



HAL
open science

Rôle de l'acide rétinoïque dans la neurogenèse corticale chez la souris

Carole Haushalter

► **To cite this version:**

Carole Haushalter. Rôle de l'acide rétinoïque dans la neurogenèse corticale chez la souris. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ063 . tel-01565090

HAL Id: tel-01565090

<https://theses.hal.science/tel-01565090>

Submitted on 19 Jul 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.

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé (ED414)

IGBMC - CNRS UMR 7104 - INSERM U964 – Département Biologie du Développement et Cellules Souches

THÈSE présentée par :

Carole HAUSHALTER

soutenue le : **28 septembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Biologie du développement

**Rôle de l'acide rétinoïque
dans la neurogenèse corticale
chez la souris**

THÈSE dirigée par :

Dr. DOLLÉ Pascal

Maître de Conférences, Praticien Hospitalier,
Université de Strasbourg, IGBMC, Illkirch

Dr. RHINN Muriel

Chargé de Recherche, CNRS, IGBMC, Illkirch

RAPPORTEURS :

Dr. DUPÉ Valérie

Pr. NGUYEN Laurent

Chargé de Recherche, INSERM, IGDR, Rennes

Professeur, Université de Liège, GIGA-Neurosciences, Liège

PRÉSIDENT DU JURY :

Pr. CHELLY Jamel

Professeur, Praticien Hospitalier,
Université de Strasbourg, IGBMC, Illkirch

EXAMINATEUR EXTERNE :

Dr. GILARDI-HEBENSTREIT Pascale

Directeur de recherche, CNRS, IBENS, Paris

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Dr. DUPÉ, le Dr. GILARDI-HEBENSTREIT, le Pr. NGUYEN et le Pr. CHELLY pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Mes remerciements vont ensuite au Dr. Pascal DOLLÉ qui m'a donné la chance d'intégrer son équipe de recherche il y a maintenant un peu plus de 5 ans. J'ai eu l'opportunité de travailler sur plusieurs thématiques, depuis mon premier stage de master jusqu'à la fin de ma thèse, ce qui a fait défiler le temps à grande vitesse et m'a apporté beaucoup de motivation tout au long de ma présence dans l'équipe. Il m'a été très agréable d'interagir avec vous lors de mes présentations orales ou par le biais de vos corrections de mes divers travaux. Vous êtes une personne mesurée et d'une grande richesse, dont je suis heureuse d'avoir été l'étudiante.

Merci Pascal pour votre présence scientifique et humaine.

Je remercie également tout particulièrement le Dr. Muriel RHINN qui m'a si soigneusement encadrée depuis mon arrivée dans l'équipe. Muriel, tu m'as tout simplement tout appris et je t'en serai toujours reconnaissante. Tes qualités professionnelles, ton intérêt pour la Science, ta rigueur et ton souhait du travail bien fait me servent d'exemple. Tu t'es toujours montrée disponible pour moi, en toutes occasions, à n'importe quelle heure, n'importe quel moment. Tu sais qu'il s'en est passé des choses depuis le début de notre projet, mais l'énergie remarquable que tu as déployée m'a portée et motivée pour donner le meilleur de moi-même. Enfin, tu n'es pas juste ma directrice de thèse, mais aussi mon amie. J'ai pu te confier mes doutes, mes pensées et en contre partie, tu as été à l'écoute et m'a donné de précieux conseils. Nous avons aussi partagé plein de choses de nos petites vies, ce qui a détendu et animé nos journées. Nous avons aussi eu l'occasion d'un peu voyager, de danser et de bien rigoler ensemble, ce qui a renforcé notre complicité. Et même si on a loupé Cancún, on a eu notre cocktail à Nuremberg.

Merci Muriel pour ton soutien et ta confiance.

Toujours de bon conseil, merci à Brigitte et Valérie pour leurs diverses aides techniques et scientifiques. Brigitte, tu as été une génotypeuse et coupeuse hors paire ; Valérie tu as dû répondre à la grande diversité de mes questionnements, et tu m'es toujours venu en aide ! Brigitte et Valérie, mes relectrices de thèse, Brigitte superfemme sportive et féminine, Valérie consciencieuse et dévouée.

Merci Brigitte et Valérie pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Merci à Karen, Wojteck et Agnès pour leur intérêt et critique scientifique lors de mes présentations orales. Karen, je retiendrai l'intérêt de nos discussions souvent profondes ainsi que votre dynamisme, votre aide et votre franchise. Wojteck et Agnès, merci pour l'ensemble de vos conseils. Merci à Ania, une jeune femme forte et plein d'entrain. J'ai pu discuter avec toi de tout et de rien et de choses aussi parfois plus importantes avec un anglais que tu as toujours réussi à comprendre ! Merci à Marion, la légère fille du Sud qui a toujours le sourire ! Nos sandwichs-machines et nos mini-pauses de midi me manqueront. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité ! Tun, une métamorphose qui s'est opéré sur toi ! Merci pour tes multiples cadeaux de Thaïlande dont je profite et d'avoir enlevé l'énorme araignée noire de la bibliothèque ! Je pense aussi à l'ensemble des membres passés de l'équipe dont Marie, Monica, Virginie et Anna qui m'ont accueillie et beaucoup soutenue. Merci aussi à la petite Laure A. qui a apporté, le temps d'un stage de master, beaucoup de fraîcheur et de travail ! Merci à Virginie, Marion et Laure pour leur sens de la fête.

Merci à toute l'équipe pour l'ambiance chaleureuse qu'elle dégage.

Je remercie aussi Adèle et Laure N. pour leur gentillesse, leurs conseils, leur disponibilité et leurs prêts d'anticorps. Adèle, je me souviendrai particulièrement de cette soirée terrible du black out groupé des -80°C, durant laquelle tu as fait preuve de beaucoup de sang froid. Merci également à Perrine et Aline pour leurs conseils.

Merci aux Pr. CHELLY et Dr. GODIN de leur confiance pour avoir mis à notre disposition leur matériel d'électroporation in utero. Merci Juliette pour ton dynamisme, ton intérêt pour notre projet et tes précieux conseils scientifiques et techniques. Merci Jamel de vous être montré disponible pour présider mon jury de thèse ainsi que vos précieux conseils scientifiques. Merci à Loïc de nous avoir fait une démonstration de la technique d'électroporation in utero. Merci Peggy pour ton aide et ton soutien dans les manip d'électroporation. Merci à Peggy, Ekaterina et Loïc de s'être montrés plus d'une fois arrangeants pour les créneaux de la salle de chirurgie. Merci à Alexandre et William pour les réassorts d'isoflurane.

Je remercie Maité pour sa disponibilité et sans qui mes divers rapports ainsi que cette thèse ne seraient pas aussi bien imprimés ! Je pense aussi au personnel de l'animalerie, du centre d'imagerie et du service informatique.

Je tiens ensuite à remercier Benoît, un homme toujours à la hauteur, qui me fait vivre plein de belles choses. Merci de m'avoir fait à manger et de m'avoir soutenue tout au long de la thèse ! Je remercie aussi Marie-Paule et Dominique pour leur bon repas et qui se sont toujours montrés compréhensifs dans mon travail de thèse. Merci à l'ensemble de la famille MEYER-WEBER pour leur soutien.

Je remercie mes parents qui sans eux je n'aurai jamais pu faire cette thèse. Merci pour les visites et les bons repas du dimanche soir qui vont continuer bien évidemment ! Merci pour les quelques expéditions du samedi, à trois avec Papa ou juste nous deux Maman, qui m'ont changé les idées ! Merci à Alexandre, Virginie et les enfants pour leurs conseils et leur joie de vivre ! Merci à Eléa et Evan de m'avoir fait découvrir Pat'patrouille. Merci à Tata et Tonton, pour votre gentillesse, vos bons repas, vos excellents gâteaux et votre compréhension.

Merci à l'ensemble de ma famille pour son soutien tout simplement.

Enfin, je remercie mes amis pour leur attention et leur soutien. Merci à vous pour votre gentillesse et votre intérêt pour mon projet de thèse, sujet qui anime parfois quelques instants d'une soirée ! Merci également de rendre mes samedis soirs et autres moments si agréables et variés. Merci à l'ensemble de mes amis de l'institut pour leur soutien et leur aide. Et enfin, merci à mes amis de promo, qui m'ont fait avoir un énorme fou-rire un soir de restauration chinoise, m'ont surprise avec de beaux costumes un soir d'animation mexicaine et avec qui nous faisons travailler nos méninges dans une ambiance irlandaise.

Merci à vous, mes amis !

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	i
LISTE DES ABRÉVIATIONS	6
INTRODUCTION GÉNÉRALE	13
INTRODUCTION	17
I. Signalisation par l'acide rétinoïque	18
1. Physiologie générale de la vitamine A	18
1.1. Fonctions de la vitamine A chez l'adulte	18
1.2. Vitamine A chez l'embryon	21
1.2.1. Syndrôme fœtal de carence en vitamine A	21
1.2.2. Effet tératogène de l'excès en vitamine A.....	21
2. Voie de synthèse de l'acide rétinoïque	23
2.1. Rétinoïdes et absorption du rétinol	23
2.2. Rétinoïdes chez l'embryon	25
2.3. Contrôle de l'induction du signal dans la cellule cible.....	27
2.4. Mode d'action de l'acide rétinoïque.....	31
3. Métabolisme tissu-spécifique de l'acide rétinoïque dans l'embryon	32
3.1. Spectre d'activité de l'acide rétinoïque dans les tissus embryonnaires	32
3.2. Synthèse tissu-spécifique de l'acide rétinoïque au cours de l'embryogenèse.....	35
3.2.1. Alcool- et rétinol-déshydrogénases	35
3.2.1.a. Profils d'expression des <i>Adhs</i>	35
3.2.1.b. Phénotypes associés aux pertes de fonctions des <i>Adhs</i>	36
3.2.1.c. Profils d'expression des <i>Rdhs</i>	36
3.2.1.d. Mutation nulle du gène <i>Rdh10</i>	38
3.2.2. Rétinaldéhyde déshydrogénases	41
3.2.2.a. Profils d'expression des <i>Raldhs</i>	41

3.2.2.b. Phénotypes associés aux pertes de fonction de <i>Raldh1</i> et <i>Raldh3</i>	44
3.2.2.c. La mutation nulle du gène <i>Raldh2</i>	45

II. Implication de l'acide rétinoïque dans le développement du système nerveux central 47

1. Développement précoce du système nerveux central 47

1.1. Gastrulation et formation du tube neural 47

1.1.1. Induction neurale aux cours des stades gastrula et neurula 47

1.1.2. Rôle des rétinoïdes dans la régionalisation antéro-postérieure de l'épiblaste..... 48

1.2. Gastrulation et neurulation..... 50

1.3. Régionalisation du tube neural..... 52

1.3.1. Développement du cerveau postérieur et de la moelle épinière 52

1.3.1.a. Signalisation rétinoïde dans le cerveau postérieur..... 54

1.3.1.b. Fonctions des gènes *Raldh2* et *Rdh10* dans la régionalisation du cerveau postérieur..... 55

1.3.1.c. Rôle des enzymes de dégradation dans le développement du cerveau postérieur..... 57

1.3.1.d. Signalisation rétinoïde dans le processus de l'allongement caudal de l'embryon 58

1.3.1.e. Signalisation rétinoïde dans la moelle épinière 59

1.3.2. Développement du cerveau antérieur 60

1.3.2.a. Signalisation rétinoïde dans le cerveau antérieur 61

1.3.2.b. Fonction précoce du gène *Raldh2* dans le cerveau antérieur 62

2. Développement du cortex cérébral 65

2.1. Origine et composition du cortex cérébral 65

2.1.1. Régionalisation dorso-ventrale du télencéphale 65

2.1.2. Structures dérivées du télencéphale..... 66

2.1.2.a. Origine embryonnaire du cortex cérébral 66

2.1.2.b. Régionalisation du cortex cérébral 66

2.1.3. Composition neuronale du cortex cérébral 68

2.1.3.a. Organisation hodologique des couches corticales 69

2.1.3.b. Organisation histologiques des couches corticales..... 69

2.2. Processus et étapes clés du développement cortical 71

2.2.1. Expansion et différenciation de l'épithélium neural 71

2.2.2. Phase neurogénique et colonisation corticale	73
2.2.2.a. Rôle des populations progénitrices	73
2.2.2.b. Spécification des progéniteurs néocorticaux	74
2.2.2.c. Lamination du néocortex	76
2.2.2.d. Spécification des populations neuronales.....	78
2.2.3. Migration neuronale.....	78
2.2.3.a. Migration des neurones corticaux et interneurons	78
2.2.3.b. Migration des neurones néocorticaux nés précocément et tardivement.....	80
2.3. Processus de régulation de la neurogenèse	82
2.3.1. Contrôle de la destinée des populations progénitrices.....	82
2.3.2. Contrôle des phases de la migration neuronale	84
3. Structures non neurales importantes pour le développement cortical	85
3.1. Vascularisation du cortex cérébral	85
3.1.1. Rôle de la vascularisation au cours du développement cortical	85
3.2. Enveloppes du cortex : les méninges	86
3.2.1. Rôle des méninges au cours du développement cortical	86
3.3. Plexus choroïde et liquide céphalo-rachidien	88
3.3.1. Rôle du plexus choroïde et du LCR au cours du développement cortical	88
4. Malformations du développement cortical.....	89
4.1. Anomalies de la prolifération neuronale ou gliale	89
4.2. Anomalies de la migration neuronale	89
4.3. Anomalies post-migratoires	90
4.4. Tubulinopathies.....	91
RÉSULTATS	92
I. Présence des acteurs de la voie des rétinoides au cours de la neurogenèse corticale	93
1. Contexte de l'étude	93
1.1. Présence des acteurs de la voie rétinoides au cours du développement du SNC	93
1.2. Présence des acteurs de la voie rétinoides dans le cerveau antérieur précoce.....	94
2. Problématique.....	95
3. Résultats	96
3.1. Enzymes de synthèse de l'AR	96

3.2. Récepteurs de l'AR.....	99
3.3. Enzymes de la dégradation de l'AR	102
4. Conclusion	105
5. Matériel et méthodes	106
5.1. Hybridation <i>in situ</i> sur coupes histologiques	106
II. Inactivation de la synthèse d'acide rétinoïque.....	108
1. Contexte de l'étude	108
2. Problématique.....	108
3. Résultats	109
3.1. Caractérisation de la lignée <i>Wnt1-Cre</i> : inactivation tissu-spécifique.....	109
3.1.1. Validation de l'efficacité d'excision de la lignée <i>Wnt1-Cre</i>	109
3.1.2. Viabilité des embryons mutants générés par les lignée <i>Wnt1-Cre</i> et <i>Raldh2^{fllox}</i>	112
3.2. Caractérisation des lignées <i>ROSA-</i> et <i>CMV-Cre ER^{T2}</i> : inactivation inductible.....	114
3.2.1. Critères d'efficacité d'excision et de viabilité de la lignée <i>ROSA-Cre ER^{T2}</i>	115
3.2.2. Critères d'efficacité d'excision et de viabilité de la lignée <i>CMV-Cre ER^{T2}</i>	117
3.2.3. Validation de la lignée <i>CMV-Cre ER^{T2}</i>	119
4. Conclusion	120
5. Matériel et méthodes	121
5.1. Établissement des génotypes.....	121
5.2. Réaction X-gal sur coupes histologiques	122
5.3. Immunomarquage sur coupes histologiques	122
5.4. Préparation du tamoxifène	122
III. Rôle de l'acide rétinoïque produit par les méninges au cours du développement du néocortex	125
1. Contexte général de l'étude	125
2. Problématique.....	126
3. Résumé des résultats	126
4. Article soumis à la publication	127

IV. Implication de la signalisation rétinienne au cours de la neurogenèse précoce du cerveau antérieur	128
1. Contexte général de l'étude	128
2. Problématique	129
3. Résumé des résultats	129
4. Article en préparation	130
DISCUSSION/ PERSPECTIVES.....	132
1. Étude de la fonction tardive du gène <i>Raldh2</i> sur la neurogenèse corticale	133
1.1. Rôle de l'AR produit par les méninges sur les populations de neurones corticaux..	134
1.2. AR et neurogenèse : mise en contexte avec les études précédentes.....	136
1.3. Y a-t-il une autre source d'AR dans le télencéphale que les méninges ?	138
1.4. Perspectives.....	139
2. Étude de la fonction du gène <i>Rdh10</i> sur la neurogenèse corticale précoce	141
2.1. Influence de l'AR sur la population des progéniteurs	141
2.2. Influence de l'absence de l'AR cortical sur la migration des neurones GABAergiques	143
2.3. Perspectives.....	144
CONCLUSION GÉNÉRALE	147
BIBLIOGRAPHIE	150
ANNEXES	169

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

A :	Antérieur
ab :	Arc branchial
Acx :	Archicortex
ADH :	Alcool déshydrogénase
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ao :	Aorte
AR :	Acide rétinoïque
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNt :	ARN de transfert
at :	Atrium

B

BCIP :	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate
BCO :	Beta-carotène oxygénase
bma :	Bourgeon du membre antérieur
BMP :	Bone Morphogenetic Protein
BNA :	Bordure neurale antérieure
bpd :	Bourgeon du poumon droit
bpg :	Bourgeon du poumon gauche
BrdU :	Bromodésoxyuridine

C

c :	Cornée
ca3 :	Région CA3 de l'hippocampe
CC :	Corps calleux
ccn :	Cellules des crêtes neurales
ce :	Capsule externe
ch :	Choane
ci :	Capsule interne
CMM :	Colonne motrice médiane
CML :	Colonne motrice latérale
CMV :	Cytomégalovirus
cm :	Cerveau moyen
cn :	Cavité nasale
cna :	Crête neurale antérieure
co :	Cœur
CPN :	Cellule progénitrice neurale

CR :	Cellule de Cajal-Retzius
cr :	Cristallin
CRABP :	Protéine liant l'AR cellulaire
Crb :	Cerebellum (cervelet)
CRBP :	Protéine liant le rétinol cellulaire
cp :	Cerveau postérieur
CYP26 :	Cytochrome p450 (sous-famille 26)
cx :	Cortex cérébral

D

DAB :	Diaminobenzidine
DBD :	Domaine de liaison à l'ADN
dNTP :	Désoxyribonucléotide triphosphate [N : Adénine (A), Cytosine (C), Guanine (G), Thymine (T)]
di :	Diencéphale
dig :	Digoxygénine
DR:	Répétition directe

E

ec :	Épithélium de la cornée
ee :	Ectoderme embryonnaire
EDTA :	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGL/EGM :	Éminence ganglionnaire latérale/médiane
En :	Jour de développement (« Embryonic day ») n
ENU :	Éthyl-nitroso-urée
EP :	Épithélium pigmentaire
EPO :	Épithélium olfactif
EPR :	Épithélium pigmentaire de la rétine
ER :	Ester de rétinyl
ER^{T2} :	Forme modifiée du domaine de liaison du ligand du récepteur aux oestrogènes
es :	Ectoderme de surface
EVA :	Endoderme viscéral antérieur

F

FGF :	Fibroblast Growth Factor
flox :	Séquence flanquée de sites LoxP
fn :	Région fronto-nasale
fo :	Foie

G

gd : Gyrus dentelé
GR : Cellule gliale radiaire

H

hi : Hippocampe
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
Hsp : Protéine de choc thermique

I

IGF : Insulin-like Growth Factor
ir : Isthme du rhombencéphale

J

j : Conjonctive palpébrale

L

LBD : Domaine de liaison au ligand
LCR : Liquide céphalo-rachidien
lp : Ligne primitive
LRAT : Lécithine rétinol acyltransférase

M

m : Méenchyme
ma: Membre antérieur
MAP : Microtubule Associated Protein
MB : Membrane basale
mc : Mésoderme cervical
MDC : Malformation du développement cortical
me : Méninges
mep: Moelle épinière
mi : Mésoderme intermédiaire
ml : Mésoderme latéral
mn : Mésonéphros
MNI : Migration nucléaire interkinétique
mp : Membre postérieur
mt Mésoderme du tronc
mx : Processus maxillaire

N

na :	Noyaux amygdaloïdes
NBT :	Nitro blue tetrazolium chloride
Ncx :	Néocortex
NE :	Cellule neuroépithéliale
NGS/NDS :	Sérum normal de chèvre/d'âne (« Normal Goat/Donkey Serum »)
no :	Nœud
np :	nasopharynx
NTP :	Ribonucléotide triphosphate [N : A, C, G et Uracile (U)]

O

O :	Bulbe olfactif
o :	nerf optique
OC :	Ourlet cortical
O/N :	Une nuit durant (« Overnight »)
oe :	Œil
ot :	Otocyste

P

P:	Postérieur
p:	Paupière
PA :	Progéniteur apical
pa :	Pallidum
PB :	Progéniteur basal
pb :	Paire de bases
PBS :	Tampon phosphate salin
PBT :	Tampon phosphate salin supplémenté en Tween20 à 0,1%
PC :	Plaque corticale
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
Pcx :	Paléocortex
PFA :	Paraformaldéhyde
pl :	Plexus choroïde
PMG :	Polymicrogyrie
Pn:	Jour post-natal n
pnc :	Plaque neurale caudale
PNI :	Progéniteur neural intermédiaire
PNM :	Processus nasal médian
Po :	Pont
po :	Poumons
PP :	Pré-plaque

PPr :	Palais primaire
PR :	Photorécepteur
pr :	Pré-rhombomère
PS :	Palais secondaire

Q

Qv :	Quatrième ventricule
-------------	----------------------

R

r :	Rhombomère
RALDH :	Rétinaldéhyde déshydrogénase
RAR :	Récepteur de l'acide rétinoïque
RARE :	Elément de réponse à l'acide rétinoïque
RBP :	Protéine de liaison au rétinol
rc :	Renflement céphalique
rd:	Rétine dorsale
RDH :	Rétinol déshydrogénase
re :	Rétine
RHO :	Rhodopsine
rn :	Rétine neurale
RT :	Température ambiante
rv :	Rétine ventrale
RXR :	Récepteur rétinoïde X

S

s :	septum
SB :	Substance blanche
SDR :	Déshydrogénase/réductase à courte chaîne
SHH :	Sonic Hedgehog
sm :	Sinus maxillaire
sn :	Septum nasal
SNARE :	Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor
SNC :	Système nerveux central
SO :	Sillon optique
so :	Somite
SP :	Sous-plaque
sp :	Sillon pré-optique
SSC :	Citrate de sodium salin
STAT :	Signal Transducers and Activators of Transcription
St :	Striatum

T

TAM :	Tamoxifène
ta :	Tronc artériel
td :	Tube digestif
te :	Téleencéphale
TGF-β :	Transforming Growth Factor- β
th :	Thalamus
tn :	Tube neural
tr :	Tronc
Tris :	Tampon trishydroxyméthylaminométhane

V

V :	Corne ventrale
VA :	Vitamine A
vd :	Ventricule droit
vec :	Voie d'éjection cardiaque
vg :	Ventricule gauche
vl :	Ventricule latéral
vo :	Selon le contexte précisé dans le texte : Vésicule optique ou vésicule otique
vt :	Vésicule télencéphalique

X

X-gal :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta- D-galactopyranoside
----------------	------------------------------------------------------

Y

YFP :	Yellow Fluorescent Protein
--------------	----------------------------

Z

ZI :	Zone intermédiaire
ZM :	Zone marginale
ZSV :	Zone sub-ventriculaire
ZV :	Zone ventriculaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La voie de signalisation des rétinoïdes, et en particulier de l'acide rétinoïque (AR), dérivé actif de la vitamine A, joue un rôle essentiel dans de nombreux aspects de la morphogenèse et de l'organogenèse des vertébrés. Contrairement aux signaux de nature peptidique (FGFs, Wnt, Sonic Hedgehog), l'AR est une petite molécule lipophile facilement diffusible. L'AR est le ligand de récepteurs nucléaires (hétérodimères RAR/RXR), qui contrôlent de manière directe la transcription de gènes cibles variés et critiques pour le développement embryonnaire. Diverses approches ont montré que l'AR est impliqué dans de nombreux phénomènes du développement, de la gastrulation jusqu'à l'organogenèse. L'AR étant une molécule directement active, sa présence dans les tissus embryonnaires doit être finement contrôlée par l'intermédiaire d'enzymes de synthèse (les rétinol-, RDH et rétinaldéhyde-déshydrogénases, RALDH) mais également par des enzymes de dégradation, les cytochromes P450 hydroxylases (CYP26A1, B1 et C1). L'ensemble des enzymes de synthèse et de dégradation de l'AR ont une expression tissu-spécifique et différentielle au cours du développement.

L'équipe du Dr. Dollé dispose de modèles de souris porteuses de mutations ciblées inactivant la fonction des enzymes responsables de la production d'AR. En utilisant ces modèles, l'équipe a caractérisé diverses fonctions de l'AR au cours du développement embryonnaire (somitogenèse, cardiogenèse, segmentation du cerveau postérieur, élongation de l'axe antéropostérieur de l'embryon, organogenèse).

L'équipe a réalisé une mutation nulle du gène murin *Raldh2* et a ainsi établi que l'enzyme RALDH2 est responsable de la synthèse de l'AR présent au sein de l'épithélium neural au cours de l'embryogenèse précoce. D'importants défauts du développement du cerveau antérieur ont été observés chez les mutants *Raldh2*^{-/-}. En effet, au jour embryonnaire (E)9, les mutants présentent une hypoplasie des territoires présomptifs des vésicules télencéphaliques, optiques et diencéphaliques. Ces résultats suggèrent qu'un pic d'AR produit tôt (vers E8,5) au cours du développement par l'enzyme RALDH2 stimulerait la croissance du télencéphale, des vésicules optiques et du diencéphale. Ce défaut de croissance est corrélé à une augmentation de la mort cellulaire et une diminution de la prolifération des cellules du neuroépithélium du cerveau antérieur. Ces résultats mettent en évidence le rôle de l'AR dans la croissance et la prolifération de l'épithélium neural au cours du développement précoce du cerveau antérieur.

De façon intéressante, après une expression précoce transitoire dans l'épithélium neural rostral, le gène *Raldh2* est induit dans les cellules des futures méninges du cortex cérébral à partir de E13, et son expression persiste au moins jusqu'aux stades péri-nataux. Les méninges

pourraient ainsi représenter une source locale d'AR qui diffuserait de l'espace méningé vers le cortex en développement.

Le développement neural cortical est un processus qui se déroule suivant trois grandes étapes : la phase d'expansion latérale (E9,5-E10,5), la phase de neurogenèse (E11,5-stades périnataux) et la phase de gliogenèse (stades périnataux-adulte). Il est connu qu'une combinaison de facteurs extrinsèques et intrinsèques contrôle divers aspects des différentes phases du développement neural cortical. L'AR produit par les méninges au moment de la phase de neurogenèse constituerait un bon candidat de facteur extrinsèque modulateur de cette étape. Les précédents travaux de l'équipe ont montré un rôle précoce de l'AR dans la phase d'expansion latérale du cerveau antérieur ; **mon sujet de thèse** s'interroge sur une action potentielle plus tardive de l'AR, au cours de la phase de neurogenèse du cortex cérébral, structure dérivée du cerveau antérieur.

Le premier objectif de ma thèse a été de générer un modèle d'inactivation conditionnelle du gène *Raldh2* dans les méninges afin de surmonter la létalité embryonnaire précoce du mutant nul *Raldh2*^{-/-} qui meurt à E9,5, suite à des défauts de développement du système cardio-vasculaire. Nous avons d'abord généré une mutation conditionnelle tissu-spécifique (lignée *Wnt1-Cre*) où le gène *Raldh2* est excisé dans les cellules de la crête neurale, tissu dont dérive les méninges. Nous avons réalisé deux autres mutations conditionnelles qui permettent d'inactiver le gène *Raldh2* dans toutes les cellules de l'embryon de manière inductible par le tamoxifène (lignées *ROSA26-CreER*^{T2} et *CMV-CreER*^{T2} croisées à la lignée *Raldh2*^{lox/lox}). Le but de ce premier objectif est d'obtenir des embryons mutants viables, où le gène *Raldh2* est inactivé avant le début de son expression dans les méninges.

Le deuxième objectif de ma thèse a été de réaliser une analyse cellulaire et moléculaire des processus déterminants de la phase de la neurogenèse dans les mutants conditionnels *Raldh2*. Nous nous sommes d'abord intéressés au tissu-source de l'AR, en étudiant l'intégrité et la fonctionnalité des méninges. Nous avons ensuite analysé plusieurs aspects de la neurogenèse tels que la prolifération et la formation des populations de progéniteurs, la mort cellulaire, la différenciation des populations neuronales, la lamination des différentes couches corticales et la migration neuronale. Le but de ce deuxième objectif est de caractériser la fonction tardive du gène *Raldh2* pour mettre en évidence le rôle potentiel de l'AR au cours de la neurogenèse corticale. Les résultats obtenus par ce travail ont donné lieu à un manuscrit soumis pour publication.

Le troisième objectif de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle de l'AR au cours de la neurogenèse précoce du cerveau antérieur. L'étude de la fonction précoce du gène *Raldh2* met en évidence le rôle de l'AR au cours de la phase d'expansion jusqu'au stade E9,5, et notre étude de la fonction tardive du gène *Raldh2* débute vers E13,5, en milieu de neurogenèse. Ainsi, le rôle de l'AR dans la phase précoce de la neurogenèse, de E10,5 à E13,5, n'a pas encore été étudié à ce jour. Il est intéressant d'explorer cette période, car malgré l'arrêt de l'expression du gène *Raldh2* dans le neuroépithélium du cerveau antérieur à E8,5, l'AR continue à y être produit par RALDH3. Pour préciser le rôle précoce de l'AR dans le développement neural cortical, un avons utilisé un modèle déjà élaboré par le laboratoire d'accueil où le gène *Rdh10*, codant pour l'enzyme de synthèse agissant en amont des RALDHs, a été inactivé. Le laboratoire d'accueil a montré (à l'aide d'un transgène rapporteur) que les mutants pour *Rdh10* ne produisent pas d'AR au niveau du cerveau antérieur. Lorsque le gène *Rdh10* est inactivé, des défauts phénotypiques sont observés, tels qu'une troncation de la région fronto-nasale, un défaut de la segmentation du cerveau postérieur et une réduction de la partie caudale de l'embryon. La mutation nulle *Rdh10*^{-/-} conduit à une létalité embryonnaire à E10,5, et les embryons meurent suite à des anomalies du développement du système cardiovasculaire. Cependant certains de ces mutants échappent à cette létalité précoce et atteignent le stade E13,5. La lignée *Rdh10*^{-/-} constitue ainsi un modèle de choix pour caractériser les défauts du développement cortical et cibler particulièrement la phase de début de la neurogenèse (E10,5-E13,5).

J'ai entrepris l'analyse du phénotype cortical lors de la neurogenèse précoce dans les mutants nuls *Rdh10*^{-/-}. De manière analogue à l'étude des mutants conditionnels *Raldh2*, je me suis intéressé à la formation des populations neuronales ainsi qu'à la formation et la prolifération des populations progénitrices. Les résultats obtenus par ce travail, avec certaines expériences complémentaires, donneront lieu à publication.

Mon travail de thèse a permis de caractériser certains rôles précoces et tardifs de l'AR au cours de la neurogenèse du cortex cérébral chez la souris. Ce travail a montré le rôle de l'AR comme facteur extrinsèque modulateur du développement neural cortical.

INTRODUCTION

I. Signalisation par l'acide rétinoïque

Générer un organisme multicellulaire à partir d'une unique cellule illustre toute la complexité qui s'opère au cours du développement de chaque être vivant. Chez les mammifères, le zygote donnera naissance à plusieurs milliards de cellules, qui s'organiseront en groupes et populations dans des tissus et organes capables de réaliser une ou plusieurs fonctions et d'interagir entre eux. L'un des mécanismes clés ayant lieu au cours du développement est la signalisation cellulaire. Ce processus désigne la communication intra- et inter-cellulaire, ainsi que celle entre les cellules et leur environnement. De nombreuses voies de signalisation régissent une grande variété de processus fondamentaux cellulaires, tels que la prolifération, la survie ou encore la différenciation des cellules. Le mécanisme d'action de ces voies se réalise par le processus de transduction du signal qui consiste à activer des récepteurs membranaires (voies de signalisation par les Fibroblast Growth Factors (FGF), Wnts, Sonic Hedgehog (SHH), Transforming Growth Factor- β (TGF- β), etc.) ou nucléaires (voie de signalisation par les rétinoïdes, par les hormones thyroïdiennes, stéroïdes, par la vitamine D, etc.) qui moduleront, par l'action de facteurs de transcription, la transcription de gènes cibles. La voie de signalisation par les rétinoïdes, et en particulier par l'acide rétinoïque tout-*trans*, dérivé actif de la vitamine A, s'illustre comme une voie aux fonctions complexes et pléiotropiques au cours du développement embryonnaire.

1. Physiologie générale de la vitamine A

Chez certains vertébrés, les processus de l'évolution ont conduit à la perte de la capacité à synthétiser les nutriments essentiels qui jouent cependant encore un rôle dans leur métabolisme. Parmi les nutriments essentiels se trouvent les vitamines, qui sont des molécules organiques indispensables à la vie. Elles sont facilement destructibles et agissent en doses très faibles par une action spécifique, généralement de type catalytique. Il est important que l'organisme en ait un apport satisfaisant, c'est pourquoi une nutrition équilibrée est essentielle au bon développement et fonctionnement des vertébrés.

1.1. Fonctions de la vitamine A chez l'adulte

La vitamine A est impliquée dans de nombreux processus biologiques chez l'adulte, notamment celui de la perception visuelle (*pour revue : Parker and Crouch, 2010*) (**Fig.1**). Au sein des photorécepteurs de la rétine, le rétinal 11-*cis*, l'un des dérivés de la vitamine A,

est isomérisé par la lumière en rétinol tout-*trans* et permet la photo-transduction. Ce mécanisme convertit la lumière en un signal électrique dans les cellules photoréceptrices. Le rétinol tout-*trans* redevient du rétinol 11-*cis* par l'intermédiaire de plusieurs étapes ayant lieu en partie dans l'épithélium pigmentaire de la rétine (**Fig.1**). La vision, et la bonne survie des photorécepteurs nécessitent un renouvellement continu du rétinol 11-*cis*, qui est un composant de la rhodopsine et des pigments visuels. Les carences en vitamine A, encore rencontrées dans les pays en voie de développement, se traduisent par une perte de la vision nocturne et, dans les cas les plus sévères, la cécité.

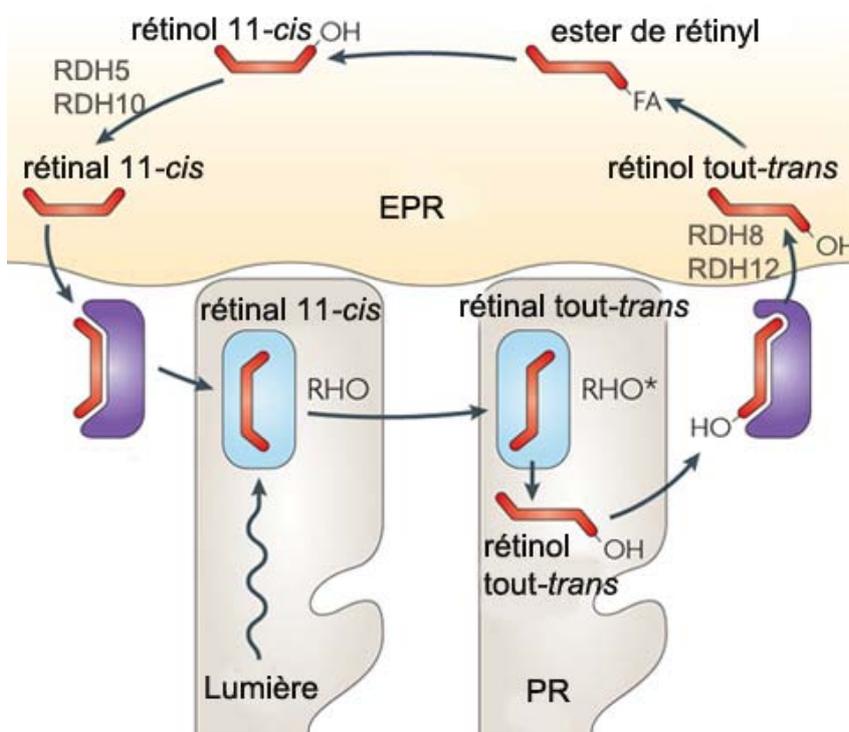


Figure 1. Cycle visuel

Le cycle visuel est un ensemble de réactions enzymatiques qui recycle les rétinoïdes utilisés dans la détection de la lumière par les photorécepteurs (PR). L'activation du pigment rhodopsine (RHO, RHO* une fois activé) par la lumière est réalisée par l'isomérisation du rétinol 11-*cis* en rétinol tout-*trans*. Le rétinol tout-*trans* est libéré de la rhodopsine et transporté dans le cytoplasme. Il devient du rétinol tout-*trans* par l'action des enzymes rétinol déshydrogénases (RDH) 8 et 12, et est transporté dans l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR) où il est estérifié en ester de rétinyl. Après hydrolyse de l'ester de rétinyl, le rétinol est isomérisé en rétinol 11-*cis*. Il subit alors une réaction d'oxydation catalysée par les RDH 5 et 10, et devient du rétinol 11-*cis* qui gagnera ensuite la cellule photoréceptrice. (adapté de Wright et al., 2010)

La vitamine A est également indispensable pour la reproduction mâle et femelle. Chez l'individu mâle, le rétinol est nécessaire pour maintenir un état de différenciation normal des canaux génitaux, de la prostate et des vésicules séminales (*Ghyselinck et al., 1999*). Dans le testicule, la vitamine A stimule la production de la testostérone et permet le maintien des jonctions serrées des cellules de Sertoli qui établissent la barrière hémato-testiculaire. Elle joue également un rôle dans la spermatogenèse en promouvant la différenciation des spermatogonies, l'adhésion des cellules germinales aux cellules de Sertoli, et la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères (**Fig.2**). Les carences en vitamine A entraînent un arrêt de la spermatogenèse par un blocage de la différenciation des spermatogonies.

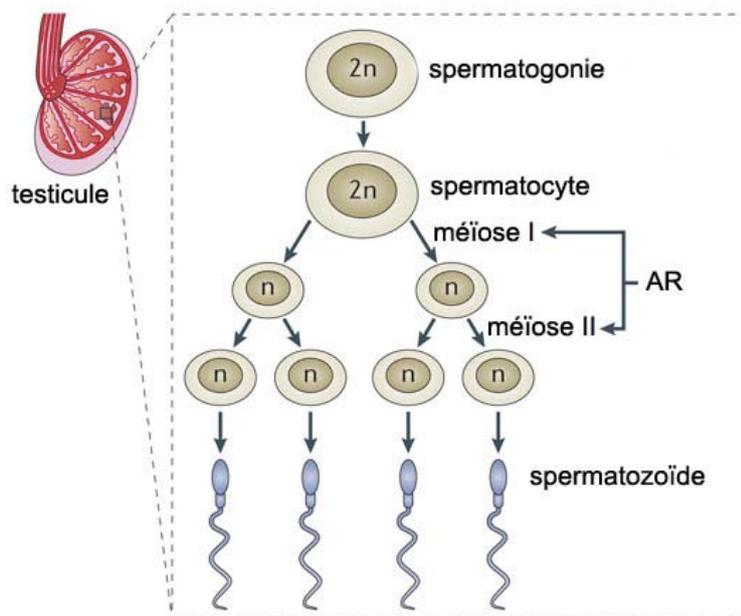


Figure 2. Exemple des rôles de l'acide rétinoïque dans le testicule

Dans le testicule post-natal, l'acide rétinoïque (AR), dérivé actif de la vitamine A, pourrait être impliqué dans le contrôle de la méiose dans les spermatocytes. (*adapté de Cunningham and Duester, 2015*)

Chez l'individu femelle murin, une sévère carence en vitamine A entraîne un défaut de la reproduction. L'ovulation a lieu, avec formation de corps jaunes, mais les ovules dégénèrent et s'accumulent dans les trompes (*pour revue : Clagett-Dame and Knutson, 2011*). Un apport limité en provitamine A (caroténoïdes) permet la réalisation du processus de fécondation et d'implantation mais ils débouchent ensuite souvent sur une létalité embryonnaire vers la migration (*Warkany and Schraffenberger, 1946*).

Parmi les autres fonctions de la vitamine A, celle-ci est impliquée dans la réponse des systèmes immunitaires systémique et muqueux ou encore dans le maintien de la structure et de l'homéostasie de l'épiderme.

1.2. Vitamine A chez l'embryon

La vitamine A joue un rôle majeur au cours du développement embryonnaire des vertébrés. Diverses études réalisées sur plusieurs modèles animaux ont montré le rôle de la vitamine A dans les processus suivants : l'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'embryon, la régionalisation du tube neural, la régulation de la croissance et la régionalisation du cerveau postérieur et de la moelle épinière, l'établissement de l'axe antéro-postérieur du membre et le développement de nombreux tissus et organes tels que le cerveau antérieur, l'œil, l'oreille interne, le cœur, le poumon, le foie, le pancréas (*pour revue : Niederreither and Dollé, 2008*). L'ensemble des études qui ont permis de mettre en évidence les fonctions de la vitamine A au cours du développement partagent des stratégies expérimentales communes : soit par l'étude des conséquences d'un excès en vitamine A (approche par gain de fonction), soit par l'analyse des conséquences d'une carence en vitamine A (approche par perte de fonction).

1.2.1. Syndrome fœtal de carence en vitamine A

Dans les années 1930, Mason et Hale montrent qu'une insuffisance maternelle en vitamine A au cours de la gestation de la ratte et la truie, respectivement, conduit à la létalité des fœtus ou à des malformations congénitales des nouveau-nés (*Mason, 1935 ; Hale, 1937*). Vingt ans plus tard, Wilson et ses collaborateurs exposent des rattes gestantes à un régime alimentaire dépourvu en vitamine A et observent les conséquences sur leur descendance (*Wilson et al., 1953*). Les nouveau-nés ainsi générés présentent de multiples défauts du développement de plusieurs organes, définissant le "syndrome fœtal de carence en vitamine A". L'œil des nouveau-nés carencés présente, en particulier, un colobome rétinien (défaut de fermeture de la fente colombique), une éversion (renversement vers l'extérieur) de la couche neuronale de la rétine, ainsi que des défauts de l'iris. Le cœur présente un myocarde hypoplasique avec des anomalies des gros vaisseaux. Les poumons et le diaphragme sont hypoplasiques. L'appareil uro-génital présente des reins très proches voire fusionnés, des uretères dont la terminaison est mal positionnée, des hypospadias (absence de fermeture du sillon urogénital), une atrophie des canaux de Wolf et de Müller, une absence de descente des testicules chez les mâles et une absence de développement du vagin chez les femelles (*Kalter and Warkany, 1959*). Si la carence en vitamine A est plus forte, des fentes faciales médianes, une hypoplasie mandibulaire et des membres de taille réduite hypodactyles apparaissent (*Morris-Kay and Sokolova, 1996*). Enfin, une carence extrêmement sévère entraîne une létalité embryonnaire précoce, une absence de la segmentation de la partie caudale du cerveau postérieur, une

absence de la formation des nerfs crâniens IX à XII et un défaut de développement de la vésicule otique (White *et al.*, 2000).

1.2.2. Effet tératogène de l'excès en vitamine A

Au 16^e siècle, des explorateurs de l'Arctique se nourrissant de foies d'ours polaire ont développé une hypervitaminose A se traduisant par des nausées, des maux de têtes, une vision trouble, une sécheresse puis une desquamation de la peau entraînant un coma et la mort (*préface du livre : The Retinoids, Dollé and Niederreither, 2015*). En 1953, Cohlman et ses collaborateurs ont exposé des rattes gestantes à de fortes doses de vitamine A sur une durée de 15 jours en début de gestation. Sur 10% de la progéniture arrivant à terme, plus de la moitié des nouveau-nés présente des anomalies de développement du squelette, des malformations crânio-faciales, une exencéphalie, et plus aléatoirement un défaut de développement de l'œil, des fentes palatines et labiales et une langue volumineuse (Cohlman, 1953) (**Fig.3**).

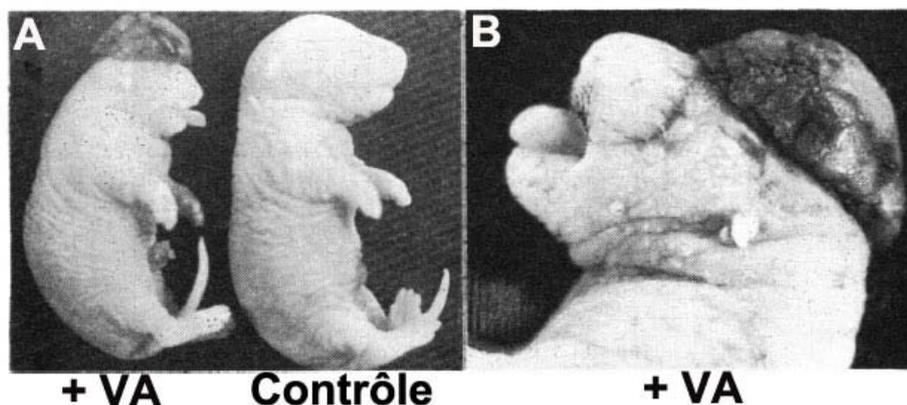


Figure 3. Excès en vitamine A

(A) Embryons de rats collectés au stade périnatal. Embryon de gauche exposé à un excès en vitamine A (+ VA) au cours du développement embryonnaire. (B) Agrandissement de la région frontale de l'embryon exposé à l'excès en vitamine A. (*adapté de Cohlman, 1953*)

De manière intéressante, la sévérité de la toxicité de la vitamine A est fonction du stade auquel l'excès est réalisé, ainsi que de la dose administrée. En effet, de faibles doses (≤ 10 mg/kg) sont toxiques dans les phases précoces du développement alors qu'une dose plus forte (≥ 100 mg/kg) est requise pour atteindre la toxicité plus tard au cours de l'organogénèse (Koren, 1992).

L'analyse des effets d'un excès ou d'une carence en rétinoïdes au cours de la gestation des vertébrés met en évidence les multiples fonctions de la vitamine A au cours du développement embryonnaire. Le succès de l'embryogénèse et de l'organogénèse dépendent

de la signalisation de la vitamine A, notamment par ses processus de régulation au sein de différents tissus et organes de l'embryon.

2. Voie de synthèse de l'acide rétinoïque

2.1. Rétinoïdes et absorption du rétinol

D'après l'IUPAC-IUB (commission de nomenclature biochimique), le terme de "vitamine A" désigne tous les composants qui partagent les propriétés biologiques du rétinol. Le terme de "rétinoïdes" désigne tous les composants constitués de quatre unités isoprénoïdes liées tête bêche, avec cinq doubles liaisons carbonées et un groupe fonctionnel à la fin d'une portion acyclique (**Fig. 4**). Les rétinoïdes désignent alors les formes naturelles de la vitamine A ainsi que les analogues synthétiques du rétinol (*pour revue : Blomhoff and Blomhoff, 2006*).

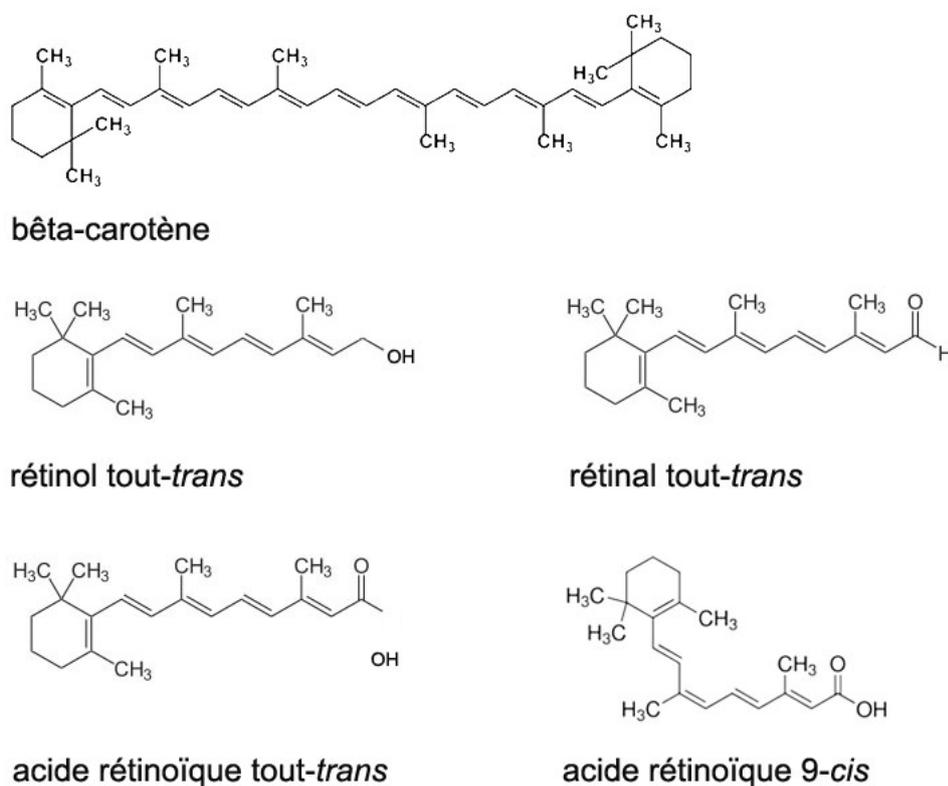


Figure 4. Exemple de rétinoïdes naturels

Formules semi-développées de certains rétinoïdes naturels. (*adapté de Theodosiou et al., 2010*)

Le composant mère des rétinoïdes est le rétinol tout-trans (**Fig.4**). Il est une molécule lipophile ayant une faible solubilité dans l'eau (60 nmol/L) (*pour revue : Blomhoff and Blomhoff, 2006*). Dans les tissus, plusieurs protéines liant les rétinoïdes sont impliquées dans leur transport à travers les phases hydrophiles, tels que la protéine de liaison au rétinol (RBP)

4 ou l'albumine dans le plasma et la protéine cellulaire de liaison au rétinol (CRBP) dans les fluides intracellulaires (Ronne *et al.*, 1983). Le rétinol provient des apports alimentaires : il est le résultat du clivage des β -carotènes (Nagao, 2004) contenus dans certains fruits et légumes (carotte, abricot, mangue, etc.), ou provient de l'hydrolyse des esters de rétinyl présents dans certaines viandes (foie, volaille) ou poisson. Le rétinol est directement absorbé de la lumière de l'intestin dans les entérocytes (Fig.5). Pour les esters de rétinyl (ER), ils seront d'abord hydrolysés en rétinol avant d'être absorbés. Le β -carotène est absorbé et clivé par les β -carotènes oxygénases (BCO) en deux molécules de rétinol qui subiront une réaction de réduction et deviendront du rétinol (pour revue : D'Ambrosio *et al.*, 2011) (Fig.5).

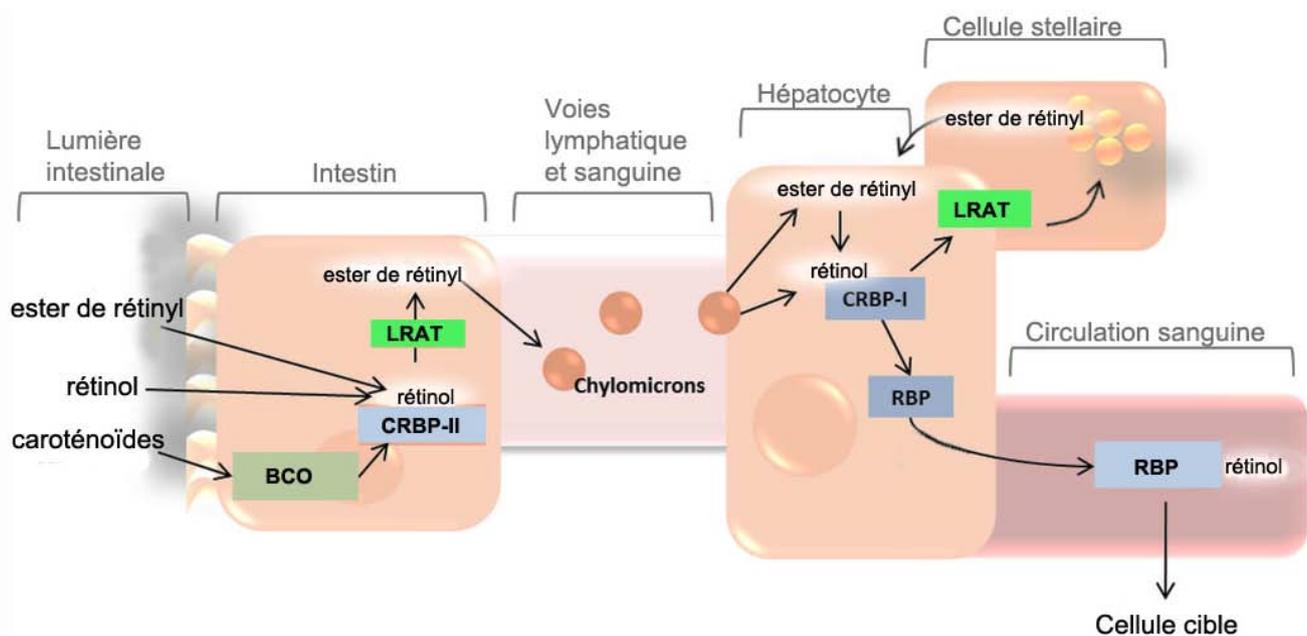


Figure 5. Absorption et distribution du rétinol

Le rétinol, les caroténoïdes et les ester de rétinyl (ER) sont absorbés dans la lumière de l'intestin. Dans l'intestin, les ERs sont hydrolysés en rétinol alors que les caroténoïdes sont transformés en rétinol par les bêta-carotène oxydases (BCO). Le rétinol se lie aux protéines cellulaires de liaison au rétinol de type II (CRBP-II) avant d'être estérifié par la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT). Les ERs sont incorporés dans les chylomicrons qui circulent dans les voies lymphatique puis sanguine vers le foie. Les ERs sont hydrolysés en rétinol, qui est ensuite lié à la protéine de liaison au rétinol (RBP). Le complexe rétinol/RBP gagne la circulation sanguine pour atteindre les tissus cibles. Le rétinol peut aussi être stocké et/ou recyclé sous forme d'ER dans les cellules stellaires du foie. (*adapté de Perusek and Maeda, 2013*)

Le rétinol est ensuite lié à la protéine cellulaire de liaison au rétinol de type II (CRBP-II) et est estérifié par la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT) à des acides gras pour devenir un ER (Fig.5). La majorité des ERs formés est ensuite incorporée dans des chylomicrons, lipoprotéines responsables du transport des lipides et libérés par les entérocytes dans le

système lymphatique (*Blomhoff et al., 1982*) (**Fig.5**). Ils gagnent ensuite la circulation sanguine où ils vont subir plusieurs processus les faisant devenir des chylomicrons rémanants contenant encore la majorité des ERs (*Blomhoff et al., 1990*). Les chylomicrons sont majoritairement absorbés par le foie (**Fig.5**). Dans les hépatocytes, les ERs sont hydrolysés en rétinol qui s'associe alors avec la protéine de liaison au rétinol (RBP). Cette liaison engendre une translocation du complexe rétinol-RBP du réticulum endoplasmique vers le Golgi. Le complexe est ensuite sécrété dans la circulation sanguine et se dirige vers les différents tissus cibles (*Ronne et al., 1983*) (**Fig.5**). Une grande partie du rétinol-RBP gagne les cellules stellaires du foie où il sera stocké majoritairement sous forme d'ER (*Blomhoff et al., 1982*) (**Fig.5**). Les stocks hépatiques peuvent être mobilisés pour les besoins des cellules de l'organisme.

2.2. Rétinoïdes chez l'embryon

Chez les animaux placentaires, le rétinol est la principale forme circulante de vitamine A, transféré de la mère à l'embryon par la membrane vitelline, puis par le placenta. Le rétinol est alors lié par la RBP4, qui est exprimé par l'embryon au sein de l'endoderme viscéral à partir des stades de la gastrulation (*Ward et al., 1997*) (**Fig.6**). L'existence de récepteurs membranaires permettant l'interaction avec les RBP ont depuis longtemps été suspectés, mais c'est Kawaguchi et ses collaborateurs qui montrent que le récepteur membranaire produit du gène "Stimulated by Retinoic Acid 6" (STRA6) interagit avec RBP4, et permet la libération du rétinol qui s'internalise alors dans la cellule (*Kawaguchi et al., 2007*) (**Fig.6**).

Dans le cytoplasme, le rétinol peut être associé à une protéine cellulaire de liaison au rétinol (CRBP) qui facilite la conversion du rétinol en ER et permet ainsi son stockage. Le rétinol peut aussi subir une première réaction d'oxydation catalysée soit par des alcool déshydrogénases cytosoliques (ADH 1, 5, 7) (*Duester et al., 2003*) qui appartiennent à la famille des déshydrogénases/réductases à moyenne chaîne, soit par des déshydrogénases/réductases microsomales à courte chaîne (SDR, rétinol déshydrogénase, RDH 1, 5, 10) (*Parés et al., 2008*) (**Fig.6**). L'ADH5 (anciennement appelée ADH3) est exprimée de manière ubiquitaire dans l'embryon et chez l'adulte, alors que ADH1 et ADH7 (anciennement appelée ADH4) sont exprimées de manière tissu-spécifique (*Ang et al., 1996*), ADH7 étant la plus efficace (*pour revue : Theodosiou et al., 2010*). Des études suggèrent que les enzymes ADHs réguleraient l'excès de rétinol plutôt que de participer à la synthèse d'AR (*Deltour et al., 1999; Molotkov et al., 2002a, 2002b*).

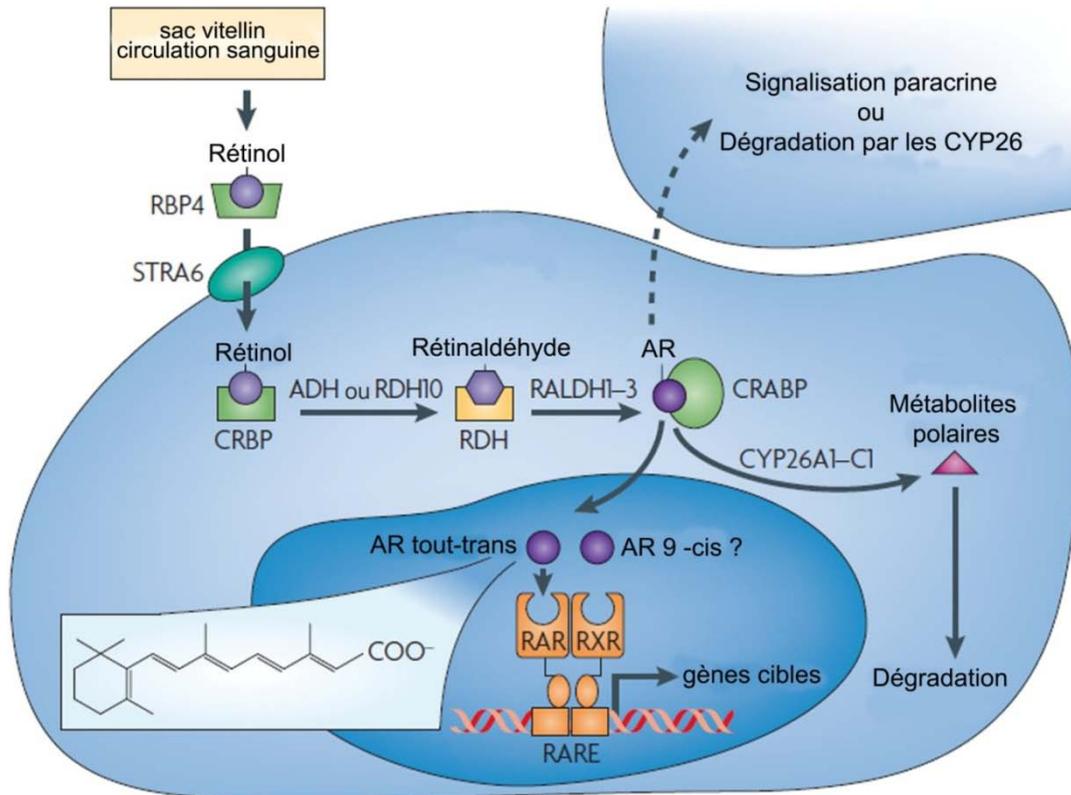


Figure 6. Voie de signalisation de l'acide rétinoïque dans la cellule embryonnaire

Le rétinol d'origine maternelle se lie à une protéine (RBP4) synthétisée au niveau du sac vitellin et du placenta. Il est internalisé dans les cellules par l'intermédiaire de la protéine STRA6. Deux réactions d'oxydation catalysées par des alcool- ou rétinol- déshydrogénases (ADH, RDH10), puis par les rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDH), le transforment en acide rétinoïque (AR). Le rétinol complexé à des protéines cellulaires de liaison au rétinol (CRBP) peut, dans certains tissus, être estérifié à des acides gras pour être stocké (non schématisé). Des protéines cellulaires de liaison à l'AR (CRABP) pourraient faciliter le transport de l'AR vers le noyau. L'AR se fixe à des récepteurs nucléaires (RAR) formant des hétérodimères avec les RXRs, et se liant à l'ADN au niveau de séquences régulatrices (RARE), activant ainsi la transcription de gènes cibles. Certaines cellules expriment les cytochromes P450 hydroxylases (CYP26), enzymes transformant l'AR en dérivés plus hydrophiles qui seront dégradés. L'AR peut également diffuser de cellule à cellule et ainsi agir de manière paracrine. (*adapté de Niederreither and Dollé, 2008*)

L'enzyme RDH5 joue un rôle important dans le cycle visuel en métabolisant le rétinol 11-*cis* en rétinaldéhyde 11-*cis* (*pour revue : Parker and Crouch, 2010*) (**Fig.1**), mais ne semble pas avoir un rôle évident dans la synthèse d'AR (*pour revue : Theodosiou et al., 2010*). Il a été montré, par contre, que RDH10 joue un rôle essentiel dans la synthèse de l'AR au sein de l'embryon (*Sandell et al., 2007 ; Rhinn et al., 2011*) (cf. §3.2.1).

Une seconde réaction d'oxydo-réduction se réalise ensuite, qui transforme de manière irréversible le rétinaldéhyde en acide rétinoïque (AR) par l'action de rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDH 1, 2 et 3) exprimées de manière tissu-spécifique dans l'embryon

(pour revue : Niederreither and Dollé, 2008) (cf. §3.2.2) (**Fig.6**). RALDH2 est la première enzyme RALDH responsable de la synthèse d'AR dans l'embryon jusqu'au stade E8,5 chez la souris (Niederreither et al., 1997), puis RALDH1 et RALDH3 synthétisent de l'AR dans l'ébauche de l'œil et le système olfactif (Dupé et al., 2003; Matt et al., 2005). L'AR synthétisé est lié par les protéines cellulaires de liaison à l'AR (CRABP-I et II) (**Fig.6**). Il a été suggéré que la CRABP-II facilite la capture de l'AR dans le cytoplasme et le conduit dans le noyau jusqu'à son récepteur (Delva et al., 1999). L'AR peut également agir de manière paracrine sur une autre cellule.

2.3. Contrôle de l'induction du signal dans la cellule cible

Dans la cellule cible, l'AR gagne le noyau, où il joue le rôle le ligand de récepteurs (RARs) qui appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires (pour revue : Chambon, 1996) (**Fig.6**). Il existe trois RARs chez les mammifères (RAR α , β , et γ), tous exprimés de manière spécifique dans l'embryon (pour revue : Dollé, 2009) (**Tableau 1**). Les RARs fonctionnent comme des régulateurs de la transcription en hétérodimères avec les récepteurs X des rétinoïdes (RXR α , β , et γ) (pour revue : Chambon, 1996) (**Tableau 1**).

L'ensemble des isotypes des récepteurs RARs et RXRs sont structurés en six modules fonctionnels caractéristiques des récepteurs nucléaires nommés A à F, de la région N-terminale à la région C-terminale (**Fig.7**). Les régions C et E contiennent respectivement le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine de liaison au ligand (LBD), régions très conservées entre les différents isotypes (pour revue : Rochette-Egly and Germain, 2009) (**Fig.7**). La région E contient également un domaine essentiel pour l'activation de la transcription, le domaine AF-2 (**Fig.7**). Un autre domaine d'activation de la transcription, nommé AF-1, se trouve dans la région A/B (**Fig.7**). L'activité de AF-2 est initiée par la fixation du ligand, contrairement à celle de AF-1 (pour revue : Rochette-Egly and Germain, 2009). Cependant, plusieurs études ont mis en évidence une coopération possible entre les domaines AF-1 et AF-2 dans l'activation de la transcription (Dowhan and Muscat, 1996).

Gène	Sites majeurs d'expression	Références principales
<i>Rara</i>	général ; plus faible dans le neuroépithélium du cerveau antérieur ; plus fort dans les rhombomères (r) 4, 7 et dans la moelle épinière	<i>Ruberte et al., 1991 ; Ruberte et al., 1993</i>
<i>Rarb</i>	r7 et moelle épinière ; cœur ; mésenchyme des arcs branchiaux (excepté pour l'arc mandibulaire) ; endoderme et mésenchyme du tube digestif ; mésonéphros ; mésoderme latéral ; mésenchyme proximal du membre	<i>Dollé et al., 1989 ; Ruberte et al., 1991 ; Ruberte et al., 1993</i>
<i>Rary</i>	ligne primitive ; mésenchymes frontonasal, du 1 ^{er} arc branchial et du membre ; plaque neurale du tronc et caudale (transitoire) ; mésoderme présomitique et du bourgeon caudal ; cellules précartilagineuses	<i>Abu-Abed et al., 2003 ; Dollé et al., 1989 ; Ruberte et al., 1990 ; Ruberte et al., 1993</i>
<i>Rxra</i>	général/ubiquitaire	<i>Dollé et al., 1994</i>
<i>Rxr</i>	général / ubiquitaire	<i>Dollé et al., 1994</i>
<i>Rxry</i>	myotomes ; muscles en développement	<i>Dollé et al., 1994</i>
<i>Cyp26a1</i>	région la plus antérieure de l'épiblaste et le tube neural (transitoire) ; ligne primitive et mésoderme postérieur ; pré-r2 ; région caudale du cerveau postérieur ; mésenchyme des arcs branchiaux ; cœur ; plaque neurale caudale ; bourgeon caudal ; ectoderme distal du membre	<i>Fujii et al., 1997 ; MacLean et al., 2001 ; Sirbu et al., 2005</i>
<i>Cyp26b1</i>	pré-r3, 5, 2-4(ventral) ; arcs branchiaux postérieurs (2 ^e -6 ^e) ; mésenchyme distal du membre ; isthme du rhombencéphale ; endothélium vasculaire et endocarde ; bourgeon caudal	<i>MacLean et al., 2001 ; Sirbu et al., 2005</i>
<i>Cyp26c1</i>	mésenchyme rostral de la tête (transitoire) ; pré-r2, 4 ; mésenchyme du cerveau postérieur ; 1 ^{er} arc branchial ; région ventrale des otocystes	<i>Sirbu et al., 2005 ; Tahayato et al., 2003</i>

Tableau 1. Principaux sites d'expression des gènes codant pour les RARs, RXRs, et enzymes de dégradation CYP26 dans l'embryon (adapté de Rhinn and Dollé, 2012)

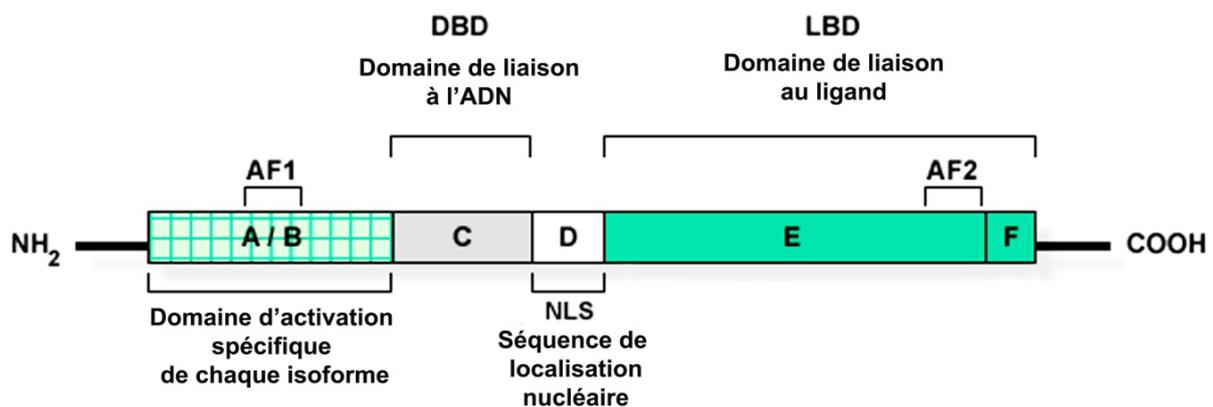
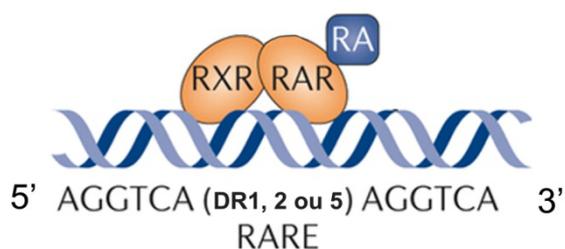


Figure 7. Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires RARs et RXRs

Les domaines A/B, C D et F sont des régions variables alors que les domaines C et E sont des régions plus conservées entre les différents isotypes. Les domaines A/B et F contiennent des fonctions activatrices de la transcription (AF1 et AF2). (adapté de Aranda and Pascual, 2001)

Les hétérodimères RAR/RXR contrôlent l'expression de gènes cibles (**Fig.6**) en se liant à des séquences régulatrices que sont les éléments de réponse à l'AR (RARE) (**Fig.6**). Les éléments de réponse RAREs sont composés de deux répétitions directes (DR) d'une séquence hexamérique consensus 5'-(A/G)G(G/T)TCA-3' (**Tableau 2**). Le plus souvent cinq paires de bases séparent les séquences répétées, dans ce cas le RARE est appelé DR5 (**Tableau 2**). Il existe également des DR1 et 2 où les DRs sont séparés respectivement par 1 ou 2 paires de bases (**Tableau 2**), et d'autres RAREs à séquences plus complexes.

A



B

DR	Gènes	Séquences 5'- 3' de l'ADN		
DR5	RAR β 2	GGTTCA	CCGAA	AGTTCA
	Cyp26a1	AGTTCA	CCCAA	AGTTCA
	Hoxa1	GGTTCA	CCGAA	AGTTCA
	Hoxd4	AGTTGA	AATGC	AGTTCA
DR2	Crbp-I	AGGTCA	AA	AGGTCA
	Crabp-II	AGTTCA	CC	AGGTCA
DR1	Crbp-II	AGGTCA	C	AGGTCA

Tableau 2. Éléments de réponse à l'AR

Représentation schématique (A) et séquences (B) de certains éléments de réponse à l'AR (RARE) identifiés dans les régions régulatrices de différents gènes, illustrant la variété des RARE et de leurs répétitions directes (DR). (*adapté de Cunningham and Duester, 2015 ; Bastien and Rochette-Egly, 2004*)

De nombreux gènes contenant des RARE ont été identifiés : incluant des gènes de la voie de signalisation de l'AR (*Rar β , Crbp1/2, Crabp1/2, Cyp26a1*), des gènes de la famille Hox (*Hoxa1, Hoxa3, Hoxb1, Hoxb4* et *Hoxd4*), des gènes impliqués dans la différenciation neuronale de la moelle épinière (*Pax6, Olig2*), des gènes importants dans la formation des somites (*Fgf8, Cdx1*) ou encore des gènes impliqués dans le développement du pancréas (*Pdx1*) ou de l'œil (*Pitx2*) (*pour revue : Rhinn and Dollé, 2012*) (**Tableau 3**).

Gène	Produit	Gène	Produit
Facteurs de transcription		Protéines sécrétées/Facteurs de signalisation et Hormones	
Récepteurs nucléaires		<i>Epo</i>	erythropoietin
<i>Nr2c1</i>	early embryonic nuclear receptor, TR2	<i>Fgf8</i>	fibroblast growth factor 8
<i>Rara</i>	retinoic acid receptor α	<i>Gh</i>	growth hormone
<i>Rarb</i>	retinoic acid receptor β	<i>Gnrh1</i>	gonadotropin releasing hormone 1
<i>Rarg</i>	retinoic acid receptor γ	<i>Tshb</i>	thyroid stimulating hormone β subunit
Homéodomaine		<i>Lefty1</i>	left-right determination factor 1
<i>Hoxa1, Hoxb1,</i>		<i>Mdk</i>	midkine
<i>Hoxa4, Hoxb4,</i>		<i>Nodal</i>	Nodal
<i>Hoxd4, Hoxb5</i>		<i>Oxt</i>	oxytocin
<i>Cdx1</i>	caudal type homeobox 1	<i>Plat</i>	tissue plasminogen activator, t-PA
<i>Pax6</i>	paired box gene 6	<i>Pth1r</i>	PTH/PTH-RP receptor
<i>Pdx1</i>	pancreatic and duodenal homeobox 1	<i>Shh</i>	sonic hedgehog
<i>Pitx2</i>	paired-like homeodomain transcription factor 2	<i>Prl3d1</i>	placental lactogen 1, chorionic somatomammotropin hormone 1
<i>Tlx2</i>	T-cell leukemia homeobox 2	Autres	
Protéines de la voie de signalisation rétinol		<i>Cebpe</i>	C/EBP epsilon
<i>Adh7</i>	ADH7, formerly ADH3 or class IV ADH	<i>Egr1</i>	early growth response 1, Krox24
<i>Aldh1a1</i>	RALDH1	<i>Ets1</i>	E26 avian leukemia oncogene 1
<i>Crabp2</i>	CRABP-II	<i>Foxa1</i>	hepatic nuclear factor 3 α
<i>Cyp26a1</i>	CYP26A1	<i>Hnf1a</i>	Tcf1, LF-B1
<i>Rbp1</i>	CRBP-I	<i>Neurog2</i>	neurogenin 2
Protéines d'adhésion/de la matrice extracellulaire		<i>Olig2</i>	oligodendrocyte transcription factor 2
<i>Icam1</i>	intercellular adhesion molecule 1	<i>Pou1f1</i>	pituitary-specific transcription factor 1, Pit1/GHF1
<i>Itgb3</i>	$\beta 3$ integrin	<i>Pou5f1</i>	Oct4 (RA-mediated repression)
<i>Lamb1-1</i>	laminin B1	<i>Stat1</i>	signal transducer and activator of transcription 1

Tableau 3. Exemples de gènes cibles contenant des RAREs

Liste non exhaustive de certains gènes cibles de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque. (*adapté de Rhinn and Dollé, 2012*)

Les RXRs sont capables d'interagir avec d'autres récepteurs nucléaires, dont le récepteur de la vitamine D ou ceux des hormones thyroïdiennes, ainsi que de lier d'autres ligands comme l'AR 9-*cis* (un stéréoisomère qui cependant n'a pas été détecté dans l'embryon et l'adulte) (*pour revue : Rochette-Egly and Germain, 2009*) (**Fig.6**). Il a été montré que le dimère RAR/RXR active la transcription majoritairement voire uniquement par la liaison du ligand sur le partenaire RAR (*Mic et al., 2003*). En absence d'AR, le complexe RAR/RXR se lie aux séquences RAREs et recrute des protéines dites "co-répresseurs". Les co-répresseurs recrutent des histones désacétylases et méthyltransférases pour stabiliser les nucléosomes et avoir ainsi un effet inhibiteur de la transcription (*pour revue : Bastien and Rochette-Egly, 2004*). En présence d'AR, la liaison au RAR entraîne un changement de configuration de son domaine LBD. Ceci conduit à la dissociation des co-répresseurs et au recrutement de co-activateurs (histones acétyltransférases et méthyltransférases) qui réduisent l'affinité histones/ADN et permettent l'activation de la transcription (*pour revue : Bastien and Rochette-Egly, 2004*).

Le contrôle de l'action de l'AR dépend de la présence au sein des tissus cibles des différents acteurs de la voie de signalisation, tels les récepteurs ainsi que les enzymes de

synthèse de l'AR (rétinol et rétinaldéhyde déshydrogénases). Il existe une voie de régulation supplémentaire médiée par un métabolisme tissu-spécifique de l'AR. Les cytochromes P450 hydroxylases (CYP26A1, B1 et C1) convertissent l'AR en métabolites hydrophiles (**Fig.6**). Ainsi, l'AR est transformé en AR 4-hydroxy, avant d'être oxydé en AR 4-oxo, puis dégradé (*Pennimpede et al., 2010*). La répartition tissulaire des enzymes de synthèse (cf. §3.1) et des enzymes de dégradation (**Tableau 1**) de l'AR est souvent complémentaire et permet de distinguer les tissus et organes qui ont besoin de la signalisation rétinolique de ceux qui doivent en être protégés.

2.4. Mode d'action de l'acide rétinolique

Plusieurs exemples dans la littérature appuient l'idée que l'AR agit de manière paracrine sur des cellules cibles distinctes des cellules dans lesquelles il a été synthétisé (**Tableau 4**). Lors de la régionalisation du cerveau postérieur, l'AR joue un rôle important dans la spécification de l'identité des rhombomères caudaux (cf. Introduction Partie II §1.3.1). L'AR produit par le mésoderme diffuse et agit sous forme d'un gradient sur le tube neural adjacent. Il est intéressant de noter que les CYP26s ont deux domaines d'expression précoces dans l'embryon aux stades présomitiques, l'un dans l'épithélium neural rostral au pôle antérieur de l'embryon et l'autre, un peu plus tard, dans la région caudale. Une région n'exprimant aucune enzyme CYP26s est présente entre ces deux domaines, d'une distance de 100 à 200 µm. Cet espace constitue une distance idéale pour la formation d'un gradient d'AR (*Maden, in Dollé and Niederreither, 2015*).

Source d'acide rétinolique	Tissu cible
mésoderme somitique (<i>Raldh2</i>)	neuroectoderme du cerveau postérieur (régionalisation antéropostérieure)
mésoderme somitique (<i>Raldh2</i>)	neuroectoderme de la moelle épinière (spécification des motoneurons)
mésoderme somitique (<i>Raldh2</i>)	neuroectoderme postérieur et ectoderme du noeud (somitogenèse)
mésoderme somitique (<i>Raldh2</i>)	région postérieure de l'embryon (induction du membre antérieur)
mésoderme somitique et latéral (<i>Raldh2</i>)	mésoderme cardiaque (régionalisation antéropostérieure)
mésoderme latéral (<i>Raldh2</i>)	endoderme du tube digestif antérieur (induction du pancréas et des poumons)
mésenchyme de la vésicule optique (<i>Raldh2</i>)	rétine neurale (formation de la cupule optique ventrale)
épithélium pigmentaire de la rétine (<i>Raldh3</i>)	rétine neurale (formation de la cupule optique ventrale)
rétine neurale (<i>Raldh1 et Raldh3</i>)	mésenchyme périoptique (développement de la paupière et de la cornée)
mésonephros (<i>Raldh2</i>)	bourgeon urétéral (induction du foie)
mésonephros (<i>Raldh2</i>)	ovaire (induction de la méiose)

Tableau 4. Exemples de fonctions paracrines de l'acide rétinolique

Liste non exhaustive de tissus cibles sensibles aux effets de l'acide rétinolique produit par des tissus adjacents (*adapté de Duester, 2008*)

Une étude réalisée chez le poisson zèbre a permis de visualiser un gradient d'AR par une lignée transgénique porteuse de la protéine fluorescente YFP placée sous le contrôle d'un RARE (*rare:yfp*) (White et al., 2007). La protéine transgénique YFP se localise sous la forme d'un gradient qui est présent dans la partie antérieure de la moelle épinière et s'étend vers le pôle antérieur de l'embryon, jusqu'à la limite entre les rhombomères 6 et 7 (White et al., 2007). Le gradient d'AR est perdu quand l'embryon est injecté avec un morpholino contre *Raldh2* (White et al., 2007). Ces observations mettent en évidence la présence d'un gradient d'AR qui expose la région postérieure du rhombencéphale à différentes concentrations d'AR, le définissant ainsi comme un morphogène.

3. Métabolisme tissu-spécifique de l'acide rétinolique dans l'embryon

3.1. Spectre d'activité de l'acide rétinolique dans les tissus embryonnaires

L'AR est une petite molécule lipophile qu'il est impossible de détecter de manière directe au niveau cellulaire dans l'embryon. Des techniques de chromatographie (HPLC) sur tissus embryonnaires et des analyses d'explants mis en contact avec une lignée cellulaire rapportrice de l'activité AR ont montré que l'AR est présent de manière tissu-spécifique et en quantité variable au sein de multiples tissus embryonnaires (*ex: Maden et al., 1998*). Des outils génétiques ont aussi été élaborés pour suivre la répartition des régions d'activité de l'AR. Plusieurs lignées de souris transgéniques ont été générées dans lesquelles le gène rapporteur *lacZ* est placé sous le contrôle de RARE qui se trouvent soit dans leur promoteur naturel (Mendelsohn et al., 1991), soit en amont du promoteur minimal *hsp68* (Rossant et al., 1991). La deuxième construction a été largement utilisée dans de nombreuses études et plusieurs observations laissent à penser que c'est un bon indicateur de l'activité AR. Cependant il a été observé que l'activité du transgène diminue à mi-gestation, vers le jour embryonnaire (E) 14,5, avec des zones où l'activité AR reste cependant détectable (rétine, cerveau antérieur dorsal, reins). Il n'est alors pas clair si cette activité reflète un réel signal transitoire de l'AR, ou si c'est le résultat d'un processus de "silencing" du transgène.

En 2010, le Dr. Dollé et son équipe ont choisi d'analyser la répartition des tissus ayant été soumis au signal AR dans l'embryon en utilisant un système génétique à deux composantes avec un transgène "effecteur" et la lignée rapportrice Rosa26R. La recombinase Cre placée en aval du promoteur RARE-*hsp68* (promoteur minimal du gène *hsp68* et trois copies de

l'élément de réponse RARE) sera activée en présence d'AR, reconnaîtra les sites *LoxP* présents sur le rapporteur Rosa26R, et permettra l'expression du gène *lacZ* codant pour la β -galactosidase (Dollé et al., 2010; Rossant et al., 1991; Soriano, 1999a). Une révélation au Xgal, substrat de la β -galactosidase, a été effectuée sur embryons entiers et sur coupes histologiques, à différents stades du développement.

Les premières cellules Xgal⁺ sont détectées à E7,5 dans la ligne primitive et le noeud (**Fig.8A, A'**). À E8, l'activité AR s'étend du cerveau postérieur jusqu'à l'extrémité caudale de l'embryon (**Fig.8B**). À E8,5, l'embryon réalise sa rotation axiale et des cellules Xgal⁺ supplémentaires apparaissent dans la partie antérieure de la région de la tête, comprenant la région fronto-nasale, la partie rostrale du cerveau antérieur, les placodes olfactives et les vésicules optiques (**Fig.8C, F**). Au cours des stades E9,5 et E10,5, l'activité β -galactosidase s'intensifie dans la région cervicale de l'embryon et le tronc (**Fig.8D, E**).

Dans le tronc de l'embryon, il est détecté de l'activité AR dans le tube neural (dès E8) au niveau du cerveau postérieur (à partir de E8,5) et dans les territoires présomptifs de la moelle épinière. Une fois que la segmentation du rhombencéphale se réalise (E9), l'activité AR se trouve jusque dans le rhombomère (r) 6, et est inégale (r5) à très faible (r4 et r3) dans la région antérieure du cerveau postérieur (**Fig.8K, L**). L'activité AR n'est pas modifiée à E11,5 et évolue de manière cohérente au cours du développement car les cellules Xgal⁺ ne s'étendent pas au-delà de la limite supérieure du myélocéphale à E17,5.

Au niveau de la tête, une activité β -galactosidase est observée au niveau du cerveau antérieur dans les vésicules télencéphaliques de E8,5 à E12,5 (**Fig.8B-H**). À E9,5, de l'activité AR est détectée dans le tube neural, les somites, le neuroépithélium du télencéphale et les vésicules optiques (**Fig.8I, J**). Un peu plus tard, au stade E12,5, une large distribution de cellules Xgal⁺ marque le télencéphale dorsal et les éminences ganglionnaires ventrales (**Fig.8M, N, O**), ainsi qu'une partie du diencéphale sous-jacent (**Fig.8N**). De plus, l'activité β -galactosidase est détectée dans les cellules du plexus choroïde en développement (**Fig.8P**). Concernant les autres structures de la tête, l'œil révèle une forte activité AR (la rétine neurale ventrale et dorsale, le mésenchyme péri-oculaire, les futures cellules de la cornée et certaines cellules de la lentille) (**Fig.8Q**). Les structures nasales sont aussi largement révélées, contrairement aux processus maxillaires et mandibulaires (**Fig.8M, R**).

Dans le cœur, une activité AR est détectée dès E8,5, et se localise plus tard, à E12,5, dans la cavité atriale et dans la voie d'éjection cardiaque avec quelques cellules Xgal⁺ présentes à la surface des ventricules gauche et droit (**Fig.8S, S'**). À E9,5, une activité β -galactosidase est observée dans les membres et dans la plupart des structures abdominales (parties antérieures

et médianes du tube digestif, les poumons, le thymus et la rate) avec quelques cellules Xgal+ détectées dans le foie et les appareils reproducteurs mâle et femelle.

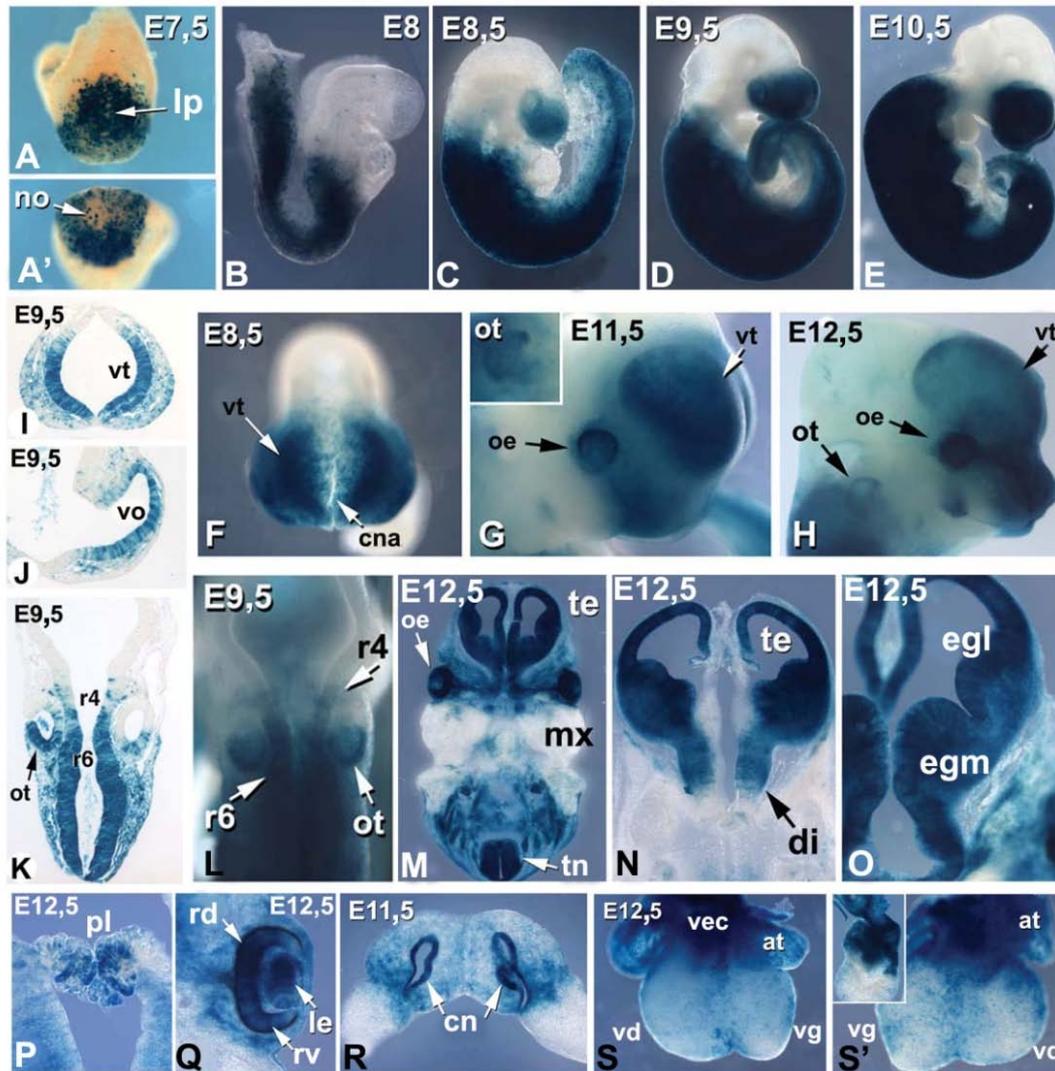


Figure 8. Répartition de l'activité de l'acide rétinol chez l'embryon

Tous les embryons sont RARE-*hsp68*-Cre ; *R26R* dont l'activité β -galactosidase a été révélée au X-gal. (A-A') Embryons entiers au stade E7,5, stade précoce du développement (A, vue postérieure, A',vue distale montrant le nœud). (B-E) Vues de profil d'embryons entiers au stade E8 (6 somites), E8,5 (après la rotation axiale), E9,5 et E10,5. (F-H) Vue frontale et vue de profil de la tête en développement d'embryons entiers. (I-K) Coupes frontales à travers le télencéphale, d'embryons à E9,5. (L) Vue dorsale zoomée sur le cerveau postérieur en processus de segmentation d'un embryon entier. (M-R) Embryons entiers ou têtes entières à E11,5 et E12,5, coupés au vibratome et révélés au X-gal. (M) Vue globale de la région de la tête. (N-P) Détails du cerveau antérieur. (Q) Détail de l'œil en développement. (R) Section à travers la cavité nasale. (S-S') Vues ventrale et dorsale d'un cœur entier au stade E12,5. at, atrium ; cn, cavité nasale ; cna, crête neurale antérieure, di, diencéphale ; egl, éminence ganglionnaire latérale, egm, éminence ganglionnaire médiane, le, lentille ; lp, ligne primitive ; mx, processus maxillaire ; no, nœud ; oe, œil ; ot, otocystes ; pl, plexus choroïde ; r, rhombomère ; rd, rétine dorsale ; rv, rétine ventrale ; te, télencéphale ; tn, tube neural ; vd, ventricule droit ; vec, voie d'éjection cardiaque ; vg, ventricule gauche ; vo, vésicule otique ; vt, vésicule télencéphalique. (adapté de Dollé et al., 2010)

Ces travaux menés par l'équipe montrent une répartition des cellules sensibles à l'AR comparable à celle rapportée par Rossant et coll. en 1991. Les rétinoïdes sont présents et peuvent activer l'expression de transgènes (et potentiellement de gènes cibles) aux moments de différentes étapes cruciales au sein de régions ou tissus embryonnaires spécifiques. Il reste cependant difficile d'avoir une vue générale et précise de toutes les populations cellulaires exposées au signal rétinoïde au cours du développement de par le caractère dynamique et transitoire de l'activité AR. Une autre manière de caractériser les régions sensibles à l'activité de l'AR est d'identifier les sites de production des enzymes impliquées dans sa synthèse au cours du développement. Cette méthode permet de connaître les régions où est synthétisé de l'AR mais ne rend pas compte de l'ensemble des cellules exposées à un éventuel gradient du signal rétinoïde.

