ont corrélié les altérations de la CNC à des malformations céphaliques qui coïncident avec l'apparition de la cyclopie (Creuzet 2009, Etchevers et al. 1999) selon l'âge auquel l'ablation de la CNC est pratiquée. Ceci démontre que la CNC est indispensable pour la spécification du cerveau antérieur en protégeant l'identité télencéphalique du neuropéthélium et en inhibant la signalisation rostrale de Bmp. Ces deux effets conjugués permettent le maintien d'expression de *Foxg1* et vraisemblablement l'état prolifératif des cellules destinées à former le télencéphale. Dans notre étude, en plus de son rôle anti-Bmp, la CNC semble participer à la spécification du cerveau

antérieur par leur migration jusqu'aux VO, permet l'invagination de la tige optique et l'individualisation des VO du tube neural prosencéphalique, agissant ainsi indirectement sur sa séparation du télencéphale.

Les expériences de sauvetage que nous avons réalisé par l'inactivation de la signalisation Wnt dans les cellules de la CNC, au tout début de leur migration, restaure leur capacité à progresser en direction des VO. La restauration de la migration à ce niveau s'accompagne du sauvetage des vésicules céphaliques, ce qui est en accord avec les résultats antérieurs de notre laboratoire montrant que la CNC exerce un effet inducteur sur l'expression de *Foxg1* dans le télencéphale par l'activation de la voie de Smad1 (Aguiar et al., 2014).

VII- La surexpression de Wnt1 perturbe la migration de la CNC

De nombreuses études ont montré que la signalisation Wnt/ β -caténine (Nordstrom et al. 2002 Jun, Yamaguchi 2001), mais aussi non canonique, (Shariatmadari et al. 2005) s'organise selon un gradient antéro-postérieur qui est essentiel au développement du diencéphale caudal. L'activation ectopique de la signalisation Wnt au niveau antérieur se traduit par une expansion du cerveau postérieur au détriment du prosencéphale, comme c'est le cas chez nos embryons expérimentaux. Dans notre projet nous avons observé une surexpression de *Wnt1*, précocement, 90 minutes après l'injection de Bmp7, au niveau de la bordure du tube neural à l'origine de la future CNC et, plus tardivement, expansion antérieure à 10HH (soit une dizaine d'heures après

l'injection) suggérant l'implication de cette signalisation d'une part, dans la perturbation de la migration de la CNC et, d'autre part, dans la « postériorisation » du cerveau antérieur.

Pour valider cette hypothèse, nous avons tenté d'inactiver la signalisation *Wnt1* par ARN interférent au niveau des cellules de la CNC, alors qu'elles sont encore associées à la bordure neurale. De façon surprenante, lorsque l'on combine l'injection de *Bmp7* dans la PPC et la transfection de l'ARN interférent de *Wnt1* dans les cellules de la CNC, l'embryon récupère un phénotype céphalique quasiment normal: les deux vésicules télencéphaliques apparaissent au stade E4,5-E5, contrairement à ce qui est observé après l'injection de *Bmp7* seule. A E9, la mâchoire supérieure, qui dérive de la CNC et est absente chez les cyclopes, se développe normalement. Ceci tend à indiquer que la migration des cellules de la CNC requiert la signalisation de *Wnt1*, elle-même sous le contrôle de la PPC au stade de la neurulation. La migration normale des cellules de la CNC permet aux cellules du télencéphale de proliférer et de se différencier pour former les vésicules céphaliques bilatérales, grâce au rôle trophique qu'elles exercent sur l'expression de *Fgf8* et de *Foxg1* (Aguiar et al. 2014, Creuzet 2009, Creuzet et al. 2006). Dans le cas où le double traitement « *Bmp7*>PPC+ARNdb *Wnt1*>CNC » est réalisé, l'expression de ces deux gènes est restaurée dans le cerveau en développement.

Au niveau de l'œil proprement dit, l'inactivation de *Wnt1* concomitante de l'injection de *Bmp7* produit une restauration partielle. Ce double traitement

permet une séparation des deux VO, toutefois le développement oculaire est caractérisé par hypotélorisme du quadrant ventral. Sur des coupes coronales, au stade E8, on peut observer que les deux yeux sont synophtalmiques, à savoir que les deux globes oculaires sont logés dans un seul orbite, avec une absence du nerf optique ce qui montre un défaut d'organogenèse de la RN en différentes couches et plus particulièrement la couche des CGR (Cellules Ganglionnaires de la Rétine) à l'origine des axones les fibres des nerfs optiques. Ces observations suggèrent que ce sauvetage conduit en modulant la signalisation de Wnt1 est sans effet sur les altérations squelettiques, puisque, en dépit d'une nette séparation des deux optiques, le septum inter-orbitaire reste manquant.

Sur le plan moléculaire, le traitement de compensation par l'ARN interférent Wnt1 permet la restauration de l'expression des gènes *Pax6*, *Otx2*, *Mitf*. Ces derniers sont restaurés dans la partie caudale des VO qui s'est séparée du reste du diencéphale alors que la partie rostrale reste fusionnée au télencéphale avec une persistance de diminution de l'expression de *Foxg1*, *Wnt2b* et d'autres gènes de la polarité cellulaire tels que la *N-cadhérine* et ceux impliqués dans la constriction apicale (*RhoA*, *ROCK1*, *Myh9*).

En perspective, il reste à savoir si l'inactivation de Wnt1 a un effet direct sur l'expression des facteurs de transcription *Pax6*, *Otx2* et *Mitf* ou indirect par la restauration de la migration des cellules de la CNC qui, à leur tour, maintiennent l'expression de ces gènes et protègent ainsi l'identité antérieure du prosencéphale.

VIII- L'expression de *Wnt2b* dans les VO est indispensable à leur invagination

Les données obtenues par le double traitement « Bmp7>PPC+ARNdb *Wnt1*>CNC » suggèrent qu'un autre facteur produit par les cellules de la CNC est requis pour permettre la séparation des deux VO et que l'inactivation de la signalisation *Wnt1* n'est pas suffisante. Par notre analyse en qPCR, nous avons identifié un gène candidat, *Wnt2b*, dont le taux d'expression diminue suite au traitement par Bmp7 dans la PPC. Nous avons alors décidé d'étudier par hybridation *in situ* le patron d'expression de ce gène. Chez les embryons témoins, *Wnt2b* est exprimé à partir du stade 9HH au niveau la partie dorsale du tube neural et vers 12HH au niveau de l'ES (ectoderme de surface). En outre, il a été montré que cette molécule participe au bon développement et positionnement du cristallin (Grocott et al. 2011). Récemment il a été montré que *Wnt2b* s'exprime au niveau l'épithélium dorsal des VO et participe à la spécification de l'EPR au stade de 10HH chez le poulet (Steinfeld et al. 2013) et ultérieurement, la signalisation *Wnt2b* au niveau des bords de la coupe optique s'est avérée indispensable à l'induction du corps ciliaire (Cho and Cepko 2006, Kitamoto and Hyer 2010) D'une manière inattendue, nous avons détecté par hybridation *in situ* l'accumulation d'un transcrit au niveau du tube neural et dans les deux VO. Chez l'embryon traité avec Bmp7, nous n'avons pas noté de changement d'expression de *Wnt2b* dans l'ES, mais, par contre, une absence totale de transcrit au niveau des deux VO. Cette observation nous a incité à penser que

