

# Mécanismes de latéralisation de l'épithalamus chez la lamproie et la roussette

Ronan Lagadec

#### ▶ To cite this version:

Ronan Lagadec. Mécanismes de latéralisation de l'épithalamus chez la lamproie et la roussette. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT: 2015PA066423. tel-01592395

#### HAL Id: tel-01592395 https://theses.hal.science/tel-01592395

Submitted on 24 Sep 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.







### **THÈSE**

pour obtenir le titre de

#### Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

École doctorale Complexité du Vivant

# Mécanismes de latéralisation de l'épithalamus chez la lamproie et la roussette

Présentée par

### **Ronan LAGADEC**

Thèse de doctorat en Évolution et Développement

Sous la direction de Dr. Sylvie Mazan

Soutenue publiquement le 22 Septembre 2015 devant un jury composé de :

Pr. Hervé LE GUYADER Président

Dr. Patrick BLADER Rapporteur

Dr. Stéphane NOSELLI Rapporteur

Dr. Patrick LAURENTI Examinateur

Dr. Sylvie MAZAN Directrice de thèse

 $\vec{A}$  mes parents,

#### Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Sylvie Mazan qui m'a fait confiance et qui m'a accueilli dans son équipe pour y effectuer mon doctorat. J'ai beaucoup appris sur le plan scientifique, ainsi que sur le plan humain. Ces années dans son laboratoire m'ont apporté, j'en suis sûr, tous les éléments pour devenir un bon scientifique.

Je souhaite également remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de venir jusqu'à Roscoff, Stéphane Noselli et Patrick Blader d'avoir pris le temps de critiquer et de juger mes travaux de thèse ainsi que Patrick Laurenti pour ses analyses. J'aimerais adresser un remerciement spécial à Hervé Le Guyader, qui de par ses interventions auprès du grand public puis à l'université, m'a convaincu de me lancer dans cette voie passionnante qu'est la recherche et qui me fait l'honneur de présider ce jury. Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de thèse, Sylvie Schneider-Maunoury et Franck Bourrat, qui m'ont prodigué de précieux conseils.

Ces années n'auraient pas été aussi agréables sans toutes les personnes que j'ai eu la chance de côtoyer dans le laboratoire. Alors merci à Agnès, Laurent, Hélène, Diane, Christophe et Anis pour votre bonne humeur, votre aide et votre gentillesse. Un grand merci à Benoit qui m'a bien mâché le travail niveau manip et qui m'a montré la voie. Merci aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer et qui m'ont beaucoup appris en retour : Marine, Bérengère et Anne. Merci aussi aux autres stagiaires qui ont apporté fraicheur et bonne humeur dans le labo : Jean-François, Laurent, Baptiste, Emilie, Thomas, Antoine, Charline, Léa et Nicolas.

Je souhaite remercier les collaborateurs passés dans le laboratoire, ce fut très enrichissant, Odete Gonçalves, Ben Steventon, Gabriel Santos Durán et Sam Vandenplas mais aussi Nadine Peyriéras. Je veux remercier nos collaborateurs espagnols: Isabel Rodriguez-Moldes, Maria Celina Rodicio, Eva Candal et rennais: Guillaume Evanno et Quentin Rougemont.

Je voudrais également remercier Fabienne Corre-Menguy et tous les membres du RHS de l'UPMC pour leur dévouement et toute l'aide dont j'ai pu bénéficier pendant mes années estudiantines. Je souhaiterais aussi remercier Gaëlle Boutin de nous avoir chouchoutés et beaucoup aidés (je pense pouvoir parler au nom de tous les étudiants de l'ED392 « Diversité du Vivant ») et d'avoir continué à m'aider dans mes démarches administratives même après la disparition de notre regrettée ED392.