3.2. Synthèse tissu-spécifique de l'acide rétinoïque au cours de l'embryogenèse

Les enzymes de synthèse de la voie de signalisation rétinoïde jouent un rôle important dans le contrôle de la distribution de l'AR dans l'embryon. Une régulation fine de leur expression est à la base du bon déroulement du développement embryonnaire.

3.2.1. Alcool- et rétinol- déshydrogénases

Les alcool (ADH 1, 5 et 7) et rétinol déshydrogénases (RDH 1, 5, 10 et 11) sont les enzymes qui réalisent la synthèse du rétinol, substrat indispensable à la synthèse d'AR. Cette première réaction d'oxydo-réduction est réversible.

a. Profils d'expression des Adhs

Le gène *Adh5* présente une expression ubiquitaire dans l'embryon, contrairement aux gènes *Adh1* et *Adh7*. Le gène *Adh7* commence à être exprimé à E7 pendant la gastrulation dans la ligne primitive, le nœud et les cellules du mésoderme postérieur (Ang et al., 1996). De E8 à E9, *Adh7* est exprimé au cours de la neurulation, dans les bourrelets neuraux et dans les cellules des crêtes neurales en migration qui constituent le mésenchyme crânien. Le gène *Adh7* est aussi exprimé dans le tronc et au niveau du neuropore postérieur. À E9,5, il s'exprime dans les mésenchymes fronto-nasal et péri-oculaire, dans les 1^{er} et le 2^e arcs branchiaux, mais aussi dans le membre antérieur et le mésoderme para-axial. L'expression du gène *Adh1* n'est observée qu'à partir du stade E9,5 dans la région du tronc notamment au niveau du mésonéphros, et est ensuite fortement exprimé dans le foie.

b. Phénotypes associés aux pertes de fonction des Adhs

Les souris mutantes nulles pour le gène *Adh5* sont viables et ne présentent pas de lourdes malformations congénitales. De plus, les défauts observés peuvent être sauvés par l'apport de rétinol, indiquant que d'autres enzymes compensent sa perte, et qu'elle n'est pas indispensable à la synthèse de rétinol (*Molotkov et al., 2002a*). Les mutants nuls *Adh1* et *Adh7* ne présentent pas non plus de défauts majeurs du développement ; cependant des phénotypes plus lourds apparaissent lorsque la mutation nulle *Adh1* est réalisée dans des conditions d'excès et lorsque la mutation nulle *Adh7* est générée en condition de carence en vitamine A. Ces résultats montrent que ADH1 est responsable de la réduction de la toxicité de la vitamine A en facilitant la conversion du rétinol en AR et que ADH7 est impliquée dans la modération des effets négatifs d'une carence en vitamine A. ADH5 semble participer au métabolisme de base, avec ADH1 et 7 intervenant majoritairement en cas de variations extrêmes des doses de vitamine A.

c. Profils d'expression des Rdhs

L'oxydation du rétinol en rétinol est un processus qui a lieu dans le cytoplasme, ce qui a placé les enzymes cytosoliques ADHs en avant des SDRs (enzymes microsomales) dans leur rôle d'enzymes de synthèse du rétinol (*Duester et al., 2003*). Il a été montré que RDH1 a une plus grande affinité pour les hydroxystéroïdes que pour le rétinol (*Yagishita et al., 2001*), et que RDH5 et 11 ont un rôle essentiel dans le cycle visuel mais ne semblent pas être nécessaires pour la synthèse d'AR de l'embryon (*Duester et al., 2003 ; Kim et al., 2005*).

L'enzyme RDH10 est, quant à elle, présente au cours de l'embryogenèse. L'expression du gène *Rdh10* apparaît au stade E7,5 dans le mésoderme latéral et dans certaines cellules du mésoderme postérieur. L'expression s'étend et s'intensifie à E8, du nœud jusqu'à la base de la région de la tête (*Cammas et al., 2007*) (**Fig.9A**). De E8,5 à E9,5 une forte expression est détectée dans les somites, la partie ventrale du tube neural et dans le mésoderme intermédiaire et latéral (**Fig.9B, C, D**). Durant la même période, le gène *Rdh10* est exprimé dans la région postérieure du tube cardiaque et au niveau du tube digestif antérieur. Il est aussi détecté dans l'épithélium neural du cerveau postérieur, dans la partie ventrale de la moelle épinière, et plus faiblement dans la région du cerveau moyen (*Cammas et al., 2007*) (**Fig.9B, C, D**). À 9,5, *Rdh10* est exprimé dans la cavité atriale du cœur, le futur estomac, le 2^e arc branchial, la partie dorsale des vésicules optiques et dans les otocystes (**Fig.9E-H**). Une expression plus forte est détectée dans le mésoderme intermédiaire et latéral, le mésonéphros, l'épithélium nasal et dans le bourgeon du membre antérieur (**Fig.9E, E'**).

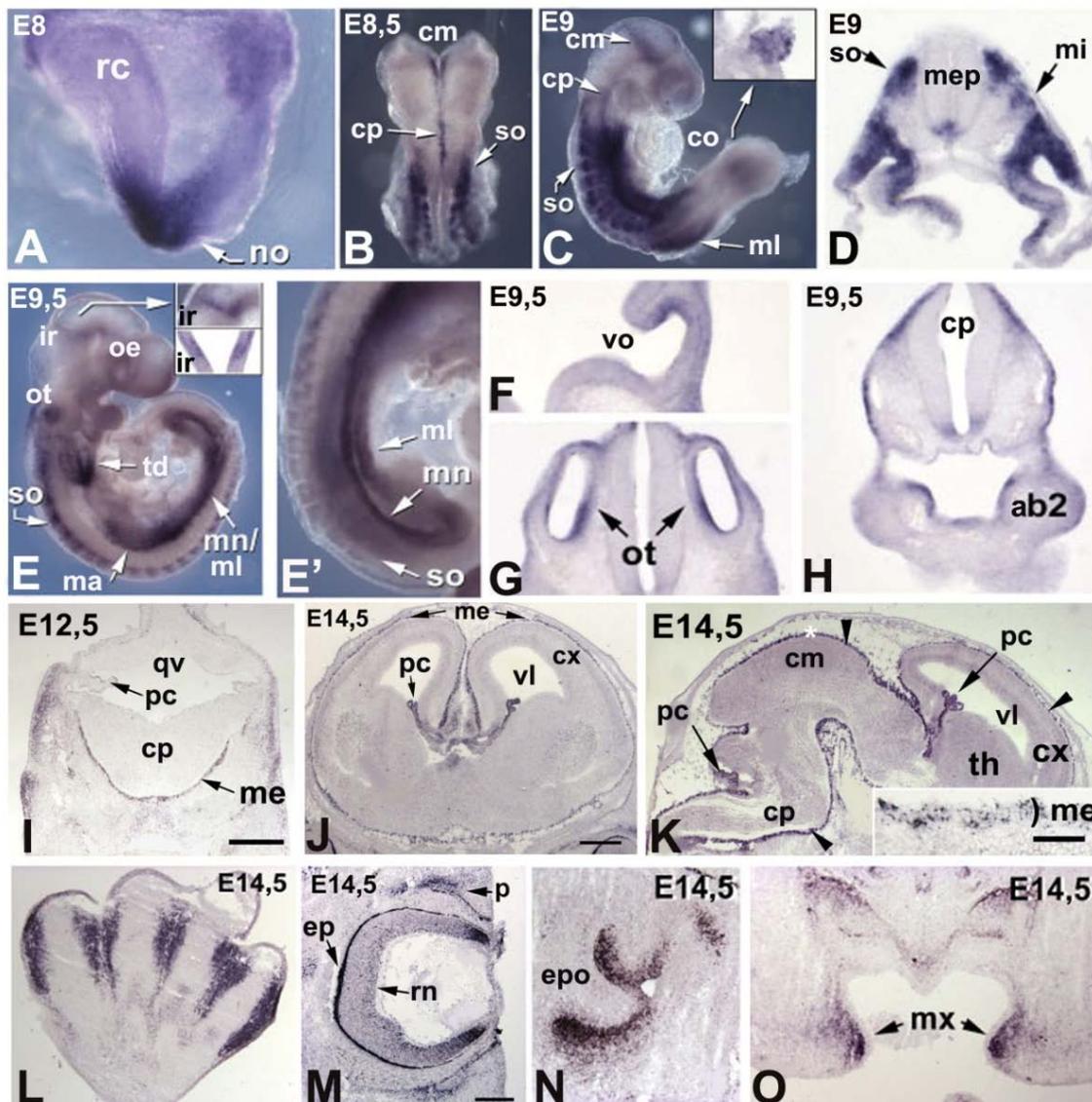


Figure 9. Patron d'expression du gène *Rdh10*

Hybridation *in situ* d'embryons entiers et sur coupes histologiques à différents stades pour le gène *Rdh10*. (A) Vue de profil d'un embryon entier au stade E8. (B) Vue dorsale d'un embryon entier à E8,5 montrant les régions des cerveaux moyen et postérieur. (C) Vue de profil d'un embryon entier au stade 10 somites. (D) coupe transversale de la région du tronc d'un embryon au stade E9. (E, E') Vue de profil globale (E) et agrandie (E') d'un embryon entier au stade E9,5. En E, le détail montre l'isthme du rhombencéphale en embryon entier et en coupe, respectivement. (F-H) Plusieurs coupes successives d'un embryon à E9,5 à travers la région de la vésicule otique (F), de l'otocyste (G), et du cerveau postérieur (H). (I) Coupe coronale d'un embryon au stade E12,5 au niveau du plexus choroïde du 4^e ventricule. (J) Coupe coronale d'un embryon au stade E14,5 au niveau du cortex cérébral. (K) Coupe sagittale d'un embryon à E14,5 recouvrant les cerveaux antérieur, moyen et postérieur. En détail, les méninges du cerveau moyen dorsal (astérisque). (L-M) Coupes sagittales du membre et de la vésicule optique d'un embryon à E14,5. (N-O) Coupes coronales au niveau des régions nasales et orales d'un embryon au stade E14,5. ab2, 2^e arc branchial ; cm, cerveau moyen ; co, cœur ; cp, cerveau postérieur ; cx, cortex ; ep, épithélium pigmentaire ; epo, épithélium olfactif ; ir, isthme du rhombencéphale ; ma, membre antérieur ; me, méninges ; mep, moelle épinière ; mi, mésoderme intermédiaire ; ml, mésoderme latéral ; mn, mésonéphros ; mx, processus maxillaire ; oe, œil ; ot, otocystes ; p, paupière ; pc, plexus choroïde ; qv, quatrième ventricule ; rc, renflement céphalique ; rn, rétine neurale ; so, somites ; td, tube digestif ; th, thalamus ; vl, ventricule latéral ; vo, vésicule otique. (adapté de Cammas *et al.*, 2007; Romand *et al.*, 2008)

Une expression plus faible est détectée dans le cerveau postérieur, la moelle épinière et l'isthme du rhombencéphale (Romand et al., 2008a) (**Fig.9D, E, H**).

À partir de E12,5, le gène *Rdh10* est exprimé dans les méninges en développement recouvrant l'ensemble des régions du système nerveux central, dans la zone ventriculaire du diencephale et dans les plexus choroïdes (Romand et al., 2008a) (**Fig.9I, J, K**). Il est aussi exprimé au niveau de la thyroïde, des processus maxillaire et mandibulaire, de la langue et du palais (Cammass et al., 2007). De E12,5 et 14,5, *Rdh10* est exprimé dans le mésenchyme interdigital (**Fig.9L**). À E14,5, l'expression de *Rdh10* s'intensifie dans les méninges et les plexus choroïdes (cf. Résultats, Partie I, §3.1) (**Fig.9J, K**), dans l'épithélium pigmenté de la rétine, l'épithélium olfactif et maxillaire, au niveau du rein et des tractus génitaux mâle et femelle (Romand et al., 2008 ; Cammass et al., 2007) (**Fig.9M, N, O**).

d. Mutation nulle du gène *Rdh10*

Une mutation induite par traitement chimique ENU (mutation nommée *Trex*) a été identifiée dans le gène *Rdh10*, générant des défauts morphogénétiques complexes et une létalité embryonnaire vers E13,5 (Sandell et al., 2007). Au stade E10,5, les mutants *Trex* présentent un défaut de développement des membres antérieurs (**Fig.10A, B**), de la vésicule optique et des otocystes surnuméraires (Sandell et al., 2007).

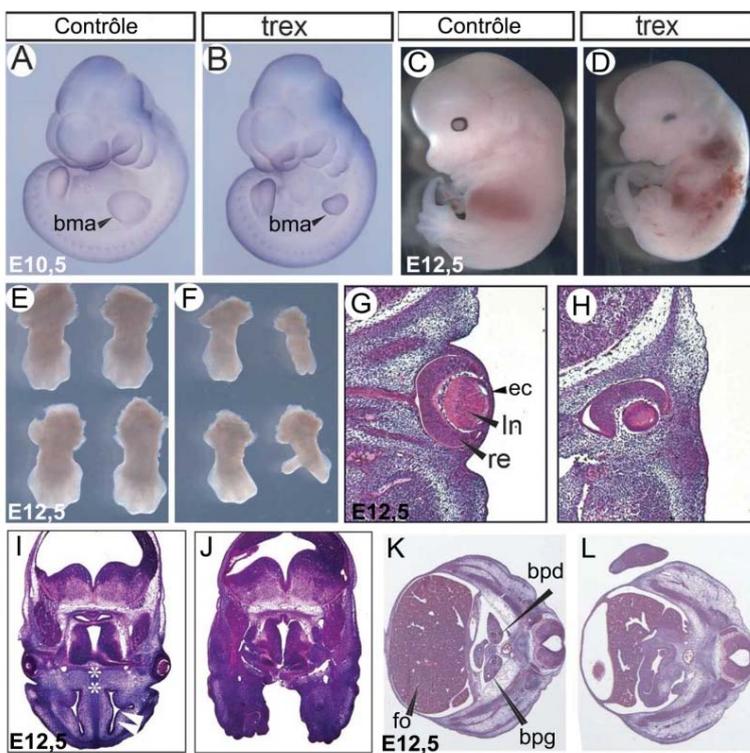


Figure 10. Mutation *Trex* du gène *Rdh10*

(**A-D**) Vues de profil d'embryons entiers contrôles (**A, C**) et mutants (**B, D**) aux stades E10,5 (**A, B**) et E12,5 (**C, D**). (**E, F**) Membres antérieurs isolés d'un embryon contrôlé (**E**) et mutant (**F**) au stade E12,5. (**G-J**) Coupes coronales d'embryon contrôlé (**G, I**) et mutant (**H, J**) à E12,5 au niveau de la vésicule optique (**G, H**) et de la région fronto-nasale (**I, J**) en coloration hématoxyline/éosine. Les astérisques montrent le septum nasal, les flèches blanches indiquent les cavités nasales. (**K, L**) Coupes coronales d'un embryon contrôlé (**K**) et mutant (**L**) au niveau du foie et des bourgeons des poumons colorés en hématoxyline/éosine. bma, bourgeon du membre antérieur ; bpd, bourgeon du poumon droit ; bpg, bourgeon du poumon gauche ; ec, ectoderme de la cornée ; fo, foie ; ln, lentille ; re, rétine. (adapté de Sandell et al., 2007)

du membre antérieur ; bpd, bourgeon du poumon droit ; bpg, bourgeon du poumon gauche ; ec, ectoderme de la cornée ; fo, foie ; ln, lentille ; re, rétine. (adapté de Sandell et al., 2007)

Aux stades E12,5-E13, l'autopode du membre antérieur est hypoplasique avec une absence du mésenchyme interdigital (**Fig.10C-F**). Au niveau de l'œil, la cornée et la partie ventrale de la rétine neurale sont absentes, et il y a une hypoplasie du cristallin (**Fig.10C, D, G, H**). Les structures nasales et l'organogenèse de plusieurs tissus (hypoplasie des poumons, du pancréas, du foie, de l'estomac, des gonades) présentent également des défauts marqués (*Sandell et al., 2007*) (**Fig.10D, I-L**).

En parallèle à ces observations, l'équipe du Dr. Dollé s'est également intéressée à la fonction du gène *Rdh10*, et le Dr. Rhinn a réalisé la mutation nulle *Rdh10*^{-/-} par recombinaison homologue d'ADN dans les cellules embryonnaires souches (*Rhinn et al., 2011*). La mutation *Rdh10*^{-/-} engendre des défauts du développement sévères et une létalité embryonnaire à E10,5 suite à des anomalies du système cardio-vasculaire. Aux stades E9-E9,5, les mutants *Rdh10*^{-/-} présentent une réduction de la partie caudale de l'embryon, une absence du 3^e arc branchial, une apparition des somites plus haute au niveau du tronc, une malformation du cœur et des otocystes plus petits et parfois surnuméraires (*Rhinn et al., 2011*) (**Fig.11A-D'**). Environ 10% des embryons *Rdh10*^{-/-} échappent à la létalité précoce. À E12,5, la mutation *Rdh10*^{-/-} engendre des défauts des membres antérieurs qui sont réduits au stade de protrusion (**Fig.11E-F'**), de sévères anomalies faciales avec des fentes palatines, et une troncation des processus nasaux (*Rhinn et al., 2011*) (**Fig.11E, F, G, H**). Dans les mutants *Rdh10*^{-/-}, la segmentation du cerveau postérieur est altérée (cf. Partie II, §1.3.1), l'œil reste internalisé, la rétine ventrale est réduite (**Fig.11I, J**), le développement du cœur (**Fig.11K, L**), de l'estomac et de l'intestin semble arrêté, les poumons sont absents et le foie, le pancréas et les reins sont hypoplasiques (*Rhinn et al., 2011*) (**Fig.11M, N**).

Le phénotype de la mutation du gène *Rdh10* présenté dans l'étude du Dr. Rhinn est plus sévère que celui du mutant *Rdh10*^{Trex}. Cette différence suggère que la perte de fonction enzymatique est incomplète chez le mutant *Rdh10*^{Trex} et s'expliquerait par le fait que la mutation *Trex* soit hypomorphe.

L'analyse de l'expression du transgène rapporteur *RARE-lacZ* chez les mutants *Rdh10*^{-/-} montre entre les stades E7,5 et E8,5, une absence d'activité du transgène dans la région fronto-nasale au niveau du cerveau antérieur, à l'exception d'une faible activité dans le tube neural et le mésoderme latéral du tronc (*Rhinn et al., 2011*). À E9,5, le transgène s'active à un faible niveau au sein du tube neural de la région du tronc et dans des régions proches du tube digestif et du cœur. Cette observation est cohérente avec celles faites dans le mutant *Rdh10*^{Trex}. De plus, un apport maternel du substrat manquant, le rétinaldéhyde, de E7,5 à E9,5, permet de sauver la quasi-totalité (excepté la fente palpébrale) du phénotype mutant et

d'obtenir pour la première fois des mutants *Rdh10*^{-/-} adultes (Rhinn et al., 2011). Enfin, le phénotype moléculaire du mutant *Rdh10*^{-/-} ne reflète pas celui d'une carence en vitamine A complète mais rappelle les conditions où l'apport en AR est sub-optimal, ce qui suggère qu'en absence de RDH10, les autres ADHs ou SDRs seraient capables de promouvoir un apport minime en rétinaldéhyde (Rhinn et al., 2011).

L'ensemble de ces observations réévalue le rôle des SDRs et notamment celui de l'enzyme RDH10 au cours du développement embryonnaire. En effet, RDH10 serait l'enzyme responsable de la synthèse tissu-spécifique de rétinaldéhyde, avec une compensation partielle possible d'autres enzymes moins spécifiques (les ADHs ou d'autres RDHs/SDRs), assurant ensemble la production du rétinol pour la synthèse de l'AR au cours du développement.

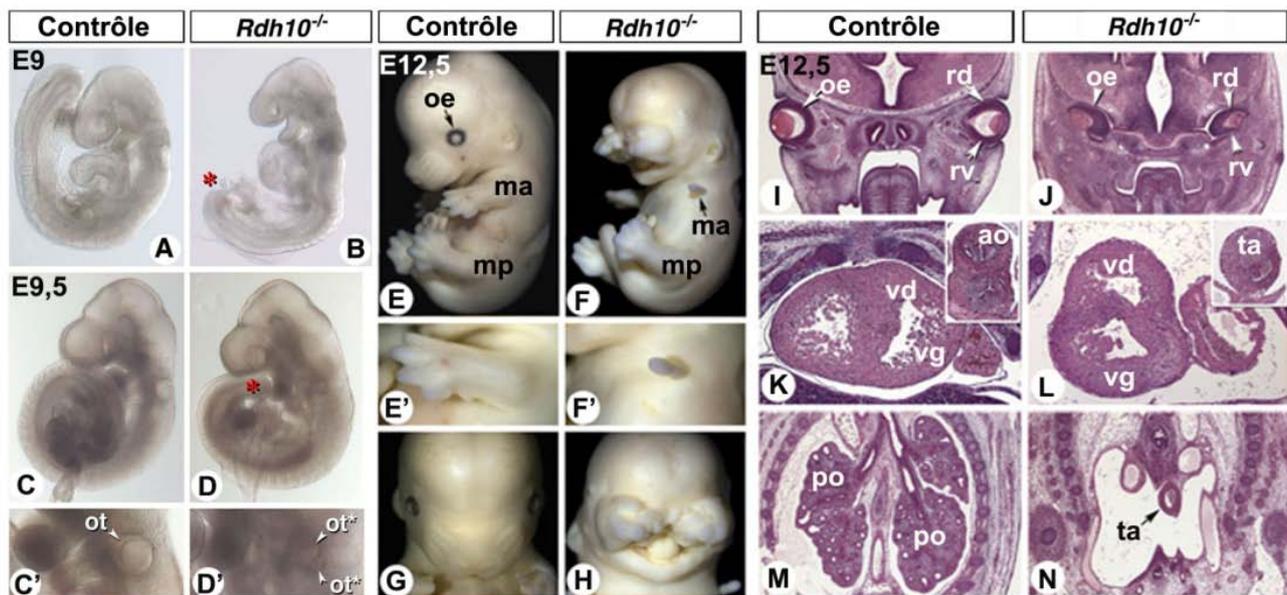


Figure 11. Mutation nulle du gène *Rdh10*

(A-D') Vues de profil d'embryons entiers contrôles (A, C) et mutants (B, D) aux stades E9 (A, B) et E9,5 (C, D). Les astérisques rouges en B et D montrent le raccourcissement de la région caudale de l'embryon mutant. C', D' : Agrandissement de C et D respectivement, de la région de la vésicule otique. En D', les astérisques mettent en évidence les otocystes surnuméraires. (E-F') Vues de profil d'embryons entiers contrôle (E, E') et mutant (F, F') au stade E12,5. (E', F') Agrandissement de E et F respectivement, de la région du membre antérieur. (G, H) Vue de face de la région fronto-nasale d'un embryon contrôle (G) et mutant (H) au stade E12,5. (I-N) Coupes histologiques coronales de différentes régions d'un embryon contrôle (I, K, M) et mutant (J, L, N) colorées en hématoxyline/éosine. En I, J, le niveau de section montre la région fronto-nasale ; en K, L, la région au niveau du cœur et en M, N, la région au niveau des poumons. ao, aorte ; ma, membre antérieur ; mp, membre postérieur ; oe, œil ; ot, otocystes ; po, poumons ; rd, rétine dorsale ; rv, rétine ventrale ; ta, tronc artériel ; vd, ventricule droit ; vg, ventricule gauche. (adapté de Rhinn et al., 2011)

3.2.2. Rétinaldéhyde déshydrogénases

Les rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDH 1, 2 et 3) sont des enzymes indispensables à la synthèse de l'AR, en réalisant la seconde réaction d'oxydation du rétinol en AR, qui est irréversible. Les RALDHs ont chacune une expression stade- et tissu-spécifique au cours de l'embryogenèse.

a. Profils d'expression des *Raldhs*

Raldh2 est le premier des trois gènes *Raldhs* exprimé dans l'embryon murin. Son expression apparaît pendant la gastrulation dès E7,5, dans le mésoderme latéral, la ligne primitive et les cellules du mésoderme postérieur (**Fig.12A-C**) (Niederreither et al., 1997). À E8, *Raldh2* est exprimé dans la partie postérieure de l'embryon s'étendant jusqu'en dessous du renflement céphalique, et dans les mésoderme pré-somitique, para-axial (mésoderme somitique) et latéral du tronc (Niederreither et al., 1997) (**Fig.12D**). Au stade E8,5, *Raldh2* est exprimé dans les somites et le mésoderme du tronc (Haselbeck et al., 1999) (**Fig.12E**). Entre E7,75 et E9, *Raldh2* a une expression transitoire dans les territoires présomptifs des vésicules télencéphaliques et optiques (Niederreither et al., 1997 ; Haselbeck et al., 1999 ; Ribes et al., 2006) (**Fig.12E, M, N**). De E8 à E9,5, *Raldh2* est fortement exprimé dans l'ectoderme de surface de la région crânio-faciale (Ribes et al., 2006) (**Fig.12M-O**). De E9,5 à E11,5, l'expression de *Raldh2* s'estompe et ne reste prononcée que dans le mésenchyme cervical, dans la partie la plus caudale des somites et au niveau des membres antérieur et postérieur (Niederreither et al., 1997) (**Fig.12F-H**). Au stade E12,5, *Raldh2* réapparaît dans les méninges, les plexus choroïdes, mais aussi dans le mésenchyme péri-oculaire et olfactif (Niederreither et al., 1997 ; Smith et al., 2001) (**Fig.12I-K**). Ailleurs, le gène est exprimé dans les arcs pharyngiens, les régions thoracique et cervicale de la moelle épinière, le mésenchyme maxillaire, péricardiaque, intestinal, urogénital, et interdigital (Niederreither et al., 1997) (**Fig.12H**). Plus tardivement aux stades fœtaux, l'expression de *Raldh2* ne persiste que dans les méninges, les plexus choroïdes, l'œil, le cœur, le système digestif et le rein.

L'expression de *Raldh3* est plus tardive et apparaît à E8,5 dans l'ectoderme de surface recouvrant l'épithélium neural de la partie rostrale du cerveau antérieur (Li et al., 2000 ; Smith et al., 2001). À partir de E8,5, *Raldh3* est exprimé dans l'épithélium neural pigmenté et dans la région ventrale de la rétine (Dupé et al., 2003) (**Fig.13A**). *Raldh1* est, quant à lui, exprimé à partir de E9,5 dans la partie dorsale de la rétine (Matt et al., 2005) (**Fig.13B**). À E9,5, *Raldh3* est exprimé dans la région des bourgeons dentaires, du muscle squelettique, dans les vésicules optiques et dans les placodes olfactives (Mic et al., 2000 ; Niederreither et al., 2002).

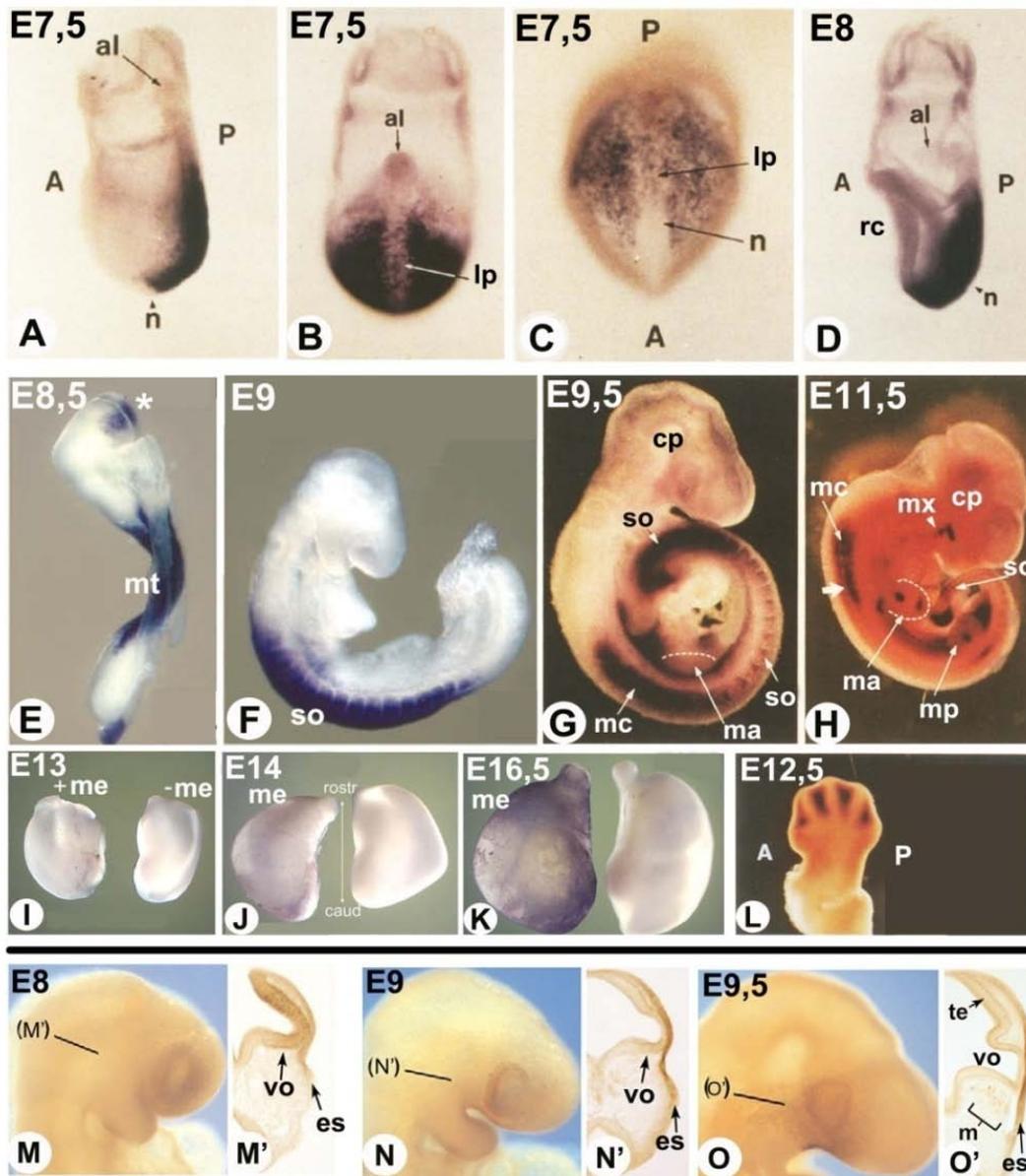


Figure 12. Patron d'expression du gène *Raldh2* et localisation de la protéine RALDH2

(A-L) Hybridation *in situ* d'embryons et d'organes entiers à différents stades pour le gène *Raldh2*. (M-O) Immunodétection sur embryons entiers et coupes histologiques à différents stades de la protéine RALDH2. (A, D) Vues de profil d'un embryon au stade E7,5 et E8, respectivement. (B) Pôle postérieur d'un embryon au stade E7,5. (C) Vue de face de la région du nœud d'un embryon au stade E7,5. En A, B, C, D, L, A signifie le pôle antérieur et P, le pôle postérieur. (E) Vue de profil d'un embryon au stade E8,5. L'astérisque met en évidence l'expression précoce du gène *Raldh2* dans les territoires présomptifs des vésicules optiques et télencéphaliques. (F-H) Vues de profil d'embryons au stade E9 (F), E9,5 (G) et E11,5 (H). (I-K) Vues du dessus de lobes télencéphaliques munis (+ me) et dépourvus de leur méninges (- me), aux stades E13 (I), et E14 (J) et E16,5 (K). (L) Vue dorsale du membre antérieur d'un embryon à E12,5. (M, N, O) Vues de profil de la région fronto-nasale d'embryons aux stades E8 (M), E9 (N) et E9,5 (O). (M', N', O') Coupes histologiques coronales de la région fronto-nasale aux stades correspondants. al, allantoïde ; cp, cerveau postérieur ; es, ectoderme de surface ; lp, ligne primitive ; m, mésenchyme ; ma, membre antérieur ; mc, mésoderme cervical ; me, méninges ; mp, membre postérieur ; mt, mésoderme du tronc ; mx, processus maxillaire ; n, nœud ; rc, renflement céphalique ; so, somites ; te, télencéphale ; vo, vésicule otique. (*adapté de Niederreither et al., 1997 ; Smith et al., 2001 ; Ribes et al., 2006*)

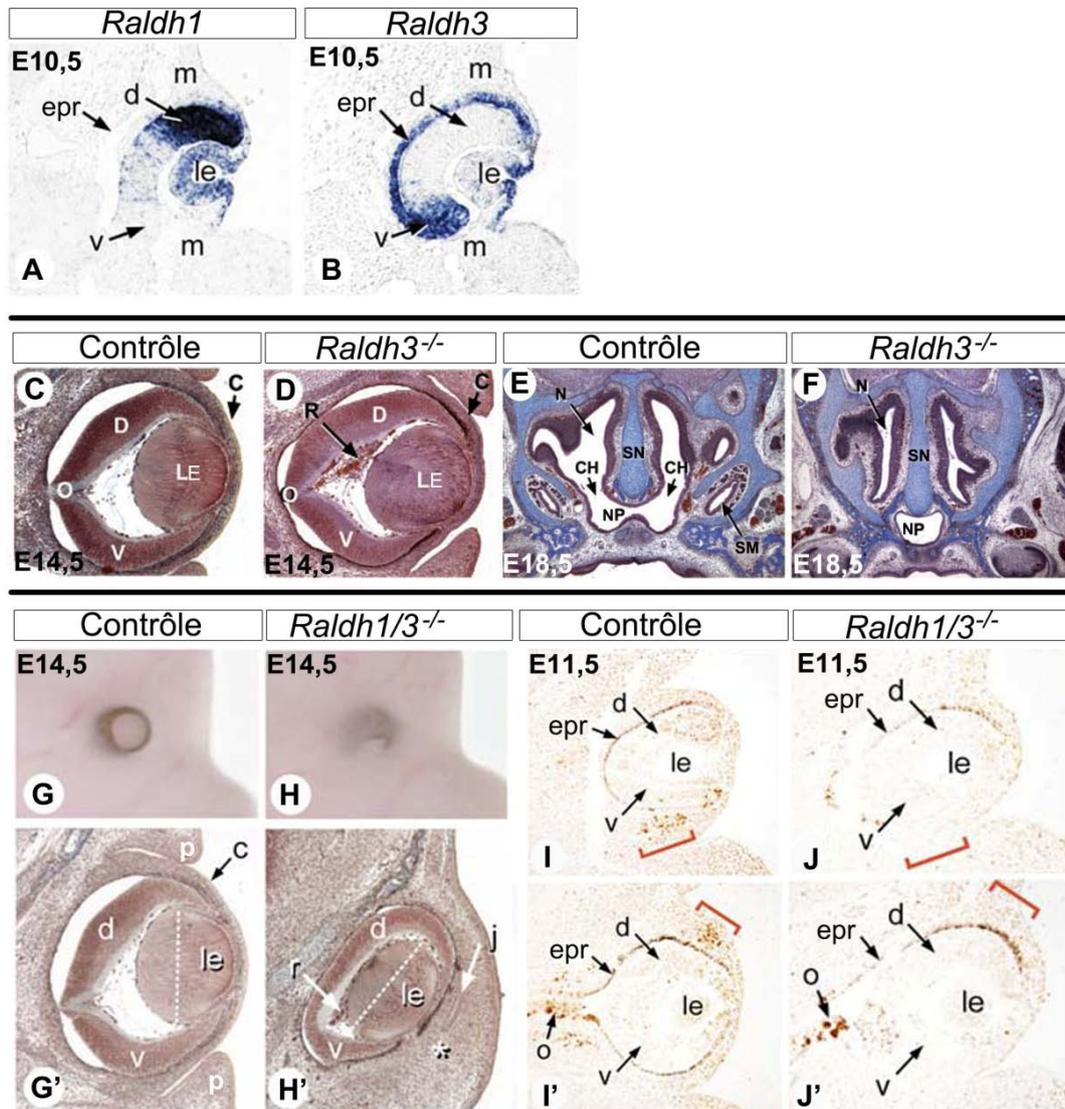


Figure 13. Patron d'expression et anomalies phénotypiques de mutants pour les gènes *Raldh1* et *Raldh3*

(A-B) Hybridation *in situ* sur coupes histologiques coronales d'embryons au stade E10,5 pour les gènes *Raldh1* (A) et *Raldh3* (B). (C-F) Mutation nulle du gène *Raldh3*. (C, D) Coupes coronales colorées en hématoxyline de Groat, de la région de la vésicule optique d'un embryon contrôle (C) et mutant (D) au stade E14,5. (E, F) Coupes coronales colorées en trichrome de Mallory de la région fronto-nasale d'un embryon contrôle (E) et mutant (F) au stade E18,5. (G-J') Double mutation nulle pour les gènes *Raldh1* et *Raldh3*. (G-H) Vues de profil de la tête entière dans la région de la vésicule optique d'un embryon contrôle (G) et mutant (H) au stade E14,5. (G'-H') Coupes histologiques coronales colorées en hématoxyline de Groat, de la région de la vésicule optique d'un embryon contrôle (G') et mutant (H') au stade E14,5. En G' et H', la ligne en pointillés représente le plan équatorial du cristallin, et l'astérisque montre du mésenchyme indifférencié à l'emplacement de la paupière et de la cornée. (I-J') Distribution des cellules apoptotiques identifiées par TUNEL sur coupes histologiques coronales de la région antérieure (I, J) et au niveau du nerf optique (I', J') (de la vésicule optique d'embryons contrôle (I, I') et mutant (J, J') au stade E11,5. Les crochets rouges indiquent le mésenchyme péri-oculaire. c, cornée ; ch, choanes ; d, rétine dorsale ; epr, épithélium pigmentaire de la rétine ; j, conjonctive palpébrale ; le, cristallin ; m, mésenchyme péri-oculaire ; n, cavité nasale ; np, nasopharynx ; o, nerf optique ; p, paupière ; r, membrane rétro-lenticulaire ; sm, sinus maxillaire ; sn, septum nasal. (adapté de Dupé et al., 2003 ; Matt et al., 2005)

Dans le cortex, le gène *Radlh3* est exprimé à partir de E11 dans les éminences ganglionnaires latérales et *Raldh1* apparaît aux stades périnataux, dans les méninges (*Smith et al., 2001*). Il existe une quatrième RALDH qui a la particularité de réaliser plus efficacement l'oxydation du rétinol 9-*cis* en AR 9-*cis* (rétinoïde non détecté chez l'embryon) (*Lin et al., 2003*). L'expression du gène *Raldh4* est plus tardive et se situe dans le foie et les reins de E15,5 jusqu'au stade adulte (*Lin et al., 2003*).

b. Phénotypes associés aux pertes de fonction de Raldh1 et Raldh3

Il a été montré que RALDH1 est l'enzyme RALDH la moins efficace dans la synthèse d'AR (*Haselbeck et al., 1999*). Les mutants *Raldh1*^{-/-} sont viables et ne présentent pas de défauts importants de développement des structures oculaires (*Matt et al., 2005*). Les mutants *Raldh3*^{-/-} ne présentent pas non plus de défauts majeurs du développement, mis à part un arrêt du développement de la membrane rétro-lenticulaire (persistance du vitré primitif), une réduction moyenne de la rétine ventrale et une absence de formation des choanes (communication entre les cavités nasale et orale) (**Fig.13C-F**) (*Dupé et al., 2003*). Les mutants *Raldh3*^{-/-} meurent à la naissance d'une détresse respiratoire (*Dupé et al., 2003*). Ni les mutants *Raldh1*^{-/-} ni les mutants *Raldh3*^{-/-} ne présentent une altération de l'axe dorso-ventral de la rétine, ce qui suggère un rôle compensatoire de RALDH1 et RALDH3. Chez les doubles mutants nuls *Raldh3/Raldh1*, aucune activité du transgène *RARE-lacZ* n'est détectée dans les tissus de l'œil ni dans le mésoderme adjacent entre les stades E10,5 et E13,5 (*Matt et al., 2005*). De plus, les doubles mutants présentent une réduction de la taille de la rétine ventrale et un défaut du processus d'apoptose du mésenchyme péri-oculaire dérivant des cellules des crêtes neurales (*Matt et al., 2005*) (**Fig13.G-H' et I-J'**). Aucun défaut dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de la rétine neurale n'est observé, en revanche, l'expression de gènes régulant la morphogénèse du mésenchyme péri-oculaire est réduite (*Matt et al., 2005*). Ceci suggère que l'AR synthétisé au niveau de la rétine par RALDH1, RALDH3 et au niveau de l'ectoderme de surface par RALDH3 agit de manière paracrine au niveau du mésenchyme péri-oculaire, contrôlant ainsi la morphogénèse de l'œil.

Les RALDHs se distinguent par la spécificité de leurs profils d'expression qui est en cohérence avec la répartition de l'activité de l'AR au sein des différents tissus embryonnaires. Les données suggèrent que RALDH2 est principalement responsable de la synthèse d'AR de E7,5 jusqu'à E8,5, et qu'après ce stade, RALDH3 produit de l'AR dans l'ectoderme de surface, et RALDH1 et RALDH3 génèrent de l'AR dans l'œil et le système olfactif.

c. La mutation nulle du gène Raldh2

RALDH2 se distingue en étant la RALDH la plus efficace dans la synthèse d'AR (Haselbeck *et al.*, 1999). Les mutants *Raldh2*^{-/-} présentent de sévères anomalies du développement et meurent à E9,5 suite à des défauts de développement du système cardio-vasculaire. Au stade E9,5, les embryons *Raldh2*^{-/-} sont plus petits, le réseau de vaisseaux extra-embryonnaires de la membrane vitelline est désorganisé et la rotation axiale (qui se réalise normalement vers E8,5) n'a pas eu lieu (Niederreither *et al.*, 1999) (**Fig.14A-B'**). Le tronc des embryons mutants apparaît plus court avec une ouverture de la région ventrale, le tube neural ne s'est pas fermé, les somites sont plus petits et compactés (**Fig.14A-B'**). La région fronto-nasale est tronquée (cf. Partie II, §1.3.2), la segmentation du cerveau postérieur est altérée (cf. Partie II, §1.3.1) et les otocystes sont hypoplasiques et anormalement éloignés du cerveau postérieur (Niederreither *et al.*, 1999 ; Niederreither *et al.*, 2000) (**Fig.14C, D**). Les bourgeons de membres ne se forment pas, la morphogénèse cardiaque est bloquée et les arcs branchiaux ne sont pas discernables, excepté le premier (Niederreither *et al.*, 1999) (**Fig. 14A-B'**).

La majorité des défauts observés dans les mutants *Raldh2*^{-/-} peuvent être sauvés de façon remarquable par un apport maternel en AR entre les stades E7,5 à E8,5 (Niederreither *et al.*, 2003). De plus, l'analyse de l'expression du transgène rapporteur *RARE-lacZ* chez les mutants montre qu'entre les stades E7,5 et E8,5, aucune activité du transgène n'est détectée, à l'exception de certaines cellules ectodermiques et mésenchymateuses au niveau des vésicules optiques (E8,5), due à l'activité de RALDH3 dans ces tissus (Niederreither *et al.*, 1999). L'ensemble de ces observations suggèrent que la signalisation rétinéoïde au cours du développement précoce repose majoritairement sur l'activité de l'enzyme RALDH2.

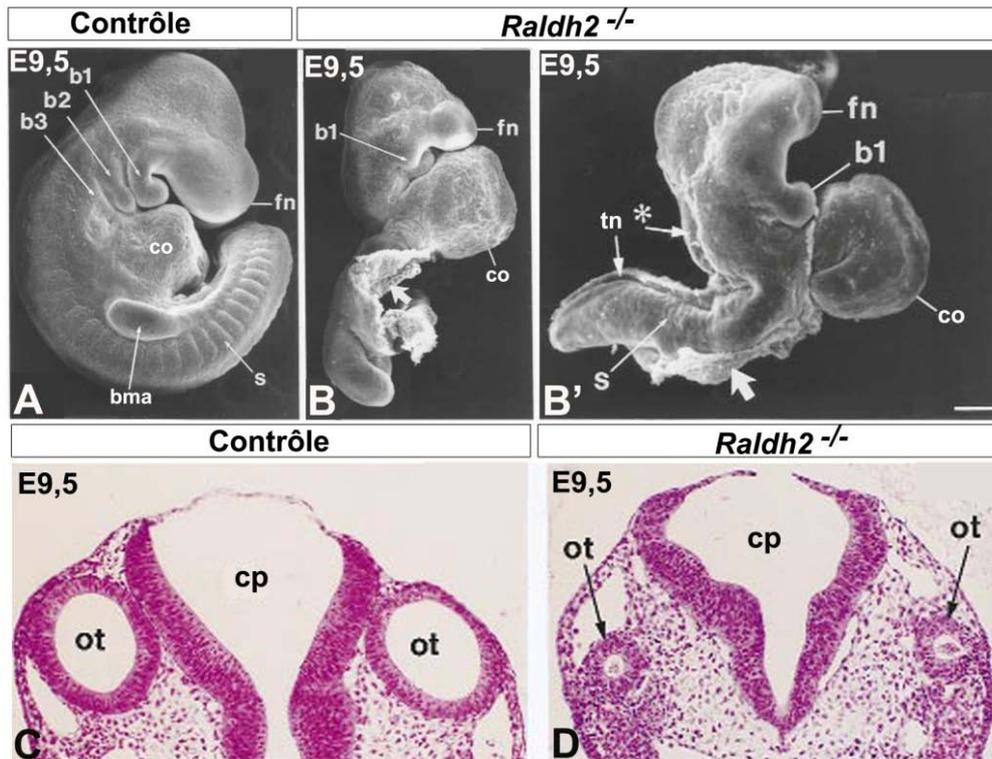


Figure 14. Mutation nulle pour le gène *Raldh2*

(A-B') Vues de profil d'embryons contrôle (A) et mutants (B, B') au stade E9,5 au microscope électronique à balayage. B' : Vue de profil avec une orientation plus dorsale. En B et B', la flèche montre l'ouverture de la région ventrale de l'embryon mutant. En B', l'astérisque met en évidence l'absence de fermeture du tube neural. (C, D) Coupes histologiques coronales colorées en hématoxyline/éosine à travers la région du cerveau postérieur d'embryons contrôle (C) et mutant (D) au stade E9,5. b1-3, 1^{er} -3^e arcs branchiaux ; bma, bourgeon du membre antérieur ; co, cœur ; cp, cerveau postérieur ; fn, région fronto-nasale ; ot, otocystes ; s, somite ; tn, tube neural. (*adapté de Niederreither et al., 1999*)

De manière intéressante, les profils d'expression des alcool/rétinol et rétinaldéhyde déshydrogénases sont essentiellement chevauchants. Les enzymes RDH10 et RALDH2 sont les acteurs majeurs de la voie rétinol au sein des mêmes tissus cibles à des moments identiques au cours du développement. Les profils d'expression des gènes *Rdh10* et *Raldh2* sont en cohérence avec le spectre d'activité du transgène *RARE-lacZ* et recouvrent à eux deux, la quasi-totalité de l'activité de l'AR au cours du développement.

Ces observations mettent en évidence plusieurs grandes régions de production de l'AR, indiquant les tissus qui ont besoin de la signalisation rétinol pour leur développement. Les enzymes de synthèse y sont dans certains cas, présentes dès les étapes précoces de leur développement et y sont ensuite réorganisées avec l'avancement des processus de différenciation. C'est notamment le cas du système nerveux central en développement, structure dans laquelle le rôle potentiel de l'AR est très étudié.

II. Implication de l'acide rétinoïque dans le développement du système nerveux central

1. Développement précoce du système nerveux central

1.1. Gastrulation et formation du tube neural

Le premier évènement du développement du système nerveux des vertébrés est le processus d'induction neurale. Chez la souris, ce processus marque le début de la gastrulation à E6,5, par l'induction du mésoderme et la formation de la ligne primitive.

1.1.1. Induction neurale aux cours des stades gastrula et neurula

La mise en place des régions antérieure et postérieure du futur neuroectoderme est réalisée par plusieurs signaux émanant de différentes structures.

Plusieurs études faites chez les mammifères montrent que l'endoderme viscéral antérieur (EVA), tissu extra-embryonnaire sous-jacent à l'épiblaste, est requis pour l'induction et le maintien de l'identité des structures de la tête (**Fig.15**).

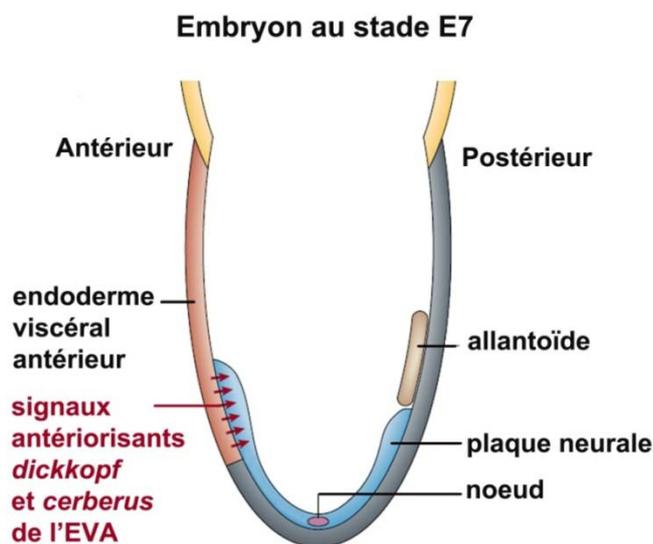


Figure 15. Signaux et tissus impliqués dans l'induction du caractère neural antérieur

Représentation d'un embryon au stade E7. Les flèches rouges indiquent les signaux comme *cerberus* et *dickkopf* émis par l'endoderme viscéral antérieur (EVA) et participant à la détermination du caractère antérieur de l'épiblaste. (adapté de Rallu et al., 2002)

L'EVA est une structure présente avant le début de la gastrulation, c'est-à-dire avant l'induction du mésoderme et l'apparition du pôle postérieur. L'ablation de l'EVA chez des

embryons murins à des stades précoces de la gastrulation entraîne la perte de l'expression de marqueurs du cerveau antérieur (Thomas and Beddington, 1996). De plus, les mutants perte de fonction pour les gènes *Hex1*, *Lim1* et *Otx2* exprimés dans l'EVA, ne parviennent pas à développer les structures de la tête (Beddington and Robertson, 1999). Enfin, il a été montré que l'EVA exprime les homologues murins des gènes *dickkopf* (Glinka et al., 1998) et *cerberus* (Biben et al., 1998) qui produisent des signaux agissant comme antagonistes naturels des voies de signalisation BMP, Wnt et Nodal pour la détermination du caractère "antérieur" de la région rostrale de l'épiblaste (Fig.15).

1.1.2. Rôle des rétinoïdes dans la régionalisation antéro-postérieure de l'épiblaste

Aux stades gastrula et neurula, l'AR est un signal restreint au pôle postérieur de l'embryon. En effet, la région antérieure de l'épiblaste exprime les gènes des enzymes de dégradation de l'AR, CYP26A1 et CYP26C1 (Uehara et al., 2007) (Fig.16A-D, E-H), alors que la région postérieure exprime ceux des enzymes de synthèse, RDH10 et RALDH2 (cf. Partie I, §3.2.1-2) (Fig.17). L'AR produit dans la ligne primitive et le mésoderme pré-somitique (cf. Partie I, §3.2.2) agit sur le neuroectoderme adjacent et diffuse sous forme de gradient vers le pôle antérieur. Les CYP26A1 et C1 stoppent ensuite la progression du signal rétinoïde pour maintenir l'identité "antérieur" des futures structures de l'épiblaste rostral.

Un excès d'AR au cours des stades gastrula et neurula provoque une anencéphalie ou une sévère microcéphalie (Simeone et al., 1995). La double mutation *Cyp26a1^{-/-}* ; *Cyp26c1^{-/-}* entraîne une microcéphalie et une absence de fermeture du tube neural (Fig.16I-L), ainsi qu'une expansion de l'activité AR vers le pôle antérieur de l'embryon (Uehara et al., 2007). Ceci suggère qu'en absence des enzymes CYP26A1 et CYP26C1, les RARs présents dans le neuroectoderme rostral, se lient à leur ligand AR et basculent d'un état de répression sans ligand à un état actif. Une étude réalisée chez le xénope montre que la levée de la répression des RARs par l'interaction avec un corépresseur dominant négatif engendre des défauts des structures antérieures similaires à celles rencontrées lors de l'excès en AR (Koide et al., 2001). Ces expériences suggèrent que les RARs doivent être maintenus sous un état "réprimé" dans les tissus embryonnaires antérieurs pour empêcher l'activation de gènes cibles déterminant une destinée cellulaire postérieure (Fig.17) (pour revue : Niederreither and Dollé, 2008). L'ensemble de ces observations mettent en évidence le rôle précoce de l'AR dans la détermination de l'axe antéro-postérieur de l'embryon.

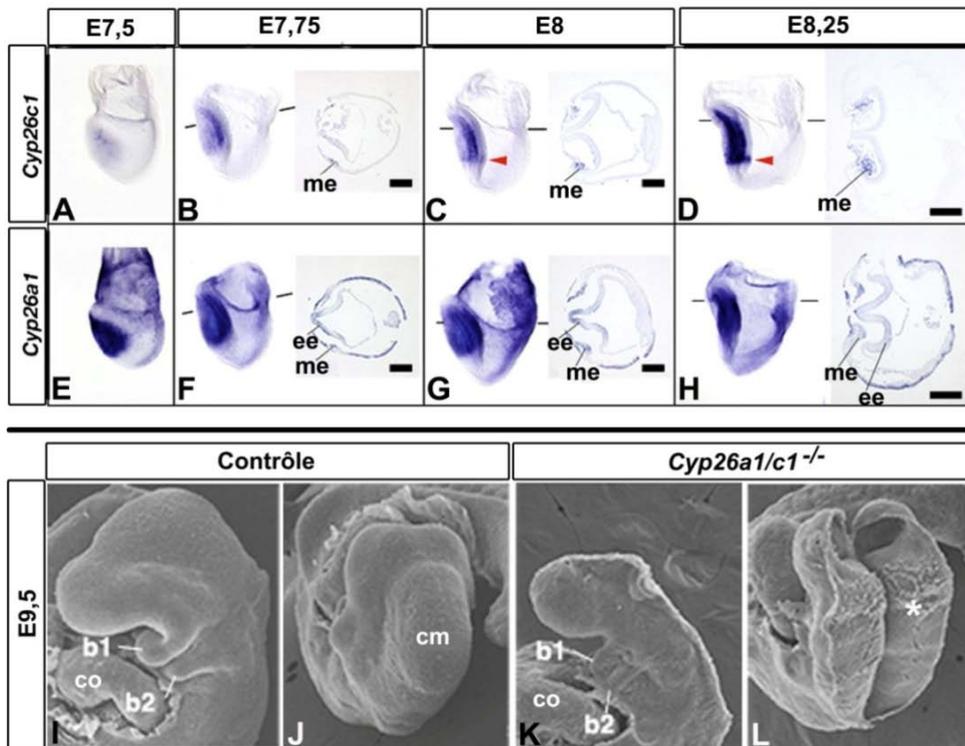


Figure 16. Expression des gènes *Cyp26a1* et *Cyp26c1* et phénotype associé à la double mutation
 (A-H) Hybridation *in situ* des gènes *Cyp26c1* (A-D) et *Cyp26a1* (E-H) dans des embryons aux stades E7,5 (A, E), E7,75 (B, F), E8 (C, G) et E8,25 (D, H). En B-D et F-H, est représenté un détail d'une coupe transversale selon le plan de coupe indiqué sur l'embryon de profil. Les flèches rouges en C et D indiquent l'expression de *Cyp26c1* dans le rhombomère 4. (I-L) Vues de profil (I, K) et par le dessus (J, L) d'embryons contrôle (I, J) et double mutant *Cyp26a1^{-/-}/c1^{-/-}* (K, L) au stade E9,5 au microscope électronique à balayage. L'astérisque en L montre l'absence de fermeture du tube neural. b1-2, 1^{er} et 2^e arcs branchiaux ; cm, cerveau moyen ; co, cœur ; ee, ectoderme embryonnaire ; me, mésoderme embryonnaire. (adapté de Uehara et al., 2007)

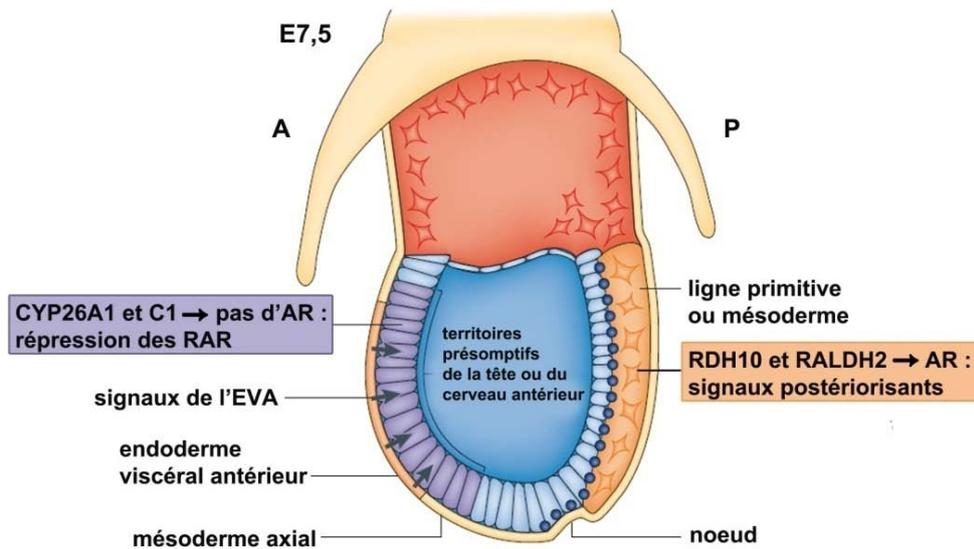


Figure 17. Signal rétinolique au stade gastrula

À E7,5, l'AR est produit par RDH10 et RALDH2 dans la région postérieure de l'embryon. Le gradient AR est restreint au pôle postérieur sous l'action des CYP26A1, B1 et C1 présentes dans la région antérieure de l'épiblaste. A, pôle antérieur ; P, pôle postérieur. (adapté de Niederreither and Dollé, 2008)

1.2. Gastrulation et neurulation

La ligne primitive est un épaississement cellulaire qui marque l'extrémité postérieure de l'embryon (**Fig.18A**). Elle se forme par délamination de certaines cellules de l'épiblaste. Les cellules qui constitueront les dérivés mésodermiques et endodermiques convergent et s'insinuent au travers de la ligne primitive pour s'intercaler entre l'ectoderme embryonnaire et l'endoderme viscéral (**Fig.18D, E**). Les trois feuilletts : externe pour l'ectoderme, intermédiaire pour le mésoderme et interne pour l'endoderme, sont ainsi formés (**Fig.18B-E**). La ligne primitive est une structure dynamique qui progresse entre E6,5 et E7,5 vers l'extrémité distale et également vers le pôle antérieur de l'embryon. Au même moment, le nœud se forme à l'extrémité antérieure de la ligne primitive, lui-même précédé par un groupe de cellules mésodermiques constituant la plaque préchordale (**Fig.18B**). Vers E7,5, la plaque neurale, épaississement de l'ectoderme, se forme en avant de la ligne primitive. Entre E7,5 et E8, la ligne primitive régresse vers la région distale de l'embryon, la plaque préchordale disparaît et la notochorde se forme (**Fig.18C**). La notochorde constitue l'axe médian de l'embryon et joue un rôle important dans la prochaine étape du développement neural.

Vers E7,5, la notochorde émet des signaux en direction de l'ectoderme. Ceci entraîne un épaississement des cellules ectodermiques en avant de la ligne primitive qui constituent ainsi la plaque neurale (**Fig.19A**). Elle s'étend par addition de cellules neuroectodermales nouvellement recrutées à son extrémité postérieure. À E8,5, la plaque neurale s'enfonce et ses extrémités latérales s'élèvent constituant des bourrelets neuraux (**Fig.19B**). Ensuite la plaque neurale s'incurve et une gouttière neurale se forme (**Fig.19C**). Enfin, les bourrelets neuraux se soudent pour constituer le tube neural (**Fig.19D**). Au moment de la fermeture du tube neural, certaines cellules se détachent des bourrelets latéraux et forment les cellules des crêtes neurales (**Fig.19D**).

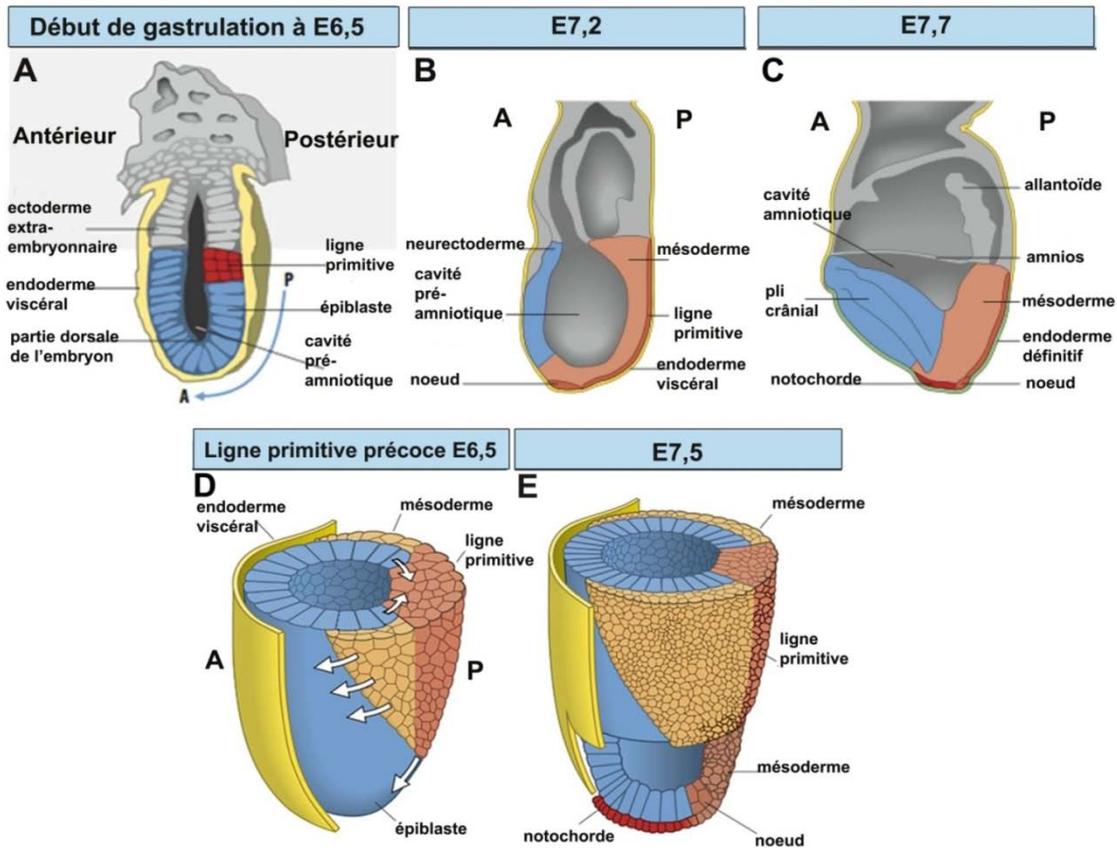


Figure 18. Gastrulation et formation de la notochorde chez la souris

(A-C) Représentations sagittales de l'embryon murin au stade gastrula, montrant l'organisation en trois feuillet de l'embryon et les annexes embryonnaires. (D, E) Représentation dans l'espace du processus de gastrulation avec l'invagination des cellules de l'épiblaste au travers de la ligne primitive et la colonisation des cellules mésodermiques. Les flèches blanches en D représentent les mouvements de convergence/extension. (adapté du livre *Developmental Biology*, Gilbert and Singer, 2006)

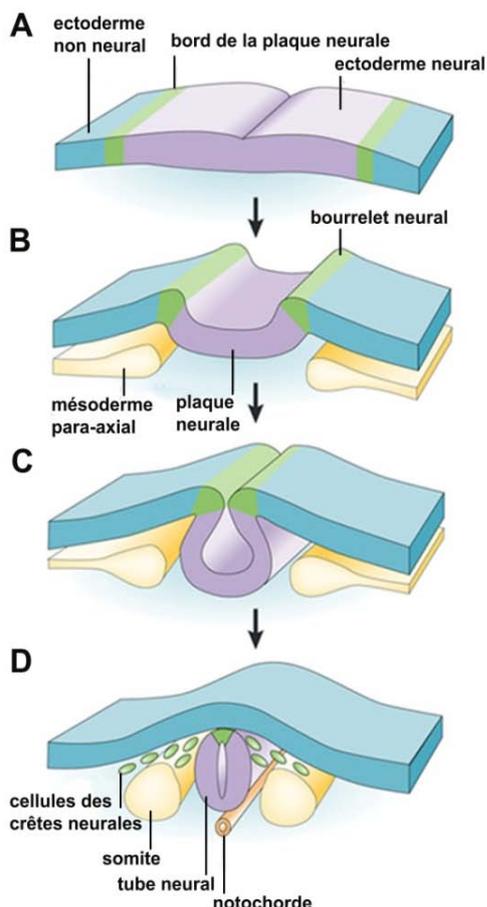


Figure 19. Neurulation chez la souris

(A-D) Représentation schématique des différentes étapes de la neurulation pour aboutir à la formation du tube neural. (A) Epaissement des cellules de l'ectoderme neural. (B) Dépression de la plaque neurale vers la région interne de l'embryon. Création des bourrelets neuraux. (C) Convergence des bourrelets neuraux et courbure de la plaque neurale. (D) Soudure des bourrelets neuraux, formation du tube neural et des cellules des crêtes neurales. (adapté de Wood, 2003)

1.3. Régionalisation du tube neural

Entre E7,5 et E8, la partie antérieure du tube neural s'enfle en trois vésicules, le prosencéphale (vésicule antérieure), le mésencéphale (médiane), et le rhombencéphale (postérieure) (**Fig.20A, A'**). Le prosencéphale se divise ensuite en télencéphale et diencéphale, le mésencéphale ne se divise pas, alors que le rhombencéphale donne naissance au métencéphale et au myélencéphale (**Fig.20B, B'**). A ce stade, le tube neural antérieur est composé de cinq vésicules, et la partie la plus postérieure du tube neural donne naissance à la moelle épinière.

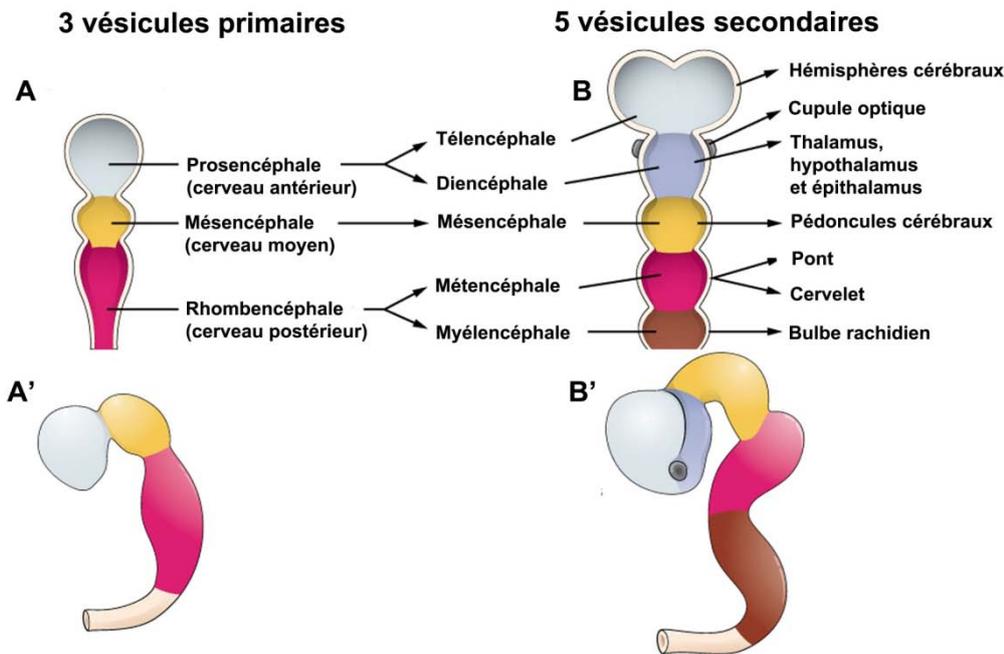


Figure 20.
Régionalisation
du tube neural

(**A, A'**) Vue du dessus (A) et de profil (A') du tube neural à trois vésicules. (**B, B'**) Vue du dessus (B) et de profil (B') du tube neural à cinq vésicules. Le prosencéphale et le rhombencéphale se divisent pour donner respectivement naissance au télencéphale et diencéphale, et au métencéphale et myélencéphale. Le télencéphale est à l'origine des hémisphères cérébraux ; le diencéphale donne naissance au thalamus ; le mésencéphale forme les pédoncules cérébraux ; le métencéphale est à l'origine du cervelet et du pont (ou protubérance annulaire) ; le myélencéphale donne le bulbe rachidien. (*adapté du module 22 "Système nerveux" sur embryology.ch, Universités de Fribourg, Lausanne et Berne*)

1.3.1. Développement du cerveau postérieur et de la moelle épinière

Une étape fondamentale du développement du cerveau postérieur est le processus de segmentation. Après la fermeture du tube neural, une série de sept renflements appelés rhombomères (r) prennent forme (**Fig.21**). Le rhombomère est une structure transitoire qui contient des propriétés cellulaires et moléculaires spécifiques à chacun et qui organise les différents processus nerveux et crânio-faciaux essentiels à la fonctionnalité du

rhombencéphale. Le premier rhombomère donne naissance au cervelet, chaque paire suivante contient des noyaux moteurs et fournit des fibres à un nerf crânien (**Fig.21**). Par exemple, le nerf trijumeau (V) provient des r2-3. Chaque rhombomère fournit aussi des cellules de la crête neurale à un des arcs branchiaux (**Fig.21**). Par exemple, le r2 donne des cellules au premier arc branchial. Les gènes *Hox* sont une famille de gènes apparentés aux gènes homéotiques de la drosophile, spécifiquement exprimés dans le cerveau postérieur. Chaque rhombomère exprime une combinaison de gènes *Hox* unique : par exemple, le gène *Hoxb1* est exprimé dans le r4, *Hoxb2* dans les r3 à 8, *Hoxb3* dans les r5 à 8 (**Fig.21**).

Il est suggéré que les gènes *Hox* sont activés par des facteurs de transcription : par exemple, le facteur *Krox20*, dont le gène est spécifiquement exprimé dans les r3 et 5 (*Gilardi et al., 1991*) (**Fig.21**). L'invalidation du gène *Krox20* entraîne chez les mutants une absence des r3 et 5 et la fusion des r2, 4 et 6 (*Schneider-Maunoury et al., 1997*). Cette même étude montre que *Krox20* est impliqué dans la régulation de la transcription des gènes exprimés dans les r3 et 5, tels que *Hoxb2*, *Hoxa2* et *Sek-1*. Enfin, il est suggéré que ces facteurs de transcription seraient à leur tour activés par les gradients précoces de FGF et de l'AR. Une étude plus récente a montré que la protéine *PIAS β* qui est une protéine répressive de la voie de signalisation STAT, a un rôle d'activateur du gène *Hoxb1* dans le r4 (*Garcia-Dominguez et al., 2006*). Par ailleurs, dans les r3 et 5, le même facteur *PIASx β* se liera au gène *Krox20* et y activera son expression (*Garcia-Dominguez et al., 2006*). Ces études montrent l'interaction fine qui s'opère entre les gènes *Hox*, certains facteurs de transcription, et des protéines activatrices/répressives intermédiaires.

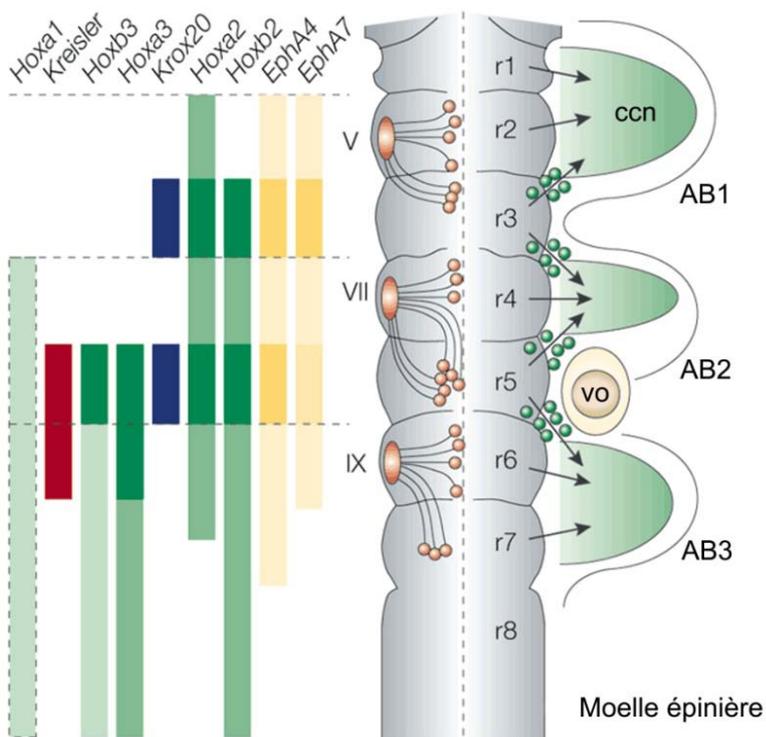


Figure 21. Segmentation du rhombencéphale

Au cours de la segmentation, le rhombencéphale se divise en 7 renflements appelés rhombomères (r). Les rhombomères contiennent des noyaux moteurs (billes oranges) et des cellules des crêtes neurales (billes vertes). Chaque rhombomère fournit des fibres nerveuses aux nerfs crâniens et des cellules des crêtes neurales aux arcs branchiaux. Les rhombomères se distinguent les uns des autres par l'expression de gènes spécifiques. AB, arc branchial ; ccn, cellules des crêtes neurales ; r, rhombomère ; vo, vésicule otique. (*adapté de Trainor and Krumlauf, 2000*)

a. Signalisation rétinolique dans le cerveau postérieur

Maden et Zile sont les premiers à montrer que la région postérieure du rhombencéphale (r4 à 8) ne se développe pas dans les embryons de cailles en carence en vitamine A (Maden *et al.*, 1996). Une étude faite sur le double mutant *RARα/γ* montre un phénotype du cerveau postérieur similaire à celui causé par une carence en vitamine A (Wendling *et al.*, 2001). A E8,5, les doubles mutants présentent une extension postérieure des marqueurs des r3 et 4 et n'expriment pas le facteur de transcription Kreisler dont le gène est spécifiquement exprimé dans les r5 et 6 (Fig.22A, B). Ce phénotype anormal du cerveau postérieur est différent de celui observé dans le double mutants *RARα/β*, dans lequel les territoires correspondant aux r5 et 6 sont sensiblement élargis (Dupé *et al.*, 1999) (Fig.22C, D). Ces études suggèrent que *RARα* et/ou *γ* sont impliqués dans la transduction du signal rétinolique requis dans la détermination des territoires présomptifs des r5 et 6 et que *RARβ* est impliqué dans la mise en place de la limite postérieure de ces mêmes territoires.

Enfin, une autre étude confirme ces observations et montre que le facteur de transcription vHNF1 joue un rôle important dans le développement du cerveau postérieur sous l'influence d'un signal rétinolique. Le gène *vHnf1* présente une séquence RARE en amont de sa région promotrice qui permettrait à l'AR d'en réguler l'expression. Le facteur vHNF1 participe à la détermination de la limite r4/r5 et à la spécification de l'identité r5 et r6 (Pouilhe *et al.*, 2007).

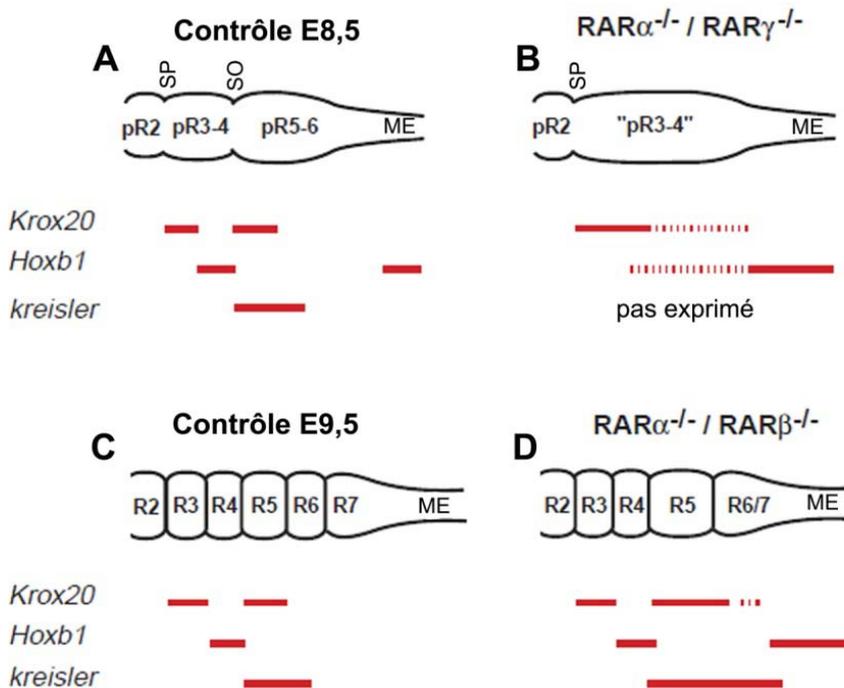


Figure 22. Segmentation du rhombencéphale dans les mutants *RAR*

(A-D) représentation schématique de la segmentation du rhombencéphale d'un embryon contrôle (A, C), d'un embryon double mutant *RARα^{-/-}/γ^{-/-}* (B) et double mutant *RARα^{-/-}/β^{-/-}* (D) aux stades E8,5 (A, B) et E9,5 (C, D). ME, moelle épinière ; pR, pré-rhombomère ; R, rhombomère ; SO, sillon otique ; SP, sillon pré-otique. (adapté de Wendling *et al.*, 2001)

b. Fonctions des gènes Raldh2 et Rh10 dans la régionalisation du cerveau postérieur

Les gènes *Raldh2* et *Rh10* sont tous les deux exprimés dans la ligne primitive, le mésoderme para-axial, les somites et le mésoderme présomitique au moment de la régionalisation du cerveau postérieur (cf. Partie I, §3.2.1-2).

La perte de fonction du gène *Raldh2* montre une antériorisation du cerveau postérieur avec une altération des profils d'expression des gènes contenus dans les rhombomères caudaux (*Niederreither et al., 2000*). Les mutants *Raldh2*^{-/-} présentent une expression de *Krox20* dans un domaine unique et élargi, une expansion du domaine d'expression *Meis2* (spécifiquement exprimé dans les r2 et 3) et une expression ectopique des gènes *Hoxb1* et *Wnt8A* (r4) anormalement parsemés le long de la région caudale du rhombencéphale (**Fig.23A-H**).

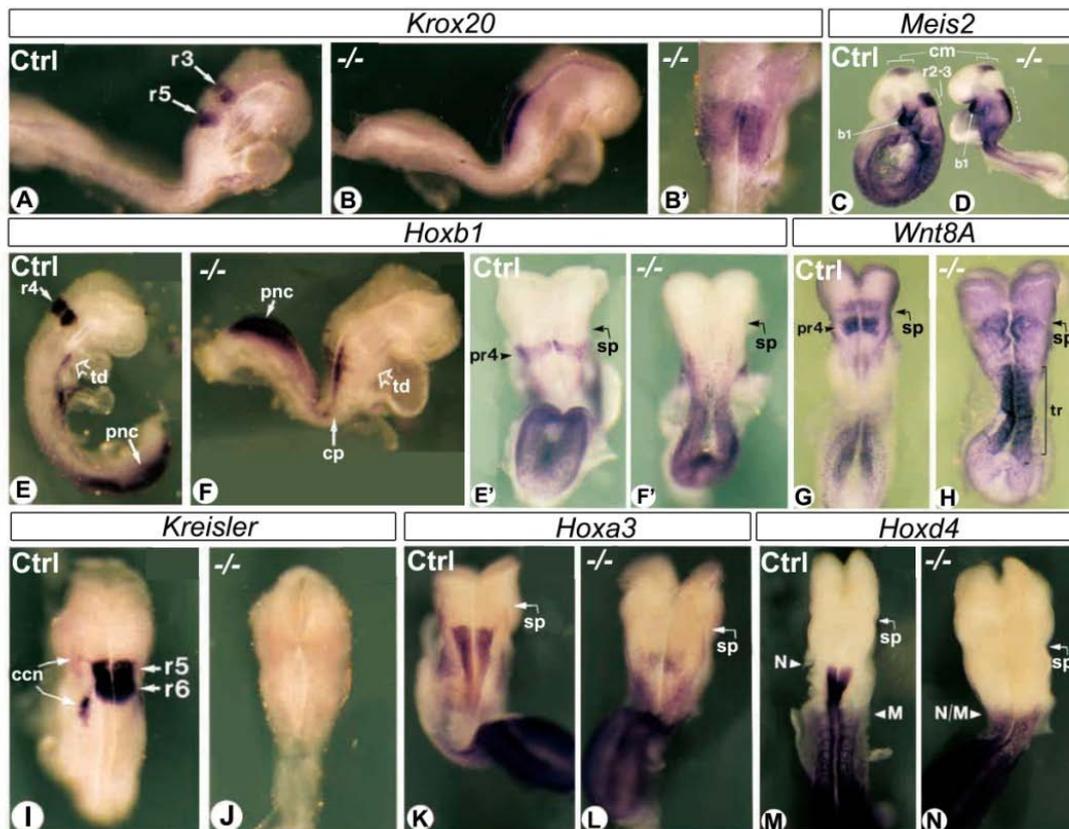


Figure 23. Fonction du gène *Raldh2* dans la segmentation du rhombencéphale

(A-N) Hybridation *in situ* de différents gènes marqueurs de rhombomères *Krox20* (r3 et r5, A-B'), *Meis2* (r2-r3, C, D), *Hoxb1* (pre-r4 et r4, E-F'), *Wnt8A* (pre-r4, G, H), *Kreisler* (r5-6, I, J), *Hoxa3* (limite r4/r5, K, L) et *Hoxd4* (limite r6/r7, M, N) dans les embryons contrôles (A, C, E, E', G, I, K, M) et mutants nuls pour le gène *Raldh2* (B, B', D, F, F', H, J, L, N). Les gènes *Krox20* et *Kreisler* ont été étudiés au stade E8,5 ; les gènes *Hoxb1*, *Wnt8A*, *Hoxa3* et *Hoxd4* au stade E8,25 ; et le gène *Meis2* au stade E8,75. Les embryons en A, B, C, D, E et F sont observés en vues de profil, les autres sont vus du dessus. b1, 1^{er} arc branchial, ccn, cellules des crêtes neurales ; cm, cerveau médian ; cp, cerveau postérieur ; m, limite d'expression au niveau du mésoderme ; n, limite d'expression au niveau du neuroectoderme ; pnc, plaque neurale caudal ; pr, pré-rhombomère ; r, rhombomère ; sp, sillon pré-otique ; td, tube digestif ; tr, tronc. (*adapté de Niederreither et al., 2000*)

De plus, les gènes marqueurs de la partie la plus postérieure du rhombencéphale, *Kreisler* (r5 et 6) et les gènes *Hox3* (*Hoxa3*, *Hoxb3* exprimés après la limite r4/r5) et *Hox4* (*Hoxa4*, *Hoxb4* et *Hoxd4* exprimés après la limite r6/r7) ont une expression absente ou nettement diminuée (*Niederreither et al., 2000*) (**Fig.23I-N**).

La mutation nulle du gène *Rdh10* engendre des anomalies de la segmentation du rhombencéphale avec une ségrégation moléculaire anormale aux niveaux des territoires présomptifs des r4 et 7 (*Rhinn et al., 2011*). L'expression du gène *Krox20* dans le r3 est élargie avec une trainée de plusieurs cellules ectopiques s'étendant vers les régions rostrale et caudale (**Fig.24A, B, G, H**). L'expression du gène *Krox20* dans le r5 est mal délimitée et s'étend vers la région caudale du rhombencéphale, jusqu'à atteindre la jonction avec la moelle épinière (**Fig.24A, B, G, H**). Il en est de même pour l'expression des gènes *Hoxb1* (r4) et *Mafb* (*Kreisler*, r5 et r6) qui s'étendent jusqu'à la région rostrale de la moelle épinière (*Rhinn et al., 2011*) (**Fig.24C-F, I-L**).

L'ensemble de ces résultats montre que l'AR a un rôle important dans la croissance et la segmentation des rhombomères caudaux du cerveau postérieur en développement.

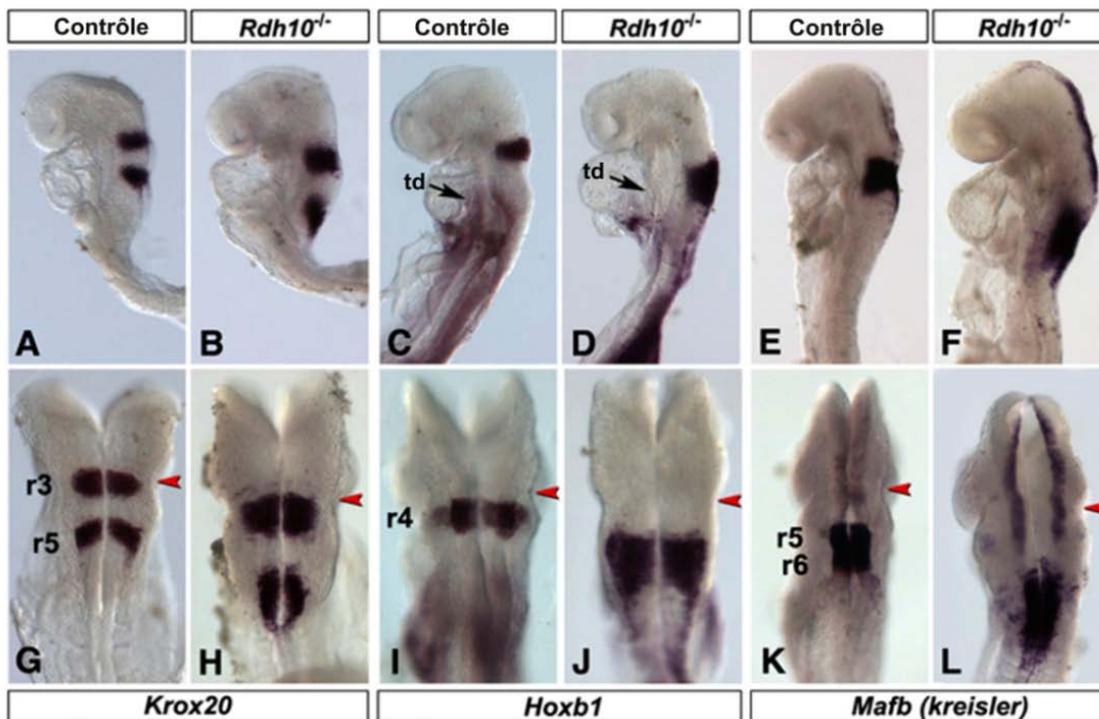


Figure 24. Fonction du gène *Rdh10* dans la segmentation du rhombencéphale

(A-L) Hybridation *in situ* de différents gènes marqueurs de rhombomères *Krox20* (r3 et r5, A-H), *Hoxb1* (r4, C-J) et *Mafb/kreisler* (r5-r6, E-L) dans les embryons contrôles (A, G, C, I, E, K) et mutants nuls *Rdh10*^{-/-} (B, H, D, J, F, L) au stade E8,5. Les flèches rouges en G-L montrent le sillon otique comme structure visuelle de référence. r, rhombomère ; td, tube digestif. (*adapté de Rhinn et al., 2011*)

c. Rôle des enzymes de dégradation dans le développement du cerveau postérieur

Il est suggéré qu'un gradient caudo (fort) – rostral (faible) serait à l'origine de la mise en place et du bon développement du rhombencéphale. En plus d'une simple diffusion d'AR provenant d'une source postérieure générée par RDH10 et RALDH2, d'autres mécanismes semblent être impliqués, assurant une réponse différentielle des tissus le long de l'axe rostro-caudal du cerveau postérieur.

De bons candidats de gènes pouvant créer cette réponse différentielle en limitant le spectre d'activité de l'AR dans la région rostrale du cerveau antérieur sont les gènes *Cyp26*. En effet, l'expression de ces gènes est différentielle au sein des rhombomères r2 à r6 (**Fig.25**). *Cyp26a1* est le premier gène à être exprimé dans l'épiblaste antérieur ainsi qu'au niveau des territoires présomptifs de la limite r3/r4, avant de se relocaliser au niveau de la limite r2/r3 (Hernandez et al., 2007; Sirbu et al., 2005a). Plus tard, *Cyp26a1* se restreint au r2 et *Cyp26c1* est exprimé dans les r2 et 4 (Uehara et al., 2007) (**Fig.25A**). Le gène *Cyp26b1* est exprimé dans les r3, r5 et r6 (Hernandez et al., 2007) (**Fig.25A**).

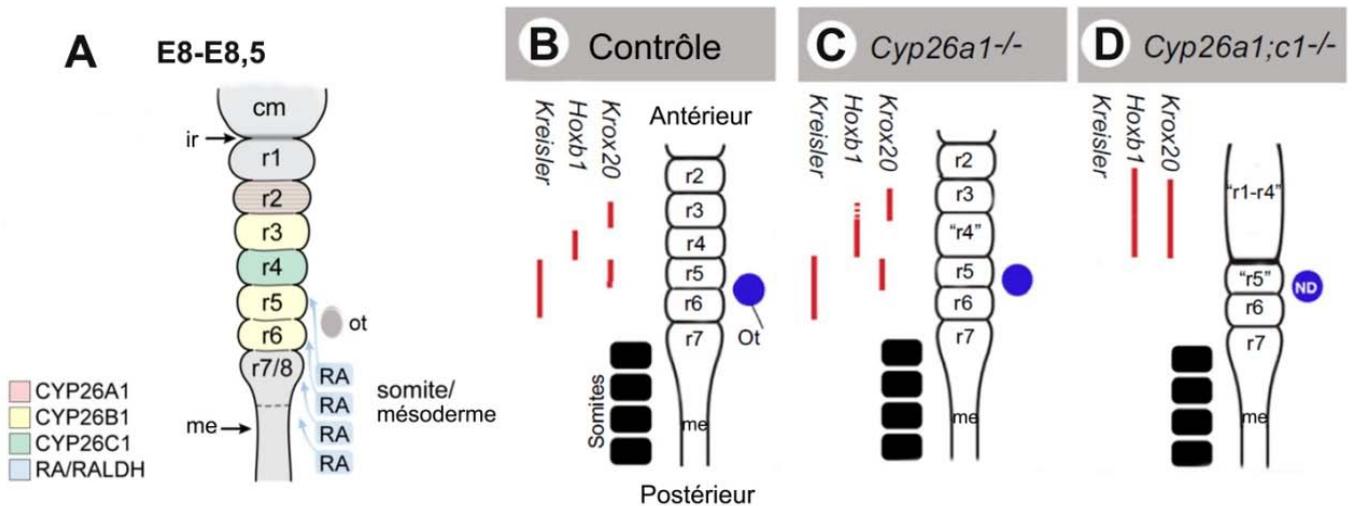


Figure 25. Rôle des gènes *Cyp26a1* et *Cyp26c1* dans la segmentation du rhombencéphale

(A-B) Représentation de la répartition des CYP26A1-C1, du signal AR et des gènes *Krox20*, *Hoxb1* et *Kreisler* lors de la segmentation du rhombencéphale en condition contrôle au stade E8-E8,5. (C-D) Représentation du phénotype mutant *Cyp26a1*^{-/-} (C) et du phénotype double mutant *Cyp26a1*^{-/-}/*c1*^{-/-} au cours de la segmentation du rhombencéphale. cm, cerveau moyen ; ir, isthme du rhombencéphale ; me, moelle épinière ; ot, otocystes ; r, rhombomère. (adapté de Clagett-Dame and Knutson, 2011; Rhinn and Dollé, 2012)

L'étude des mutations de ces gènes révèle l'importance de la famille des CYP26 dans le développement du cerveau postérieur. La mutation nulle du gène *Cyp26a1* conduit à une

augmentation du domaine du r4 et une transformation partielle du r3 en r4 (*Abu-Abed et al., 2001; Sakai et al., 2001*) (**Fig.25 B, C**). Le double mutant *Cyp26a1*^{-/-}; *Cyp26c1*^{-/-} présente un défaut de segmentation et une large expansion du domaine caudal du rhombencéphale par une postériorisation des régions présomptives des r1 à 4 (*Uehara et al., 2007 ; Maclean et al., 2009*) (**Fig.25B, D**).