cette molécule pourrait être impliquée dans le phénotype de la cyclopie. Nous avons alors entrepris chez les embryons traité par « Bmp7>PPC + ARNdb Wnt1 », de tester les effets d'un vecteur plasmidique conduisant l'expression du gène humain *Wnt2b*, combiné à l'activation de la protéine fluorescente GFP, afin de visualiser les tissus électroporés «Bmp7>PPC + ARNdb Wnt1 + pWnt2b-GFP ». Lorsque nous avons exprimé *Wnt2b* seulement dans la CNC nous n'avons pas obtenu le même phénotype que celui obtenu suite au traitement avec l'ARN interférent Wnt1. Par contre, l'expression de *Wnt2b* au niveau des VO a beaucoup amélioré le phénotype, ce qui suggère que l'expression de *Wnt2b* au niveau de ce tissu est essentielle à la morphogenèse précoce de l'œil. L'expression de *Wnt2b* à la fois dans la CNC et les VO ne change pas le phénotype par rapport au traitement au niveau des VO seules, ce qui suggère aussi que l'expression de *Wnt2b* dans la CNC a un effet redondant avec son expression dans les VO, pour leur invagination.

De même, nous n'avons pas noté d'amélioration précoce (3h après injection) de la migration de la CNC par l'expression de *Wnt2b* au niveau de la CNC et des VO, contrairement à ce qui est obtenu avec le traitement par l'ARN interférent Wnt1. Par contre nous avons observé que les expériences de sauvetage par l'expression de *Wnt2b* avec le traitement Bmp7 « Bmp7>PPC+p*Wnt2b* » permettent de sauver le développement des vésicules céphaliques à E4-5. Ceci suggère un rôle de *Wnt2b* dans la migration de la CNC par chimiotactisme comme l'ont proposé des études portant sur le rôle des VO dans la migration polarisée de la CNC ([Ittner et al. 2005](#), [Langenberg et al. 2008](#)) .

Nous avons étudié l'effet du triple traitement sur l'expression des marqueurs de la polarité cellulaire, F-actine et Vangl2, et montrent une amélioration dans ce contexte.

Après cinq jours de développement, l'embryon présente deux vésicules encéphaliques bien développées, mais aussi les deux yeux avec une coupe optique bien visible. A E8, l'embryon traité ressemble à un embryon contrôle avec deux yeux qui présentent un léger hypotelorisme. Sur des coupes coronales colorées au Crésyl violet, on a observé qu'au niveau dorsal les deux vésicules encéphaliques sont bien développées, alors qu'au niveau ventral, les deux yeux restent fusionnés au télencéphale. Dans la littérature, cette région du cerveau présente la frontière limite entre le diencephale rostral et le télencéphale (DR/T), qui devient visible vers le stade 12HH chez l'embryon de poulet (Trujillo et al. 2005). Nous notons également l'absence du septum inter-orbitaire, dérivé de la CNC. Plus ventralement, nous observons la formation des fibres du nerf optique. Toutefois, les fibres du nerf optique apparaissent encore désorganisées et coïncident avec la persistance d'un colobome choroïdien, reflétant un défaut de fermeture de la cupule optique.

La technique d'hybridation *in situ* a révélé que le transcrite de *Foxg1*, détecté chez le contrôle au niveau du neuroépithélium télencéphalique et de l'ERP à la région frontière (DR/T), n'est plus présent suite au traitement par l'ARN interférent Wnt1 ou par le vecteur plasmidique conduisant l'expression du gène *Wnt2b*. Ceci pourrait expliquer que l'expression de *Foxg1* participe plus précocement à la

séparation du territoire télencéphalique de ceux du champ visuel et qu'il joue un rôle important dans le développement du télencéphale ventral et sa spécification (Danesin et al. 2009, Martynoga et al. 2005, Roth et al. 2010). Egalement, l'inactivation du gène *Wnt1* et l'expression du gène *Wnt2b* dans la CNC et les VO chez les embryons traités semble sans effet au niveau la région frontière (DR/T) : leur effet respectif porte seulement sur le diencéphale.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé un double traitement de l'embryon par l'ARN interférent de *Wnt2b* et un vecteur plasmidique exprimant *Wnt1* au niveau des VO et la CNC respectivement « ds*Wnt2b*+p*Wnt1* ». A E6, nous observons un phénotype cyclopie mais qui diffère de celui obtenu par le traitement de *Bmp7* par l'apparition d'un proboscis, nez tubulaire dysfonctionnel, au dessus des yeux. L'observation de coupes coronales colorées au Crésyl violet a montré un cerveau holoprosencéphalique mais complètement séparé dans la région (DR/T) et plus ventralement deux yeux fusionnés caractéristiques de la cyclopie.

Ces données illustrent deux phénotypes de cyclopie distincts entre la position du probosis au dessus des yeux et celui obtenu par le traitement par *Bmp7* où il apparaît au dessous des yeux. L'explication possible de ce phénomène est que suite au traitement par *Bmp7*, les deux VO sont restées fusionnées au reste du diencéphale ainsi qu'au niveau du (DR/T) du futur télencéphale et que dans le traitement « ARNdb*Wnt2b*+p*Wnt1* » les deux vésicules sont restées fusionnées

seulement au niveau diencéphalique, alors que la partie rostrale, dépendante de *Foxg1* probablement, s'est individualisée au niveau DR/T.

L'ensemble de ces données suggère que les signalisations Wnt2b et Wnt1 ciblent spécifiquement la région diencéphalique, alors que la région frontière DR/T est complètement indépendante de ces deux molécules et pourrait dépendre de la signalisation de *Foxg1*.

Dans notre étude il reste à déterminer par quelle voie Wnt est impliqué dans le phénotype de la cyclopie. D'une part, nous avons observé que l'augmentation de la signalisation Wnt1 au niveau des cellules de la CNC accompagnée par une augmentation de la signalisation β -caténine au niveau des VO, protéine qui perd sa localisation apicale, ce qui nous amène à supposer que la molécule Wnt1 pourrait agir par la voie canonique.

D'autre part nous avons observé une diminution de la signalisation Wnt2b dans les VO, une diminution accompagnée par une perturbation de la distribution de la protéine Vangl2 qui regagne sa distribution apicale grâce au sauvetage « Bmp7>PPC+ARNdbWnt1+pWnt2b>VO+CNC » ainsi que pour l'expression combinée de RhoA-ROCK1-Myh9 à la constriction apicale.