Un grand merci à tous les membres de la Station Biologique de Roscoff et à son directeur Bernard Kloareg. Plus particulièrement, je souhaite remercier Sébastien qui s'est beaucoup démené pour nous fournir des œufs de bonne qualité, Ronan, Gaëtan, Régis et plus généralement l'équipe M3. Merci à Sophie Le Panse pour son aide en microscopie. Merci aux ex-membres de l'UMR7150 pour leur accueil, merci à Patrick Cormier sans qui je n'aurais peut-être jamais envisagé de venir à Roscoff, à Stéphane Égée parce que Stéphane Égée... et à tous les autres membres de l'unité que je ne peux pas citer. Merci à Bénédicte Charrier et Bernard Billoud. Merci à tout le personnel qui nous permet de travailler dans de bonnes conditions et dans la sérénité tous les jours, Brigitte et Christine à l'accueil, Alain, Martine à la laverie, à Franck et tout le personnel du Gulf Stream, Léna et l'administration, les services info, technique et de ménage ainsi que les gardiens, en particulier Denis, sans qui, les nuits au labo ne seraient pas pareilles!

Merci à toutes les personnes incroyables que j'ai pu côtoyer à la station et en dehors, Madhi, JB, Raphaël, Aliou, Camille, Karine, Anaïs, Romain, Benoit, Élodie, Zofia, Frédo, les footeux du mercredi et toutes celles que je n'ai pas pu citer.

Je souhaite aussi remercier quelques personnes qui ont eu une grande influence sur mon parcours universitaire, Isabelle Arnulf et son équipe sans qui je ne serais pas allé si loin; Nicolas Rabet, mon premier maitre de stage en laboratoire, qui m'a donné confiance et l'envie de faire de l'évo-dévo; Éric Quéinnec pour ses nombreux conseils.

Enfin, je souhaite remercier mes amis qui sont probablement ceux qui ont joué le rôle le plus important en me supportant toutes ces années : Moïses, Aliénor, Max, Claire, Antoine, Lorenzo, MC et tous les autres. Je ne peux pas retranscrire tous mes sentiments à votre égard ici alors je vous dis juste un grand MERCI.

Plus que merci à ma famille, à mes parents et ma sœur qui en ont bien « bavé » avec moi mais qui m'ont soutenu de toutes les façons possibles pendant toutes ces années, à Karim, à mes grandmères, à mes cousines et cousins, mes tantes et mes oncles.

Et pour finir, je souhaite remercier Marie, toujours là pour moi et grâce à qui j'ai passé de merveilleuses années à Roscoff. Sans elle, ce doctorat et ma vie (tout court) n'auraient pas été si plaisants.

PS: Je me dois de remercier le Saint-Hilaire, le Petit Bonheur et l'Alba qui m'ont fourni tous les outils pour réussir ce pari un peu fou qu'est le doctorat.

### **TABLE DES MATIERES**

Remerciements	4
TABLE DES MATIERES	6
INTRODUCTION	10
1. Les asymétries du système nerveux chez les bilatériens : Le modèle épithalamus	11
1.1. Les asymétries du système nerveux chez les bilatériens	11
1.2. L'épithalamus : aspects morphologiques et fonctionnels	17
1.2.1. Aspects morphologiques	17
a) Le complexe pinéal	18
b) Le complexe habénulaire	19
1.2.2. Les fonctions de l'épithalamus	22
a) Rôles du complexe pinéal	22
b) Rôle des habenulæ	23
c) Régulations comportementales par des systèmes neuromédiateurs	24
1.3. Les asymétries épithalamiques chez les vertébrés	27
1.3.1. Les asymétries épithalamiques chez le poisson-zèbre	27
a) Les asymétries habénulaires	27
b) Les asymétries du complexe pinéal	31
1.3.2. Des asymétries retrouvées dans tous les grands groupes de vertébrés	32
a) Asymétries morphologiques	32
b) Asymétries moléculaires	36
1.3.3. Fonctions des asymétries habénulaires	40
2. Mécanismes de formation des asymétries épithalamiques: le modèle poisson-zèbre	45
2.1. Spécification de l'épithalamus	46
2.1.1. Spécification des habenulæ	46
2.1.2. Spécification du complexe pinéal	50