De plus, les dynamiques d'expression des gènes *Cyp26a1* et *Cyp26c1* au cours de la formation des r2 et 4 ont été corrélées avec la régulation de l'expression des gènes *Hoxb1* (r4) et *Hnfl* (limite r4 /r5) (*Sirbu et al., 2005a*). L'ensemble de ces résultats montre que l'AR pourrait former un gradient de diffusion à partir d'une source provenant du mésoderme du rhombencéphale postérieur et disparaissant sous l'action des CYP26 dans le neuroectoderme antérieur. Une autre hypothèse serait que l'expression des CYP26 crée des limites dynamiques dans l'espace et le temps générant une régulation segmentée de l'expression de gènes cibles (*Sirbu et al., 2005a*). Une dernière hypothèse suggère au stade gastrula tardif, une progressive levée de l'inhibition de l'expression de *Cyp26a1* dans la région rostrale, par le signal FGF, qui entraînera le gradient AR jusqu'à ses cellules cibles (*White et al., 2007*).

d. Signalisation rétinolide dans le processus de l'allongement caudal de l'embryon

Au cours de l'allongement du corps de l'embryon, l'AR contrôle plusieurs processus tels que la segmentation du mésoderme, mais aussi la différenciation, la neurogenèse et la régionalisation de la moelle épinière. L'apport progressif de cellules contribuant à l'extension du tronc est généré par une population de cellules souches adjacentes à la ligne primitive en régression. Le maintien de cette population est possible par son exposition au signal FGF (majoritairement FGF8 exprimé en un gradient caudo-rostral) (*Diez del Corral et al., 2003*) et par sa protection du signal AR médiée par la présence de *Cyp26A1* (*Sakai et al., 2001; Emoto et al., 2005*). En effet, le signal FGF protège les cellules souches caudales d'une différenciation précoce en inhibant la synthèse d'AR, alors que de l'AR produit dans la région présomitique atténue le signal FGF et conduit à la différenciation de cette population de cellules souches. Le moment de la production d'AR est crucial pour la préservation des cellules souches de la zone de prolifération et pour la continuité de l'extension de l'axe du corps de l'embryon (*Olivera-Martinez and Storey, 2007*).

Parallèlement à cela, de l'AR est produit par RALDH2 dès la somitogenèse précoce au sein des somites nouvellement formés et dans la partie rostrale du mésoderme pré-somitique (*Vermot et al., 2005a*). Il est connu que le mésoderme somitique est la source de signaux nécessaire à la différenciation neuronale, et plus spécifiquement à la transcription de gènes

impliqués dans la détermination des cellules de la moelle épinière ventrale (*Diez del Corral et al., 2002*). Il est suggéré que le gène *Wnt8*, dont l'expression dans le neuroépithélium caudal est dépendante du signal FGF, servirait de relais pour provoquer la synthèse d'AR dans le mésoderme pré-somitique voisin, constituant un mécanisme de régulation de la différenciation induite par le basculement d'une exposition au signal FGF vers un signal AR (*Olivera-Martinez and Storey, 2007*). Les mutants murins carencés en vitamine A présentent une antériorisation du signal FGF8 et développent des somites anormalement petits. Le signal FGF est un facteur déterminant "une vague de front" qui régule la localisation des limites entre les somites et contrôle ainsi leur taille (*pour revue : Dubrulle and Pourquié, 2004*).

L'AR contrôle également la symétrie bilatérale de la somitogenèse. Le blocage de la synthèse d'AR une fois que le processus de segmentation de somites a débuté, entraîne une somitogenèse non coordonnée le long de l'axe gauche-droite de l'embryon (*Vermot et al., 2005a*). Il est suggéré qu'il se produit une désynchronisation des vagues d'expression cycliques de plusieurs gènes des voies de signalisation Notch et Wnt, qui contrôlent la variable "temps" dans le processus de segmentation (*pour revue : Dequéant and Pourquié, 2008*). De plus, la perturbation du gradient FGF8 causée par la carence en vitamine A pourrait contribuer à l'asymétrie observée dans la formation des somites, car FGF8 agit dans le processus de détermination de l'axe gauche-droite (*Meyers and Martin, 1999*).

e. Signalisation rétinoides dans la moelle épinière

Au stade neurula, l'embryon commence à s'allonger et la moelle épinière se forme progressivement le long de l'axe antéro-postérieur. Au même moment, les premiers somites apparaissent de part et d'autre de la moelle épinière. L'AR produit par les somites et le mésoderme présomitique antérieur par l'enzyme RALDH2 diffuse dans la moelle épinière et régule plusieurs processus de son développement (*Diez del Corral and Storey, 2004*). Une étude a montré que l'AR active le gène *Cdx1* dans le neuroectoderme caudal, gène qui réprime le développement du cerveau postérieur et qui stimule celui de la moelle épinière (*Skromne et al., 2007*). De plus, l'AR induit l'expression du gène *Neurogénine 2 (Neurog2)* important dans l'initiation de la neurogenèse et la régionalisation dorso-ventrale de la moelle épinière (*Ribes et al., 2008*). La mutation nulle du gène *Raldh2* entraîne la perte de l'expression du marqueur de progéniteur neuraxial *Sox2* dans la plaque neurale caudale et une absence de différenciation des motoneurones dans la moelle épinière (*Ribes et al., 2009*). Une autre étude montre que l'AR joue un rôle dans la différenciation des motoneurones de la moelle épinière par

l'induction de l'expression des gènes *Pax6* et *Olig2* (Diez del Corral et al., 2003; Molotkova et al., 2005).

Au cours de son développement, la moelle épinière se régionalise le long de l'axe antéro-postérieur en différents domaines : la région cervicale, thoracique, lombaire et sacrée. Chaque région est caractérisée par la présence de "colonnes longitudinales" contenant différents types neuronaux (Maden, 2006a). Par exemple, les motoneurons qui innervent les muscles du tronc sont localisés dans les colonnes motrices médianes (CMMs) alors que les motoneurons qui innervent les muscles des membres sont localisés dans les colonnes motrices latérales (CMLs), restreintes aux régions cervicales et lombaires de la moelle épinière. Il a été montré que l'AR est important pour la spécification des neurones des CMLs. En effet, la mutation conditionnelle du gène *Raldh2*, qui inactive le gène spécifiquement dans la moelle épinière et le mésoderme du tronc, entraîne la perte des motoneurons positifs exprimant *Lim1* dans la région cervicale de la moelle épinière, une migration altérée des neurones *Islet1* positifs et une projection axonale inappropriée vers les muscles (Vermot et al., 2005b). Ces anomalies entraînent chez l'adulte un défaut neuromusculaire des membres antérieurs (Vermot et al., 2005b). Au niveau moléculaire, le mutant conditionnel présente une dérégulation de l'expression du gène *Hoxc8* qui contrôle l'expression du gène *Rarb* (Vermot et al., 2005b). L'ensemble de ces observations met en évidence un rôle de l'AR dans la spécification neuronale de la région cervicale de la moelle épinière, et le développement du membre antérieur.

Il a également été montré un rôle de l'AR dans la différenciation des interneurons. Au sein de la moelle épinière, les populations neuronales situées dans la région la plus ventrale sont appelées interneurons V3 (V pour corne ventrale) suivis par les interneurons V2 à V0 (pour revue : Lara-Ramírez et al., 2013). Une étude *in vitro* réalisée chez le poulet montre que le signal rétinoloïque induit la spécification des interneurons de types V0 et V1 (Pierani et al., 1999). La carence en vitamine A chez l'embryon de caille entraîne la perte des interneurons V1, et un remplacement des progéniteurs des interneurons V1 et V0 par d'autres progéniteurs plus ventraux (Wilson et al., 2004). Ces observations mettent en évidence le rôle de l'AR dans le maintien des populations progénitrices et la spécification des interneurons de la corne ventrale de la moelle épinière en développement.

1.3.2. Développement du cerveau antérieur

Les cellules à la jonction rostrale entre le neuroectoderme et l'ectoderme non neural, définissant la "bordure neurale antérieure" (BNA, pour le terme ANR, anterior neural ridge),

ont un rôle important dans le développement du télencéphale. Des études réalisées chez la souris et le poisson zèbre montrent que l'ablation de la BNA entraîne la perte de l'expression des marqueurs télencéphaliques *Bfl* et *Emx1* (Shimamura and Rubenstein, 1997 ; Houart et al., 1998). Chez le poisson zèbre, la transplantation ectopique des cellules de la BNA dans la région du cerveau moyen induit l'expression de gènes marqueurs du télencéphale et supprime celle des marqueurs du cerveau moyen (Houart et al., 1998). D'autres études faites sur le même modèle ont mis en évidence le rôle de la voie de signalisation Wnt dans la subdivision du cerveau antérieur en télencéphale, diencéphale et vésicules optiques, et son rôle dans la spécification du télencéphale (Heisenberg et al., 2001). De plus, il a été montré que l'activité de la BNA est médiée par le gène *Tlc* codant un antagoniste extracellulaire de la voie Wnt (Houart et al., 2002). L'ensemble de ces résultats suggère que, de manière similaire à l'induction des tissus neuraux antérieurs, la détermination de l'identité télencéphalique requiert l'inhibition de signaux postériorisants incluant la voie de signalisation Wnt.

a. Signalisation rétinoidale dans le cerveau antérieur

La première étude qui montre l'importance de l'AR dans la croissance du cerveau antérieur a été réalisée chez le poulet, dans lequel l'inhibition locale de la signalisation rétinoidale entraîne une hypoplasie du cerveau antérieur ainsi que des défauts de développement des autres dérivés de la région fronto-nasale (yeux fusionnés, absence de certaines structures fronto-nasales) (Schneider et al., 2001). Une autre étude réalisée sur des embryons de caille en carence en vitamine A suggère un rôle de l'AR dans la survie du mésenchyme des structures fronto-nasales et du neuroectoderme du cerveau antérieur (Halilagic et al., 2003). La perte d'AR affecte à la fois la distribution des marqueurs de l'axe antéro-postérieur et de l'axe dorso-ventral. En effet, les cailles en carence en vitamine A présentent une expression décalée vers le pôle postérieur de plusieurs déterminants du télencéphale antérieur, comme *Emx1* et *Emx2*. Ceci suggère que l'AR est requis dans la restriction d'une identité antérieure du cerveau antérieur (Halilagic et al., 2003). De plus, la carence en vitamine A conduit à un épaissement de l'épithélium neural dorsal du cerveau antérieur, en lien avec l'expansion des marqueurs dorsaux (dont le gène *Wnt1*), alors que les déterminants ventraux, comme *Nkx2-1*, ont une expression réduite. L'ensemble de ces résultats montre que les phénotypes engendrés par l'absence de vitamine A résultent d'une altération dans la signalisation antérieure de FGF8 et dans la signalisation ventrale de SHH (Halilagic et al., 2003) (**Fig.26**).

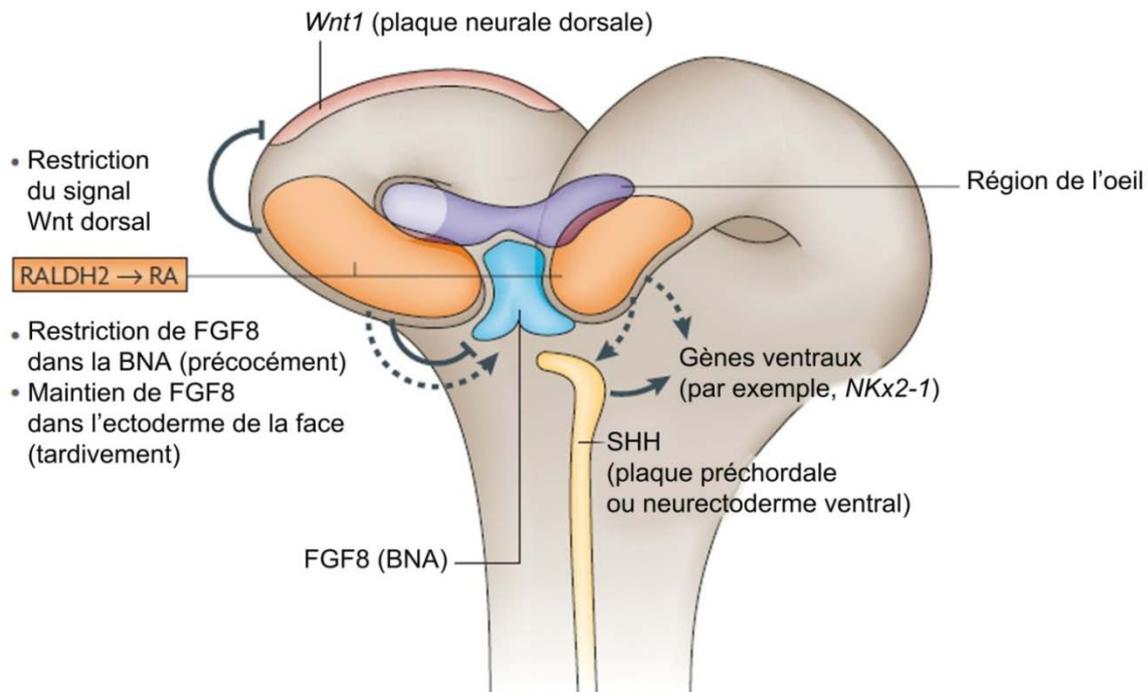


Figure 26. Rôle de l'AR dans le développement des processus de la tête

Au stade plaque neurale, le gène *Raldh2* est transitoirement exprimé dans la région rostrale de l'épithélium neural du cerveau antérieur et dans l'ectoderme de surface. L'enzyme RALDH2 y produit de l'AR qui sera requis dans le développement des vésicules télencéphaliques, diencéphaliques et optiques, par une interaction complexe avec les voies de signalisation FGF, Wnt, SHH et la bordure neurale antérieure (BNA). (*adapté de Niederreither and Dollé, 2008*)

b. Fonction précoce du gène Raldh2 dans le cerveau antérieur

À des stades somitiques précoces chez la souris (E8-E8,5), *Raldh2* est exprimé de manière spécifique dans la région la plus rostrale du neuroectoderme du cerveau antérieur, avec un signal fort dans les territoires présomptifs des vésicules optiques et du télencéphale et un signal faible dans l'ectoderme de surface (cf. Partie I, §3.2.2). À E9, l'expression de *Raldh2* diminue considérablement dans l'épithélium neural du cerveau antérieur, mais reste forte dans l'ectoderme de surface (cf. Partie I, §3.2.2). De plus, l'activité de l'AR (transgène rapporteur RARE-*hsp68-lacZ*) est détectée dans les régions de la vésicule optique et du télencéphale en développement (vers E8-E8,5), puis dans le mésenchyme antérieur de la tête et dans l'ectoderme de surface (de E8,5 à E9) (*Ribes et al., 2006*) (cf. Partie I §3.1 et **Fig.12 M-O'**).

La mutation nulle du gène *Raldh2* entraîne un sévère défaut de développement de la région céphalique résultant en une troncation des structures fronto-nasales (cf. Partie I §3.2.2) (*Niederreither et al., 1999*). Une étude détaillée du phénotype au niveau du cerveau antérieur a été réalisée par l'équipe du Dr. Dollé. De E8 à E9, les mutants *Raldh2*^{-/-} présentent un désordre localisé de l'organisation cellulaire du neuroépithélium et un excès de cellules du mésenchyme adjacent (*Ribes et al., 2006*) (**Fig.27A, B**). À E9,5, le télencéphale et le

diencephale naissent de la division du prosencéphale. Les embryons mutants ne présentent qu'une unique vésicule hypoplasique et sans délimitation des territoires télencéphalique et diencephalique (**Fig.27C, D**). Une hypoplasie générale avec une réduction de l'épaisseur du neuroépithélium de l'ensemble des structures du cerveau antérieur (télencéphale, vésicules optiques, diencephale, hypothalamus) est observée alors que ce n'est pas le cas par exemple pour le neuroépithélium du mésencéphale (**Fig.27C, D**).

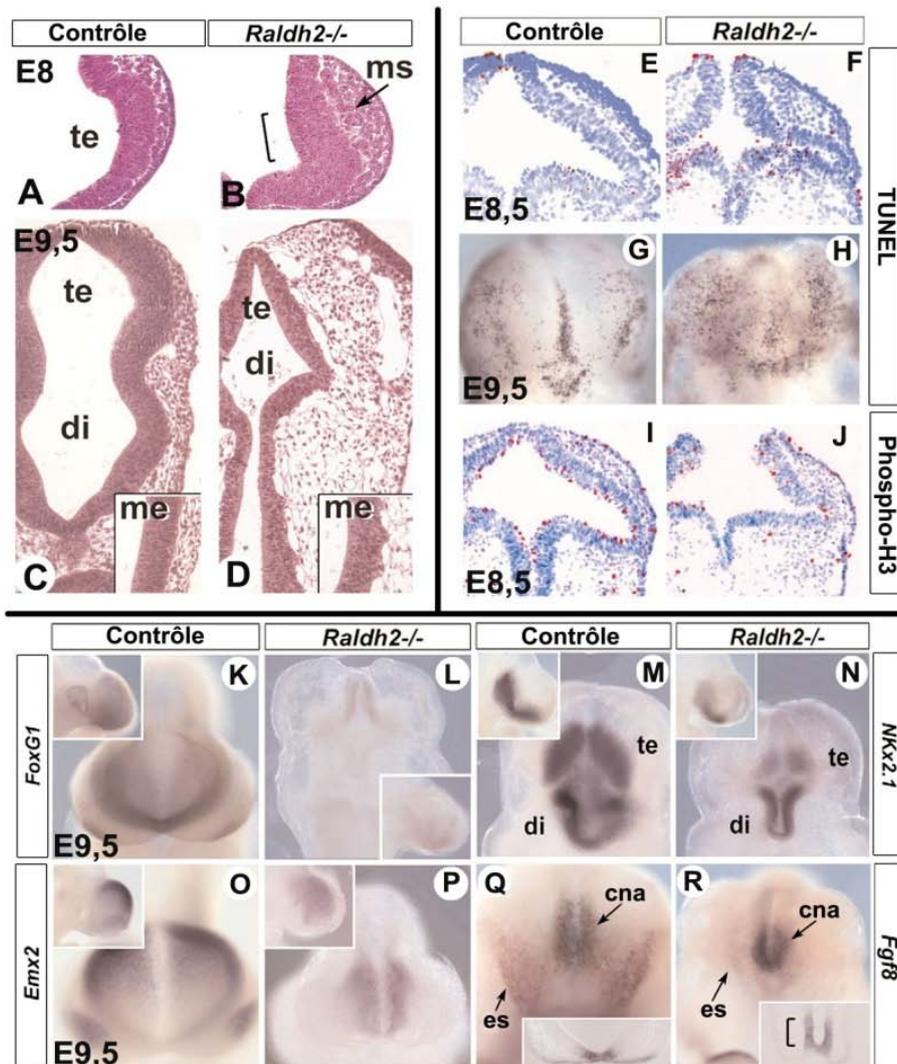


Figure 27. Fonction du gène *Raldh2* dans le développement du cerveau antérieur

(A-D) coupes transversales colorées en hématoxyline/éosine aux niveaux de la vésicule télencéphalique (A, B) et des vésicules télencéphaliques, diencephaliques et optiques (C, D) d'embryons contrôles (A, C) et mutants nuls *Raldh2*^{-/-} (B, D) aux stades E8 (A, B) et E9,5 (C, D). En B, le crochet indique la désorganisation localisée de l'épithélium neural. En C et D, les agrandissements montrent l'épithélium neural mésencéphalique. (E-F) Immunodétection des cellules apoptotiques par TUNEL sur coupes de la région du

télencéphale d'embryon contrôle (E) et mutant (F) au stade E8,5. (G-H) Immunodétection des cellules apoptotiques par TUNEL sur embryons entiers contrôle (G) et mutant (H) au stade E9,5. Vue frontale de la tête. (I-J) Immunodétection de la phosphohistone H3 sur coupes transversales de la région du télencéphale au stade E8,5. (K-R) Hybridation *in situ* pour les gènes *Foxg1* (K, L), *Nkx2.1* (M, N), *Emx2* (O, P) et *Fgf8* (Q, R) sur embryons entiers contrôles (K, M, O, Q) et mutants (L, N, P, R) au stade E9,5. En K-P, les inserts montrent des vues de profil de l'embryon correspondant. En Q et R, des inserts montrent des coupes transversales des mêmes embryons. Le crochet en R indique l'étendue du signal *Fgf8*. cna, crête neurale antérieure ; di, diencephale ; es, ectoderme de surface ; me, mésencéphale ; ms, mésenchyme ; te, télencéphale. (adapté de Ribes et al., 2006)

De plus, une mort cellulaire anormale est détectée vers E8,5 dans les vésicules optiques et la partie ventrale du diencephale, et s'étend ensuite jusqu'à la région intermédiaire du télencéphale (**Fig.27E, F**). À E9,5, une apoptose excessive est observée dans la région rostrale de l'ectoderme de surface, contrastant avec l'apoptose restreinte le long de la ligne médiane ventrale chez l'embryon témoin (*Ribes et al., 2006*) (**Fig.27G, H**). Dans les mutants *Raldh2*^{-/-}, la prolifération cellulaire est diminuée à E8,5 au sein du neuroépithélium ventral du cerveau antérieur, avant d'être réduite à E9,5 dans l'ensemble du cerveau antérieur (excepté dans sa région la plus dorsale) (*Ribes et al., 2006*) (**Fig.27I, J**).

Les mutants *Raldh2*^{-/-} présentent également un défaut dans la migration des cellules des crêtes neurales et dans la régionalisation des régions dorsales et ventrales du cerveau antérieur. L'expression de *Foxg1* (*Bf1*), gène codant pour un facteur de transcription requis pour la régionalisation et la croissance des vésicules télencéphaliques, est considérablement réduite à E9,5 au sein du télencéphale intermédiaire. Au même moment, l'expression du gène *Emx2* est homogène dans les embryons mutants, alors qu'elle devrait être régionalisée dans la partie dorsale du cerveau antérieur (**Fig.27K, L, O, P**). Enfin, l'étendue et l'intensité de l'expression du gène *Nkx2.1* dans les régions ventrales du télencéphale et du diencephale est diminuée à E9,5 (*Ribes et al., 2006*) (**Fig.27M, N**).

Les mutants *Raldh2*^{-/-} présentent une expression réduite de gènes clés de la voie Notch, *Delta1* et *Hes5*, impliqués dans l'initiation du processus de différenciation neuronale (*Ribes et al., 2006*). La voie de signalisation FGF est également perturbée ; à E9,5, l'expression de *Fgf8* est réduite dans la crête neurale antérieure et fortement diminuée dans l'ectoderme de surface des embryons mutants (*Ribes et al., 2006*) (**Fig.27Q, R**). La voie de signalisation SHH est importante pour la détermination de la région ventrale des structures du cerveau antérieur. A 9,5, l'expression de *Shh* est perturbée dans le diencephale avec une expression anormalement maintenue dans sa région ventrale, et diminuée dans sa région rostrale. L'expression de gènes cibles de SHH (*Ptch1*, *Gli1*, *Gli3*) est considérablement réduite, voire absente dans le neuroépithélium du diencephale, et absente dans le mésenchyme adjacent. L'expression de *Olig2*, qui est régulée par le signal SHH, est également réduite dans la région ventrale du diencephale (*Ribes et al., 2006*).

L'ensemble de ces résultats révèle des fonctions précoces du gène *Raldh2*, et suggère que l'AR a un rôle essentiel dans le développement du cerveau antérieur et dans l'établissement des structures qui en dérivent telles que le télencéphale, le diencephale et les vésicules optiques.

2. Développement du cortex cérébral

2.1. Origine et composition du cortex cérébral

À partir de E9, chacune des cinq vésicules formées par la subdivision du tube neural vont subir une réorganisation importante, être soumises à divers signaux et réaliser une organogenèse pour donner naissance à différentes structures du système nerveux central (Fig.20B).

2.1.1. Régionalisation dorso-ventrale du télencéphale

Sous l'action de mouvements morphogénétiques complexes et d'un processus intensif de prolifération, le télencéphale est transformé à partir du stade E9, en deux vésicules télencéphaliques qui se régionalisent par la localisation de différents marqueurs dorso-ventraux. Ces marqueurs préparent la subdivision du télencéphale en trois grandes régions qui n'apparaîtront qu'à E11 : la région dorsale (région d'où dérivera le cortex cérébral), la région latérale (d'où dériveront les éminences ganglionnaires latérales (EGL)) et la région ventrale (d'où dériveront les éminences ganglionnaires médianes (EGM)) (pour revue : Rallu et al., 2002a) (Fig.28A).

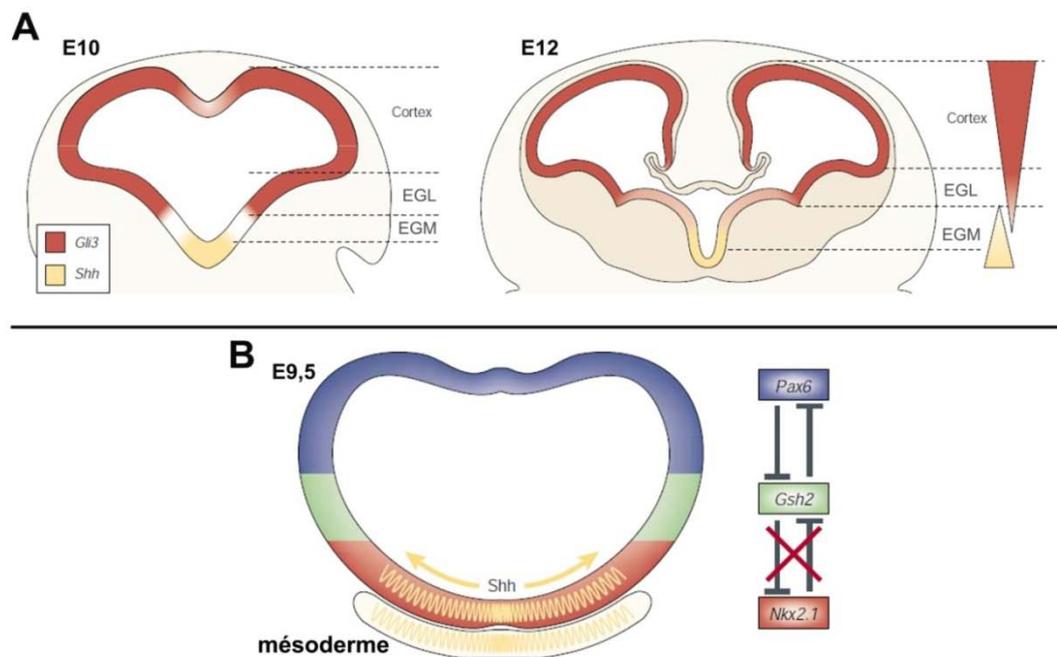


Figure 28. Régionalisation du télencéphale

(A) Représentation des gradients des signaux SHH ventral et *Gli3* dorsal aux stades E10 et E12 dans le télencéphale. (B) Représentation de la répartition de l'expression des gènes *Pax6* dorsal, *Gsh2* médian et *Nkx2.1* ventral, au stade E9,5 dans le télencéphale. (adapté de Rallu et al., 2002b)

La voie de signalisation SHH joue un rôle important dans la régionalisation ventrale du télencéphale. Des études *in vitro* ont montré que le caractère le plus ventral du télencéphale (correspondant à l'EGM) est acquis suite à l'action du signal SHH. L'étude suggère que contrairement à ce qu'il se produit dans la moelle épinière, la détermination du caractère ventral dans le télencéphale est fonction du moment où a lieu l'exposition plutôt que de l'intensité du signal reçu (Kohtz *et al.*, 1998). L'activité du signal SHH se réalise sous la forme d'un gradient juste avant que ne commence la neurogenèse, dans la partie ventrale du télencéphale (Shimamura *et al.*, 1995) (**Fig.28A**). Le gène cible de la voie SHH, *Gli3* qui agit majoritairement comme répresseur, est exprimé également sous la forme d'un gradient, inverse à celui de SHH, dans la région dorso-latérale du télencéphale (*pour revue : Matisse and Joyner, 1999*) (**Fig.28A**). Les mutants *Gli3*^{-/-} présentent une expansion dorsale de l'expression de gènes codant des marqueurs ventraux, la mutation *Shh* induit le phénotype opposé, et la double mutation *Gli3*^{-/-}; *Shh*^{-/-} induit une absence de régionalisation du télencéphale (Rallu *et al.*, 2002a). Ces résultats suggèrent que la balance entre les fonctions des gènes *Shh* et *Gli3* est cruciale dans l'établissement de l'axe dorso-ventral et la régionalisation du télencéphale.

Il est suggéré que d'autres voies de signalisation participent à la régionalisation de l'axe dorso-ventral telles que les voies BMP, Wnt et FGF. En réponse aux signaux de la voie SHH ainsi qu'à ceux des autres voies, la cellule exprimera des facteurs de transcription spécifiques. Certains de ces facteurs ont une implication démontrée dans la régionalisation du télencéphale : le gène *Pax6* codant pour un marqueur de la région dorsale, *Gsh2* pour un marqueur de la région intermédiaire et *Nkx2.1* pour un marqueur de la région ventrale du télencéphale (*pour revue : Schuurmans and Guillemot, 2002*) (**Fig.28B**).

2.1.2. Structures dérivées du télencéphale

a. Origine embryonnaire du cortex cérébral

On distingue dans le télencéphale une région dorsale, le pallium, et une région ventrale, le sub-pallium (**Fig.29**). Le pallium donne naissance à la majorité des structures corticales : la région médiane du pallium devient l'hippocampe (archicortex), la partie dorsale donne naissance au cortex cérébral (néocortex) et la partie latérale donne le cortex limbique (paléocortex) (*pour revue : Molyneaux et al., 2007*) (**Fig.30A**).

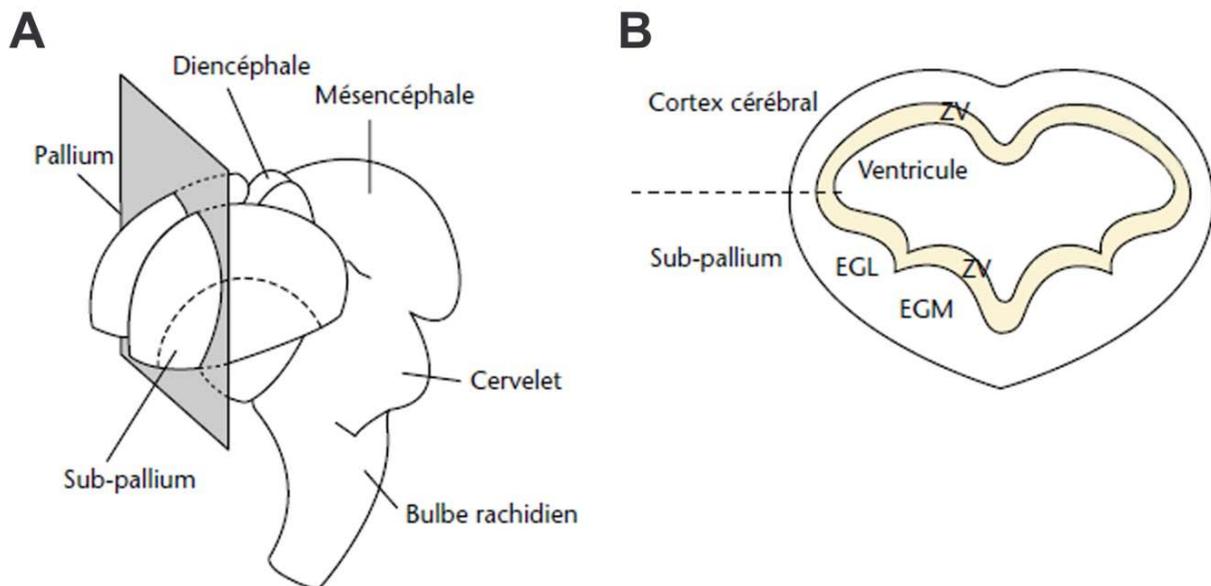


Figure 29. Origine embryonnaire du cortex

(A-B) Subdivision du télencéphale en pallium (A), région dorsale qui donne naissance au cortex cérébral (B), et en sub-pallium (A), région ventrale qui est à l'origine des éminences ganglionnaires latérale (EGL) et médiane (EGM) (B). (B) Coupe coronale selon le plan indiqué en A. ZV : zone ventriculaire comprenant les progéniteurs mitotiques (*adapté de Narboux-Nême, 2008*)

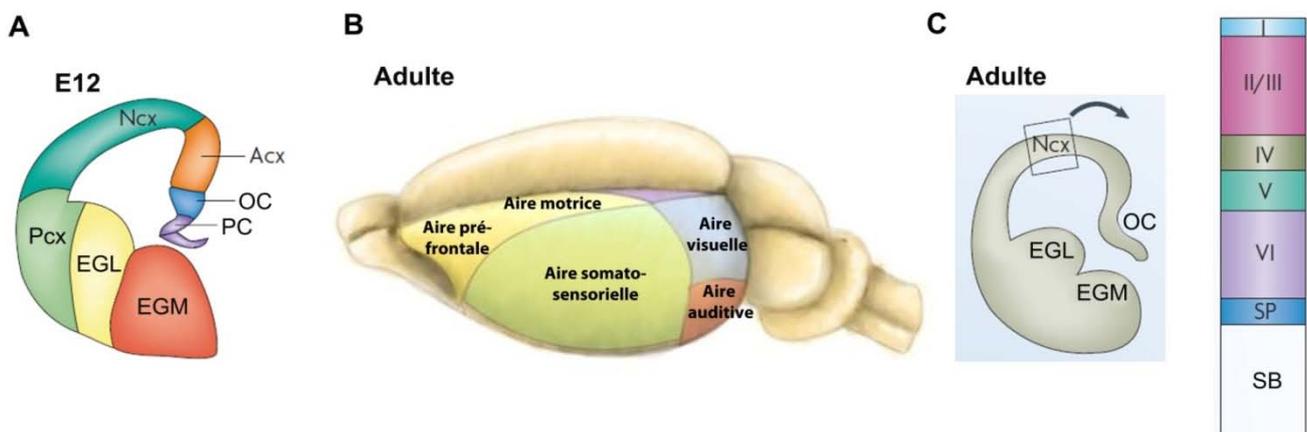


Figure 30. Organisation du pallium et du néocortex

(A) Le pallium se divise en trois grandes régions : une région dorsale dont dérive le néocortex (Ncx), une région latérale qui donne naissance au paléocortex (Pcx) et une région médiane qui devient l'archicortex (Acx). (B) Représentation schématique de la régionalisation de l'encéphale chez la souris adulte. En jaune, le lobe frontal qui contient l'aire pré-frontale et l'aire motrice ; en vert le lobe pariétal contenant l'aire somatosensorielle, en rouge le lobe temporal qui contient l'aire auditive et en bleu le lobe occipital contenant l'aire visuelle. (C) Au stade adulte, le néocortex est divisé en plusieurs régions, la substance blanche (SB) étant la plus proche du ventricule et située en dessous de ce qui reste de la sous-plaque (SP), elle-même en dessous de la plaque corticale constituée de 6 couches neuronales différentes (VI-I). EGL, éminence ganglionnaire latérale ; EGM, éminence ganglionnaire médiane ; OC, ourlet cortical ; PC, plexus choroïde. (*adapté de Molyneaux et al., 2007; schéma B réalisé par le Dr. Hugues Jacobs*)

Le cortex cérébral est la structure qui occupe le plus de place dans le pallium. Il est caractérisé par une structure en six couches, alors que l'archicortex et le paléocortex n'en contiennent que trois à quatre. Les neurones des structures corticales du pallium sont majoritairement glutamatergiques.

Le sub-pallium comporte deux épaississements de la paroi du tube neural qui sont les éminences ganglionnaires latérales et médianes. Ces structures génèrent des neurones de type GABAergiques : les EGL produisent les neurones du striatum et du pallidum, alors que les EGM génèrent les interneurons du cortex cérébral, du cortex limbique et de l'hippocampe.

b. Régionalisation du cortex cérébral

Le cortex cérébral est une structure complexe hautement fonctionnelle. Chez les vertébrés, la surface des hémisphères cérébraux est régionalisée en quatre lobes externes qui sont de l'avant vers l'arrière, le lobe frontal, le lobe temporal, le lobe pariétal et le lobe occipital (**Fig.30B**). Il existe également deux lobes internes qui sont le lobe limbique et le lobe central ou insula. La cartographie fonctionnelle du cortex cérébral associe aux différents lobes, une ou plusieurs fonctions corticales définissant les aires corticales. Ainsi, le lobe frontal contient l'aire motrice et l'aire préfrontale (**Fig.30B**), le lobe pariétal contient l'aire somatosensorielle (**Fig.30B**), le lobe temporal contient l'aire auditive (**Fig.30B**) et le lobe occipital contient l'aire visuelle (**Fig.30B**). La régionalisation du cortex est conservée entre les espèces, avec cependant une variation dans le développement de certaines aires par rapport à d'autres spécifique à chaque espèce. Le lobe préfrontal est celui qui a subi le plus fort développement chez l'Homme par rapport aux autres espèces, alors que la souris présente, par exemple, une aire somatosensorielle particulièrement développée (**Fig.30B**).

2.1.3. Composition neuronale du cortex cérébral

Le cortex cérébral des mammifères est un organe complexe, hautement structuré et organisé en six couches (**Fig.30C**) qui contiennent des centaines de types de populations neuronales différentes et une grande variété de cellules de la glie. Il est constitué de deux populations neuronales principales : les neurones de projection, qui représentent 80% des neurones corticaux, et les interneurons, qui représentent 20% des neurones du néocortex (*pour revue : Kwan et al., 2012*).

Les neurones de projection sont des neurones excitateurs glutamatergiques caractérisés par une morphologie pyramidale. Ils transmettent des informations dans le néocortex et vers

d'autres régions de l'encéphale. En effet, ils étendent leur axone pour atteindre une cible dans le cortex (projection intracorticale), dans une région en dessous du cortex (projection sous-corticale) ou plus loin dans l'encéphale (projection sous-cérébrale). Ils sont générés par des populations de progéniteurs localisées dans les zones prolifératives du néocortex (*Anderson et al., 2002*). Les interneurons sont, quant à eux, des neurones inhibiteurs GABAergiques. Ils réalisent majoritairement des connexions locales. Ils sont générés par d'autres populations progénitrices localisées dans la région ventrale du télencéphale. Contrairement aux neurones pyramidaux, les interneurons doivent migrer sur de longues distances pour atteindre leur position finale dans le néocortex (*pour revue : Wonders and Anderson, 2006*).

a. Organisation hodologique des couches corticales

Dans le cortex mature, les populations neuronales sont localisées dans des couches corticales distinctes, ont des morphologies différentes, des fonctions diverses et expriment des facteurs de transcription qui leur sont propres. Une manière de rendre compte de la diversité des populations neuronales corticales est de réaliser une classification par l'hodologie, c'est-à-dire par l'étude des connexions neuronales. Cette classification permet de distinguer des neurones corticaux associatifs, commissuraux et corticofuges. Par exemple, les neurones corticaux commissuraux sont des neurones pyramidaux de projection callosale localisés dans les couches II/III, V et VI, et qui étendent leur axone à travers le corps calleux. Ils réalisent soit une projection simple vers le cortex controlatéral, soit des projections doubles vers la région corticale controlatérale et vers le striatum controlatéral/ipsilatéral, ou encore des projections doubles vers le cortex controlatéral et une région différente du cortex frontal ipsilatéral (**Fig.31A**). Les neurones corticofuges réalisent, quant à eux, des connexions vers d'autres régions de l'encéphale, telles que : le thalamus pour les neurones corticothalamiques (**Fig.31B**), le colliculus supérieur et/ou le pont pour les neurones cortico-mésencéphaliques et cortico-pontiques (**Fig.31C**), ou encore le striatum, le pont et la moelle épinière pour les neurones corticospinaux (**Fig.31C**).

b. Organisation histologique des couches corticales

Une autre classification possible de ces diverses populations neuronales se base sur l'étude de leur aspect histologique. Les six couches sont généralement partagées en couches supragranulaire (I, II/III), granulaire (IV) et infra-granulaire (V, VI) :

- la couche I, dérivée de la zone marginale et située directement sous la pie-mère, est dite agranulaire, ou moléculaire. Cette couche est pauvre en neurones, contient des projections parallèles à la surface corticale, et se constitue majoritairement de cellules gliales.

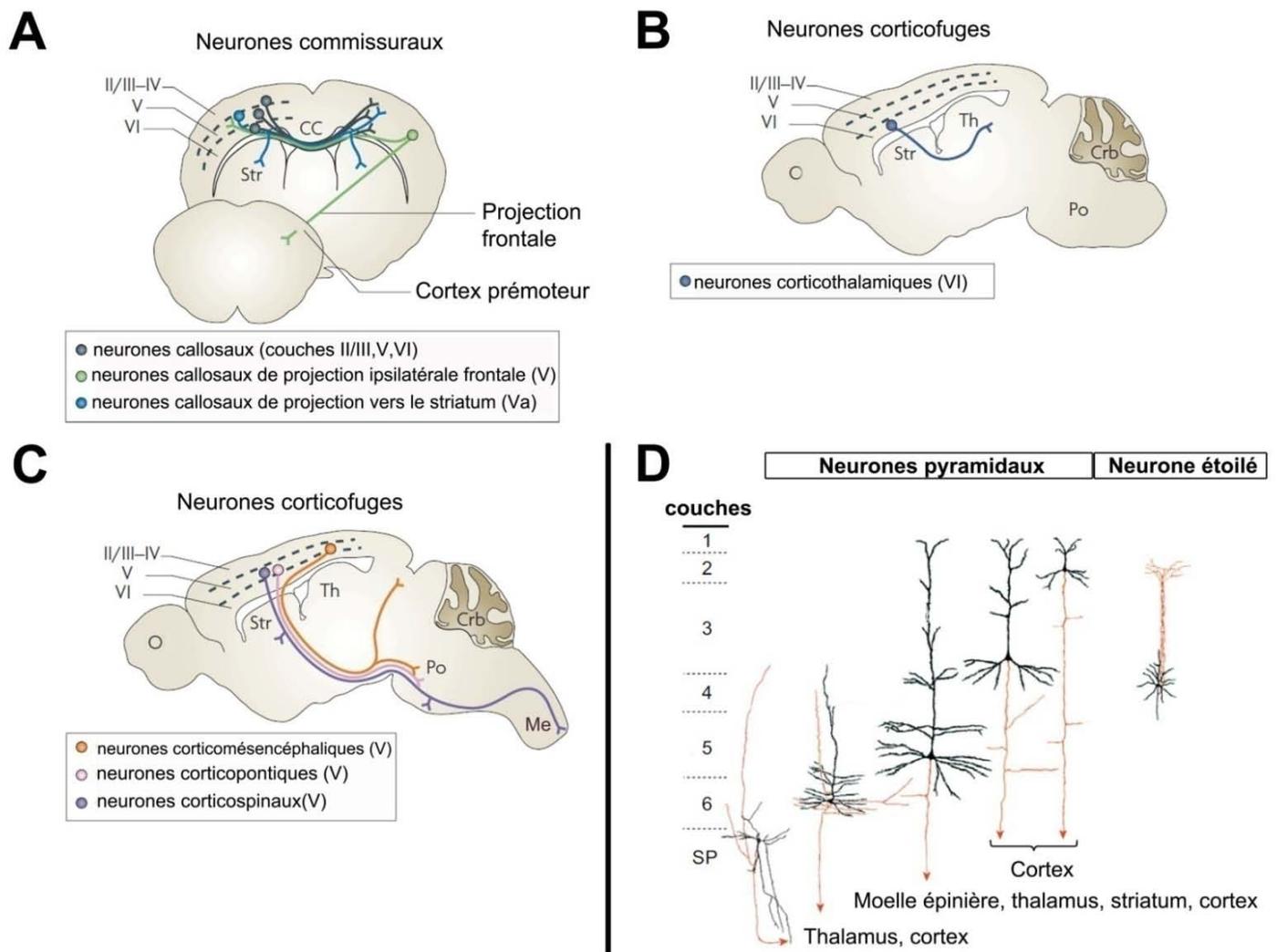


Figure 31. Composition neuronale du cortex cérébral

(A-C) Classification hodologique des neurones néocorticaux selon leur type de projections : neurones commissuraux de projection callosale (A), neurones corticofuges de projection corticothalamique (B), corticomésencéphalique (C), corticopontique (C) et corticospinale (C). (D) Classification histologique des neurones pyramidaux ou étoilés répartis dans les différentes couches du néocortex. CC, corps calleux ; Crb, cervelet ; Me, moelle épinière ; O, bulbe olfactif ; Po, pont ; Str, striatum ; Th, thalamus (*adapté de Molyneaux et al., 2007; Kwan et al., 2012*)

- la couche II/III ou couche granulaire et pyramidale externe, contient de petits neurones non pyramidaux et des neurones pyramidaux associatifs et commissuraux (**Fig.31D**).

- la couche IV ou couche granulaire interne est composée de neurones non pyramidaux mais glutamatergiques à arborisation dendritique dense appelés neurones "étoilés" (**Fig.31D**). La couche IV reçoit également des projections thalamocorticales. Le rôle de cette couche est de transmettre l'information sensorielle qui revient des organes sensoriels, aux neurones corticaux avoisinants ainsi qu'à ceux des couches II/III (**Fig.31D**).

- la couche V ou couche pyramidale interne est caractérisée par une importante population de neurones pyramidaux corticothalamiques, corticomésencéphaliques, corticospinaux et quelques neurones à projections callosales. Elle contient aussi des neurones dont les dendrites apicaux se projettent vers les couches I et IV (**Fig.31D**).
- la couche VI ou couche multiforme est caractérisée par une importante population de neurones corticothalamiques. Mais elle contient aussi des neurones associatifs et commissuraux (**Fig.31D**).

2.2. Processus et étapes clés du développement cortical

Le développement du néocortex est un procédé qui requiert une exécution finement orchestrée de plusieurs processus clés, tels que la prolifération cellulaire, la division cellulaire, la migration cellulaire et la spécification cellulaire. Le développement cortical progresse à travers trois phases : une phase précoce d'expansion, une phase de neurogenèse et une phase finale de gliogenèse.

2.2.1. Expansion et différenciation de l'épithélium neural

Aux stades E8,5-E10,5, le tube neural est composé d'une monocouche de cellules neuroépithéliales (NE) qui forment le neuroépithélium. Il est dit pseudostratifié car les noyaux des cellules NEs réalisent une migration nucléaire interkinétique (MNI) apico-basale au cours de la mitose : un mouvement nucléaire apico-basal pendant la phase G1 du cycle cellulaire, et baso-apical pendant la phase G2 (*pour revue : Farkas and Huttner, 2008*). Les cellules NEs se localisent au bord de la lumière du ventricule, dans la zone ventriculaire (ZV), et sont polarisées le long de leur axe apico-basal (**Fig.32A**) (*pour revue : Götz and Huttner, 2005*). De plus, ce sont des cellules progénitrices qui se divisent de manière symétrique (**Fig.33A**) et réalisent un processus de prolifération intensif contribuant à l'expansion latérale du tube neural : c'est la première phase du développement neural cortical (**Fig.32A**).

À partir de E10, les cellules NEs perdent progressivement certaines de leurs propriétés épithéliales, notamment leurs jonctions serrées, l'amplitude de la migration nucléaire interkinétique diminue (*Aaku-Saraste et al., 1997*), mais ces cellules gardent l'expression de certains marqueurs neuroépithéliaux (comme *nestine* par exemple), une surface apicale et des jonctions adhérentes (*Hartfuss et al., 2001*). Elles acquièrent par contre des propriétés de cellules astrogliales, notamment des caractéristiques ultrastructurales caractéristiques des cellules de la glie que sont les granules de glycogène, ainsi que plusieurs marqueurs

spécifiques tels que GLAST, S100 β , GFAP et BLBP (*pour revue : Kriegstein and Götz, 2003*). Le neuroépithélium est ainsi progressivement remplacé par les cellules gliales radiales (GR), pour arriver à E12 à une dominance de cellules progénitrices aux caractéristiques gliales (**Fig.32B**). Ce changement d'identité des cellules NEs en GRs marque le début de la deuxième phase du développement cortical, la phase de neurogenèse (**Fig.32B**).

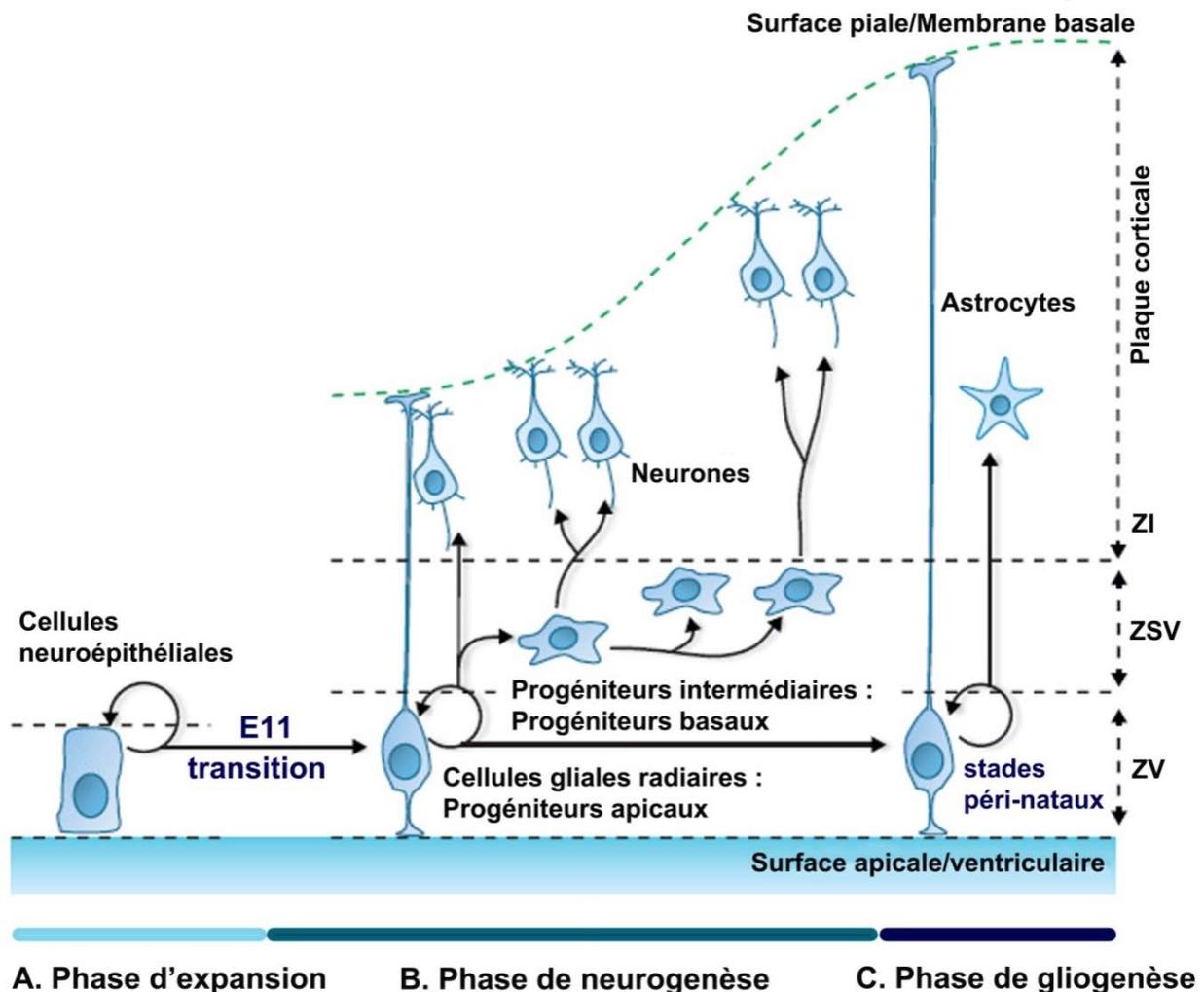


Figure 32. Développement neural cortical chez la souris

(A) Phase d'extension latérale de E8,5 à E10-11. Les cellules neuroépithéliales (NE) sont des cellules progénitrices neurales (CPN). Une cellule NE se divise et donne naissance à deux cellules NE, permettant l'extension de l'épithélium neural. **(B) Phase de neurogenèse** où l'extension est radiale. Les CPNs deviennent progressivement des cellules gliales radiales (GR) appelées progénéteurs apicaux (PA). Par division asymétrique, un PA se divise et donne naissance à un PA et un neurone (neurogenèse directe). Un PA a la capacité de donner naissance à un autre type de progéniteur, appelé progéniteur neural intermédiaire (PNI) ou progéniteur basal (PB) (neurogenèse indirecte). Les PBs génèrent des neurones. Les neurones migrent vers les régions supérieures du cortex et forment les différentes couches corticales. **(C) Phase de gliogenèse** à partir de E17, durant laquelle les CPNs génèrent des astrocytes (A) et des oligodendrocytes. ZI, zone intermédiaire ; ZSV, zone sub-ventriculaire ; ZV, zone ventriculaire. (*adapté de Tiberi et al., 2012*)

2.2.2. Phase neurogénique et colonisation corticale

a. Rôle des populations progénitrices

Vers E10,5, la phase de neurogenèse débute, et les cellules GRs réalisent des divisions asymétriques par une orientation particulière de leur sillon de division lors de la cytokinèse (**Fig.33A**) (pour revue : Götz and Huttner, 2005).

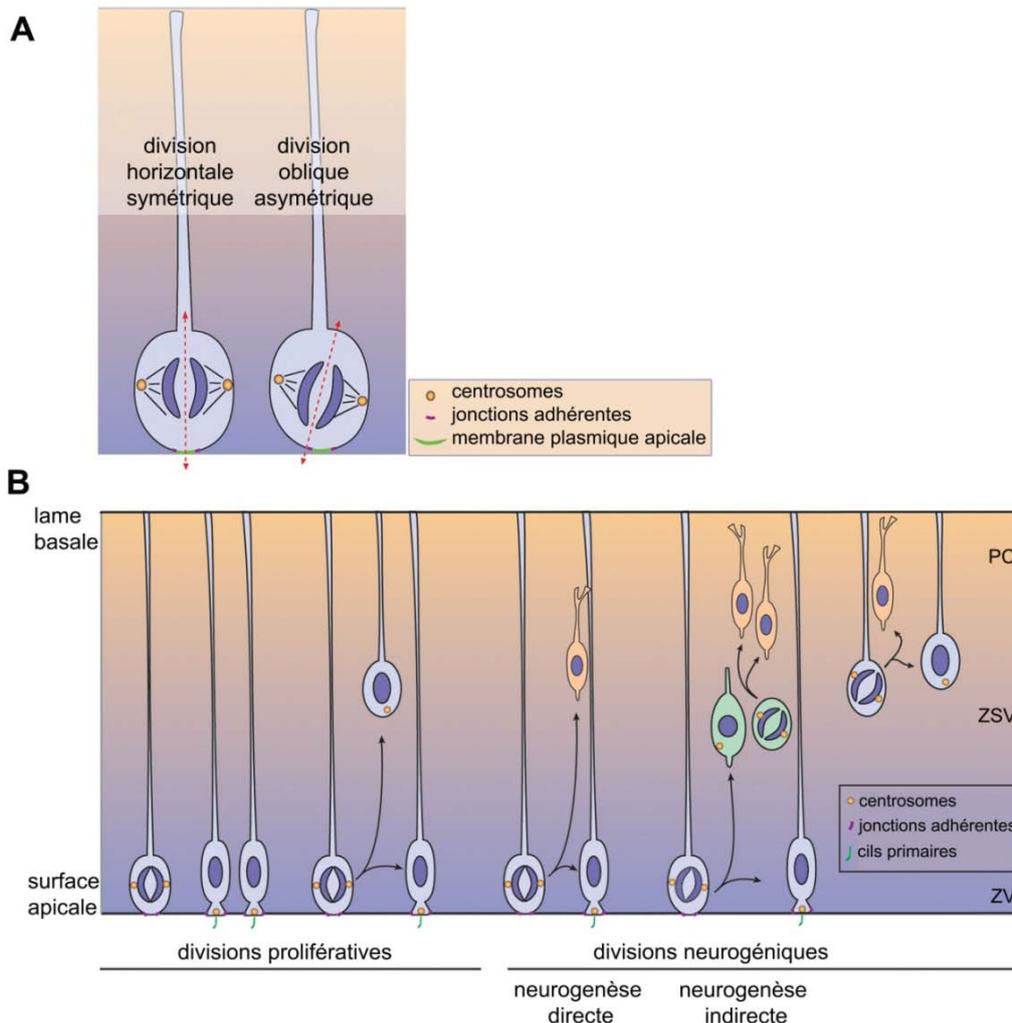


Figure 33.
Modes de division des populations progénitrices du néocortex

(A) Représentation proposée par le groupe de Huttner (Huttner and Brand, 1997) des modes de division symétrique et asymétrique. Une division symétrique a lieu lorsque le plan de division est horizontal et distribue de manière égale la membrane plasmique apicale et les jonctions adhérentes entre les deux cellules filles. Une division asymétrique est engendrée par un plan de division oblique qui répartit de manière inégale la membrane plasmique et les jonctions adhérentes qui sont héritées par l'une des cellules filles. (B) Représentation des divisions prolifératives et neurogéniques réalisées par les différentes populations progénitrices du néocortex. Au cours des divisions prolifératives, un plan de division horizontale va préférentiellement donner naissance à deux cellules gliales radiaires. Au cours de la phase de neurogenèse, les divisions horizontales vont favoriser la neurogenèse directe alors que les divisions obliques engendreront une neurogenèse indirecte, majoritairement par la production de PNIs. PC, plaque corticale ; ZSV, zone sub-ventriculaire ; ZV, zone ventriculaire. (adapté de Laguesse et al., 2015)

Ces divisions distribuent de manière inégale les constituants cellulaires de la GR mère dans les deux cellules filles générant une cellule fille GR permettant un auto-renouvellement, et une autre cellule d'avantage différenciée : un neurone post-mitotique (**Fig.32B**). Ces divisions sont dites neurogéniques et résultent en une neurogenèse directe (*pour revue : Laguesse et al., 2015*) (**Fig.33B**). Les cellules GRs réalisent leur mitose de manière apicale à la surface du ventricule et sont connectées les unes aux autres par des jonctions adhérentes localisées au pôle apical de leur membrane plasmique latérale. Ces cellules GRs sont des progéniteurs apicaux (PA) et se localisent dans la ZV (*pour revue : Farkas and Huttner, 2008*) (**Fig.32B**).

Certains PAs vont donner naissance par division asymétrique à un PA et à un autre type de progéniteur, le progéniteur neural intermédiaire (PNI) ou progéniteur basal (PB) (**Fig.32B**). Ces divisions neurogéniques résultent en une neurogenèse indirecte. Les PBs se décrochent de la surface apicale du neuroépithélium, en déconnectant les jonctions adhérentes qui les lient aux PAs. Ils réalisent une translocation nucléaire vers la région basale de la ZV formant une zone proliférative secondaire qui est la zone sub-ventriculaire (ZSV) (*pour revue : Farkas and Huttner, 2008*) (**Fig.32B**). Avant la mitose, les PBs perdent leur polarité et rétractent leur processus apical et basal (*Attardo et al., 2008*) (**Fig.33B**). Les PBs réalisent ensuite leur mitose dans une zone qui n'est pas ventriculaire, la région basale de la ZV ou dans la ZSV. La plupart des PBs réalisent une division symétrique qui génère deux neurones post-mitotiques (**Fig.32B**). Cette division neurogénique qui comprend une étape intermédiaire, résulte en une neurogenèse indirecte (**Fig.33B**). Cependant, une faible partie des PBs (environ 10%) serait capable d'effectuer des divisions symétriques prolifératives avant la division neurogénique, participant ainsi à l'expansion de leur population dans la ZSV (*Noctor et al., 2004*). Les PAs et les PBs sont les populations progénitrices clés de la deuxième phase de la corticogenèse, qui par neurogenèse directe et/ou indirecte, contribuent à l'expansion radiaire du néocortex.

b. Spécification des progéniteurs néocorticaux

Les gènes *Lhx2*, *Foxg1*, *Emx2* et *Pax6* ont des rôles décisifs dans la spécification des progéniteurs dorsaux du télencéphale. *Lhx2* et *Foxg1* sont impliqués dans la répression de l'identité latérale des populations progénitrices, alors que *Pax6* et *Emx2* répriment l'identité ventrale des progéniteurs (*pour revue : Molyneaux et al., 2007*). Dans les mutations perte de fonction des gènes *Lhx2* et *Foxg1*, les progéniteurs néocorticaux ne sont pas produits, ce qui engendre une absence de néocortex. De plus, il y a la présence et une forte expansion des structures ventrales et latérales chez les *Lhx2*^{-/-}, ou uniquement latérales chez les mutants *Foxg1*^{-/-} (*Bulchand et al., 2001; Muzio and Mallamaci, 2005*) (**Fig.34**). Le double mutant

Pax6^{-/-} ; *Emx2*^{-/-} présente une absence de cortex et une expansion des progéniteurs ventraux sur l'ensemble du télencéphale dorsal (*Muzio et al., 2002*) (**Fig.34**).

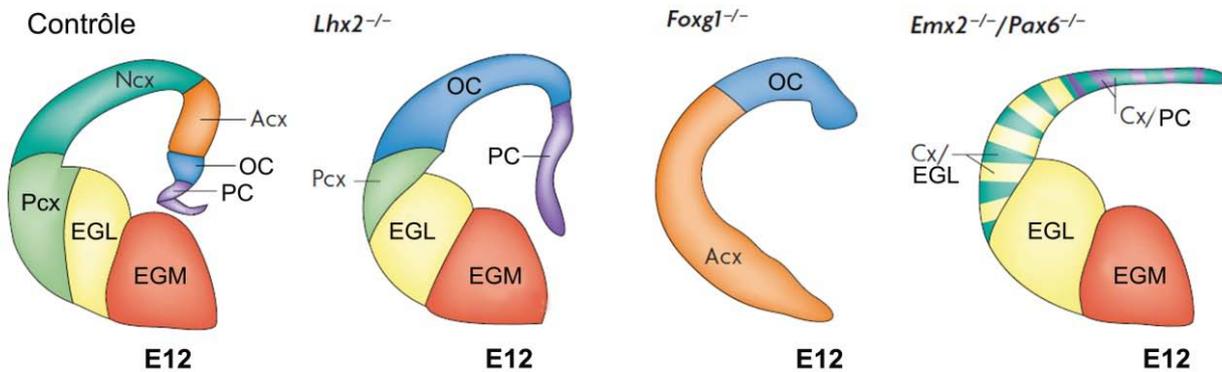


Figure 34. Spécification des progéniteurs néocorticaux

Représentation d'un cortex contrôle et de trois phénotypes montrant un défaut de corticogénèse suite à la mutation nulle des gènes *Lhx2*, *Foxg1* et la double mutation *Emx2*^{-/-} ; *Pax6*^{-/-} au stade E12. Acx, archicortex ; Cx, cortex ; EGL, éminence ganglionnaire latérale ; EGM, éminence ganglionnaire médiane ; OC, ourlet cortical ; PC, plexus choroïde ; Pcx, paléocortex. (*adapté de Molyneaux et al., 2007*)

Une étude a montré que le gène *Pax6* contrôle la prolifération des progéniteurs de la ZV. En effet, le mutant *Pax6*^{-/-} présente une réduction de l'épaisseur du néocortex ainsi qu'une diminution du nombre des PAs due à une sortie prématurée du cycle cellulaire (*Quinn et al., 2007*). Le gène *Pax6* semble également avoir une fonction dans la prolifération des progéniteurs de la ZSV et l'établissement des couches corticales superficielles. En effet, la mutation nulle du gène *Pax6* entraîne une réduction du nombre de progéniteurs *Tbr2* positifs (gène spécifiquement exprimé dans les PNIs) et une réduction des neurones *Cux1* et *Cux2* positifs (gènes spécifiquement exprimés dans les neurones des couches II à IV) (*Quinn et al., 2007* ; *Nieto et al., 2004*). Il est suggéré que les PNIs contribuent significativement à la génération des neurones localisés dans les couches superficielles IV à II (*pour revue : Pontious et al., 2008*). Ainsi la réduction des neurones des couches superficielles serait la conséquence de la réduction du nombre de PNIs. L'ensemble de ces observations met en évidence le rôle du facteur de transcription *Pax6* dans le contrôle de la prolifération et du maintien des PAs ainsi que de la spécification des PNIs du néocortex.

La population des PAs exprime spécifiquement le gène *Pax6*. Certains des progéniteurs quittent la ZV pour rejoindre la ZSV. Au fur et à mesure de leur migration, ils perdent l'expression du marqueur *Pax6* et expriment progressivement les gènes *Tbr2*, *Svet1*, *Cux1* et *Cux2* en devenant des PNIs (*pour revue : Götz and Huttner, 2005*). Ainsi, l'ensemble de la

population progénitrice des neurones néocorticaux peut être identifié par l'expression spécifique de gènes marqueurs de PAs vs PNIs.

c. Lamination du néocortex

Les premiers neurones générés par les PAs quittent la ZV et migrent de façon radiaire vers la surface du cortex. Ils y rejoignent d'autres neurones déjà présents qui sont les cellules de Cajal-Retzius (CR), majoritairement produites à E10 dans la périphérie du cortex dans l'ourlet cortical, et qui ont migré de manière tangentielle pour atteindre le néocortex (*Bielle et al., 2005*). Ces deux populations neuronales forment la préplaque (**Fig.35A**). Les prochains neurones générés enrichissent la préplaque et vont la scinder en deux couches : une couche superficielle, appelée zone marginale (ZM), et une couche profonde, appelée sous-plaque (SP) (*pour revue : Kriegstein and Noctor, 2004*) (**Fig.35A**). Les nouveaux neurones générés ensuite, vont passer au travers de la SP et créent une nouvelle couche qui est la plaque corticale (PC) (**Fig.35A**). Ils colonisent la PC dans un ordre dit "de l'intérieur vers l'extérieur" : les neurones nouvellement formés passent au travers des neurones déjà en place et colonisent une couche plus superficielle à celle précédente. L'apparition des couches dans le cortex suit un ordre précis : la première couche est la couche I qui est la ZM, puis il y a la couche VI, la couche V, la couche IV et enfin la couche II/III (couche fusionnée chez la souris) (*pour revue : Supèr et al., 1998*). Ainsi, les couches profondes (VI et V) sont les premières à être constituées alors que les couches superficielles (IV et II/III) sont les dernières (*Angevine and Sidman, 1961*).

Les neurones sont générés tout au long de la phase de neurogenèse, par différentes vagues de production successives. Il est proposé que ces vagues correspondent à des pics de production de groupe de neurones destinés à la même couche corticale. Ainsi, les neurones destinés à la couche VI ont leur pic de production à E12,5, ceux de la couche V à E13,5, ceux de la couche IV à E14,5 et ceux de la couche II/III à E15,5 (*pour revue : Molyneaux et al., 2007*) (**Fig.35B**).

Il a été admis que les progéniteurs se partageaient la production neuronale de telle sorte que les PAs forment les neurones de couches profondes et que les PNIs génèrent ceux des couches superficielles. En effet, Tarabykin et ses collaborateurs montrent que l'expression des gènes *Otx1* (spécifique des progéniteurs de la ZV) et *Svet1* (spécifique des progéniteurs de la ZSV) est détectée au 2^e jour post-natal (P2) respectivement dans les neurones des couches VI-V et dans les neurones des couches IV-II (*Tarabykin et al., 2001*). Plus récemment, une étude de lignage cellulaire a révélé que les PNIs produiraient à la fois les neurones des couches

profondes et ceux des couches superficielles (Kowalczyk *et al.*, 2009). De plus, l'étude de la mutation perte de fonction du gène *Tbr2* montre une réduction de l'étendue corticale avec une diminution des populations neuronales de l'ensemble des couches corticales (Sessa *et al.*, 2008). Une autre étude a montré que les PNIs sont responsables de la production de la majorité des neurones générés entre les stades E11 et E13 (Haubensak *et al.*, 2004). L'ensemble de ces observations suggère que les PNIs participeraient à la production des neurones des couches profondes et qu'à partir du stade E14, ils généreraient de manière plus spécifique les neurones des couches superficielles.

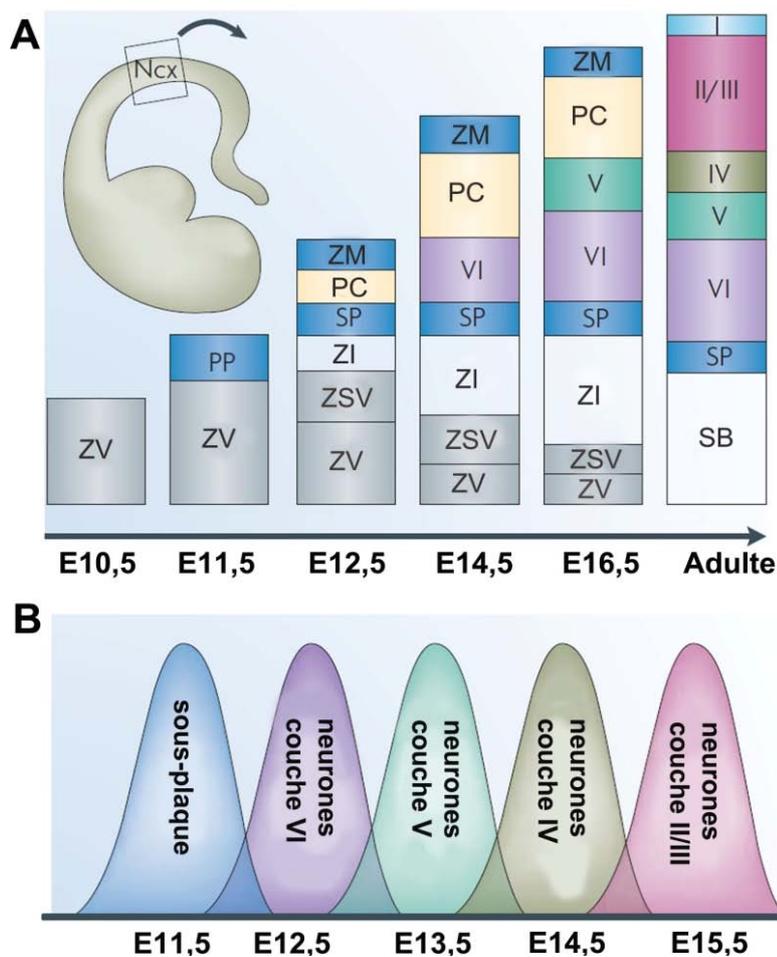


Figure 35. Organisation de la lamination du cortex cérébral au cours du développement

(A) La pré-plaque (PP) est la première couche colonisée par les neurones générés à E11,5 dans le néocortex. Les prochains neurones produits scindent la PP en zone marginale (ZM) et en sous-plaque (SP). Les neurones générés à E12,5, vont ensuite passer au travers de la SP et créent la plaque (PC). S'en suit plusieurs vagues de production neuronale, dont les neurones nouvellement formés vont se loger dans une couche supérieure à celle déjà établie, et générer ainsi "de l'intérieur vers l'extérieur" les six différentes couches de la PC. Les couches VI et V sont dites "profondes" et les couches "IV, II/III" sont appelées couches "superficielles". (B) Représentation des différents pics de production des populations neuronales du néocortex au cours du développement. Ncx, néocortex ; SB, substance blanche ; ZI, zone intermédiaire ; ZSV, zone sub-ventriculaire ; ZV, zone ventriculaire. (*adapté de Molyneaux et al.*, 2007)

Aux stades périnataux, le développement neural cortical s'achève par la phase finale qui est la gliogenèse. Les cellules GRs arrêtent progressivement de générer des neurones vers E17,5 et basculent vers la production d'astrocytes et d'oligodendrocytes (**Fig.32C**). Le processus de maturation du cortex cérébral se poursuit jusqu'au stade adulte.

d. Spécification des populations neuronales

Les gènes *Neurogénine1* (*Neurog1*) et *Neurogénine2* (*Neurog2*) sont des gènes proneuraux codant pour des facteurs de transcription "basic-helix-loop-helix" caractérisés par leur expression tissu-spécifique (*Bertrand et al., 2002*). *Neurog1* et *Neurog2* sont définis comme nécessaires et suffisants pour induire une identité neuronale glutamatergique. Ils sont spécifiquement exprimés dans les populations progénitrices du cortex cérébral de E10,5 à E15,5 (*Neurog1*) et jusqu'à la période postnatale (*Neurog2*) (*Gradwohl et al., 1996*). Il a été montré que ces gènes sont nécessaires à la spécification des neurones destinés aux couches profondes VI et V (*pour revue : Wilkinson et al., 2013*).

Certains facteurs de transcription ont également un rôle important dans la spécification neuronale. Le gène *Tbr1*, par exemple, est requis pour le bon positionnement des neurones de la SP et de la couche VI, dans la spécification du caractère "couche VI" (en supprimant l'expression de *Fezf2* et de *Ctip2*, gènes spécifiquement exprimés dans les neurones de la couche V) et dans la spécification du caractère "neurone cortico-thalamique" (suppression de *Fezf2*, donnant le caractère corticospinal) (*McKenna et al., 2011*). Le gène *Satb2* est requis dans la répression du caractère "couche V", dans la spécification de l'identité "couche IV" (par l'activation de la transcription du gène *Rorb*, spécifiquement exprimé dans les neurones de la couche IV), de l'identité couche "II/III" (activation du gène *Cux2*, spécifiquement exprimé dans les neurones des couches II/III et IV), et dans la spécification du caractère neurone "cortico-corticaux" (*Zhang et al., 2012*).

2.2.3. Migration neuronale

a. Migrations des neurones corticaux et des interneurones

Le cortex cérébral est constitué de neurones générés à partir de zones distinctes du pallium et du subpallium. Selon leur provenance, les neurones parcourent des distances variables et adoptent des modes de migration différents. Les neurones corticaux pyramidaux sont générés dans les zones progénitrices du télencéphale dorsal (*Hatanaka and Murakami, 2002*) alors que les interneurones proviennent des zones progénitrices des éminences ganglionnaires (*Tamamaki et al., 1997*). Ainsi, les neurones corticaux peuvent suivre une voie de migration

directe et radiaire alors que les interneurones réalisent une migration dite "tangentielle" (*pour revue : Kriegstein and Noctor, 2004*) (**Fig.36A, B**).

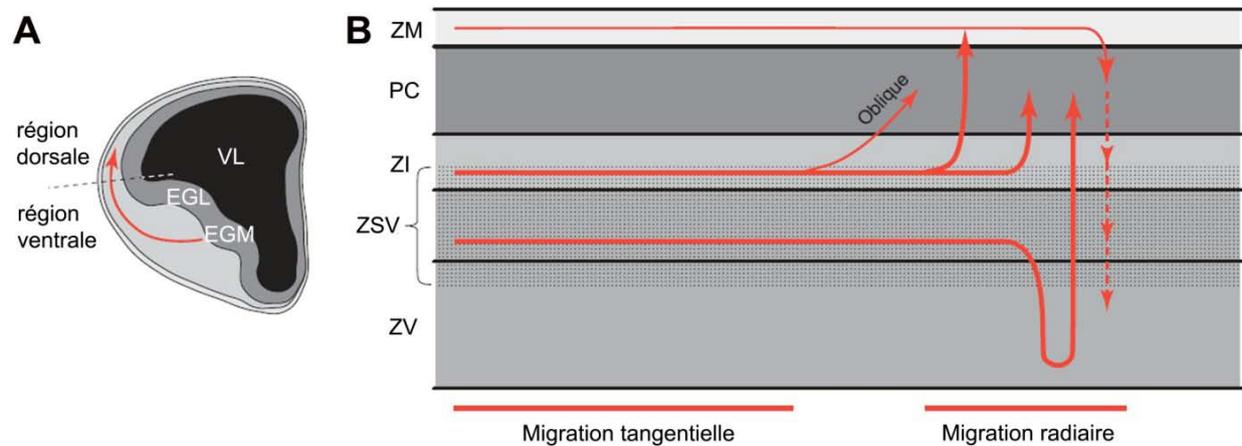


Figure 36. Migration tangentielle et radiaire des populations neuronales du néocortex

(A) Origine des interneurones dans le télencéphale ventral. La plupart des interneurones sont générés dans l'éminence ganglionnaire médiane (EGM). (B) Les interneurones migrent de manière tangentielle jusqu'au cortex cérébral et changent ensuite de direction pour rentrer dans la plaque corticale (PC) en effectuant une migration oblique ou radiaire. (*adapté de Kriegstein and Noctor, 2004*)

Au cours de la neurogenèse, les premières cellules GABAergiques de l'EGM migrent à travers la zone intermédiaire (ZI) vers les différentes couches corticales, alors que les interneurones nés plus tardivement migrent à travers la ZV et la ZSV de l'EGL avant d'entrer dans le cortex. Dans le cortex en développement, les premiers interneurones en migration se trouvent majoritairement dans les régions basses de la ZI et de la ZSV, dans la ZM et dans SP (*Lavdas et al., 1999*) (**Fig.36B**). Une fois dans le cortex cérébral, les interneurones se propagent tangentiellement et entrent dans la PC en basculant vers une migration radiaire (*Anderson et al., 2001*) (**Fig.36B**). Dans la majorité des cas, les interneurones prennent le chemin le plus court pour entrer dans la CP : de manière radiaire/oblique par en-dessous, pour ceux présents dans la ZI et la ZSV, et de manière radiaire par au-dessus pour ceux présents dans la ZM. Certains interneurones de la ZI ou ZSV semblent cependant favoriser un mode de migration tangentielle plus complexe, en allant d'abord de manière radiaire vers la ZM, avant de se rediriger vers la PC (*Tanaka et al., 2003*) (**Fig.36B**). Un ensemble de facteurs participe au guidage de la migration tangentielle ; telles que les molécules de croissance axonale comme les sémaphorines, les molécules d'adhésion comme les PSA-NCAM, ou encore des molécules attractives/répulsives comme la famille Slit/Robo. L'action de ces facteurs pourrait

se combiner pour créer des "couloirs" guidant les interneurons au cours de la migration tangentielle (*Wichterle et al., 2003*).

b. Migrations des neurones néocorticaux nés précocement et tardivement

Les neurones naissent à la surface du ventricule et vont migrer jusqu'au bord du cortex en développement. Aux stades précoces, quand l'étendue corticale est encore faible, la distance à parcourir est courte. Mais au fur et à mesure que le développement progresse, la distance à parcourir devient plus importante. Les neurones nés au moment d'une étendue corticale faible se caractérisent par un mode de migration radiaire différent de celui adopté par les neurones nés plus tardivement. Les neurones nés précocement possèdent un prolongement pial relativement long qui constitue une attache stable avec la surface piale de la ZM (*Nadarajah et al., 2001*). Ils vont se servir de cette attache pour réaliser une migration radiaire par "translocation" (**Fig.37A**). En effet, ces neurones vont déplacer leur noyau par un mouvement continu et régulier vers leur extrémité apicale et raccourcir ainsi leur prolongement pial pour atteindre leur position finale dans la PC. Cette translocation est dite "nucléaire" car le noyau est en mouvement, ou "somale" car l'ensemble du soma est en migration (**Fig.37A**) (*Gupta et al., 2002*). Ce type de migration se distingue de la migration radiaire par "locomotion", car elle est indépendante de la glie radiaire (*Gupta et al., 2002*) (**Fig.37A-B**).

Les neurones nés tardivement, après le stade E13, sont des neurones à prolongement court, qui migrent par locomotion dans une direction radiaire le long de cellules GRs guides (*Hatten, 1990*). Étant donné l'origine gliale des neurones, il a été suggéré qu'ils pouvaient hériter de la fibre gliale radiaire au moment de la mitose pour la migration par translocation (*Miyata et al., 2001*).

Lors du processus de locomotion, les neurones subissent une série de quatre phases migratoires caractérisées par des modifications de forme, de trajectoire, et de vitesse de migration vers la PC (*Noctor et al., 2004*) (**Fig.37C**). Au cours de la première phase, les neurones générés dans la ZV adoptent une morphologie bipolaire et y séjournent environ 10 h avant de la quitter et de migrer de manière radiaire dans la ZSV (**Fig.37C**). En phase 2, ils marquent une pause et deviennent multipolaires, c'est-à-dire qu'ils présentent au moins trois neurites à leur surface (**Fig.37C**) (*Tabata and Nakajima, 2003*).

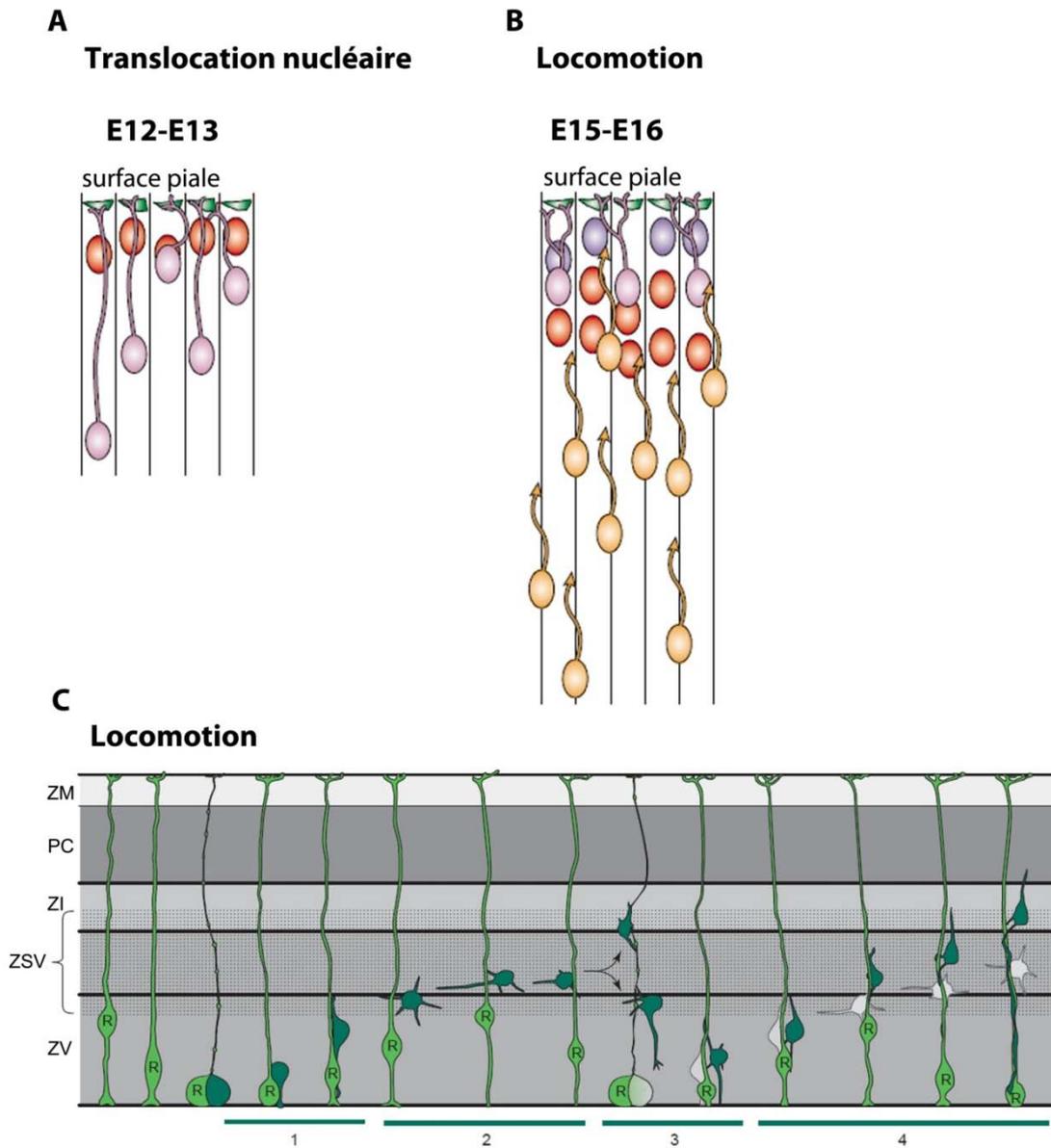


Figure 37. Migration radiaire des neurones pyramidaux du néocortex

(A) Mode de migration par translocation nucléaire réalisé par les neurones nés précocement aux stades E12-E13. (B) Mode de migration par locomotion utilisé par les neurones nés plus tardivement, après le stade E13. (C) Représentation des différentes étapes réalisées par les neurones corticaux lors de la migration par locomotion. En phase 1, le neurone cortical (vert foncé) migre de façon radiaire de la zone ventriculaire (ZV) à la zone sub-ventriculaire (ZSV). En phase 2, les cellules deviennent multipolaires et stoppent leur migration dans la région basse de la zone intermédiaire (ZI). Certains neurones passent en phase 3 qui est caractérisée par un mouvement rétrograde vers le ventricule. La phase 4 est la phase finale de la migration radiaire vers la PC, guidée par le prolongement pial de la cellule gliale radiaire (vert clair). En gris est représentée une cellule fille de la cellule gliale radiaire. EGL, éminence ganglionnaire latérale (EGL) ; VL, ventricule latéral ; ZM, zone marginale. (*adapté de Kriegstein and Noctor, 2004*)

Les neurones arrêtent leur migration pendant 24 à 36 h au niveau des ZI/ZSV, créant une nouvelle région qui est la zone d'accumulation multipolaire (*Tabata and Nakajima, 2003*). Les neurones multipolaires présentent un comportement dynamique, modifiant leur orientation et

leur morphologie très fréquemment. Ils sont également capables de se déplacer tout en projetant ou rétractant leurs prolongements, mais ne se déplacent *in fine* que sur une faible distance (Tabata and Nakajima, 2003).

Ensuite, la majorité des neurones multipolaires passe en phase 3 et étend un prolongement vers le ventricule, alors que d'autres vont directement en phase 4 (Noctor *et al.*, 2004) (**Fig.37C**). Le contact entre le ventricule et le prolongement neuronal est maintenu pendant environ 10h avant que les neurones reprennent leur migration (Tabata and Nakajima, 2003) (**Fig.37C**).

Les neurones passent ensuite en phase 4 : ils inversent leur polarité, étendent un prolongement vers la surface piale, adoptent une morphologie bipolaire caractéristique du neurone en migration, et commencent une migration radiaire vers la plaque corticale (Noctor *et al.*, 2004) (**Fig.37C**). Le processus de migration par locomotion n'est pas continu, car il y a une alternance entre les phases d'expansion du prolongement pial et les phases de déplacement du noyau et du soma (Noctor *et al.*, 2004). Une fois arrivé dans la plaque corticale, le prolongement pial s'ancre dans la surface piale et les neurones effectuent une translocation nucléaire pour se détacher de la glie radiaire (Nadarajah *et al.*, 2001).

2.3. Processus de régulation de la neurogenèse

La taille globale de l'encéphale et le nombre de neurones qu'il contient sont des caractéristiques relativement conservées d'un individu à l'autre. La durée de la phase de neurogenèse et l'efficacité de la production neuronale sont des paramètres pouvant influencer le nombre final de neurones.

2.3.1. Contrôle de la destinée des populations progénitrices

Il a été montré que la voie de signalisation Notch, qui inhibe les gènes proneuraux et la différenciation neuronale, semble promouvoir l'initiation de la phase neurogénique. L'activation ou l'inactivation de la voie de signalisation Notch augmente ou diminue l'expression de marqueurs des cellules GRs (comme *RC2* ou *BLBP*) (Gaiano *et al.*, 2000; Anthony *et al.*, 2005) (**Fig.38**).

La voie de signalisation FGF semble également être impliquée dans l'initiation de la phase neurogénique, en promouvant la transition de la cellule NE vers la cellule GR. L'inactivation du gène *Fgf10* conduit à un retard de l'apparition des cellules GRs, un taux de division asymétrique réduit et une durée plus longue de la phase d'expansion latérale du cortex

(Sahara and O'Leary, 2009). Ces résultats montrent que le moment de l'induction de la phase de transition cellules NEs à GRs est déterminant pour le développement cortical (**Fig.38**).

D'une part, il a été montré que le gène *Emx2* a une fonction stimulatrice de la division cellulaire symétrique proliférative (Heins et al., 2001), alors que le gène *Pax6* promeut une division cellulaire asymétrique neurogénique (Heins et al., 2002) (**Fig38**).