Dans la littérature, il a été montré que Wnt2b agit par la voie canonique au niveau de l'ES permettant l'alignement du cristallin avec la VO (Grocott et al. 2011) et la voie β -caténine indépendante dans la spécification de l'ERP(Steinfeld et al. 2013). Cependant, au niveau des VO, cette molécule semble agir par la voie de la polarité cellulaire planaire en activant la cascade RhoA-

ROCK1-Myh9 indispensable à la constriction apicale, permettant ainsi l'invagination des VO et leur séparation du reste du tube neural.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, les travaux de ma thèse viennent d'ajouter une nouvelle dimension aux rôles déjà très riches et variés qu'exerce la CNC au cours du développement précoce de l'embryon. Il a été montré que la CNC participe aux structures oculaires et péri-oculaires en donnant certains dérivés indispensables au fonctionnement de l'œil et son homéostasie (Creuzet et al. 2005) mais aussi la CNC exerce un rôle trophique au développement de l'œil. De plus, l'équipe d'Andréa Streit a montré que la CNC permet le bon positionnement de la placode cristallinienne et empêche sa formation ectopique par l'inhibition de la signalisation de Pax6 via la signalisation TGF- β secrétée par les cellules de la CNC. Ces auteurs ont montré que la signalisation TGF- β agit aussi sur la stabilisation dans l'ectoderme de la β -caténine, qui agit en aval de Wnt2b, en inhibant la formation ectopique de cristallin, à distance de la cupule optique. Par conséquent, la molécule TGF- β secrétée par la CNC permet la stabilisation de la signalisation de Wnt2b dans l'ES. Ce mode de régulation pourrait se reproduire au niveau des VO mais cette fois par une voie impliquant la signalisation Wnt dans la PCP.

Nos résultats montrent que lorsque le traitement par l'ARN interférent contre *Wnt1* améliore la migration des cellules de la CNC, l'expression de *Wnt2b* dans les VO reste diminuée. Ceci soulève une question sur le mécanisme de régulation de Wnt2b au niveau des VO, pour savoir si son expression dépend ou non de la migration de la CNC. Une hypothèse alternative serait que l'expression de Wnt2b dans les VO ne dépend pas des cellules de la CNC mais permet seulement de se stabiliser de la (les) signalisation(s) dépendant de la CNC. Il reste à répondre à

ces questions dans nos futures perspectives. Nous pensons que dans les conditions normales, les cellules de la CNC, en migrant au niveau des VO, permettent la stabilisation de la signalisation de Wnt2b soit d'une manière directe (sur l'expression du gène lui-même) ou indirecte (par la sécrétion des antagonistes de la signalisation Bmp, Noggin et Gremlin).

Ce travail montre également qu'il existe une cause commune à deux malformations oculaires majeures, le colobome et la cyclopie,

Le défaut de spécification du nerf optique embryonnaire, par une désorganisation de polarité apico-basale des cellules neuroépithéliales conduit à l'absence d'invagination du neuroépithélium de l'*optic stalk*. Le territoire de l'*optic stalk* est alors éverté, et cette éversion précède la formation du colobome géant. La séparation entre le champ sensoriel rétinien et neural prosencéphalique n'étant plus préservée par la formation du nerf optique, ces territoires présomptifs convergent puis dégénèrent en cyclopie.

L'aboutissement de notre étude est l'établissement d'un modèle([Fig.S2](#)) par lequel la CNC, en s'opposant à la signalisation ventrale de Bmp7 dans la PPC, permet le développement et la régionalisation précoce (vers 12HH) du cerveau antérieur. Cette régionalisation commence vers le stade 12HH par la séparation du champ optique du reste du diencephale caudalement et du télencéphale rostralement, ensuite leur migration antérieure permet le maintien et la prolifération des cellules du futur télencéphale, dès 14-15HH, en protégeant la signalisation de *Foxg1* et en s'opposant à la signalisation Bmp. Ceci favorise une

organogenèse correcte du télencéphale, de la VO et du diencephale rostral et caudal. Cet antagonisme dorso-ventral entre CNC et PPC se fait par le biais des signalisations Bmp7, Foxg1, Wnt2b, Wnt1 et probablement d'autres molécules qui restent à déterminer.

Notre étude vient également confirmer l'hypothèse selon laquelle l'œil joue un rôle de centre organisateur du développement craniofacial (Kish et al. 2011). Beaucoup de données ont montré que les malformations de développement oculaire sont souvent associées aux troubles de développement du cerveau (Ittner et al. 2005, Langenberg et al. 2008). Nos résultats indiquent que la cyclopie, jusqu'à présent perçue comme la conséquence d'un défaut de spécification précoce du prosencéphale, est en fait initiée au niveau oculaire. Les deux VO ne sont pas séparées du reste du tube neural, ce qui entrave par la suite la morphogenèse du télencéphale, de l'œil et du diencephale rostral.

BIBLIOGRAPHIES

- Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Briata P, Corte G, et al. (1998) Visceral endoderm-restricted translation of Otx1 mediates recovery of Otx2 requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation. *Development* 125: 5091-5104.
- Aguiar DP, Sghari S, Creuzet S (2014) The facial neural crest controls fore- and midbrain patterning by regulating Foxg1 expression through Smad1 activity. *Development* 141: 2494-2505.
- Alward WLM (2000) Axenfeld-Rieger syndrome in the age of molecular genetics. *American journal of ophthalmology* 130: 107-115.
- Aoto K, Shikata Y, Higashiyama D, Shiota K, Motoyama J (2008) Fetal ethanol exposure activates protein kinase a and impairs Shh expression in prechordal mesendoderm cells in the pathogenesis of holoprosencephaly. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 82: 224-231.
- Aybar MJ, Nieto MA, Mayor R (2003) Snail precedes Slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the *Xenopus* neural crest. *Development* 130: 483-494.
- Bachiller D, Klingensmith J, Kemp C, Belo JA, Anderson RM, et al. (2000) The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* 403: 658-661.
- Baker JC, Beddington Rs Fau - Harland RM, Harland RM (1999) Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development. *Genes Dev* 13(23):3149-59.
- Bang AG, Papalopulu N, Goulding MD, Kintner C (1999) Expression of Pax-3 in the Lateral Neural Plate Is Dependent on a Wnt-Mediated Signal from Posterior Nonaxial Mesoderm. *Developmental Biology* 212: 366-380.
- Barkovich AJ, Quint DJ (1993) Middle interhemispheric fusion: an unusual variant of holoprosencephaly. *AJNR Am J Neuroradiol* 14(2):431-40.
- Barr M Jr HJ, Currey K, Sharp S, Toriello H, et al. ((1983)) Holoprosencephaly in infants of diabetic mothers. . *J Pediatr* 102: 565–568