2.2. Mécanismes d'établissement des asymétries chez le poisson-zèbre	54
2.2.1. Les asymétries précoces : un double rôle pour la voie Nodal	54
a) Une expression asymétrique précoce de la voie Nodal dans le diencéphale	dorsal 54
b) Rôle de la voie Nodal dans la directionnalité des asymétries épithalamique	es56
c) Rôle de la voie Nodal dans la neurogenèse asymétrique précoce	57
2.2.2. Rôle clé de la parapinéale et de sa migration dans l'établissement des épithalamiques	-
a) Une corrélation entre la formation des asymétries de la parapinéale et de	
b) Des asymétries habénulaires dépendantes de la parapinéale et de sa migra	ation62
c) Influence de la taille de la parapinéale : des interactions réciproques en Nodal et sa cible <i>pitx2c</i>	
2.3. Morphogenèse asymétrique des habenulæ	68
2.3.1. Une régulation asymétrique de la neurogenèse et des choix de destin cellu les habenulæ gauche et droite	
a) Une neurogenèse et des choix de destins cellulaires asymétriques	68
b) Implication de Notch dans la spécification des sous-domaines habénulaire	es70
c) Implication de la voie Wnt	72
d) Implication du réticulum endoplasmique	73
2.3.2. Formation asymétrique du neuropile	74
a) Rôle de Ulk2	75
b) Rôle de Daam1a	76
3. Évolution des mécanismes de latéralisation de l'épithalamus	78
3.1. Grandes caractéristiques de la lamproie et de la roussette	78
3.1.1. Positions phylogénétiques	78
3.1.2. Caractéristiques biologiques	79
a) Cycle de vie de la lamproie	79
b) Cycle de vie de la roussette	81
3.1.3. Disponibilité des ressources biologiques	82
3.2. Des espèces modèles établies en évo-dévo	83

3.2.1. Outils moléculaires et fonctionnels chez la lamproie	83
a) Données génomiques	83
b) Avancées expérimentales	84
3.2.2. Outils moléculaires et fonctionnels chez la roussette	85
a) Données génomiques	85
b) Avancées expérimentales	86
3.2.3. Utilisation de la lamproie et de la roussette en évo-dévo	87
3.3. Contexte et objectifs de la thèse	88
CHAPITRE I - Rôle de la voie Nodal dans l'établissement des asymétries de l'épitha	
1. Contexte et principaux résultats	90
2. Publication n°1: The ancestral role of nodal signalling in breaking LR symmetry	in the
vertebrate forebrain	93
Matériels Supplémentaires	104
CHAPITRE II - Caractérisation des asymétries habénulaires embryonnaires dépend	dantes
de Nodal chez la petite roussette ( <i>Scyliorhinus canicula</i> )	118
1. Introduction	119
2. Manuscrit en préparation	121
CHAPITRE III - Les asymétries de la neurogenèse dans les habenulæ de rous	sette
Résultats complémentaires	156
1. Introduction	157
2. Résultats et discussion	159
2.1. Asymétries précoces de la neurogenèse	159
2.2. Mise en évidence d'une asymétrie précoce de la neurogenèse chez la roussette	162
2.3. Caractérisation moléculaire des habenulæ de roussette au stade 32	167
3. Conclusion	170
DISCUSSION GÉNÉRALE	172
1 Intérêt d'une étude des asymétries énithalamiques chez la roussette et la lamproje	172

1.1. Apports en termes évolutifs17	'3
Quel rôle ancestral pour la parapinéale : une remise en perspective des mécanisme décrits chez le poisson-zèbre	
Une latéralité des asymétries épithalamiques conservée à l'échelle des vertébrés 17	′4
De nouvelles hypothèses évolutives et une remise en perspective de la notion d modèle17	
1.2. Des apports en termes d'interprétation mécanistique	6'
Quelle base moléculaire pour le découplage entre les latéralités des asymétries moléculaires et celle de taille ?	
Quel degré de conservation entre les programmes respectivement contrôlés par Noda chez la lamproie et la roussette et par la parapinéale chez le poisson-zèbre?17	
2. Perspectives17	'8
2.1. Nodal, au centre d'un programme génétique essentiel	'8
2.2. Stratégies expérimentales	'9
Modalités de la neurogenèse chez la roussette et la lamproie17	'9
Approches transcriptomiques18	0
Approches fonctionnelles	1
Rôles des asymétries habénulaires dans le contrôle du comportement18	12
2.3. Impacts attendus18	32
ANNEXES18	3
1. Table de développement de la petite roussette Scyliorhinus canicula 18	34
2. Table de développement de la lamproie18	7
TABLE DES FIGURES19	0
RÉFÉRENCES19	4
Summary21	5
Résumé 21	6