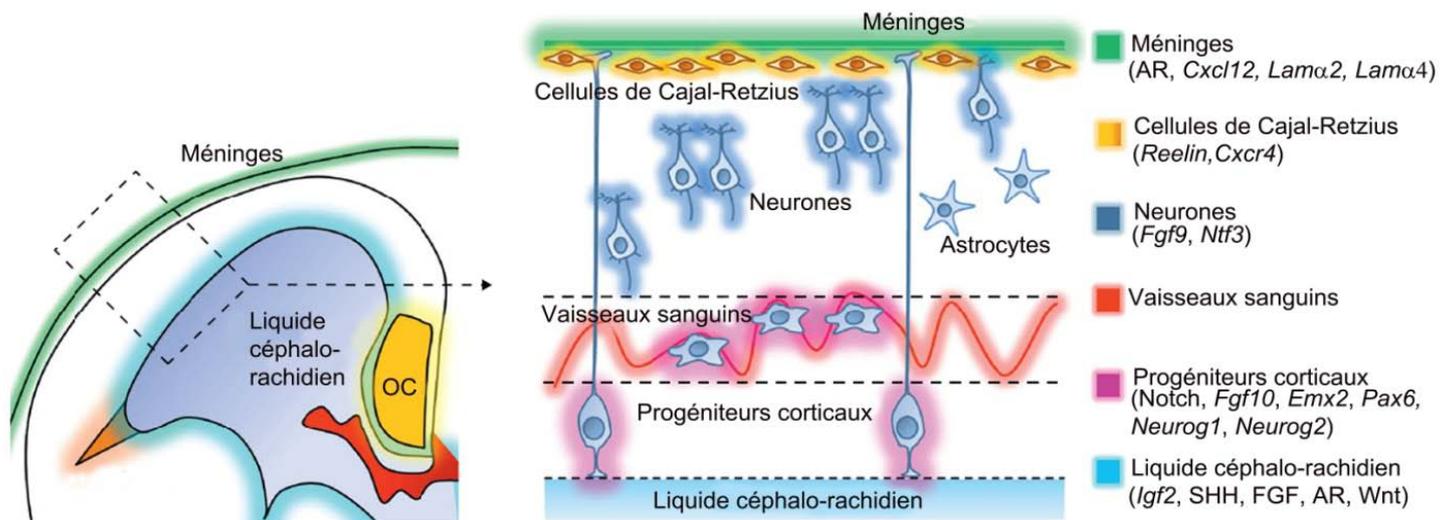


Figure 38. Diversité des sources de morphogènes et signaux dans le cortex en développement

Les différentes sources s'étendent dans l'ensemble du cortex cérébral, de la limite basale, qui est en contact avec le liquide céphalo-rachidien, jusqu'à la limite apicale, bordée par les méninges. Au sein du cortex, les premières cellules à s'y trouver, les cellules de Cajal-Retzius, mais aussi les neurones pyramidaux, les vaisseaux sanguins, les progéniteurs corticaux sécrètent une variété de signaux influant la différenciation et la maturation du cortex cérébral. (adapté de Tiberi et al., 2012)

D'autre part, il a été montré une corrélation entre le défaut de l'orientation du fuseau mitotique et une différenciation neuronale prématurée. La mutations des gène *ASPM* (abnormal spindle-like microcephaly-associated), et notamment celle de *Aspm1*, gène requis dans le maintien de l'orientation horizontale du fuseau mitotique nécessaire pour une division symétrique des GRs, résultent en un processus de neurogenèse anticipée (Fish et al., 2006). De plus, une étude a mis en évidence le rôle de Huntingtine, protéine mutée dans la maladie de Huntington, dans le contrôle de la neurogenèse. En effet, la perte de fonction par ARN interférent du gène *Htt* génère une perturbation de l'orientation du fuseau mitotique, une diminution du nombre des cellules GRs, et une neurogenèse anticipée (Godin et al., 2010).

Il a été également montré que les protéines SNAREs (responsables de la fusion membranaire) étaient importantes pour le contrôle de la destinée des cellules NEs. La

mutation du gène *Snap-α* induit chez les cellules NEs un basculement prématuré d'une division proliférative vers une division neurogénique (*Chae et al., 2004*).

Le contrôle de la transition de l'identité neuroépithéliale à gliale radiaire est également contrôlé par la durée du cycle cellulaire. La transition du caractère prolifératif à neurogénique serait associée à une augmentation de la phase G1 du cycle cellulaire (*Takahashi et al., 1995*). En effet chez le rat, la surexpression du gène *PC3* (orthologue du gène murin *Tis21*, gène inhibiteur de la transition de la phase G1 à S), induit une augmentation de la neurogenèse et inhibe l'expansion des cellules NEs (*Malatesta et al., 2000*).

2.3.2. Contrôle des phases de la migration neuronale

Les transitions entre les différentes phases de la migration neuronale sont régulées par des signaux intracellulaires et environnementaux.

Le cytosquelette des neurones joue un rôle majeur dans le contrôle de la migration neuronale. La mutation nulle du gène codant pour la tubuline β3, spécifique des neurones post-mitotiques, engendre un retard de la migration radiaire avec un retard dans l'acquisition de la morphologie bipolaire. Cette étude montre le rôle de la tubuline β3 dans la polarisation des neurones en migration requis dans la phase d'initiation de la migration radiaire neuronale (*Saillour et al., 2014*).

La mutation du gène *Dcx* (codant pour la protéine MAP Doublecortine) engendre un arrêt prématuré de la migration de certains neurones s'accumulant dans les ZI et ZSV, ainsi qu'une migration inappropriée d'autres neurones dans les couches néocorticales (*Bai et al., 2003*). Ceci suggère un rôle du gène *Dcx* dans la transition de la phase 2 à 3 au cours de la migration radiaire par locomotion. De plus, une étude réalisée sur des miRNAs contrôlant l'expression de DCX, a mis en évidence le rôle de DCX dans l'établissement de la polarisation neuronale et dans la migration radiaire néocorticale (*Volver et al., 2014*).

Une autre protéine régulatrice du cytosquelette, la filamine A, semble être impliquée dans la transition du caractère multipolaire vers le caractère bipolaire. La mutation du gène codant pour la filamine A induit une accumulation de cellules multipolaires dans les ZV et ZSV (*Nagano et al., 2004*). Cette étude suggère que les changements de morphologie lors de la transition multipolaire/bipolaire sont essentiels pour la migration et faciliteraient la formation du processus axonal (*Noctor et al., 2004*).

Une autre étape importante de la migration radiaire est l'étape de détachement du neurone de la cellule GR guide. Il est suggéré que cette étape requiert la coordination de plusieurs

mécanismes tels que : des signaux d'anti-adhésion comme le gène *SPARC-like 1*, des modifications de la réceptivité neuronale aux neurotransmetteurs glutamate et GABA, et l'induction de gènes modulateurs du cytosquelette neuronal (*pour revue : Kwan et al., 2012*).

La dernière étape de la migration neuronale est le positionnement final du neurone en migration dans la couche corticale impliquant le passage au travers des neurones déjà en place. Dans les mutants *reeler*, mutation nulle pour le gène *reelin* codant une glycoprotéine sécrétée par les cellules de CR, les neurones nouvellement formés ne parviennent pas à passer au travers des neurones déjà en place (Caviness, 1982a). Les neurones ne migrent pas au travers des neurones de la SP, conduisant à une formation d'une pseudo PC en dessous de la SP, et une inversion de la lamination des couches II à VI. Cette étude montre la fonction du gène *reelin* exprimé dans la ZM, dans le contrôle de la migration neuronale et la lamination corticale (**Fig.38**).

3. Structures non neurales importantes pour le développement cortical

Le système nerveux central est une structure vascularisée, enveloppée par les méninges et qui baigne dans le liquide céphalo-rachidien.

3.1. Vascularisation du cortex cérébral

La vascularisation de l'encéphale dépend des deux artères carotides et des deux artères vertébrales. Au niveau des hémisphères cérébraux, les artères carotides se divisent en artères cérébrales antérieures, moyennes et postérieures. La région médiane de l'encéphale est irriguée principalement par l'artère cérébrale antérieure, la région latérale correspondant au cortex cérébral est irriguée par l'artère moyenne, alors que la région ventrale de l'encéphale est irriguée par l'artère postérieure. Les territoires de chacune de ces artères se recoupent partiellement.

3.1.1. Rôle de la vascularisation au cours du développement cortical

Au cours de la corticogenèse, les PAs sont en contact par leur prolongements avec des molécules sécrétées aux niveaux de leurs surfaces ventriculaire ou piale. Ce n'est pas le cas des PNIs, qui sont des progéniteurs apolaires ne réalisant pas de contacts apicaux-basaux. Une question qui se pose alors est comment les PNIs interagissent avec leur environnement. Deux études indépendantes ont suggéré que les vaisseaux sanguins auraient une influence sur la

physiologie des PNIs. En effet, la distribution spatiale et temporelle des PNIs suivrait l'organisation tridimensionnelle des capillaires au sein de la ZSV (*Javaherian and Kriegstein, 2009 ; Stubbs et al., 2009*). Ces observations mettent en évidence le rôle potentiel de la vascularisation dans l'approvisionnement des PNIs en nutriments et molécules signales nécessaires à leur physiologie et destinée dans le cortex en développement (**Fig.38**).

3.2. Enveloppes du cortex : les méninges

Les méninges ont pour rôle de séparer le système nerveux central (SCN) du reste de l'organisme. Elles recouvrent l'ensemble des structures du SNC et le protègent des chocs lors de mouvements par le liquide céphalo-rachidien (LCR) (*pour revue : Catala, 1998*) (**Fig.39A**).

Les méninges apparaissent chez la souris entre E9 et E10 (*McLone and Bondareff, 1975*) et ont différentes origines. Les méninges recouvrant le cerveau antérieur sont formées à partir des cellules de la crête neurale du diencéphale (*Couly and Le Douarin, 1987*). Aux niveaux du cerveau moyen, postérieur et de la moelle épinière, les méninges dérivent du mésoderme céphalique et somatique (*Bagnall et al., 1989; Couly et al., 1992; Jiang et al., 2002*). Les méninges sont composées de trois membranes : la dure-mère, membrane rigide et non vascularisée qui adhère à l'os de la boîte crânienne ; l'arachnoïde, membrane fine, molle et non vascularisée ; et la pie-mère, membrane fine et vascularisée qui est accolée à la membrane basale, adjacente au cortex cérébral (*pour revue : Catala, 1998*).

3.2.1. Rôle des méninges au cours du développement cortical

Il a été montré que les méninges jouent un rôle important dans le développement tardif du cerveau postérieur. En effet, Zhang et ses collaborateurs ont mis en évidence une source d'AR à partir de E13 dans les méninges recouvrant le cerveau postérieur (*Zhang et al., 2003*). L'AR émane des méninges au niveau du territoire présomptif du cervelet et du système pré-cérébelleux et assure ainsi son rôle dans le développement tardif du cerveau postérieur.

De plus, il est suggéré que les méninges sont impliquées au cours de la neurogenèse dans la régulation du devenir des progéniteurs corticaux. En effet, les mutants *Foxc1^{-/-}*, caractérisés par un défaut de formation des méninges corticales, présentent une élongation anormale du neuroépithélium du cerveau antérieur, une diminution du nombre des PBs et une diminution des populations neuronales du cortex en développement (*Siegenthaler et al., 2009*). La même étude suggère que l'absence d'AR synthétisé par les méninges contribue au phénotype observé

et propose ainsi un rôle de l'AR dans le contrôle de la neurogenèse corticale (*Siegenthaler et al., 2009*) (**Fig.38**).

Il est également observé que les méninges jouent un rôle important dans le contrôle de la migration tangentielle et radiaire des neurones du néocortex. En effet, la membrane la plus interne et accolée à l'encéphale, la pie-mère, exprime le gène *Cxcl12* qui code pour une protéine chémoattractive (**Fig.38, Fig.39A**). Cette protéine va interagir avec le récepteur CXCR4 localisé sur les cellules de Cajal-Retzius, et attirer les cellules CRs dans la ZM. Si cette étape ne se fait pas correctement, la fonction des cellules CRs n'est pas assurée, et c'est la lamination de l'ensemble de la PC qui est perturbée (*Borrell and Marín, 2006*).

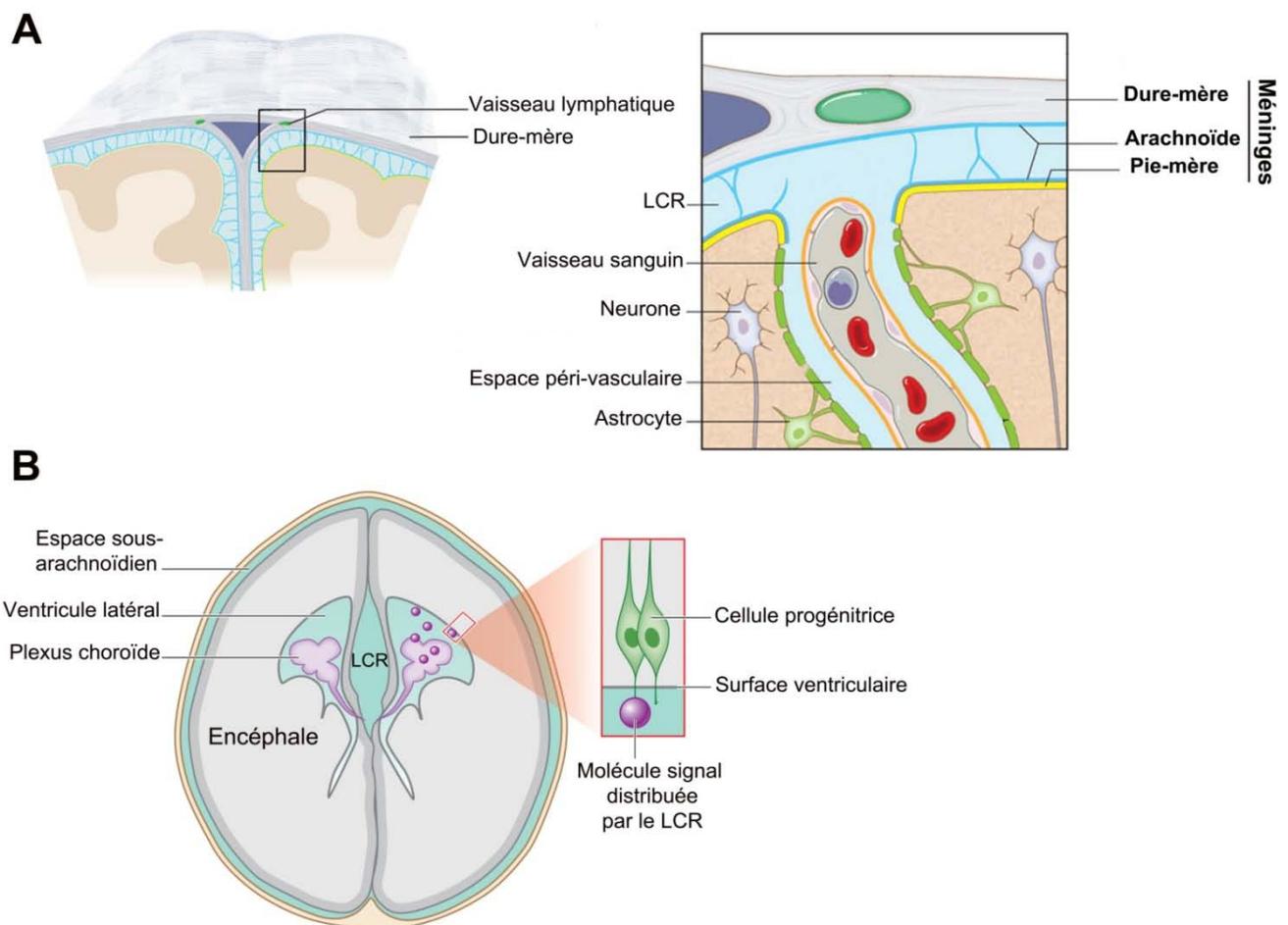


Figure 39. Méninges et liquide céphalo-rachidien

(A) Représentation de l'organisation des méninges : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. Entre l'arachnoïde et la pie-mère se trouve l'espace sous-arachnoïdien qui contient les artères cérébrales et le liquide céphalo-rachidien. (B) Le liquide céphalo-rachidien est synthétisé par les plexus choroïdes et circule dans le ventricule et l'espace sous-arachnoïdien. Il véhicule des molécules signal pouvant influencer le devenir des cellules progénitrices bordant le ventricule et contribuer ainsi au développement cortical. (*adapté de Louveau et al., 2015; Lehtinen and Walsh, 2011*)

Lors des processus de migration radiaire, le prolongement des cellules GRs ou celui des neurones s'ancrent dans la lame basale (ou membrane basale, MB) de la pie-mère. Les méninges ont ainsi un rôle dans l'ancrage des supports lors de la migration. Si l'ancrage est perturbé, le processus de migration sur support n'est plus possible. Les mutations pour les gènes de l'intégrine β 1 (protéine transmembranaire de liaison) et des laminines α 2 et α 4 (protéines de la MB) entraînent un détachement des prolongements gliaux de la MB des méninges, qui résulte en l'apoptose des cellules GRs et en une diminution du volume du cortex cérébral (*Radakovits et al., 2009*) (**Fig.38**).

3.3. Plexus choroïde et liquide céphalo-rachidien

Le plexus choroïde est une structure formée de capillaires semi-perméables dits fenestrés, recouverte de cellules épendymaires, similaire à un tissu épithélial et protubérante dans la lumière du ventricule (*Hunter and Dymecki, 2007*). Le plexus choroïde a une double origine embryonnaire : les cellules épithéliales dérivent du tube neural et les cellules du mésenchyme ont pour origine le mésoderme céphalique. Chez la souris, les plexus choroïdes apparaissent vers E12-E13 aux niveaux du cerveau postérieur et des ventricules latéraux et vers E14 dans la région du mésencéphale (*pour revue : Catala, 1998*). Le plexus choroïde sécrète le LCR qui circule librement dans l'espace sous-arachnoïdien des méninges ainsi que dans les ventricules des hémisphères cérébraux (**Fig.39A-B**). Le LCR a une fonction de protection de l'encéphale en amortissant des chocs, il évacue également les molécules et les "déchets" provenant du cerveau et joue un rôle de protection immunologique (*Redzic et al., 2005*). Enfin, il baigne le cil primaire des cellules gliales radiaires assises sur le bord du ventricule et les met en contact avec des molécules signal pouvant ainsi influencer leur développement (**Fig.39B**).

3.3.1. Rôles du plexus choroïde et du LCR au cours du développement cortical

Plusieurs molécules signal circuleraient par le LCR et influeraient des étapes du développement neural cortical (**Fig.39 B**). Il a été montré que le facteur IGF2 stimule la prolifération des populations progénitrices en se liant aux récepteurs IGF localisés à la surface apicale et au niveau du cil primaire des cellules NEs et GRs (*Lehtinen et al., 2011*) (**Fig.38**). Le signal SHH est également capté par le cil via le récepteur patched, et promeut ainsi la prolifération des populations progénitrices (*Spassky et al., 2008*) (**Fig.38**). La voie FGF, quant à elle, a un rôle dans la régulation de la prolifération des progéniteurs mais aussi une action sur la taille et la fonction du cil primaire (*Neugebauer et al., 2009*) (**Fig.38**). Enfin il a été

montré que des signaux libérés par les plexus choroïdes au niveau du cerveau postérieur, comme le signal Wnt, pouvaient circuler dans le LCR et influencer le développement du telencéphale (*Johansson et al., 2013*) (**Fig.38**). Ces observations montrent l'implication des méninges et du LCR dans la neurogenèse et mettent en évidence la fonction clé du domaine apical dans la transmission du signal venant du ventricule (*Taverna et al., 2014*).

4. Malformations du développement cortical

La mutation de gènes impliqués dans le contrôle des processus clés de la corticogenèse tels que la prolifération, la division, ou encore la migration cellulaire, entraînent de nombreuses pathologies sévères de l'encéphale, notamment des malformations du développement cortical (MDC). Les MDCs définissent des anomalies du cortex cérébral à l'origine d'un retard mental souvent associée à une épilepsie. Bien que leur classification est complexe, elles peuvent être rassemblées en quatre groupes : les anomalies de la prolifération neuronale ou gliale, les anomalies de la migration neuronale, les anomalies dites "post-migratoires" (entre autres, les anomalies de la lamination corticale), et les anomalies dites "inclassables" (*Francis et al., 2006*).

4.1. Anomalies de la prolifération neuronale ou gliale

Les défauts de la prolifération neuronale ou gliale engendrent des microcéphalies (réduction du volume cortical), des mégalencéphalies (augmentation du volume cortical), et des dysplasies corticales focales (*Francis et al., 2006*). La diminution ou l'augmentation de la taille de l'encéphale est souvent liée soit à un défaut dans la balance division asymétrique/symétrique lors de la prolifération des progéniteurs pour la microcéphalie (*pour revue : Thornton and Woods., 2009*) ; soit à un défaut du processus d'apoptose ou du cycle cellulaire pour la mégalencéphalie (*pour revue : Barkovitch et al., 2012*).

4.2. Anomalies de la migration neuronale

Les défauts de migration neuronale sont à l'origine d'hétérotopies nodulaire péri-ventriculaire ou laminaire sous-corticale, et de lissencéphalies classique ou pavimenteuse. Les hétérotopies se traduisent par un regroupement de neurones, qui se produit à différents endroits (sous-cortical, péri-ventriculaire), de diverses tailles, et de formes différentes

(nodulaire ou laminaire). Les hétérotopies laminaires sous corticales, appelées aussi "double cortex" sont considérées comme une forme modérée de lissencéphalie et sont le résultat de la mutation du gène *DCX*. Les hétérotopies nodulaires péri-ventriculaires représentent la principale cause de MDC à l'âge adulte chez l'Homme. Elles se caractérisent par un arrêt précoce de la migration de certains neurones qui s'agrègent en nodule dans la ZV et sont dans certains cas, liées à une mutation dans le gène de la Filamine A (*FNLA*), gène codant pour une protéine se liant au réseau d'actine. La diminution de l'expression du gène *FNLA* entraîne une accumulation de neurones multipolaires qui ne parviennent pas à retrouver leur morphologie bipolaire (*Nagano et al., 2004*) (cf. Partie II, §2.3).

La lissencéphalie classique se caractérise chez l'Homme par un épaissement du cortex, avec un défaut de lamination corticale et l'absence ou la diminution des circonvolutions cérébrales engendrant un aspect lisse de la surface de l'encéphale. Ce phénotype reflète une incapacité des neurones à migrer au travers des neurones déjà en place dans la plaque corticale. Chez la souris, la mutation du gène *Lis1* (dont l'homologue est à l'origine d'une lissencéphalie classique chez l'Homme) entraîne un défaut de migration neuronale, une réduction de la PC et une diminution de l'étendue des zones ventriculaires (*Gambello et al., 2003*). Une autre forme de lissencéphalie classique se caractérise par la mutation dans le gène *DCX*. L'inactivation du gène *Dcx* par le modèle d'ARNi chez le rat entraîne un arrêt de la migration radiaire et une accumulation des neurones dans la ZI générant une hétérotomie neuronale semblable à celle observée chez l'Homme (*Bai et al., 2003*).

4.3. Anomalies post-migratoires

Les défauts post-migratoires engendrent, quant à eux, des polymicrogyries (PMG) (surface corticale irrégulière) et des dysplasies corticales focales (*Francis et al., 2006*). Les PMGs représentent le groupe des MDCs le plus répandu regroupant plusieurs types qui ont en commun la perte de l'organisation laminaire en six couches, une désorganisation des sillons et une fusion de la couche I (*Francis et al., 2006*). Les causes à l'origine des PMGs restent à ce jour difficile à caractériser. Elles pourraient être la conséquence d'un défaut de l'encrage du processus basal des cellules GRs au sein de la membrane piaie et/ou de l'intégrité de cette même membrane (*Jaglin et al., 2009*).

4.4. Tubulinopathies

Il existe également des MDCs relatives à la mutation d'un gène de la famille des tubulines regroupées sous le terme de "tubulinopathies". L'étude de ces mutations appuie l'importance des microtubules dans le développement neural cortical (cf. Partie II §2.3).

L'étude de la physiologie des populations progénitrices et neuronales actrices de la neurogenèse permet de mieux comprendre les mécanismes biologiques fondamentaux qui régissent le développement neural cortical. L'ensemble de ces travaux permet de clarifier certains aspects des processus cellulaires déréglés dans les MDCs, de mieux comprendre les mécanismes pathogéniques de diverses anomalies du développement et maladies neurodégénératives, et de contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

RÉSULTATS

I. Présence des acteurs de la voie des rétinoïdes au cours de la neurogenèse corticale

1. Contexte de l'étude

La signalisation rétinoïde contrôle plusieurs aspects du développement du système nerveux central. Elle est notamment impliquée dans la régionalisation du tube neural (cf. Introduction, Partie II, §1.3) ou encore dans la segmentation du rhombencéphale (cf. Introduction, Partie II, §1.3.1). L'AR est une petite molécule lipophile facilement diffusible. Il est suggéré que l'AR a un mode d'action par gradient et est capable d'agir à distance par rapport à son lieu de synthèse (cf. Introduction, Partie I, §2.4). Ainsi, il est probable que les acteurs de la transduction du signal, les RARs, participent de manière intrinsèque à l'activité AR en étant présents dans les tissus cibles, alors que les acteurs de la synthèse, les RDHs et les RALDHs, agiraient plutôt dans les tissus adjacents aux cellules cibles. Les enzymes responsables de la dégradation de l'AR, les CYP26A1-C1, seraient quant à elles présentes dans les tissus à préserver de la signalisation rétinoïde.

1.1. Présence des acteurs de la voie rétinoïde au cours du développement du SNC

Dans l'exemple de la régionalisation du tube neural, au stade gastrula et neurula, les enzymes RDH10 et RALDH2 produisent de l'AR dans la ligne primitive et les cellules du mésoderme postérieur (cf. Introduction, Partie I, §3.2.1-2), où est également exprimé le gène *Crbp1* (Ruberte et al., 1991). L'AR va diffuser vers le tissu adjacent qui est la région postérieure de la plaque neurale, où les gènes *Rara*, *Rarβ* et *Rarγ* sont exprimés (Ruberte et al., 1991, 1993 ; Abu-Abed et al., 2003). Le gradient d'AR progresse également vers le pôle antérieur qui doit être préservé du signal rétinoïde postériorisant. Les gènes des enzymes de dégradation CYP26A1 et C1, exprimés dans la région rostrale du neuroépithélium (Uehara et al., 2007) (cf. Introduction, Partie II, §1.1.2) vont métaboliser l'AR et maintenir ainsi le caractère "antérieur" du tissu.

Lors de la segmentation du rhombencéphale, il est suggéré que l'AR est nécessaire dans la spécification de l'identité des rhombomères postérieurs (pour revue : Niederreither and Dollé, 2008). L'AR est produit par RALDH2 dans le mésoderme pré-somitique et les somites (cf. Introduction, Partie I, §3.2.1-2). Les gènes *Rara* et *Rarβ* sont exprimés dans les territoires présomptifs des rhombomères postérieurs (limite des r6/7 pour *Rara* et *Rarβ* ; et r4 pour *Rara*) (Ruberte et al., 1991), alors que les gènes *Cyp26a1-c1* sont exprimés dans le

rhombencéphale plus antérieur (limites des r3/4 puis r2/3 pour *Cyp26a1*, limite r5/6 pour *Cyp26b1* et *Cyp26c1*) (cf. Introduction, Partie II, §1.3.1). Cette complémentarité d'expression permet à l'AR de diffuser dans le neuroépithélium du rhombencéphale adjacent et de spécifier l'identité des rhombomères postérieures sans agir sur ceux plus antérieurs (*pour revue : Maden, 2002*).

1.2. Présence des acteurs de la voie rétinienne dans le cerveau antérieur précoce

L'activité de l'AR débute dans le cerveau antérieur vers le stade E8,5, lorsque le gène *Raldh2* est exprimé de manière spécifique dans la région rostrale du neuroectoderme du cerveau antérieur, incluant un signal fort dans les territoires présomptifs du télencéphale (cf. Introduction, Partie I, §3.1 et §3.2.2) (*Ribes et al., 2006*). Cette expression est transitoire car à E9,5, l'expression de *Raldh2* s'estompe et ne reste prononcée que dans l'ectoderme de surface et les somites. Le gène *Raldh3* est également exprimé à partir de E8,5 et au moins jusqu'au stade E10,5 dans l'ectoderme de surface (*Ribes et al., 2006 ; Li et al., 2000*). Le gène *Rdh10* est détecté à E8 dans le mésoderme pré-somitique s'étendant de la base de la région de la tête jusqu'au nœud (*Cammas et al., 2007*). De E8,5 à E9, le gène *Rdh10* est exprimé dans la région rostrale de l'isthme du rhombencéphale au sein du cerveau moyen, à proximité du cerveau antérieur (*Cammas et al., 2007*).

Les précédents travaux de l'équipe réalisés sur les mutants *Raldh2*^{-/-} ont mis en évidence le rôle précoce de l'AR dans le contrôle de la prolifération et de la survie des cellules progénitrices dans l'épithélium neural prosencéphalique (*Ribes et al., 2006*) (cf. Introduction, Partie II, §1.3.2). Ceci suggère que la transduction du signal rétinienne a bien lieu au niveau du cerveau antérieur précoce. Bien que l'expression des gènes des RARs n'ait pas été illustrée en amont du cerveau postérieur, il est possible que ces gènes y soient exprimés à de faibles niveaux par l'épithélium neural du cerveau antérieur, et de manière suffisante pour induire les effets de l'AR (*pour revue : Dollé, 2009*).

Enfin, l'expression des gènes *Cyp26a1* et *Cyp26c1* s'estompe de la région antérieure de l'embryon et ceux-ci sont ré-exprimés dans la partie rostrale du cerveau postérieur vers E8,5 (*Sirbu et al., 2005b*). Le gène *Cyp26b1* n'est pas exprimé dans la région antérieure de l'embryon et commence son expression dès E8 dans les territoires présomptifs du cerveau postérieur (*Uehara et al., 2007*).

Les conditions semblent être réunies pour produire et transduire le signal rétinienne dans le cerveau antérieur au cours des stades précoces du développement. L'étude réalisée par

l'équipe sur le mutant *Raldh2*^{-/-} montre que l'absence du signal de l'AR entraîne de sévères défauts du développement du télencéphale (*Ribes et al., 2006*). Ceci démontre qu'un signal rétinoidé est nécessaire au cours du développement précoce du cerveau antérieur.

2. Problématique

Les acteurs de la voie rétinoidé sont-ils également présents au cours des étapes plus tardives du développement du cortex cérébral ? Quels sont les acteurs de la voie rétinoidé présents dans le cortex cérébral ? Dans quelles structures et à quel stade les retrouve-t-on ?

Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé une analyse par hybridation *in situ* (cf. §5.1, Matériel et méthodes) de l'expression des gènes de la voie rétinoidé dans le cortex cérébral en développement. Nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes codant pour les enzymes de la synthèse d'AR, dont celle de la première réaction d'oxydo-réduction, l'enzyme RDH10, ainsi que celles de la seconde étape de la synthèse, les RADLH1, RALDH2 et RALDH3. Nous avons également détecté l'expression des gènes des récepteurs de l'AR, les RAR α , β et γ , ainsi que l'expression des gènes des enzymes de dégradation, les CYP26A1, B1 et C1.

Pour pouvoir localiser l'expression des gènes dans les différentes structures de l'encéphale, l'étude a été réalisée sur trois niveaux de sections : un niveau rostral, région antérieure du cortex cérébral, en avant du plexus choroïde ; un niveau plus postérieur dans lequel le plexus choroïde se trouve dans le ventricule et un niveau caudal, région postérieure du cortex cérébral, où le ventricule s'allonge et où l'hippocampe apparaît en dessous du ventricule.

Pour suivre la dynamique de l'expression des gènes étudiés au cours du développement, nous avons réalisé notre analyse à différents stades : à E14,5, stade suivant le début de l'expression des gènes *Raldh2* et *Rdh10* dans les méninges ; à E16,5, stade en cours de neurogenèse et à E18,5, stade périnatal, de fin de neurogenèse.

3. Résultats

3.1. Enzymes de synthèse de l'AR

À E14,5, le gène *Raldh1* n'est pas exprimé dans les structures du cortex cérébral aux niveaux rostral, médian et caudal (**Fig.40A-C**). Au même stade, le gène *Raldh2* est détecté de manière homogène dans les méninges ventrales, latérales et dorsales (**Fig.40D-F**). Une expression plus forte est observée au niveau du plexus choroïde (**Fig.40E-E'**). Au stade E14,5, la majorité des structures corticales est également dépourvue de l'expression de *Raldh3* (**Fig.40G-I**), excepté un groupe de cellules au niveau de l'EGL et du noyau septal dans la région rostrale du cortex (**Fig.40G**). L'expression dans les méninges du gène *Rdh10* à E14,5 est semblable à celle du gène *Raldh2*, avec cependant un signal moins prononcé dans les méninges dorsales (**Fig.40J-L**). Le gène *Rdh10* présente une forte expression dans le plexus choroïde (**Fig.40K**) et une expression plus faible dans l'EGL (**Fig.40 visible en J**).

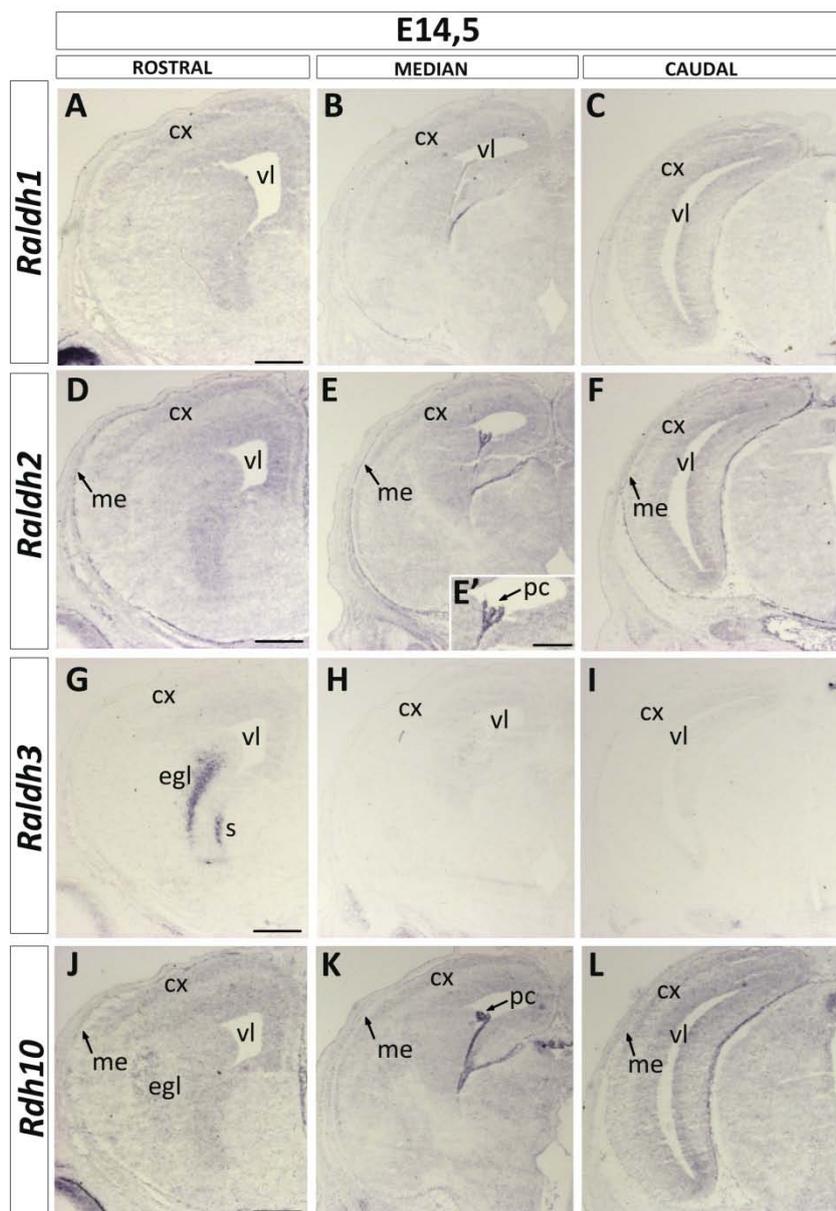


Figure 40. Expression des gènes codant pour les enzymes de synthèse de l'AR au stade E14,5

(A-L) Hybridation *in situ* sur coupes histologiques pour les gènes *Raldh1*, *Raldh2*, *Raldh3* et *Rdh10* au stade E14,5. Coupes coronales au niveau des régions rostrale (A, D, G, J), médiane (B, E, H, K) et caudale (C, F, I, L) du cortex cérébral d'un embryon contrôle. (E') Agrandissement de la région du plexus choroïde montrée en E. cx, cortex ; egl, éminence ganglionnaire latérale ; me, méninges ; pc, plexus choroïde ; s, septum ; vl, ventricule latéral. Échelles : 500µm, échelle en E' : 200µm.

Au stade E16,5, le gène *Raldh1* commence à être détecté dans les méninges ventrales avec une expression faible dans les méninges latérales et absente des méninges dorsales (**Fig.41A-C**). Un signal plus intense est détecté au niveau caudal dans le plexus choroïde (**Fig.41C**). À E16,5, l'expression du gène *Raldh3* s'intensifie dans l'EGL et le noyau septal de la région rostrale du cortex (**Fig.41G**). Aucune autre structure des niveaux médian et caudal ne présente une expression du gène *Raldh3* (**Fig.41H-I**). Les gènes *Raldh2* et *Rdh10* présentent une expression plus intense dans l'ensemble des méninges (**Fig.41D-F et J-L**) ainsi que dans le plexus choroïde (**Fig.41E-F et K-L**). L'expression du gène *Rdh10* s'intensifie également dans l'EGL (**Fig.41J**).

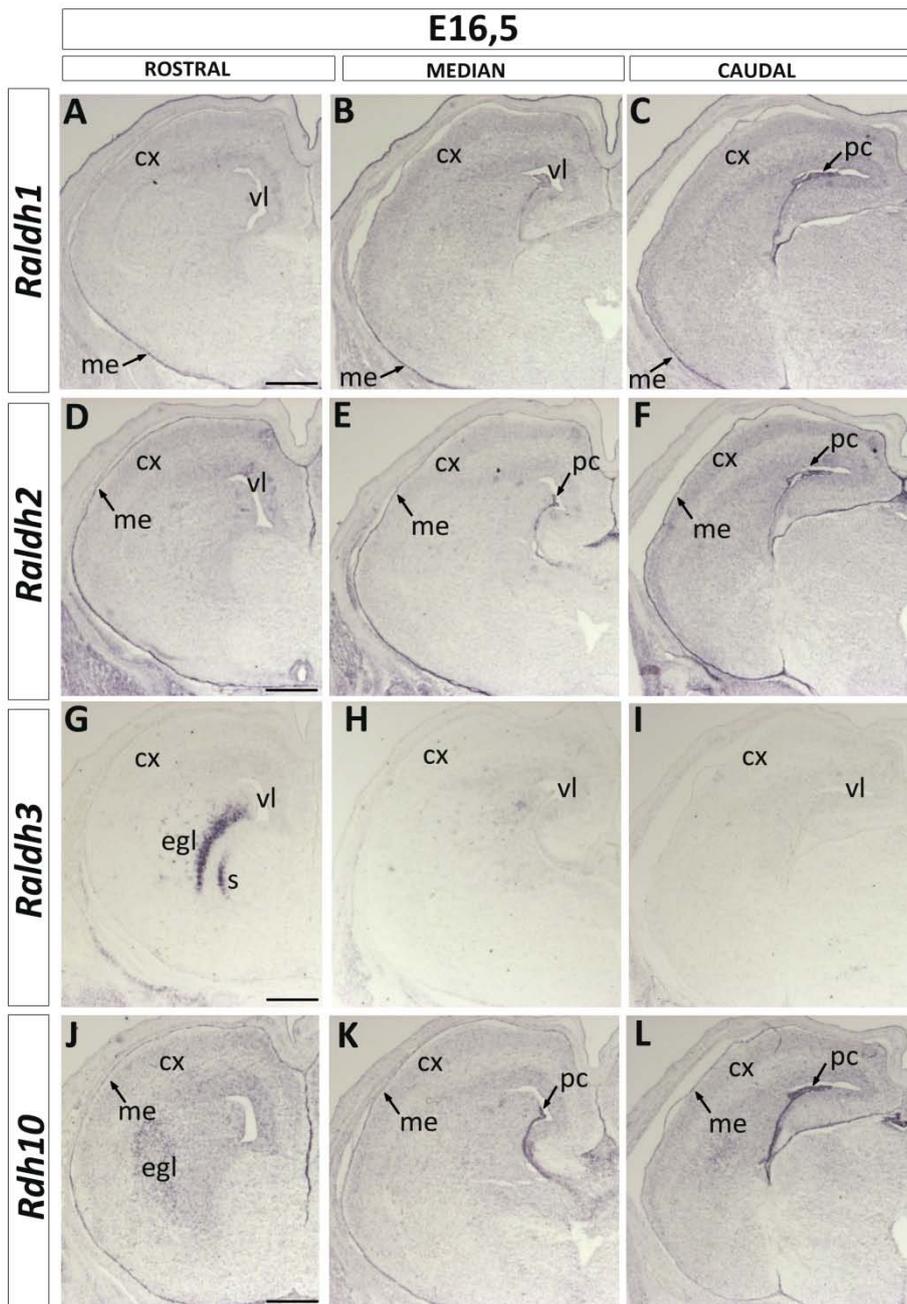


Figure 41. Expression des gènes codant pour les enzymes de synthèse de l'AR au stade E16,5

Hybridation *in situ* sur coupes histologiques pour les gènes *Raldh1*, *Raldh2*, *Raldh3* et *Rdh10* au stade E16,5. Coupes coronales au niveau des régions rostrale (**A, D, G, J**), médiane (**B, E, H, K**) et caudale (**C, F, I, L**) du cortex cérébral d'un embryon contrôle. cx, cortex ; egl, éminence ganglionnaire latérale ; me, méninges ; pc, plexus choroïde ; s, septum ; vl, ventricule latéral. Échelles : 500µm.

Enfin à E18,5, le gène *Raldh3* n'est plus exprimé par les structures corticales (**Fig.42G-I**). Le gène *Raldh1* est exprimé dans les méninges (**Fig.42A-C**) mais de manière moins intense que les gènes *Raldh2* et *Rdh10* (**Fig.42D-F et J-L**). L'expression du gène *Raldh1* diminue alors que celle des gènes *Raldh2* et *Rdh10* persiste dans le plexus choroïde (**Fig.42E et K-L**). L'expression du gène *Rdh10* reste détectable mais est diminuée à E18,5 dans l'EGL (**Fig.42 J**).

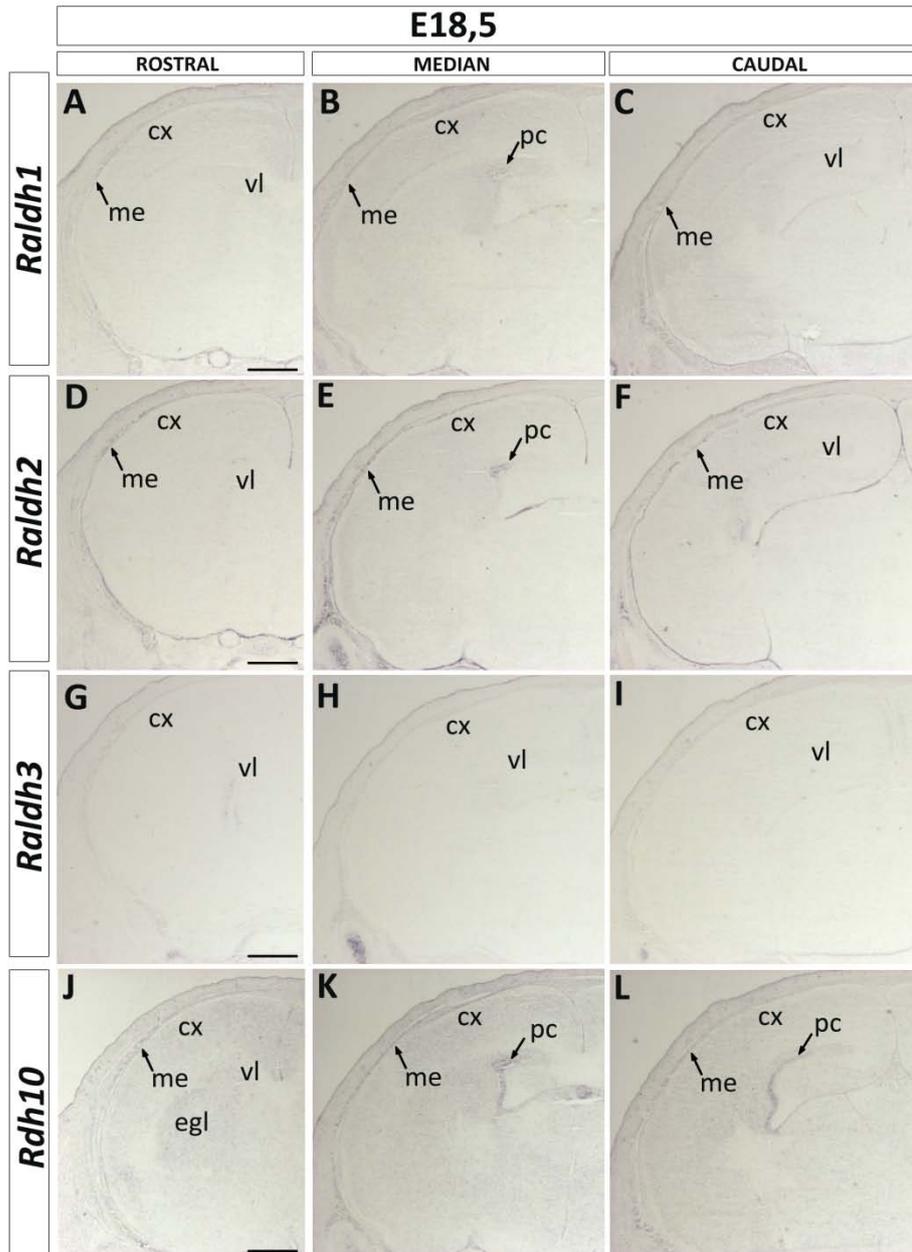


Figure 42. Expression des gènes codant pour les enzymes de synthèse de l'AR au stade E18,5

Hybridation *in situ* sur coupes histologiques pour les gènes *Raldh1*, *Raldh2*, *Raldh3* et *Rdh10* au stade E18,5. Coupes coronales au niveau des régions rostrale (**A, D, G, J**), médiane (**B, E, H, K**) et caudale (**C, F, I, L**) du cortex cérébral d'un embryon contrôle. cx, cortex ; egl, éminence ganglionnaire latérale ; me, méninges ; pc, plexus choroïde ; vl, ventricule latéral. Échelles : 500µm.

3.2. Récepteurs de l'AR

Au stade E14,5, le gène *Rara* est exprimé faiblement et de manière ubiquitaire dans l'ensemble du cerveau antérieur. Nous détectons cependant une expression plus intense dans le cortex (**Fig.43A-C**). Nous observons également une expression plus forte au niveau de la ZSV de l'EGL (**Fig.43A, B**), région adjacente à celle où s'exprime le gène *Rarβ*, également exprimé dans l'EGL mais dans un domaine étendu qui comprend le noyau caudé, le putamen et le noyau accumbens (**Fig.43D, E**). L'expression des gènes *Rara* et *Rarβ* est aussi détectée dans le plexus choroïde (**Fig.43B, E**). De plus, le gène *Rarβ* est exprimé dans les méninges aux niveaux rostral, médian et caudal (**Fig.43D-F**). L'expression du gène *Rary* est quant à elle très faible dans l'ensemble des structures corticales (**Fig.43G-I**).

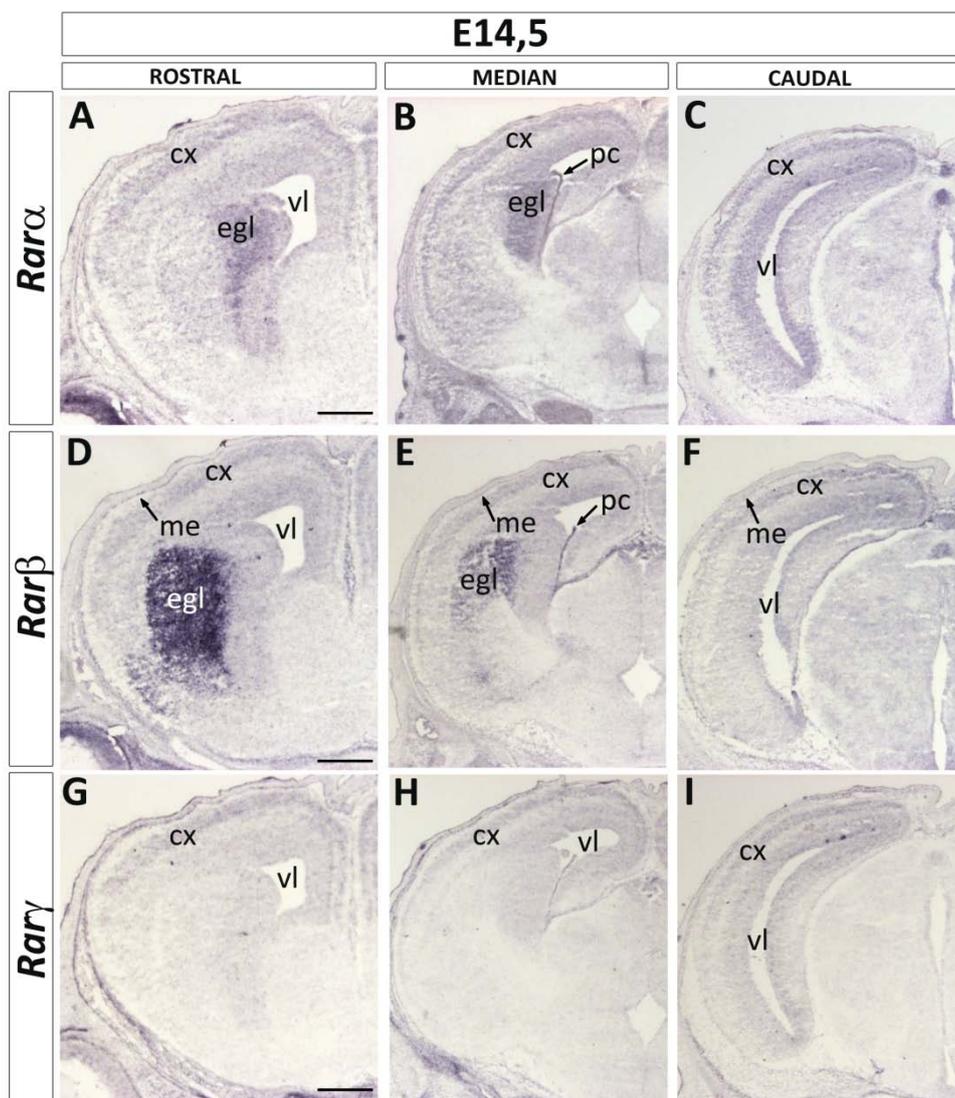


Figure 43. Expression des gènes codant pour les récepteurs de l'AR au stade E14,5

Hybridation *in situ* sur coupes histologiques pour les gènes *Rara*, *Rarβ* et *Rary* au stade E14,5. Coupes coronales au niveau des régions rostrale (**A, D, G**), médiane (**B, E, H**) et caudale (**C, F, I**) du cortex cérébral d'un embryon contrôle. cx, cortex ; egl, éminence ganglionnaire latérale ; me, méninges ; pc, plexus choroïde ; vl, ventricule latéral. Échelles : 500µm.

À E16,5, l'expression du gène *Rara* est détectée dans le cortex et l'EGL (**Fig.44A-C**) et reste plus prononcée dans le plexus choroïde (**Fig.44B, C**). Au même stade, le gène *Rarβ* est toujours exprimé dans l'EGL (**Fig.44D-F**) et le plexus choroïde (**Fig.44E, F**), avec une expression qui s'intensifie dans les méninges (**Fig.44D-F**). Le gène *Rarγ* montre, comme à E14,5, un signal faible et homogène dans l'ensemble de l'encéphale aux différents niveaux de section (**Fig.44G-I**).

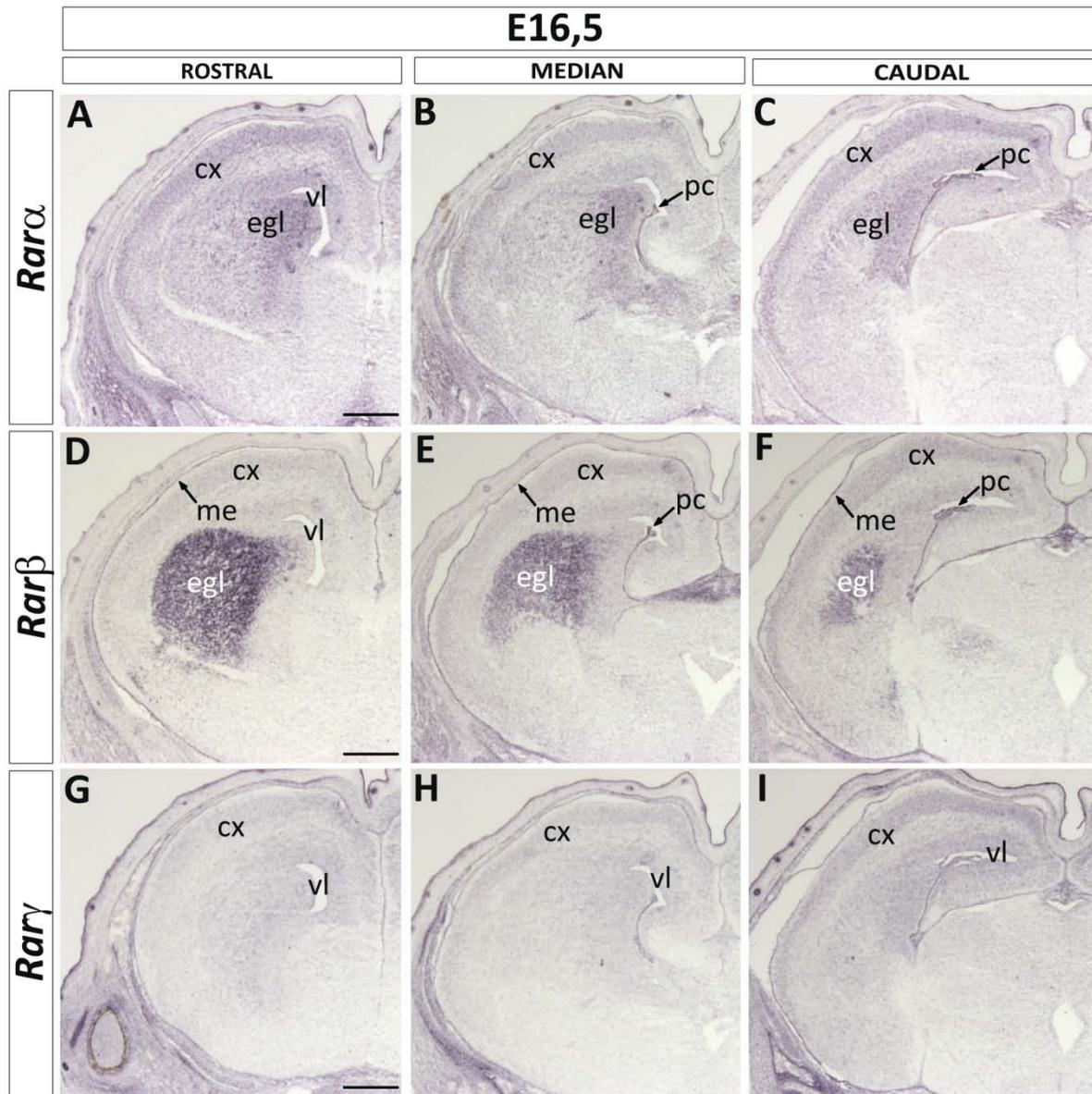


Figure 44. Expression des gènes codant pour les récepteurs de l'AR au stade E16,5

Hybridation *in situ* sur coupes histologiques pour les gènes *Rara*, *Rarβ* et *Rarγ* au stade E16,5. Coupes coronales au niveau des régions rostrale (**A, D, G**), médiane (**B, E, H**) et caudale (**C, F, I**) du cortex cérébral d'un embryon contrôle. cx, cortex ; egl, éminence ganglionnaire latérale ; me, méninges ; pc, plexus choroïde ; vl, ventricule latéral. Échelles : 500µm.

Au stade E18,5, l'expression du gène *Rara* est ubiquitaire et faible, mais est détectée dans le cortex, l'EGL et le plexus choroïde (**Fig.45A-C**). L'expression du gène *Rarb* est prononcée dans l'EGL, les méninges ainsi que dans le plexus choroïde (**Fig.45D-F**). En ce qui concerne le gène *Rary*, l'ensemble des structures corticales semblent dépourvues de son expression du niveau rostral au niveau caudal (**Fig.45G-I**).

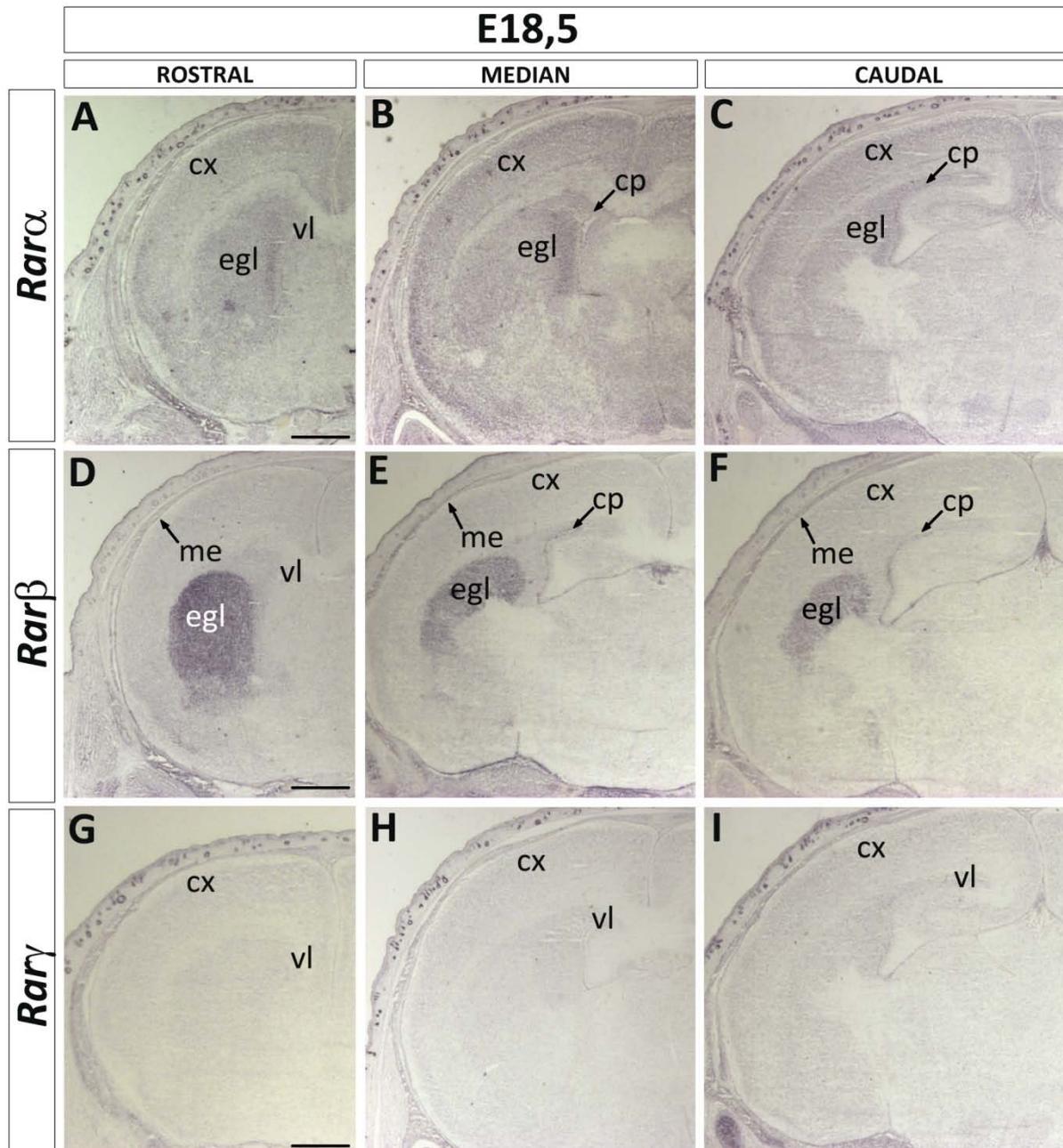


Figure 45. Expression des gènes codant pour les récepteurs de l'AR au stade E18,5

Hybridation *in situ* sur coupes histologiques pour les gènes *Rara*, *Rarb* et *Rary* au stade E18,5. Coupes coronales au niveau des régions rostrale (**A, D, G**), médiane (**B, E, H**) et caudale (**C, F, I**) du cortex cérébral d'un embryon contrôle. cx, cortex ; egl, éminence ganglionnaire latérale ; me, méninges ; pc, plexus choroïde ; vl, ventricule latéral. Échelles : 500µm.

3.3. Enzymes de la dégradation de l'AR

Du stade E14,5 au stade E18,5, les gènes *Cyp26a1* et *Cyp26c1* ne sont exprimés dans aucune des structures de l'encéphale aux niveaux rostral, médian et caudal (**Fig.46A-C et G-I, 47A-C et G-I, 48A-C et G-I**). Le gène *Cyp26b1* présente quant à lui des domaines d'expression spécifiques. En effet, au stade E14,5, *Cyp26b1* est exprimé dans le septum (**Fig.46D**), dans l'hippocampe (**Fig.46E, F**), ainsi que dans une population de cellules de l'EGM (**Fig.46E**).

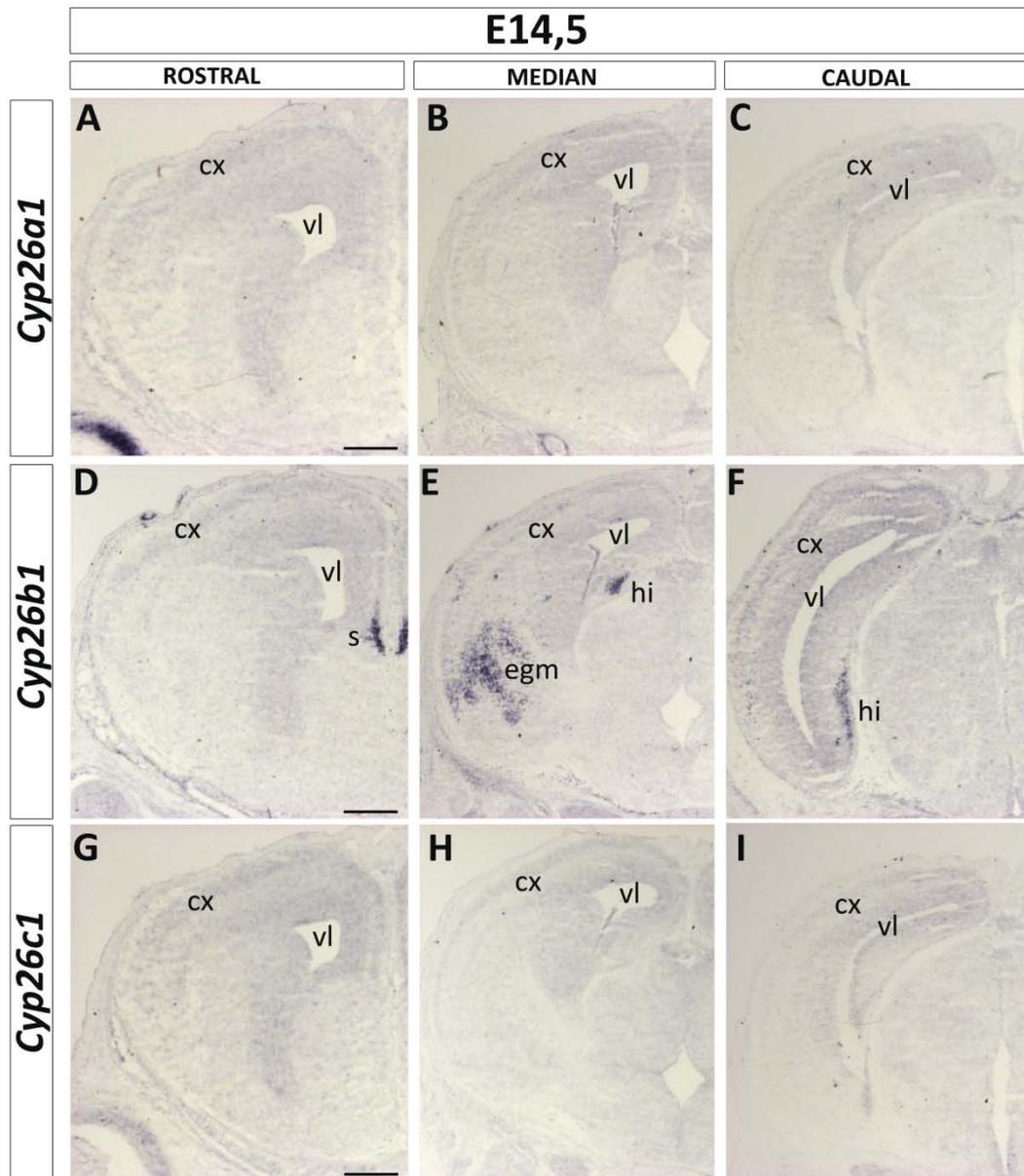


Figure 46. Expression des gènes codant pour les enzymes de dégradation de l'AR au stade E14,5
Hybridation *in situ* sur coupes histologiques pour les gènes *Cyp26a1*, *Cyp26b1* et *Cyp26c1* au stade E14,5. Coupes coronales au niveau des régions rostrale (**A, D, G**), médiane (**B, E, H**) et caudale (**C, F, I**) du cortex cérébral d'un embryon contrôle. cx, cortex ; egm, éminence ganglionnaire médiane ; hi, hippocampe ; s, septum ; vl, ventricule latéral. Échelles : 500µm.

À E16,5, l'expression du gène *Cyp26b1* s'intensifie dans le septum (**Fig.47D**), dans l'hippocampe (**Fig.47E-F**) et au niveau du pallidum et des capsules interne et externe de l'EGM (**Fig.47E-F**).

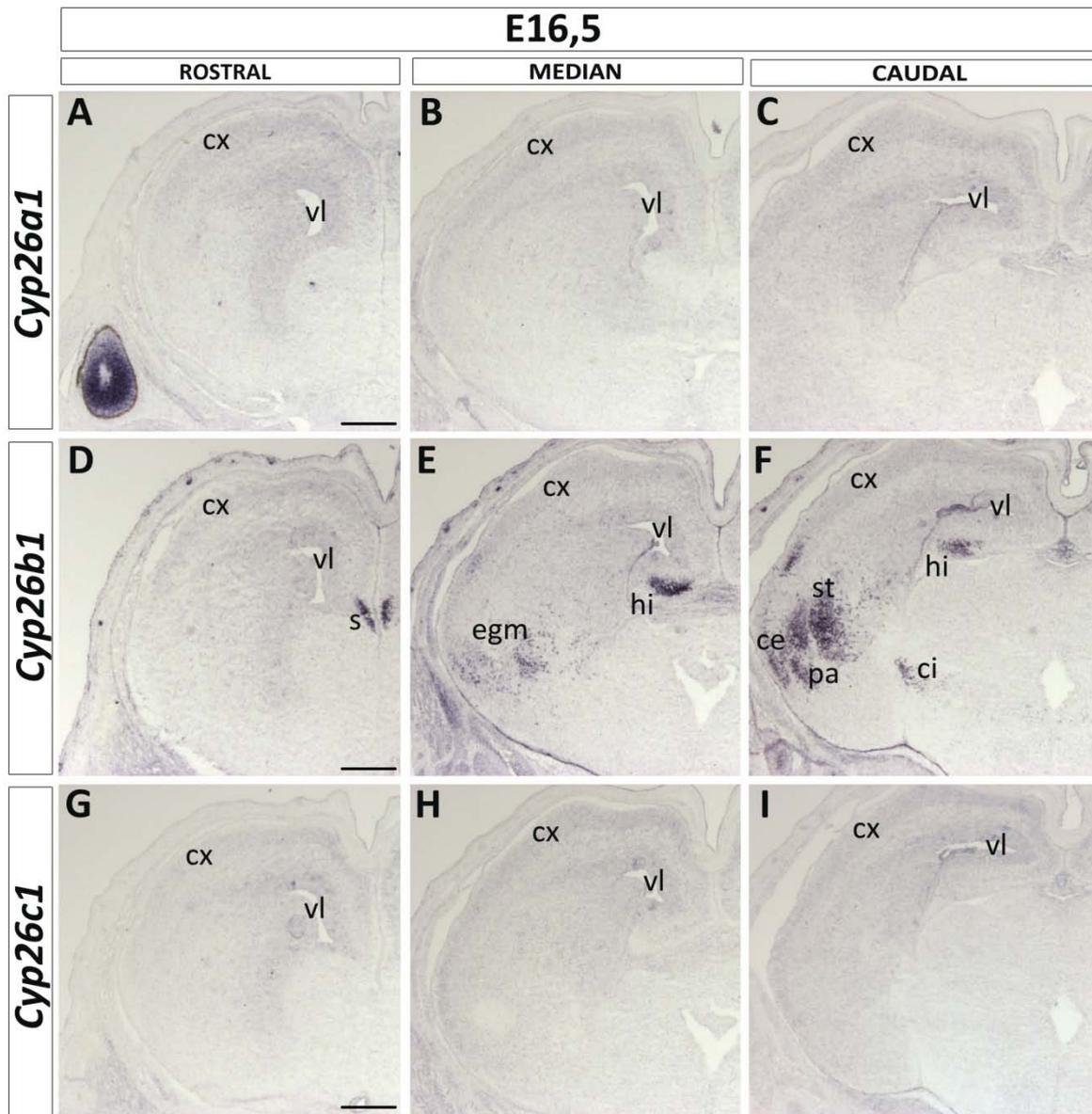


Figure 47. Expression des gènes codant pour les enzymes de dégradation de l'AR au stade E16,5
Hybridation *in situ* sur coupes histologiques pour les gènes *Cyp26a1*, *Cyp26b1* et *Cyp26c1* au stade E16,5. Coupes coronales au niveau des régions rostrale (**A, D, G**), médiane (**B, E, H**) et caudale (**C, F, I**) du cortex cérébral d'un embryon contrôle. ce, capsule externe ; ci, capsule interne ; cx, cortex ; egm, éminence ganglionnaire médiane ; hi, hippocampe ; pa, pallidum ; s, septum ; vl, ventricule latéral. Échelles : 500µm.

À E18,5, l'expression du gène *Cyp26b1* persiste dans le noyau septal (**Fig.48D-E**), se régionalise dans le gyrus dentelé et le domaine CA3 de l'hippocampe (**Fig.48E, F**), et dans les noyaux amygdaloïdes de l'EGM (**Fig.48E, F**).

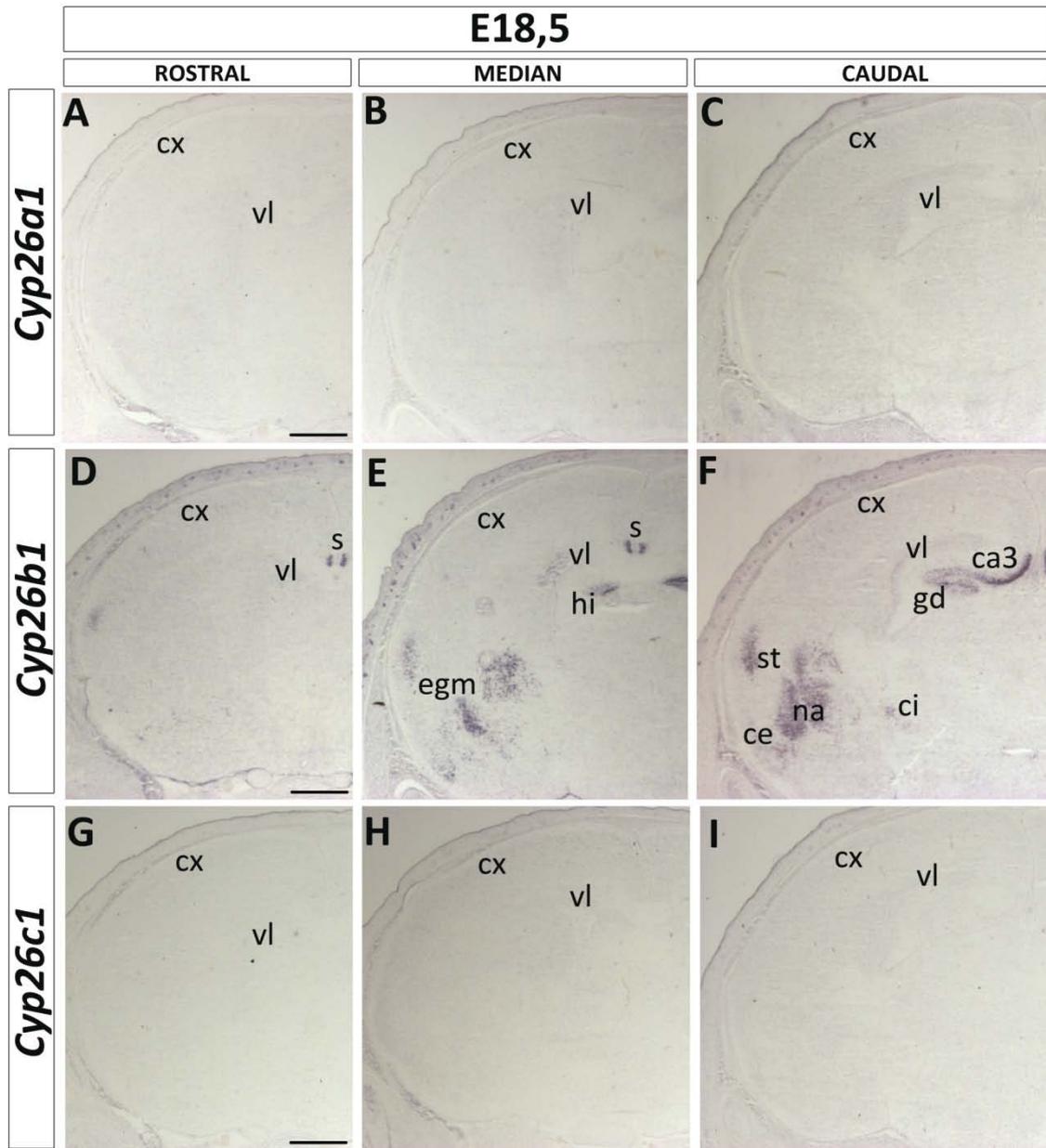


Figure 48. Expression des gènes codant pour les enzymes de dégradation de l'AR au stade E18,5
Hybridation *in situ* sur coupes histologiques pour les gènes *Cyp26a1*, *Cyp26b1* et *Cyp26c1* au stade E18,5. Coupes coronales au niveau des régions rostrale (**A, D, G**), médiane (**B, E, H**) et caudale (**C, F, I**) du cortex cérébral d'un embryon contrôlé. ca3, région CA3 de l'hippocampe ; ce, capsule externe ; ci, capsule interne ; cx, cortex ; egm, éminence ganglionnaire médiane ; gd, gyrus dentelé ; hi, hippocampe ; na, noyaux amygdaloïdes ; s, septum ; vl, ventricule latéral. Échelles : 500µm.

4. Conclusion

L'ensemble de ces résultats montre que les acteurs de la synthèse et de la transduction du signal rétinoidé sont présents dans les structures du cortex cérébral en développement.

Au niveau de l'encéphale, nos observations ont mis en évidence la présence du récepteur $RAR\alpha$ dans le cortex, alors que les récepteurs $RAR\beta$ et γ ne semblent pas y être localisés. Une autre étude appuie notre résultat en révélant la présence du récepteur $RAR\alpha$ dans le cortex cérébral murin à E18,5 (*Chatzi et al., 2011*). De plus, nous n'avons pas détecté la présence des enzymes de dégradation CYP26A1-C1 dans le cortex. Ceci suggère que le cortex cérébral constituerait un tissu cible de l'AR où la transduction du signal rétinoidé est possible.

Nous avons également montré que les enzymes de synthèse RDH10 et RALDH2 sont présentes de E14,5 à E18,5 dans les méninges ventrales, latérales et dorsales. L'enzyme RALDH1 est également présente dans les méninges, mais uniquement à partir du stade E16,5 dans les méninges ventrales, et est étendue aux méninges dorsales à E18,5. Une étude a montré par hybridation *in situ*, que l'expression du gène *Raldh1* commençait à E17 dans les méninges, mais qu'elle est nettement plus faible que celle du gène *Raldh2* au même stade (*Smith et al., 2001*). Ceci suggère que RALDH2 est la seule enzyme de la seconde réaction de synthèse d'AR présente dans les méninges dorsales jusqu'au stade E17. Ce qui fait de RDH10 et RALDH2 les enzymes responsables de la production de l'AR dans les méninges. Le récepteur $RAR\beta$ est également présent dans les méninges de E14,5 à E18,5, ce qui suggère que la production et l'induction du signal rétinoidé est possible dans ce tissu. Les méninges seraient potentiellement un tissu cible du signal rétinoidé ainsi qu'une source d'AR pour le cortex adjacent.

De manière intéressante, les enzymes de synthèse RDH10 et RALDH2 sont colocalisées avec les récepteurs $RAR\alpha$ et $RAR\beta$ de E14,5 à E18,5 au niveau du plexus choroïde. Le plexus choroïde constituerait ainsi une seconde source d'AR ayant également la capacité de transduire son signal. Enfin, au niveau de l'EGL, nous avons révélé la colocalisation des enzymes de synthèse RDH10 et RALDH3 avec les récepteurs $RAR\alpha$ et $RAR\beta$. Il faut noter également la présence de l'enzyme de dégradation CYP26B1 dans ce tissu. Le futur striatum constituerait ainsi un site de production, d'induction et de régulation de la signalisation rétinoidé.

L'ensemble de ces observations a permis de révéler la présence des récepteurs de l'AR dans le cortex ainsi que l'absence des enzymes de dégradation. Nous avons également confirmé la

présence des enzymes RDH10 et RALDH2 dans les méninges. Ainsi, tous les éléments sont réunis pour permettre une signalisation rétinéoïde au sein du cortex cérébral.

5. Matériel et méthodes

5.1. Hybridation *in situ* sur coupes histologiques

5.1.1. Synthèse des sondes marquées à la digoxygénine

Les sondes d'ARN antisens (*Rdh10*, *Raldh1*, *Raldh2*, *Raldh3*, *Rara*, *Rarβ*, *Rarγ*, *Cyp26a1*, *Cyp26b1*, *Cyp26c1*) sont synthétisées par transcription *in vitro* à partir d'ADN matriciels clonés dans des plasmides (BlueScriptII-KS+) comprenant les promoteurs de bactériophage T3 et T7. Les plasmides sont linéarisés (*Kpn1* pour *Rdh10*, *BamH1* pour *Raldh1*, *EcoR1* pour *Raldh2*, *BamH1* pour *Raldh3*, *Msc1* pour *Rara*, *Hind3* pour *Rarβ*, *Bgl2* pour *Rarγ*, *Nco1* pour *Cyp26a1*, *Hind3* pour *Cyp26b1* et *Xho1* pour *Cyp26c1*) de manière à ne transcrire que l'insert (transcription en "run-off"). Les promoteurs et ARN polymérase utilisés sont : T7 pour *Rdh10*, T7 pour *Raldh1*, T3 pour *Raldh2*, T7 pour *Raldh3*, T3 pour *Rara*, T7 pour *Rarβ*, T7 pour *Rarγ*, T7 pour *Cyp26a1*, T7 pour *Cyp26b1* et SP6 pour *Cyp26c1*. Les ARNs sont marqués par la digoxygénine, un groupement hapténique qui sera révélé par un anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline (Roche).

Pour réaliser la transcription *in vitro*, il y a incubation d'un mélange contenant 2 µg d'ADN matriciel linéarisé, les ribonucléotides ATP, GTP, CTP (1 mM), UTP (0,6 mM), l'UTP couplé à la digoxygénine (dig-UTP) 0,4 mM, ainsi que 20 unités de RNAsin (un inhibiteur de RNAses) et la polymérase adéquate (T7, T3 ou Sp6). Le mélange est incubé à 37°C pendant 1 h. Un aliquot (1 µl) de la réaction est analysé par électrophorèse en gel d'agarose pour évaluer la qualité de la transcription. Pour arrêter la réaction et précipiter l'ARN, 2,5 µl de LiCl 4 M et 2 µl d'EDTA 0,2 M sont ajoutés, puis 250 µl d'éthanol absolu. Le mélange est laissé à -80°C pendant 30 min, puis centrifugé pendant 15 min à 12000 tours/min. Le surnageant est éliminé, et 75 µl d'eau, 2,5 µl de LiCl 4 M et 75 µl d'éthanol sont ajoutés pour stockage à -20°C de l'ARN précipité. Avant l'utilisation, une centrifugation de 7 min à 4°C à 12000 tours/min est nécessaire, suivie d'un rinçage dans de l'éthanol 70%. Puis il y a re-centrifugation pendant 10 min et re-suspension dans 200 µl de tampon d'hybridation (formamide désionisée 50% ; dextran sulfate 10% ; ARNt de levure 1 mg/ml ; solution de Denhardt's 1x ; 0,195 M NaCl ; 5 mM Tris [pH 7,2] ; 1,13 M NaH₂PO₄ ; 0,4 M Na₂PO₄ ; 5

mM EDTA), et stockage à -20°C. Le jour de l'hybridation, la sonde est chauffée à 70°C pendant 10 min (dénaturation des structures secondaires de l'ARN), puis mise sur la glace.

5.1.2. Hybridation in situ

Les lames sont mises à température ambiante pendant 30 min. On dépose sur chaque lame 100 µl du tampon d'hybridation comprenant la sonde choisie, puis celles-ci sont recouvertes de lamelles. L'hybridation est réalisée O/N à 65°C dans une chambre humide (boîtes closes contenant du papier imbibé de 5x SSC [saline sodium citrate] et 50% formamide). La température d'hybridation et la présence de formamide (un agent dénaturant) donnent des conditions de stringence permettant l'appariement de longs ARN (ARNm/sonde), mais défavorisant les appariements avec des séquences partiellement identiques.

Le deuxième jour, les lamelles sont éliminées lors d'un premier lavage dans un mélange 50% formamide/5x SSC pendant 15 min à 68°C. Ce lavage est répété trois fois. Les lames sont transférées dans du tampon MABT (134 mM NaCl ; 100 mM acide maléique ; 0,1% Tween 20) (deux fois 30 min) avant d'être incubées deux heures dans du tampon de blocage (MABT ; 2% Blocking Reagent[®], Roche). Les sections sont ensuite incubées O/N à 4°C avec l'anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline (dilué 1:2500 dans le tampon de blocage). La phosphatase alcaline est une enzyme dont le BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) est un substrat artificiel qui, après déphosphorylation, est oxydé par le NBT (nitro blue tetrazolium chloride) pour donner un précipité bleu.

Le troisième jour, les sections sont lavées cinq fois 30 min dans du tampon MABT à RT. Elles sont alors rincées dans du tampon de coloration NTMT (0,25 M NaCl ; 0,1 M MgCl₂ ; 0,2 M Tris [pH 9,5] ; 0,1% Tween 20) deux fois 10 min à RT. Environ 200 µl de la solution de coloration (NBT 350 µg/ml, BCIP 350 µg/ml, dilués en NTMT) sont déposés sur les lames qui sont placées dans une chambre humide à l'abri de la lumière. La coloration est contrôlée régulièrement. Lorsque la réaction doit être arrêtée, les lames sont placées dans du PBS pendant quelques minutes, puis brièvement plongées dans de l'éthanol 100%. Après séchage, les lames sont montées sous lamelles en solution Eukitt[®].

II. Inactivation de la synthèse d'acide rétinolique

1. Contexte de l'étude

Les méninges constituent une source possible d'AR au cours du développement cortical. Nous avons confirmé que RALDH2 est la seule rétinaldéhyde déshydrogénase présente dans les méninges au moins jusqu'au stade E17.

L'expression spécifique du gène *Raldh2* dans les méninges suggère une fonction potentielle de ce gène à des stades plus avancés du développement cortical, ciblant la phase de neurogenèse. À ce jour, l'étude des fonctions tardives de *Raldh2* chez la souris n'a pas été possible à cause de la létalité embryonnaire des mutants nuls *Raldh2*^{-/-}. Les embryons meurent à E9,5 avant le début de la neurogenèse (E10-E12). C'est pourquoi il a été nécessaire de mettre en place de nouveaux outils expérimentaux qui nous permettent d'obtenir des embryons porteurs de la perte de fonction *Raldh2* au niveau méningé, mais sans déficience du système cardio-vasculaire.

2. Problématique

Comment inactiver le gène *Raldh2* en contournant la létalité embryonnaire ? La stratégie expérimentale adoptée répond-t-elle aux critères d'efficacité d'excision et de survie embryonnaire ?

Pour répondre à ces questions, nous avons élaboré trois modèles d'inactivation conditionnelle du gène *Raldh2* qui induisent une perte de fonction restreinte à un tissu, ou ne se réalisant qu'à partir d'un stade choisi (après E10,5).

Par mutation tissu-spécifique (lignée *Wnt1-Cre* croisée à la lignée *Raldh2*^{flox}), le gène *Raldh2* est excisé uniquement dans les cellules de la crête neurale, qui donneront naissance aux méninges. Les mutations conditionnelles permettent d'inactiver le gène *Raldh2* dans toutes les cellules de l'embryon de manière inductible par le tamoxifène (lignées *ROSA26-CreER*^{T2} et *CMV-CreER*^{T2} croisées à la lignée *Raldh2*^{flox}). Nous obtiendrons ainsi des embryons déficients en AR dans les structures cérébrales au cours de la phase de neurogenèse.

Nous avons pour l'ensemble de ces stratégies expérimentales vérifié l'efficacité d'excision de la recombinaise Cre sur une lignée rapportrice *ROSA26R* (Soriano, 1999b), ainsi que sur notre gène d'intérêt *Raldh2* floxé. Ce point est important car pour une même activité Cre, il

peut exister des séquences floxées qui s'excisent moins bien que d'autres. C'est notamment le cas du locus de la lignée *Raldh3^{flox}* (Dupé et al., 2003) qui réalise au mieux une excision incomplète sous l'action de la CMV-*CreER^{T2}*, quelle que soit le stade d'administration du TAM et la dose délivrée.

Nous avons également vérifié si la létalité embryonnaire a été surmontée dans les mutants conditionnels obtenus. Pour les lignées inductibles nous utilisons du tamoxifène qui est une substance particulièrement toxique. Nous avons ainsi mis au point un dosage et un temps de traitement qui permettront d'allier efficacité d'excision et survie embryonnaire.

3. Résultats

L'augmentation de la durée de vie des embryons mutants est la condition à remplir pour pouvoir étudier les fonctions tardives du gène *Raldh2*. Notre stratégie expérimentale est basée sur le système Cre-*LoxP* du bactériophage P1 (Stricklett et al., 1999). La recombinaise Cre permet la recombinaison des sites *LoxP* placés de part et d'autre du gène d'intérêt entraînant l'excision de la séquence "floxée". Le laboratoire d'accueil dispose de la lignée *Raldh2^{flox}* (Vermot et al., 2006) où l'exon 4 du gène *Raldh2* est floxé (Fig.49A). Cet exon code pour 42 acides aminés dont l'excision détruit le site actif de l'enzyme, produisant un allèle nul (Vermot et al., 2006).

3.1. Caractérisation de la lignée *Wnt1-Cre* : inactivation tissu-spécifique

Une lignée Cre que nous avons choisi d'utiliser exprime la recombinaise sous le contrôle du promoteur du gène *Wnt1* (Fig.49B). Le gène *Wnt1* codant pour une glycoprotéine ligand des récepteurs membranaires Frizzled et LRP5/6, est exprimé dès E8 dans les cellules des crêtes neurales qui sont à l'origine de la formation des méninges céphaliques entourant le cortex cérébral (Nichols and Bruce, 2006). Ainsi, la lignée *Wnt1-Cre* devrait permettre l'expression du transgène *Cre* dans les cellules précurseurs des méninges (Danielian et al., 1998), sans affecter le gène *Raldh2* dans le système cardio-vasculaire.

3.1.1. Validation de l'efficacité d'excision de la lignée *Wnt1-Cre*

L'un des critères que doit remplir la recombinaise Cre est d'avoir une activité satisfaisante. Nous avons ainsi contrôlé l'efficacité d'excision de la recombinaise par croisement avec la

lignée rapportrice *ROSA26R* (Soriano, 1999b), où le gène *LacZ* d'*E.coli* est inséré dans un gène d'expression ubiquitaire (*ROSA26*) en aval d'une séquence PGK-*neo*/Poly-A "floxée" (Fig.49C). Suite à l'action de la recombinaise Cre, la séquence PGK-*neo* est excisée et la séquence *LacZ* est traduite. Ceci permet la synthèse de l'enzyme β -galactosidase, dont l'activité est révélée par la présence cellulaire d'un produit bleu, témoin de la réaction de l'enzyme sur son substrat, le X-gal (cf. §5.2, Matériel et méthodes).

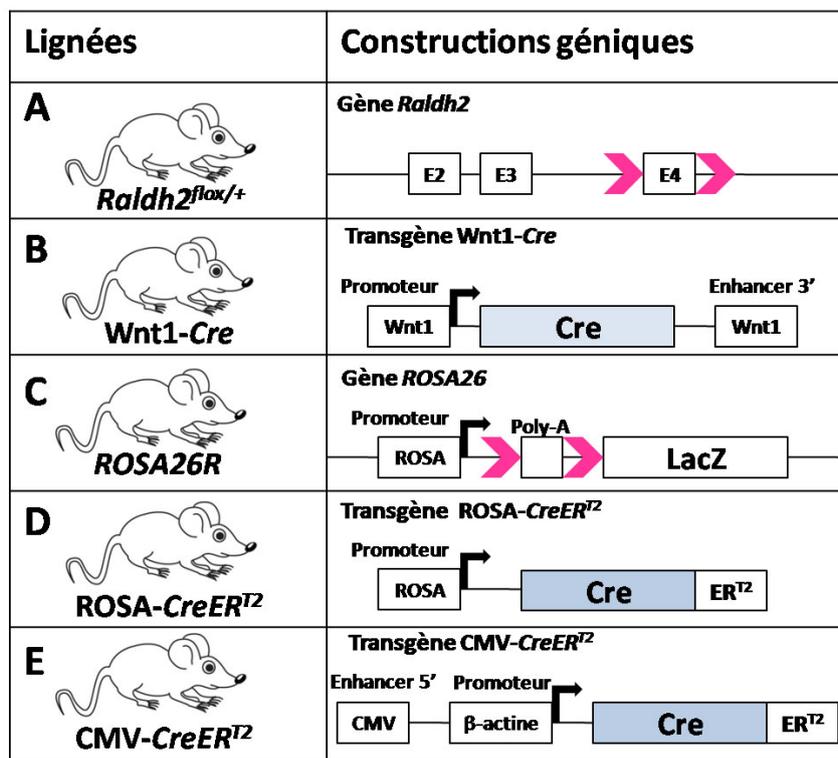


Figure 49 : Lignées de souris transgéniques et "knock-in" utilisées

(A) **Lignée *Raldh2*^{flox}** (Vermot *et al.*, 2006). L'excision de l'exon 4 du gène *Raldh2* est connue pour générer un allèle nul. Les souris homozygotes sont viables et fertiles. (B) **Lignée transgénique *Wnt1-Cre*** (Danielian *et al.*, 1998). Le gène codant pour la protéine Cre est sous le contrôle du promoteur et de l'enhancer 3' du gène *Wnt1*. (C) **Lignée "knock-in" rapportrice *ROSA26R*** (Soriano *et al.*, 1999). Pour créer cette lignée, une construction contenant une cassette PGK-*neo* et un signal de poly-adénylation (Poly-A) flanqués de sites *LoxP*, et suivis du gène *LacZ* a été inséré dans le gène ubiquitaire *Rosa26*. (D-E) **Lignées transgéniques *ROSA-CreER^{T2}*** (Vooijs *et al.*, 2001) et ***CMV-CreER^{T2}*** (Santagati *et al.*, 2006). Le gène codant pour la protéine de fusion Cre-ER^{T2} est sous le contrôle respectivement du promoteur ubiquitaire du gène *Rosa26* (D) et du promoteur ubiquitaire β -actine et de l'enhancer CMV (E).