- Barrio-Asensio C, Murillo-Gonzalez J Fau - Pena-Meliann A, Pena-Meliann A Fau - Puerta-Fonolla J, Puerta-Fonolla J (1999) Immunocytochemical study on the triple origin of the sphincter iris in the chick embryo. *Dev Genes Evol* 209(10):620-4.
- Barrio-Asensio C, Peña-Melián A, Puerta-Fonollá J, Vázquez-Osorio T, Murillo-González J (2002) Ciliary muscle in avian is derived from mesenchymal and epithelial cells. *Vision Research* 42: 1695-1699.
- Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverse G, Siegel-Bartelt J, et al. (1996) Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 14: 353-356.
- Bohnsack BL, Kasprick DS, Kish PE, Goldman D, Kahana A (2012) A Zebrafish Model of Axenfeld-Rieger Syndrome Reveals That pitx2 Regulation by Retinoic Acid Is Essential for Ocular and Craniofacial Development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53: 7-22.
- Bonstein L, Elias S, Frank D (1998) Paraxial-Fated Mesoderm Is Required for Neural Crest Induction in *Xenopus* Embryos. *Developmental Biology* 193: 156-168.
- Braut V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, et al. (2001) Inactivation of the (β)-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* 128: 1253-1264.
- Bronner-Fraser M, Wolf JJ, Murray BA (1992) Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. *Developmental Biology* 153: 291-301.
- Casteels ID, K. (2005) Unilateral Peters' anomaly in a patient with DiGeorge syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 42(5):311-3.
- Cavodeassi F, Carreira-Barbosa F, Young RM, Concha ML, Allende ML, et al. (2005) Early Stages of Zebrafish Eye Formation Require the Coordinated Activity of Wnt11, Fz5, and the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Neuron* 47: 43-56.
- Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D (1996) Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 589-595.
- Cerny R, Lwigale P, Ericsson R, Meulemans D, Epperlein H-H, et al. (2004) Developmental origins and evolution of jaws: new interpretation of “maxillary” and “mandibular”. *Developmental Biology* 276: 225-236.
- Chang C, Hemmati-Brivanlou A (1998) Neural Crest Induction by Xwnt7B in *Xenopus*. *Developmental Biology* 194: 129-134.
- Chang L, Blain D, Bertuzzi S, Brooks BP (2006) Uveal coloboma: clinical and basic science update. *Current Opinion in Ophthalmology* 17: 447-470.
- Chapman DL, Papaioannou VE (1998) Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene Tbx6. *Nature* 391: 695-697.

- Chapman SC, Schubert FR, Schoenwolf GC, Lumsden A (2002) Analysis of Spatial and Temporal Gene Expression Patterns in Blastula and Gastrula Stage Chick Embryos. *Developmental Biology* 245: 187-199.
- Chen S, Lewis B Fau - Moran A, Moran A Fau - Xie T, Xie T (2012) Cadherin-mediated cell adhesion is critical for the closing of the mouse optic fissure. *PLoS One* 7(12).
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, et al. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383: 407-413.
- Chiappedi M, Bejor M (2010) Corpus callosum agenesis and rehabilitative treatment. *Italian Journal of Pediatrics* 36: 64-64.
- Chibon P (1964.) Analyse par la méthode de marquage nucléaire à la thymidine tritiée des dérivés de la crête neurale céphalique chez l'Urodele *Pleurodeles waltlii*. . *CR Acad Sci Paris* 259, 3624–3627.
- Cho S-H, Cepko CL (2006) Wnt2b/ β -catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye. *Development* 133: 3167-3177.
- Chow RL, Lang RA (2001) Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 255-296.
- Chu CW, Gerstenzang E Fau - Ossipova O, Ossipova O Fau - Sokol SY, Sokol SY (2013) Lulu regulates Shroom-induced apical constriction during neural tube closure. *PLoS One* 8(11):e81854. doi: 10.1371.
- Cohen Jr MM (1990) Syndromology: An updated conceptual overview. X. References. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 19: 89-96.
- Cohen MM, Shiota K (2002) Teratogenesis of holoprosencephaly. *American Journal of Medical Genetics* 109: 1-15.
- Collins T (1900) Case with symmetrical congenital notches in the outer part of each lower lid and defective development of the malar bones. . *Trans Ophthalmol Soc UK* ;20:90.
- Couly G, Grapin-Botton A, Coltey P, Le Douarin NM (1996) The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited: the regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior and posterior neural fold. *Development* 122: 3393-3407.
- Couly GF, Coltey, P. M. and Le Douarin, N. M. (1993). The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. . *Development* 117, 409-429.

- Creuzet S, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM (2002) Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development* 129: 4301-4313.
- Creuzet S, Schuler B, Couly G, Le Douarin NM (2004) Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4843-4847.
- Creuzet S, Vincent C, Couly G, Couly G (2005) Neural crest derivatives in ocular and periocular structures. *Int J Dev Biol* 49: 161-171.
- Creuzet SE (2009) Regulation of pre-otic brain development by the cephalic neural crest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 15774-15779.
- Creuzet SE, Martinez S, Le Douarin NM (2006) The cephalic neural crest exerts a critical effect on forebrain and midbrain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 14033-14038.
- Crossley PH, Martin GR (1995) The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121: 439-451.
- Danesin C, Peres JN, Johansson M, Snowden V, Cording A, et al. (2009) Integration of Telencephalic Wnt and Hedgehog Signaling Center Activities by Foxg1. *Developmental Cell* 16: 576-587.
- de longh RU, Abud He Fau - Hime GR, Hime GR (2006) WNT/Frizzled signaling in eye development and disease. *Front Biosci* 11:2442-64.
- de longh RU, Chen Y Fau - Kokkinos MI, Kokkinos Mi Fau - McAvoy JW, McAvoy JW (2004) BMP and activin receptor expression in lens development. *Mol Vis* 10:: 566-576.
- de Melker AA, Desban N, Duband J-L (2004) Cellular localization and signaling activity of β -catenin in migrating neural crest cells. *Developmental Dynamics* 230: 708-726.
- Demyer W Fau - Zeman W, Zeman W (1963) Alobar holoprosencephaly (arhinencephaly) with median cleft lip and palate: clinical, electroencephalographic and nosologic considerations. *Confin Neurol* ;23:1-36.
- Dottori M, Gross MK, Labosky P, Goulding M (2001) The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. *Development* 128: 4127-4138.
- Dublin I (1970) [Comparative embryologic studies of the early development of the cornea and the pupillary membrane in reptiles, birds and mammals]. *Acta Anat (Basel)* ;76(3):381-408.
- Dudley AT, Robertson EJ (1997) Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Developmental Dynamics* 208: 349-362.