### **INTRODUCTION**

# 1. Les asymétries du système nerveux chez les bilatériens : Le modèle épithalamus

#### 1.1. Les asymétries du système nerveux chez les bilatériens

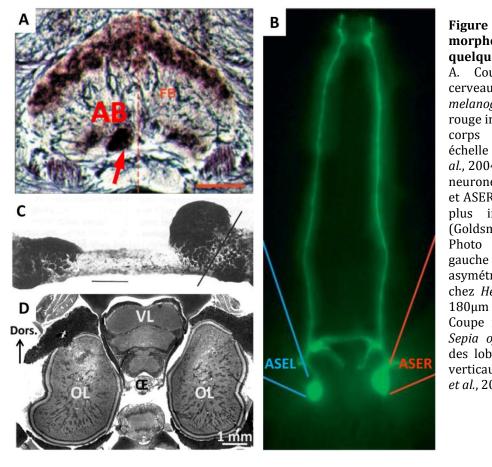
Les asymétries du système nerveux central (SNC) sont étudiées chez l'humain depuis les travaux de Broca, qui a déterminé au  $19^{\text{ème}}$  siècle, que le siège du langage articulé se situait dans l'hémisphère cérébral gauche (Berker *et al.*, 1986). Peu de travaux ont été réalisés chez les autres espèces de bilatériens avant ces dernières décennies, l'asymétrie ayant été longtemps pensée comme une marque de la supériorité cognitive de l'*Homo sapiens* et par le fait qu'elle ne soit pas évidente à voir chez des animaux à symétrie bilatérale. Cependant, des asymétries morphologiques et moléculaires du CNS ont été détectées, non seulement chez un vaste spectre de chordés mais également chez les deux grands phyla de protostomiens : les ecdysozoaires et les lophotrochozoaires (Figure 1) (Frasnelli *et al.*, 2012 ; Coutelis *et al.*, 2014). Les conséquences fonctionnelles de ces asymétries ont également été décrites chez quelques espèces qui se situent dans un large spectre phylogénétique. Elles apparaissent impliquées dans la latéralisation de processus adaptatifs complexes, tels que le traitement de l'information sensorielle, des processus cognitifs ou le contrôle de comportements latéralisés.

					Asymétries du CNS	Latéralisations comportementales liées
	Pro	L		D. melanogaster (Hexapodes)	Le corps asymétrique AB situé à droite chez 92.4% des individus (Pascual <i>et al.</i> , 2004)	Rôle dans la formation de la mémoire à long terme
	otost		Ecdysozoaires	<i>C. elegans</i> (Nématodes)	Récepteurs gustatifs des neurones ASE (Goldsmith, 2010)	Discrimination entre différents ions et sels (Ortiz <i>et al.</i> , 2009)
B	omie	-		Helix aspersa (Gastéropodes)	Lobe du mésocérébron plus gros dans le ganglion cérébral droit (Chase, 1986 ; 2000)	Biais vers la droite pendant l'accouplement
	ns	רס	Spirotrocriosogiles	Sepia officinalis (Céphalopodes)	Lobe optique et lobe vertical droit (Jozet-Alves <i>et al.</i> , 2012)	Plus les lobes, optique et vertical, droits sont gros et plus il y a un biais à tourner vers la gauche
érie	De			<i>Danio rerio</i> (Téléostéens)	Habénula gauche plus grosse que l'habénula droite et migration de la parapinéale vers la gauche (95% des individus) (Concha <i>et al.</i> , 2000)	Latéralisation de la réponse à la lumière (habénula droite) et olfactive (habénula droite) (Dréosti <i>et al.</i> , 2014)
NS	eutéro			Gallus gallus (Oiseaux)	Système tectofugal : Différences de types cellulaires et de projections neuronales entre les tectum optiques gauche et droit	Traitement des stimuli extérieurs répartis entre les hémisphères droit et gauche (Rev in Rogers, 2008)
	stomie	Amniote	,	Mus musculus (Rongeurs)	Répartition asymétrique des sous-unités £2 des récepteurs NMDA dans l'hippocampe (Kawakami <i>et al.</i> ,2003)	Rôle sur l'acquisition de références spatiales et sur la mémoire de travail (Goto <i>et al.</i> , 2010)
	ens	S		Homo sapiens (Primates)	Tailles des aires de Broca et de Wernicke plus importantes dans l'hémisphère gauche (Toga & Thompson, 2005)	Traitement par l'hémisphère gauche des informations liées au langage (Amunts <i>et al.</i> , 1999 ; Sun & Walsh, 2006)

**Figure 1: Exemples de bilatériens présentant des asymétries du SNC** corrélées à des fonctions cognitives ou comportementales latéralisées. La position des espèces citées dans la classification phylogénétique des bilatériens est indiquée sur la gauche.