Dans les embryons porteurs de l'allèle maternel *ROSA26R* et en absence de la recombinaise Cre, l'activité β -galactosidase n'est détectée dans aucune cellule de l'embryon (Fig.50A, A'). Dans les embryons porteurs du transgène *Wnt1-Cre* (par héritage paternel) et de l'allèle

maternel *ROSA26R*, nous détectons une activité β -galactosidase dans toutes les cellules dérivées des crêtes neurales, dont les méninges corticales (**Fig.50B, B'**).

Un autre critère que doit remplir la recombinaise Cre est d'avoir une activité satisfaisante sur notre gène d'intérêt. Nous avons ainsi vérifié que l'efficacité d'excision de la recombinaise Cre sur le gène *Raldh2* par immunodétection de la protéine RALDH2 (cf. §5.3, Matériel et méthodes) dans les embryons porteurs du transgène *Wnt1-Cre* et des deux allèles maternels *Raldh2* floxés (*Raldh2*^{flox/flox}). En absence du transgène Cre, le gène *Raldh2* est intact et la protéine RALDH2 est détectée dans les méninges, plus précisément au niveau de la pie-mère en développement (**Fig.50C**). Dans les embryons porteurs du transgène Cre, nous ne détectons pas RALDH2 dans les méninges (**Fig.50D**). L'ensemble de ces résultats valide le critère d'efficacité d'inactivation de la lignée *Wnt1-Cre*.

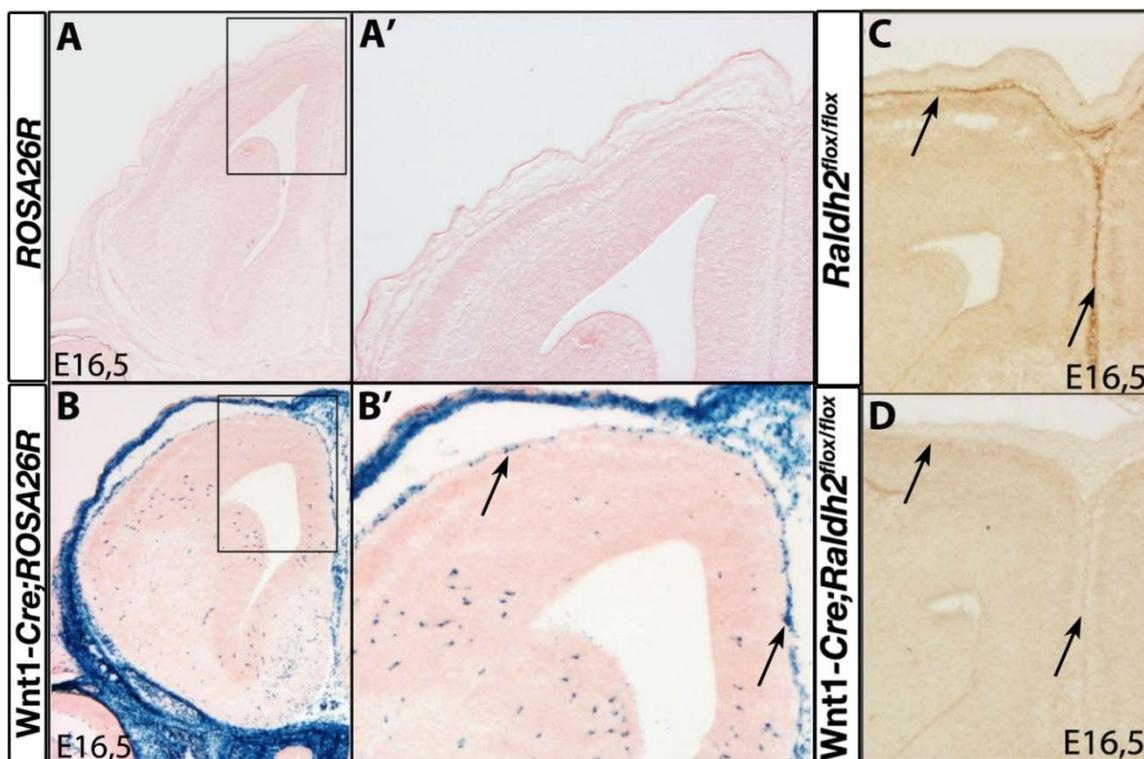


Figure 50 : Activité de la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur Wnt1

(A-D) Coupes coronales de télencéphale d'embryons au stade E16,5. (A-B') **Embryons analysés par coloration X-gal.** (A, A') Individu contrôle porteur de l'allèle *ROSA26R* et génotypé négatif pour le transgène *Cre*. Aucune activité β -galactosidase n'est détectée (absence de couleur bleue). (B, B') Individu porteur du transgène *ROSA26R* et génotypé positif pour le transgène *Cre*. L'activité β -galactosidase (cellules bleues) est détectée dans les méninges (B, flèches en B'), et dans d'autres cellules dérivées des crêtes neurales. (A', B') Agrandissements des régions encadrées en A, B. (C, D) **Embryons analysés par immunohistochimie pour la protéine RALDH2.** (C) Individu contrôle porteur des allèles *Raldh2* floxés et génotypé négatif pour le transgène *Cre*. La protéine RALDH2 est détectée spécifiquement dans les méninges (flèches). (D) Individu porteur des deux allèles floxés et génotypé positif pour le transgène *Cre*. La protéine RALDH2 n'est pas détectée dans les méninges (flèches), indiquant une excision correcte des deux allèles *Raldh2*.

3.1.2. Viabilité des embryons mutants générés par les lignées *Wnt1-Cre* et *Raldh2^{fl}*

Une fois le système d'inactivation validé, le prochain critère important est la viabilité des embryons porteurs de la mutation. Aucun mutant *Wnt1-Cre ; Raldh2^{fl/fl}* n'a pu être collecté au jour post-natal (P) 4 alors qu'ils sont obtenus en fréquence mendélienne à E18,5 et à la naissance (**Tableau 5**). Nous avons observé que la majorité des nouveau-nés deviennent cyanotiques et meurent par suffocation dans les 10h suivant la naissance. Nous avons mis en évidence par des analyses morphologiques (**Fig.51A-F**) et histologiques (**Fig.51G-J**), la présence d'une fente palatine dans les embryons mutants (**Fig.51D-F et I, J**).

Stade	Nombre de portées	Nombre d'embryons	Génotype <i>Wnt1-Cre ; Raldh2^{fl/+}</i>	Génotype <i>Raldh2^{fl/+}</i>	Génotype <i>Raldh2^{fl/fl}</i>	Génotype <i>Wnt1-Cre ; Raldh2^{fl/fl}</i>	Nombre d'embryons morts
P0	20	175	45	49	45	10 (6%)	23 (14%)
E18,5	4	40	3	11	12	13 (32%)	1 (2%)
E14,5	11	108	28	29	25	26 (24%)	0

Tableau 5 : Fréquence des génotypes obtenus par croisement des lignées *Wnt1-Cre* et *Raldh2^{fl}*

Report en nombre d'embryons des différents génotypes obtenus lors du croisement des lignées *Wnt1-Cre* et *Raldh2^{fl}* aux stades P0, E18,5 et E14,5. Calcul du pourcentage des embryons porteurs du transgène *Wnt1-Cre* et de deux copies de l'allèle *Raldh2^{fl}* (violet) ainsi que du pourcentage d'embryons morts retrouvés dans la portée (rouge). (*données non publiées du Dr. Rhinn*)

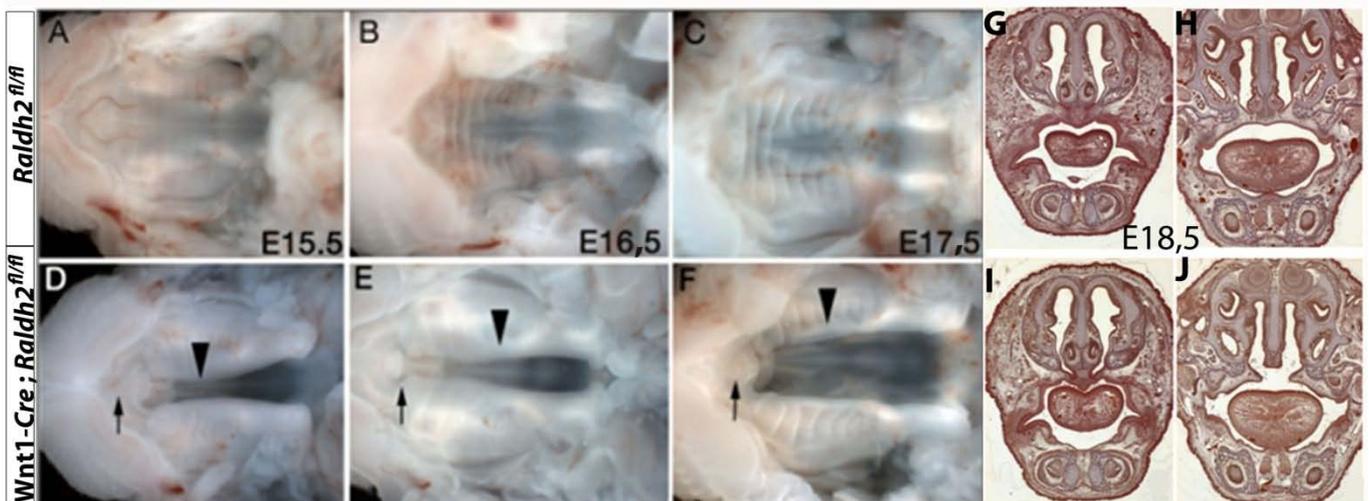


Figure 51 : Palatogenèse chez les mutants *Wnt1-Cre ; Raldh2^{fl/fl}*

(A-F) Vue du palais d'embryons contrôles (A-C) et mutants (D-F) aux stades E15,5 (A, D), E16,5 (B, E) et E17,5 (C, F). Les flèches indiquent le palais primaire et les têtes de flèches montrent l'absence de la fusion du palais secondaire. (G-J) Coupes coronales colorées en trichrome de Mallory de la région fronto-nasale rostrale (G, I) et médiane (H, J) d'embryons contrôles (G, H) et mutants (I, J) au stade E18,5. (*données non publiées du Dr. Rhinn*)

Chez la souris la formation du palais se réalise de E11,5 à E17 (*Bush and Jiang, 2012*) (**Fig.52A**). À E11,5, le processus nasal médian fusionne avec les bourgeons maxillaires (**Fig.52B**) faisant apparaître le palais primaire primitif et les processus palatins (PP). Les PP réalisent ensuite une phase de croissance verticale jusqu'à environ E13,5 (**Fig.52C**). Au stade E14, une phase d'élévation s'opère au cours de laquelle les PP verticaux s'orientent de manière horizontale (**Fig.52D**). À E15, ils croissent, se rejoignent au niveau de la ligne médiane et fusionnent pour former le palais secondaire (**Fig.52E**). Au cours des prochains stades du développement, le palais secondaire fusionnera ensuite avec le palais primaire (**Fig.52F**).

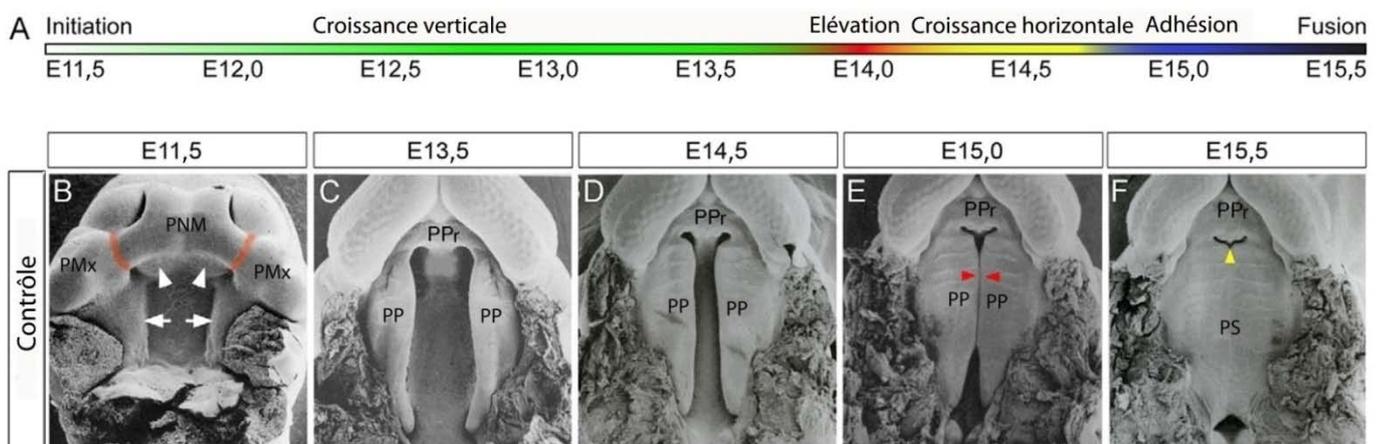


Figure 52 : Palatogenèse chez la souris

(A) Grandes étapes du développement du palais au cours du temps chez la souris. (B-F) Vue au microscope à balayage de l'évolution du développement du palais d'un embryon contrôlé aux stades E11,5 (B), E13,5 (C), E14,5 (D), E15 (E) et E15,5 (F). En B, les flèches mettent en évidence l'apparition des processus palatins et les têtes de flèches blanches indiquent celle du palais primaire primitif. Les lignes oranges marquent les points de fusion entre le processus nasal médian et les processus maxillaires. En E, les têtes de flèches rouges indiquent la fusion des deux processus palatins au niveau de la ligne médiane. En F, la tête de flèche jaune montre la fusion du palais secondaire avec le palais primaire. PMx, processus maxillaire ; PNM, processus nasal médian ; PP, processus palatin ; PPr, palais primaire ; PS, palais secondaire. (*adapté de Bush and Jiang, 2012*)

Les embryons mutants *Wnt1-Cre ; Raldh2^{flox/flox}* présentent à E15,5 un espace entre les processus palatins qui persiste jusqu'à la naissance (**Fig.51D-F et I, J**). Le palais primaire se forme correctement et le processus d'élévation des PPs a bien lieu dans les embryons mutants (**Fig.51D-F et J**). Cependant, les mutants présentent un défaut de croissance et de fusion des PPs, résultant en une absence de palais secondaire (**Fig.51D-F et J**). Ces observations mettent en évidence une fonction tardive du gène *Raldh2* dans la formation du palais et le rôle de l'AR dans le développement tardif des processus de la tête.

Nous avons ainsi montré que la mutation conditionnelle $Wnt1-Cre ; Raldh2^{lox/lox}$ est létale au stade P0. Nous n'avons pas retenu cette stratégie d'inactivation car bien qu'elle remplisse les critères d'efficacité d'excision, elle compromet la viabilité des mutants à P4, stade requis dans l'analyse des fonctions tardives du gène *Raldh2* au cours de la neurogenèse.

3.2. Caractérisation des lignées ROSA- et CMV-Cre ER^{T2} : inactivation inductible

Deux autres lignées que nous avons choisi d'utiliser expriment la recombinaise Cre de façon ubiquitaire et inductible grâce au système $CreER^{T2}$ (Metzger and Chambon, 2007). La recombinaise Cre est exprimée sous le contrôle d'un promoteur/enhancer à activité ubiquitaire, le promoteur du gène *Rosa26* (Vooijs et al., 2001) (Fig.49D), ou en aval d'une construction comprenant le promoteur β -actine de poulet et la région régulatrice du virus CMV (Santagati et al., 2005) (Fig.49E). Pour la rendre inductible, la protéine Cre a été fusionnée à une forme mutante du domaine de liaison du ligand du récepteur aux oestrogènes (ER^{T2}). La mutation présente dans le domaine ER^{T2} empêche la fixation du ligand naturel, le 17 β -oestradiol, mais permet celle du tamoxifène (TAM). Le transgène est exprimé dans toutes les cellules de l'organisme, mais la protéine Cre ne peut agir du fait de la liaison sur ER^{T2} de la protéine Hsp90 (heat shock protein 90) qui la séquestre dans le cytoplasme (Fig.53A). Le TAM va permettre, par sa liaison au domaine ER^{T2} , un changement de conformation libérant Hsp90. La protéine $CreER^{T2}$ peut alors être internalisée dans le noyau, où elle pourra exciser le gène d'intérêt (Fig.53B). Les lignées ROSA- $CreER^{T2}$ et CMV- $CreER^{T2}$ permettent d'exprimer la protéine $CreER^{T2}$ dans toutes les cellules de l'embryon, mais son action sera contrôlée par une administration de TAM au moment choisi. Nous allons ainsi donner le TAM à partir de E9,5, avant le début de la neurogenèse corticale.

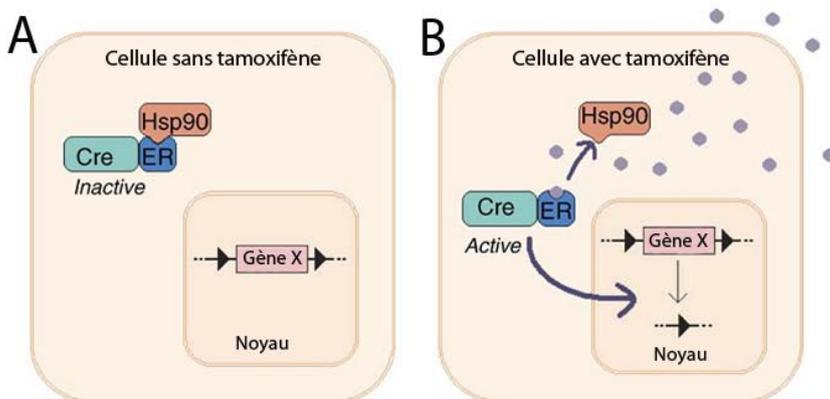


Figure 53 : Action de la protéine $CreER^{T2}$

(A) En absence de TAM, la $Cre-ER^{T2}$ est liée à la protéine Hsp90 et est séquestrée dans le cytoplasme. Le gène cible reste intact. (B) L'entrée de la recombinaise dans le noyau est possible grâce au TAM qui se fixe sur le domaine ER^{T2} , entraînant un changement de conformation qui libère la Hsp90 et permet la translocation nucléaire. (adapté Tian et al., 2006)

3.2.1. Critères d'efficacité d'excision et de viabilité de la lignée ROSA-CreER^{T2}

Le TAM est un produit dont la toxicité peut nuire à la mère et ses embryons. Il est donc important d'optimiser l'administration de TAM c'est-à-dire le moment, la fréquence et les doses à administrer. Nous avons testé deux modes d'administration : l'injection intra-péritonéale et le gavage (cf. §5.4, Matériel et méthodes). Pour tester l'activité de la recombinase, une révélation de l'activité β -galactosidase est effectuée sur des embryons porteurs du transgène ROSA-CreER^{T2} par héritage paternel et du rapporteur ROSA26R par héritage maternel.

Nous avons testé l'administration de 1 mg de TAM par injection intra-péritonéale à E9,5. La révélation au X-gal montre une excision mosaïque pour l'ensemble des embryons de la portée (n=4/4 embryons analysés) s'accompagnant d'un taux moyen de létalité (21%) (**Tableau 6**). Lorsque deux injections de 1 mg chacune sont réalisées aux stades E9,5 et E10,5, il n'y a cette fois-ci aucun mort (**Tableau 6**), mais l'excision n'est toujours que majoritairement mosaïque (n=6/7) voire nulle (n=1/6). Ces deux conditions de traitement mettent en évidence une variabilité dans la létalité des embryons et une activité d'excision au mieux mosaïque.

Lignées inductibles	Stade d'injection	Dose totale de TAM injecté	Nombre d'embryons total (n= nombre de portées)	Nombre d'embryons morts
ROSA-CreER ^{T2}	E9,5	1 mg	29 (n=3)	6 (21%)
ROSA-CreER ^{T2}	E9,5 + E10,5	2 mg	21 (n=3)	0
CMV-CreER ^{T2}	E10,5 + E11,5	2 mg	25 (n=3)	0

Tableau 6 : Viabilité des embryons après l'administration de TAM par injection intra-péritonéale
Report en nombre d'embryons du critère de viabilité après injection intra-péritonéale de différentes doses de TAM (1 à 2mg) à différents stades (E9,5, E10,5, E11,5 et combinés) pour les lignées inductibles ROSA- et CMV-CreER^{T2}. Calcul du pourcentage des embryons morts retrouvés dans la portée (rouge).

Nous avons ensuite observé qu'une administration de 10 mg de TAM par gavage maternel à E10,5 entraîne une mortalité peu élevée (12%) des embryons (**Tableau 7**), mais l'excision présente une forte variabilité intra-portée. En effet dans les embryons porteurs du transgène ROSA-CreER^{T2} et de l'allèle ROSA26R, nous détectons une activité β -galactosidase ubiquitaire (n=1/4, **Fig.54A, A'**), mosaïque (n=1/4, **Fig.54B, B'**) voire absente (n=2/4, **Fig.54C, C'**). Pour diminuer cette variabilité, nous avons décidé de réaliser deux gavages successifs aux stades E9,5 et E10,5, de 10mg chacun. La révélation au X-gal montre une activité ubiquitaire chez la majorité des embryons (n=4/6, **Fig.54D-E'**) avec cependant des cas où l'excision est mosaïque (n=2/6, **Fig.54F, F'**). De plus, la létalité embryonnaire

augmente et atteint 35% (**Tableau 7**). Nous avons également testé un gavage de 10 mg aux stades E10,5 et E11,5. Dans ces conditions, nous obtenons une efficacité d'excision de 100% (n=3/3, **Fig.54G-H'**) mais elle s'accompagne d'une forte létalité (45%) des embryons (**Tableau 7**). L'ensemble de ces tests montrent qu'un gavage de 10 mg permet une bonne survie des embryons mais l'efficacité d'excision est alors relativement variable. Avec deux gavages, nous notons une efficacité d'excision améliorée à optimale, mais une augmentation modérée à forte de la létalité embryonnaire.

Lignées inductibles	Stade de gavage	Dose totale de TAM gavé	Nombre d'embryons total (n= nombre de portées)	Nombre d'embryons morts
ROSA- <i>CreER</i> ^{T2}	E10,5	10 mg	16 (n=2)	2 (12%)
ROSA- <i>CreER</i> ^{T2}	E9,5 + E10,5	20 mg	46 (n=5)	16 (35%)
ROSA- <i>CreER</i> ^{T2}	E10,5 + E11,5	20 mg	31 (n=4)	14 (45%)
CMV- <i>CreER</i> ^{T2}	E9,5	5mg	7 (n=2)	2 (29%)
CMV- <i>CreER</i> ^{T2}	E9,5 + E10,5	10mg	7 (n=1)	1 (14%)
CMV- <i>CreER</i> ^{T2}	E10,5 + E11,5	10mg	11 (n=2)	1 (9%)
CMV- <i>CreER</i> ^{T2}	E10,5	10mg	13 (n=2)	1 (7%)

Tableau 7 : Viabilité des embryons après l'administration de TAM par gavage maternel

Report en nombre d'embryons du critère de viabilité après gavage maternel de différentes doses de TAM (5, 10 ou 20 mg) à différents stades (E9,5, E10,5, E11,5 et combinés) pour les lignées inductibles ROSA- et CMV-*CreER*^{T2}. Calcul du pourcentage des embryons morts retrouvés dans la portée (rouge).

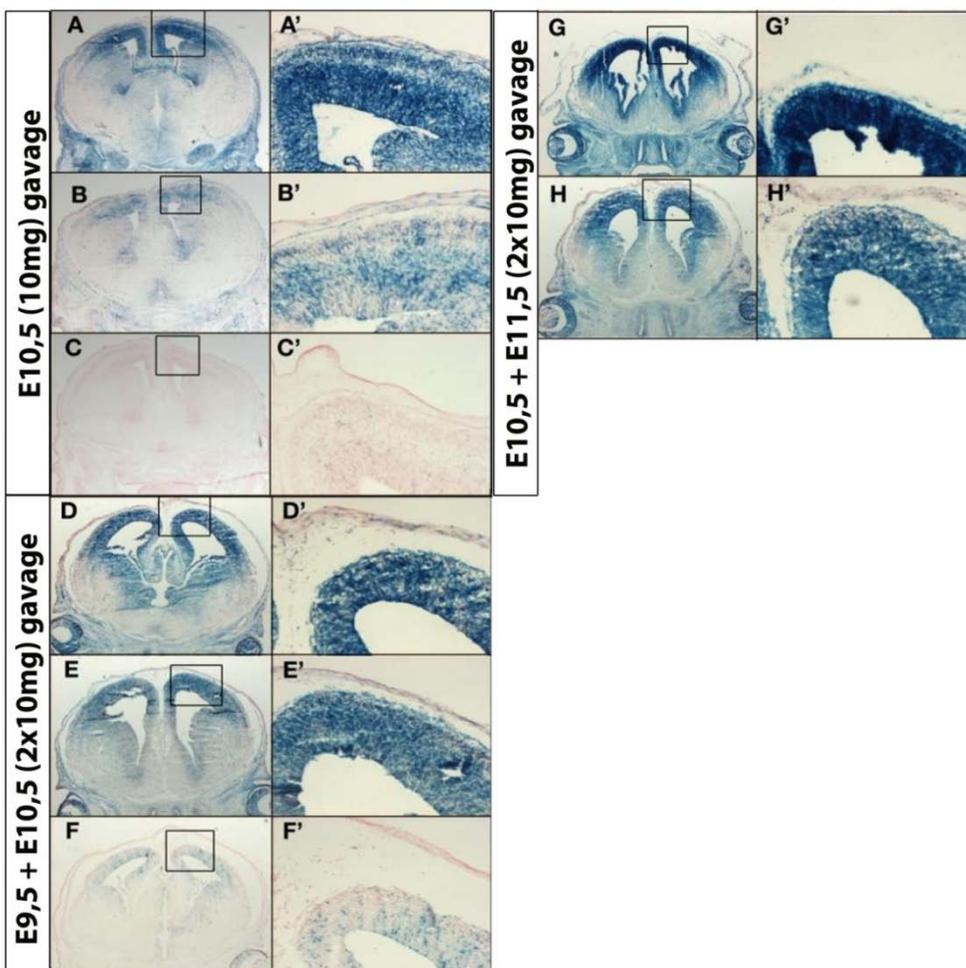


Figure 54 : Niveau d'excision de la *CreER*^{T2} induit par gavage dans la lignée ROSA-*CreER*^{T2}

(A-H') : Coupes coronales révélées au X-gal de la région médiane du cortex cérébral d'embryons porteurs de l'allèle *ROSA26R* et du transgène ROSA-*CreER*^{T2} au stade E16,5. (A', B', C', D', E', F', G' et H') Agrandissements des zones encadrées correspondantes. Les embryons sont analysés après gavage maternel de différentes doses de TAM (10 à 20 mg) à différents stades (E9,5, E10,5, E11,5 et combinés).

3.2.2. Critères d'efficacité d'excision et de viabilité de la lignée CMV-CreER^{T2}

Après l'analyse des résultats obtenus pour la lignée ROSA-CreER^{T2}, nous avons voulu savoir si l'activité de la CreER^{T2} placée sous la dominance d'un autre promoteur ubiquitaire serait plus satisfaisante. Nous avons ainsi testé la lignée CMV-CreER^{T2} en suivant la même méthodologie que celle faite pour la lignée ROSA-CreER^{T2}, à l'exception de la concentration du TAM dans les administrations par gavage. Nous avons décidé de concentrer davantage le TAM (cf. §5.4, Matériel et méthodes) pour réduire la quantité d'huile gavée. En effet, pour une même quantité de TAM administré, la dose d'huile sera moins importante et cela facilitera l'assimilation de la solution TAM/huile par la femelle gestante.

Nous observons que lorsque 1 mg de TAM est injecté aux stades E10,5 et E11,5, l'activité β -galactosidase est au mieux mosaïque (n=2/13, **Fig.55A, A'**), voire limitée à quelques cellules seulement (n=2/13, **Fig.55B, B'**) ; la majorité des embryons ne montrent pas d'activité β -galactosidase (n=9/13, **Fig.55C, C'**). Ce traitement n'entraîne pas de létalité embryonnaire. Bien que ces conditions d'administration du TAM permettent une survie de la totalité de la portée, elles ne résultent pas en une excision efficace par la recombinase CreER^{T2} et sont donc abandonnées.

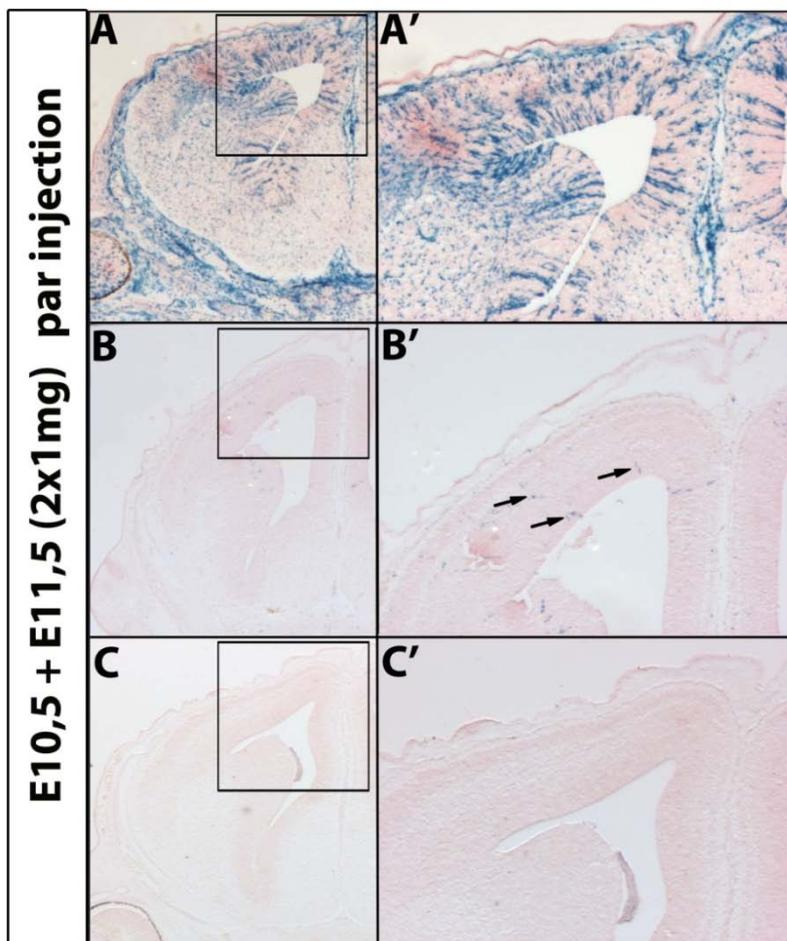


Figure 55 : Niveau d'excision de la CreER^{T2} induit par injection intra-péritonéale dans la lignée CMV-CreER^{T2}

(A-C') Coupes coronales révélées au X-gal de la région médiane du cortex cérébral d'embryons porteurs de l'allèle ROSA26R et du transgène CMV-CreER^{T2} au stade E16,5. (A', B', C') Agrandissements des zones encadrées correspondantes. Les embryons sont analysés après injection intra-péritonéale de 2x1mg de TAM administré aux stades E10,5 et E11,5. En B', les flèches mettent en évidence la présence de quelques rares cellules bleues indiquant une excision par la CreER^{T2} quasi nulle.

Nous avons ensuite réalisé une administration de 5 mg de TAM par gavage maternel au stade E9,5. Les embryons porteurs du transgène *CMV-CreER^{T2}* et de l'allèle *ROSA26R* présentent une bonne efficacité d'excision (n=2/2, **Fig.56A-B'**) mais une létalité embryonnaire de 29% (**Tableau 7**).

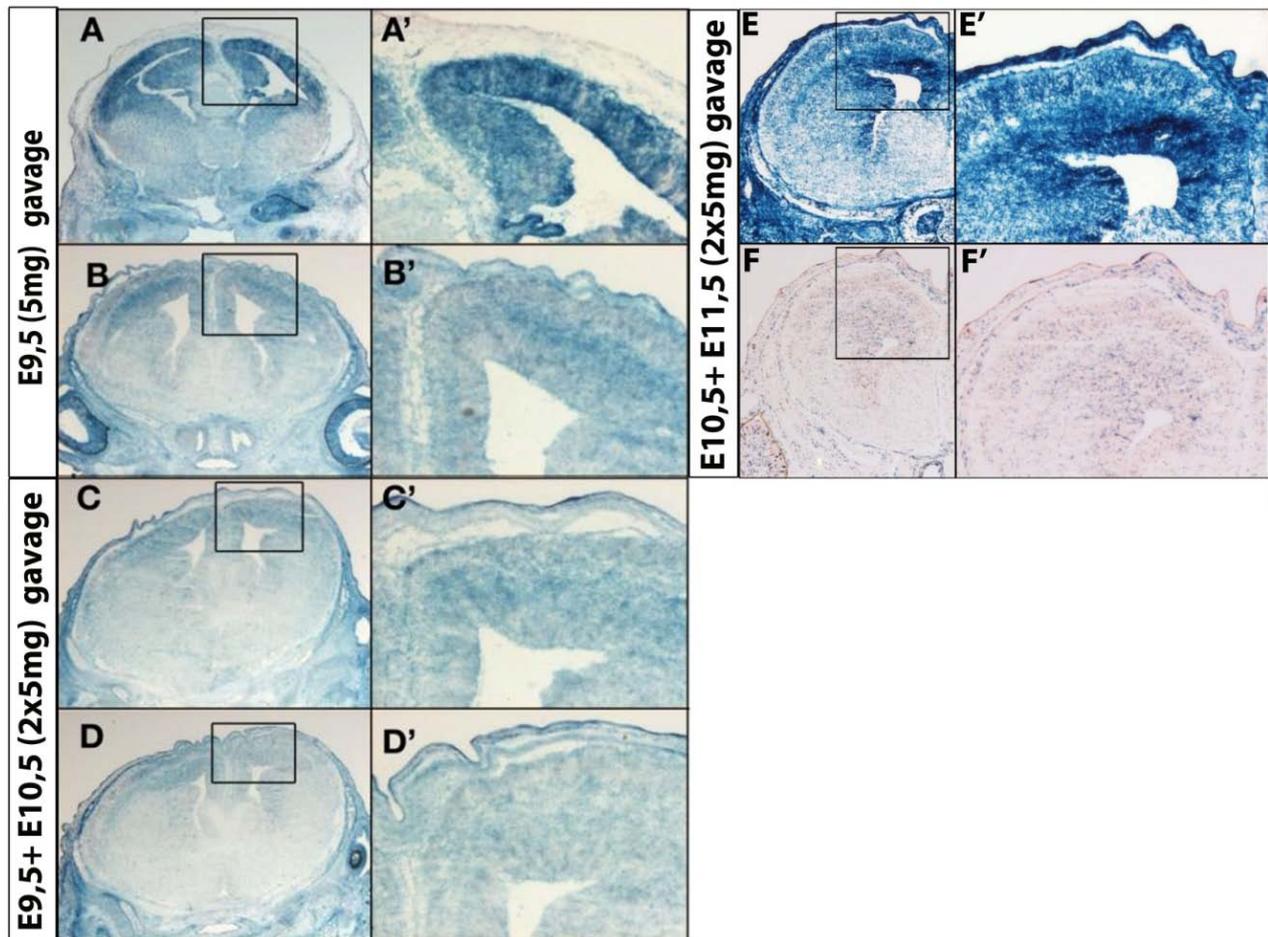


Figure 56 : Niveau d'excision de la *CreER^{T2}* induit par gavage dans la lignée *CMV-CreER^{T2}*

(A-F') Coupes coronales révélées au X-gal de la région médiane du cortex cérébral d'embryons porteurs de l'allèle *ROSA26R* et du transgène *CMV-CreER^{T2}* au stade E16,5. (A', B', C', D', E' et F') agrandissements des zones encadrées correspondantes. Les embryons sont analysés après gavage maternel de différentes doses de TAM (5 et 10 mg) administrées aux stades E9,5, E10,5, E11,5 et combinés.

Deux gavages de 5 mg de TAM chacun aux stades E9,5 et E10,5 résultent en une activité β -galactosidase ubiquitaire dans la majorité des embryons (n=3/4, **Fig.56C, C'**) et une expression mosaïque rare (n=1/4, **Fig.56D, D'**). La létalité embryonnaire est réduite, et n'est que de 14% dans ces conditions (**Tableau 7**). Réaliser les deux gavages un peu plus tard, aux stades E10,5 et E11,5, conduit également à une excision majoritairement ubiquitaire (n=8/9, **Fig.56E, E'**) à mosaïque rare (n=1/9, **Fig.56F, F'**) et une faible létalité des embryons (9%)

(**Tableau 7**). De façon intéressante, nous observons une meilleure survie des embryons malgré une dose totale de TAM plus forte. Ceci suggère qu'en plus de la quantité de TAM administré, le stade de l'embryon traité influence aussi la létalité embryonnaire. Pour réduire cette létalité au maximum, nous avons réalisé un seul gavage de 10 mg à E10,5. Dans ces conditions, nous observons une activité β -galactosidase ubiquitaire (n=10/10) et une létalité embryonnaire diminuée (7%) (**Tableau 7**). **L'ensemble de ces tests montrent qu'un gavage de 5 mg à E9,5 permet une excision satisfaisante mais entraîne une létalité embryonnaire considérable qui sera nettement réduite lorsque le gavage est réalisé à E10,5, malgré une dose de TAM administrée plus forte.** Avec deux gavages, nous notons une efficacité d'excision améliorée à optimale, mais une létalité embryonnaire augmentée. La meilleure condition d'administration est obtenue par le gavage de 10 mg de TAM à E10,5, qui confère une efficacité d'excision optimale et la survie de la plus grande proportion d'embryon de la portée. Dans la lignée *ROSA-CreER^{T2}*, 20 mg de TAM sont nécessaires à l'obtention d'une excision ubiquitaire de l'allèle rapporteur, ce traitement entraînant une forte létalité. Ainsi, nous notons que l'activité recombinase est plus satisfaisante lorsque la *CreER^{T2}* est exprimée par la construction CMV que sous le contrôle du promoteur ROSA26.

3.2.3. Validation de la lignée CMV-CreER^{T2}

Nous nous sommes ensuite assurés que la seule présence du transgène *CMV-CreER^{T2}* n'induit pas d'activité de la *CreER^{T2}*. Aucune activité β -galactosidase n'est détectée chez les embryons *CMV-CreER^{T2}*; *ROSA26R* en absence d'administration de TAM (**Fig.57A-A'**) par rapport aux embryons traités (**Fig.57B, B'**) : il n'y a donc pas de phénomène de "leaking" dû à une mauvaise séquestration cytoplasmique de la recombinase *CreER^{T2}*.

Nous avons également vérifié l'activité d'excision de *CreER^{T2}* sur notre gène d'intérêt par une expérience d'immunodétection de RALDH2 chez les embryons porteurs du transgène *CMV-CreER^{T2}* et de deux allèles *Raldh2* floxés. En absence du transgène, le gène *Raldh2* est intact et l'enzyme RALDH2 est présente dans la pie-mère (**Fig.57C, flèches**). Dans les embryons porteurs du transgène et après administration par gavage de TAM, nous ne détectons plus RALDH2 (**Fig.57D**). Un gavage au stade E10,5 représente une façon efficace d'administrer le TAM pour exciser la région floxée de notre gène d'intérêt.

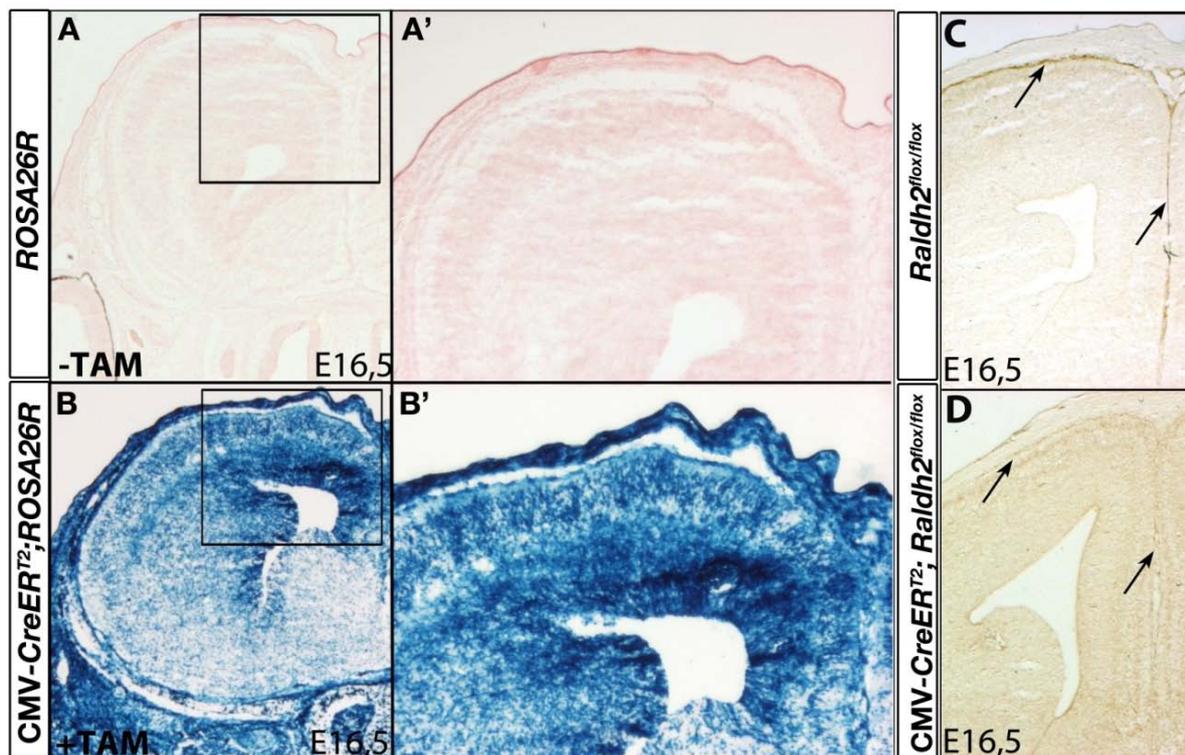


Figure 57 : Activité de la recombinaison inducible $CreER^{T2}$ sous le contrôle du promoteur CMV
 (A-D) Coupes coronales de télencéphale d'embryons au stade E16,5. (A-B') Embryons analysés par coloration X-gal. A-A': Embryon *ROSA26R* ; CMV-*CreER^{T2}* analysé en l'absence de traitement maternel au TAM. Aucune activité β -galactosidase n'est détectée dans l'ensemble des cellules. (A', B') Agrandissements des régions encadrées correspondantes. (B, B') Embryon *ROSA26R* ; CMV-*CreER^{T2}* analysé après traitement maternel au TAM. Une activité β -galactosidase est détectée dans l'ensemble des cellules de l'embryon. (C, D) Embryons analysés par immunohistochimie pour la protéine RALDH2. Individus porteurs des allèles *Raldh2* floxés et génotypés négatif (C) ou positif (D) pour le transgène *CreER^{T2}*. La protéine RALDH2 est détectée spécifiquement dans les méninges chez l'individu non transgénique (flèches en C). Elle n'est pas détectée chez l'animal porteur du transgène (flèches en D), témoignant d'une excision satisfaisante des deux allèles *Raldh2* par la recombinaison inducible.

4. Conclusion

L'ensemble de nos résultats ont permis de choisir l'outil expérimental qui remplit au mieux les critères d'efficacité d'excision de la recombinaison et de viabilité des embryons générés.

Nous concluons tout d'abord que la lignée *Wnt1-Cre*, qui réalise une inactivation satisfaisante tissu-spécifique du gène *Raldh2*, ne répond pas au critère de viabilité des embryons. Nous avons écarté cette lignée de notre étude, du fait de la létalité, puisque des stades post-nataux (P4) sont requis pour l'analyse de la lamination corticale.

Concernant les lignées inducibles, le travail d'optimisation des conditions d'administration du TAM nous a permis de montrer que l'injection intra-péritonéale ne

constitue pas une façon efficace d'induire l'activité de la CreER^{T2} au niveau des embryons. Bien qu'elle permette une bonne survie, l'excision de l'allèle rapporteur par les lignées ROSA- et CMV- CreER^{T2} n'est jamais complète. Ainsi, nous avons retenu la voie d'administration par gavage qui confère une activité optimale de la recombinaison dans les deux lignées inductibles.

Nous avons observé que dans la lignée CMV-CreER^{T2}, une dose 4 fois plus faible est suffisante à l'induction d'une excision ubiquitaire par rapport à celle nécessaire pour obtenir le même résultat dans la lignée ROSA-CreER^{T2}. Par conséquent, la létalité embryonnaire est réduite dans la lignée CMV- CreER^{T2} par rapport à celle observée dans la lignée ROSA-CreER^{T2}. Nous avons ainsi choisi de réaliser notre étude avec la lignée CMV-CreER^{T2} pour laquelle nous obtiendrons des mutants conditionnels CMV-CreER^{T2} ; *Raldh2*^{flox/flox}, après gavage de 5 mg à E10,5. Les mutants ainsi obtenus seront d'excellents modèles pour l'étude des défauts de la neurogenèse à des stades tardifs de développement.

5. Matériel et méthodes

5.1. Établissement des géotypes

Les biopsies de queues sont digérées dans 250 µl de soude (NaOH 50 mM) à 95°C pendant 30 à 60 min. Un volume de 25 µl de tampon Tris 0,1 M pH 8 est ajouté, puis les tubes sont vortexés et centrifugés à 13000 tours/min pendant 5 min. L'amplification des allèles *LacZ*, *Raldh2* ou *Cre* est obtenue par PCR à partir de surnageant (1 µl) dilué dans le tampon de réaction (10 mM Tris/HCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 50 mM KCl) contenant des désoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) à 5 mM, les amorces sens et anti-sens à 1 µg/µl, et 0,025 unité d'ADN polymérase thermostable (Taq polymérase). L'ADN est dénaturé pendant 1 min à 94°C, puis l'amplification est réalisée en 30 cycles (dénaturation : 30 secondes (sec) à 94°C ; appariement des amorces : 30 sec à 60°C ; polymérisation : 40 sec à 72°C).

Les amorces 5'-CGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAG-3' et 5'-CTCCGGCTGCGGTAGTTCAGGCAGTTC-3' amplifient un segment de 300 paires de bases (pb) dans le gène *LacZ*. Les amorces 5'-TATCTGGACAGTGGTTAAGG-3' et 5'-CCCAGCCTGCATAATACCTC-3' amplifient un segment de 300 pb dans l'allèle *Raldh2* sauvage et les amorces 5'-TATCTGGACAGTGGTTAAGG-3' et 5'-GCTTTATGATAATGTTTCATAGTTGG-3' un segment de 500 pb dans l'allèle *Raldh2* muté (Vermot et al., 2006). Les amorces 5'-ATTTGCCTGCATTACCGGTC-3' et 5'-ATCAACGTTTTGTTTTCGGA-3' amplifient un segment de 350 pb dans le gène *Cre*

(séquences communiquées par le Dr. D. Metzger). Les fragments amplifiés sont visualisés par électrophorèse en gel d'agarose 2% grâce au bromure d'éthidium (0,5 mg/ml).

5.2. Réaction X-gal sur coupes histologiques

Le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) (Invitrogen) est utilisé pour révéler les cellules exprimant l'enzyme β -galactosidase, codée par le gène *LacZ*. Le X-gal va être clivé par la β -galactosidase en galactose et 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole, qui sera oxydé en 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo, un produit bleu insoluble.

Les lames sont décongelées une heure à RT et incubées dans du PBS pendant 5 min, puis 5 min dans une solution WASH (2 mM $MgCl_2$; 0,02% NP40 ; 100 mM Tampon Sodium pH 7.3 : sodium phosphate monobasique 23 mM et sodium phosphate dibasique 77 mM). Puis la réaction enzymatique se fait dans la solution de coloration, à l'abri de la lumière pendant 6 h. La solution de coloration est composée de ferrocyanide (0,125 mM), ferricyanide (0,125 mM), X-gal (1 mg/ml) dans la solution WASH. Les lames sont alors rincées 5 min dans du PBS à température ambiante, puis 5 min dans de l'eau, puis contre-colorées pendant 30 sec dans la safranine 0,01% (marquage des noyaux). Il y a alors deux rinçages d'une minute à l'eau, puis deux passages à l'éthanol 100% pendant une minute chacun. Après avoir laissé sécher les lames pendant quelques minutes, elles sont montées sous lamelles avec la solution d'inclusion Eukitt[®].

5.3. Immunomarquage sur coupes histologiques

Pour réaliser les immunomarquages, les lames sont décongelées 30 min à RT et lavées 5 min dans du PBS. Un démasquage des épitopes est effectué par un bain de 15 min en citrate de sodium (0,01M, pH6) porté à ébullition au four à micro-ondes. Après retour à température ambiante, les lames sont rincées dans du PBS deux fois 5 min.

Un blocage des sites antigéniques aspécifiques est réalisé pour toutes les lames par incubation pendant 1 h à température ambiante avec du PBS contenant 0,1% de Triton X-100 et 5% de sérum de chèvre (NGS). L'espèce d'où provient le sérum doit être identique à celle qui produit l'anticorps secondaire. L'anticorps primaire anti-RALDH2 (polyclonal de chèvre, Abcam, dilution 1:75) est dilué en PBS-Triton X-100 (0,1%) contenant 5% de NDS et 100 μ l de la solution sont déposés sur chaque lame. Les lames sont recouvertes de lamelles et mises à 4°C O/N.

Le jour suivant, les lames sont lavées dans du PBS 3 x 5 min à température ambiante. Les peroxydases endogènes sont inactivées par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 3% en PBS) pendant 5 min afin d'éviter le bruit de fond. Trois lavages de 5 min en PBS sont effectués, puis les lames sont incubées en présence de l'anticorps secondaire adéquat (âne anti-chèvre couplé à la biotine, Vectastain[®] Vector, dilution 1:200) dilué en PBS à RT pendant 90 min. Trois lavages de 5 min en PBS et un lavage de 5 min en PBT (PBS ; 0,1% Tween 20) sont réalisés. Les lames sont ensuite incubées avec le complexe ABC (ABC Kit Vectastain[®], Vector) pendant 45 min à RT. Ce complexe (avidine/streptavidine couplé à plusieurs peroxydases) reconnaît la biotine et le signal est ainsi amplifié. Les lames sont rincées dans du PBT (trois fois 5 min à température ambiante), puis 5 min en PBS. La révélation au DAB (diaminobenzidine, un chromogène qui en présence de son substrat [H₂O₂] et de peroxydases, est oxydé en un composé brun; kit DAB[®], Dako) peut alors être réalisée. La solution est déposée sur les lames pendant quelques minutes, et la réaction est arrêtée par deux bains de PBS et un bref passage dans l'éthanol 100%. Les lames sont séchées et montées avec l'Eukitt[®].

5.4. Préparation du tamoxifène

Le tamoxifène (TAM) peut être administré aux femelles gestantes par injection intra-péritonéale ou par voie orale (gavage).

5.4.1. Préparation pour injection intra-péritonéale

Pour préparer la solution injectable, le TAM utilisé est du 4-OH-tamoxifène (Sigma), un métabolite qui pourra être directement assimilé par la femelle gestante. 500 µl d'éthanol 100% sont ajoutés à 50 mg de TAM. Le mélange est vortexé 5 à 10 min. 500 µl d'huile de tournesol filtrée sont ajoutés ; la préparation est vortexée 5 à 10 min. Le mélange est visqueux et est transféré dans un tube de 5 ml gardé à l'abri de la lumière. Pour limiter la perte de solution, le flacon qui a contenu le TAM est lavé ml par ml avec 4 ml d'huile filtrée et chaque ml est transféré dans un même tube. Le tout est vortexé longuement puis chauffé dans un incubateur à 37°C jusqu'à ce que le mélange soit homogène. Le mélange concentré à 10 mg/ml est aliquoté dans des seringues de 100 µl et conservé à -20°C.

5.4.2. Préparation pour gavage

Pour préparer la solution de gavage, 250 mg de TAM (Sigma) sont dilués dans 12,5 ml d'huile, aliquotés dans des seringues et conservés à -20°C (20mg/ml). 5 ou 10 mg sont donnés aux femelles gestantes à chaque gavage, soit un volume de 250µl ou 500µl de solution de TAM/huile.

Une solution plus concentrée en TAM a également été préparée afin de donner moins d'huile par gavage à la femelle. Pour cela, 250 mg de TAM (Sigma) sont dilués dans 750µl d'éthanol. Le mélange est vortexé jusqu'à obtention d'un produit blanc laiteux. Puis 6,7 ml d'huile végétale (tournesol) sont ajoutés à la préparation. Le TAM est ainsi à une concentration de 34 mg/ml. De 5 à 10 mg de TAM sont donnés aux femelles gestantes à chaque gavage, soit un volume de 150 à 300 µl de solution préparée. La solution de gavage est aliquotée par 400 µl et conservée à -20°C.

III. Rôle de l'acide rétinoïque produit par les méninges au cours du développement du néocortex

1. Contexte général de l'étude

L'acide rétinoïque joue un rôle clé au cours du développement précoce du cerveau antérieur. En effet, l'AR produit par RALDH2 dans l'épithélium neural du cerveau antérieur et dans l'ectoderme de surface adjacent semble contrôler la prolifération et la survie des cellules progénitrices dans l'épithélium neural prosencéphalique (Ribes *et al.*, 2006). Jusqu'à E9, RALDH2 est l'enzyme responsable de la production du signal rétinoïde et a pour fonction de générer un pic d'AR nécessaire à la croissance du tissu neural antérieur (Niederreither *et al.*, 1999 ; Ribes *et al.*, 2006). Une fonction tardive du gène *Raldh2* est supposée de par son expression spécifique à partir de E13 dans les cellules des méninges télencéphaliques, expression qui persiste jusqu'aux stades péri-nataux (Smith *et al.*, 2001) (cf. Résultats, Partie I, §3.1). L'AR produit dans les méninges par RALDH2 pourrait diffuser de la pie-mère vers le cortex cérébral et agir au cours de son développement. L'AR pourrait ainsi influencer la destinée des populations de progéniteurs, contrôler la différenciation et/ou la migration radiaire des neurones corticaux. C'est ce que suggèrent également les travaux de Siegenthaler et collaborateurs, qui ont étudié le mutant du gène *Foxc1*, codant pour un facteur de transcription essentiel à la formation des méninges recouvrant le cerveau antérieur (Siegenthaler *et al.*, 2009). La mutation de ce gène entraîne une expansion latérale de la région dorsale du neuroépithélium s'accompagnant d'une réduction du nombre des progéniteurs basaux et des neurones. Les mutants pour le gène *Foxc1* présentent également une diminution de l'expression des gènes *Raldh2* et *Rdh10* au sein des méninges (Siegenthaler *et al.*, 2009). De plus, un traitement à l'AR rétablit un développement normal du cortex cérébral des mutants *Foxc1*. Par l'ensemble de leurs résultats, ces auteurs suggèrent que le défaut du développement cortical observé a pour origine un déficit en AR provenant des méninges (Siegenthaler *et al.*, 2009). Une étude plus récente a montré que la perturbation du signal rétinoïde par la surexpression d'un récepteur dominant négatif RAR α au sein des progéniteurs et des neurones post-mitotiques engendrait un retard de migration des neurones corticaux nés tardivement (Choi *et al.*, 2014). C'est dans ce contexte que nous avons utilisé notre modèle murin pour l'étude du rôle de l'AR produit par les méninges au cours de la neurogenèse corticale.

2. Problématique

L'AR produit par les méninges exerce-t-il une fonction tardive au cours du développement du cortex cérébral ? L'absence de la production d'AR par RALDH2 conduit-elle à un défaut de la formation des couches corticales ? Affecte-t-elle les populations progénitrices et/ou neuronales ?

Pour répondre à ces questions, nous avons étudié dans les mutants conditionnels inductibles *CMV-CreER^{T2/o}* ; *Raldh2^{fl/fl}* (*Raldh2cKO*) différents processus s'opérant au cours de la neurogenèse, tels que la lamination des couches corticales, la prolifération, la mort cellulaire des populations progénitrices, la détermination neuronale et la migration neuronale.

3. Résumé des résultats

Nous avons tout d'abord montré que l'absence de l'AR au sein des méninges n'affecte ni leur intégrité, ni leur fonctionnalité. Dans les mutants *Raldh2cKO*, les méninges attirent de manière satisfaisante les cellules Cajal-Retzius dans la zone marginale du cortex cérébral.

Concernant la différenciation neuronale, nous avons observé une augmentation du nombre des neurones des couches profondes VI, V et superficielle II/III, ainsi qu'une diminution des neurones de la couche superficielle IV en absence d'AR. La perturbation numérique des populations neuronales pourrait être la conséquence d'un défaut dans les populations progénitrices.

Les mutants *Raldh2cKO* ne présentent aucun changement du nombre de progéniteurs apicaux ou basaux. De plus, l'ensemble de la population progénitrice n'effectue pas une sortie prématurée du cycle cellulaire qui se caractérise par des durées de phases de réplication S et de mitose M inchangées dans les embryons mutants par rapport aux contrôles. Nous suggérons ainsi que ce n'est pas par une action sur la prolifération des progéniteurs que l'AR influence la lamination corticale. La perturbation numérique des populations neuronales pourrait être la conséquence d'un défaut de spécification et/ou de migration neuronale.

Le suivi de la distribution des neurones corticaux dans les mutants *Raldh2cKO* révèle que les neurones nés précocement à E13,5 sortent préférentiellement de la ZI pour se loger dans les couches profondes, créant un déficit de neurones dans la ZI et une accumulation neuronale dans les couches profondes. Nous avons observé ce phénotype aux stades E15,5 et E17,5. L'absence d'AR conduirait à un défaut de spécification neuronale s'opérant à E13,5.

Nous avons également étudié la distribution des neurones corticaux nés tardivement à E14,5. Les mutants *Raldh2cKO* présentent une accumulation neuronale dans la ZI et une diminution du nombre de neurones des couches superficielles à E17,5. Vingt-quatre heures plus tard, nous avons noté que la distribution neuronale revient à la norme dans les embryons mutants par rapport aux contrôles. Les neurones générés au stade E14,5 sont préférentiellement destinés à la couche IV, or la population surnuméraire neuronale de la ZI observée à E17,5 ne présente pas les caractéristiques de cette couche. Par ailleurs, les neurones bloqués dans la ZI présentent une morphologie multipolaire, caractéristique du neurone en arrêt de migration. Les prolongements des cellules gliales et leur ancrage dans la membrane basale sont inchangés dans les embryons mutants par rapport aux contrôles. Ainsi, il semblerait que l'absence d'AR affecte la spécification et/ou la migration radiaire des neurones générés au stade E14,5.

Par l'ensemble de ces résultats, nous suggérons un rôle de l'AR au cours de la neurogenèse dans la spécification et/ou la migration de différentes populations neuronales.

4. Article soumis à la publication

Carole Haushalter, Brigitte Schuhbaur, Pascal Dollé and Muriel Rhinn. **Meningeal retinoic acid contributes to neocortical lamination and radial migration during mouse brain development.**

Meningeal retinoic acid contributes to neocortical lamination and radial migration during mouse brain development

Carole Haushalter¹⁻⁵, Brigitte Schuhbaur¹⁻⁵, Pascal Dollé^{1-5, #} and Muriel Rhinn^{1-5, #}

1) Development and Stem Cells Department, Institut de Génétique et de Biologie

Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France

2) Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7104, Illkirch, France

3) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 964, Illkirch, France

4) Université de Strasbourg, Illkirch, France

5) Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France

To whom correspondence should be addressed:

E mail : rhinn@igbmc.fr, dolle@igbmc.fr

Running title : Retinoids and cerebral cortex

Key words: retinoids, cerebral cortex, neurons, radial migration, cortical layering

SUMMARY STATEMENT

An involvement of the signalling molecule retinoic acid in neurogenesis of the developing cerebral cortex is shown through targeted deletion of its synthesizing enzyme.

ABSTRACT

Retinoic acid (RA) is a diffusible molecule involved in early forebrain patterning. Its later production in the meninges by the retinaldehyde dehydrogenase RALDH2 coincides with the time of cortical neurons generation. A function of RA in this process has not been addressed directly as *Raldh2*^{-/-} mouse mutants are embryonic lethal. Here we used a conditional genetic strategy to inactivate *Raldh2* just prior to its onset of expression in the developing meninges. This inactivation does not affect the formation of the cortical progenitor populations, their rate of division, or timing of differentiation. However, migration of late-born cortical neurons is delayed, with neurons stalling in the intermediate zone and exhibiting an abnormal multipolar morphology. This suggests that RA controls the multipolar-to-bipolar transition which occurs in the intermediate zone and allows neurons to start locomotion in the cortical plate. Our work also shows a role for RA in cortical lamination, as a subset of layer IV neurons are not formed in the *Raldh2*-ablated mutants. These data demonstrate that meninges are a source of extrinsic signals important for cortical development.

INTRODUCTION

Early induction events in the anterior neural plate define the embryonic forebrain. One of its derivatives is the cerebral cortex, a brain center responsible for the control of higher cognitive functions, perceptions and emotions. At the beginning of corticogenesis, neuroepithelial (NE) cells give rise to radial glial (RG) cells (also called apical progenitors), located in the ventricular zone (VZ) and undergoing symmetrical and proliferative divisions to self-renew. As development proceeds, RG cells divide asymmetrically to produce postmitotic neurons or intermediate neuronal progenitor (INP) cells. INP cells localise in the subventricular zone (SVZ), divide a few times (1-2), and differentiate into neurons (Götz and Huttner, 2005; Miyata et al., 2010; Noctor et al., 2004). Newly born neurons migrate through the intermediate zone (IZ) and eventually give rise, in an inside-out manner, to six cortical layers known as layers I to VI (with layer I being essentially composed of axons and dendritic tufts) (Rakic, 1974; Sidman and Rakic, 1973). Neurons produced during early neurogenesis (E12.5-E13.5 in mouse) generate deeper layers of the cortex (layers VI and V), whereas those born later generate the more superficial (upper) layers II/III and IV (Polleux et al., 1997). To reach their destination in the cortical plate, early-born neurons move by somal translocation (Nadarajah et al., 2001), whereas neurons born at E14.5 and later use glia-guided locomotion to migrate (LoTurco and Bai, 2006). While traveling through the SVZ and IZ, the late-born neurons acquire a transient multipolar morphology by sprouting out multiple neurites (LoTurco and Bai, 2006; Noctor et al., 2004; Tabata and Nakajima, 2003). In the upper IZ, they acquire a bipolar morphology allowing a proper glia-guided locomotion. Eventually, to reach their final position, they extend their leading processes to the pial surface and switch to a glia-independent somal translocation (Nadarajah et al., 2001).

A tight control of all these coordinated steps is required during early corticogenesis and involves specific transcription factors, as well as signalling molecules (for review, see Miyata et al., 2010). One candidate signal is retinoic acid (RA), a key regulator of several processes during development and organogenesis (Rhinn and Dollé, 2012 for a review). RA is a lipophilic molecule that acts as diffusible ligand for nuclear receptor, RARs (retinoic acid receptors) and RXRs (retinoid X receptors), thereby controlling the transcription of many genes. The presence of RA in specific embryonic tissues depends on its regulated synthesis. In the embryo, vitamin A or retinol is uptaken transplacentally and is transformed into RA in a two steps oxydation involving retinol dehydrogenases (mainly RDH10) and then retinaldehyde dehydrogenases (RALDH1, 2, 3). During head development, *Raldh2* is the first

enzyme to be expressed at embryonic day 8 (E8) within the anterior forebrain neuroepithelium and in the overlying surface ectoderm. Progressively, *Raldh2* expression recedes from the forebrain neuroepithelium, while surface ectoderm expression persists until E9.5 (Niederreither et al., 1999; Ribes et al., 2006). Thus, until E9.5, RALDH2 is responsible for RA signalling in the embryonic head and our analysis of *Raldh2*^{-/-} mutant mice suggests that this peak of RA occurring at E8.5 acts on the growth and organisation of anterior neural tissue (Niederreither et al., 1999; Ribes et al., 2006). Interestingly, *Raldh2* shows a second peak of expression in the meninges surrounding the cerebral cortex, starting at E12.5 ventrally and encompassing the whole meninges by E14.5 (Siegenthaler et al., 2009; Smith et al., 2001). Thus, RALDH2 activity may define a source of RA in the meningeal space, which could act on the underlying cortex where it may influence neurogenesis. Indeed, a number of studies have shown that the retinoid pathway acts on neuronal differentiation, proliferation, neurite outgrowth, and synaptogenesis (Corcoran et al., 2000; Maden, 2007 and 2015; McCaffery et al., 2003). As *Raldh2*^{-/-} mutants are early embryonic lethal at E9.5 (Niederreither et al., 1999), a possible function of RA at later stages of cortical neurogenesis has not been investigated directly. In this study, we have analyzed the development of the cerebral cortex in embryos lacking RA produced by RALDH2 in the developing meninges. Using a *Raldh2* conditional knockout (*Raldh2*cKO), we showed that loss of function of *Raldh2* from its beginning of expression in the meninges did not affect the formation of progenitor cells, including RG and INP cells, nor the birth of newly born neurons. However, we observed an abnormal layering of cortical neurons, mainly affecting layer IV. Also, by tracing the new born neurons using in utero electroporation of a GFP marker, we showed that loss of RA in the developing cerebral cortex transiently affected the migration of new born neurons.

RESULTS

Conditional deletion of *Raldh2*

After its transient early expression in forebrain neuroepithelial cells and surface ectoderm (Ribes et al., 2006), *Raldh2* is expressed starting E12.5 in the lateral and medial meninges and is present in the entire meninges by E14.5-16.5 (Siegenthaler et al., 2009; Fig. 1A, D). Until birth, the meninges are the only brain structure where *Raldh2* can be detected (Smith et al., 2001 and data not shown).

To address the function of RA produced by the meninges, it was necessary to

overcome the early embryonic lethality of germline *Raldh2*^{-/-} mutants. We used the *Cre-ERT2* recombinase system to induce a temporally controlled deletion of *Raldh2* by tamoxifen induction. A *Raldh2* conditional knockout mouse line that was previously described (*Raldh2*^{fllox/fllox}; Vermot et al., 2006) was crossed with the *CMV-βactin-Cre-ERT2* transgenic line (Santagati et al., 2005). For tamoxifen induction, 10 mg of tamoxifen was given to pregnant females at E10 by oral gavage. The loss of RALDH2 in tamoxifen-induced (*Raldh2*cKO) mutants was validated by immunolabelings on E16.5 brains (Fig. 1A-D). When compared to control littermates (devoid of the *Cre-ERT2* transgene), *Raldh2*cKO animals did not display any detectable morphological abnormality at prenatal stages, and upon dissection their brains were comparable to those of control mice (data not shown).

Integrity of the meninges and cortical marginal zone upon deletion of *Raldh2*

Cajal-Retzius (CR) cells are a transient population of neurons located in the marginal zone (MZ) of the developing cerebral cortex, beneath the meninges (del Rio et al., 1995; Derer, 1985). They play a crucial role for cortical lamination as they regulate migration and final positioning of neurons in the cortical plate via the secretion of an extracellular glycoprotein, Reelin, in a process called glia-independent somal translocation (Dulabon et al., 2000; Hartfuss et al., 2003). Integrity of the meninges is critical for the correct spread and final localisation of CR cells (Inoue et al., 2008). *Cxcr4*, a chemokine receptor, is expressed by CR cells (Stumm et al., 2003) and its ligand, *Cxcl12*, is expressed in the meninges. Through their interaction, both proteins play a crucial role for the positioning of CR cells in the MZ (Borrell and Marin, 2006). We analysed by in situ hybridisation the expression of *Reelin* (CR cells: Fig. 2A-D') and *Cxcl12* (meninges: Fig. 2E-H') in control and *Raldh2*cKO mice at E16.5, and observed comparable distributions of labelled cells in both genotypes. Furthermore, using immunohistochemistry we analysed the distribution of the calcium-binding protein calretinin, another marker of CR cells. Again, there was no detectable difference between control and *Raldh2*cKO mice (Fig. 2I-L'), and examination at high magnification showed an almost continuous band of *Reelin*- and calretinin-labelled CR cells along the cortical marginal zone in both genotypes (Fig. 2A-D', I-L'). Also, examination at higher magnification of *Cxcl12* expression did reveal any differences between control and *Raldh2*cKO mice (Fig. 2E-H'), indicating the presence of a functional meningeal layer—with respect to its signalling towards CR cells—in absence of RALDH2.

Absence of RALDH2 leads to abnormal neuronal layers in the cerebral cortex

Laminar-specific cortical neurons can be distinguished through the expression of distinct (layer-specific) transcription factors that control cortical neuronal identities and properties (Molyneaux et al., 2007 for a review). To determine the requirement of RA in layer-specific cortical neuronal differentiation, we examined expression of these molecular markers in brains of early postnatal mice. The brains of the pups were dissected at postnatal day 4 (P4), and the loss of RALDH2 validated by immunolabelings.

Immunolabelings of projection neurons sitting in deeper layers (DL) of the cortex were performed using Tbr1 (layer VI) (Hevner et al., 2001) and Ctip2 (layer V) (Arlotta et al., 2005). Raldh2cKO mutants showed a 18% significant increase of layer VI Tbr1-positive neurons (Fig. 3A-B', E-F', G; $p < 0.05$), as well as a 26% significant increase of layer V Ctip2-positive neurons (Fig. 3C-D', E-F', H; $p < 0.01$) on rostral sections of the cortex. The cell density of the layers was evaluated and is unchanged (data not shown). These data support a role for RA in establishing the DL in the cortex.

We analysed projection neurons sitting in upper layers (UL) by using Cux1 (layers IV-II) (Nieto et al., 2004) and Brn2 (layers II-III) (Sugitani et al., 2002) as markers. Strikingly, the overall number of Cux1-positive cells was diminished by 15% (Fig. 4A-B', I; $p < 0.05$) in Raldh2cKO mutants. In contrast, the overall numbers of Brn2-positive cells showed a 15% significant increase on rostral sections (Fig. 4C, D, J; $p < 0.05$), and a tendency to an increase on more caudal sections (Fig. 4C', D', J), in the mutants. These data further support a role for RA in proper establishment of projection neuron layers in the cortex.

To refine this analysis, we counted the number of Cux1-positive, Brn2-negative cells, that identify layer IV neurons. Strikingly, this number was reduced by 30% (Fig. 4E, F, K; $p < 0.05$) anteriorly and 45% caudally (Fig. 4E', F', K; $p < 0.05$). This observation led us to examine specifically layer IV neurons labeled by ROR β (Jabaudon et al., 2012). A loss by 20% of ROR β -expressing neurons was observed in mutants anteriorly (Fig. 4G, H, L; $p < 0.05$) and by 30% posteriorly (Fig. 4G', H', L; $p < 0.05$). We assessed apoptotic cell death by performing immunolabeling for activated caspase 3 in Raldh2cKO mutants, and compared them with control littermates. No abnormal apoptosis was detected in mutants at E14.5 (supplementary material, Fig. S1A-B') and E16.5 (supplementary material, Fig. S1C-D').

Altogether, these observations suggest that RA is required to establish a proper cortical layering, especially for the formation of layer IV.

Absence of RALDH2 does not affect cell proliferation in the developing cortex

In the mouse cerebral cortex, there are two major populations of neural progenitor (NP) cells: radial glial (RG) cells localised in the VZ and expressing Pax6 (Englund et al., 2005), and intermediate neuronal progenitor (INP) cells localised in the SVZ and expressing Tbr2 (Englund et al., 2005; Sessa et al., 2008). Some projection neurons arise from dividing RG cells through a process called direct neurogenesis, but a large number of these neurons arises via an indirect mechanism involving INP cells. To assess whether the imbalanced number of neurons observed in the DL and UL of the cortex in Raldh2cKO mice could be due to an aberrant number of NP cells, we quantified RG cells and INP cells using immunolabeling for Pax6 and Tbr2, respectively, in sections of the cerebral cortex from E14.5 and E16.5 control and Raldh2cKO littermates. The number of Pax6-positive RG progenitors (Fig. 5A-B', G-H', E, K) and Tbr2-positive INPs (Fig. 5C-D', I-J', F, L) was unchanged at both stages in the Raldh2cKO mutants when compared to controls. These data indicate that absence of RA may not affect the initial number of NP cells, neither the balance between direct and indirect neurogenesis after E14.5.

The abnormal distribution of neurons among cortical layers in Raldh2cKO mice could also arise due to an improper timing of neuronal birth. Indeed, the observed increase in DL neurons and the decrease in UL neurons could be due to a premature cell cycle exit of NP cells. To evaluate the rate of cells leaving the cycle, we exposed control and Raldh2cKO embryos to a pulse of BrdU 24 h prior to analysis, which was performed at two developmental stages (E14.5 and at E16.5). For this analysis we performed combined BrdU and Ki67 immunolabeling. We quantified the BrdU+/Ki67- cells, corresponding to the cells that were dividing at the time of BrdU injection, but had presumably exited the cell cycle by the time of analysis. These experiments did not reveal any significant difference in the number of counted cells in Raldh2cKO versus control animals (Fig. 6).

Recent studies point to a link between cell cycle length and specification of neocortical NP cells (Arai et al., 2011; Pilaz et al., 2016). We investigated whether changes in the behaviour of cycling progenitors could explain the subsequent defects in neurogenesis observed in Raldh2cKO mice. Immunolabelings performed after a short (1 hour) BrdU pulse showed that the numbers of progenitors undergoing S-phase is unchanged in Raldh2cKO mutants (supplementary material, Fig. S2A-F). Furthermore, phospho-histone H3 (PHH3) immunolabelings showed that the M-phase is unaffected (supplementary material, Fig. S2G-J', K, L).

Taken together, these results suggest that the loss of RA does not affect the number of NP cells neither their proliferating behaviour, i.e. these cells do not appear to differentiate prematurely or in a delayed manner.

Abnormal specification of new born neurons to deep layers

To further dissect the effects of loss of RA, we assessed the distribution of cortical cells through an approach involving in utero electroporation of a green fluorescent protein (GFP)-expressing vector in the VZ of control and *Raldh2c*KO brains. We performed in utero electroporations at E13.5 and E14.5 as these two time points immediately precede the peak of generation of neurons that will form layers V-VI and II-III-IV, respectively (Polleux et al., 1997). We then examined the distribution of GFP-expressing cells at E17.5. Three zones were defined by co-immunolabelings with *Tbr2* and *Ctip2*: the UL (*Ctip2*⁻), the DL (*Ctip2*⁺), and the intermediate zone (IZ) located between the *Ctip2*⁺ and *Tbr2*⁺ layers (see Fig. 7A-B', E-F').

In brains electroporated at E13.5, we observed at E17.5 a significant increase by 15% in the percentage of GFP-positive cells reaching the DL in *Raldh2c*KO animals (Fig. 7A-D, E-H, I, J; $p < 0.01$). Strikingly, a significant deficit (20%) of GFP-positive cells was observed in the IZ (Fig. 7A'-D', E'-H', I, J; $p < 0.001$). To assess the effect of RA on differentiation of the DL, we counted GFP⁺/*Ctip2*⁺ cells. *Ctip2* is expressed in DL neurons, most of them differentiating before E14.5. Interestingly, in *Raldh2c*KO brains compared to controls, the percentage of GFP-positive cells expressing *Ctip2* was significantly increased from 21% to 32% (Fig. 7K-L', M; $p < 0.01$). This observation corroborates the increase in DL neurons observed at P4 (see Fig. 3C- D', H) and suggests that in absence of RA more neurons differentiate into DL.

In a next series of experiments, we harvested the electroporated embryos two days earlier at E15.5 to investigate if the distribution of GFP-positive cells was already abnormal at an earlier stage of their migration. At this stage, very few new born neuron have reached the UL (supplementary material, Fig. S3A-D, E-H, I, J). At this stage already, we observed a significant increase by ~15% in the percentage of GFP-positive cells that reached the DL at rostral levels (supplementary material, Fig. S3A-D, I) and more caudal levels (supplementary material, Fig. S3E-H, J). A significant deficit of GFP-positive (~15%) cells was observed in the IZ both rostrally (supplementary material, Fig. S3A'-D', I) and caudally (supplementary material, Fig. S3E-H', J). As our former experiments (Fig. 5, 6) indicated that neither the number of progenitors, neither the timing of cell cycle exit was changed in mutants,

collectively the experiments suggest that in mutants, more neurons born at E13.5 leave the IZ through a facilitated process to reach the DL, thus leading to a reduction of the number of neurons in the IZ in absence of RA and to their misspecification in DL.

Loss of RA affects upper layer neuron specification by increasing their length of stay in the intermediate zone

We next focused on E14.5 electroporations, the time point immediately preceding the peak of neuronal generation for layers IV mainly and II/III (Polleux et al., 1997). In brains of control animals analysed at E17.5, the majority of GFP-positive cells have reached the UL and DL of the cortical plate (CP), although about a third of the labeled cells is still migrating through the IZ (Fig. 8). Strikingly, in *Raldh2cKO* mutant brains, the percentage of GFP-positive cells was significantly increased by 12% in the IZ (Fig. 8A'-D', E'-H', I, J; $p < 0.001$), with a concomitant significant decrease by 9% in the UL (Fig. 8A-D, E-H, I, J; $p < 0.01$). The vast majority of GFP-positive cells in the IZ did not express *Tbr2*, suggesting that those cells are new born neurons rather than progenitors. In addition, as no ectopic *ROR β* expression could be detected in the IZ via immunolabelling or in situ hybridisation (data not shown), it suggests that those cells have not yet fully progressed through differentiation or are misspecified. Migration of GFP-positive cells to the DL was not significantly affected at this stage in *Raldh2cKO* mutants (Fig. 8A-D, E-H, I, J). These observations suggest that disruption of the RA signalling pathway in newly born neurons at E14.5 causes part of them to stall within the IZ and fail to migrate to the CP. Also, consistent with the idea that E14.5 progenitors preferentially differentiate into UL neurons mainly populating layer IV, less neurons are found in layer IV in mutants. This deficit of neurons corroborates our observation of a decrease of *ROR β* -positive cells at P4 (Fig. 4). Thus, it appears that absence of RA perturbs radial migration of late born neurons.

To assess whether this accumulation of newly born neurons in the IZ at E14.5 reflects an arrest, rather than just a delay of migration, we repeated the above experiment but instead of collecting the brains at E17.5, these were analysed at E18.5. We observed that newly born neurons leave the IZ and migrate to the CP in comparable ways in control and mutants. The abnormalities in their distribution that were observed at E17.5 are normalised in the mutant animals at E18.5 (supplementary material, Fig. S4 A-H', I, J).

These observations lead to the conclusion that RA is differentially required for migration of early and late born neurons. In absence of RA, at E13.5, new born neurons leave massively the IZ to populate the DL whereas at E14.5, the newly born neurons stall in the IZ and leave it

with some delay. These distinct, stage-specific abnormalities could be related to the fact that there are two ways of migration for these neuronal populations: somal translocation is preferentially used by early born neurons, whereas glial guided-locomotion is used by late born neurons to engage on longer distances (Nadarajah et al., 2001).

New born neurons destined to upper layers have aberrant morphologies in absence of RA

Electroporation of cortical progenitors at E14.5 in *Raldh2cKO* mutants leads to an accumulation of post-mitotic (*Tbr2*-negative) neurons 3 days later in the IZ (Fig. 8). During normal development, late born cortical neurons undergo a series of morphological changes to migrate towards the CP. Disruption of these changes will block radial migration. Late born neurons use glial-guided locomotion to migrate towards UL. First they acquire in the IZ, a transient multipolar morphology by sprouting out multiple neurites (Noctor et al., 2004). This is followed by the acquisition of a bipolar shape, which will allow their attachment to RG cells and their migration to the CP by glia-guided locomotion (LoTurco and Bai, 2006).

First, we checked if the glia-guided locomotion could be compromised by abnormal RG processes and/or disruption of the basement membrane. We performed co-immunolabelings with pan-laminin and nestin antibodies at E16.5 and no detectable change in morphology of the RG cells and their endfeet were observed, pleading against the possibility of a disruption of the radial glial scaffolding (supplementary material, Fig. S5). We next performed in utero electroporation at E14.5 and examined the morphology of migrating GFP-positive cells in the IZ at E17.5 in control animals and *Raldh2cKO* mutants. We observed a significant increase in multipolar shaped cells (cells harboring at least three processes) in the IZ of mutants at all brain levels (Fig. 9; $p < 0.001$). Accordingly, the proportion of uni/bipolar shaped cells was significantly lower in *Raldh2cKO* mutants. This suggests that in *Raldh2cKO* mutants, some of the neurons born at E14.5 and destined to populate the UL retain a multipolar morphology, which will prevent them to correctly migrate to the CP. Our findings strongly suggest a role for RA in promoting multipolar to unipolar/bipolar transition in newly born neurons.

Altogether, these data suggest that in absence of RA, neurons destined to migrate to layer IV (mainly born at E14.5), and some neurons destined for layer II/III, are delayed in their migration towards the UL of the cortical plate. Our data point out that RA may control the transition from a multipolar to a bipolar morphology of late born neurons, thus influencing their capacity to engage into radial glial-guided migration.

DISCUSSION

In this study we demonstrate a role for RA during development of the mouse cerebral cortex. We used a conditional gene knockout strategy (Raldh2cKO) ablating the function of a RA-synthesizing enzyme in the developing meninges, and found that this loss of function affects cortical layering: the deep layers (V and VI) are increased, whereas layer IV contains less ROR β -positive and Cux1-positive neurons. The number of Brn2-positive cells in the upper layers II/III shows a tendency to be slightly increased. These abnormalities are not the consequence of an abnormal establishment or behaviour of the progenitor cell populations. Indeed, we found that loss of meningeal RA does not affect these populations (RG cells and INPs), which are correctly formed and divide to the same extent than in control embryos. Also, the timing of cell cycle exit does not appear to be changed. Interestingly, however, we showed that the lack of RA affects migration of newly born neurons: in Raldh2cKO mutants, early born neurons leave massively the IZ to populate layers V and VI, and late born neurons show a delayed initiation in their radial migration, probably due to an abnormal transition from multipolar to bipolar. One major consequence is on cell specification with a major effect on a subset of ROR β -positive neurons that fail to form.

RA and cortical neuronal differentiation

The cortical plate is organised in two populations: the deep layers (DL) V and VI, and the upper layers (UL) II/III and IV. Neurons located in layer II and III connect different cortical areas ipsilaterally or contralaterally. Layer IV is the major input layer as it receives inputs from the thalamus and transmits them to local cortical networks (Lopez-Bendito and Molnar, 2003). Neurons of the DL form connections with subcortical targets including the spinal cord, the pons, the tectum and the thalamus (McConnell, 1995; Molyneaux et al., 2007). During development, the neurons located in a given layer form at the same time, the DL forming first, followed by layers IV, III and II. Progress has been made in identifying genes involved in the specification of progenitors, but little is known on how these various projection neurons are specified. Some studies have shown that neurons are specified at their time of birth (Caviness, 1982; McConnell, 1995), though more recent studies suggest that molecular identities are acquired progressively during postmigratory differentiation (Kwan et al., 2008) even in the first post-natal week (De la Rossa et al., 2013). This progressive refinement implies that some transcription factors are expressed in larger domains encompassing, for example, layer V and

VI, are then progressively downregulated via repressive interactions in one of both layers, thus refining the identity of the other layer. This is the case for the DL, where *Fezf2* and *Sox5* interact to define progressively layer V and VI, respectively (Kwan et al., 2008). Moreover, *Tbr1* has been shown to regulate the differentiation of layer VI neurons (Hevner et al., 2001), whereas *Fezf2* and *Ctip2* are involved in the specification of layer V subcortical projection neurons (Chen et al., 2008; Molyneaux et al., 2005). On the other hand, *Satb2* is required to activate a genetic program within early UL neurons and can inactivate DL markers like *Ctip2* (Britanova et al., 2008). Also, the immature UL are first uniformly labelled by *Brn1/2*, which are then restricted to layer II/III followed by an upregulation of *ROR β* in layer IV via a mutually repressive interaction (Oishi et al., 2016). In absence of meningeal RA, globally all markers are present and respect their position in regard to layering. The more pronounced effect was observed for *ROR β* , which is strongly diminished in layer IV. We have observed that neurons born at E14.5 and contributing to layer IV are delayed in their migration. This delay could render *Brn2* expression more robust, partially preventing *ROR β* expression. In other words, *ROR β* expression would be too weak in some cells to repress *Brn2*, leading to its ectopic expression. Thus, in absence of RA, this neuronal subtype specification is decreased.

Also in absence of RA, a concomitant increase of layer V and layer VI is observed. The role of RA would be to regulate a global factor responsible for the DL lineage restricted effect. These findings are consistent with work showing that the acquisition of a DL fate is specified actively by an environmental signal (Bohner et al., 1997; Desai and McConnell, 2000). Only thereafter, different transcription factors like *Tbr1*, *Fezf2* or *Ctip2* interact positively or negatively and define the development of projection neuron subtypes (McKenna et al., 2011).

RA and migration of newly born neurons

During cortical development, early born neurons use somal translocation to migrate in the DL. After E14, neurons migrate by using another mode of migration called glia-guided migration, that is dependent on the radial glial (RG) fibers. The late born neurons acquire in the IZ, a transient multipolar morphology by sprouting out multiple neurites (Noctor et al., 2004). This is followed by the acquisition of a bipolar shape and attachment to RG fibers, followed by migration in the CP guided by the glia (LoTurco and Bai, 2006). Perturbation of migration is often linked to mutations in genes coding for proteins involved in the function of the cytoskeleton (Stouffer et al., 2016 for a review). Disruption of the multipolar to bipolar

transition will also affect radial migration. Several families of proteins have been shown to be involved in regulating this process (Azzarelli et al., 2014), including members of the Rho GTPase superfamily—like Rnd2, itself controlled by Neurog2 (Heng et al., 2008), or COUP-TFI (Alfano et al., 2011). Also it has recently been shown that the Wnt/ β -catenin signalling pathway needs to be downregulated for multipolar to bipolar transition to occur properly (Boitard et al., 2015). Knock-down of two other genes encoding proteins interacting with microtubules leads to similar phenotypes : LIS1 and DCX RNAi electroporation in rats causes cells into a multipolar shape to accumulate in the IZ (LoTurco and Bai, 2006). Except for Neurog2 that is regulated by RA in the developing spinal cord (Ribes et al., 2008), no link for these genes with the retinoid pathway has been shown. We have observed that in absence of RA, an abnormal migration due to a delay in the multipolar to bipolar transition of late-born cortical neurons occurs. The molecular events and downstream effectors of RA involved in the control of these processes remain to be identified.

RA and corticogenesis: how to reconcile with previous studies

It has long been suggested that RA could be a candidate molecule acting as a diffusible signal from the meninges to the developing neuronal layers of the cerebral cortex. This was suggested by the specific expression of *Raldh2*, throughout fetal developmental, in meningeal cells (Smith et al., 2001), while a more recent study has implicated RDH10, the enzyme acting upstream of RALDH2 (Siegenthaler et al., 2009). These authors analysed *Foxc1* mutants which fail to form forebrain meninges and exhibit a dramatic reduction of neurons and intermediate progenitor cells (with a decreased Tbr2+ population). They observed that an ENU-generated *Rdh10* mutant exhibits a very similar phenotype to the *Foxc1* mutant, and furthermore they could rescue the abnormalities of the *Foxc1* mutants by in utero vitamin A or RA supplementation (Siegenthaler et al., 2009). To reconcile the differences between the phenotypes observed in the *Rdh10* mutant (Siegenthaler et al., 2009) and the present *Raldh2*cKO mice, one should consider the dynamics of expression of the *Raldh* genes in the brain. Indeed, there are two phases through which RA may control dorsal forebrain and cortex development: (1) a phase going from E8.5 until E11.5-12.5 corresponding to a local and sequential production of RA first by RALDH2 then RALDH3 in dorsal forebrain neuroepithelium and surface ectoderm, (2) a second phase starting around E13.5 with a new source of RA production corresponding to the meninges. Interestingly, a new report from the Siegenthaler lab described a role for RDH10 in regulating development of the neocortex vasculature (Bonney et al., 2016).

Previous studies have evaluated that only very low levels of RA are present in the cortex itself (Chatzi et al., 2011; Luo et al., 2004; Toresson et al., 1999), suggesting that after E13.5 the source of RA is very local and may be diffusing from neighboring tissue, generating a diffuse gradient. The cortical phenotype observed in *Rdh10* mutants (Siegenthaler et al., 2009) may be related to the early phase of RA production that would affect the start of neurogenesis and the formation of the pools of progenitors. Indeed, we have observed the same defects by analyzing a *Rdh10*^{-/-} mutant generated by our team (Rhinn et al., 2011, and unpublished observations). Thus, we think that the observed defects are not the result of a loss of RA produced by the meninges, but rather by the loss of RA produced earlier by RALDH2 and RALDH3 in the forebrain. On the same line of observation, electroporation of a dominant-negative RA receptor (RAR403) at E14.5, that potentially blocks RAR signalling, does not affect progenitor cells which leave the cell cycle at the same rate as in control animals (Choi et al., 2014). In this case, the effect of RA produced by the meninges and may be some other unknown sources after E14.5 are stopped and the molecular phenotype of the embryos does not resemble to the described phenotype of *Foxc1* or *Rdh10* mutants. In another study, Chatzi and collaborators analysed *Raldh2*^{-/-} embryos rescued from lethality by maternal RA supplementation, and did not detect defects in radial expansion or post mitotic neurons formation (Chatzi et al., 2011). These authors limited their analysis to E14.5, a stage maybe too early to see defects due to a loss of meningeal RA (*Raldh2* being fully expressed in meninges from E14.5). Furthermore, only Ki67 and TuJ1 were used as markers, respectively for proliferating cells and differentiating neurons, which might not have allowed to detect subtle layering or migration defects.

By generating a *Raldh2* genetic ablation from E10.5, we removed the main (if not unique) source of RA in the cortex after E13.5. Our results corroborate those obtained by Choi et al. (2014), who electroporated a dominant-negative RA receptor in cortices, demonstrating that RA is involved in the onset of radial migration by controlling the multipolar to bipolar change in morphology of new born neurons, and is also involved in controlling neuronal fate, mainly for layer IV neurons. But the phenotype of *Raldh2*cKO mutants (this study) is not that strong as in cortices electroporated with the dominant-negative RAR where at P4 layers V to III do not maintain their fate but acquire characteristics of layer II (Choi et al., 2014). We may speculate that the weakness of the phenotype of *Raldh2*cKO is due to the presence of other sources of RA that are blocked by using the dominant-negative approach: there could be RA produced by RALDH1 starting E17.5 in the meninges and/or RA produced by the choroid plexus and present in the circulating cerebrospinal fluid (Alonso

et al., 2011). From our study and the study by Choi et al., one can conclude that RA does not affect the progenitors cell population, neither its survival or division rates, but contributes to the regulation of cell migration and cell specification, thus acting as a regulator of cortical layering.

Conclusion

In conclusion, our data indicate that RA produced by the meninges is required for proper cortical radial cell migration. It is also part of a post-mitotic molecular mechanism contributing to acquisition of proper neuronal identity, and thus to elaborate a brain with the appropriate connectivities. It is known that inappropriate positioning in the cortical plate leads to neurodevelopmental disorders including lissencephaly, heterotopia and focal cortical dysgenesis (Sarkisian et al., 2008). Also, subtle alterations in neocortical development contribute to alteration in some neural functions, which may lead in human to dyslexia, schizophrenia, epilepsy, and also mental retardation or learning disabilities. Our mutant is a novel, viable animal model showing subtle effects that could be causal for one or more of these disorders, and its further behavioral analysis will be of interest in this respect.