- Eccles MR, Schimmenti LA (1999) Renal-coloboma syndrome: a multi-system developmental disorder caused by PAX2 mutations. *Clinical Genetics* 56: 1-9.
- Esteve P, Sardonis A, Ibañez C, Shimono A, Guerrero I, et al. (2011) Secreted frizzled-related proteins are required for Wnt/ β -catenin signalling activation in the vertebrate optic cup. *Development* 138: 4179-4184.
- Etchevers HC, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM (1999) Anterior cephalic neural crest is required for forebrain viability. *Development* 126: 3533-3543.
- Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF (2001) The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development* 128: 1059-1068.
- Evans AL, Gage PJ (2005) Expression of the homeobox gene Pitx2 in neural crest is required for optic stalk and ocular anterior segment development. *Human Molecular Genetics* 14: 3347-3359.
- Flügel-Koch C, Ohlmann A, Piatigorsky J, Tamm ER (2002) Disruption of anterior segment development by TGF- β 1 overexpression in the eyes of transgenic mice. *Developmental Dynamics* 225: 111-125.
- Fokina VM, Frolova EI (2006) Expression patterns of Wnt genes during development of an anterior part of the chicken eye. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235: 496-505.
- Fuhrmann S (2010) Chapter Three - Eye Morphogenesis and Patterning of the Optic Vesicle. In: Ross LC, Thomas AR, editors. *Current Topics in Developmental Biology*: Academic Press. pp. 61-84.
- Fuhrmann S, Chow L, Reh TA (2000) Molecular control of cell diversification in the vertebrate retina. *Results Probl Cell Differ* 31: 69-91.
- Fuhrmann S, Levine EM, Reh TA (2000) Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development* 127: 4599-4609.
- Furimsky M, Wallace VA (2006) Complementary Gli activity mediates early patterning of the mouse visual system. *Developmental Dynamics* 235: 594-605.
- Furuta Y, Hogan BLM (1998) BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes & Development* 12: 3764-3775.
- Gage PJ, Rhoades W, Prucka SK, Hjalt T (2005) Fate Maps of Neural Crest and Mesoderm in the Mammalian Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46: 4200-4208.
- Gage PJ, Suh H, Camper SA (1999) Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* 126: 4643-4651.
- Galy A, Néron B, Planque N, Saule S, Eychène A (2002) Activated MAPK/ERK Kinase (MEK-1) Induces Transdifferentiation of Pigmented Epithelium into Neural Retina. *Developmental Biology* 248: 251-264.

García-Castro Mnl, Marcelle C, Bronner-Fraser M (2002) Ectodermal Wnt Function as a Neural Crest Inducer. *Science* 297: 848-851.

Golden JA, Bracilovic A, McFadden KA, Beesley JS, Rubenstein JLR, et al. (1999) Ectopic bone morphogenetic proteins 5 and 4 in the chicken forebrain lead to cyclopia and holoprosencephaly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 2439-2444.

Gregory-Evans CY, Williams MJ, Halford S, Gregory-Evans K (2004) Ocular coloboma: a reassessment in the age of molecular neuroscience. *Journal of Medical Genetics* 41: 881-891.

Grocott T, Johnson S, Bailey AP, Streit A (2011) Neural crest cells organize the eye via TGF- β and canonical Wnt signalling. *Nat Commun* 2: 265.

Hammerschmidt M, Pelegri F, Mullins MC, Kane DA, van Eeden FJ, et al. (1996) dino and mercedes, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo. *Development* 123: 95-102.

Harada T, Harada C Fau - Parada LF, Parada LF (2007) Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes Dev* 21(4):367-78.

Harris TJC, Tepass U (2010) Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 502-514.

Harris WA (1997) Cellular diversification in the vertebrate retina. *Current Opinion in Genetics & Development* 7: 651-658.

Hartsock A, Nelson WJ (2008) Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* 1778: 660-669.

Haustein J (1983;) On the ultrastructure of the developing and adult mouse corneal stroma. *Anat Embryol (Berl)* 168(2):291-305.

His W (1868) Untersuchungen u"ber die erste Anlage des Wirbeltierleibes: die erste Entwicklung des Hu"hnchens im Ei. . Vogel FCW, Leipzig,

237 p

Hjalt TA, Amendt Ba Fau - Murray JC, Murray JC (2001) PITX2 regulates procollagen lysyl hydroxylase (PLOD) gene expression: implications for the pathology of Rieger syndrome. *J Cell Biol* 152(3):: 545-552.

Hollyday M, McMahon JA, McMahon AP (1995) Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mechanisms of Development* 52: 9-25.

Honoré SM, Aybar MJ, Mayor R (2003) Sox10 is required for the early development of the prospective neural crest in *Xenopus* embryos. *Developmental Biology* 260: 79-96.

- Hörstadius S (1950) *The Neural Crest: Its Properties and Derivatives in the Light of Experimental Research*. Oxford University Press, London, 111 p.
- Huang X, Saint-Jeannet JP (2004) Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Dev Biol* 275: 1-11.
- Ikeya M, Lee SMK, Johnson JE, McMahon AP, Takada S (1997) Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* 389: 966-970.
- Itoh K, Ossipova O, Sokol SY (2014) GEF-H1 functions in apical constriction and cell intercalations and is essential for vertebrate neural tube closure. *Journal of Cell Science* 127: 2542-2553.
- Ittner LM, Wurdak H, Schwerdtfeger K, Kunz T, Ille F, et al. (2005) Compound developmental eye disorders following inactivation of TGF β signaling in neural-crest stem cells. *Journal of Biology* 4: 11-11.
- Jiang X, Iseki S, Maxson RE, Sucov HM, Morriss-Kay GM (2002) Tissue Origins and Interactions in the Mammalian Skull Vault. *Developmental Biology* 241: 106-116.
- Johnston Mc Fau - Noden DM, Noden Dm Fau - Hazelton RD, Hazelton Rd Fau - Coulombre JL, Coulombre JI Fau - Coulombre AJ, Coulombre AJ (1979) Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res* 29(1):27-43.
- Kao WWY, Liu H, Zhang J (2013) Wakayama Symposium: Challenges of Future Research in Ocular Surface Cell Biology. *The ocular surface* 11: 19-24.
- Kawakami Y, Capdevila J, Büscher D, Itoh T, Esteban CRg, et al. (2001) WNT Signals Control FGF-Dependent Limb Initiation and AER Induction in the Chick Embryo. *Cell* 104: 891-900.
- Kengaku M, Okamoto H (1993) Basic fibroblast growth factor induces differentiation of neural tube and neural crest lineages of cultured ectoderm cells from *Xenopus* gastrula. *Development* 119: 1067-1078.
- Kidson SH, Kume T, Deng K, Winfrey V, Hogan BLM (1999) The Forkhead/Winged-Helix Gene, Mf1, Is Necessary for the Normal Development of the Cornea and Formation of the Anterior Chamber in the Mouse Eye. *Developmental Biology* 211: 306-322.
- Kim H-S, Shin J, Kim S-H, Chun H-S, Kim J-D, et al. (2007) Eye field requires the function of Sfrp1 as a Wnt antagonist. *Neuroscience Letters* 414: 26-29.
- Kim H-T, Kim J (2012) Compartmentalization of vertebrate optic neuroepithelium: External cues and transcription factors. *Molecules and Cells* 33: 317-324.
- Kirby MI Fau - Gale TF, Gale Tf Fau - Stewart DE, Stewart DE (1983) Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science* 220(4601):1059-61.
- Kish PE, Bohnsack BL, Gallina DD, Kasprick DS, Kahana A (2011) The eye as an organizer of craniofacial development. *Genesis (New York, NY : 2000)* 49: 222-230.