Ainsi, les deux modèles génétiques phares des protostomiens, la drosophile *Drosophila* melanogaster et le nématode *Caenorhabditis elegans* (tous deux membres des ecdysozoaires) ont

fait l'objet d'études détaillées concernant les mécanismes de formation des asymétries et de leurs conséquences fonctionnelles. Chez D. melanogaster, si les études mécanistiques se concentrent principalement sur l'asymétrie des intestins et du spermiducte, il existe aussi une structure latéralisée située dans l'hémisphère droit du complexe central, le corps asymétrique (AB) (Figure 2 A). Un lien a été suggéré entre son positionnement asymétrique et l'apprentissage. Chez une minorité d'individus sauvages (7,6%), l'AB est bilatérale et les tests de mémorisation à long terme montrent une baisse significative de leur capacité de mémorisation comparée aux individus asymétriques, la mémorisation à court terme n'étant, elle, pas affectée (Pascual et al., 2004). Chez le nématode C. elegans, une latéralisation fonctionnelle liée à l'asymétrie d'une paire de neurones bilatéraux nommés ASEL et ASER (pour Amphid Single cilliary Ending gauche et droite respectivement) a été bien démontrée (Hobert, 2014). Ces deux neurones gustatifs diffèrent en taille, l'ASER étant 30% plus gros que l'ASEL (Figure 2 B) (Goldsmith et al., 2010). Une expression latéralisée de plusieurs guanylyl cyclases permet de discriminer spécifiquement certaines molécules ou ions pour adopter le comportement adéquat (Yu et al., 1997; Ortiz et al., 2009). Des asymétries morphologiques et fonctionnelles du système nerveux ont également été mises en évidence chez les lophotrochozoaires. Avec sa coquille spiralée, l'escargot est l'une des espèces asymétriques les plus emblématiques. Cela dit, on retrouve aussi une asymétrie au niveau des ganglions cérébraux chez le gastéropode Helix aspersa. Le lobe droit du mésocérébron diffère de celui de gauche par sa taille globale plus importante, par son nombre de neurones (plus important de 23%) ainsi que par la taille de ses neurones (plus gros à droite) (Figure 2 C). Ces asymétries ont été corrélées à des comportements d'accouplements latéralisés (Chase, 1986; Chase, 2000). Chez les céphalopodes, autres représentants des lophotrochozoaires, la seiche Sepia officinalis présente une différence de taille plus ou moins marquée des lobes optiques et verticaux (supérieurs à droite) (Figure 2 D). Avec des expériences dans un tube en T, Jozet-Alvès et al. ont montré une corrélation entre l'importance du degré d'asymétrie en taille de ces lobes avec un biais à tourner vers la gauche (Jozet-Alves et al., 2012).



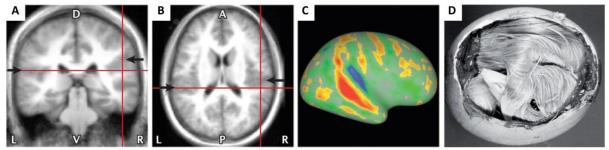
2 : Asymétries morphologiques chez quelques protostomiens A. Coupe frontale d'un cerveau de Drosophila melanogaster, la flèche rouge indique la position du asymétrique (AB) corps échelle: 20µm (Pascual et al., 2004) B. Image des deux neurones bilatéraux ASEL et ASER montrant une taille plus importante d'ASER. (Goldsmith et al., 2010) C. Photo des lobes droit et gauche montrant asymétrie du mésocérébron chez Helix aspersa échelle: 180µm (Chase, 1986) D. Coupe frontale du SNC de Sepia officinalis au niveau des lobes optiques (OL) et verticaux (VL) (Jozet-Alves et al., 2012).