MATERIALS AND METHODS

Generation of Raldh2cKO mice and tamoxifen treatment

CMV-βactin-Cre-ERT2 and *Raldh2^{lox/lox}* mice were generated and genotyped as previously described (Santagati et al., 2005; Vermot et al., 2006). Tamoxifen (Sigma) was dissolved in pre-warmed corn oil (Sigma) to make a 34 mg/ml solution, which was aliquoted and stored at -20°C. Tamoxifen was administered orally to pregnant females by gavage (10 mg per gavage) at E10.5. Animals were initially difficult to obtain for analyses at postnatal stages, as tamoxifen treatments leads to abortion, female delivery difficulty and absence of feeding (our observations; Lizen et al., 2015). To circumvent these effects, we systematically performed caesarian sections at E18, followed by adoption of the delivered pups by foster mothers (BALB/c strain).

In utero electroporation

Electroporation of the cortex were performed as previously described (Marchetti et al., 2010). Briefly, endofree plasmid DNA solution (*pCAGGS-GFP* plasmid [gift of Dr. J. Godin], 5 mg/ml, Qiagen) mixed with 0.05% Fast Green (Sigma) was injected into the lateral ventricles

of each embryonic brain at the indicated stages using pulled glass capillaries. The electroporations were performed on whole heads using a Tweezertrode electrode (diameter 7 mm; BTX) connected to a CUY 21 EDIT electroporator (NEPA GENE) with the following parameters: five 45 V pulses, P(on) 50 milliseconds (ms), P(off) 950 ms for E14.5 and five 35 V pulses, P(on) 50 ms, P(off) 950 ms for E13.5. Brains were dissected at the required time point, fixed in 4% paraformaldehyde, cryopreserved in 20% sucrose and sectioned coronally (18 μ m thickness, Leica CM3050S cryostat).

Immunohistochemistry

Brains were sectioned coronally and processed for immunofluorescence or immunoperoxidase. Sections were obtained using a cryostat (14 μ m thickness) or a microtome (8 μ m, Leica 2035 Biocut), respectively. After antigen unmasking in citrate buffer (0.01 M, pH 6) during 15 min in a microwave oven, slides were blocked with 5% donkey serum, 0.1% triton in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated overnight with the following primary antibodies: bromodeoxyuridine (BrdU) (1:500, Abd serotec #OBT0030G), Ki67 (1:300, Novocastra #NCL-KI67P), phospho-histone H3 (1:500, Upstate #05-806); Pax6 (1:300, Covance #PRB-278P); Tbr2 (1:300, eBioscience #14-4875); β III-tubulin/TuJ1 (1:200, Covance #MMS-435P-100); Tbr1 (1:100, Abcam #ab31940); Ctip2 (1:500, Abcam #ab18465); Cux1 (1:100, Santa Cruz #sc13024); cleaved caspase-3 (1:200, R&D system #NB100-56113); Brn2 (1:1000 Santa Cruz #sc6029X), ROR β (1:500, Santa Cruz #sc21354); calretinin (1:2000, Swant #7699/4); Raldh2 (1:75, Santa Cruz #sc22591); nestin (1:100; Hybridoma Bank #rat-401); laminin (1:500, Sigma #L9393). Primary antibodies were visualised by immunofluorescence using secondary antibodies from donkey (1:400, Invitrogen: Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG #A-21202, Alexa Fluor 594 donkey anti-rat IgG #A-21209, Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit #A-31572; 1:400, Interchim: Dylight 488 affinipure donkey anti-goat IgG #705-485-147), whereas cell nuclei were identified using DAPI (1:2000). Immunoperoxidase labeling was performed using species-specific biotin-coupled secondary antibodies (1:400, Jackson Laboratories #PK-6101) and detection was performed using a Vectastain Elite ABC Kit (Jackson Laboratories #PK-6101), following the manufacturer's instructions.

In situ hybridisation

In situ hybridisation was performed with digoxigenin-labeled probes as previously described (Rhinn et al., 2011). Template DNAs were kindly provided by Drs O. Marin (*CxCl12*), F.

Guillemot (*Reelin*). All expression patterns were documented using a macroscope (Leica M420) or microscope (DM4000B), both connected to a Photometrics camera with the CoolSNAP (v. 1.2) imaging software (Roger Scientific).

Quantification and statistics

At least four animals of each genotype (control: *Raldh2^{fllox/fllox}; CMV-βactin-Cre-ERT2⁰* and *Raldh2cKO: Raldh2^{fllox/fllox}; CMV-βactin-Cre-ERT2⁺*) from four different litters were analysed for each experiment. Cell counting was performed on two cortical regions, i.e. at a rostral and more caudal (at the level of the choroid plexus) level. For each region, three adjacent sections were counted. For migration quantification, GFP+ cells were counted in each defined area (UL, DL and IZ) and averaged to the total number of GFP+ cells of the three areas. For morphology quantification, multipolar shaped cells (cells harboring at least three processes) and unipolar/bipolar shaped cells were counted in the IZ.

Microsoft Excel was used to analyse the data for statistical significance. All graphs plot mean ± s.e.m. Statistical analysis was performed using two-tailed Student's t-test between control and experimental conditions (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 for all histograms in figures).

Animal ethics statement

Animal experimentation protocols were reviewed and approved by the Direction Départementale des Services Vétérinaires (agreement #67-172 to MR, 67-189 to PD, and institutional agreement #D67-218-5 for animal housing) and conformed to the NIH and European Union guidelines, provisions of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the Animal Welfare Act.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Valérie Fraulob for excellent technical assistance; Mélanie Schuh for assistance during her undergraduate training; Prof. Jamel Chelly and Dr. Juliette Godin for sharing materials; Loic Broix for advice on in utero electroporation; Dr. Juliette Godin for critical comments on the manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.H. and M.R. performed all experiments. M.R. generated and managed the recombinant mice. B.S performed mouse genotyping and sectioning. M.R., C.H. and P.D. conceived experiments and analysed data. M.R. and P.D. obtained funding for the experiments, and wrote the paper.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR grant ReSiNEs, ANR-11-BSV2-0003), and by an institutional grant (LabEx ANR-10-LABX-0030-INRT) under the frame programme Investissements d’Avenir ANR-10-IDEX-0002-02. P.D. was partly supported by the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. C.H. was supported by PhD fellowships from the Inserm, Région Alsace, and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

REFERENCES

- Alfano, C., Viola, L., Heng, J. I., Pirozzi, M., Clarkson, M., Flore, G., De Maio, A., Schedl, A., Guillemot, F. and Studer, M.** (2011). COUP-TFI promotes radial migration and proper morphology of callosal projection neurons by repressing Rnd2 expression. *Development* **138**, 4685-4697.
- Alonso, M. I., Martin, C., Carnicero, E., Bueno, D. and Gato, A.** (2011). Cerebrospinal fluid control of neurogenesis induced by retinoic acid during early brain development. *Dev Dyn* **240**, 1650-1659.
- Arai, Y., Pulvers, J. N., Haffner, C., Schilling, B., Nusslein, I., Calegari, F. and Huttner, W. B.** (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* **2**, 154.
- Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R. and Macklis, J. D.** (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* **45**, 207-221.
- Azzarelli, R., Kerloch, T. and Pacary, E.** (2014). Regulation of cerebral cortex development by Rho GTPases: insights from in vivo studies. *Front Cell Neurosci* **8**, 445.
- Bohner, A. P., Akers, R. M. and McConnell, S. K.** (1997). Induction of deep layer cortical neurons in vitro. *Development* **124**, 915-923.
- Boitard, M., Bocchi, R., Egervari, K., Petrenko, V., Viale, B., Gremaud, S., Zraggen, E., Salmon, P. and Kiss, J. Z.** (2015). Wnt signaling regulates multipolar-to-bipolar transition of migrating neurons in the cerebral cortex. *Cell Rep* **10**, 1349-1361.
- Bonney, S., Harrison-Uy, S., Mishra, S., MacPherson, A. M., Choe, Y., Li, D., Jaminet, S. C., Fruttiger, M., Pleasure, S. J. and Siegenthaler, J. A.** (2016). Diverse functions of retinoic acid in brain vascular development. *J Neurosci* **36**, 7786-7801.
- Borrell, V. and Marin, O.** (2006). Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat Neurosci* **9**, 1284-1293.
- Britanova, O., de Juan Romero, C., Cheung, A., Kwan, K. Y., Schwark, M., Gyorgy, A., Vogel, T., Akopov, S., Mitkovski, M., Agoston, D., et al.** (2008). *Satb2* is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron* **57**, 378-392.
- Caviness, V. S., Jr.** (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res* **256**, 293-302.
- Chatzi, C., Brade, T. and Duester, G.** (2011). Retinoic Acid functions as a key GABAergic differentiation signal in the Basal Ganglia. *PLoS Biol* **9**, e1000609.
- Chen, B., Wang, S. S., Hattox, A. M., Rayburn, H., Nelson, S. B. and McConnell, S. K.** (2008). The *Fezf2-Ctip2* genetic pathway regulates the fate choice of subcortical projection neurons in the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11382-11387.
- Choi, J., Park, S. and Sockanathan, S.** (2014). Activated retinoid receptors are required for the migration and fate maintenance of subsets of cortical neurons. *Development* **141**, 1151-1160.
- Corcoran, J., Shroot, B., Pizzey, J. and Maden, M.** (2000). The role of retinoic acid receptors in neurite outgrowth from different populations of embryonic mouse dorsal root ganglia. *J Cell Sci* **113** (Pt 14), 2567-2574.

- De la Rossa, A., Bellone, C., Golding, B., Vitali, I., Moss, J., Toni, N., Luscher, C. and Jabaudon, D.** (2013). In vivo reprogramming of circuit connectivity in postmitotic neocortical neurons. *Nat Neurosci* **16**, 193-200.
- del Rio, J. A., Martinez, A., Fonseca, M., Auladell, C. and Soriano, E.** (1995). Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb Cortex* **5**, 13-21.
- Derer, P.** (1985). Comparative localization of Cajal-Retzius cells in the neocortex of normal and reeler mutant mice fetuses. *Neurosci Lett* **54**, 1-6.
- Desai, A. R. and McConnell, S. K.** (2000). Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development* **127**, 2863-2872.
- Dulabon, L., Olson, E. C., Taglienti, M. G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C. A., Kreidberg, J. A. and Anton, E. S.** (2000). Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* **27**, 33-44.
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A., Bulfone, A., Kowalczyk, T. and Hevner, R. F.** (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* **25**, 247-251.
- Götz, M. and Huttner, W. B.** (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 777-788.
- Hartfuss, E., Forster, E., Bock, H. H., Hack, M. A., Leprince, P., Luque, J. M., Herz, J., Frotscher, M. and Götz, M.** (2003). Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development* **130**, 4597-4609.
- Heng, J. I., Nguyen, L., Castro, D. S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J. M., Hevner, R., et al.** (2008). Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature* **455**, 114-118.
- Hevner, R. F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A. M., Campagnoni, A. T. and Rubenstein, J. L.** (2001). Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* **29**, 353-366.
- Inoue, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K. and Aruga, J.** (2008). Zic deficiency in the cortical marginal zone and meninges results in cortical lamination defects resembling those in type II lissencephaly. *J Neurosci* **28**, 4712-4725.
- Jabaudon, D., Shnider, S. J., Tischfield, D. J., Galazo, M. J. and Macklis, J. D.** (2012). RORbeta induces barrel-like neuronal clusters in the developing neocortex. *Cereb Cortex* **22**, 996-1006.
- Kwan, K. Y., Lam, M. M., Krsnik, Z., Kawasawa, Y. I., Lefebvre, V. and Sestan, N.** (2008). SOX5 postmitotically regulates migration, postmigratory differentiation, and projections of subplate and deep-layer neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16021-16026.
- Lizen, B., Claus, M., Jeannotte, L., Rijli, F. M. and Gofflot, F.** (2015). Perinatal induction of Cre recombination with tamoxifen. *Transgenic Res* **24**, 1065-1077.
- Lopez-Bendito, G. and Molnar, Z.** (2003). Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat Rev Neurosci* **4**, 276-289.
- LoTurco, J. J. and Bai, J.** (2006). The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci* **29**, 407-413.
- Luo, T., Wagner, E., Grun, F. and Drager, U. C.** (2004). Retinoic acid signaling in the brain marks formation of optic projections, maturation of the dorsal telencephalon, and function of limbic sites. *J Comp Neurol* **470**, 297-316.
- Maden, M.** (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **8**, 755-765.

- Maden, M.** (2015). Retinoic acid signaling and central nervous system development. in "*The Retinoids: Biology, Biochemistry, and Disease*" (P. Dollé, K. Niederreither, Eds.) Wiley-Blackwell. ISBN: 978-1-118-62798-3.
- Marchetti, G., Escuin, S., van der Flier, A., De Arcangelis, A., Hynes, R. O. and Georges-Labouesse, E.** (2010). Integrin alpha5beta1 is necessary for regulation of radial migration of cortical neurons during mouse brain development. *Eur J Neurosci* **31**, 399-409.
- McCaffery, P. J., Adams, J., Maden, M. and Rosa-Molinar, E.** (2003). Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur J Neurosci* **18**, 457-472.
- McConnell, S. K.** (1995). Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* **15**, 761-768.
- McKenna, W. L., Betancourt, J., Larkin, K. A., Abrams, B., Guo, C., Rubenstein, J. L. and Chen, B.** (2011). Tbr1 and Fezf2 regulate alternate corticofugal neuronal identities during neocortical development. *J Neurosci* **31**, 549-564.
- Miyata, T., Kawaguchi, D., Kawaguchi, A. and Gotoh, Y.** (2010). Mechanisms that regulate the number of neurons during mouse neocortical development. *Curr Opin Neurobiol* **20**, 22-28.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M. and Macklis, J. D.** (2005). Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron* **47**, 817-831.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. and Macklis, J. D.** (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* **8**, 427-437.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O. and Pearlman, A. L.** (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* **4**, 143-150.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P. and Chambon, P.** (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* **21**, 444-448.
- Nieto, M., Monuki, E. S., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S. J., Cunningham, J., Götz, M. and Walsh, C. A.** (2004). Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol* **479**, 168-180.
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. and Kriegstein, A. R.** (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* **7**, 136-144.
- Oishi, K., Aramaki, M. and Nakajima, K.** (2016). Mutually repressive interaction between Brn1/2 and Rorb contributes to the establishment of neocortical layer 2/3 and layer 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 3371-3376.
- Pilaz, L. J., McMahon, J. J., Miller, E. E., Lennox, A. L., Suzuki, A., Salmon, E. and Silver, D. L.** (2016). Prolonged Mitosis of Neural Progenitors Alters Cell Fate in the Developing Brain. *Neuron* **89**, 83-99.
- Polleux, F., Dehay, C. and Kennedy, H.** (1997). The timetable of laminar neurogenesis contributes to the specification of cortical areas in mouse isocortex. *J Comp Neurol* **385**, 95-116.
- Rakic, P.** (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* **183**, 425-427.
- Rhinn, M. and Dollé, P.** (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development* **139**, 843-858.

- Rhinn, M., Schuhbaur, B., Niederreither, K. and Dollé, P.** (2011). Involvement of retinol dehydrogenase 10 in embryonic patterning and rescue of its loss of function by maternal retinaldehyde treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 16687-16692.
- Ribes, V., Stutzmann, F., Bianchetti, L., Guillemot, F., Dollé, P. and Le Roux, I.** (2008). Combinatorial signalling controls Neurogenin2 expression at the onset of spinal neurogenesis. *Dev Biol* **321**, 470-481.
- Ribes, V., Wang, Z., Dollé, P. and Niederreither, K.** (2006). Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling. *Development* **133**, 351-361.
- Santagati, F., Minoux, M., Ren, S. Y. and Rijli, F. M.** (2005). Temporal requirement of Hoxa2 in cranial neural crest skeletal morphogenesis. *Development* **132**, 4927-4936.
- Sarkisian, M. R., Bartley, C. M. and Rakic, P.** (2008). Trouble making the first move: interpreting arrested neuronal migration in the cerebral cortex. *Trends Neurosci* **31**, 54-61.
- Sessa, A., Mao, C. A., Hadjantonakis, A. K., Klein, W. H. and Broccoli, V.** (2008). Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron* **60**, 56-69.
- Sidman, R. L. and Rakic, P.** (1973). Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* **62**, 1-35.
- Siegenthaler, J. A., Ashique, A. M., Zarbalis, K., Patterson, K. P., Hecht, J. H., Kane, M. A., Folias, A. E., Choe, Y., May, S. R., Kume, T., et al.** (2009). Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell* **139**, 597-609.
- Smith, D., Wagner, E., Koul, O., McCaffery, P. and Drager, U. C.** (2001). Retinoic acid synthesis for the developing telencephalon. *Cereb Cortex* **11**, 894-905.
- Stouffer, M. A., Golden, J. A. and Francis, F.** (2016). Neuronal migration disorders: Focus on the cytoskeleton and epilepsy. *Neurobiol Dis* **92**, 18-45.
- Stumm, R. K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., Nagasawa, T., Holtt, V. and Schulz, S.** (2003). CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci* **23**, 5123-5130.
- Sugitani, Y., Nakai, S., Minowa, O., Nishi, M., Jishage, K., Kawano, H., Mori, K., Ogawa, M. and Noda, T.** (2002). Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes Dev* **16**, 1760-1765.
- Tabata, H. and Nakajima, K.** (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **23**, 9996-10001.
- Toresson, H., Mata de Urquiza, A., Fagerstrom, C., Perlmann, T. and Campbell, K.** (1999). Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. *Development* **126**, 1317-1326.
- Vermot, J., Garnier, J. M., Dierich, A., Niederreither, K., Harvey, R. P., Chambon, P. and Dollé, P.** (2006). Conditional (loxP-flanked) allele for the gene encoding the retinoic acid-synthesizing enzyme retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2). *Genesis* **44**, 155-158.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Tamoxifen-induced ablation of *Raldh2* in the developing meninges. (A,C) Immunodetection of RALDH2 on coronal sections of the brain of a control (*Raldh2^{flox/flox};CMV- β actin-Cre-ERT2⁰*) mouse at E16.5. Two sections are shown at a rostral (A) and more caudal (C) level of the brain, showing RALDH2 expression in the meningeal layer overlying the cerebral cortex (arrows), and in choroid plexus (chp). (C,D) Comparative views of the brain of a *Raldh2cKO* (*Raldh2^{flox/flox}; CMV- β actin-Cre-ERT2⁺*) mutant, showing absence of RALDH2 signal. Tamoxifen was administered at E10.5. Scale bars: 250 μ m.

Figure 2. Analysis of Cajal-Retzius cells and developing meninges in *Raldh2cKO* mice. Comparative, coronal E16.5 brain sections are shown at two levels, rostral (upper panels) and more caudal (lower panels). In situ hybridisation for *Reelin* (A-D') and immunolabelings for calretinin (I-L') show that their distribution in Cajal-Retzius cells of the cortical marginal zone of control embryos is unchanged in *Raldh2cKO* embryos. In situ hybridisation for *Cxcl12* (E-H'), a marker of the developing meninges, also shows a normal distribution in *Raldh2cKO* embryos. mn, meninges. Scale bars: 500 μ m (A-L), 250 μ m (A'-L').

Figure 3. Postnatal *Raldh2cKO* mice show increased numbers of neurons in deep layers of the cortex. (A-F') Immunolabelings on brains sections from P4 control and *Raldh2cKO* animals for *Tbr1* (A-B') or *Ctip2* (C-D') are shown on comparative brain sections at rostral (A-F) and caudal (A'-F') levels. (E-F') are overlays of the *Tbr1/Ctip2* signal. White boxes (A-D') show the areas used for cell counts. (G) Quantification of *Tbr1*-positive cells; rostrally: 267.6 ± 15.00 (control) and 315.26 ± 13.08 (*Raldh2cKO*); caudally: 209.66 ± 13.88 (control) and 251.73 ± 11.61 (*Raldh2cKO*). (H) Quantification of *Ctip2*-positive cells; rostrally: 49.6 ± 2.79 (control) and 62.73 ± 1.24 (*Raldh2cKO*); caudally: 48.46 ± 4.1 (control) and 51.66 ± 3.65 (*Raldh2cKO*). n=5 brains. *, p<0.05; **, p<0.01; ns, not significant. Scale bars: 100 μ m.

Figure 4. Postnatal *Raldh2cKO* mice have decreased neuron numbers in upper cortical layers. (A-H') Immunolabelings on brain sections from P4 control and *Raldh2cKO* animals for *Cux1* (A-B'), *Brn2* (C-D') or *ROR β* (G-H') at rostral (A-H) levels and caudal (A'-H') levels. (E-F') overlay of *Cux1* and *Brn2* signals. White boxes show the areas used for cell counts. (I) Quantification of *Cux1*-positive cells; rostrally: 388.4 ± 17.76 for control and

333.26 ± 12.68 for Raldh2cKO; caudally: 347.6 ± 18.68 for control and 273.73 ± 15.50 for Raldh2cKO. **(J)** Quantification of Brn2-positive cells; rostrally: 248.26 ± 12.60 for control and 287.2 ± 8.22 for Raldh2cKO; caudally: 221.06 ± 18.91 for control and 243.4 ± 17.53 for Raldh2cKO. **(K)** Quantification of Cux1-positive/Brn2-negative cells; rostrally: 67.25 ± 5.18 for control and 45.58 ± 1.14 for Raldh2cKO; caudally: 63.66 ± 7.25 for control and 33.83 ± 4.27 for Raldh2cKO. **(L)** Quantification of RORβ-positive cells; rostrally: 97.33 ± 5.95 for control and 76.8 ± 4.11 for Raldh2cKO; caudally: 84.53 ± 6.73 for control and 59.93 ± 5.71 for Raldh2cKO. n=5 brains. *, p<0.05; ns, not significant. Scale bars: 100 μm.

Figure 5. Raldh2cKO does not affect cortical NPCs. **(A-D')** Immunolabelings on brain sections from E14.5 control and Raldh2cKO animals for Pax6 **(A-B')** or Tbr2 **(C-D')** at rostral **(A-D)** and more caudal levels **(A'-D')** used for quantification. **(G-J')** Immunolabelings on brain sections from E16.5 control and Raldh2cKO animals for Pax6 **(G-H')** or Tbr2 **(I-J')** at rostral **(G-J)** and medial levels **(G'-J')** used for quantification. **(E)** Quantification of Pax6-positive cells at E14.5; rostrally: 477.13 ± 13.10 for control and 456 ± 10.48 for Raldh2cKO; caudally: 412.73 ± 6.14 for control and 408.2 ± 3.49 for Raldh2cKO. **(F)** Quantification of Tbr2-positive cells at E14.5; rostrally: 398.66 ± 9.23 for control and 390.47 ± 11.37 for Raldh2cKO; caudally: 339.47 ± 9.89 for control and 320.13 ± 12.49 for Raldh2cKO. **(K)** Quantification of Pax6-positive cells at E16.5; rostrally: 374.06 ± 21.71 for control and 357.26 ± 22.71 for Raldh2cKO; caudally: 319 ± 16.42 for control and 306.99 ± 15.28 for Raldh2cKO. **(L)** Quantifications of Tbr2-positive cells at E16.5; rostrally: 353.2 ± 20.93 for control and 341.2 ± 20.23 for Raldh2cKO; caudally: 298.46 ± 16.96 for control and 276.66 ± 13.27 for Raldh2cKO. n=5 brains. ns, not significant. Scale bars: 50 μm.

Figure 6. Raldh2cKO does not affect cell cycle exit of NPCs. **(A-D')** Immunolabelings on brain sections from E14.5 control and Raldh2cKO animals analysed for BrdU (green), which was injected 24 h prior to analysis as a single pulse, and Ki67 (red) at rostral **(A-D)** and more caudal levels **(A'-D')** used for quantification. **(E-H')** Immunolabelings on brain sections from E16.5 control and Raldh2cKO animals similarly analysed for BrdU (green) injected 24 h prior to analysis and Ki67 (red). The proportion of cells leaving the cell cycle (BrdU+/Ki67- over BrdU+ cells) is unchanged in Raldh2cKO mutants versus controls. **(I)** Quantifications at E14.5; rostrally: 25.58 ± 0.54 for control and 27.57 ± 0.75 for Raldh2cKO; caudally: 27.53 ± 0.75 for control and 29.83 ± 1.25 for Raldh2cKO. **(J)** Quantifications at E16.5; rostrally: 33.92 ± 0.84 for control and 29.92 ± 1.92 for Raldh2cKO; caudally: 31.90 ± 0.74 for control

and 31.69 ± 0.92 for Raldh2cKO. n=5 brains. ns, not significant. Scale bars: 50 μm .

Figure 7. Lack of RA impairs cell migration of early born cortical neurons. Brain sections from E17.5 mice electroporated at E13.5 with a GFP reporter construct were analysed for GFP (C-D',G-H'), and by immunolabeling (A-B',E-F') for Tbr2 and Ctip2. Single color immunolabeling for the two markers help to define the upper layer (UL) and deeper layer (DL) of the cortical plate and the intermediate zone (IZ). (I, J) Histograms depict the percentage of GFP-positive cells per zone (UL, DL and IZ) of the developing cortex. (K-L') Quantification of GFP-positive cells (green) expressing Ctip2 (red) in the cortical plate of control and Raldh2cKO animals (representative sections shown in K-L'). Histograms (M) show the percentage of GFP+/Ctip2+ cells. n=5 brains. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Scale bars: 100 μm .

Figure 8. Lack of RA perturbs cell migration of late born cortical neurons. Brain sections from E17.5 embryos electroporated at E14.5 with the GFP reporter were analysed by immunolabeling for Tbr2 and Ctip2 (A-B',E-H') and for GFP-expressing cells (C-D',G-H'), at rostral (A-D') and caudal levels (E-H') of the cortex. (I,J) Histograms show the percentage of GFP-positive cells in control and Raldh2cKO animals per zone (UL, DL and IZ) of the developing cortex. n=5 brains. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0,001$; ns, not significant. Scale bars: 100 μm .

Figure 9. Aberrant morphology in new born migrating neurons in Raldh2cKO brains. In vivo electroporation of the GFP reporter was performed on E14.5 cortices, which were harvested at E17.5. (A,B,E,F) Immunolabelings (red) on electroporated control and Raldh2cKO animals for Tbr2 and Ctip2 to define the upper layer (UL), the deeper layer (DL) and the intermediate zone (IZ). (C',D',G',H') Higher magnification views of the areas boxed in (C,D,G,H) representing the counted areas. (I,J) Histograms showing the distribution of bipolar and multipolar cells in the IZ at rostral (I) and caudal (J) levels. More electroporated cells in the IZ exhibit a multipolar morphology in Raldh2cKO mutants (white arrows). (I, J) Quantifications. Bipolar cells rostrally: $87.64\% \pm 1.41\%$ for control and $71.14\% \pm 1.5\%$ for Raldh2cKO; caudally : $84,17\% \pm 1.15\%$ for control and $69.70\% \pm 2.43\%$ for Raldh2cKO. Multipolar cells rostrally: $12,35\% \pm 1.4\%$ for control and $28.85\% \pm 1.5\%$ for Raldh2cKO; caudally: $15.82\% \pm 1.15\%$ for control and $30.29\% \pm 2.43\%$ for Raldh2cKO. n=5 brains. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0,001$; ns, not significant. Scale bars: 100 μm .

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figure 1. Loss of meningeal RA does not lead to increased cell death.

Brain sections from E14.5 (A-B') and E16.5 (C-D') embryos. Fluorescent immunolabelings with an antibody against cleaved caspase-3 in control (A,A',C,C') and Raldh2cKO (B,B',D,D') animals revealed no changes in the number of apoptotic cells. Scale bars; 100 μm .

Supplementary Figure 2. Analysis of S- and M-phase in cycling progenitors.

Immunolabelings were performed on brain sections from E14.5 and E16.5 control and Raldh2cKO animals, for BrdU (green) which was injected 1 h prior to analysis as a single pulse (A-D'), and phosphorylated histone H3 (PHH3, red) (G-J'). (E) Quantification of BrdU+ cells at E14.5; rostrally: 254.91 ± 18.98 for control and 257.25 ± 15.96 for Raldh2cKO; caudally: 181.25 ± 9.18 for control and 185 ± 10.37 for Raldh2cKO. (F) Quantifications of BrdU+ cells at E16.5; rostrally: 189.16 ± 12.23 for control and 178.75 ± 9.75 for Raldh2cKO; caudally: 178.33 ± 9.66 for control and 184.41 ± 10.96 for Raldh2cKO. n=4 brains. ns, not significant. (K) Quantifications of PHH3+ cells at E14.5; rostrally: 40.66 ± 2.72 for control and 36.16 ± 2.67 for Raldh2cKO; caudally: 24.66 ± 3.68 for control and 23.16 ± 3.06 for Raldh2cKO. (L) Quantifications of PPH3+ cells at E16.5; rostrally: 25.25 ± 3.76 for control and 24.16 ± 3.00 for Raldh2cKO; caudally: 24 ± 0.93 for control and 26.41 ± 3.35 for Raldh2cKO. n=5 brains. ns, not significant. Scale bars: 50 μm .

Supplementary Figure 3. Lack of RA perturbs cell migration of early born neurons already at E15.5.

Sections from E15.5 brains electroporated at E13.5 with GFP. (A-B',E-F') Immunolabelings on electroporated control and Raldh2cKO animals for Tbr2 and Ctip2. These labelings help to define the upper layer (UL), the deeper layer (DL) and the intermediate zone (IZ). (C-D',G-H') GFP expression in electroporated control and Raldh2cKO animals at rostral (C-D') and caudal levels (G-H'). (I, J) Histograms showing the percentage of GFP-positive cells in control and Raldh2cKO per zone (UL, DL and IZ). n=5 brains. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns, non significant. Scale bars: 100 μm .

Supplementary Figure 4. Cell migration of late born neurons is normalised at E18.5 in absence of RA.

Sections from E18.5 brains electroporated at E14.5 with GFP. (A-B',E-F')

Immunolabelings on electroporated control and Raldh2cKO animals for Tbr2 and Ctip2, allowing to define the UL, DL and IZ. (C-D',G-H') GFP expression in electroporated control and Raldh2cKO animals at rostral (A-D') and caudal levels (E-H'). (I,J) Histograms showing the percentage of GFP-positive cells in control and Raldh2cKO per zone (UL, DL and IZ). n=5 brains. ns, non significant. Scale bars: 100 μ m.

Supplementary Figure 5. The radial glia scaffold is intact in absence of meningeal RA.

Immunolabelings on brain sections from E18.5 control (A-B',E-F') and Raldh2cKO (C-D',G-H') animals for nestin (green) and pan-laminin (red) at rostral (A-D') and caudal levels (E-H'). Nestin staining highlights the fiber organization and laminin labels the basal membrane. Arrows indicate the fiber end feet ending at the basal membrane. Scale bars: 100 μ m (A-D,E-H) and 500 μ m (A'-D',E'-H').

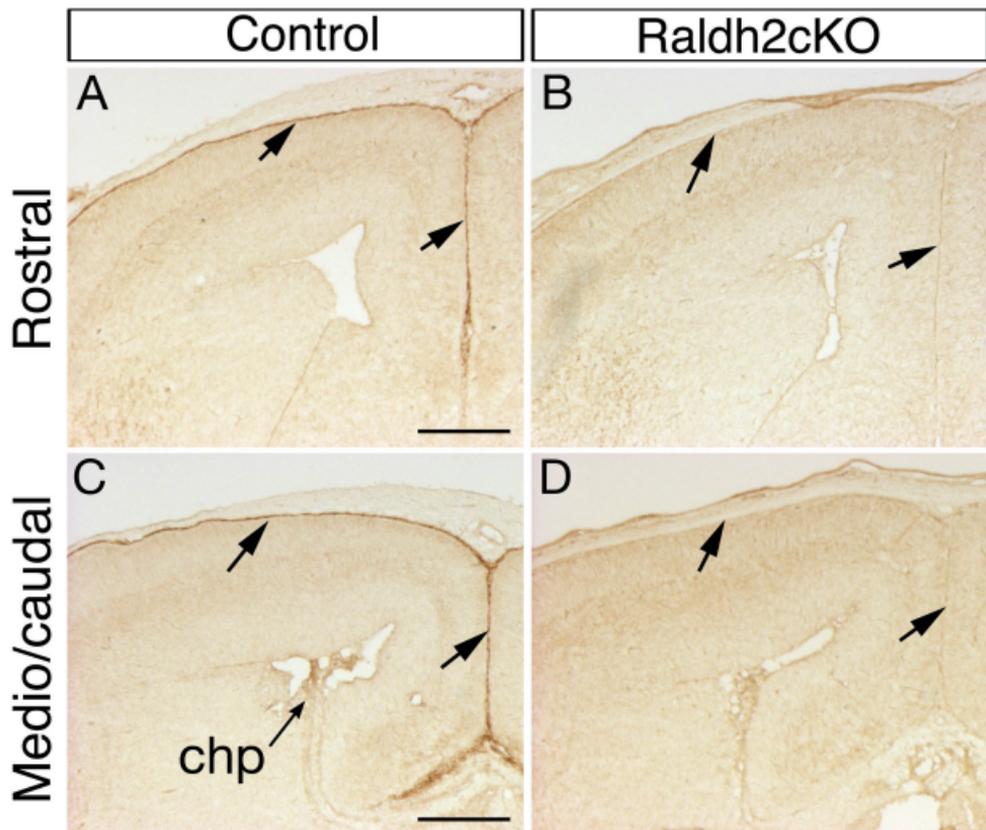


Figure 1
Haushalter et al., 2016

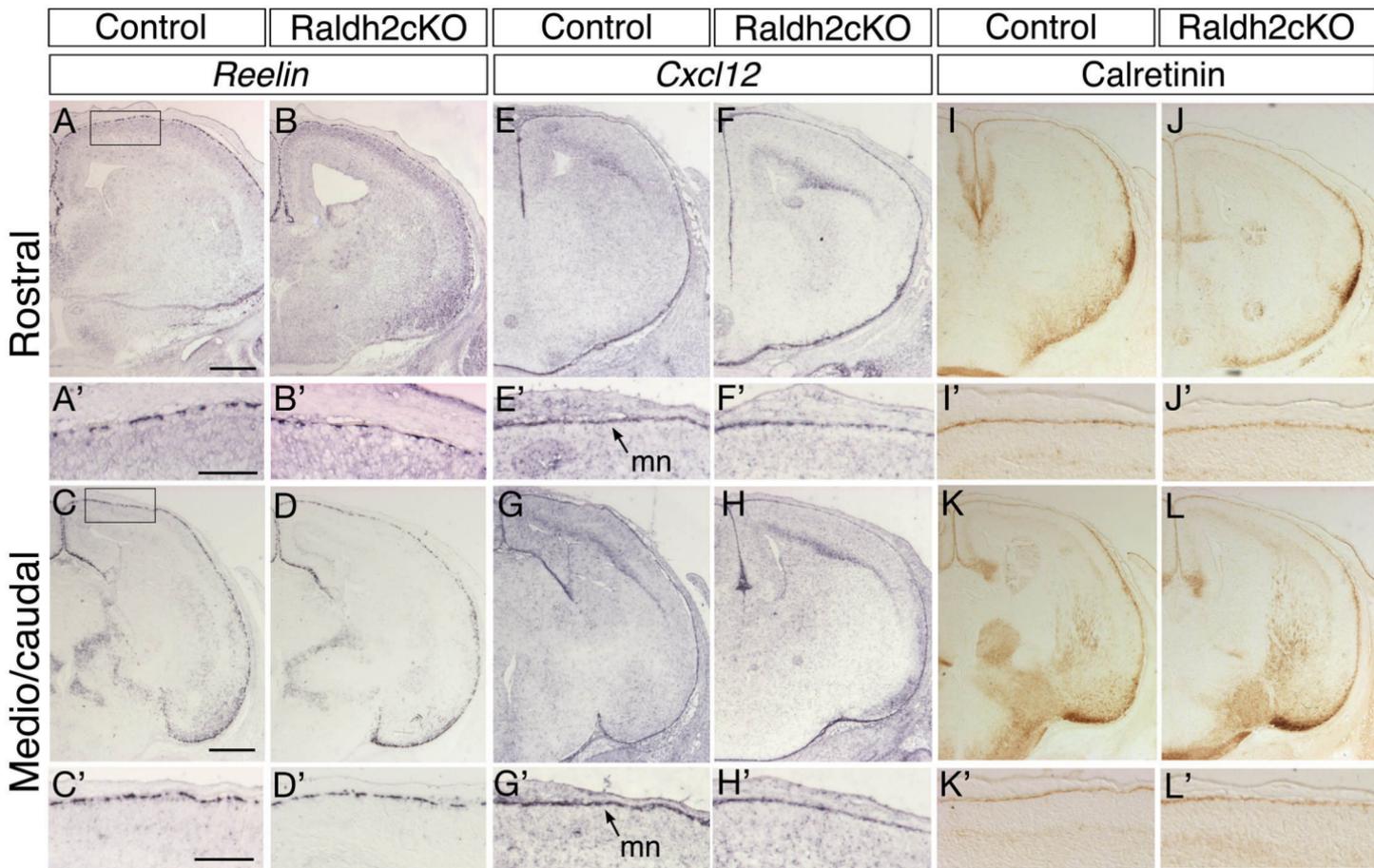


Figure 2
 Haushalter et al., 2016

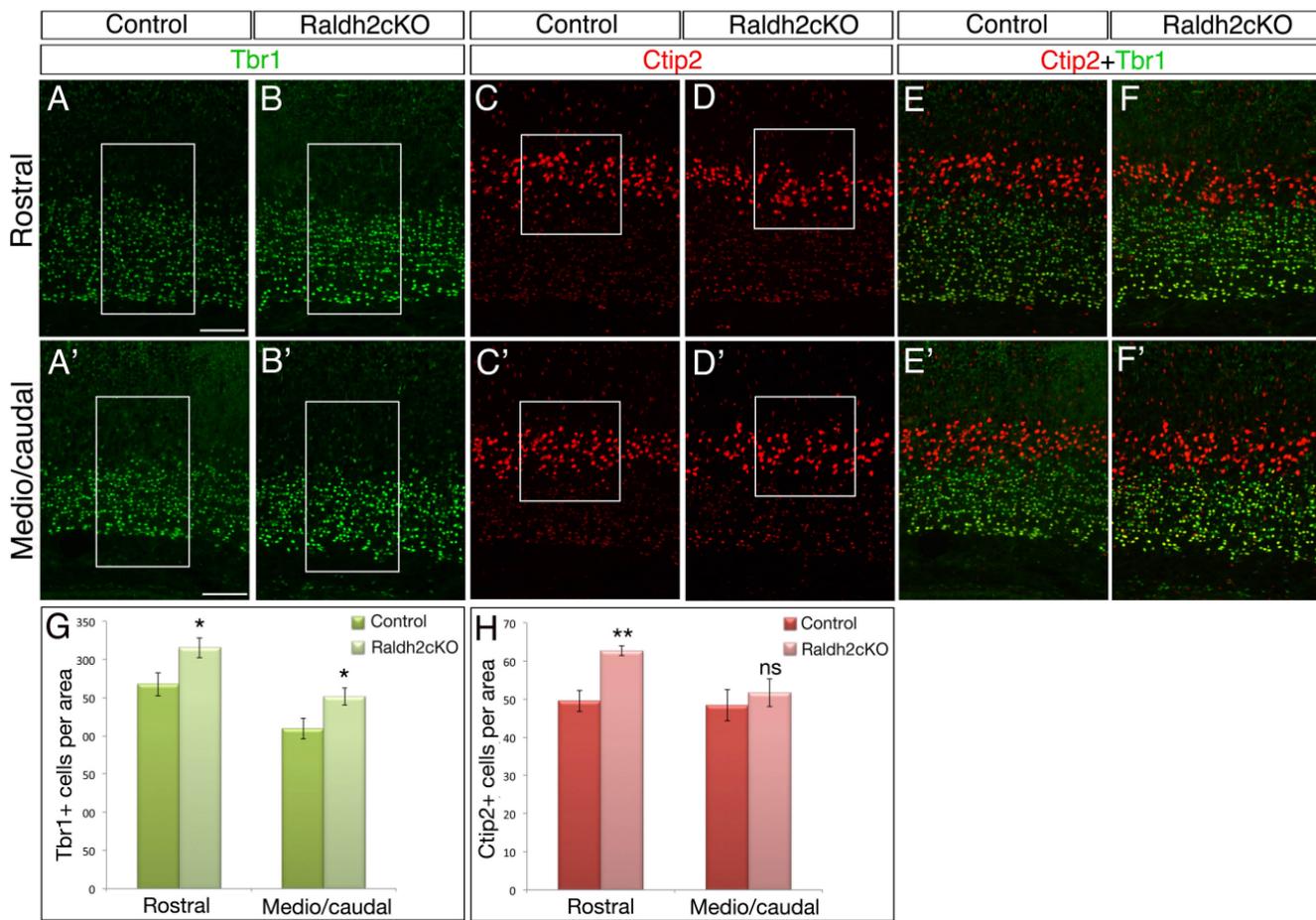


Figure 3
 Haushalter et al., 2016

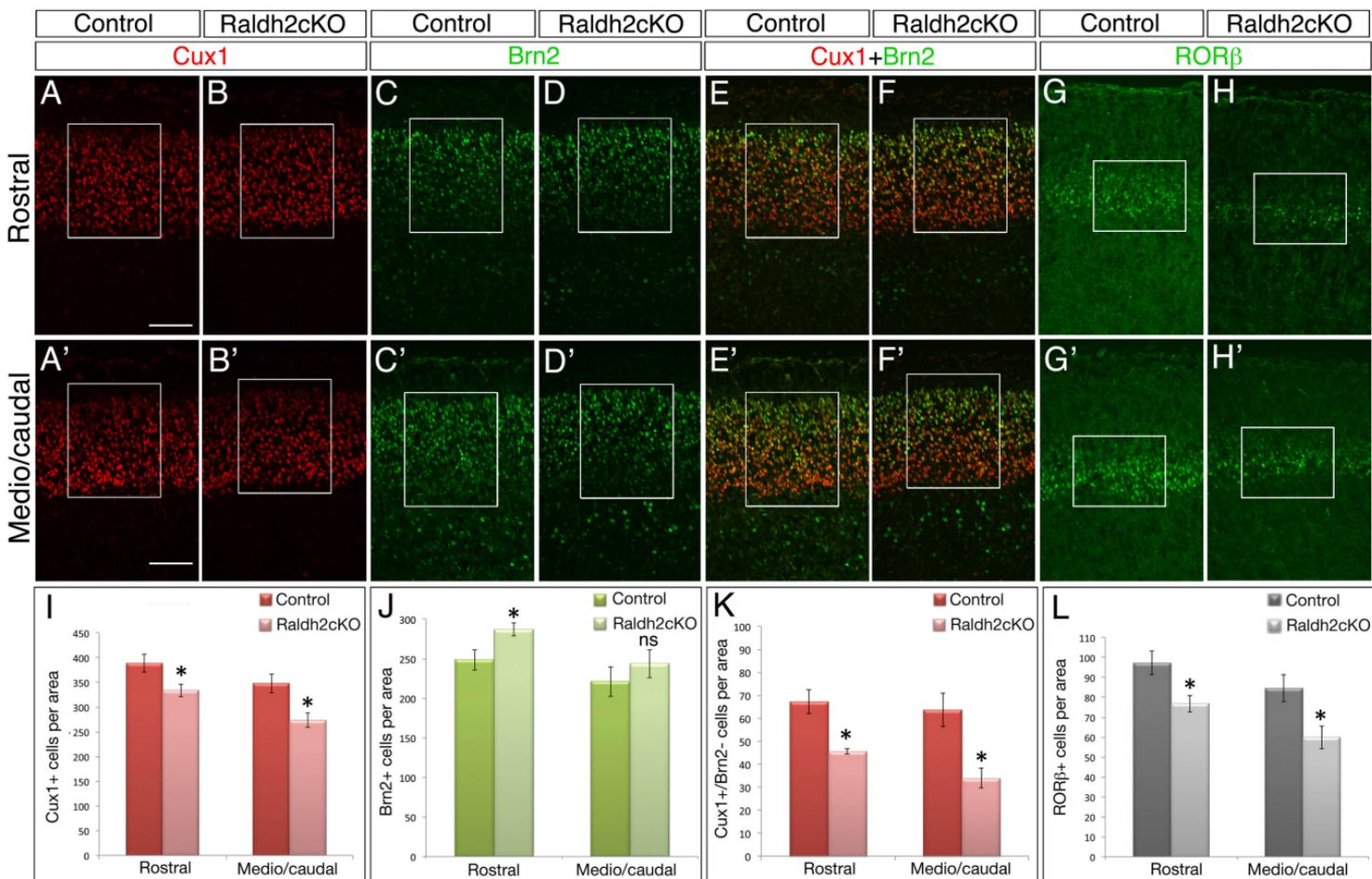


Figure 4
Haushalter et al., 2016

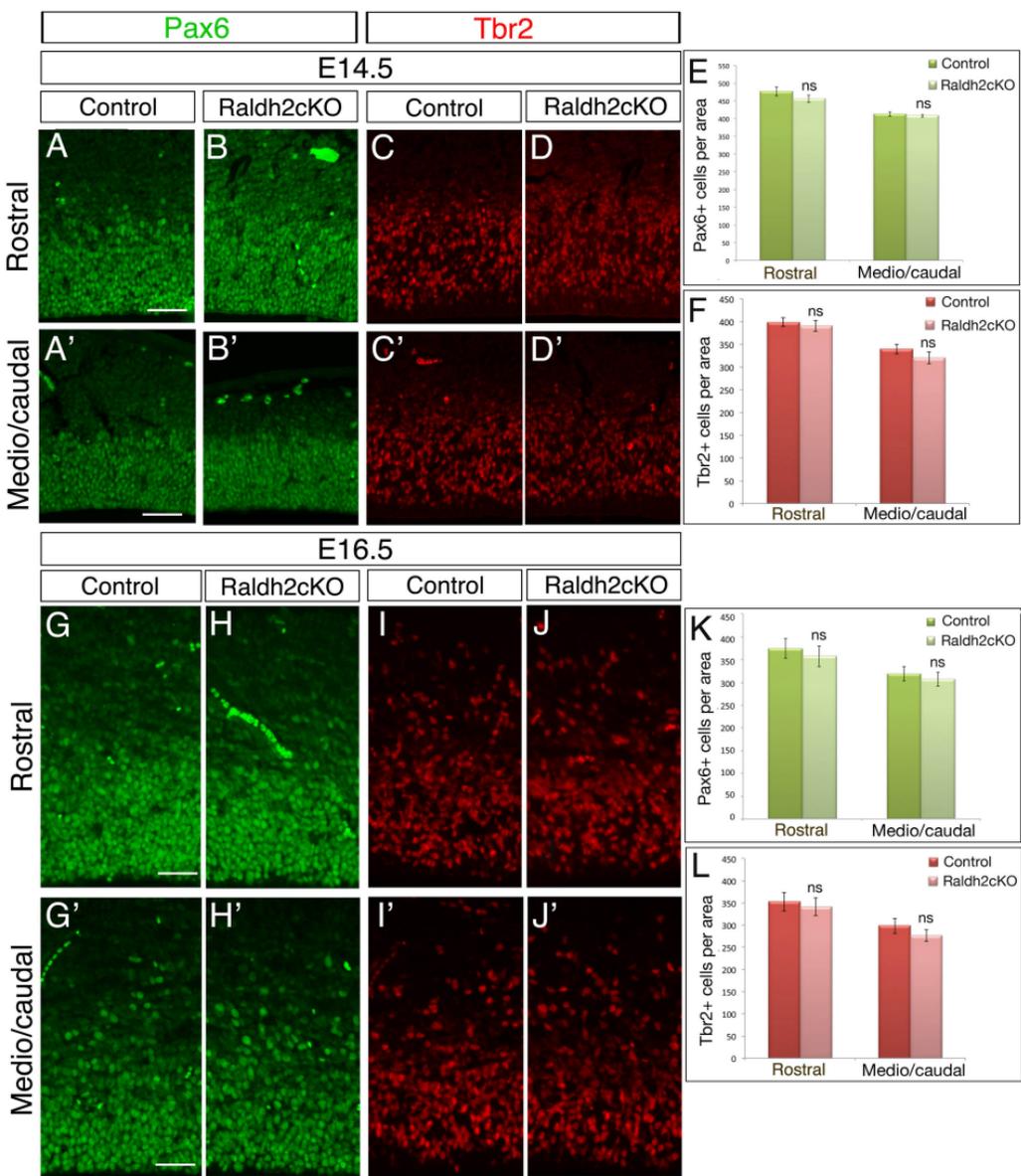


Figure 5
Haushalter et al., 2016

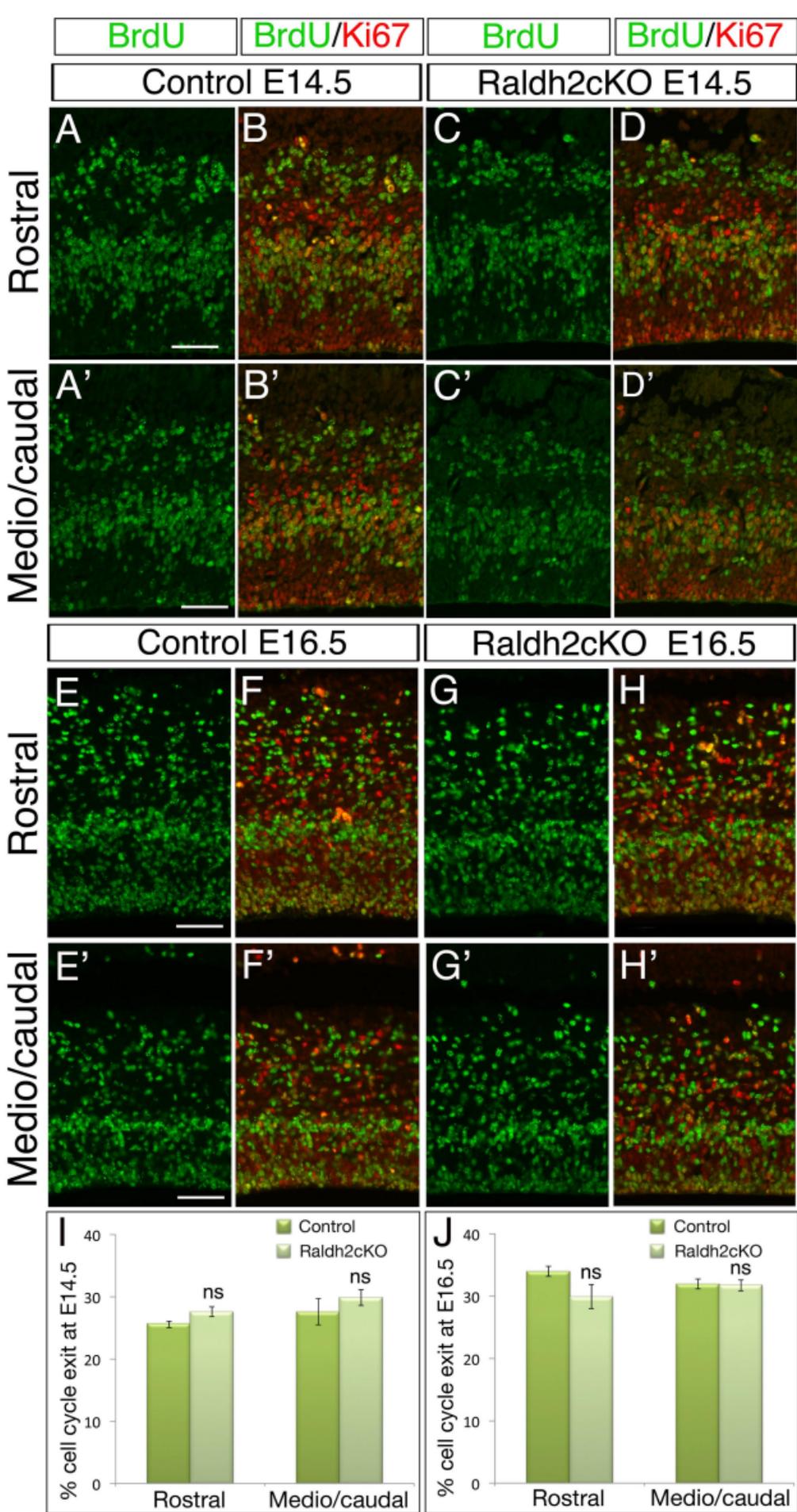


Figure 6
 Haushalter et al., 2016

Elect E13.5 -> E17.5

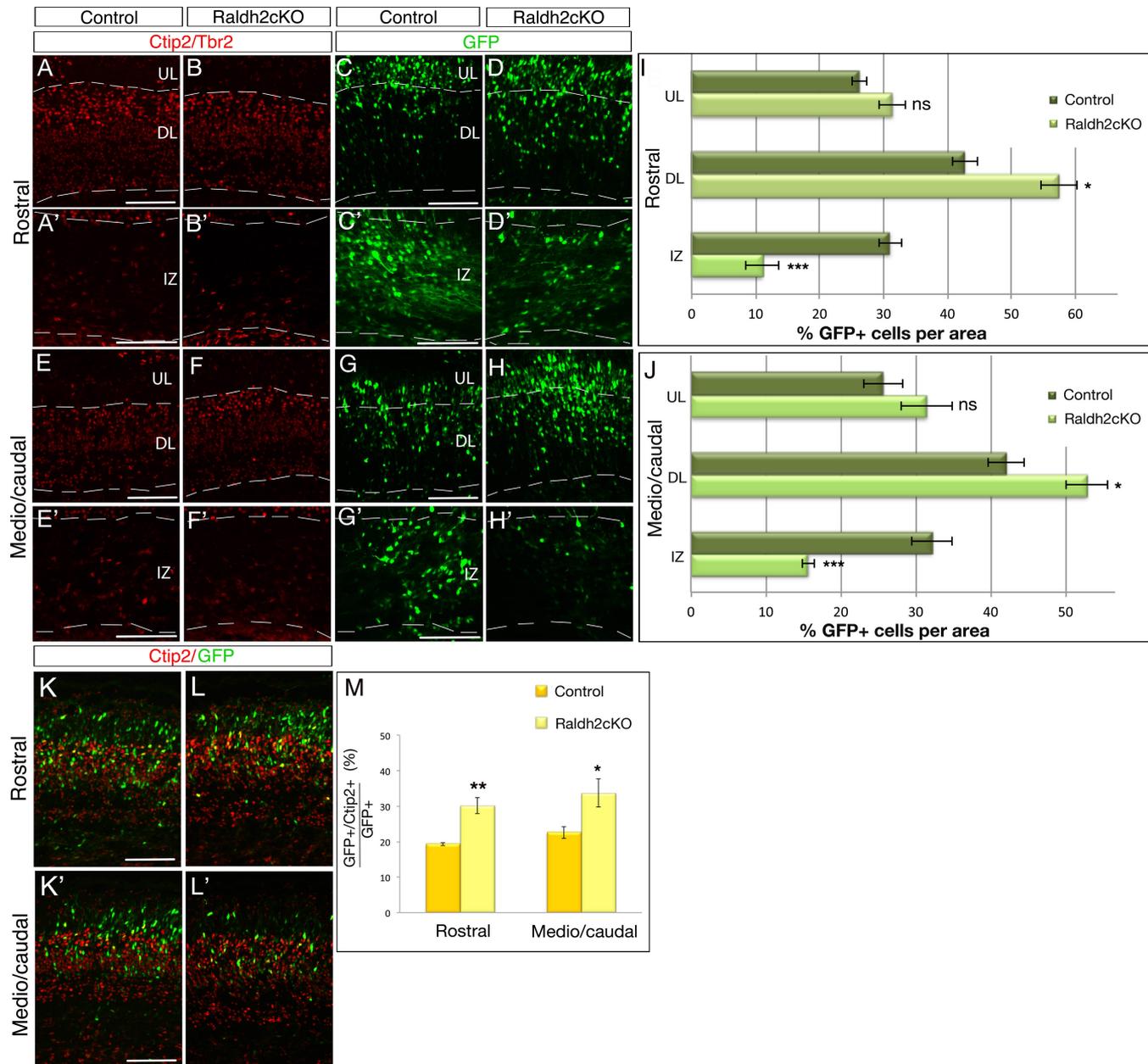


Figure 7
 Haushalter et al., 2016

⚡ Elect E14.5 -> E17.5

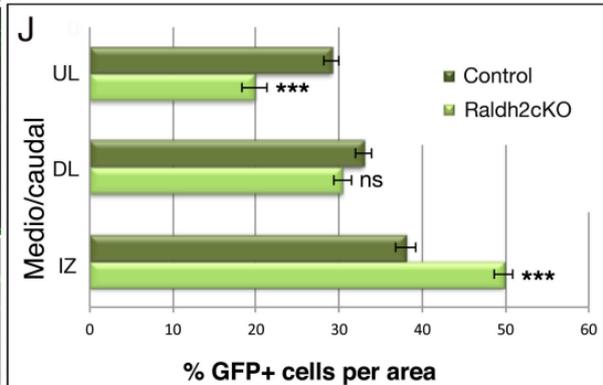
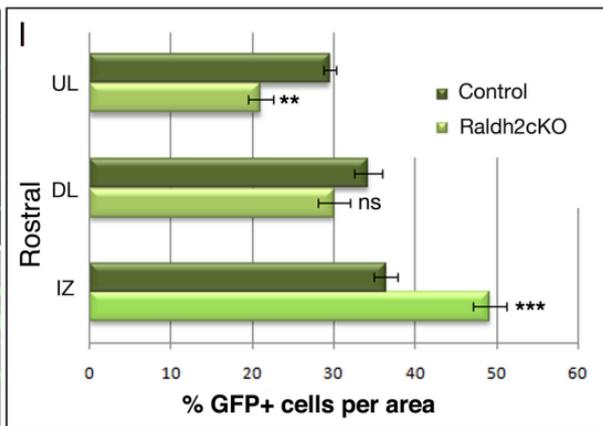
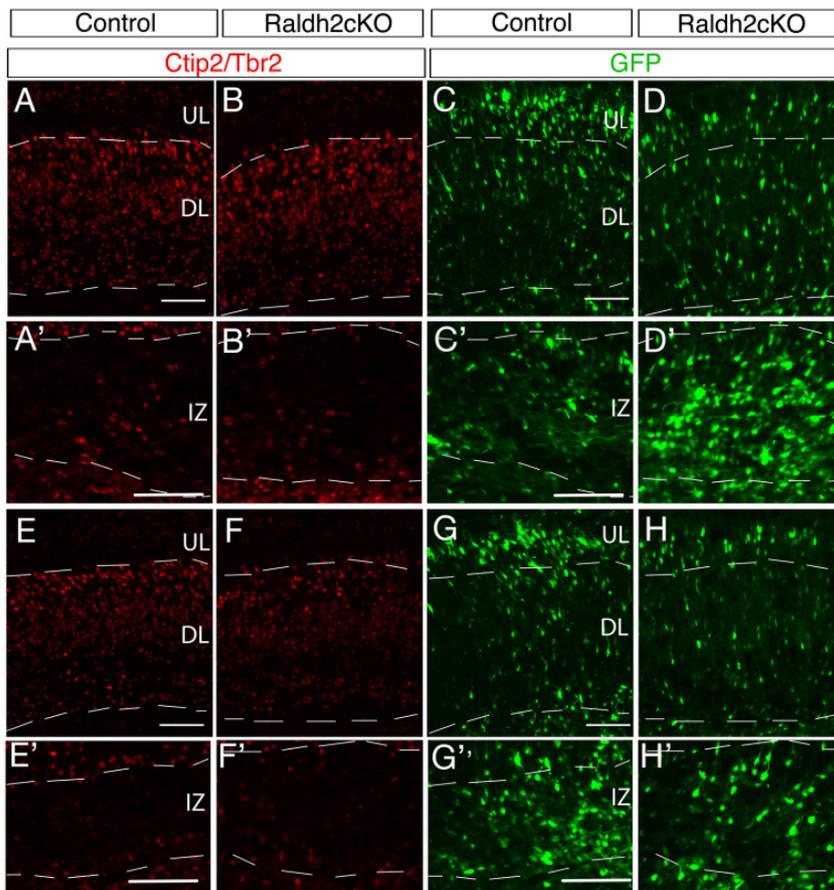


Figure 8
 Haushalter et al., 2016

Elect E14.5 → E17.5

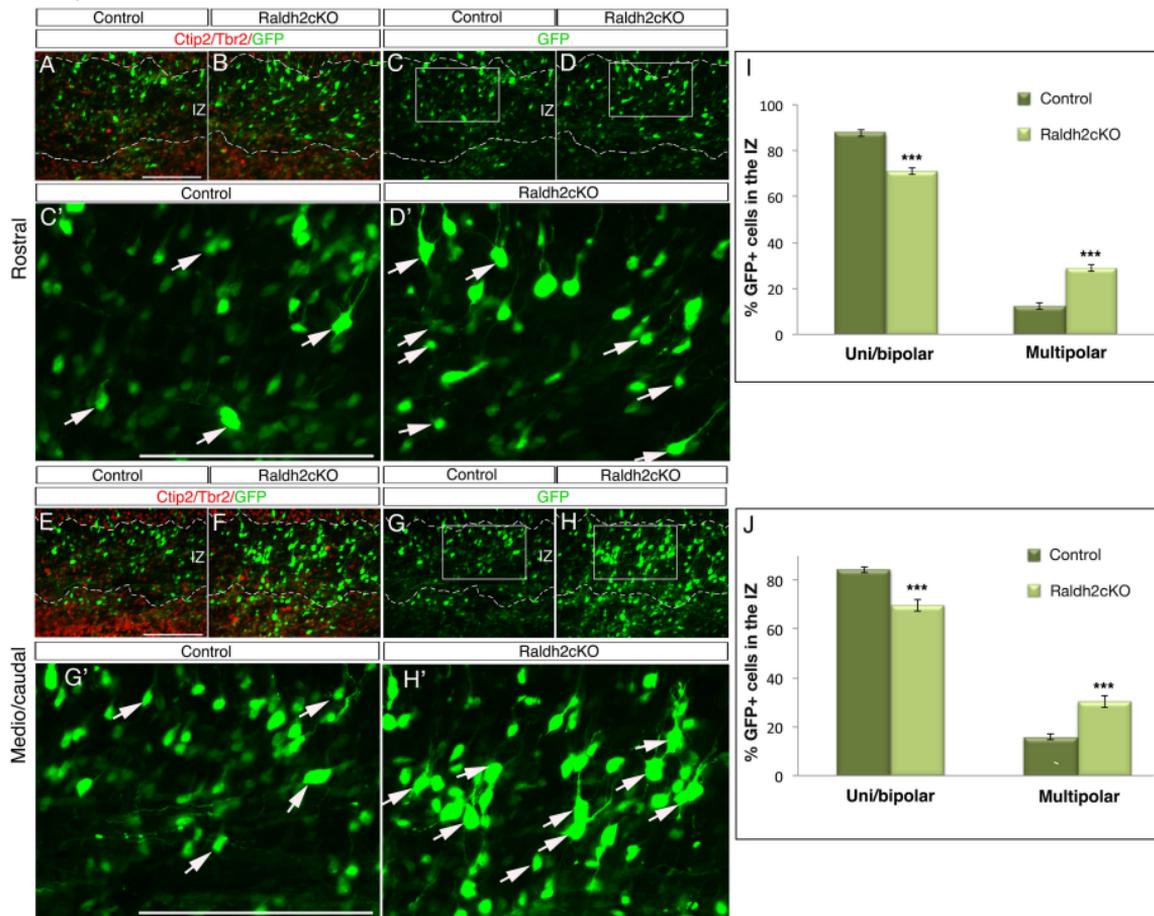
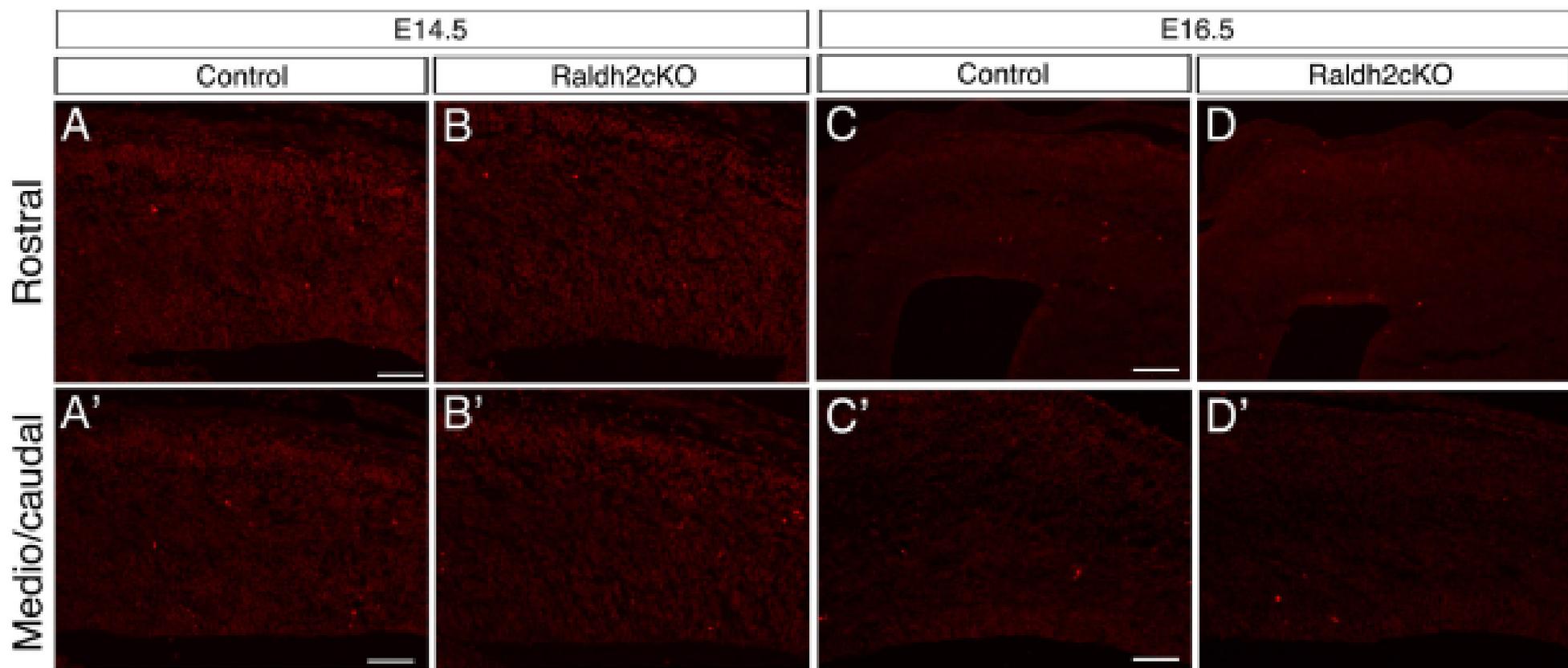
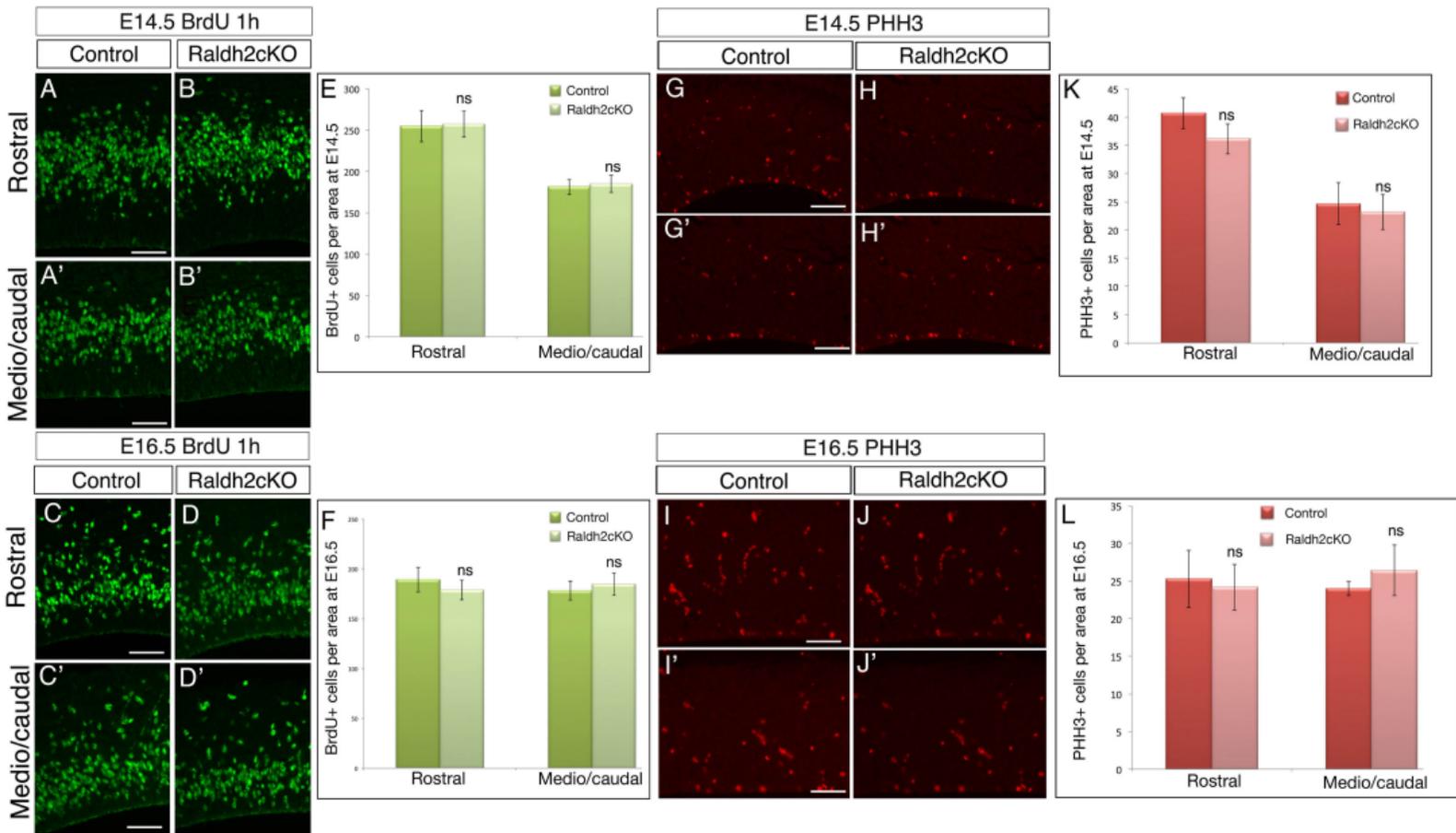


Figure 9
Haushalter et al., 2016

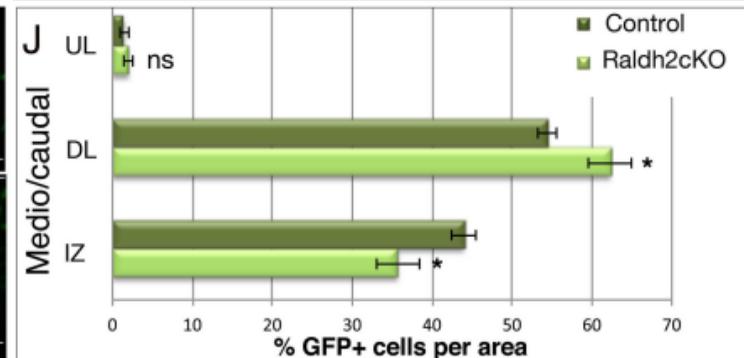
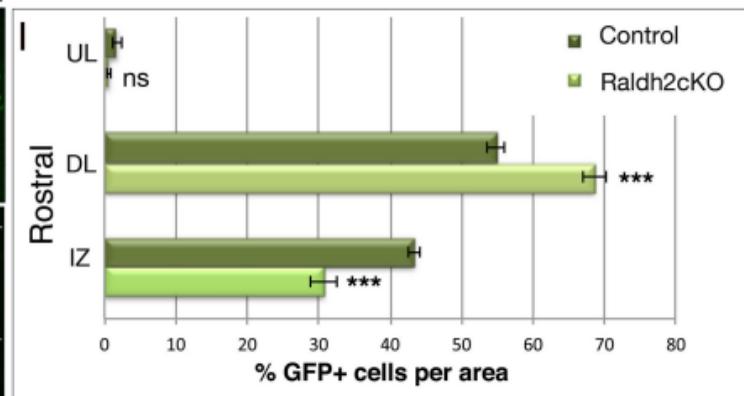
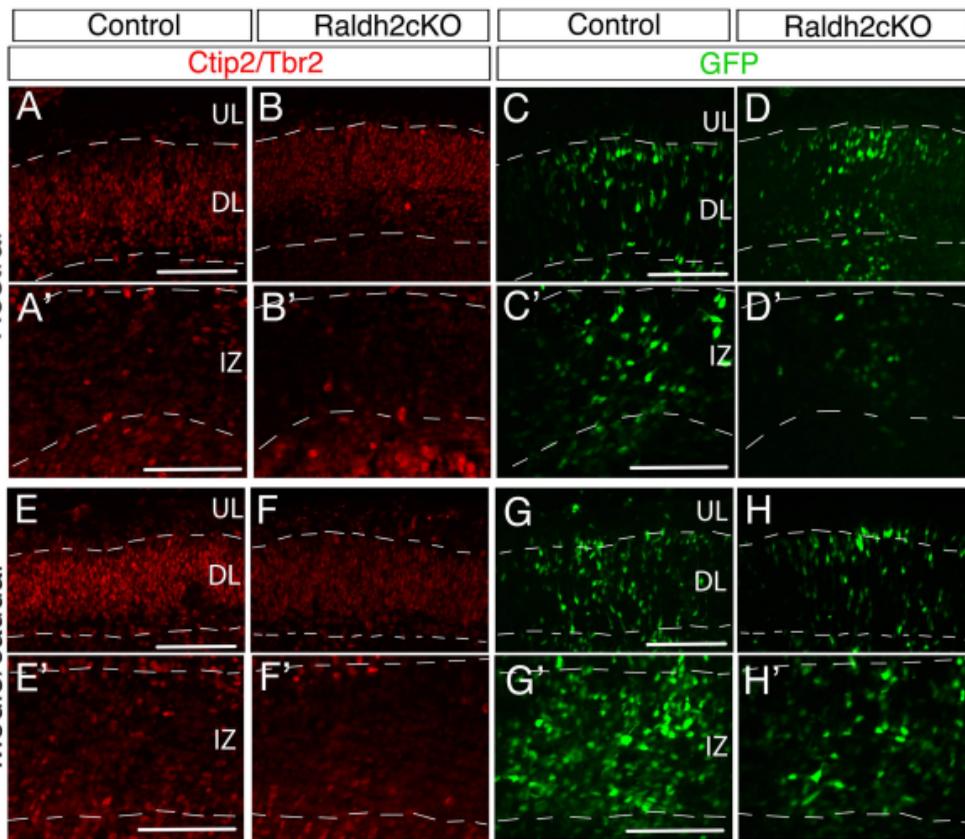


Supplementary figure 1
Haushalter et al., 2016

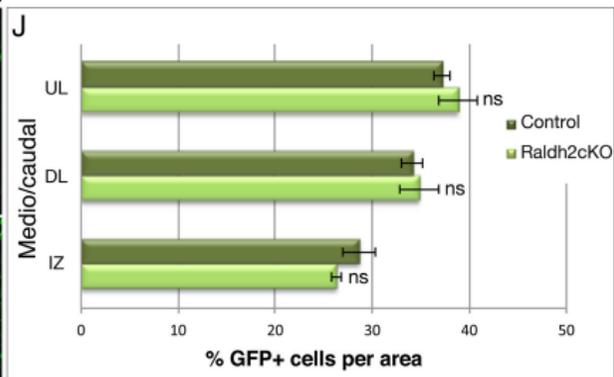
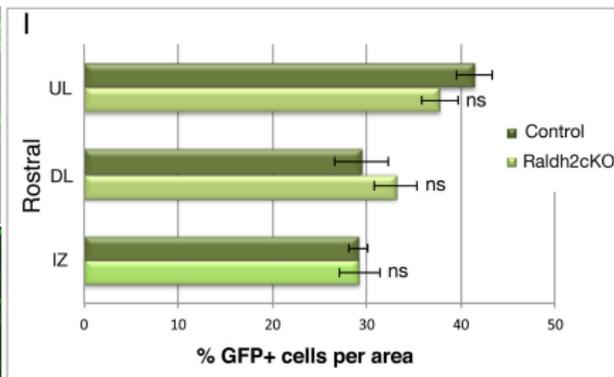
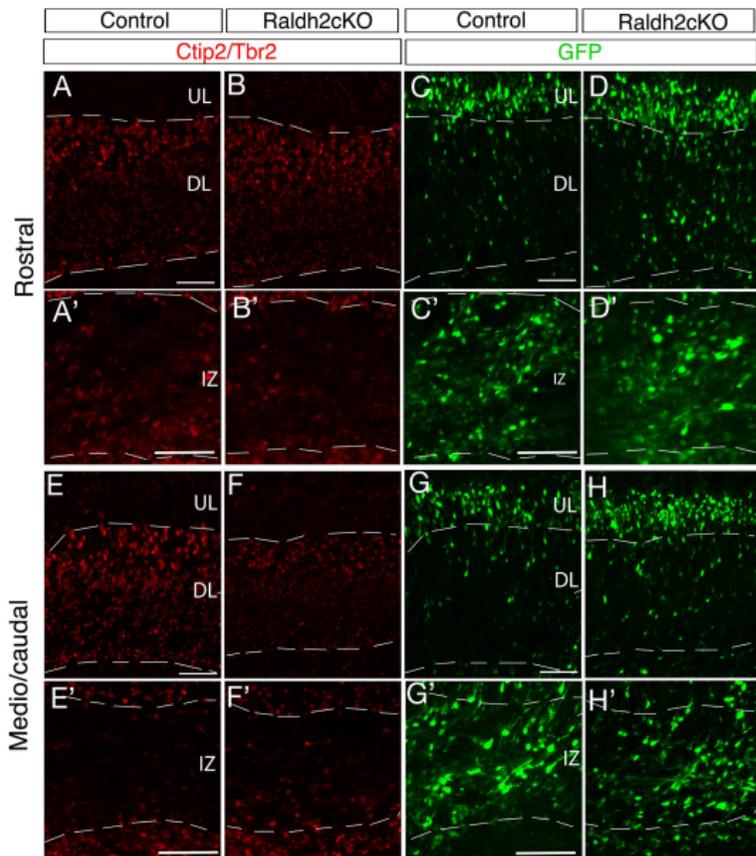


Supplementary figure 2
Haushalter et al., 2016

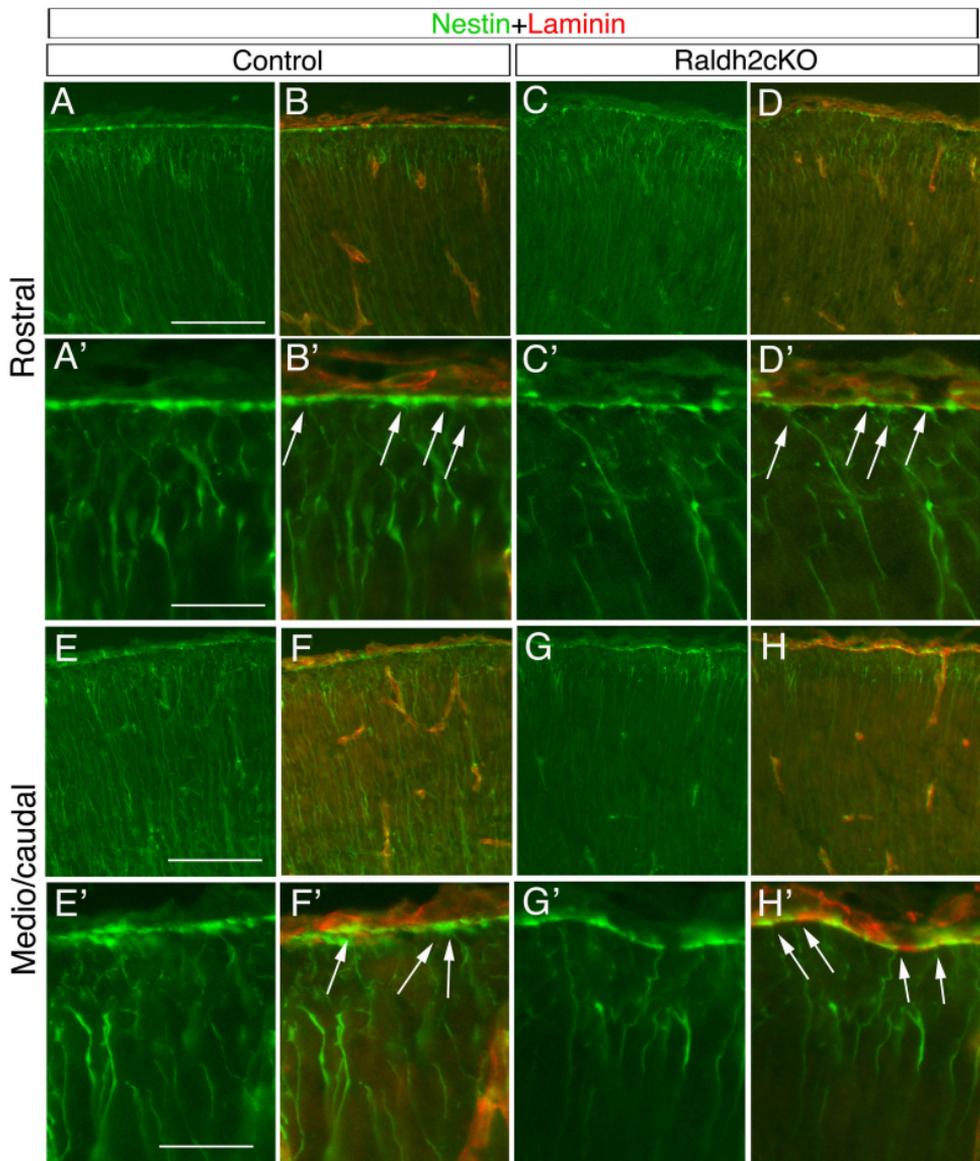
Elect E13.5 → E15.5



Elect E14.5 -> E18.5



Supplementary figure 4
Haushalter et al., 2016



Supplementary figure 5
Haushalter et al. 2016

IV. Implication de la signalisation rétinéinoïde au cours de la neurogenèse précoce du cerveau antérieur

1. Contexte général de l'étude

L'AR est une molécule signal impliquée dans le développement du cerveau antérieur, notamment au cours de la phase d'expansion latérale. Les travaux menés par l'équipe sur la lignée *Raldh2*^{-/-} démontrent ce point et suggèrent également un rôle de l'AR au cours de la phase ultérieure du développement neural cortical, la phase de neurogenèse (*Ribes et al., 2006*). Notre étude de la fonction tardive du gène *Raldh2* suggère que l'AR influence la neurogenèse à partir du stade E13,5 (cf. Résultats, Partie III, §3-4), laissant inexploré son rôle potentiel au début de la neurogenèse.

À partir de E8,5, l'expression du gène *Raldh2* s'estompe au sein de l'épithélium neural du cerveau antérieur et est présente jusqu'à E9,5 dans l'ectoderme de surface. À E9, le gène *Raldh3* est également exprimé dans l'ectoderme de surface et apparaît dans l'ectoderme neural de la vésicule optique ainsi que dans les placodes olfactives (*Li et al., 2000b; Ribes et al., 2006*). L'expression de *Raldh3* est ensuite détectée à E11 dans la région ventrale du cerveau antérieur aux niveaux des éminences ganglionnaires latérales et le septum (*Li et al., 2000b*). Contrairement à la mutation du gène *Raldh2*, les mutants *Raldh3*^{-/-} ne présentent pas de défauts de morphogenèse au niveau du cerveau antérieur ou du processus fronto-nasal, excepté une agénésie des choanes (*Dupé et al., 2003*). Le laboratoire d'accueil a réalisé une étude sur le gène *Rdh10*, en élaborant une mutation nulle *Rdh10*^{-/-} (*Rhinn et al., 2011b*) (cf. Introduction, Partie I, §3.2.1). Ces travaux ont montré que les mutants *Rdh10*^{-/-} ne produisent pas d'AR au niveau du cerveau antérieur, ne mettant plus à disposition le substrat nécessaire aux RALDH. Les mutants *Rdh10*^{-/-} porteurs du transgène rapporteur RARE-*lacZ* sont dépourvus à E9,5 d'activité β-galactosidase dans la région fronto-nasale et le cerveau antérieur (*Rhinn et al., 2011b*). Lorsque le gène *Rdh10* est inactivé, de sévères défauts du développement sont observés et cela conduit à une létalité embryonnaire précoce (E10,5) (*Rhinn et al., 2011b*). Cependant, une partie des embryons mutants échappe à la létalité et atteint des stades plus tardifs (*Rhinn et al., 2011b*). Ainsi, il est possible d'observer aux stades E12,5 et E13,5 des défauts phénotypiques de la région crânio-faciale, telles qu'une troncation des processus fronto-nasaux ainsi que des fentes palatines (*Rhinn et al., 2011b*). L'ensemble

de ces observations laisse à penser que l'AR produit par les RALDHs au moment du développement précoce du télencéphale pourrait influencer le début de la neurogenèse.

Le contrôle temporel du début de la phase de neurogenèse est crucial car il régule l'importance de la population initiale de progéniteurs et ainsi le nombre des neurones. Différents facteurs contrôlent la transition entre la phase proliférative et la phase neurogénique (cf. Introduction, Partie II, §2.3). L'AR pourrait être l'un de ces facteurs et agir sur le déroulement des étapes précoces de la neurogenèse. Nous avons utilisé la lignée *Rdh10*^{-/-} afin de caractériser le rôle potentiel de l'AR au cours de la neurogenèse précoce.

2. Problématique

Le gène *Rdh10* exerce-t-il une fonction au cours du développement du cortex cérébral ?

Le manque en AR affecte-t-il la transition cellule NE/cellule GR et ainsi le début de la neurogenèse ? Le manque en AR conduit-il à une perturbation de la transition cellule GR/ PNI et affecte-t-il ainsi la population progénitrice et neuronale ?

Pour répondre à ces questions, nous nous sommes intéressés à la formation des populations neuronales des couches profondes, ainsi qu'à la formation des PNIs. Nous avons analysé également la formation de la population des cellules GRs à l'origine des PNIs et des neurones. Nous avons enfin étudié la prolifération et le cycle cellulaire de l'ensemble de la population progénitrice corticale.

3. Résumé des résultats

Nous avons tout d'abord observé que la taille globale de l'encéphale des mutants *Rdh10*^{-/-} est réduite. Une analyse quantitative montre une réduction significative de l'épaisseur de la plaque corticale, de la ZI et de la zone de prolifération ZV/ZSV dans les embryons mutants par rapport aux contrôles. La réduction de ces régions corticales engendrée par l'absence d'AR pourrait être la conséquence d'une perturbation des populations progénitrices et neuronales.

À E13,5, la PC est composée de neurones destinés aux couches profondes VI et V. Les mutants *Rdh10*^{-/-} présentent une diminution significative de la population neuronale destinée à la couche V et rencontrée également dans la couche VI. Ceci suggère qu'en absence d'AR, la plaque corticale se réduit à cause d'un déficit en neurones des couches profondes. La

perturbation du nombre de neurones pourrait avoir comme origine un défaut des populations progénitrices.

Nous avons observé une diminution significative du nombre des cellules GRs et des PNIs en absence d'AR. Ceci suggère que le déficit en neurones corticaux est dû à un défaut du nombre des populations progénitrices. De plus, ceci suggère que l'AR serait important pour la génération et/ou le maintien des populations progénitrices corticales. Nous avons effectué une analyse de la prolifération des progéniteurs. Dans les mutants *Rdh10*^{-/-}, les populations progénitrices effectuent un cycle cellulaire plus long avec une réduction des PNIs en phase M. Ces résultats suggèrent que l'AR est nécessaire à la transition des cellules GRs en PNIs et à la différenciation des PNIs. Ces observations sont en lien avec la diminution de la zone de prolifération ZV/ZSV.

La réduction des zones ZSV et ZI pourraient avoir une influence sur la migration des interneurones, se servant de ces régions comme voies d'accès à la plaque corticale. Les données de la littérature induisent que la ZSV/ZI contiendrait une molécule chémoattractive guidant les interneurones vers le cortex. En connaissance de cela, nous avons décidé d'analyser la distribution des interneurones dans le cortex. De premières observations montrent un défaut de leur distribution dans la ZI et une distance parcourue plus courte dans les embryons mutants par rapport aux contrôles. Ceci suggère un rôle de l'AR dans la migration tangentielle des interneurones du cortex.

Nous suggérons que l'absence d'AR conduit à une microcéphalie en perturbant la prolifération des populations progénitrices, générant moins de progéniteurs intermédiaires, et ainsi moins de neurones. À cela s'ajoute un nombre réduit d'interneurones peuplant la plaque corticale par une perturbation de leur migration en absence d'AR.

Dans la zone de prolifération (ZV/ZSV), nous observons un nombre réduit de PNIs qui pourrait être engendré par le maintien des cellules GRs dans un état "prolifératif". Si les GRs étaient en prolifération, nous devrions observer une augmentation de ce pool. Or nous notons une faible diminution de leur nombre, suggérant une éventuelle perturbation s'opérant avant le début de la neurogenèse, lors de la transition des cellules NEs en cellules GRs.

Ainsi l'AR pourrait constituer un facteur extrinsèque important agissant en amont et sur l'initiation de la neurogenèse précoce lors du développement cortical.

4. Article en préparation

Carole Haushalter*, Laure Asselin*, Valérie Fraulob, Pascal Dollé, and Muriel Rhinn.
Retinoic acid controls the onset of neurogenesis and neuronal production in the developing mouse cerebral cortex.

(*) Contribution égale

NB: les notes en italiques qui apparaissent dans l'article indiquent le complément d'expériences à réaliser et les pistes à explorer pour compléter cette étude.

Retinoic acid controls the onset of neurogenesis and neuronal production in the developing mouse cerebral cortex

Carole Haushalter^{1-5,*}, Laure Asselin^{1-5,*}, Valérie Fraulob¹⁻⁵, Pascal Dollé^{1-5, #} and Muriel Rhinn^{1-5, #}

- 1) Development and Stem Cells Department, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France
- 2) Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7104, Illkirch, France
- 3) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 964, Illkirch, France
- 4) Université de Strasbourg, Illkirch, France
- 5) Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France

* These authors contributed equally to this work

To whom correspondence should be addressed:

E-mail : rhinn@igbmc.fr, dolle@igbmc.fr

Running title : retinoic acid and cortical neurogenesis

Key words: retinoic acid, cerebral cortex, neurons, neuronal progenitors, cortical layering

ABSTRACT

A tight regulation of neuron production is required to generate a functional cerebral cortex and is achieved by a proper balance between proliferation and differentiation of progenitor cells. Though the vitamin A (retinol) active derivative retinoic acid (RA) has been implicated as one of the signals acting during mammalian forebrain neurogenesis, its function at the start of neurogenesis as well as during establishment of cortical layers and neuronal subtypes remains elusive as murine mutants for genes encoding key enzymes involved in RA synthesis die during embryonic development. We analysed corticogenesis in *Rdh10* mutants where an RA-deficiency is generated as the retinol to retinaldehyde conversion is abolished. When analysed at the latest stage before lethality occurs (embryonic day E13.5), the mutants show smaller telencephalic vesicles and the thickness of the cortical plate is strongly reduced. The first progenitors formed in the cortical plate are radial glial (RG) cells which generate neurons directly, as well as through an indirect mechanism involving the production of intermediate neuronal progenitors (INPs) which then give rise to neurons. We show that lack of RA impairs the generation of INPs and affects the cell cycle exit of progenitor cells, leading to microcephaly. Our data indicate that RA controls the balance between self-renewal of RG cells and their progression to a more restricted state (neurons and/or INPs). As RG cells are diminished in our mouse model, RA may already act at early stages (before or at the start of neurogenesis) during the transition between neuroepithelial cells and RG cells.