- Kitamoto J, Hyer J (2010) The expression of Wnt2b in the optic cup lip requires a border between the pigmented and nonpigmented epithelium. *Molecular Vision* 16: 2701-2717.
- Klimova L, Kozmik Z (2014) Stage-dependent requirement of neuroretinal Pax6 for lens and retina development. *Development* 141: 1292-1302.
- Knight RD, Nair S, Nelson SS, Afshar A, Javidan Y, et al. (2003) lockjaw encodes a zebrafish tfap2a required for early neural crest development. *Development* 130: 5755-5768.
- Kolmer WE, Aik W.; Lauber, H., editors. (1936) *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Haut und Sinnesorgane. 2. Teil: Auge.* .
Verlag von Julius springer
. p. 623-676.
- Kontges G, Lumsden A (1996) Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* 122: 3229-3242.
- Kos R, Reedy MV, Johnson RL, Erickson CA (2001) The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Development* 128: 1467-1479.
- Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK, Matsumoto K, Momose T, Uno K, et al. (2000) Tbx5 and the Retinotectum Projection. *Science* 287: 134-137.
- Krupke OA, Burke RD (2014) Eph-Ephrin signaling and focal adhesion kinase regulate actomyosin-dependent apical constriction of ciliary band cells. *Development* 141: 1075-1084.
- Kulesa P, Ellies DL, Trainor PA (2004) Comparative analysis of neural crest cell death, migration, and function during vertebrate embryogenesis. *Developmental Dynamics* 229: 14-29.
- Kumar S, Duester G (2010) Retinoic acid signaling in perioptic mesenchyme represses Wnt signaling via induction of Pitx2 and Dkk2. *Developmental Biology* 340: 67-74.
- LaBonne C, Bronner-Fraser M (1998) Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development* 125: 2403-2414.
- LaBonne C, Bronner-Fraser M (2000) Snail-Related Transcriptional Repressors Are Required in *Xenopus* for both the Induction of the Neural Crest and Its Subsequent Migration. *Developmental Biology* 221: 195-205.
- Lad EM, Cheshier SH, Kalani MYS (2008) Wnt-Signaling in Retinal Development and Disease. *Stem Cells and Development* 18: 7-16.
- Lagutin OV, Zhu CC, Kobayashi D, Topczewski J, Shimamura K, et al. (2003) Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes & Development* 17: 368-379.

- Langenberg T, Kahana A, Wszalek JA, Halloran MC (2008) The Eye Organizes Neural Crest Cell Migration. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists 237: 1645-1652.
- Le Douarin N (1969.) Particularité's du noyau interphasique chez la Caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*). Utilisation de ces particularité's comme 'marquage biologique' dans les recherches sur les interactions tissulaires et les migrations cellulaires au cours de l'ontogenèse.
- . *Bull Biol Fr Belg* 103, 435–452.
- Le Douarin NM, Couly G, Creuzet SE (2012) The neural crest is a powerful regulator of pre-otic brain development. *Developmental Biology* 366: 74-82.
- Le Douarin NM, Creuzet S, Couly G, Dupin E (2004) Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131: 4637-4650.
- Le Douarin NM, Teillet M-AM (1974) Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Developmental Biology* 41: 162-184.
- Le Lievre C (1974) Rôle des cellules méséctodermiques issues des crêtes neurales céphaliques dans la formation des arcs branchiaux et du squelette viscéral. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 31: 453-477.
- Le Lièvre CS, Le Douarin NM (1975) Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 34: 125-154.
- Le Douarin NM, Kalcheim, C., (1999) *The Neural Crest*, second ed. Cambridge Univ Press, London.
- Lee S-H, Bédard O, Buchtová M, Fu K, Richman JM (2004) A new origin for the maxillary jaw. *Developmental Biology* 276: 207-224.
- Levin M (1998) The roles of activin and follistatin signaling in chick gastrulation. *Int J Dev Biol* 42(4):553-9.
- Lewis JL, Bonner J, Modrell M, Ragland JW, Moon RT, et al. (2004) Reiterated Wnt signaling during zebrafish neural crest development. *Development* 131: 1299-1308.
- Li J, Vogt PK (1993) The retroviral oncogene qin belongs to the transcription factor family that includes the homeotic gene fork head. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 4490-4494.
- Liem Jr KF, Tremml G, Roelink H, Jessell TM (1995) Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82: 969-979.

- Luo T, Lee Y-H, Saint-Jeannet J-P, Sargent TD (2003) Induction of neural crest in *Xenopus* by transcription factor AP2 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 532-537.
- Lupo G, Gestri G, O'Brien M, Denton RM, Chandraratna RAS, et al. (2011) Retinoic acid receptor signaling regulates choroid fissure closure through independent mechanisms in the ventral optic cup and periocular mesenchyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 8698-8703.
- MacDonald IM, Tran M, Musarella MA (2004) Ocular genetics: current understanding. *Survey of Ophthalmology* 49: 159-196.
- Marcos Simões-Costa MEB (2013) Insights into neural crest development and evolution from genomic analysis. *Genome Res* 23(7):1069-80. doi: 10.1101/gr.157586.113.
- Martin AC, Goldstein B (2014) Apical constriction: themes and variations on a cellular mechanism driving morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* 141: 1987-1998.
- Martynoga B, Morrison H, Price DJ, Mason JO (2005) *Foxg1* is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Developmental Biology* 283: 113-127.
- Matt N, Dupé V, Garnier J-M, Dennefeld C, Chambon P, et al. (2005) Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells. *Development* 132: 4789-4800.
- Matt N, Ghyselinck NB, Pellerin I, Dupé V (2008) Impairing retinoic acid signalling in the neural crest cells is sufficient to alter entire eye morphogenesis. *Developmental Biology* 320: 140-148.
- Mayor R, Guerrero N, Martinez C (1997) Role of FGF and noggin in neural crest induction. *Dev Biol* 189: 1-12.
- Mayor R, Morgan R, Sargent MG (1995) Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121: 767-777.
- Mayor R, Theveneau E (2013) The neural crest. *Development* 140: 2247-2251.
- McGrew LL, Lai C-J, Moon RT (1995) Specification of the Anteroposterior Neural Axis through Synergistic Interaction of the Wnt Signaling Cascade withnogginandfollistatin. *Developmental Biology* 172: 337-342.
- ME D (1977) Holoprosencephaly (cyclopia-arhinencephaly) Vinken PJ, Bruyn GW, editors Amerstam: North-Hollan.
- Merte J, Jensen D, Wright K, Sarsfield S, Wang Y, et al. (2010) *Sec24b* selectively sorts *Vangl2* to regulate planar cell polarity during neural tube closure. *Nature cell biology* 12: 41-48.