Chez les deutérostomiens, les fonctions des asymétries cérébrales ont été principalement étudiées chez les vertébrés, avec deux systèmes modèles principaux, le cortex des mammifères et plus récemment, l'épithalamus du poisson-zèbre. Ce paragraphe se restreint aux données disponibles chez les mammifères, le rôle des asymétries épithalamiques chez le poisson-zèbre faisant l'objet du paragraphe 1.3.3. Chez l'humain, la description des asymétries cérébrales a considérablement progressé au cours de ces dernières années grâce à de nouvelles techniques d'imagerie structurelle ou fonctionnelle, telles que l'imagerie à résonance magnétique (IRM), la tomographie d'émission monophotonique (TEMP), la tomographie par émission de positrons (TEP) ou l'IRM fonctionnelle. Ces techniques ont permis de décrire avec précision les nombreuses asymétries structurelles du cortex humain comme le sillon latéral (ou scissure de Sylvius), généralement plus long dans l'hémisphère gauche (Van Essen, 2005) (Figure 3 A-C) et le *planum temporale*, également plus grand à gauche (Toga & Thompson, 2003). Au niveau

fonctionnel, deux des latéralisations les mieux connues sont celles liées au fait d'être droitier ou gaucher et celle liée au langage, qui est traitée par l'hémisphère gauche (Amunts et al., 1999 ; Sun & Walsh, 2006). L'aire de Broca est responsable de la parole et de la compréhension du langage alors que l'aire de Wernicke est impliquée dans la compréhension du discours oral et écrit. L'impossibilité d'expérimenter chez l'humain rend difficile la démonstration de liens directs entre asymétries structurales et fonctionnelles. Néanmoins, certaines pathologies, qui apparaissent associées à des défauts de latéralisation cérébrale, aident à établir ces liens. C'est le cas des patients touchés par la schizophrénie (Ribolsi et al., 2014; Royer et al., 2015), l'autisme (Wan et al., 2012) ou la dyslexie (Hugdahl et al., 2003), qui présentent des cerveaux avec une latéralisation réduite ou inversée. Chez la souris (Mus musculus), Kawakami et al. ont montré une asymétrie gauche-droite dans la répartition des sous-unités ε2 des récepteurs NMDA (Nméthyl-D-aspartate) au niveau de l'hippocampe (Kawakami et al., 2003). Dans une autre étude publiée en 2010, cette équipe a utilisé la souris mutante iv pour déterminer le rôle de cette asymétrie moléculaire. Chez cette souris mutante iv, 50% des individus ont un situs inversus (asymétries viscérales inversées) et 50% ont un situs solitus (asymétries viscérales normales) mais les récepteurs NMDA présentent une répartition symétrique des sous-unités ε2 avec un isomérisme droit indépendamment de la latéralité des viscères. En comparant les résultats de tests comportementaux obtenus par des souris iv/iv homozygotes avec ceux de souris iv/+ hétérozygote (qui présentent un phénotype sauvage), cette équipe a pu mettre en évidence une dégradation de la mémoire de travail et de l'acquisition de références spatiales chez les souris symétriques (iv/iv) (Goto et al., 2010), démontrant ainsi l'importance de la latéralisation dans des fonctions cognitives complexes.

Enfin chez le poulet *Gallus gallus* la contrainte que crée la coquille de l'œuf sur la position de l'embryon, induit une latéralisation du système visuel déclenchée par une exposition de l'œil droit à la lumière alors que l'œil gauche reste occulté par le reste de sa tête (Rogers, 2008) (Figure 3 D). Cette latéralisation se traduit par un traitement différentiel des stimuli extérieurs. En se concentrant sur différents indices, l'hémisphère gauche peut discriminer les stimuli

pertinents (graines) des autres (cailloux) alors qu'inversement, la capacité limitée de concentration de l'hémisphère droit permet à l'oiseau de détecter les dangers potentiels et de gérer les réponses liées à la peur et à la fuite (Dharmaretnam & Rogers, 2005).