INTRODUCTION

Several pathways including fibroblast growth factors (FGFs), transforming growth factors β (TGF β), Sonic hedgehog (Shh) and retinoic acid (RA) are interacting in order to elaborate from a simple neuroepithelial sheet the most anterior neural structure, the telencephalon. Its dorsal part will generate the cerebral cortex, the site of higher cognitive functions. Before the start of neurogenesis, the neuroepithelial (NE) cells divide exclusively symmetrically to expand this cell pool, leading to a lateral expansion of the cortex (Chenn and McConnell, 1995). At the onset of neurogenesis, the NE cells turn into radial glial (RG) cells, that undergo symmetric proliferative divisions to amplify their pool in the ventricular zone (VZ) of the neuroepithelium. As development proceeds, RG cells divide asymmetrically to self-renew and generate either a postmitotic neuron, or an intermediate neuronal progenitor (INP) cell (Götz and Huttner, 2005; Miyata et al., 2010; Noctor et al., 2004). INP cells localise in the subventricular zone (SVZ), and divide abventricularly in a symmetric differentiative mode generating two postmitotic neurons. Little is known about the mechanism that controls transition between these progenitor populations. The timing of the transition between the early expansion phase and the neurogenic phase where NE cells turn into RG cells, as well as the timing of the transition of the RG cells generating neurons directly or indirectly through INPs, is critical for proper forebrain development. A premature or delayed transition will affect the size of the initial progenitors pool and thus the number of neurons, and finally the cortical size that will lead to smaller or larger brains (i.e., microcephaly or macrocephaly, respectively) (Caviness et al., 1995; Rakic, 1995).

The fate of progenitor cells is controlled by an interplay of extrinsic and intrinsic signals and only part of them have been identified. On one hand, Notch signalling as well as FGF10 signalling are key determinants for the transition of NE to RG cells (Anthony et al., 2005; Gaiano et al., 2000; Sahara and O'Leary, 2009); for a review: Miyata et al., 2010). On the other hand, FGF signal inhibits the transition of RG cells to INPs (Kang et al., 2009). Furthermore, it has been shown recently that the loss of function of Elp3, an enzymatic subunit of the large macromolecular Elongator complex, favors direct neurogenesis at a time point where the neurons should arise from INPs (Laguesse et al., 2015). Ablation of Wnt/beta-catenin signalling leads to a premature differentiation of RG cells, but also to an increase of INPs (Draganova et al., 2015). In mice, the expansion phase holds until embryonic day 11.5 (E11.5) when RG cells appear and the neurogenic phase can start. Among the

various signalling molecules present from E8.5 until the beginning of neurogenesis, retinoic acid, an active vitamin A (retinol) derivative, can directly regulate gene expression by binding to its nuclear receptors (RARs). This small lipophilic molecule is synthesised in a two-step oxidative reaction involving RDH10, the main retinol dehydrogenase present in the embryo (Cammass et al., 2007; Sandell et al., 2007), and then retinaldehyde dehydrogenases (RALDH1, 2, 3) (for a review: Rhinn and Dollé, 2012). During brain development, RALDH2 is the first RALDH to be expressed as early as E8.5, followed by RALDH3 (Ribes et al., 2006). *Raldh2*^{-/-} mutant mice are lethal at E9.5, preventing the generation of double *Raldh2;Raldh3* mutants and their analysis at the start of the neurogenic phase and later on. We have previously generated an *Rdh10* knockout allele that is lethal at midgestation, though interestingly some of the mutants escape early lethality and survive until E14.5 (Rhinn et al., 2011). This provides us with a model where we can ask about a potential role of RA during early corticogenesis, and analyze loss-of-function mutants until E13.5.

Using *Rdh10*^{-/-} mutant mice, we have found that mutants have a reduced number of developing cortical projection neurons, resulting in a microcephalic phenotype. To understand the origin of the microcephaly, we analysed progenitor populations and their proliferating behaviour. We observed a decrease of RG cells and a strong depletion of INP cells. These results suggest a key function of RA during early cortical neurogenesis in regulating the transition phase of RG cells to INPs. *So far, the questions if RA is involved in establishing the pool of NE cells, and/or controls the transition of NE cells to RG cells, are still open and we are performing experiments to answer those questions before publication.*

RESULTS

***Rdh10* deletion affects neurogenesis and leads to microcephaly**

As described above, retinoic acid is present in anterior brain during early neurogenesis (E10.5-E13.5) produced by RALDH2 and RALDH3 successively. We previously generated an *Rdh10* loss of function allele (*Rdh10*^{-/-}) by gene targeting, eliminating the catalytic domain. This loss of function is embryonic lethal shortly after midgestation, with a small fraction of the mutants surviving until around E13.5 (Rhinn et al., 2011). The *Rdh10*^{-/-} mutants obtained at E13.5 had severe external abnormalities including nasal/facial clefting, truncation of the nasal process and intracranial eye development (Rhinn et al., 2011). Remarkably, when dissected the brains of *Rdh10*^{-/-} mutants displayed smaller telencephalic vesicles compared to

controls at E13.5 (Fig. 1A-D), an observation confirmed by histological analysis (Fig. 1E-G'). Interestingly, combined loss of function of RALDH2 and RALDH3 using a conditional approach (see Materials and Methods and Haushalter et al., 2016) led to a craniofacial and brain phenotype comparable to *Rdh10*^{-/-} mutants at E13.5 (Supplementary material, Fig. S1A-E), indicating that the severe craniofacial abnormalities accompanied with smaller brains are due to a lack of RA production.

The observation of smaller neocortices in *Rdh10*^{-/-} mutants suggests a possible role of RA in neurogenesis. As revealed by our histological analysis, *Rdh10*^{-/-} animals showed a reduced cortical thickness (Fig. 2A-B', E, p<0.05 rostrally and p<0.01 more posteriorly). This defect could result from impaired birth of progenitors or newborn neurons. Interestingly, immunostaining using Tuj1, a marker for differentiating neurons at E13.5, showed a markedly reduced thickness of the intermediate zone (IZ) and cortical plate (CP) in *Rdh10*^{-/-} mutants, suggesting that less newborn projection neurons are formed (Fig. 2C-D', F, p<0.01). To distinguish the IZ from the CP, we analysed by in situ hybridisation the expression of *Cxcl12* (also known as *Sdf1*, *Stromal cell-derived factor-1*), which is specifically expressed in the IZ (Daniel et al., 2005). We observed a reduced extension of the expression domain (arrowheads in Fig. 2 H-I'), as well as a diminished thickness all along its length, in the *Rdh10*^{-/-} mutants compared to controls. *Cxcl12* mRNA is detected in INPs (Abe et al., 2015; Tiveron et al., 2006), suggesting a deficit in this population of cells. To analyse the cortical plate, we performed immunolabelings of projection neurons present in deeper layers (DL) of the cortex using Ctip2 (a marker of cortical layer V) (Arlotta et al., 2005). *Rdh10*^{-/-} mutants showed a 45-50% significant decrease of Ctip2-positive neurons (Fig. 3A-B', C; p<0.05 rostrally and p<0.01 more caudally). *We will next perform immunolabeling with Tbr1 (layer VI) as well as with Cux1 (layers IV-II) to evaluate if the different neuronal populations are equally affected.* To assess whether the deficiency in new born neurons may be due to apoptotic cell death, we performed TUNEL experiments in *Rdh10*^{-/-} mutants, and compared them with control littermates. No abnormal apoptosis was detected in mutants at E13.5 (Supplementary material, Fig. S2A-D').

These results reveal that in absence of RA, the production of projection neurons is decreased, which will lead to a microcephaly phenotype in *Rdh10*^{-/-} mutants.

***Rdh10* loss of function affects the progenitor populations**

In *Rdh10*^{-/-} neocortices, the thickness of the Tuj1-negative domain corresponding to the ventricular zone (VZ) and subventricular zone (SVZ) is diminished, though fairly less than

the Tuj1-positive domain, suggesting that progenitor populations may show some abnormalities (Fig. 2C-D', G, $p < 0.05$). In the developing mouse cortex, there are two major populations of neural progenitor (NP) cells: radial glial (RG) cells localised in the VZ and expressing Pax6 (Englund et al., 2005), and intermediate neuronal progenitor (INP) cells localised in the SVZ and expressing Tbr2 (Englund et al., 2005; Sessa et al., 2008). Some projection neurons arise from dividing RG cells through a process called direct neurogenesis, but a large number of these neurons arise via an indirect mechanism involving division of INP cells. We performed immunolabelings for Pax6 and Tbr2, in sections of the cerebral cortex from E13.5 control and *Rdh10*^{-/-} littermates. The number of Pax6-positive RG progenitors was diminished rostrally by 16% ($p < 0.05$) (Fig. 4A-B, E) and more posteriorly by 27% ($p < 0.01$) (Fig. 4A'-B', E) in *Rdh10*^{-/-} mutants when compared to controls. Interestingly, the number of Tbr2-positive INPs (Fig. 4C-D', F) was strongly decreased at both levels by 48% ($p < 0.01$).

To determine whether an impaired RA synthesis affects cell proliferation, we performed 1 h bromodeoxyuridine (BrdU) pulse labeling. We quantified BrdU+ cells, corresponding to cells that were undergoing DNA replication at the time of BrdU injection. These experiments did not reveal any significant difference in the number of counted cells in *Rdh10*^{-/-} versus control animals (Fig. 5A-B', E), suggesting that the same number of progenitors are undergoing S-phase in both genotypes. To examine if absence of RA is affecting apical to basal mitotic transition, we analysed immunolabelings of serine 10-phosphorylated histone H3 (pHH3), a marker for dividing cells in late G2 and M-phase. It has been described that RG cells divide at the apical surface, whereas mitoses in INPs are localised abventricularly in the SVZ (Noctor et al., 2004). Interestingly, in *Rdh10*^{-/-} mutants, only basal mitoses were reduced (Fig. 5C-D', F). These results, together with the observed decrease of Tbr2+ cells in mutants, suggest that RA influences the transition of RGs to INPs.

We next evaluated the rate of cells leaving the cell cycle, by exposing control and *Rdh10*^{-/-} embryos to a pulse of BrdU 18 h prior to analysis, which was performed at E13.5. Double immunolabeling for BrdU and Ki67, a marker for proliferating progenitors in all except G2 phases, revealed a significantly lower cell cycle exit rate by 7% (Fig. 6A-D', E). These results support the idea that the lack of RA results in a delayed neurogenesis leading to a deficit of INPs and therefore in the production of cortical neurons.

Loss of *Rdh10* affects migration of cortical interneurons

GABAergic interneurons represent 20-30% of all cortical neurons (Parnavelas, 2000). They originate from the lateral and medial ganglionic eminence (LGE and MGE, respectively),

structures derived from the ventral forebrain, and migrate tangentially to their final destination into the developing cortex (Lavdas et al., 1999). Most of the interneurons enter the brain at E12, and the marginal zone and the SVZ/IZ are the major routes of their tangential migration (Wonders and Anderson, 2006). We described above that the expression of *Cxcl12* in the IZ is affected in *Rdh10*^{-/-} mutants, whereas expression in the developing meninges is maintained (Fig. 2H-I'). *Cxcl12* is a chemokine secreted by INPs (Stumm et al., 2003; Tiveron et al., 2006) and it has been shown that *Cxcl12* ablation in INPs disrupts tangential interneuron migration in the SVZ/IZ (Abe et al., 2014; Tiveron et al., 2006). Also, *Pax6* and *Tbr2* mutants exhibit reduced *Cxcl12* expression in the IZ and abnormal interneuron migration (Arnold et al., 2008; Sessa et al., 2008). This prompted us to analyse the expression of *Gad67*, encoding the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase, a marker for GABAergic inhibitory neurons. *We cannot conclude about the absolute number of Gad67-positive cells in the cortex as we have not performed precise quantifications.* However, we observed that the distribution of *Gad67*-expressing cells is affected mainly at the level of the IZ, and more posteriorly the extent of their migration stream is reduced, in *Rdh10*^{-/-} embryos (arrowheads in Fig. 7), suggesting that a deficit in *Cxcl12* chemokine secretion contributes to inhibit migration. These results support that an appropriate level of RA is required for tangential migration of developing GABAergic interneurons to occur properly.

DISCUSSION

In this study we demonstrate a role for RA in early neurogenesis in the mouse cerebral cortex. We used *Rdh10*^{-/-} mutants that have been generated previously (Rhinn et al., 2011), in which production of retinaldehyde, the substrate for RA synthesis, is ablated. We found that the *Rdh10*^{-/-} mutants display smaller telencephalic vesicles. Newly born projection neurons are reduced, probably as a consequence of defects in progenitor cells production and neuronal differentiation. We attribute those defects to the ability of RA to influence the transition of RG cells into INPs and to control cell cycle exit of the progenitors.

We are still investigating a potential role of RA at the start of neurogenesis in the control of the transition NE cells to RG cells, and/or prior to neurogenesis in establishing the pool of NE cells.

Indirect neurogenesis is affected in *Rdh10*^{-/-} cortices

In *Rdh10*^{-/-} mutants, we observe a reduction in the number of cortical projection neurons. This

may be the result of progenitors continuing to proliferate instead of producing neurons, or of a defect in the production of the progenitors generating these neurons. Our observations show that the loss of neurons is contributed by an abnormal cell cycle arrest of progenitors. But more strikingly, the numbers of Tbr2-positive cells is strongly reduced in *Rdh10*^{-/-} mutants, suggesting a deficit of INPs. Also, our analysis of cell proliferation showed that only basal mitoses were reduced, suggesting an impairment of the INPs. Projection neurons arise in part from dividing RG cells through direct neurogenesis. But the majority of them is generated via indirect neurogenesis from dividing INPs (Sessa et al., 2008). The neuronal deficit observed in *Rdh10*^{-/-} mutants could be attributed mostly to the INP deficit, and this may indicate an important role for RA in controlling the balance between self-renewal of RG cells and their progression to a more restricted state. As RA is a regulator of gene transcription, it would be interesting to search for target genes specifically involved in this process using high throughput (RNA-seq) approaches. One good candidate is *Neurogenin2* (*Ngn2*), a gene previously shown to be an RA-target (Ribes et al., 2008). *Ngn2* is expressed by cortical progenitors at the time they are committed to the neuronal lineage, and cells infected with *Ngn2*-expressing retroviruses undergo increased non-apical divisions (Hand et al., 2005; Miyata et al., 2004). On the other hand, it has been shown in vitro that Wnt signalling depends on Shh and FGF2 to promote progenitor maturation to an SVZ state (Viti et al., 2003). This crosstalk with the FGF and Shh signalling pathways would appear as a persistent role of RA during mouse brain development, as those interactions have already been revealed in *Raldh2*^{-/-} mutants during early forebrain development (Ribes et al., 2006).

What happens before the onset of neurogenesis in *Rdh10*^{-/-} mutants?

An interesting observation is that the number of RG cells (Pax6-positive) is slightly decreased in the mutants. We have shown that there is a diminished transition of these cells into INPs, that their proliferation is not affected, but that the cell cycle exit rate is diminished. One hypothesis to explain that the number of RG cells is not increased as a consequence of these events would be that at the beginning of neurogenesis (E11.5), the pool of RG cells is already diminished, and their eventual increase during the following phases would partly compensate this deficit. This is supported by previous analyses performed in *Raldh2*^{-/-} mutants where hypoplastic telencephalic vesicles were already observed at an early embryonic stage (E9.5) (Ribes et al., 2006). Thus, RA could be required at two levels: it could influence the proliferation of NE cells, and/or the transition of NE cells into RG cells. The timing of this

transition is important because even a small delay will change the proportion of progenitors and eventually the number of neurons produced (Caviness et al., 1995; Rakic, 1995).

Several signalling molecules have been identified in regulating this process. Overexpression of Notch before the onset of neurogenesis promotes RG cell identity (Gaiano et al., 2000), and analysis of *Notch* mutants in mice have identified *Brain lipid-binding protein (Blbp)* as a target gene (Anthony et al., 2005). Thus, Notch promotes RG cell identity. Expression of a constitutively active form of Notch1 at E13.5 inhibits progenitors from generating neurons and maintains these progenitors as proliferating RG cells (Mizutani and Saito, 2005), suggesting that Notch signalling is also required for the maintenance of progenitors. Accordingly, *Hes1* and *Hes5*, two Notch effectors, contribute to maintain progenitors in a proliferating state by blocking their differentiation into neurons (de la Pompa et al., 1997; Ishibashi et al., 1994). Also, *Fgf10* is expressed in NE cells coincidentally with the transition of NE cells to RG cells, and targeted deletion of this gene delays the transition (Sahara and O'Leary, 2009). Interestingly, it has been shown that this delay is accompanied by an extended period of symmetric division of RG cells, leading to a delayed onset of neuron production as well as a reduced production of INPs (Sahara and O'Leary, 2009).

*At the time of writing this discussion, we are not able to conclude on the exact role of RA in the NE to RG cell transition as further experiments are required. The next step of our analysis will be to see if just before neurogenesis (E10.5), the pool of NE cells is properly established and proliferates appropriately. Then, we will investigate at what rate the transition of NE cells to RG cells occurs in *Rdh10*^{-/-} mutants by performing immunolabelings for BLBP, the astrocyte-specific glutamate transporter (GLAST), and RC2, three antigens expressed in the newly formed RG cells, and for occludin, a tight-junction marker. Furthermore, identifying the molecular switch that governs the transition from NE cells to RG cells would be of great interest. We plan to identify some RA-target genes involved in the control of the transition of NE cells to RG. Several candidates (*Notch*, *Delta1*, *Hes1*, *Hes5*, *Fgf10*) will be analysed by *in situ* hybridisation.*

Retinoic acid and GABAergic neurons

Our observations suggest that less Gad67-positive GABAergic neurons are formed in the cortex of *Rdh10*^{-/-} mutants. We attribute this to an aberrant migration explained by a deficit in the secreted Cxcl12 chemokine in the IZ, rather to a misspecification of those neurons. It has been shown that RALDH3 is expressed in the LGE and is required for GABAergic neurodifferentiation (Chatzi et al., 2011; Li et al., 2000). *Rdh10* is not expressed in the LGE,

its expression in the striatum (a structure derived from the LGE) starting at E13.5 (Romand et al., 2008). Also, it was shown that a block of RA signalling using a pan-retinoic acid receptor (RAR) antagonist decreased tangential cell migration, suggesting a role for RA in the organisation of cortical excitatory-inhibitory balance (Crandall et al., 2011). *Quantification of Gad67+ cells in the cortex of Rdh10^{-/-} mutants will help us to conclude about a deficit in those neurons production. Also, we will compare these quantifications with those to be performed on conditional double mutants for RALDH2 and RALDH3 (Supplementary material, Fig. S1; Materials and methods and (Haushalter et al., 2016), in which the number of Gad67-positive cells is expected to be diminished due to the absence of RA production by RALDH3 (Chatzi et al., 2011).*

MATERIALS AND METHODS

Generation of mutant mice

Rdh10^{-/-} and *Raldh3^{-/-}* mutant mice were generated and genotyped as described previously (Rhinn et al., 2011; Dupé et al., 2003, respectively). *CMV-βactin-Cre-ERT2* and *Raldh2^{flox/flox}* mice were generated and genotyped as described previously (Santagati et al., 2005; Vermot et al., 2006). Double mutants were generated by crossing *CMV-βactin-Cre-ERT2 ;Raldh2^{flox/flox} ; Raldh3^{+/-}* males with *Raldh2^{flox/flox} ; Raldh3^{+/-}* females. Tamoxifen (Sigma) was prepared as described previously (Haushalter et al., 2016). Tamoxifen was administered orally to pregnant females by gavage (10 mg per gavage) at E7.75.

Immunohistochemistry

Brains were sectioned coronally and processed for immunofluorescence or immunoperoxidase staining. Sections were obtained using a cryostat (14 μm thickness, Leica CM3050S) or a microtome (8 μm, Leica 2035 Biocut). After antigen unmasking in citrate buffer (0.01 M, pH 6) during 15 min in a microwave, slides were blocked with 5% donkey serum, 0.1% Triton in PBS 1X and incubated overnight with the following primary antibodies: bromodeoxyuridine (BrdU) (1:500, Roche), phospho-histone H3 (1:500, Upstate), Ki67 (1:300, Novocastra), Pax6 (1:300, Covance); Tbr2 (1:300, eBioscience); βIII-tubulin/TuJ1 (1:200, Covance); Ctip2 (1:500, Abcam). Primary antibodies were visualised using secondary antibodies from donkey conjugated with Alexa 488 or Alexa 594 (1:400; Invitrogen), whereas cell nuclei were identified using DAPI (1:2000). Immunoperoxidase labeling was performed using species-specific biotin-coupled secondary antibodies (1:400, Jackson Laboratories) and

detection was performed using a Vectastain Elite ABC Kit, following the manufacturer's instructions.

In situ hybridisation

In situ hybridisation was performed with digoxigenin-labeled probes as previously described (Rhinn et al., 2011). Template DNAs were kindly provided by Drs O. Marin (*CxCl12*), F. Rijli (*Gad67*). All expression patterns were documented using a macroscope (Leica M420) or microscope (DM4000B), both connected to a Photometrics camera with the CoolSNAP (v. 1.2) imaging software (Roger Scientific).

Quantification and statistics

At least four animals of each genotype (wild-type and *Rdh10^{-/-}*) from four different litters were analysed for each experiment. Cell counting was performed on two cortical regions, i.e. at a rostral and more caudal (at the level of the choroid plexus) level. For each region, three adjacent sections were counted. Phosphohistone H3 (pHH3)-labelled nuclei were considered basal if they were located more than two DAPI-positive nuclei away from the ventricle.

Microsoft Excel was used to analyse the data for statistical significance. All graphs plot mean \pm s.e.m. Statistical analysis was performed using two-tailed Student's t-test between control and experimental conditions. Results are indicated as mean \pm s.e.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for all histograms in figures.

Animal ethics statement

Animal experimentation protocols were reviewed and approved by the Direction Départementale des Services Vétérinaires (agreement #67-172 to MR, 67-189 to PD, and institutional agreement #D67-218-5 for animal housing) and conformed to the NIH and European Union guidelines, provisions of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the Animal Welfare Act.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Brigitte Schuhbaur for excellent technical assistance.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.H., L.A. and M.R. performed most experiments. M.R. generated and managed the mutant mice. V.F. performed sectioning and in situ hybridisation experiments. M.R., C.H. and P.D. conceived experiments and analysed data. M.R. and P.D. obtained funding for the experiments and wrote the paper.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR grant ReSiNEs, ANR-11-BSV2-0003), and by an institutional grant (LabEx ANR-10-LABX-0030-INRT) under the frame programme Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02. P.D. was partly supported by the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. C.H. was supported by PhD fellowships from the Inserm, Région Alsace, and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

REFERENCES

- Abe, P., Molnar, Z., Tzeng, Y. S., Lai, D. M., Arnold, S. J. and Stumm, R.** (2015). Intermediate Progenitors Facilitate Intracortical Progression of Thalamocortical Axons and Interneurons through CXCL12 Chemokine Signaling. *J Neurosci* **35**, 13053-13063.
- Abe, P., Mueller, W., Schutz, D., MacKay, F., Thelen, M., Zhang, P. and Stumm, R.** (2014). CXCR7 prevents excessive CXCL12-mediated downregulation of CXCR4 in migrating cortical interneurons. *Development* **141**, 1857-1863.
- Anthony, T. E., Mason, H. A., Gridley, T., Fishell, G. and Heintz, N.** (2005). Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes Dev* **19**, 1028-1033.
- Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R. and Macklis, J. D.** (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* **45**, 207-221.
- Arnold, S. J., Huang, G. J., Cheung, A. F., Era, T., Nishikawa, S., Bikoff, E. K., Molnar, Z., Robertson, E. J. and Groszer, M.** (2008). The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev* **22**, 2479-2484.
- Cammas, L., Romand, R., Fraulob, V., Mura, C. and Dollé, P.** (2007). Expression of the murine retinol dehydrogenase 10 (Rdh10) gene correlates with many sites of retinoid signalling during embryogenesis and organ differentiation. *Dev Dyn* **236**, 2899-2908.
- Caviness, V. S., Jr., Takahashi, T. and Nowakowski, R. S.** (1995). Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci* **18**, 379-383.
- Chatzi, C., Brade, T. and Duester, G.** (2011). Retinoic Acid functions as a key GABAergic differentiation signal in the Basal Ganglia. *PLoS Biol* **9**, e1000609.
- Chenn, A. and McConnell, S. K.** (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* **82**, 631-641.
- Crandall, J. E., Goodman, T., McCarthy, D. M., Duester, G., Bhide, P. G., Dräger, U. C. and McCaffery, P.** (2011). Retinoic acid influences neuronal migration from the ganglionic eminence to the cerebral cortex. *J Neurochem* **119**, 723-735.
- Daniel, D., Rossel, M., Seki, T. and König, N.** (2005). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) expression in embryonic mouse cerebral cortex starts in the intermediate zone close to the pallial-subpallial boundary and extends progressively towards the cortical hem. *Gene Expr Patterns* **5**, 317-322.
- de la Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J., et al.** (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**, 1139-1148.
- Draganova, K., Zemke, M., Zurkirchen, L., Valenta, T., Cantu, C., Okoniewski, M., Schmid, M. T., Hoffmans, R., Götz, M., Basler, K., et al.** (2015). Wnt/beta-catenin signaling regulates sequential fate decisions of murine cortical precursor cells. *Stem Cells* **33**, 170-182.
- Dupé, V., Matt, N., Garnier, J. M., Chambon, P., Mark, M. and Ghyselinck, N. B.** (2003). A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14036-14041.

- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A., Bulfone, A., Kowalczyk, T. and Hevner, R. F.** (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* **25**, 247-251.
- Gaiano, N., Nye, J. S. and Fishell, G.** (2000). Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* **26**, 395-404.
- Götz, M. and Huttner, W. B.** (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 777-788.
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J. I., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A. P., Parras, C., et al.** (2005). Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* **48**, 45-62.
- Haushalter, C., Schuhbaur, B., Dollé, P. and Rhinn, M.** (2016). Meningeal retinoic acid contributes to neocortical lamination and radial migration during mouse brain development. *Submitted for publication*.
- Ishibashi, M., Moriyoshi, K., Sasai, Y., Shiota, K., Nakanishi, S. and Kageyama, R.** (1994). Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *Embo J* **13**, 1799-1805.
- Kang, W., Wong, L. C., Shi, S. H. and Hebert, J. M.** (2009). The transition from radial glial to intermediate progenitor cell is inhibited by FGF signaling during corticogenesis. *J Neurosci* **29**, 14571-14580.
- Laguesse, S., Creppe, C., Nedialkova, D. D., Prevot, P. P., Borgs, L., Huysseune, S., Franco, B., Duysens, G., Krusy, N., Lee, G., et al.** (2015). A Dynamic Unfolded Protein Response Contributes to the Control of Cortical Neurogenesis. *Dev Cell* **35**, 553-567.
- Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V. and Parnavelas, J. G.** (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **19**, 7881-7888.
- Li, H., Wagner, E., McCaffery, P., Smith, D., Andreadis, A. and Dräger, U. C.** (2000). A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech Dev* **95**, 283-289.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T. and Ogawa, M.** (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* **131**, 3133-3145.
- Miyata, T., Kawaguchi, D., Kawaguchi, A. and Gotoh, Y.** (2010). Mechanisms that regulate the number of neurons during mouse neocortical development. *Curr Opin Neurobiol* **20**, 22-28.
- Mizutani, K. and Saito, T.** (2005). Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. *Development* **132**, 1295-1304.
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. and Kriegstein, A. R.** (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* **7**, 136-144.
- Parnavelas, J. G.** (2000). The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci* **23**, 126-131.
- Rakic, P.** (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci* **18**, 383-388.
- Rhinn, M. and Dollé, P.** (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development* **139**, 843-858.

- Rhinn, M., Schuhbaur, B., Niederreither, K. and Dollé, P.** (2011). Involvement of retinol dehydrogenase 10 in embryonic patterning and rescue of its loss of function by maternal retinaldehyde treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 16687-16692.
- Ribes, V., Stutzmann, F., Bianchetti, L., Guillemot, F., Dollé, P. and Le Roux, I.** (2008). Combinatorial signalling controls Neurogenin2 expression at the onset of spinal neurogenesis. *Dev Biol* **321**, 470-481.
- Ribes, V., Wang, Z., Dollé, P. and Niederreither, K.** (2006). Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling. *Development* **133**, 351-361.
- Romand, R., Kondo, T., Cammas, L., Hashino, E. and Dollé, P.** (2008). Dynamic expression of the retinoic acid-synthesizing enzyme retinol dehydrogenase 10 (rdh10) in the developing mouse brain and sensory organs. *J Comp Neurol* **508**, 879-892.
- Sahara, S. and O'Leary, D. D.** (2009). Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron* **63**, 48-62.
- Sandell, L. L., Sanderson, B. W., Moiseyev, G., Johnson, T., Mushegian, A., Young, K., Rey, J. P., Ma, J. X., Staehling-Hampton, K. and Trainor, P. A.** (2007). RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev* **21**, 1113-1124.
- Santagati, F., Minoux, M., Ren, S. Y. and Rijli, F. M.** (2005). Temporal requirement of Hoxa2 in cranial neural crest skeletal morphogenesis. *Development* **132**, 4927-4936.
- Sessa, A., Mao, C. A., Hadjantonakis, A. K., Klein, W. H. and Broccoli, V.** (2008). Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron* **60**, 56-69.
- Stumm, R. K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., Nagasawa, T., Holtt, V. and Schulz, S.** (2003). CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci* **23**, 5123-5130.
- Tiveron, M. C., Rossel, M., Moepps, B., Zhang, Y. L., Seidenfaden, R., Favor, J., König, N. and Cremer, H.** (2006). Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *J Neurosci* **26**, 13273-13278.
- Vermot, J., Garnier, J. M., Dierich, A., Niederreither, K., Harvey, R. P., Chambon, P. and Dollé, P.** (2006). Conditional (loxP-flanked) allele for the gene encoding the retinoic acid-synthesizing enzyme retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2). *Genesis* **44**, 155-158.
- Viti, J., Gulacsi, A. and Lillien, L.** (2003). Wnt regulation of progenitor maturation in the cortex depends on Shh or fibroblast growth factor 2. *J Neurosci* **23**, 5919-5927.
- Wonders, C. P. and Anderson, S. A.** (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* **7**, 687-696.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Loss of *Rdh10* function leads to microcephaly. (A,B) Lateral views and (C,D) dorsal views of E13.5 brains of control (A, C) and *Rdh10*^{-/-} (B,D) embryos. (E-G') Histological sections (hematoxylin/eosin staining) of control (E,F,G) and *Rdh10*^{-/-} (E',F',G') E13.5 embryos. Sections are along a coronal plane, at levels of the forebrain indicated by red arrows in (A). Scale bars: 50 μm.

Figure 2. Cortical thickness is affected in *Rdh10* mutants. (A-B') Cortical thickness evaluated by DAPI staining on brains sections from E13.5 control and *Rdh10*^{-/-} animals was measured on comparative brain sections at rostral (A,B) and more caudal (A',B') levels. (C-D') Immunolabelings with a Tuj1 antibody are similarly shown on comparative brain sections from E13.5 control and *Rdh10*^{-/-} animals. (E) Quantification of the thickness of the DAPI-positive domain: rostral : 197.65 μm ± 19.29 for control and 131.85 μm ± 16.97 for *Rdh10*^{-/-}, *p<0.05; medio-caudal: 184.97 μm ± 6.14 for control and 130.28 μm ± 13.05 for *Rdh10*^{-/-}, **p<0.01; Student's test, n=4 brains. (F) Quantification of the cortical plate thickness (Tuj1-positive domain): rostrally: 76.88 μm ± 10.12 (control) and 34.54 μm ± 2.28 for (*Rdh10*^{-/-}); caudally: 69.53 μm ± 9.28 (control) and 31.85 μm ± 3.021 (*Rdh10*^{-/-}). (G) Quantification of the VZ+SVZ thickness (Tuj1-negative domain domain); rostrally: 118.78 μm ± 5.70 (control) and 89.61 μm ± 10.54 (*Rdh10*^{-/-}); caudally: 107.51 μm ± 3.20 (control) and 83.62 μm ± 6.59 (*Rdh10*^{-/-}). n=4 brains. *, p<0.05; **, p<0.01. (H-I') In situ hybridisation for *Cxcl12*, a marker of the developing meninges and the IZ, shows an abnormal distribution in *Rdh10*^{-/-} embryos. Red arrowheads indicate the extent of the expression domain in the IZ of control (H,H') and *Rdh10*^{-/-} embryos (I,I'). CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone. Scale bars (A-B'): 200 μm; (C-D'): 50 μm; (H-I'): 250 μm.

Figure 3. *Rdh10* mutants show decreased numbers of neurons in deep layers of the cortex. (A-B') Immunolabelings on brains sections from E13.5 control and *Rdh10*^{-/-} for Ctip2 are shown on comparative brain sections at rostral (A,B) and more caudal (B',C') levels. White boxes (A-B') show the areas used for cell counts. (C) Quantification of Ctip2-positive cells; rostrally: 181.41 ± 21.4 (control) and 91.25 ± 15.15 (*Rdh10*^{-/-}); medio-caudally: 146.00 ± 8.73 (control) and 79.66 ± 11.45 (*Rdh10*^{-/-}). n=4 brains. *, p<0.05; **, p<0.01. Scale bars:

Figure 4. Analysis of cortical progenitor populations in *Rdh10* mutants. (A-D')

Immunolabelings on brain sections from E13.5 control and *Rdh10*^{-/-} animals for Pax6 (A-B') or Tbr2 (C-D') at rostral (A-D) and more caudal levels (A'-D') used for quantification. (E) Quantification of Pax6-positive cells; rostrally: 648.66 ± 40.64 (control) and 519.16 ± 31.08 (*Rdh10*^{-/-}); caudally: 460.17 ± 11.34 (control) and 335.83 ± 4.38 (*Rdh10*^{-/-}). (F) Quantification of Tbr2-positive cells; rostrally: 310.41 ± 16.79 (control) and 162.58 ± 24.73 (*Rdh10*^{-/-}); caudally: 214.41 ± 12.63 (control) and 115.5 ± 7.77 (*Rdh10*^{-/-}). n=4 brains. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001. Scale bar: 50 m.

Figure 5. Progenitor cell proliferation in *Rdh10* mutants. (A-B') Immunolabelings on rostral (A,B) and more caudal (A',B') brain sections from E13.5 control and *Rdh10*^{-/-} animals analysed for BrdU (green), which was injected 1 h prior to analysis as a single pulse in order to label cells in S-phase. (C-D') Immunolabelings on rostral (C,D) and more caudal (C',D') brain sections from E13.5 control and *Rdh10*^{-/-} animals analysed for PHH3 (labeling cells in M-phase). (E) Quantification of BrdU-positive cells; rostrally: 318.75 ± 18.13 (control) and 333.58 ± 20.20 (*Rdh10*^{-/-}); caudally: 256.5 ± 10.94 (control) and 238.5 ± 10.40 (*Rdh10*^{-/-}). n=4 brains. ns, not significant. (F) Quantification of apical and basal progenitors in M-phase (PHH3-positive). Apical progenitors; rostrally : 28.83 ± 0.58 (control) and 29.33 ± 0.70 (*Rdh10*^{-/-}); caudally: 30.11 ± 3.15 (control) and 29.22 ± 3.04 (*Rdh10*^{-/-}) n=3 brains. ns. Basal progenitors; rostrally: 18.66 ± 0.47 (control) and 9.5 ± 0.58 (*Rdh10*^{-/-}); caudally: 8.88 ± 0.82 (control) and 6.88 ± 0.60 (*Rdh10*^{-/-}) n=3 brains. ns, *, p<0.05. Scale bars: 50 m.

Figure 6. *Rdh10* mutants show a reduced cell cycle exit of NPCs. (A-D') Immunolabelings on brain sections from E13.5 control and *Rdh10*^{-/-} animals analysed for BrdU (green), which was injected 18 h prior to analysis as a single pulse, and Ki67 (red) at rostral (A-D) and more caudal levels (A'-D') used for quantification. The proportion of cells leaving the cell cycle (BrdU+/Ki67- over BrdU+ cells) is diminished in *Rdh10*^{-/-} mutants versus controls. (E) Quantifications. Rostral: 17% ± 0.23% for control and 11.21% ± 0.74% for *Rdh10*^{-/-}; Caudal: 19.08% ± 1.26% for control and 13.38% ± 0.53% for *Rdh10*^{-/-}. n=4 brains. **, p<0.01; ***, p<0.001. Scale bars: 50 m.

Figure 7. Comparative, coronal E13.5 brain sections are shown at two levels, rostral (upper panels) and more caudal (2 rows of lower panels). In situ hybridisation for *Gad67*, a marker of prospective GABAergic interneurons, shows an abnormal distribution in *Rdh10*^{-/-} embryos. Red arrowheads indicate the dorsalmost location of migrating interneurons in control (A-A'') and *Rdh10*^{-/-} (B-B'') embryos. Scale bars: 250 μm.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figure 1. External views of controls (A,E), an *Rdh10*^{-/-} mutant (B), and a *CMV-βactin-Cre-ERT2;Raldh2*^{fllox/fllox}; *Raldh3*^{-/-} mutant treated with tamoxifen at E7.75 (C,D). The craniofacial phenotypes of the mutant embryos are similar, though only the *Rdh10*^{-/-} mutant shows hypoplastic forelimbs. Scale bars: 50 μm.

Supplementary Figure 2. Depletion of *Rdh10* does not lead to increased cell death. (A-D') Brain sections from E13.5 embryos. TUNEL staining in control (A,A',C,C') and *Rdh10*^{-/-} mutants (B,B',D,D') at a rostral (A-B') and more caudal (C-D') level. (A'-D') Higher magnification of the areas boxed in (A-D) respectively. (A'') Apoptotic cells in the interdigital mesenchyme of an E13.5 hindlimb are shown as a positive control. The experiment revealed no change in the number of apoptotic cell death in the cortices. Scale bars: 500 μm in A-B and 250 μm in A'-B'.

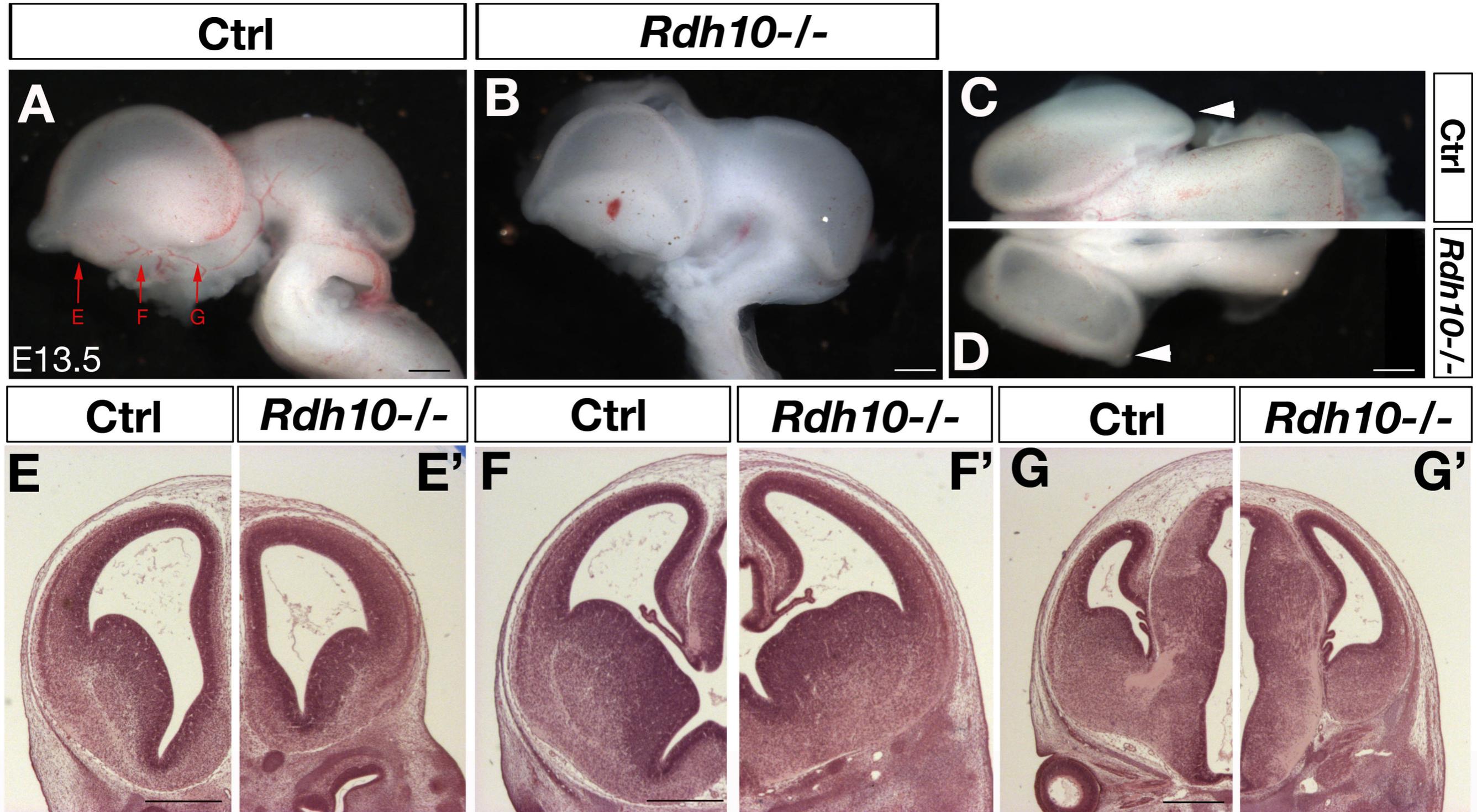


Figure 1

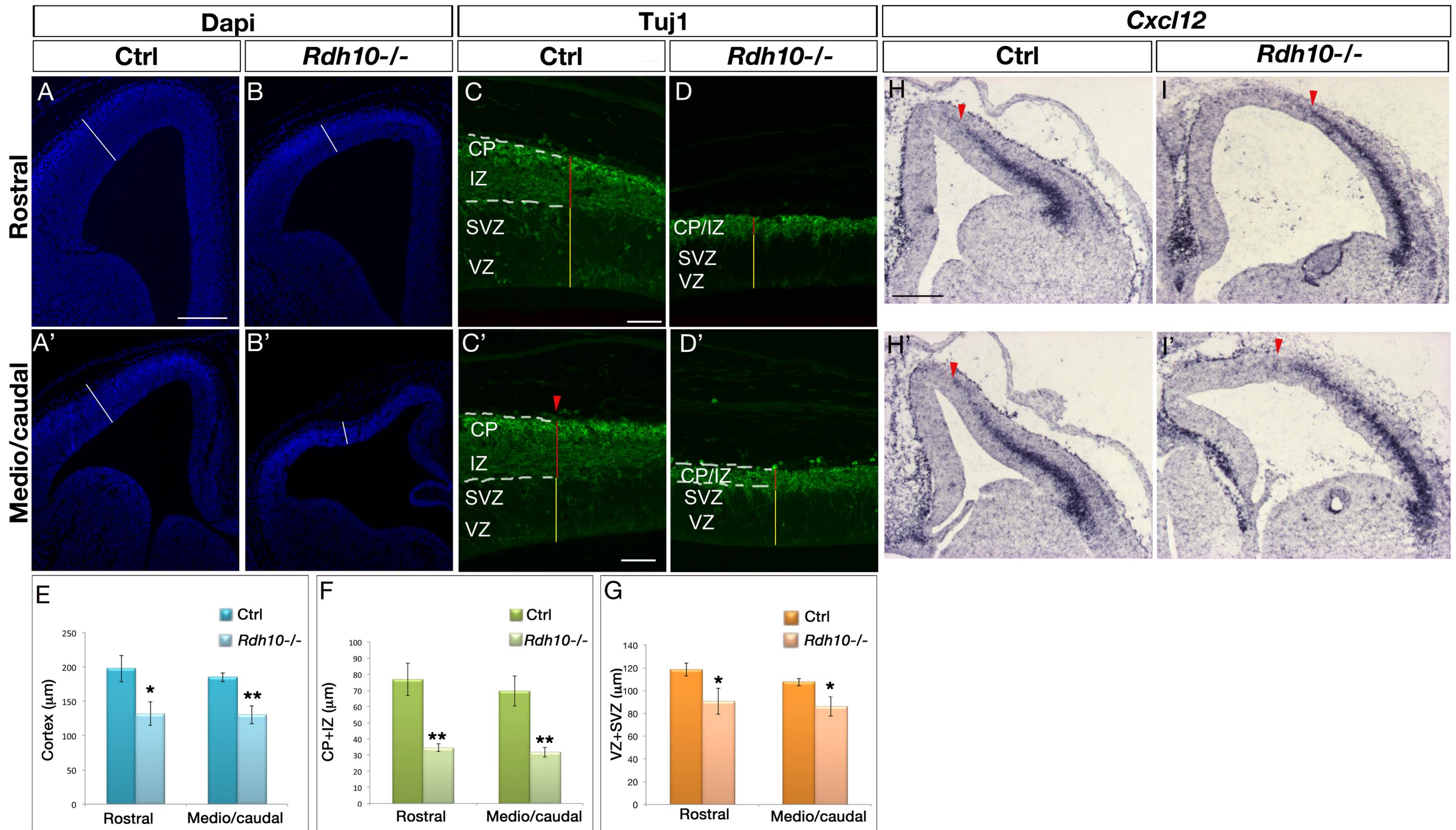


Figure 2

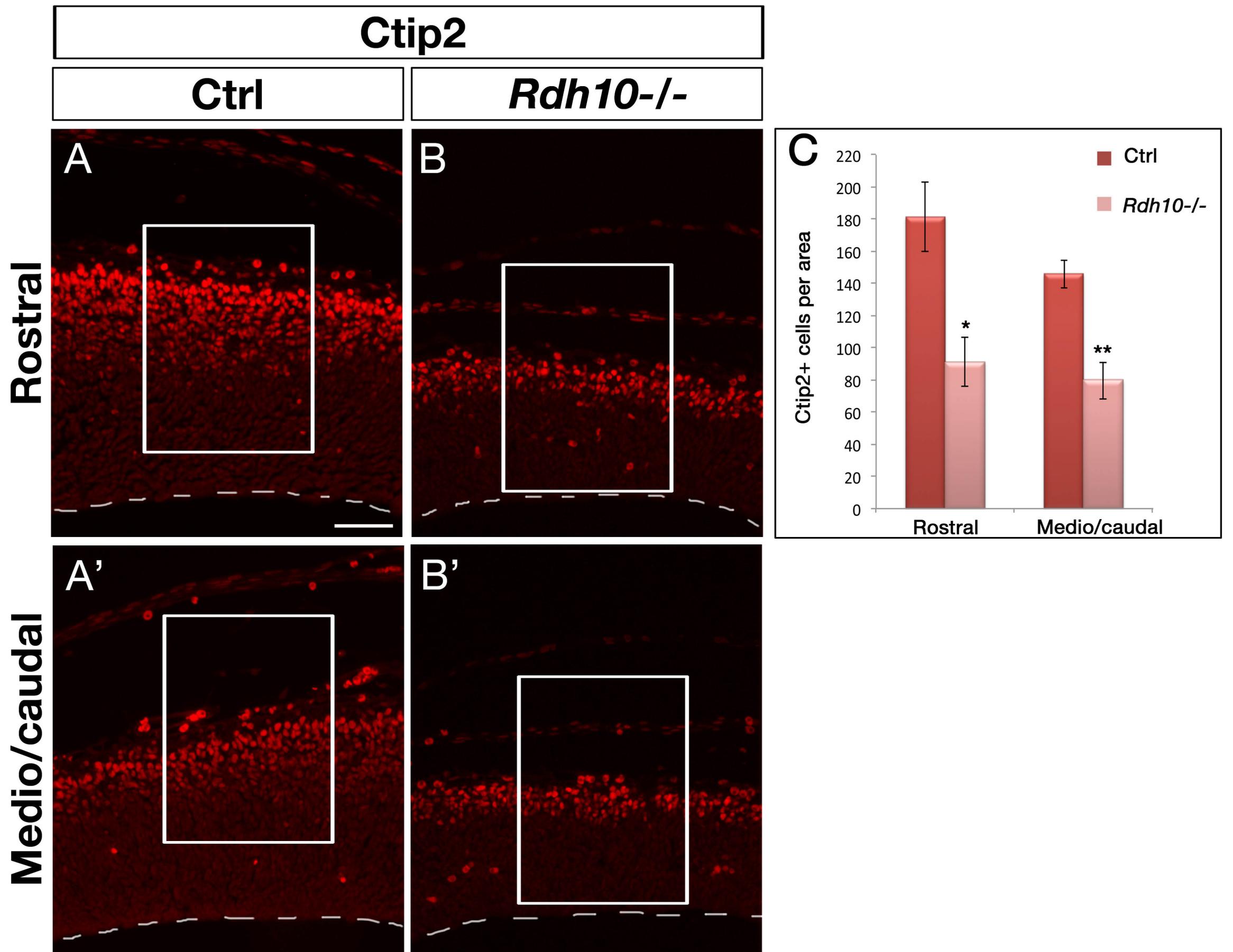


Figure 3

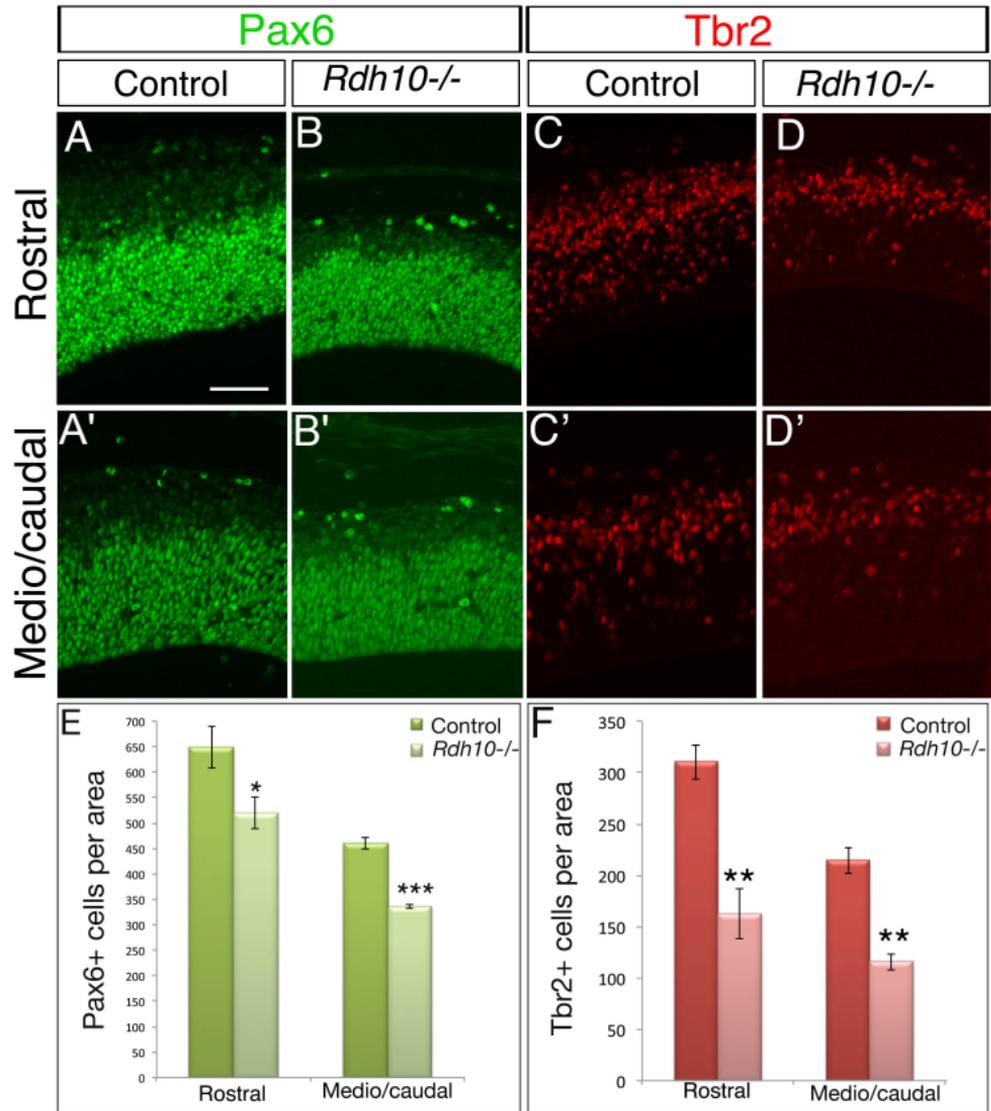


Figure 4

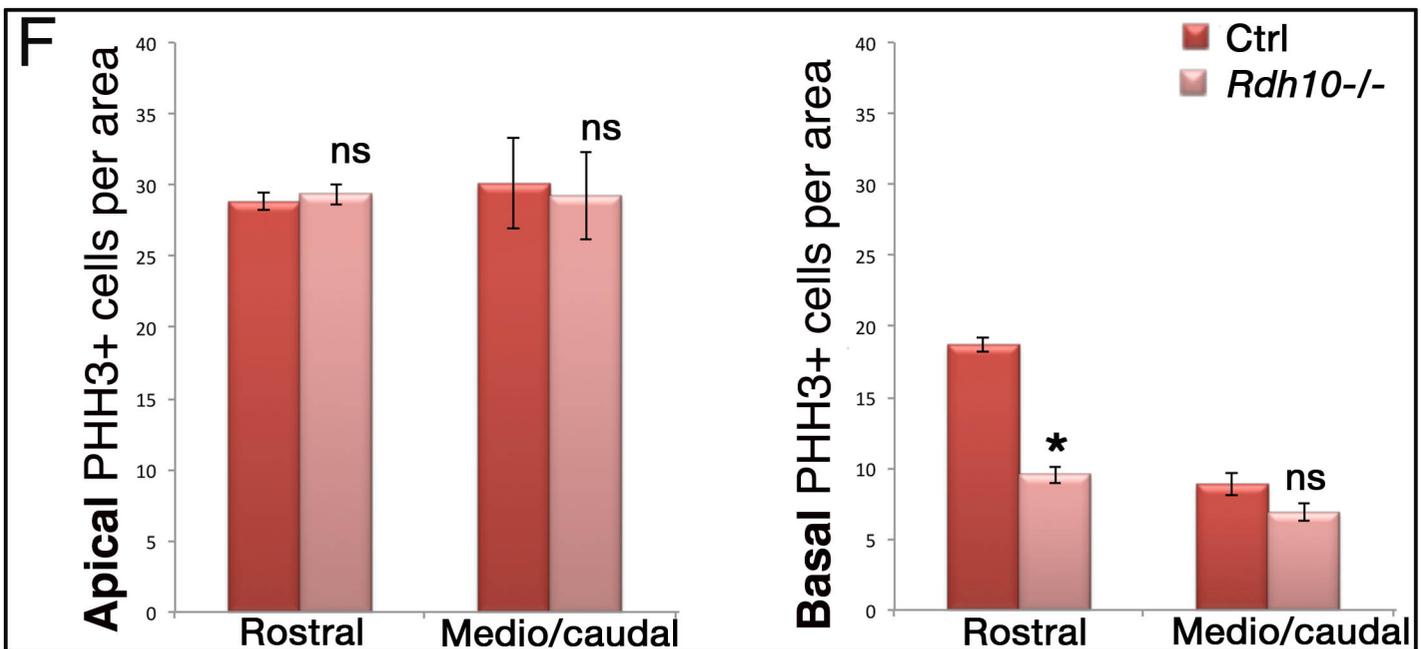
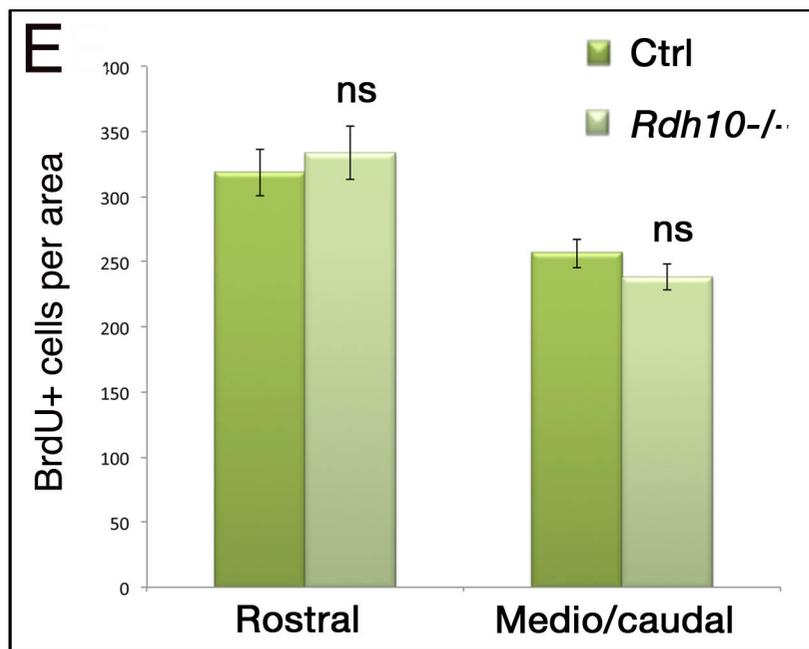
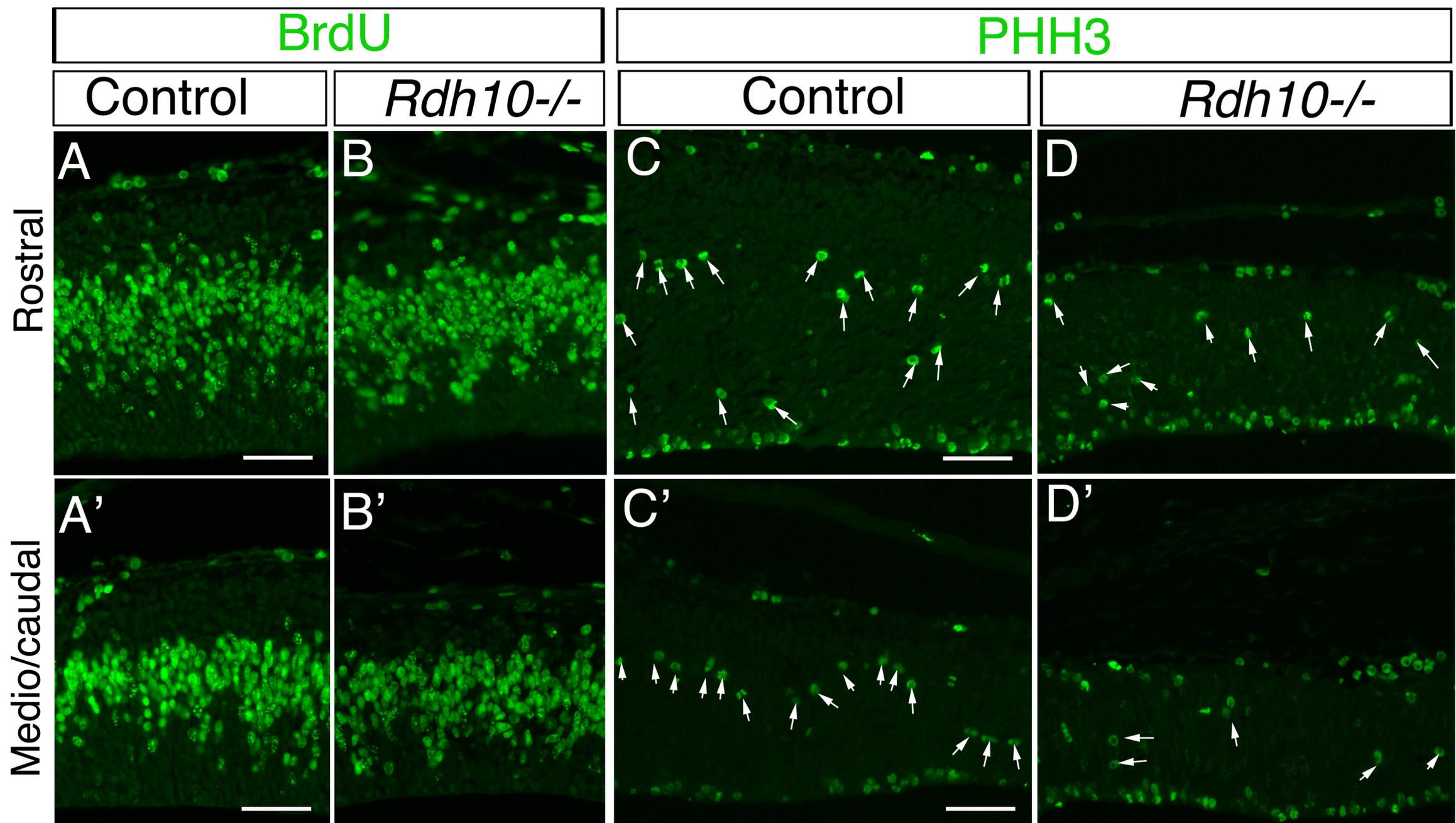


Figure 5

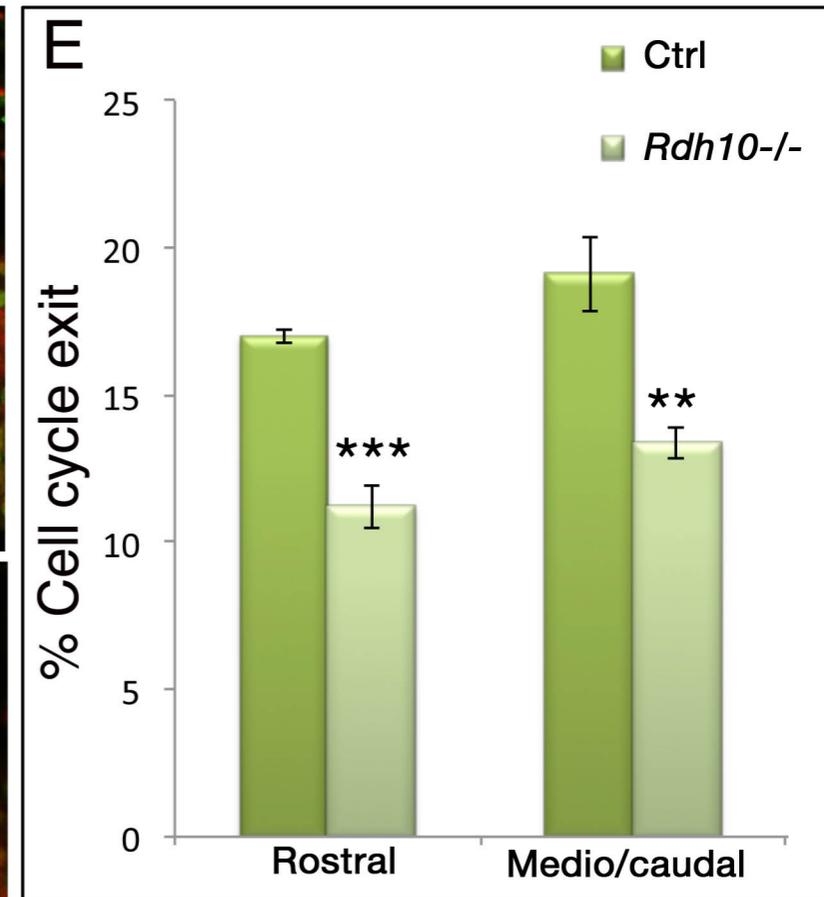
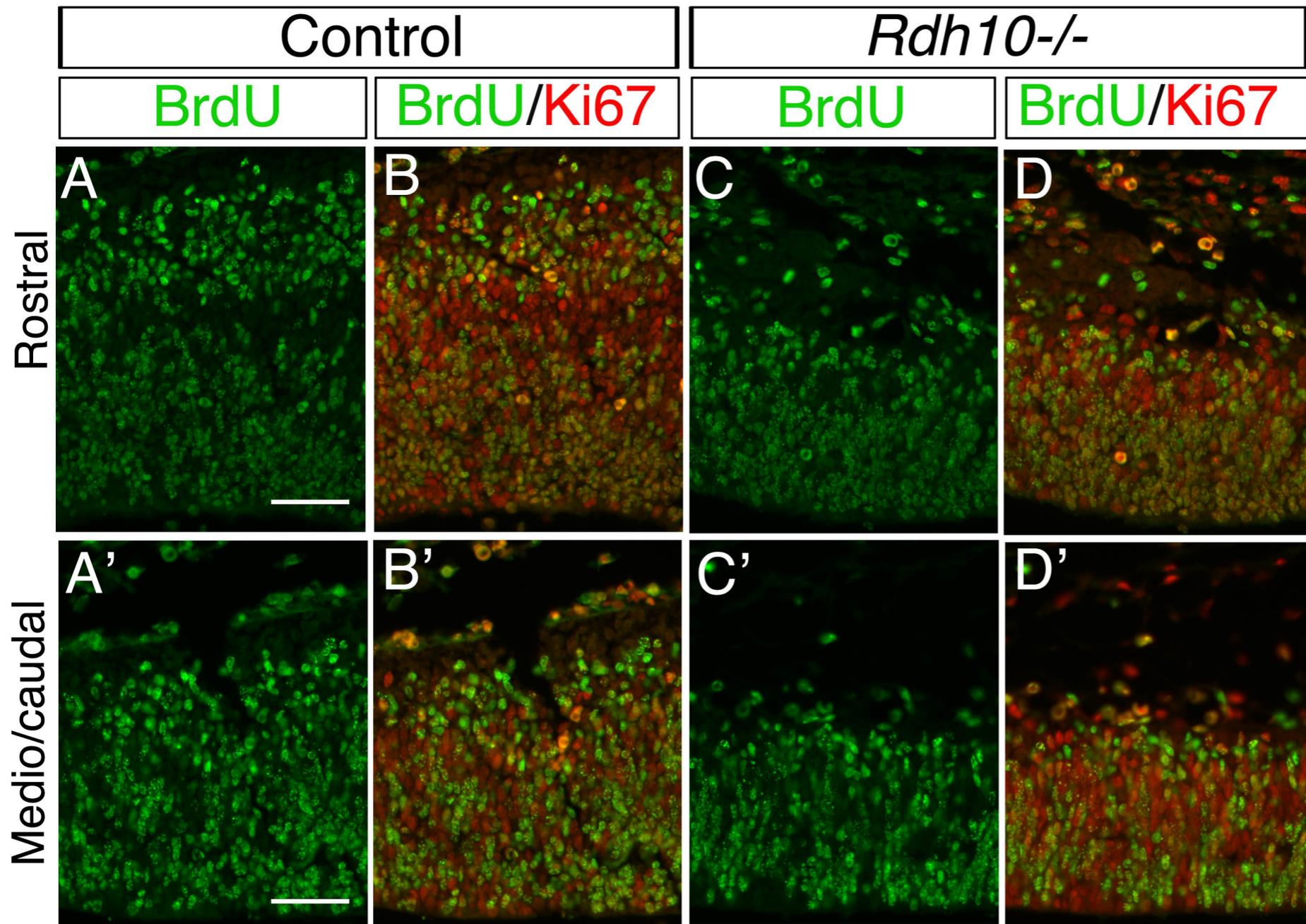


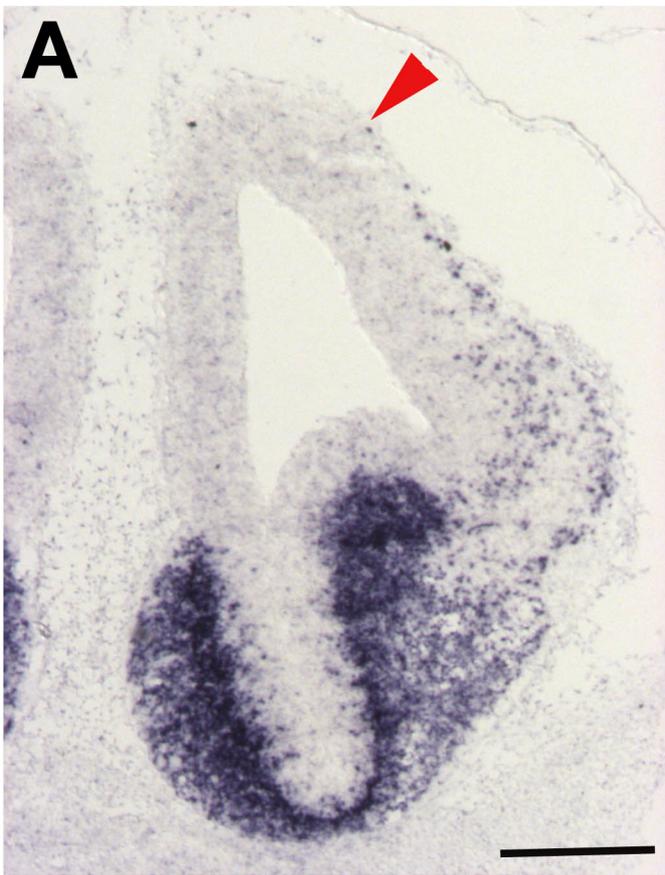
Figure 6

Gad67

Ctrl

Rdh10^{-/-}

Rostral



Medio/caudal

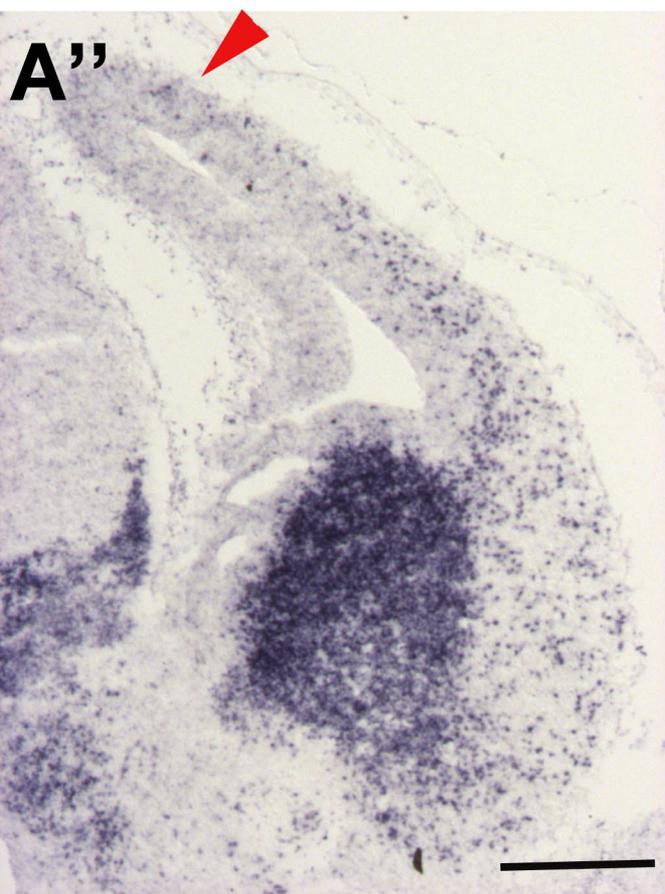
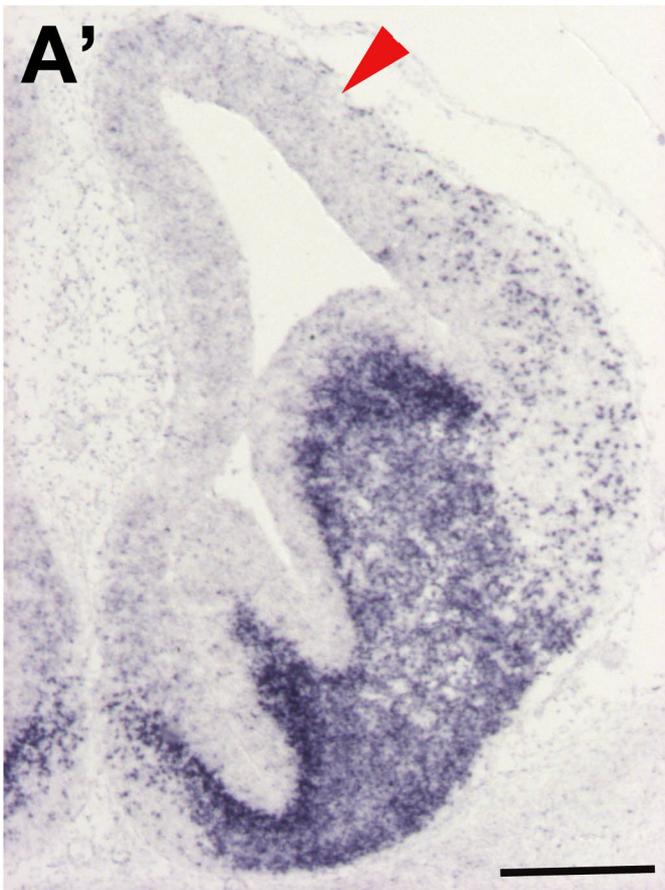
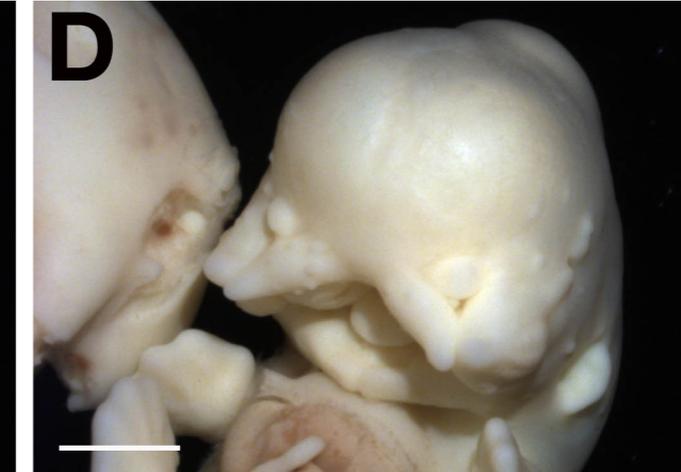


Figure 7

Ctrl

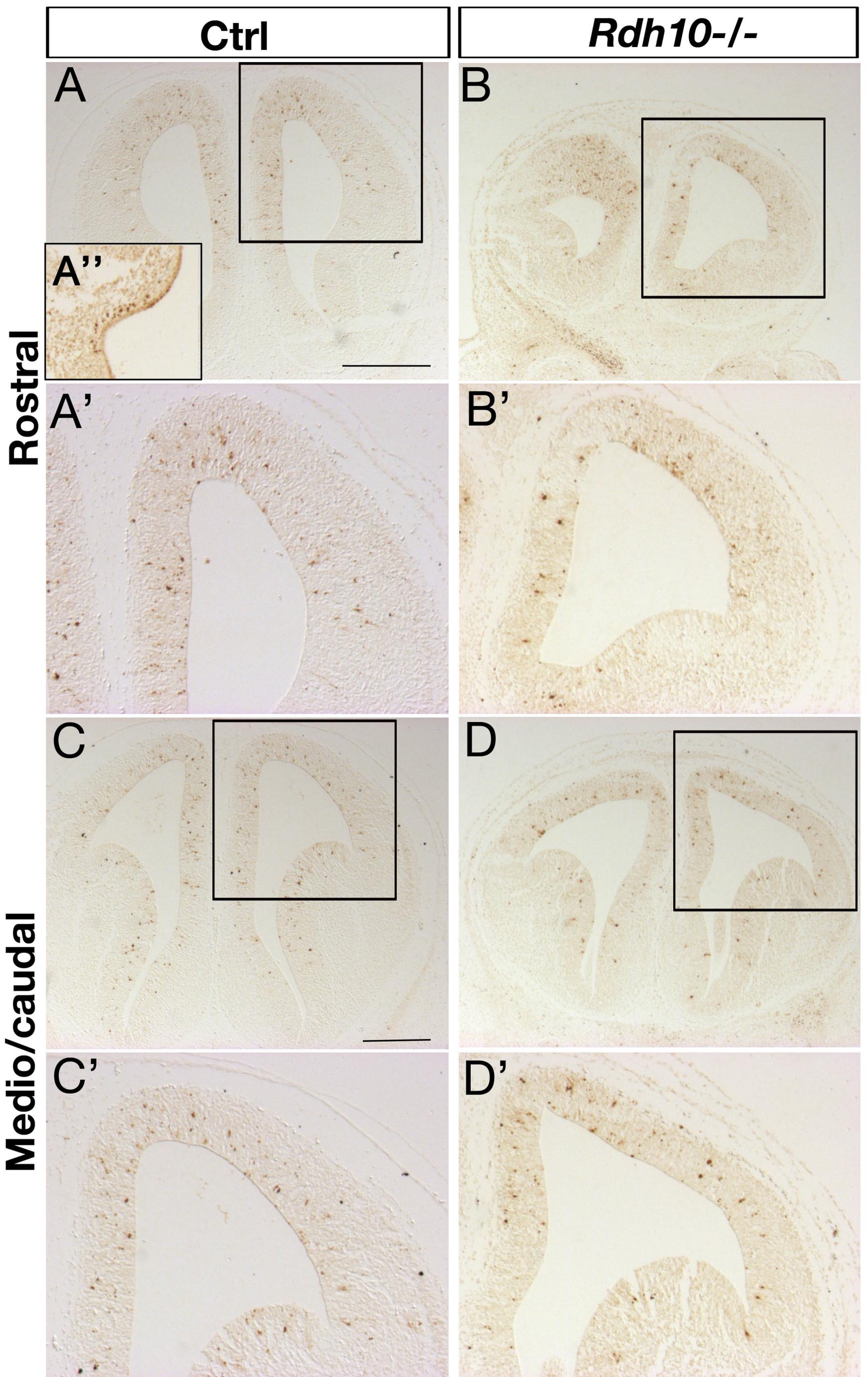
***Rdh10*^{-/-}**

***Raldh2cKO;Raldh3*^{-/-}**



Ctrl

Supplementary figure 1



Supplementary Figure 2

DISCUSSION

PERSPECTIVES

L'AR est une molécule sécrétée qui régule plusieurs aspects du développement neural. *In vitro*, il induit la différenciation de cellules souches en cellules neurales et gliales (Maden, 2001). De plus, l'addition d'AR à une culture de neurones augmente le nombre et l'étendue de leurs neurites (pour revue : McCaffery et al., 2003). Au cours du développement des vertébrés, le signal rétinolique permet notamment la régionalisation du tube neural et du cerveau postérieur, la différenciation neuronale et la croissance des neurites des motoneurones de la moelle épinière (Maden, 2002; Sockanathan et al., 2003). Dans la région rostrale de l'embryon, l'AR est important pour le maintien et la prolifération des populations progénitrices de l'épithélium des vésicules télencéphalique, optique, diencephalique et de la placode olfactive (Ribes et al., 2006; Halilagic et al., 2003)

Bien que l'action de l'AR dans l'établissement du cerveau postérieur et de la moelle épinière a été très documentée (Maden, 2002, 2006b), son rôle dans le développement du cortex cérébral est encore à ce jour mal connu. Mon travail de thèse a eu pour but d'apporter de nouvelles évidences du rôle de l'AR sur les populations progénitrices et neuronales au cours de l'étape précoce (E10,5-E13,5) et tardive (à partir de E13,5) de la neurogenèse corticale chez la souris.

Nous avons tout d'abord confirmé la présence de différents acteurs de la voie des rétinoliques dans le télencéphale ainsi que dans les tissus adjacents au cortex. Nous avons élaboré une stratégie expérimentale qui empêche la production d'AR par les méninges et avons pu ainsi étudier le rôle potentiel de l'AR méningéal au cours de la neurogenèse corticale. Nous avons également analysé l'éventuelle fonction de la signalisation de l'AR sur les populations progénitrices et neuronales avant et au début de la phase de neurogenèse du cortex cérébral.

1. Étude de la fonction tardive du gène *Raldh2* sur la neurogenèse corticale

Nous avons montré la présence des enzymes de synthèse RDH10 et RALDH2 dans les méninges, faisant d'elles une source d'AR dans le cortex cérébral. Des études réalisées chez le poisson zèbre ont permis de visualiser un gradient linéaire d'AR au stade de la gastrula, s'étendant sur une distance d'environ 200 μm (White et al., 2007a; Shimozone et al., 2013). Il a été également montré chez le poulet que l'AR a un coefficient de diffusion tissulaire de l'ordre de 10 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (Eichele and Thaller, 1987). Ainsi, l'AR produit par la pie-mère pourrait diffuser de l'espace méningé vers le cortex sous-jacent et atteindre les neurones des couches corticales.

1.1. Rôle de l'AR produit par les méninges sur les populations de neurones corticaux

L'étude des mutants conditionnels *Raldh2cKO* a mis en évidence l'influence de l'AR sur la spécification des neurones corticaux ainsi qu'un rôle au cours de l'initiation de la migration des neurones des couches superficielles. Ces deux processus biologiques sont indispensables pour la lamination en six couches de la plaque corticale.

1.1.1. Population neuronale des couches profondes

En absence d'AR, nous avons observé une surpopulation neuronale au sein des couches V et VI à P4. Au cours du développement, la population neuronale est générée en différentes vagues de production, chacune d'elle correspondant à une identité neuronale majoritairement identique (*pour revue : Molyneaux et al., 2007*) (cf. Introduction, Partie II, 2.2.2). Ainsi, les neurones destinés aux couches VI et V seraient issus de pics de production à E12,5 et E13,5, respectivement. En effet, certaines études suggèrent que le stade auquel est généré le neurone spécifie son identité (*Caviness, 1982 ; McConnell, 1995*). Cependant, des études plus récentes ont montré que l'acquisition d'une identité neuronale précise est un processus progressif qui ne se réalise pas uniquement au moment de la production, mais se poursuit une fois la migration radiaire réalisée (*Kwan et al., 2008*). De plus, l'identité du neurone post-mitotique peut rester flexible et encore être modifiée au cours de la première semaine post-natale (*De la Rossa et al., 2013*). Dans le cas des couches profondes, il a été montré que *Tbr1* est un facteur qui régule la différenciation des neurones destinés à la couche VI (*Hevner et al., 2001*) alors que les facteurs de transcription *Fezf2* et *Ctip2* sont présents dans un premier temps de manière uniforme dans les neurones destinés aux couches VI et V (*pour revue : Molyneaux et al., 2007*). L'apparition du facteur de transcription *Sox5* dans les neurones de la couche VI va y diminuer l'expression des gènes *Fezf2* et *Ctip2*. Ainsi, les facteurs *Fezf2* et *Ctip2* disparaissent progressivement des neurones de la couche VI et deviennent spécifiques de ceux de la couche V (*Kwan et al., 2008*). Ainsi, *Sox5* permet la spécification des neurones de l'ensemble des neurones des couches profondes. Dans notre étude, nous supposons un défaut de spécification de l'ensemble de la population neuronale des couches profondes. Nos résultats suggèrent que l'AR agirait en amont dans les étapes de différenciation, sur un facteur responsable de la spécification des couches profondes. Cette hypothèse est appuyée par des travaux qui montrent que l'identité "couche profonde" est déterminée par un signal extrinsèque environnemental (*Bohner et al., 1997 ; Desai and McConnell, 2000*) et non seulement par un facteur intrinsèque.

1.1.2. Population neuronale des couches superficielles

La majorité des neurones des couches superficielles sont générés aux stades E14,5 et E15,5 (*pour revue : Molyneaux et al., 2007*). Une étude a montré que le facteur de transcription *Satb2* est requis dans l'induction d'une programmation génétique dans les neurones des couches superficielles et supprime l'expression des gènes de facteurs spécifiques des couches profondes, tel que *Ctip2* (*Britanova et al., 2008*). De plus, il a été montré que les facteurs de transcription *Brn1* et *Brn2* sont dans un premier temps présents de manière uniforme dans l'ensemble des neurones destinés aux couches IV, III et II (*Oishi et al., 2016*). L'apparition du facteur de transcription *Rorb* dans les neurones destinés à la couche IV va engendrer une inhibition mutuelle des facteurs *Rorb* et *Brn1/2* dans cette couche et restreindre ainsi la présence de *Rorb* dans la couche IV et de *Brn1/2* dans les neurones destinés aux couches II/III (*Oishi et al., 2016*). Dans notre étude, nous avons observé que l'absence d'AR engendre une diminution des neurones de la couche IV et une augmentation de ceux de la couche II/III à P4. De plus, les neurones nés à E14,5 sont retardés dans leur processus de migration et marquent une pause dans la ZI à E17,5. Ainsi ces neurones ne se trouvent pas au bon endroit dans la couche superficielle, préservant plus longtemps le facteur *Brn2* de l'action inhibitrice de *Rorb*. Nous proposons que le retard de migration contribue à rendre le facteur *Brn2* plus robuste face à un signal *Rorb* faible et insuffisant à l'induction de l'identité "couche IV" pour une partie des neurones nés à E14,5. En absence d'AR certains de ces neurones maintiennent l'expression du facteur *Brn2* et se destinent de manière ectopique à la couche II/III. Nous supposons alors que l'AR joue un rôle dans la spécification des neurones des couches superficielles.

1.1.3. Rôle de l'AR dans la migration neuronale

Les neurones générés dans la ZV à partir des différentes vagues de production entreprennent une migration active pour atteindre leur position finale dans les couches corticales d'où ils étendront leurs neurites vers les cellules cibles (*Marín and Rubenstein, 2003*). Dans notre étude, nous avons noté un retard dans la migration des neurones nés à E14,5 et destinés à la couche IV. À ce stade, les neurones utilisent une combinaison de deux modes de migration dont celui par locomotion, en utilisant comme guide le prolongement pial des cellules GRs (*Gupta et al., 2002*) (cf. Introduction, Partie II, §2.2.3). Une des étapes critiques de ce mode de migration est la transition d'une morphologie multipolaire à bipolaire des neurones, cette conversion étant requise pour poursuivre et réaliser une migration

appropriée dans la plaque corticale (Noctor et al., 2004). Plusieurs protéines importantes pour la fonctionnalité du cytosquelette ont été présentées comme ayant une influence sur la régulation de ce mode de migration et sur la conversion multipolaire/bipolaire (pour revue : Stouffer et al., 2016) (cf. Introduction, Partie II, §2.3). De plus, il a été montré que le membre de la superfamille des Rho GTPase *Rnd2*, régulé par Neurogénine2 (*Neurog2*) (Heng et al., 2008) et par COUP-TF1 (Alfano et al., 2011) est impliqué dans la transition de l'état multipolaire à bipolaire des neurones en migration. Il a été montré que la séquence du gène *Neurog2* contient deux séquences RARE et est régulé par l'AR au cours de la neurogenèse de la moelle épinière (Ribes et al., 2008). L'AR pourrait réguler l'expression de *Neurog2* dans les neurones corticaux, *Neurog2* contrôlant celle du gène *Rnd2*, important dans le processus de transition multipolaire/bipolaire.

1.2. AR et neurogenèse : mise en contexte avec les études précédentes

1.2.1. Divergence entre le mutant conditionnel *Raldh2* et les mutants *Foxc1* et *Rdh10*

Une étude récente présente les fonctions des gènes *Raldh2* et *Rdh10* exprimés dans les méninges sur la neurogenèse corticale (Siegenthaler et al., 2009). Ces auteurs décrivent le mutant *Foxc1* caractérisé par un défaut de développement des méninges du cerveau antérieur. Ce mutant présente une expansion latérale de l'épithélium neural, une réduction drastique des progéniteurs basaux et une diminution des neurones des couches profondes et superficielles (Siegenthaler et al., 2009). Le mutant *Foxc1* présente une absence d'expression des gènes *Raldh2* et *Rdh10* dans les méninges (Siegenthaler et al., 2009). Les mêmes auteurs observent chez un mutant *Rdh10* généré par mutagenèse chimique un phénotype similaire à celui du mutant *Foxc1*. Le phénotype est attribué à la perte de synthèse d'AR par les méninges et il est sauvé chez le mutant *Foxc1* par une supplémentation en AR du stade E10,5 au stade E13,5 (Siegenthaler et al., 2009). Dans nos mutants conditionnels *Raldh2*, nous n'observons qu'une diminution des neurones de la couche IV. Les autres anomalies du mutant *Foxc1* ou *Rdh10*, notamment la perturbation des populations des progéniteurs, n'est pas observée sous nos conditions d'inactivation. Le fait de ne plus avoir la présence de RDH10, ni celle de RALDH2 dans le mutant *Foxc1* permet d'abolir la synthèse d'AR. Rappelons que nous détectons dans les embryons sauvages la présence de RALDH1 dans les méninges, déjà à partir de E16,5 (cf. Résultats, partie I, §3.1), contrairement à ce qui est décrit dans l'étude réalisée par Smith et ses collaborateurs (Smith et al., 2001). Dans notre mutant conditionnel *Raldh2*, nous supprimons

la source d'AR produit par cette enzyme dans les méninges à partir de E11,5. Bien que moins efficace dans la synthèse de l'AR (*Grün et al., 2000*), nous ne pouvons pas exclure que RALDH1 ait un effet de compensation par rapport à RALDH2 absente, et prenne le relais de la synthèse pour produire une quantité sous-optimale d'AR à partir du stade E16,5 qui entrainerait un phénotype moindre dans le mutant conditionnel. La mutation induite par traitement chimique de *Rdh10* engendre une perte de fonction ubiquitaire du gène. Ainsi, elle inactive RDH10 dans les méninges, mais aussi dans les tissus céphaliques de E8,5 à E11,5-E12,5 qui normalement permet la synthèse d'AR par RALDH2 puis RALDH3 dans le neuroépithélium du télencéphale et l'ectoderme de surface. Ainsi, le phénotype observé dans le mutant *Rdh10* (*Siegenthaler et al., 2009*) pourrait refléter le rôle précoce de RDH10 dans la synthèse de l'AR de E8,5 à E12,5 car cette phase affecterait le début de la neurogenèse ainsi que la génération des différentes populations progénitrices. De plus, ce phénotype nous rappelle celui du mutant *Rdh10*^{-/-} sur lequel nous travaillons (*Rhinn et al., 2011*) (cf. Résultats, Partie IV, §3). Ainsi, les défauts observés par Siegenthaler et ses collaborateurs dans les mutants *Rdh10* ne seraient pas le résultat de la perte d'AR produit par les méninges, mais celui de la perte d'AR produit plus tôt dans le télencéphale, par RALDH2 et RALDH3.