- Meulemans D, Bronner-Fraser M (2004) Gene-Regulatory Interactions in Neural Crest Evolution and Development. *Developmental Cell* 7: 291-299.
- Milet C, Monsoro-Burq AH (2012) Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Developmental Biology* 366: 22-33.
- Molven A, Njølstad PR, Fjose A (1991) Genomic structure and restricted neural expression of the zebrafish *wnt-1* (*int-1*) gene. *The EMBO Journal* 10: 799-807.
- Momose T, Tonegawa A, Takeuchi J, Ogawa H, Umesono K, et al. (1999) Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Development, Growth & Differentiation* 41: 335-344.
- Monsoro-Burq A-H, Fletcher RB, Harland RM (2003) Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals. *Development* 130: 3111-3124.
- Morcillo J, Martínez-Morales JR, Trousse F, Fermin Y, Sowden JC, et al. (2006) Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development* 133: 3179-3190.
- Morrison DA, FitzPatrick DR, Fleck BW (2002) Iris coloboma and a microdeletion of chromosome 22: del(22)(q11.22). *British Journal of Ophthalmology* 86: 1316.
- Moury JD, Jacobson AG (1989) Neural fold formation at newly created boundaries between neural plate and epidermis in the axolotl. *Developmental Biology* 133: 44-57.
- Müller F, Rohrer H, Vogel-Höpker A (2007) Bone morphogenetic proteins specify the retinal pigment epithelium in the chick embryo. *Development* 134: 3483-3493.
- Murdoch JN, Damrau C, Paudyal A, Bogani D, Wells S, et al. (2014) Genetic interactions between planar cell polarity genes cause diverse neural tube defects in mice. *Disease Models & Mechanisms* 7: 1153-1163.
- Nguyen M, Arnheiter H (2000) Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF. *Development* 127: 3581-3591.
- Nieto MA, Sargent Mg Fau - Wilkinson DG, Wilkinson Dg Fau - Cooke J, Cooke J (1994) Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264(5160):835-9.
- Noden DM, Trainor PA (2005) Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *Journal of Anatomy* 207: 575-601.
- NodenDM. (1982;) Periocular mesenchyme: neural crest and mesodermal interactions. . *JacobiecFA eds Ocular Anatomy, Embryology, and Teratology* 97–119. Harper & Row Hagerstown, MD.
- Nordstrom U, Jessell Tm Fau - Edlund T, Edlund T (2002 Jun) Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nat Neurosci* ;5(6): :525-532.

- Ohkubo Y, Chiang C, Rubenstein JLR (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.
- Olson HE, Tambunan D, LaCoursiere C, Goldenberg M, Pinsky R, et al. (2015) Mutations in epilepsy and intellectual disability genes in patients with features of Rett syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*: n/a-n/a.
- Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M (2008) Concise Review: Pax6 Transcription Factor Contributes to both Embryonic and Adult Neurogenesis as a Multifunctional Regulator. *STEM CELLS* 26: 1663-1672.
- Ozanic V Fau - Rayborn M, Rayborn M Fau - Sagun D, Sagun D (1977) Observations on the morphology of the developing primate cornea: epithelium, its innervation and anterior stroma. *J Morphol* 153(2):263-97.
- Pei Yf Fau - Rhodin JA, Rhodin JA (1970) The prenatal development of the mouse eye. *Anat Rec* 168(1):105-25.
- Pekarik V, Bourikas D, Miglino N, Joset P, Preiswerk S, et al. (2003) Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat Biotech* 21: 93-96.
- Perron M, Boy S, Amato MA, Viczian A, Koebernick K, et al. (2003) A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* 130: 1565-1577.
- Petryk A, Graf D, Marcucio R (2015) Holoprosencephaly: signaling interactions between the brain and the face, the environment and the genes, and the phenotypic variability in animal models and humans. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4: 17-32.
- Pittack C, Grunwald GB, Reh TA (1997) Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos. *Development* 124: 805-816.
- Plouhinec JL, Leconte L, Sauka-Spengler T, Bovolenta P, Mazan S, et al. (2005) Comparative analysis of gnathostome Otx gene expression patterns in the developing eye: implications for the functional evolution of the multigene family. *Developmental Biology* 278: 560-575.
- Porges Y, Gershoni-Baruch R Fau - Leibur R, Leibur R Fau - Goldscher D, Goldscher D Fau - Zonis S, Zonis S Fau - Shapira I, et al. (1992) Hereditary microphthalmia with colobomatous cyst. *Am J Ophthalmol* 114(1):30-4.
- Reme C Fau - d'Epinay SL, d'Epinay SL (1981) Periods of development of the normal human chamber angle. *Doc Ophthalmol* 51(3):241-68.
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-1416.

- Roelink H, Nusse R (1991) Expression of two members of the Wnt family during mouse development--restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube. *Genes Dev* ;5(3):381-8.
- Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, et al. (1996) Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14: 357-360.
- Roth M, Bonev B, Lindsay J, Lea R, Panagiotaki N, et al. (2010) FoxG1 and TLE2 act cooperatively to regulate ventral telencephalon formation. *Development* 137: 1553-1562.
- Saint-Jeannet J-P, He X, Varmus HE, Dawid IB (1997) Regulation of dorsal fate in the neuraxis by Wnt-1 and Wnt-3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 13713-13718.
- Sakuta H, Suzuki, R., Takahashi, H., Kato, A., Shintani, T., Iemura, , S. Y, T.S., Ueno, N., and Noda, M. ((2001).) Ventroptin: a BMP-4 antagonist expressed in a double-gradient pattern in the retina. . *Science* 293, 111-115. .
- Sasai N, Mizuseki K, Sasai Y (2001) Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in *Xenopus*. *Development* 128: 2525-2536.
- Sawyer JM, Harrell JR, Shemer G, Sullivan-Brown J, Roh-Johnson M, et al. (2010) Apical constriction: A cell shape change that can drive morphogenesis. *Developmental Biology* 341: 5-19.
- Schneider RA (1999) Neural Crest Can Form Cartilages Normally Derived from Mesoderm during Development of the Avian Head Skeleton. *Developmental Biology* 208: 441-455.
- Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ (1996) Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381: 235-238.
- Schumacher JA, Hashiguchi M, Nguyen VH, Mullins MC (2011) An intermediate level of BMP signaling directly specifies cranial neural crest progenitor cells in zebrafish. *PLoS One* 6: e27403.
- Schwanbeck R (2015) The Role of Epigenetic Mechanisms in Notch Signaling During Development. *Journal of Cellular Physiology* 230: 969-981.
- Sclafani AM, Skidmore JM, Ramaprakash H, Trumpp A, Gage PJ, et al. (2006) Nestin-Cre mediated deletion of Pitx2 in the mouse. *genesis* 44: 336-344.
- See AW-M, Clagett-Dame M (2009) The temporal requirement for vitamin A in the developing eye: Mechanism of action in optic fissure closure and new roles for the vitamin in regulating cell proliferation and adhesion in the embryonic retina. *Developmental Biology* 325: 94-105.
- Selleck MA, Bronner-Fraser M (1995) Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development* 121: 525-538.