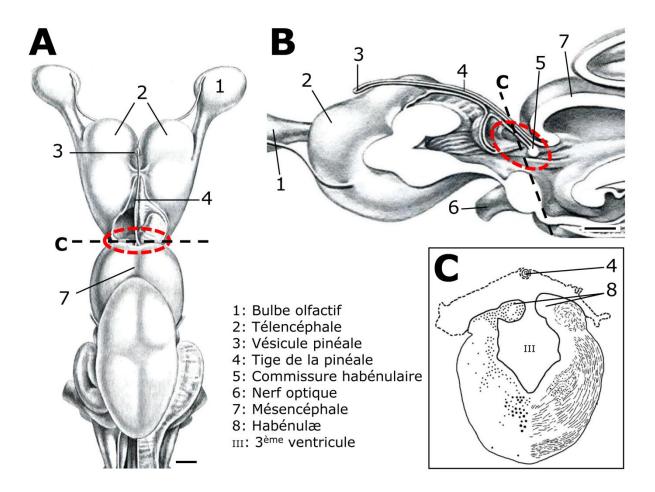
**Figure 3 : Asymétries chez l'humain et le poulet.** (A-C) Asymétries anatomiques du cortex cérébral humain. Coupe coronale (A) et frontale (B) d'IRM montrant la scissure de Sylvius indiquée par des flèches. (C) Illustration des différences de profondeurs des sillons entre les hémisphères droit et gauche. La profondeur plus importante du cortex est représentée en rouge et jaune si elle est à droite et en vert et bleu si elle est à gauche. A, antérieur ; D, Dorsal ; L, gauche ; R, droite (Sun & Walsh, 2006). (D) Position de la tête d'un embryon de poulet de 18 jours dans son œuf entraînant une asymétrie du système visuel (Halpern *et al.*, 2005).

Les bases moléculaires ou génétiques des asymétries fonctionnelles décrites chez les amniotes et notamment l'humain restent mal connues. La plupart des études font appel à l'imagerie fonctionnelle ou récemment à la recherche de polymorphismes chez des individus présentant des anomalies de ces latéralisations (Brandler *et al.*, 2013). Très peu d'études ont été menées sur le développement embryonnaire des asymétries du cerveau humain mais des expressions asymétriques de gènes ont néanmoins été observées (Sun *et al.*, 2005). Le système modèle qui s'est imposé pour l'étude des asymétries cérébrales des vertébrés est l'épithalamus du poisson-zèbre, comme décrit ci-après.

#### 1.2. L'épithalamus : aspects morphologiques et fonctionnels

#### 1.2.1. Aspects morphologiques

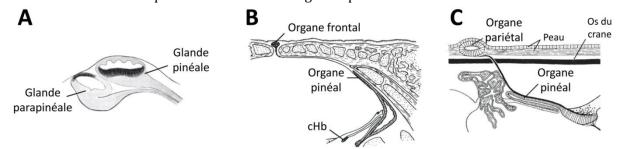
L'épithalamus (du grec *épi-* = sur/au-dessus) tire son nom de sa situation topographique puisqu'on le retrouve au-dessus du thalamus. Dérivé du cerveau antérieur, il se situe entre le télencéphale et le mésencéphale et forme le toit du 3ème ventricule (Figure 4). Cet organe se retrouve sans ambiguïté chez tous les vertébrés et se subdivise en deux structures également conservées, le complexe pinéal et le complexe habénulaire (Butler & Hodos, 2005).



**Figure 4 : Organisation de l'épithalamus chez les vertébrés.** Vue dorsale (A) et sagittale (B) d'un cerveau de vertébré (*Squalus acanthias*) présentant la position topographique de l'épithalamus. Le cercle en pointillé rouge correspond à l'emplacement de l'épithalamus. La ligne en pointillé noire correspond au plan de coupe du schéma de coupe transversale de *Squalus acanthias* au niveau de l'épithalamus (encadré C). Échelle : 250mm (Smeets, 1998).