Par ailleurs, le blocage à E14,5 de l'action de l'ensemble des RARs par électroporation *in utero* d'un récepteur dominant négatif (RAR403) n'affecte pas la population progénitrice qui prolifère de la même manière que chez les souris contrôles (*Choi et al., 2014*). De plus, le phénotype moléculaire décrit dans cette étude ne correspond pas à celui décrit pour les mutants *Foxc1* ou *Rdh10* (*Siegenthaler et al., 2009*). Enfin, l'étude du mutant *Raldh2*^{-/-}, sauvé par supplémentation maternelle d'AR effectuée par l'équipe de G. Duester, montre que la population progénitrice et l'expansion radiaire ne sont pas affectées (*Chatzi et al., 2011*). Cependant, Chatzi et ses collaborateurs concluent que leur mutant ne présente pas non plus de défaut des neurones post-mitotiques (*Chatzi et al., 2011*). Pour l'analyse des populations neuronales, les auteurs ont limité l'étude au stade E14,5 et aux marqueurs Ki67 et Tuj1. Ces conditions d'analyse pourraient ne pas rendre compte de défauts subtils dans la production des neurones, la distribution neuronale et/ou la lamination corticale.

1.2.2. Comparaisons des phénotypes du mutant conditionnel *Raldh2* et du mutant induit par injection d'un récepteur dominant négatif RAR403

En inactivant le gène *Raldh2* à E10,5, nous supprimons la source majeure voire unique de synthèse d'AR dans le cortex après E14,5. Nos résultats corroborent ceux décrits par Choi et

ses collaborateurs, qui montrent que l'AR régule la migration radiaire en influençant la transition multipolaire/bipolaire, qu'il contrôle la spécification neuronale et majoritairement celle des neurones de la couche IV (Choi et al., 2014). Cependant, le mutant conditionnel *Raldh2* présente un phénotype plus subtil étant donné que les populations corticales électroporées avec le dominant négatif RAR403 et destinées aux couches V et III ne parviennent pas à maintenir leur identité et deviennent des neurones de la couche II au stade P4 (Choi et al., 2014). Cette différence d'intensité de phénotype pourrait être à nouveau le résultat d'un effet compensatoire de RALDH1 présent à partir de E16,5 dans les méninges. De plus, il a été montré que le plexus choroïde pourrait participer à l'apport d'AR présent dans le LCR (Alonso et al., 2011). Enfin, nous ne pouvons pas exclure qu'un autre apport en AR pourrait provenir de la vascularisation corticale (Kurlandsky et al., 1995).

De par notre étude et celle réalisée par Choi et ses collaborateurs, nous pouvons conclure que l'AR produit à E14,5, au cours de la neurogenèse, ne semble pas influencer la population des progéniteurs, ni leur maintien ou leur prolifération. Ces deux études s'accordent sur le rôle de l'AR dans la régulation de la différenciation et la migration neuronale, importantes pour la lamination corticale et la fonctionnalité du cortex.

1.3. Y a-t-il une autre source d'AR dans le télencéphale que les méninges ?

Nous avons montré la présence des enzymes de synthèse RDH10 et RALDH2 dans le plexus choroïde à partir de E12 et au moins jusqu'au stade E18,5 (Romand et al., 2008 ; Yamamoto et al., 1996) (cf. Résultats, Partie I, §3.1). Le plexus choroïde pourrait constituer un site de production d'AR supplémentaire à celui des méninges, en libérant de l'AR dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) qu'il synthétise. Il a été détecté une concentration d'AR de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-6} mol/L au sein du LCR (Lehtinen et al., 2011). De plus, une étude a montré la présence de rétinol et de la protéine de transport RBP dans le LCR (Parada et al., 2008). Ainsi, le LCR pourrait à la fois fournir les méninges et le plexus choroïde en rétinol et véhiculer l'AR produit par ces structures.

Par ailleurs, une étude suggère que l'encéphale est en grande partie approvisionné en AR par voie plasmatique. La circulation sanguine contient de 7,3 à 9 nmol d'AR/L et le véhicule via une liaison à l'albumine (Kurlandsky et al., 1995). De plus, le développement de la vascularisation corticale est régulé par la signalisation rétinolique (Mizee et al., 2013 ; Bonney et al., 2016). Ainsi, les vaisseaux sanguins corticaux pourraient transporter l'AR et le fournir aux différentes populations présentes à leur proximité dans le cortex cérébral.

1.4. Perspectives

1.4.1. Études comportementales des mutants conditionnels *Raldh2*

Au stade P4, les mutants conditionnels *Raldh2* présentent des anomalies de la distribution neuronale à l'intérieur des couches corticales. Lorsque nous observons une perturbation du nombre de neurones au sein d'une couche, nous nous demandons si cette perturbation est maintenue dans le temps ou si elle sera corrigée, et quelles conséquences fonctionnelles elle pourra avoir sur un individu adulte.

Les couches V et VI contiennent entre autres des neurones corticothalamiques et corticospinaux. Le surplus de neurones dans ces couches pourrait avoir une influence sur le relais des informations sensorielles et motrices entre le cortex et le thalamus ou le cortex et la moelle épinière. Le thalamus a aussi un rôle de modulateur de l'activation d'une information de stress, ou de danger venant du cortex. Ainsi, une perturbation de ces neurones pourrait avoir une influence sur le comportement des individus adultes. De plus, le déficit en neurones de la couche IV, qui contient des neurones thalamocorticaux, pourrait engendrer un défaut dans l'intégration de l'information sensorielle afférente. Enfin, le surplus en neurones de la couche II/III pourrait avoir une influence sur le traitement et la compréhension de l'information reçue.

Des tests phénotypiques comportementaux sur des individus adultes permettraient de mettre en évidence les conséquences de la perturbation de la composition des couches corticales engendrée par l'absence de l'AR méningéal. Ces tests exploreront la mobilité, l'équilibre et la dextérité des individus ; la reconnaissance d'objet et la mémoire ; la curiosité, l'hyperactivité ou encore l'anxiété. Ainsi, nous développerions un modèle animal adulte présentant des anomalies du développement du cortex qui permettront de clarifier les conséquences fonctionnelles de ces défauts corticaux, et peut-être de proposer de nouvelles pistes du diagnostic et de l'approche thérapeutique des maladies neuro-développementales.

1.4.2. La lignée *Wnt1-Cre*

Une alternative pour inactiver le gène *Raldh2* dans les méninges serait d'utiliser la lignée *Wnt1-Cre* croisée à la lignée *Raldh2^{fllox}*. Le promoteur *Wnt1* n'est pas ubiquitaire et est actif dans les cellules des crêtes neurales en migration qui sont les précurseurs des méninges corticales. L'inactivation par la lignée *Wnt1-Cre* est donc plus sélective, puisqu'elle ne cible que les méninges. Ce n'est pas le cas lors de l'inactivation par la *CMV-CreER^{T2}* qui inactive le

gène *Raldh2* dans l'ensemble de l'embryon. Par la mutation ubiquitaire, il est possible que nous inactivions une autre source d'AR nécessaire à la neurogenèse corticale, par exemple celle issue du plexus choroïde.

L'étude de la lignée *Wnt1-Cre* nous permettrait de confirmer le rôle de l'AR produit par les méninges sur la neurogenèse corticale. De plus, la comparaison du phénotype des mutants *Wnt1-Cre ; Raldh2^{flox/flox}* avec celui des mutants *CMV-CreER^{T2} ; Raldh2^{flox/flox}*, nous indiquerait l'implication de l'AR produit par les méninges sur la neurogenèse corticale. En effet, si le phénotype *Wnt1-Cre ; Raldh2^{flox/flox}* est plus subtil que celui des mutants *CMV-CreER^{T2} ; Raldh2^{flox/flox}*, cela suggèrera que de l'AR d'une autre source est important pour la neurogenèse du cortex.

Bien que les mutants *Wnt1-Cre ; Raldh2^{flox/flox}* ne survivent pas après P0, une partie des études réalisées chez le mutant conditionnel pourrait être confirmée. Nous pourrions notamment analyser les populations de progéniteurs et leur prolifération, ainsi que la distribution neuronale au sein du cortex en développement. Ainsi, nous confirmerions que l'AR produit par les méninges n'est pas nécessaire à la prolifération ni au maintien des populations de progéniteurs et qu'il aurait une influence sur la distribution des populations neuronales corticales. Pour rendre compte de la lamination du cortex à P4, nous devrions mettre quelques jours en culture les cerveaux des mutants collectés à P0. Nous pourrions de cette manière confirmer le rôle de l'AR produit par les méninges sur la spécification et/ou la migration des neurones du cortex.

1.4.3. Suppression de l'effet compensatoire de RALDH1

Étant donné que le gène *Raldh1* s'exprime à partir de E16,5 dans les méninges, une compensation fonctionnelle de la perte de *Raldh2* dans le mutant *CMV-CreER^{T2} ; Raldh2^{flox/flox}* pourrait avoir lieu. Le mutant *Raldh1^{-/-}* est viable et fertile (*Fan et al., 2003*), ce qui rend possible la génération du double mutant *CMV-CreER^{T2} ; Raldh2^{flox/flox} ; Raldh1^{-/-}*. Cette double inactivation permettrait d'analyser la neurogenèse corticale en écartant la possibilité d'une compensation de la perte de RALDH2 par RALDH1 et de se placer dans un système où l'AR ne serait plus produit à partir des méninges. De plus, la comparaison du mutant conditionnel *Raldh2* avec le double mutant *CMV-CreER^{T2} ; Raldh2^{flox/flox} ; Raldh1^{-/-}* permettrait d'évaluer l'éventuelle fonction de *Raldh1* dans la neurogenèse corticale. Si le phénotype *CMV-CreER^{T2} ; Raldh2^{flox/flox} ; Raldh1^{-/-}* est plus fort que celui du conditionnel *Raldh2*, cela suggèrera que RALDH1 fournit à partir de E16,5 un apport en AR nécessaire à

la neurogenèse, en plus de celui fournit par RALDH2. De manière analogue à l'analyse faite sur le mutant conditionnel *Raldh2*, nous pourrions étudier la population des progéniteurs et leur prolifération, la distribution et la migration neuronales ainsi que la lamination corticale. Cette analyse nous permettra de préciser les fonctions tardives des gènes *Raldh2* et *Raldh1* au cours de la neurogenèse corticale.

2. Étude de la fonction du gène *Rdh10* sur la neurogenèse corticale précoce

2.1. Influence de l'AR sur la population des progéniteurs

Dans le mutant *Rdh10*^{-/-}, nous avons montré une réduction de vésicules télencéphaliques qui s'accompagne d'une forte diminution des populations neuronales et d'une réduction plus ou moins importante des populations progénitrices. Nous supposons que l'AR régule la destinée cellulaire des populations progénitrices et influence ainsi la production des progéniteurs neuraux intermédiaires et des neurones.

2.1.1. Rôle de l'AR dans la neurogenèse indirecte

La taille finale du cortex cérébral est dépendante de l'expansion des populations qui le composent, et notamment de la génération des populations neuronales. Le mutant *Rdh10*^{-/-} présente une microcéphalie et une réduction importante du nombre des neurones. Ces anomalies peuvent être la conséquence d'une perturbation de la prolifération des progéniteurs et/ou d'un défaut quantitatif lors de la production du pool des progéniteurs. Au cours de la neurogenèse, les premiers neurones sont générés à partir des cellules GRs par neurogenèse directe. Cependant, la majorité des neurones corticaux sont produits par neurogenèse indirecte à partir des PNIs (*Sessa et al., 2008*). L'ensemble de nos observations suggère que le déficit de la population neuronale pourrait être majoritairement dû à la diminution du nombre des PNIs. En effet, la réduction de cette population de progéniteurs a été mise en évidence par la diminution du nombre de progéniteurs exprimant le facteur de transcription Tbr2 spécifique des PNIs ainsi que par la réduction du nombre de progéniteurs abventriculaires en phase M correspondant également aux PNIs. Ainsi, l'AR contrôlerait la transition entre la phase proliférative et la phase neurogénique des cellules GRs.

De manière intéressante, le gène *Neurog2* est exprimé dans les progéniteurs corticaux en transition vers l'identité neuronale, et les cellules infectées par un rétrovirus exprimant

Neurog2 montrent une augmentation des divisions non-apicales (Miyata et al., 2004; Hand et al., 2005). Le gène *Neurog2* contient deux éléments de réponse RARE et a été montré comme étant important dans l'induction de la phase neurogénique (Ribes et al., 2008). D'autre part, une étude *in vitro* a montré que le signal Wnt, sous l'influence de SHH et FGF2, favorise l'induction des cellules GRs vers une identité de progéniteurs neuronaux, les PNIs (Viti et al., 2003). L'interaction des voies de signalisation SHH et FGF avec celle de l'AR a déjà été montrée lors du développement précoce du cerveau antérieur (Ribes et al., 2006). L'interaction entre ces voies qui pourrait avoir lieu au cours de la neurogenèse corticale serait dans la continuité de celle déjà établie plus précocement au cours du développement neural. De plus, le gène *Neurog2* contient également un site de liaison aux protéines Gli (Ribes et al., 2008), ce qui appuie l'idée d'une interaction entre les signaux SHH et AR. Ainsi, les voies de signalisation SHH, FGF et AR pourraient continuer d'interagir au cours de la phase précoce de neurogenèse et contrôler la destinée des cellules GRs.

2.1.2. Rôle de l'AR pour débiter la phase de neurogenèse

Les cellules GRs réalisent plusieurs modes de divisions. Elles peuvent soit (1) réaliser des divisions symétriques et donner naissance à deux cellules GRs, soit (2) réaliser des divisions asymétriques et s'auto-renouveler tout en donnant naissance à un neurone ou un PNI (Götz and Huttner, 2005). Dans notre étude, nous avons observé une diminution du nombre de PNIs et de neurones, suggérant que dans les mutants *Rdh10*^{-/-}, les cellules GRs ne sont pas favorisées pour effectuer des divisions asymétriques, mais plutôt incitées à rester dans un état prolifératif et se diviser de manière symétrique. Si les cellules GRs effectuent des divisions prolifératives symétriques, nous devrions observer une augmentation du nombre de cellules GRs, or c'est l'observation inverse qui est faite, cette population diminue sensiblement chez le mutant *Rdh10*^{-/-}. Une hypothèse qui pourrait expliquer cette observation serait qu'au début de la neurogenèse (E11,5), le pool des cellules GRs est déjà diminué chez le mutant. Cette idée est appuyée par le phénotype observé dans le mutant *Raldh2*^{-/-} qui se traduit par la formation d'une vésicule télencéphalique hypoplasique (Ribes et al., 2006). Il serait possible qu'à partir d'un très faible nombre de cellules NEs, les divisions préférentiellement prolifératives des cellules GRs compensent le déficit de départ et résultent en une diminution mineure du nombre de ces cellules lors de la neurogenèse précoce.

Ainsi, l'AR pourrait être requis à deux niveaux, en influençant la prolifération des cellules NEs et/ou la transition des cellules NEs en cellules GRs. Le contrôle temporel de cette

transition est important car même un léger retard peut modifier l'importance du pool des progéniteurs et le nombre final des neurones corticaux (*Caviness et al., 1995; Rakic, 1995*). Plusieurs molécules signal ont été identifiées comme étant impliquées dans la régulation de ce processus, notamment celles des voies de signalisation Notch et FGF (cf. Introduction, Partie II, §2.3). En effet, une activation constitutive de la voie Notch à E13,5 engendre une inhibition de la production des neurones par les cellules GRs et le maintien de leur statut de prolifération (*Mizutani and Saito, 2005*). De plus, il a été montré que la voie Notch contribue au maintien des progéniteurs dans un état de prolifération en bloquant leur différenciation en neurones (*de la Pompa et al., 1997; Ishibashi et al., 1994*). Par ailleurs, l'inactivation du gène *Fgf10* entraîne un retard dans la transition de la cellule NE en cellule GR, ainsi qu'un retard dans l'initiation de la production neuronale, aboutissant à un nombre réduit de PNIs (*Sahara and O'Leary, 2009*). L'AR pourrait faire partie de ces molécules signal et influencer la transition de la cellule NE à la cellule GR ainsi que l'induction de la phase neurogénique.

2.2. Influence de l'absence de l'AR cortical sur la migration des neurones GABAergiques

En plus de la diminution du nombre de neurones corticaux, nous avons observé dans le mutant *Rdh10*^{-/-} un défaut dans la progression des interneurones *Gad67* positifs vers le cortex. Ce phénotype semble résulter d'un défaut de migration dû à un déficit en la chémokine attractive Cxcl12 de la ZI. Afin d'être sûr que le manque en interneurones de la ZI ne soit pas dû à un défaut de spécification, il faut procéder à une quantification des cellules *Gad67* positives. En effet, il a été montré que RALDH3 présente dans l'EGL est requise pour la différenciation des neurones GABAergiques (*Li et al., 2000 ; Chatzi et al., 2011*). Cependant, le gène *Rdh10* n'est exprimé qu'à partir de E13,5 dans le futur striatum, structure dérivée de l'EGL (*Romand et al., 2008b*). Il a été montré qu'un blocage de la voie de signalisation de l'AR par l'utilisation d'un antagoniste des RARs engendre une migration tangentielle réduite, suggérant un rôle de l'AR dans la balance des neurones excitateurs vs. inhibiteurs dans le cortex (*Crandall et al., 2011*). Ainsi, l'AR pourrait contrôler, au cours de la neurogenèse précoce, la colonisation des couches corticales par les neurones excitateurs et inhibiteurs, en influant notamment la production des neurones corticaux et la migration tangentielle des interneurones.

2.3. Perspectives

Par l'étude de la fonction du gène *Rdh10* au cours de la phase précoce de la neurogenèse, nous avons démontré un rôle de l'AR dans la transition de la phase proliférative à neurogénique. Il nous reste à démontrer son rôle potentiel dans la transition de la cellule NE à la cellule GR.

2.3.1. Rôle de l'AR sur l'initiation de la phase neurogénique

Par notre étude, nous supposons un rôle de l'AR dans la transition cellule GR à PNI. Pour confirmer cette hypothèse, il faudra quantifier les cellules GRs ainsi que les cellules en transition GR à PNI. Ainsi, nous obtiendrons un ratio de la population des GRs engagés dans une division asymétrique neurogénique par rapport à la population totale des GRs. Cette étude nous précisera le rôle de l'AR sur l'initiation de la phase neurogénique.

La diminution du nombre de PNIs et de neurones dans le mutant *Rdh10*^{-/-} pourrait être la conséquence d'un retard de l'initiation de la phase neurogénique. Ce défaut peut être engendré par une perturbation de la longueur du cycle cellulaire. Nous proposons de compléter notre étude du cycle cellulaire des progéniteurs, en analysant plus précisément la durée de ses phases. Par quantification, nous discriminerons la population des cellules GRs en phase S par rapport à celle des PNIs en phase S. Nous mesurerons également la durée du cycle cellulaire, et nous intéresserons à quantifier la durée de la phase S dans les embryons mutants par rapport aux contrôles. Par ailleurs, il a été montré que la variation de la durée de la phase G1 engendrait une modification de la destinée des cellules en division : une division symétrique proliférative pour une phase G1 courte, une division asymétrique neurogénique pour une durée moyenne, et une division symétrique neurogénique pour une durée longue (*Calegari and Huttner, 2003*). Nous supposons que l'absence d'AR engendre un retard dans l'initiation des divisions neurogéniques, qui pourrait être dû à une phase G1 plus courte. Nous nous intéresserons à la cycline D2 dont l'inactivation est connue pour provoquer l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (*Koyama-Nasu et al., 2013*).

Nous souhaiterons également identifier des gènes cibles de l'AR impliqués dans la transition cellule GRs à PNI et explorer la piste de la potentielle influence de l'AR sur le gène *Neurog2*. Nous étudierons les possibles interactions entre l'AR et les voies de signalisation SHH, Wnt et FGF dans le contrôle de l'initiation de la phase neurogénique. Par l'ensemble de ces approches, nous préciserons ainsi le rôle de l'AR dans la transition de la phase proliférative à la phase neurogénique au cours de la neurogenèse précoce.

2.3.2. Rôle de l'AR sur la population des cellules NE

Dans le mutant *Rdh10*^{-/-}, nous avons observé une légère diminution du nombre de cellules GRs mais pas d'augmentation du nombre des PNIs ou des neurones qui laisserait penser à un épuisement du pool des GRs à cause de divisions neurogéniques intensives. Nous supposons alors un déficit de la population des cellules NEs, avant que ne commence la neurogenèse. Pour vérifier cette hypothèse, nous quantifierons spécifiquement la population initiale des cellules NEs au cours de la phase d'expansion latérale, à E10,5. Nous nous intéresserons également à leur taux de prolifération. La diminution du nombre de cellules GRs peut également être le résultat d'un défaut de transition de la cellule NE à la cellule GR. Pour confirmer cette hypothèse, nous quantifierons la population des progéniteurs à identité NE par rapport à ceux ayant acquis les caractéristiques de la cellule GR. Nous pourrions ainsi discriminer le ratio de transition cellule NE à GR et affirmer le rôle de l'AR sur l'initiation de ce processus. De plus, les voies de signalisation Notch et FGF sont importantes dans le contrôle de cette transition. Par une étude moléculaire, nous investiguerons la potentielle interaction de l'AR avec les voies de signalisation Notch et FGF et nous souhaiterions identifier les gènes cibles de l'AR impliqué dans la transition de l'identité NE à GR.

2.3.3. Rôle de l'AR dans la migration tangentielle des interneurones

Nous avons observé dans le mutant *Rdh10*^{-/-} un défaut de la population neuronale GABAergique à atteindre et peupler la plaque corticale, suggérant un rôle de l'AR sur la migration tangentielle de cette population. Il serait également possible que la population GABAergique soit diminuée lors de sa génération dans l'EGL et que par conséquent un plus faible nombre d'interneurones atteignent le cortex. Une quantification du nombre des neurones GABAergiques nous permettra de mettre en évidence un défaut de production si leur nombre est réduit, ou un défaut de migration si leur nombre est inchangé. Par ailleurs, nous souhaitons utiliser le double mutant *CMV-CreER*^{T2} ; *Raldh2*^{fllox/fllox} ; *Raldh3*^{-/-} et comparer la quantification des interneurones de ce mutant avec celle réalisée dans le mutant *Rdh10*^{-/-}. Nous nous attendons à quantifier un nombre réduit d'interneurones dans le double mutant car RALDH3 n'est pas présent dans l'EGL pour promouvoir la production des interneurones (*Chatzi et al., 2011*). Nous préciserons ainsi la fonction précoce du gène *Rdh10* sur la population des interneurones au cours de la neurogenèse précoce.

2.3.4. Études comportementales des mutants *Rdh10*^{-/-}

Dans le mutant *Rdh10*^{-/-}, nous avons observé une perte importante des populations neuronales des couches profondes. De manière analogue à l'étude proposée pour le mutant conditionnel *Raldh2*, nous pourrions explorer la conséquence à l'âge adulte de ce déficit en neurones par des tests comportementaux. Cependant, nous n'avons pas accès à des embryons mutants *Rdh10*^{-/-} au-delà du stade E13,5. Toutefois, un traitement au rétinol administré aux femelles gestantes de E7,5 à E11,5 permet d'obtenir des mutants *Rdh10*^{-/-} viables adultes (Rhinn et al., 2011b). Ce traitement est une manière de contourner la létalité embryonnaire et d'avoir accès à la population adulte. Cependant, du rétinol doit être administré lors de la gestation, et nous ne pouvons contrôler précisément son effet après l'arrêt du traitement. De plus, étant donné que le rétinol est administré jusqu'au stade E11,5, il pourrait permettre de sauver les défauts corticaux causés au cours de la neurogenèse précoce.

Une autre manière de contourner la létalité embryonnaire et d'avoir accès à une population adulte avec des défauts corticaux de neurogenèse précoce, serait d'inactiver le gène *Rdh10* de manière tissu-spécifique. Nous pourrions utiliser la lignée conditionnelle *Rdh10*^{flox} (générée par le Dr. Rhinn) croisée avec une lignée *Cre* placée sous la dominance d'un promoteur spécifique de l'encéphale. Avant de réaliser des tests comportementaux sur des individus adultes issus de ce croisement, nous devons nous assurer de la corrélation entre le phénotype de neurogenèse précoce de cette lignée et celui de la lignée *Rdh10*^{-/-}. Si c'est le cas, nous pourrions alors mettre en évidence les conséquences de l'absence d'AR produit par RDH10 sur la fonctionnalité corticale à l'âge adulte. Nous aurons alors développé un second modèle animal adulte présentant des anomalies du développement du cortex qui sera utile dans la compréhension et le traitement des maladies neuro-développementales.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le rôle de la voie de signalisation de l'AR dans le développement neural s'illustre à plusieurs reprises dans les processus de prolifération, différenciation, migration de cellules au sein de différentes structures du système nerveux central. Pour préciser le rôle de l'AR dans le développement du cerveau antérieur, le travail présenté ici a porté sur l'implication de signalisation rétinolique au sein du cortex en développement.

L'étude des profils d'expression des gènes codant pour les différents acteurs de la voie de signalisation de l'AR nous a permis de mettre en évidence un environnement cortical propice à la signalisation rétinolique. En effet nous avons montré entre les stades E14,5 et E18,5, la présence probable des enzymes de synthèse RDH10, RALDH1 et RALDH2 dans les méninges et le plexus choroïde, celle du récepteur RAR α dans le cortex, des récepteurs RAR α et β dans le plexus choroïde, et l'absence des enzymes de dégradation CYP26A1, B1 et C1 dans le cortex et les méninges.

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de l'AR produit par les méninges pour le développement cortical. L'étude d'un mutant conditionnel pour *Raldh2* suggère que l'AR issu des méninges contrôle les processus de spécification et de migration neuronale. Ainsi, nous avons montré que l'AR agit sur les populations corticales neuronales et assure la lamination du cortex cérébral au cours de la neurogenèse.

Nous avons également entrepris une étude qui explore le rôle plus précoce de l'AR avant et au début de la phase de neurogenèse. L'étude de la fonction précoce du gène *Rdh10* suggère que l'AR a une influence sur la prolifération des progéniteurs, sur la production neuronale et sur la migration des interneurons au sein du cortex cérébral. Nos résultats suggèrent qu'en plus d'agir sur les populations corticales neuronales, l'AR pourrait avoir un rôle sur les populations de progéniteurs au cours des étapes plus précoces de la neurogenèse corticale.

Ce travail de thèse fournit de nouvelles données sur l'implication de la signalisation de l'AR dans le développement du cortex cérébral. Notre étude s'inscrit dans la poursuite des travaux précédents réalisés sur les mutants *Raldh2*^{-/-} et *Rdh10*^{-/-} et a permis de montrer que l'AR agit comme facteur extrinsèque régulant diverses étapes de la neurogenèse corticale. De plus, ce projet a mis en œuvre des approches novatrices, et a permis d'obtenir des modèles animaux présentant des désordres corticaux qui permettront de clarifier certains aspects de la détermination cellulaire, des processus de différenciation et de migration neuronale importants pour le développement de l'encéphale. Il s'ouvre également à de nouveaux questionnements, notamment celui du rôle de l'AR sur la fonctionnalité du cortex cérébral.

L'ensemble des phénotypes observés causé par l'absence d'AR (microcéphalie, perte de neurones, perturbation de la lamination corticale, défaut de spécification et de migration neuronales) nous évoque des perturbations corticales correspondant chez l'Homme à des malformations du développement cortical (MDC). Les MDCs définissent les anomalies corticales à l'origine d'une déficience intellectuelle souvent associée à une épilepsie. Le cortex cérébral est le siège principal des fonctions motrices, sensorielles et cognitives. Tout nombre anormal de neurones est souvent associé à certaines déficiences engendrant des troubles du comportement, retards mentaux, maladies neuropsychiatriques (schizophrénie, autisme) ou neurodégénératives (maladie de Huntington). La poursuite de l'étude des troubles corticaux engendrés par l'absence d'AR sur les différents modèles animaux contribuera à une meilleure compréhension de mécanismes pathogéniques de diverses anomalies du cortex et permettra d'ouvrir des perspectives pour le diagnostic et le traitement de maladies développementales et neurodégénératives chez l'Homme.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Aaku-Saraste, E., Oback, B., Hellwig, A., and Huttner, W.B. (1997). Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. *Mech. Dev.* *69*, 71–81.
- Abu-Abed, S., Dollé, P., Metzger, D., Beckett, B., Chambon, P., and Petkovich, M. (2001). The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev.* *15*, 226–240.
- Abu-Abed, S., Dollé, P., Metzger, D., Wood, C., MacLean, G., Chambon, P., and Petkovich, M. (2003). Developing with lethal RA levels: genetic ablation of Rarg can restore the viability of mice lacking Cyp26a1. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 1449–1459.
- Alfano, C., Viola, L., Heng, J.I.-T., Pirozzi, M., Clarkson, M., Flore, G., De Maio, A., Schedl, A., Guillemot, F., and Studer, M. (2011). COUP-TFI promotes radial migration and proper morphology of callosal projection neurons by repressing Rnd2 expression. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 4685–4697.
- Alonso, M.I., Martín, C., Carnicero, E., Bueno, D., and Gato, A. (2011). Cerebrospinal fluid control of neurogenesis induced by retinoic acid during early brain development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *240*, 1650–1659.
- Anderson, S.A., Marín, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J.L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 353–363.
- Anderson, S.A., Kaznowski, C.E., Horn, C., Rubenstein, J.L.R., and McConnell, S.K. (2002). Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo. *Cereb. Cortex N. Y. N* *12*, 702–709.
- Ang, H.L., Deltour, L., Hayamizu, T.F., Zgombi-Knight, M., and Duester, G. (1996). Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J. Biol. Chem.* *271*, 9526–9534.
- Angevine, J.B., and Sidman, R.L. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* *192*, 766–768.
- Anthony, T.E., Mason, H.A., Gridley, T., Fishell, G., and Heintz, N. (2005). Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes Dev.* *19*, 1028–1033.
- Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* *81*, 1269–1304.
- Attardo, A., Calegari, F., Haubensak, W., Wilsch-Bräuninger, M., and Huttner, W.B. (2008). Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PLoS One* *3*, e2388.

B

- Bagnall, K.M., Higgins, S.J., and Sanders, E.J. (1989). The contribution made by cells from a single somite to tissues within a body segment and assessment of their integration with similar cells from adjacent segments. *Dev. Camb. Engl.* *107*, 931–943.
- Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R.V., and LoTurco, J.J. (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat. Neurosci.* *6*, 1277–1283.

- Barkovich, A.J., Guerrini, R., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D., and Dobyns, W.B. (2012). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain J. Neurol.* *135*, 1348–1369.
- Bastien, J., and Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* *328*, 1–16.
- Beddington, R.S., and Robertson, E.J. (1999). Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* *96*, 195–209.
- Bertrand, N., Castro, D.S., and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 517–530.
- Biben, C., Stanley, E., Fabri, L., Kotecha, S., Rhinn, M., Drinkwater, C., Lah, M., Wang, C.C., Nash, A., Hilton, D., et al. (1998). Murine cerberus homologue mCer-1: a candidate anterior patterning molecule. *Dev. Biol.* *194*, 135–151.
- Bielle, F., Griveau, A., Narboux-Nême, N., Vigneau, S., Sigrist, M., Arber, S., Wassef, M., and Pierani, A. (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat. Neurosci.* *8*, 1002–1012.
- Blomhoff, R., and Blomhoff, H.K. (2006). Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* *66*, 606–630.
- Blomhoff, R., Helgerud, P., Rasmussen, M., Berg, T., and Norum, K.R. (1982). In vivo uptake of chylomicron [3H]retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 7326–7330.
- Blomhoff, R., Green, M.H., Berg, T., and Norum, K.R. (1990). Transport and storage of vitamin A. *Science* *250*, 399–404.
- Bohner, A.P., Akers, R.M., and McConnell, S.K. (1997). Induction of deep layer cortical neurons in vitro. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 915–923.
- Bonney, S., Harrison-Uy, S., Mishra, S., MacPherson, A.M., Choe, Y., Li, D., Jaminet, S.-C., Fruttiger, M., Pleasure, S.J., and Siegenthaler, J.A. (2016). Diverse Functions of Retinoic Acid in Brain Vascular Development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *36*, 7786–7801.
- Borrell, V., and Marín, O. (2006). Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat. Neurosci.* *9*, 1284–1293.
- Britanova, O., de Juan Romero, C., Cheung, A., Kwan, K.Y., Schwark, M., Gyorgy, A., Vogel, T., Akopov, S., Mitkovski, M., Agoston, D., et al. (2008). *Satb2* is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron* *57*, 378–392.
- Bulchand, S., Grove, E.A., Porter, F.D., and Tole, S. (2001). LIM-homeodomain gene *Lhx2* regulates the formation of the cortical hem. *Mech. Dev.* *100*, 165–175.
- Bush, J.O., and Jiang, R. (2012). Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 231–243.

C

- Calegari, F., and Huttner, W.B. (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J. Cell Sci.* *116*, 4947–4955.
- Cammas, L., Romand, R., Fraulob, V., Mura, C., and Dollé, P. (2007). Expression of the murine retinol dehydrogenase 10 (Rdh10) gene correlates with many sites of retinoid signalling during embryogenesis and organ differentiation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *236*, 2899–2908.
- Catala, M. (1998). Embryonic and fetal development of structures associated with the cerebro-spinal fluid in man and other species. Part I: The ventricular system, meninges and choroid plexuses. *Arch. Anat. Cytol. Pathol.* *46*, 153–169.
- Caviness, V.S. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res.* *256*, 293–302.
- Caviness, V.S., Takahashi, T., and Nowakowski, R.S. (1995). Numbers, time and neocortical neurogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.* *18*, 379–383.
- Chae, T.H., Kim, S., Marz, K.E., Hanson, P.I., and Walsh, C.A. (2004). The *hyh* mutation uncovers roles for alpha Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat. Genet.* *36*, 264–270.
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *10*, 940–954.
- Chatzi, C., Brade, T., and Duester, G. (2011). Retinoic acid functions as a key GABAergic differentiation signal in the basal ganglia. *PLoS Biol.* *9*, e1000609.
- Choi, J., Park, S., and Sockanathan, S. (2014). Activated retinoid receptors are required for the migration and fate maintenance of subsets of cortical neurons. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 1151–1160.
- Clagett-Dame, M., and Knutson, D. (2011). Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients* *3*, 385–428.
- Cohlan, S.Q. (1953). Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* *117*, 535–536.
- 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.
- Couly, G.F., Coltey, P.M., and Le Douarin, N.M. (1992). The developmental fate of the cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Dev. Camb. Engl.* *114*, 1–15.
- Crandall, J.E., Goodman, T., McCarthy, D.M., Duester, G., Bhide, P.G., Dräger, U.C., and McCaffery, P. (2011). Retinoic acid influences neuronal migration from the ganglionic eminence to the cerebral cortex. *J. Neurochem.* *119*, 723–735.
- Cunningham, T.J., and Duester, G. (2015). Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 110–123.

D

- D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D., and Blaner, W.S. (2011). Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients* 3, 63–103.
- Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K., and McMahon, A.P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr. Biol. CB* 8, 1323–1326.
- De la Rossa, A., Bellone, C., Golding, B., Vitali, I., Moss, J., Toni, N., Lüscher, C., and Jabaudon, D. (2013). In vivo reprogramming of circuit connectivity in postmitotic neocortical neurons. *Nat. Neurosci.* 16, 193–200.
- Deltour, L., Foglio, M.H., and Duester, G. (1999). Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase Adh1, Adh3, and Adh4 null mutant mice. Overlapping roles of Adh1 and Adh4 in ethanol clearance and metabolism of retinol to retinoic acid. *J. Biol. Chem.* 274, 16796–16801.
- Delva, L., Bastie, J.N., Rochette-Egly, C., Kraïba, R., Balitrand, N., Despouy, G., Chambon, P., and Chomienne, C. (1999). Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7158–7167.
- Dequéant, M.-L., and Pourquié, O. (2008). Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nat. Rev. Genet.* 9, 370–382.
- Desai, A.R., and McConnell, S.K. (2000). Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Dev. Camb. Engl.* 127, 2863–2872.
- Diez del Corral, R., and Storey, K.G. (2004). Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 26, 857–869.
- Diez del Corral, R., Breitkreuz, D.N., and Storey, K.G. (2002). Onset of neuronal differentiation is regulated by paraxial mesoderm and requires attenuation of FGF signalling. *Dev. Camb. Engl.* 129, 1681–1691.
- Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., and Storey, K. (2003). Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40, 65–79.
- Dollé, P. (2009). Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl. Recept. Signal.* 7, e006.
- Dollé, P., and Niederreither, K. (2015). *The Retinoids: Biology, Biochemistry, and Disease* (Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell).
- Dollé, P., Fraulob, V., Gallego-Llamas, J., Vermot, J., and Niederreither, K. (2010). Fate of retinoic acid-activated embryonic cell lineages. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 239, 3260–3274.
- Dowhan, D.H., and Muscat, G.E. (1996). Characterization of the AB (AF-1) region in the muscle-specific retinoid X receptor-gamma: evidence that the AF-1 region functions in a cell-specific manner. *Nucleic Acids Res.* 24, 264–271.
- Dubrulle, J., and Pourquié, O. (2004). Coupling segmentation to axis formation. *Dev. Camb. Engl.* 131, 5783–5793.

- Duester, G. (2008). Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* *134*, 921–931.
- Duester, G., Mic, F.A., and Molotkov, A. (2003). Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem. Biol. Interact.* *143–144*, 201–210.
- Dupé, V., Ghyselinck, N.B., Wendling, O., Chambon, P., and Mark, M. (1999). Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 5051–5059.
- Dupé, V., Matt, N., Garnier, J.-M., Chambon, P., Mark, M., and Ghyselinck, N.B. (2003). A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 14036–14041.

E

- Eichele, G., and Thaller, C. (1987). Characterization of concentration gradients of a morphogenetically active retinoid in the chick limb bud. *J. Cell Biol.* *105*, 1917–1923.
- Emoto, Y., Wada, H., Okamoto, H., Kudo, A., and Imai, Y. (2005). Retinoic acid-metabolizing enzyme Cyp26a1 is essential for determining territories of hindbrain and spinal cord in zebrafish. *Dev. Biol.* *278*, 415–427.

F

- Fan, X., Molotkov, A., Manabe, S.-I., Donmoyer, C.M., Deltour, L., Foglio, M.H., Cuenca, A.E., Blaner, W.S., Lipton, S.A., and Duester, G. (2003). Targeted disruption of *Aldh1a1* (*Raldh1*) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 4637–4648.
- Farkas, L.M., and Huttner, W.B. (2008). The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 707–715.
- Fish, J.L., Kosodo, Y., Enard, W., Pääbo, S., and Huttner, W.B. (2006). *Aspm* specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 10438–10443.
- Francis, F., Meyer, G., Fallet-Bianco, C., Moreno, S., Kappeler, C., Socorro, A.C., Tuy, F.P.D., Beldjord, C., and Chelly, J. (2006). Human disorders of cortical development: from past to present. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 877–893.

G

- Gaiano, N., Nye, J.S., and Fishell, G. (2000). Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* *26*, 395–404.
- Gambello, M.J., Darling, D.L., Yingling, J., Tanaka, T., Gleeson, J.G., and Wynshaw-Boris, A. (2003). Multiple dose-dependent effects of *Lis1* on cerebral cortical development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 1719–1729.

- Garcia-Dominguez, M., Gilardi-Hebenstreit, P., and Charnay, P. (2006). PIAS β acts as an activator of Hoxb1 and is antagonized by Krox20 during hindbrain segmentation. *EMBO J.* 25, 2432–2442.
- Ghyselinck, N.B., Båvik, C., Sapin, V., Mark, M., Bonnier, D., Hindelang, C., Dierich, A., Nilsson, C.B., Håkansson, H., Sauvant, P., et al. (1999). Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.* 18, 4903–4914.
- Gilardi, P., Schneider-Maunoury, S., and Charnay, P. (1991). Krox-20: a candidate gene for the regulation of pattern formation in the hindbrain. *Biochimie* 73, 85–91.
- Gilbert, S.F., and Singer, S. (2006). *Developmental Biology*, Eighth Edition (Sunderland, Mass: Sinauer Associates Inc.).
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357–362.
- Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.-L., Guillemot, F., Dragatsis, I., et al. (2010). Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67, 392–406.
- Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788.
- Gradwohl, G., Fode, C., and Guillemot, F. (1996). Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. *Dev. Biol.* 180, 227–241.
- Grün, F., Hirose, Y., Kawauchi, S., Ogura, T., and Umesono, K. (2000). Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. *J. Biol. Chem.* 275, 41210–41218.
- Gupta, A., Tsai, L.-H., and Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 342–355.

H

- Halilagic, A., Zile, M.H., and Studer, M. (2003). A novel role for retinoids in patterning the avian forebrain during presomite stages. *Dev. Camb. Engl.* 130, 2039–2050.
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J.I.-T., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A.P., Parras, C., et al. (2005). Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48, 45–62.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., and Götz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* 229, 15–30.
- Haselbeck, R.J., Hoffmann, I., and Duester, G. (1999). Distinct functions for Aldh1 and Raldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways. *Dev. Genet.* 25, 353–364.
- Hatanaka, Y., and Murakami, F. (2002). In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.* 454, 1–14.
- Hatten, M.E. (1990). Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci.* 13, 179–184.

- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W.B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3196–3201.
- Heins, N., Cremisi, F., Malatesta, P., Gangemi, R.M., Corte, G., Price, J., Goudreau, G., Gruss, P., and Götz, M. (2001). Emx2 promotes symmetric cell divisions and a multipotential fate in precursors from the cerebral cortex. *Mol. Cell. Neurosci.* *18*, 485–502.
- Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K.L., Hack, M.A., Chapouton, P., Barde, Y.-A., and Götz, M. (2002). Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat. Neurosci.* *5*, 308–315.
- Heisenberg, C.P., Houart, C., Take-Uchi, M., Rauch, G.J., Young, N., Coutinho, P., Masai, I., Caneparo, L., Concha, M.L., Geisler, R., et al. (2001). A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes Dev.* *15*, 1427–1434.
- Heng, J.I.-T., Nguyen, L., Castro, D.S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J.-M., Hevner, R., et al. (2008). Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature* *455*, 114–118.
- Hernandez, R.E., Putzke, A.P., Myers, J.P., Margaretha, L., and Moens, C.B. (2007). Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 177–187.
- Hevner, R.F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A.M., Campagnoni, A.T., and Rubenstein, J.L. (2001). Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* *29*, 353–366.
- 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.
- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M., and Wilson, S. (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* *35*, 255–265.
- Hunter, N.L., and Dymecki, S.M. (2007). Molecularly and temporally separable lineages form the hindbrain roof plate and contribute differentially to the choroid plexus. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 3449–3460.
- Huttner, W.B., and Brand, M. (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* *7*, 29–39.

I

- Ishibashi, M., Moriyoshi, K., Sasai, Y., Shiota, K., Nakanishi, S., and Kageyama, R. (1994). Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J.* *13*, 1799–1805.

J

- Jaglin, X.H., Poirier, K., Saillour, Y., Buhler, E., Tian, G., Bahi-Buisson, N., Fallet-Bianco, C., Phan-Dinh-Tuy, F., Kong, X.P., Bomont, P., et al. (2009). Mutations in the β -tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat. Genet.* *41*, 746–752.

- Javaherian, A., and Kriegstein, A. (2009). A stem cell niche for intermediate progenitor cells of the embryonic cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991 19 Suppl 1*, i70-77.
- Jiang, X., Iseki, S., Maxson, R.E., Sucov, H.M., and Morriss-Kay, G.M. (2002). Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev. Biol.* *241*, 106–116.
- Johansson, P.A., Irmeler, M., Acampora, D., Beckers, J., Simeone, A., and Götz, M. (2013). The transcription factor Otx2 regulates choroid plexus development and function. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 1055–1066.

K

- Kalter, H., and Warkany, J. (1959). Experimental production of congenital malformations in mammals by metabolic procedure. *Physiol. Rev.* *39*, 69–115.
- Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J., Hu, J., Whitelegge, J., Ping, P., Wiita, P., Bok, D., and Sun, H. (2007). A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* *315*, 820–825.
- Kim, T.S., Maeda, A., Maeda, T., Heinlein, C., Kedishvili, N., Palczewski, K., and Nelson, P.S. (2005). Delayed dark adaptation in 11-cis-retinol dehydrogenase-deficient mice: a role of RDH11 in visual processes in vivo. *J. Biol. Chem.* *280*, 8694–8704.
- Kohtz, J.D., Baker, D.P., Corte, G., and Fishell, G. (1998). Regionalization within the mammalian telencephalon is mediated by changes in responsiveness to Sonic Hedgehog. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 5079–5089.
- Koide, T., Downes, M., Chandraratna, R.A., Blumberg, B., and Umesono, K. (2001). Active repression of RAR signaling is required for head formation. *Genes Dev.* *15*, 2111–2121.
- Koren, G. (1992). *Retinoids in Clinical Practice: The Risk-benefit Ratio* (New York: CRC Press).
- Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R.A.M., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W.B., and Hevner, R.F. (2009). Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991 19*, 2439–2450.
- Koyama-Nasu, R., Nasu-Nishimura, Y., Todo, T., Ino, Y., Saito, N., Aburatani, H., Funato, K., Echizen, K., Sugano, H., Haruta, R., et al. (2013). The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* *32*, 3840–3845.
- Kriegstein, A.R., and Götz, M. (2003). Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* *43*, 37–43.
- Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* *27*, 392–399.
- Kurlandsky, S.B., Gamble, M.V., Ramakrishnan, R., and Blaner, W.S. (1995). Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J. Biol. Chem.* *270*, 17850–17857.
- Kwan, K.Y., Lam, M.M.S., Krsnik, Z., Kawasawa, Y.I., Lefebvre, V., and Sestan, N. (2008). SOX5 postmitotically regulates migration, postmigratory differentiation, and projections of subplate and deep-layer neocortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16021–16026.
- Kwan, K.Y., Sestan, N., and Anton, E.S. (2012). Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 1535–1546.

L

- Laguesse, S., Peyre, E., and Nguyen, L. (2015). Progenitor genealogy in the developing cerebral cortex. *Cell Tissue Res.* 359, 17–32.
- Lara-Ramírez, R., Zieger, E., and Schubert, M. (2013). Retinoic acid signaling in spinal cord development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1302–1313.
- Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V., and Parnavelas, J.G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 7881–7888.
- Lehtinen, M.K., and Walsh, C.A. (2011). Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 653–679.
- Lehtinen, M.K., Zappaterra, M.W., Chen, X., Yang, Y.J., Hill, A.D., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., et al. (2011). The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron* 69, 893–905.
- Li, H., Wagner, E., McCaffery, P., Smith, D., Andreadis, A., and Dräger, U.C. (2000). A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech. Dev.* 95, 283–289.
- Lin, M., Zhang, M., Abraham, M., Smith, S.M., and Napoli, J.L. (2003). Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J. Biol. Chem.* 278, 9856–9861.
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., et al. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523, 337–341.

M

- Macleay, G., Dollé, P., and Petkovich, M. (2009). Genetic disruption of CYP26B1 severely affects development of neural crest derived head structures, but does not compromise hindbrain patterning. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 238, 732–745.
- Maden, M. (2001). Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int. Rev. Cytol.* 209, 1–77.
- Maden, M. (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 843–853.
- Maden, M. (2006). Retinoids and spinal cord development. *J. Neurobiol.* 66, 726–738.
- Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., and Zile, M. (1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr. Biol. CB* 6, 417–426.
- Maden, M., Sonneveld, E., van der Saag, P.T., and Gale, E. (1998). The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. *Dev. Camb. Engl.* 125, 4133–4144.
- Malatesta, P., Götz, M., Barsacchi, G., Price, J., Zoncu, R., and Cremisi, F. (2000). PC3 overexpression affects the pattern of cell division of rat cortical precursors. *Mech. Dev.* 90, 17–28.

- Marín, O., and Rubenstein, J.L.R. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 441–483.
- Matise, M.P., and Joyner, A.L. (1999). Gli genes in development and cancer. *Oncogene* 18, 7852–7859.
- Matt, N., Dupé, V., Garnier, J.-M., Dennefeld, C., Chambon, P., Mark, M., and Ghyselinck, N.B. (2005). Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells. *Dev. Camb. Engl.* 132, 4789–4800.
- McCaffery, P.J., Adams, J., Maden, M., and Rosa-Molinar, E. (2003). Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur. J. Neurosci.* 18, 457–472.
- McConnell, S.K. (1995). Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* 15, 761–768.
- McKenna, W.L., Betancourt, J., Larkin, K.A., Abrams, B., Guo, C., Rubenstein, J.L.R., and Chen, B. (2011). *Tbr1* and *Fezf2* regulate alternate corticofugal neuronal identities during neocortical development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 549–564.
- McLone, D.G., and Bondareff, W. (1975). Developmental morphology of the subarachnoid space and contiguous structures in the mouse. *Am. J. Anat.* 142, 273–293.
- Mendelsohn, C., Ruberte, E., LeMeur, M., Morriss-Kay, G., and Chambon, P. (1991). Developmental analysis of the retinoic acid-inducible RAR-beta 2 promoter in transgenic animals. *Dev. Camb. Engl.* 113, 723–734.
- Metzger, D., and Chambon, P. (2007). Contribution of targeted conditional somatic mutagenesis to deciphering retinoid X receptor functions and to generating mouse models of human diseases. *Handb. Exp. Pharmacol.* 511–524.
- Meyers, E.N., and Martin, G.R. (1999). Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH. *Science* 285, 403–406.
- Mic, F.A., Molotkov, A., Fan, X., Cuenca, A.E., and Duester, G. (2000). RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development. *Mech. Dev.* 97, 227–230.
- Mic, F.A., Molotkov, A., Benbrook, D.M., and Duester, G. (2003). Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7135–7140.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31, 727–741.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., and Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Dev. Camb. Engl.* 131, 3133–3145.
- Mizee, M.R., Wooldrik, D., Lakeman, K.A.M., van het Hof, B., Drexhage, J.A.R., Geerts, D., Bugiani, M., Aronica, E., Mebius, R.E., Prat, A., et al. (2013). Retinoic acid induces blood-brain barrier development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 1660–1671.

- Mizutani, K., and Saito, T. (2005). Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 1295–1304.
- Molotkov, A., Fan, X., Deltour, L., Foglio, M.H., Martras, S., Farrés, J., Parés, X., and Duester, G. (2002a). Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 5337–5342.
- Molotkov, A., Fan, X., and Duester, G. (2002b). Excessive vitamin A toxicity in mice genetically deficient in either alcohol dehydrogenase Adh1 or Adh3. *Eur. J. Biochem. FEBS* *269*, 2607–2612.
- Molotkova, N., Molotkov, A., Sirbu, I.O., and Duester, G. (2005). Requirement of mesodermal retinoic acid generated by Raldh2 for posterior neural transformation. *Mech. Dev.* *122*, 145–155.
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., and Macklis, J.D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 427–437.
- Morriss-Kay, G.M., and Sokolova, N. (1996). Embryonic development and pattern formation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *10*, 961–968.
- Muzio, L., and Mallamaci, A. (2005). Foxg1 confines Cajal-Retzius neuronogenesis and hippocampal morphogenesis to the dorsomedial pallium. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 4435–4441.
- Muzio, L., Di Benedetto, B., DiBenedetto, B., Stoykova, A., Boncinelli, E., Gruss, P., and Mallamaci, A. (2002). Conversion of cerebral cortex into basal ganglia in Emx2(-/-) Pax6(Sey/Sey) double-mutant mice. *Nat. Neurosci.* *5*, 737–745.

N

- Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O., and Pearlman, A.L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* *4*, 143–150.
- Nagano, T., Morikubo, S., and Sato, M. (2004). Filamin A and FILIP (Filamin A-Interacting Protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 9648–9657.
- Nagao, A. (2004). Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *J. Nutr.* *134*, 237S–240S.
- Neugebauer, J.M., Amack, J.D., Peterson, A.G., Bisgrove, B.W., and Yost, H.J. (2009). FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature* *458*, 651–654.
- Nichols, D.H., and Bruce, L.L. (2006). Migratory routes and fates of cells transcribing the Wnt-1 gene in the murine hindbrain. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *235*, 285–300.
- Niederreither, K., and Dollé, P. (2008). Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 541–553.
- Niederreither, K., McCaffery, P., Dräger, U.C., Chambon, P., and Dollé, P. (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech. Dev.* *62*, 67–78.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P., and Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat. Genet.* *21*, 444–448.

- Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbauer, B., Chambon, P., and Dollé, P. (2000). Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 75–85.
- Niederreither, K., Fraulob, V., Garnier, J.-M., Chambon, P., and Dollé, P. (2002). Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech. Dev.* *110*, 165–171.
- Niederreither, K., Vermot, J., Le Roux, I., Schuhbauer, B., Chambon, P., and Dollé, P. (2003). The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 2525–2534.
- Nieto, M., Monuki, E.S., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S.J., Cunningham, J., Gotz, M., and Walsh, C.A. (2004). Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* *479*, 168–180.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* *7*, 136–144.

O

- Oishi, K., Aramaki, M., and Nakajima, K. (2016). Mutually repressive interaction between Brn1/2 and Rorb contributes to the establishment of neocortical layer 2/3 and layer 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 3371–3376.
- Olivera-Martinez, I., and Storey, K.G. (2007). Wnt signals provide a timing mechanism for the FGF-retinoid differentiation switch during vertebrate body axis extension. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 2125–2135.

P

- Parada, C., Gato, A., and Bueno, D. (2008). All-trans retinol and retinol-binding protein from embryonic cerebrospinal fluid exhibit dynamic behaviour during early central nervous system development. *Neuroreport* *19*, 945–950.
- Parés, X., Farrés, J., Kedishvili, N., and Duester, G. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families in medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *65*, 3936–3949.
- Parker, R.O., and Crouch, R.K. (2010). Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. *Exp. Eye Res.* *91*, 788–792.
- Pennimpede, T., Cameron, D.A., MacLean, G.A., Li, H., Abu-Abed, S., and Petkovich, M. (2010). The role of CYP26 enzymes in defining appropriate retinoic acid exposure during embryogenesis. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* *88*, 883–894.
- Perusek, L., and Maeda, T. (2013). Vitamin A Derivatives as Treatment Options for Retinal Degenerative Diseases. *Nutrients* *5*, 2646–2666.
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., and Jessell, T.M. (1999). A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* *97*, 903–915.
- de la Pompa, J.L., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T.W., Rossant, J., et al. (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 1139–1148.

Pontious, A., Kowalczyk, T., Englund, C., and Hevner, R.F. (2008). Role of intermediate progenitor cells in cerebral cortex development. *Dev. Neurosci.* *30*, 24–32.

Pouilhe, M., Gilardi-Hebenstreit, P., Desmarquet-Trin Dinh, C., and Charnay, P. (2007). Direct regulation of vHnf1 by retinoic acid signaling and MAF-related factors in the neural tube. *Dev. Biol.* *309*, 344–357.

Q

Quinn, J.C., Molinek, M., Martynoga, B.S., Zaki, P.A., Faedo, A., Bulfone, A., Hevner, R.F., West, J.D., and Price, D.J. (2007). Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism. *Dev. Biol.* *302*, 50–65.

R

Radakovits, R., Barros, C.S., Belvindrah, R., Patton, B., and Müller, U. (2009). Regulation of radial glial survival by signals from the meninges. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 7694–7705.

Rakic, P. (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci.* *18*, 383–388.

Rallu, M., Machold, R., Gaiano, N., Corbin, J.G., McMahan, A.P., and Fishell, G. (2002a). Dorsoroventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both Gli3 and Hedgehog signaling. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 4963–4974.

Rallu, M., Corbin, J.G., and Fishell, G. (2002b). Parsing the prosencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 943–951.

Redzic, Z.B., Preston, J.E., Duncan, J.A., Chodobski, A., and Szmydynger-Chodobska, J. (2005). The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging. *Curr. Top. Dev. Biol.* *71*, 1–52.

Rhinn, M., and Dollé, P. (2012). Retinoic acid signalling during development. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 843–858.

Rhinn, M., Schuhbauer, B., Niederreither, K., and Dollé, P. (2011). Involvement of retinol dehydrogenase 10 in embryonic patterning and rescue of its loss of function by maternal retinaldehyde treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16687–16692.

Ribes, V., Wang, Z., Dollé, P., and Niederreither, K. (2006). Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 351–361.

Ribes, V., Stutzmann, F., Bianchetti, L., Guillemot, F., Dollé, P., and Le Roux, I. (2008). Combinatorial signalling controls Neurogenin2 expression at the onset of spinal neurogenesis. *Dev. Biol.* *321*, 470–481.

Ribes, V., Le Roux, I., Rhinn, M., Schuhbauer, B., and Dollé, P. (2009). Early mouse caudal development relies on crosstalk between retinoic acid, Shh and Fgf signalling pathways. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 665–676.

Rochette-Egly, C., and Germain, P. (2009). Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl. Recept. Signal.* *7*, e005.

- Romand, R., Kondo, T., Cammas, L., Hashino, E., and Dollé, P. (2008). Dynamic expression of the retinoic acid-synthesizing enzyme retinol dehydrogenase 10 (*rdh10*) in the developing mouse brain and sensory organs. *J. Comp. Neurol.* *508*, 879–892.
- Ronne, H., Ocklind, C., Wiman, K., Rask, L., Obrink, B., and Peterson, P.A. (1983). Ligand-dependent regulation of intracellular protein transport: effect of vitamin a on the secretion of the retinol-binding protein. *J. Cell Biol.* *96*, 907–910.
- Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M., and Giguère, V. (1991). Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* *5*, 1333–1344.
- Ruberte, E., Dolle, P., Chambon, P., and Morriss-Kay, G. (1991). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Dev. Camb. Engl.* *111*, 45–60.
- Ruberte, E., Friederich, V., Chambon, P., and Morriss-Kay, G. (1993). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. *Dev. Camb. Engl.* *118*, 267–282.

S

- Sahara, S., and O’Leary, D.D.M. (2009). *Fgf10* regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron* *63*, 48–62.
- Saillour, Y., Broix, L., Bruel-Jungerman, E., Lebrun, N., Muraca, G., Rucci, J., Poirier, K., Belvindrah, R., Francis, F., and Chelly, J. (2014). Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to *Tubb3* knockdown. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 1516–1526.
- Sakai, Y., Meno, C., Fujii, H., Nishino, J., Shiratori, H., Saijoh, Y., Rossant, J., and Hamada, H. (2001). The retinoic acid-inactivating enzyme *CYP26* is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev.* *15*, 213–225.
- Sandell, L.L., Sanderson, B.W., Moiseyev, G., Johnson, T., Mushegian, A., Young, K., Rey, J.-P., Ma, J., Staehling-Hampton, K., and Trainor, P.A. (2007). *RDH10* is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev.* *21*, 1113–1124.
- Santagati, F., Minoux, M., Ren, S.-Y., and Rijli, F.M. (2005). Temporal requirement of *Hoxa2* in cranial neural crest skeletal morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 4927–4936.
- Schneider, R.A., Hu, D., Rubenstein, J.L., Maden, M., and Helms, J.A. (2001). Local retinoid signaling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining *FGF8* and *SHH*. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 2755–2767.
- Schneider-Maunoury, S., Seitaniidou, T., Topilko, P., Vesque, C., Frain, M., Gilardi-Hebenstreit, P., and Charnay, P. (1997). [Role of the *Krox-20* gene in the development of rhombencephalon]. *Comptes Rendus Séances Société Biol. Ses Fil.* *191*, 91–94.
- Schuermans, C., and Guillemot, F. (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr. Opin. Neurobiol.* *12*, 26–34.

- Sessa, A., Mao, C.-A., Hadjantonakis, A.-K., Klein, W.H., and Broccoli, V. (2008). Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron* 60, 56–69.
- Shimamura, K., and Rubenstein, J.L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Dev. Camb. Engl.* 124, 2709–2718.
- Shimamura, K., Hartigan, D.J., Martinez, S., Puelles, L., and Rubenstein, J.L. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Dev. Camb. Engl.* 121, 3923–3933.
- Shimozono, S., Iimura, T., Kitaguchi, T., Higashijima, S.-I., and Miyawaki, A. (2013). Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development. *Nature* 496, 363–366.
- Siegenthaler, J.A., Ashique, A.M., Zarbali, K., Patterson, K.P., Hecht, J.H., Kane, M.A., Folias, A.E., Choe, Y., May, S.R., Kume, T., et al. (2009). Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell* 139, 597–609.
- Simeone, A., Avantsgiato, V., Moroni, M.C., Mavilio, F., Arra, C., Cotelli, F., Nigro, V., and Acampora, D. (1995). Retinoic acid induces stage-specific antero-posterior transformation of rostral central nervous system. *Mech. Dev.* 51, 83–98.
- Sirbu, I.O., Gresh, L., Barra, J., and Duester, G. (2005a). Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2611–2622.
- Sirbu, I.O., Gresh, L., Barra, J., and Duester, G. (2005b). Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2611–2622.
- Skromne, I., Thorsen, D., Hale, M., Prince, V.E., and Ho, R.K. (2007). Repression of the hindbrain developmental program by Cdx factors is required for the specification of the vertebrate spinal cord. *Dev. Camb. Engl.* 134, 2147–2158.
- Smith, D., Wagner, E., Koul, O., McCaffery, P., and Dräger, U.C. (2001). Retinoic acid synthesis for the developing telencephalon. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 11, 894–905.
- Sockanathan, S., Perlmann, T., and Jessell, T.M. (2003). Retinoid receptor signaling in postmitotic motor neurons regulates rostrocaudal positional identity and axonal projection pattern. *Neuron* 40, 97–111.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 21, 70–71.
- Spassky, N., Han, Y.-G., Aguilar, A., Strehl, L., Besse, L., Laclef, C., Ros, M.R., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Dev. Biol.* 317, 246–259.
- Stouffer, M.A., Golden, J.A., and Francis, F. (2016). Neuronal migration disorders: Focus on the cytoskeleton and epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 92, 18–45.
- Strate, I., Min, T.H., Iliev, D., and Pera, E.M. (2009). Retinol dehydrogenase 10 is a feedback regulator of retinoic acid signalling during axis formation and patterning of the central nervous system. *Dev. Camb. Engl.* 136, 461–472.
- Stricklett, P.K., Nelson, R.D., and Kohan, D.E. (1999). The Cre/loxP system and gene targeting in the kidney. *Am. J. Physiol.* 276, F651–657.

Stubbs, D., DeProto, J., Nie, K., Englund, C., Mahmud, I., Hevner, R., and Molnár, Z. (2009). Neurovascular congruence during cerebral cortical development. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 19 *Suppl 1*, i32-41.

Supèr, H., Soriano, E., and Uylings, H.B. (1998). The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 27, 40–64.

T

Tabata, H., and Nakajima, K. (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 9996–10001.

Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness, V.S. (1995). The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 6046–6057.

Tamamaki, N., Fujimori, K.E., and Takauji, R. (1997). Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 8313–8323.

Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., and Murakami, F. (2003). Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Dev. Camb. Engl.* 130, 5803–5813.

Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N., and Gruss, P. (2001). Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by *Svet1* gene expression. *Dev. Camb. Engl.* 128, 1983–1993.

Taverna, E., Götz, M., and Huttner, W.B. (2014). The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 465–502.

Theodosiou, M., Laudet, V., and Schubert, M. (2010). From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 1423–1445.

Thomas, P., and Beddington, R. (1996). Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr. Biol. CB* 6, 1487–1496.

Thornton, G.K., and Woods, C.G. (2009). Primary microcephaly: do all roads lead to Rome? *Trends Genet. TIG* 25, 501–510.

Tian, Y., James, S., Zuo, J., Fritsch, B., and Beisel, K.W. (2006). Conditional and inducible gene recombineering in the mouse inner ear. *Brain Res.* 1091, 243–254.

Tiberi, L., Vanderhaeghen, P., and van den Aemele, J. (2012). Cortical neurogenesis and morphogens: diversity of cues, sources and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 269–276.

Trainor, P.A., and Krumlauf, R. (2000). Patterning the cranial neural crest: Hinbrain segmentation and hox gene plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 116–124.

U

Uehara, M., Yashiro, K., Mamiya, S., Nishino, J., Chambon, P., Dolle, P., and Sakai, Y. (2007). CYP26A1 and CYP26C1 cooperatively regulate anterior-posterior patterning of the developing

brain and the production of migratory cranial neural crest cells in the mouse. *Dev. Biol.* 302, 399–411.

V

Vermot, J., Gallego Llamas, J., Fraulob, V., Niederreither, K., Chambon, P., and Dollé, P. (2005a). Retinoic acid controls the bilateral symmetry of somite formation in the mouse embryo. *Science* 308, 563–566.

Vermot, J., Schuhbauer, B., Le Mouellic, H., McCaffery, P., Garnier, J.-M., Hentsch, D., Brûlet, P., Niederreither, K., Chambon, P., Dollé, P., et al. (2005b). Retinaldehyde dehydrogenase 2 and Hoxc8 are required in the murine brachial spinal cord for the specification of Lim1+ motoneurons and the correct distribution of Islet1+ motoneurons. *Dev. Camb. Engl.* 132, 1611–1621.

Vermot, J., Garnier, J.-M., Dierich, A., Niederreither, K., Harvey, R.P., Chambon, P., and Dollé, P. (2006). Conditional (loxP-flanked) allele for the gene encoding the retinoic acid-synthesizing enzyme retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2). *Genes. N. Y. N* 2000 44, 155–158.

Viti, J., Gulacsi, A., and Lillien, L. (2003). Wnt regulation of progenitor maturation in the cortex depends on Shh or fibroblast growth factor 2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5919–5927.

Volvvert, M.-L., Prévot, P.-P., Close, P., Laguesse, S., Pirotte, S., Hemphill, J., Rogister, F., Kruzy, N., Sacheli, R., Moonen, G., et al. (2014). MicroRNA targeting of CoREST controls polarization of migrating cortical neurons. *Cell Rep.* 7, 1168–1183.

Vooijs, M., Jonkers, J., and Berns, A. (2001). A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep.* 2, 292–297.

W

Ward, S.J., Chambon, P., Ong, D.E., and Båvik, C. (1997). A retinol-binding protein receptor-mediated mechanism for uptake of vitamin A to postimplantation rat embryos. *Biol. Reprod.* 57, 751–755.

Warkany, J., and Schraffenberger, E. (1946). Congenital malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency; defects of the eye. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1929 35, 150–169.

Wendling, O., Ghyselinck, N.B., Chambon, P., and Mark, M. (2001). Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning. *Dev. Camb. Engl.* 128, 2031–2038.

White, J.C., Highland, M., Kaiser, M., and Clagett-Dame, M. (2000). Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo. *Dev. Biol.* 220, 263–284.

White, R.J., Nie, Q., Lander, A.D., and Schilling, T.F. (2007). Complex regulation of *cyp26a1* creates a robust retinoic acid gradient in the zebrafish embryo. *PLoS Biol.* 5, e304.

Wichterle, H., Alvarez-Dolado, M., Erskine, L., and Alvarez-Buylla, A. (2003). Permissive corridor and diffusible gradients direct medial ganglionic eminence cell migration to the neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 727–732.

Wilkinson, G., Dennis, D., and Schuurmans, C. (2013). Proneural genes in neocortical development. *Neuroscience* 253, 256–273.

Wilson, J.G., Roth, C.B., and Warkany, J. (1953). An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am. J. Anat.* *92*, 189–217.

Wilson, L., Gale, E., Chambers, D., and Maden, M. (2004). Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord. *Dev. Biol.* *269*, 433–446.

Wonders, C.P., and Anderson, S.A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 687–696.

Wood, H. (2003). The long and the short of it. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 7–7.

Wright, A.F., Chakarova, C.F., Abd El-Aziz, M.M., and Bhattacharya, S.S. (2010). Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 273–284.

Y

Yagishita, N., Yamamoto, Y., Yoshizawa, T., Sekine, K., Uematsu, Y., Murayama, H., Nagai, Y., Krezel, W., Chambon, P., Matsumoto, T., et al. (2001). Aberrant growth plate development in VDR/RXR gamma double null mutant mice. *Endocrinology* *142*, 5332–5341.

Yamamoto, M., McCaffery, P., and Dräger, U.C. (1996). Influence of the choroid plexus on cerebellar development: analysis of retinoic acid synthesis. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *93*, 182–190.

Z

Zhang, J., Smith, D., Yamamoto, M., Ma, L., and McCaffery, P. (2003). The meninges is a source of retinoic acid for the late-developing hindbrain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 7610–7620.

Zhang, L., Song, N.-N., Chen, J.-Y., Huang, Y., Li, H., and Ding, Y.-Q. (2012). *Satb2* is required for dendritic arborization and soma spacing in mouse cerebral cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *22*, 1510–1519.

ANNEXES

LISTE DES MANIFESTATIONS

- septembre 2014*
- **Présentation orale** au congrès "Tri-Regional Stem Cell and Developmental Biology meeting" - Biozentrum, Bâle
-

- avril 2016*
- **Présentation poster** au "Quatrièmes Journées Scientifiques de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg" (FMTS) –Faculté Dentaire, Strasbourg-

- octobre 2015*
- **Présentation poster** au "Joint Symposium IGBMC/Freiburg : Animal Models in Biomedical Research" – IGBMC, Illkirch-

- mars 2015*
- **Présentation poster** au "Joint Meeting of the German and French Societies of Developmental Biologists" - FAU, Nüremberg-
-

- juin 2014*
- **Participante** à la manifestation "École de l'innovation thérapeutique" organisée par Leem, ARIIS, Aviesan, Mis'apprentissage et l'Inserm –Paris-

- mai 2014*
- **Participante** au congrès de la "4^{ème} journée des Récepteurs Nucléaires" -IGBMC, Illkirch -

- septembre 2012*
- **Participante** au workshop EMBO "Retinoids"-IGBMC, Illkirch -

- février 2012*
- **Participante** au workshop "Infra-Frontier – Phenome –Frontier" : acquisition de notions théoriques et pratiques destinées à l'étude du développement de la souris -ICS, Illkirch -

Fonction du gène *Raldh2* au cours de la neurogenèse corticale chez la souris

Carole Haushalter, équipe du Dr. Pascal Dollé, encadrant: Dr. Muriel Rhinn, IGBMC, CNRS/INSERM/UdS, France

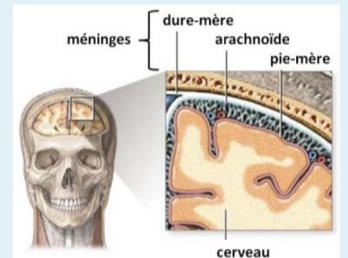
1. Introduction

L'acide rétinoïque (AR) est une molécule lipophile et diffusible qui agit comme ligand de récepteurs nucléaires, contrôlant ainsi de nombreuses étapes de la morphogenèse et de l'organogenèse. Les enzymes rétinaldéhyde déshydrogénases (**RALDH 1, 2, 3**) synthétisent l'AR à partir de la vitamine A. Nous étudions le rôle de l'AR dans le développement du télencéphale de la souris. La région dorsale du télencéphale donne naissance **au cortex cérébral**.

2. Objectif et Méthodes

Le gène *Raldh2* est exprimé dans les cellules des futures méninges à partir du jour embryonnaire 13 (E13). L'AR produit par RALDH2 pourrait agir en diffusant des méninges vers les couches neuronales externes du télencéphale (cortex). La mutation nulle *Raldh2*^{-/-} est létale à E9.5. Nous allons générer **des inactivations géniques somatiques** (tissu-spécifiques ou inducibles par le tamoxifène) afin d'étudier la **fonction de l'AR produit par les méninges**.

Les méninges chez l'Homme (coupe coronale du crâne)



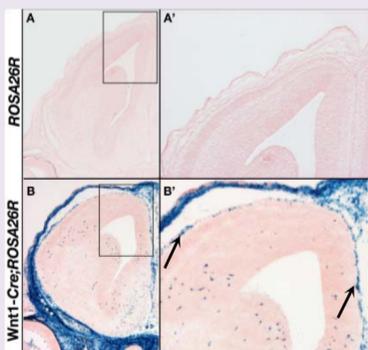
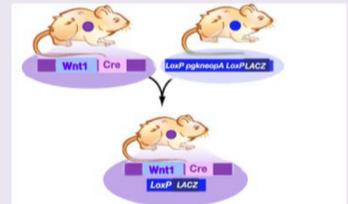
3. Outils expérimentaux

- Mutation conditionnelle de *Raldh2* (*Raldh2*^{flx/flx}) (1)
- Lignée *Wnt1-Cre* (2): excision **tissu-spécifique** dans les cellules précurseurs des méninges
- Lignée *CMV-CreER^{T2}* (3): excision **ubiquitaire**, inducible par injections de tamoxifène
- Lignée rapportrice *ROSA26R* (4): « visualiser » l'action de la recombinase Cre: activité β-galactosidase après excision dans le gène rapporteur

4. Validation des outils

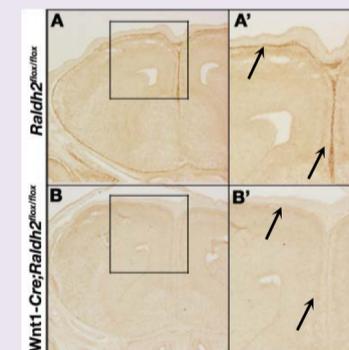
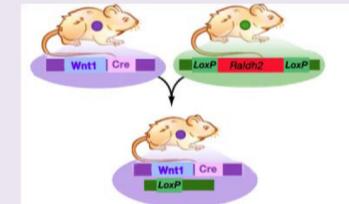
- Perte de fonction **tissu-spécifique**: lignée *Wnt1-Cre*

Croisement de mâles *Wnt1-Cre* avec des femelles *ROSA26R*



Révélation de l'activité β-gal (bleu): nous observons un marquage bleu dans les méninges (B, flèches B'); la recombinase Cre produit une excision spécifique. Il n'y a pas eu excision dans le contrôle (A).

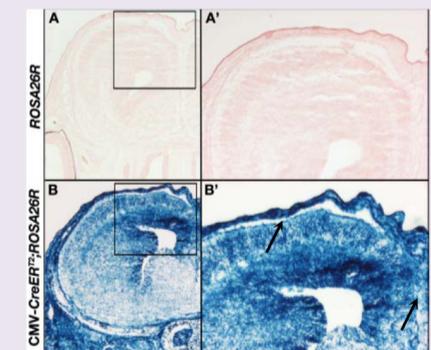
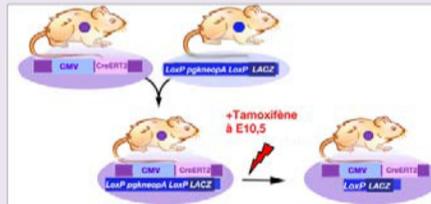
Croisement de mâles *Wnt1-Cre* avec des femelles *Raldh2*^{flx/flx}



Immunodétection de RALDH2 (brun): la protéine RALDH2 est absente dans les méninges (B, flèches en B'). *Raldh2* a été excisé dans le mutant. La protéine RALDH2 est présente dans le contrôle (A). Il n'y a pas eu excision (flèches en A').

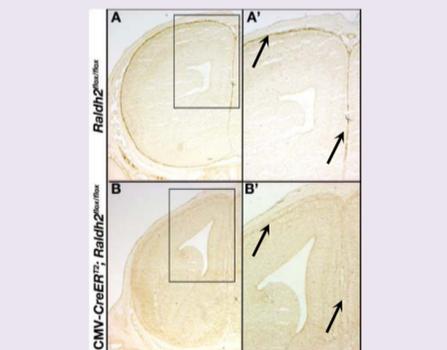
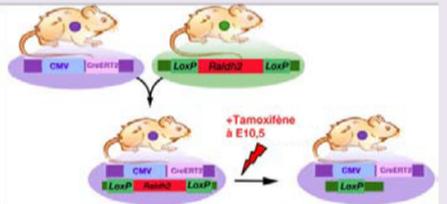
- Perte de fonction **inductible**: lignée *CMV-CreER^{T2}*

Croisement de mâles *CMV-CreER^{T2}* avec des femelles *ROSA26R*



Révélation de l'activité β-gal (bleu): nous observons un marquage bleu ubiquitaire y compris dans les méninges (B, flèches en B'); la recombinase Cre produit une excision spécifique. Il n'y a pas eu excision dans le contrôle (A).

Croisement de mâles *CMV-CreER^{T2}* avec des femelles *Raldh2*^{flx/flx}



Immunodétection de RALDH2 (brun): la protéine RALDH2 est absente dans les méninges (B, flèches en B'). *Raldh2* a été excisé dans le mutant. La protéine RALDH2 est présente dans le contrôle (A). Il n'y a pas eu excision (flèches en A').

La lignée *Wnt1-Cre* et la lignée *CMV-CreER^{T2}* permettent de générer une perte de fonction de *Raldh2* dans les méninges.

5. Conclusion et Perspectives

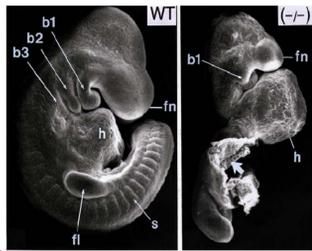
Nos outils génétiques permettent d'invalider la synthèse d'AR au niveau des méninges. **Nous étudierons si cette perte de fonction affecte le développement du cortex cérébral** en analysant la prolifération cellulaire, les populations progénitrices, l'organisation corticale et la différenciation neuronale.

Carole Haushalter, Brigitte Schuhbaur, Valérie Fraulob, Pascal Dollé and Muriel Rhinn

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/Uds, UMR 7104, Strasbourg, France

Introduction

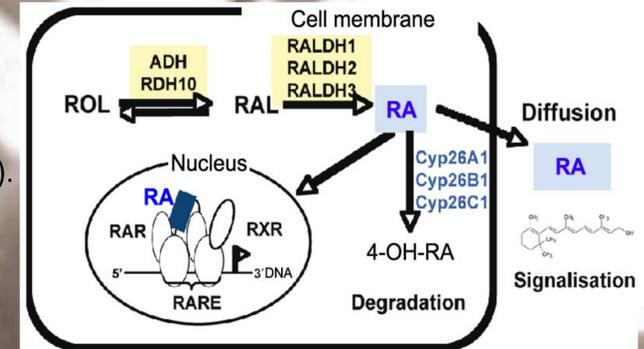
Retinoic acid (RA), an active vitamin A (retinol) derivative, is a signaling molecule involved in many developmental events in vertebrates. RA is a small lipophilic molecule which acts by binding to nuclear receptor (the RA receptors RAR α,β,γ) to control the transcriptional activity of target genes. RA distribution is tightly controlled within embryonic tissues. This is achieved through the stage- and tissue-specific expression of enzymes involved in its synthesis from retinol and/or beta-carotene (RALDHs) and its metabolism into less or non-active compounds (CYP26s).



Targeted null mutation of the *Raldh2* gene is embryonic lethal at E9.5.

(Niederreither et al., 1999)

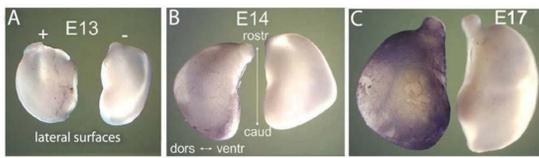
We have shown that the RALDH2 enzyme is responsible for RA synthesis in the mouse anterior neural tissue and *Raldh2*^{-/-} mutants show defective forebrain morphogenesis (truncated forebrain region and frontonasal region).



ADH: alcohol dehydrogenases; RDH10: retinol dehydrogenase
RALDH: retinaldehyde dehydrogenases; Cyp26: cytochrome P450 enzymes

Background and hypothesis

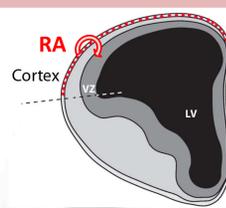
At E13.5, *Raldh2* starts to be expressed in the meninges



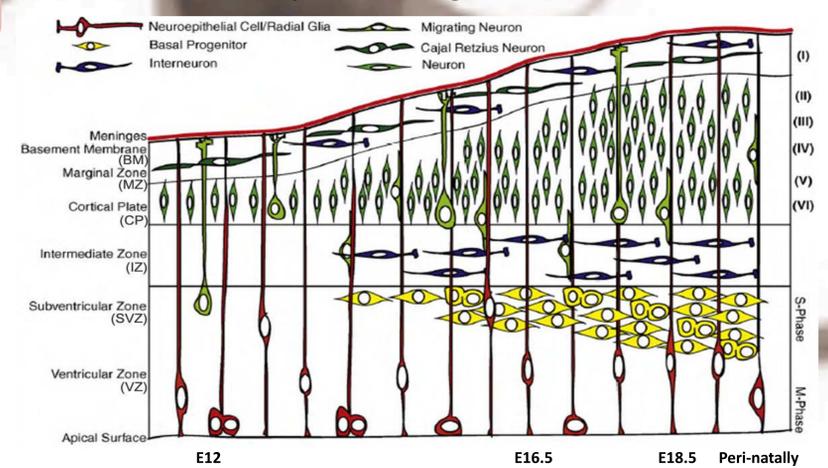
(Smith et al., 2001)



Does RA produced by the meninges play a role in cortical neurogenesis ?



Cortical development during time

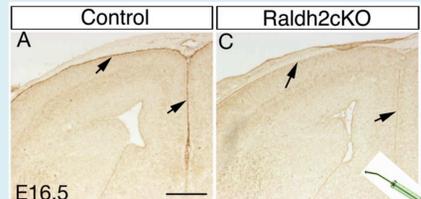


(Adapted from Johansson et al., 2010)

Experimental strategy

We have developed an inducible, ubiquitous and temporally controlled inactivation of *Raldh2* using the CMV-CreER^{T2} (1) line crossed with the *Raldh2*^{flx/flx} (2) line.

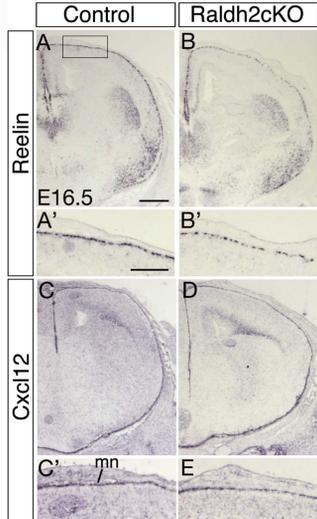
(1) Santagati et al., 2006; (2) Vermot et al., 2006



***Raldh2* gene excision**
Raldh2 immunostaining showing the efficiency of Cre excision in a brain section

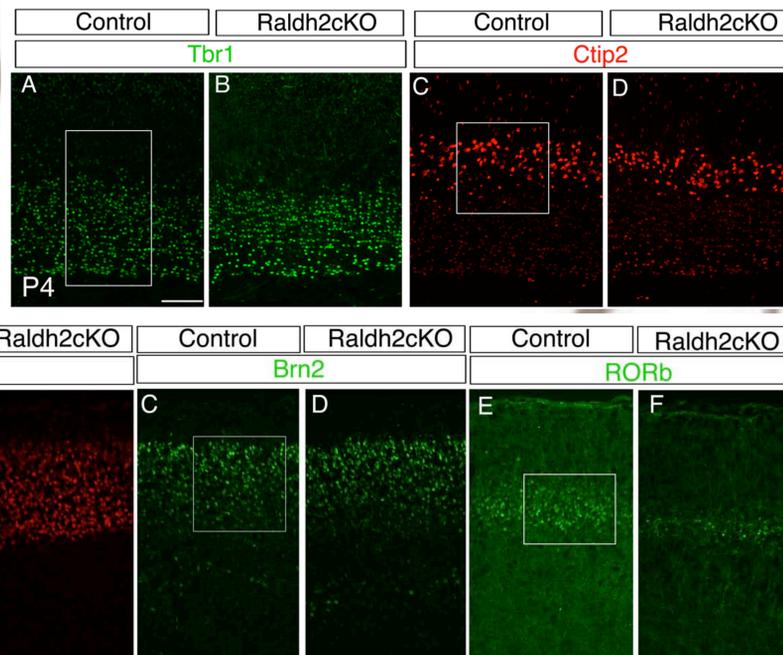
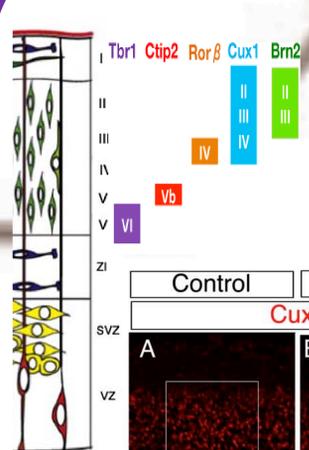
Tamoxifen: E10.5 (5mg)

Integrity and functionality of meninges

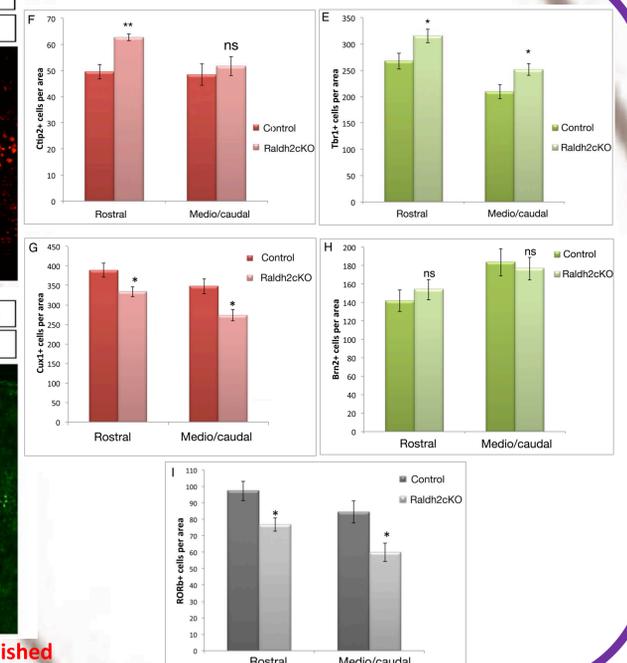


In the absence of *Raldh2*, the meninges are well formed and functional

Cortical layering at P4

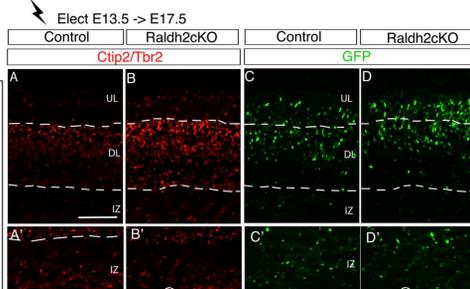
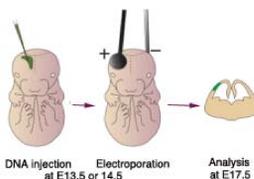


In the absence of RA, more neurons in the deeper layers are formed whereas layer IV neurons are diminished

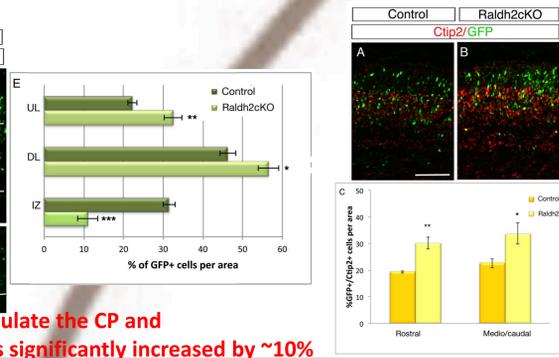


Migration of newly born neurons

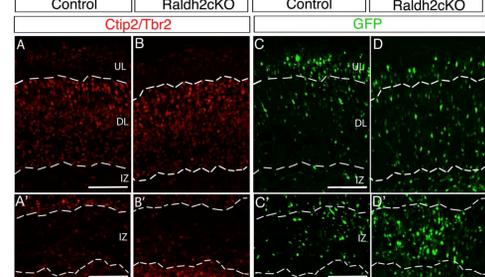
In utero electroporation



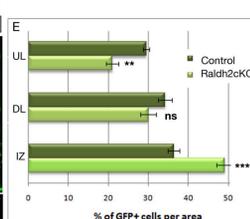
In the absence of RA, more neurons leave the IZ to populate the CP and the percentage of GFP-positive cells expressing Ctip2 is significantly increased by ~10%



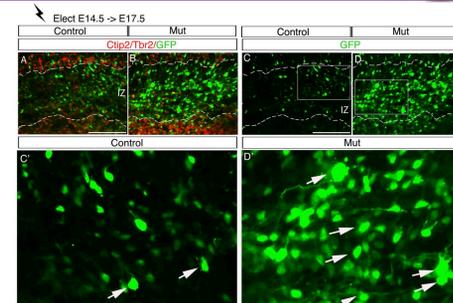
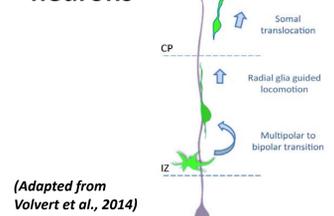
Elect E14.5 -> E17.5



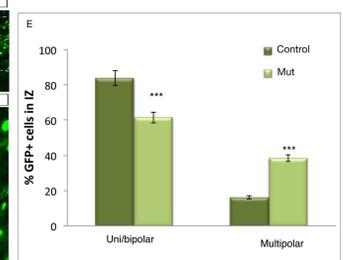
In the absence of RA, upper layer neurons stall in the IZ



Migration of newly born neurons



In the absence of RA, the multipolar to bipolar transition is impaired: multipolar cells accumulate in the IZ



Summary

Our results show functions of RA produced by the meninges and acting within the cortex:

- RA is required for the proper formation of the cortical neuronal layers.
- RA is involved in the migration of newly born neurons, mainly those going to layer IV.
- In absence of RA, multipolar cells accumulate in the IZ.

Rôle de l'acide rétinoïque dans la neurogenèse corticale chez la souris

Résumé

L'acide rétinoïque (AR), dérivé actif de la vitamine A (rétinol) circulante, est une petite molécule lipophile contrôlant divers aspects de la mise en place du système nerveux central des vertébrés. L'AR influence notamment le développement précoce du cerveau antérieur, où il contrôle la prolifération et la survie des cellules progénitrices dans l'épithélium neural prosencéphalique. Le développement neural est un processus qui s'articule en trois grandes étapes : la phase d'expansion latérale (E9,5-E10,5 chez la souris), la phase de neurogenèse (E11,5-stades périnataux) et la phase de gliogenèse (stades périnataux-adulte). Nous avons montré que l'AR produit par les méninges à partir de E13 influence la spécification et la migration neuronale au cours de la phase de neurogenèse. De plus, nos travaux suggèrent un rôle plus précoce de l'AR pour la formation et la prolifération des populations progénitrices et neuronales avant et au début de la phase de neurogenèse. Une combinaison de signaux intrinsèques et extrinsèques contrôle divers aspects du développement neural cortical. Nos travaux placent l'AR parmi ces facteurs modulateurs de la neurogenèse corticale.

Mots-clés : acide rétinoïque, neurogenèse, cortex cérébral, migration neuronale, spécification et prolifération cellulaire

Summary

Retinoic acid (RA), an active vitamin A (retinol) metabolite, is a small lipophilic molecule controlling numerous events during central nervous system development in vertebrates. RA is involved in early forebrain development by controlling cell proliferation and survival in the prosencephalic neuroepithelium. Neural development is a process progressing through three key steps: a phase of lateral expansion (E9.5-E10.5 in the mouse), a phase of neurogenesis (E11.5-perinatal stages) and a gliogenic phase (perinatal stages-adult). My work has shown that RA produced by the developing meninges from E13 influences neuronal specification and migration during the phase of neurogenesis. Moreover, our data suggest an earlier role of RA during the production and proliferation of progenitor and neuronal populations, before and at the onset of the neurogenic phase. A combination of extrinsic and intrinsic signals is required to orchestrate the various aspects of cortical development. RA is likely to be one of such extrinsic factors modulating cortical neurogenesis.

Key words: retinoic acid, neurogenesis, cerebral cortex, neuronal migration, cell specification and proliferation