- Shah SP, Taylor AE, Sowden JC, Ragge NK, Russell-Eggitt I, et al. (2011) Anophthalmos, Microphthalmos, and Typical Coloboma in the United Kingdom: A Prospective Study of Incidence and Risk. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52: 558-564.
- Shariatmadari M, Peyronnet J, Papachristou P, Horn Z, Sousa KM, et al. (2005) Increased Wnt levels in the neural tube impair the function of adherens junctions during neurulation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 30: 437-451.
- Smith RS, Zabaleta A, Savinova OV, John SWM (2001) The mouse anterior chamber angle and trabecular meshwork develop without cell death. *BMC Developmental Biology* 1: 3-3.
- Snider P, Olaopa M, Firulli AB, Conway SJ (2007) Cardiovascular Development and the Colonizing Cardiac Neural Crest Lineage. *TheScientificWorldJournal* 7: 1090-1113.
- Steinfeld J, Steinfeld I, Coronato N, Hampel M-L, Layer PG, et al. (2013) RPE specification in the chick is mediated by surface ectoderm-derived BMP and Wnt signalling. *Development* 140: 4959-4969.
- Storey KG, Crossley JM, De Robertis EM, Norris WE, Stern CD (1992) Neural induction and regionalisation in the chick embryo. *Development* 114: 729-741.
- Streit A, Lee KJ, Woo I, Roberts C, Jessell TM, et al. (1998) Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo. *Development* 125: 507-519.
- Tamimi Y, Lines M, Coca-Prados M, Walter MA (2004) Identification of Target Genes Regulated by FOXC1 Using Nickel Agarose-Based Chromatin Enrichment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45: 3904-3913.
- Theveneau E, Mayor R (2012) Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology* 366: 34-54.
- Trainor PA (2010) Craniofacial Birth Defects: The Role of Neural Crest Cells in the Etiology and Pathogenesis of Treacher Collins Syndrome and the Potential for Prevention. *American journal of medical genetics Part A* 0: 2984-2994.
- Tríbulo C, Aybar MJ, Nguyen VH, Mullins MC, Mayor R (2003) Regulation of Msx genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification. *Development* 130: 6441-6452.
- Trost A, Schroedl F, Lange S, Rivera FJ, Tempfer H, et al. (2013) Neural Crest Origin of Retinal and Choroidal Pericytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54: 7910-7921.
- Trujillo CM, Alonso A, Delgado AC, Damas C (2005) The rostral and caudal boundaries of the diencephalon. *Brain Research Reviews* 49: 202-210.

- Tsukiji N, Nishihara D, Yajima I, Takeda K, Shibahara S, et al. (2009) Mitf functions as an in ovo regulator for cell differentiation and proliferation during development of the chick RPE. *Developmental Biology* 326: 335-346.
- Tucker RP (2004) Antisense knockdown of the $\beta 1$ integrin subunit in the chicken embryo results in abnormal neural crest cell development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 1135-1139.
- Ueno N, Greene NDE (2003) Planar cell polarity genes and neural tube closure. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 69: 318-324.
- Van Raay TJ, Moore KB, Iordanova I, Steele M, Jamrich M, et al. (2005) Frizzled 5 Signaling Governs the Neural Potential of Progenitors in the Developing Xenopus Retina. *Neuron* 46: 23-36.
- van Raay TJ, Vetter ML (2004) Wnt/Frizzled Signaling during Vertebrate Retinal Development. *Developmental Neuroscience* 26: 352-358.
- Villanueva S, Glavic A, Ruiz P, Mayor R (2002) Posteriorization by FGF, Wnt, and Retinoic Acid Is Required for Neural Crest Induction. *Developmental Biology* 241: 289-301.
- Walker MB, Trainor PA (2006) Craniofacial malformations: intrinsic vs extrinsic neural crest cell defects in Treacher Collins and 22q11 deletion syndromes. *Clinical Genetics* 69: 471-479.
- Wallis D, Muenke M (2000) Mutations in holoprosencephaly. *Human Mutation* 16: 99-108.
- Walther C, Gruss P (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113: 1435-1449.
- Warkany J, Fau - Schraffenberger E, Schraffenberger E (1946) Congenital malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency; defects of the eye. *Arch Ophthalmol* 35:150-69.
- Weinstein DC, Hemmati-Brivanlou A (1999) NEURAL INDUCTION. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15: 411-433.
- Weston JA (1963.) A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest in the chick. . *Dev Biol* 6, 279–310.
- Williams AL, Bohnsack BL (2015) Neural crest derivatives in ocular development: Discerning the eye of the storm. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 105: 87-95.
- Wilson SI, Graziano E, Harland R, Jessell TM, Edlund T (2000) An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Current Biology* 10: 421-429.
- Wolda SL, Moody CJ, Moon RT (1993) Overlapping Expression of Xwnt-3A and Xwnt-1 in Neural Tissue of *Xenopus laevis* Embryos. *Developmental Biology* 155: 46-57.

- Wu L, Wang L Fau - Shangguan S, Shangguan S Fau - Chang S, Chang S Fau - Wang Z, Wang Z Fau - Lu X, et al. (2013) Altered methylation of IGF2 DMR0 is associated with neural tube defects. *Mol Cell Biochem* 380(1-2):33-42.
- Xuan S, Baptista CA, Balas G, Tao W, Soares VC, et al. (1995) Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron* 14: 1141-1152.
- Yamaguchi TP (2001) Heads or tails: Wnts and anterior–posterior patterning. *Current Biology* 11: R713-R724.
- Yoshikawa Y, Fujimori T, McMahon AP, Takada S (1997) Evidence That Absence of Wnt-3a Signaling Promotes Neuralization Instead of Paraxial Mesoderm Development in the Mouse. *Developmental Biology* 183: 234-242.
- Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, et al. (1996) Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381: 238-241.
- Zhang X-M, Yang X-J (2001) Temporal and Spatial Effects of Sonic Hedgehog Signaling in Chick Eye Morphogenesis. *Developmental Biology* 233: 271-290.
- Zhao S, Hung F-C, Colvin JS, White A, Dai W, et al. (2001) Patterning the optic neuroepithelium by FGF signaling and Ras activation. *Development* 128: 5051-5060.
- Zhao S, Overbeek PA (1999) Tyrosinase-Related Protein 2 Promoter Targets Transgene Expression to Ocular and Neural Crest-Derived Tissues. *Developmental Biology* 216: 154-163.