#### a) Le complexe pinéal

Le complexe pinéal est composé d'une ou de deux évaginations, selon l'espèce considérée. La première d'entre elles est appelée glande pinéale et se retrouve chez tous les vertébrés à l'exception des myxines, chez qui on n'a pas retrouvé de complexe pinéal (Wicht & Nieuwenhuys, 1998) et de certains mammifères et les crocodiliens qui semblent l'avoir perdu secondairement (Sorensen, 1894). Chez la plupart des espèces, la glande pinéale occupe une position médiane. Elle est composée d'une évagination, la vésicule pinéale (Figure 4 A et B n°3), qui se projette antérieurement par rapport à l'épithalamus mais qui y reste reliée par le pédoncule (ou la tige) de la pinéale (Figure 4 B et C n°4). La seconde évagination est présente chez un nombre plus restreint de vertébrés. On la nomme glande parapinéale chez les lamproies et les actinoptérygiens (Figure 5 A) (Meek & Nieuwenhuys, 1998; Nieuwenhuys & Nicholson, 1998), organe frontal chez les amphibiens (Figure 5 B) (ten Donkelaar, 1998a) et organe pariétal chez les squamates (Figure 5 C) (ten Donkelaar, 1998b). L'origine évolutive de cette structure reste mal connue et la question sur son homologie n'a pas encore été tranchée.



**Figure 5 : Morphologies de la parapinéale chez les vertébrés.** Représentations schématiques de coupes sagittales médianes du complexe pinéal d'une lamproie (*Lampetra fluviatilis*) (A) (Richardson *et al.*, 2010), d'une grenouille (*Rana esculenta*) (B) (ten Donkelaar, 1998a) et d'un caméléon (*Chameleo pardalis*) (ten Donkelaar, 1998b). La partie antérieure se situe à gauche et la partie dorsale en haut. cHb, Commissure habénulaire

Le complexe pinéal est un organe sensoriel possédant des cellules photoréceptrices, les pinéalocytes, en contact avec les neurones de la pinéale (ou parapinéale). Chez la plupart des vertébrés, ces neurones projettent vers le complexe habénulaire et vers d'autres territoires plus ou moins diversifiés selon les espèces. Des projections ont été mises en évidence vers le diencéphale (thalamus dorsal, thalamus ventral, l'hypothalamus, le pretectum) chez les lamproies (Nieuwenhuys & Nicholson, 1998), les téléostéens (Meek & Nieuwenhuys, 1998), les

amphibiens (ten Donkelaar, 1998a; ten Donkelaar, 1998c) et les sauropsidés (ten Donkelaar, 1998b) mais également vers le mésencéphale (à l'exception des oiseaux) et le télencéphale (amygdale) chez les amphibiens (Butler & Hodos, 2005). Le complexe pinéal a aussi un rôle sécréteur et intervient dans la régulation de certains rythmes biologiques comme l'entrainement du rythme circadien en sécrétant de la mélatonine la nuit (Nieuwenhuys *et al.*, 1998; Butler & Hodos, 2005; Falcón *et al.*, 2009).

#### b) Le complexe habénulaire

La deuxième grande subdivision de l'épithalamus correspond au complexe habénulaire et se retrouve chez tous les vertébrés. Il est composé de deux structures bilatérales, les habenulæ (ou noyaux habénulaires) situées de part et d'autre du troisième ventricule et reliées entre elles par la commissure habénulaire. Les habenulæ comprennent plusieurs sous-domaines, bien caractérisés chez certaines espèces. Une subdivision des habenulæ en un territoire médian (MHb) et un territoire latéral (LHb), lui-même composé de deux sous-régions (médiale, LHbM, et latérale, LHbL) a ainsi été décrit chez le rat. Ces subdivisions se basent sur des différences au niveau de l'organisation cellulaire et des connexions neuronales (Figure 6 A) (Andres et al., 1999). Une organisation très similaire des habenulæ a été retrouvée chez l'humain mise à part au niveau de la LHb qui est proportionnellement plus grosse (Díaz et al., 2011). On retrouve également une subdivision des habenulæ chez les amphibiens (Harris et al., 1996 ; Guglielmotti & Cristino, 2006) et les téléostéens (Aizawa et al., 2011). Chez ces espèces, ces sous-territoires occupent des positions relatives différentes et une subdivision dorso-ventrale a été définie. C'est le cas chez le poisson-zèbre où ils ont été caractérisés de façon plus précise grâce à des marqueurs génétiques et sur la base de l'expression de neurotransmetteurs. Chez cette espèce, chaque habénula est composée d'une partie ventrale (vHb) ainsi que d'une partie dorsale (dHb). L'habenulæ dorsale étant elle-même subdivisée en un domaine latéral (dHbL) et d'un domaine médial (dHbM) (Figure 6 B) (Aizawa et al., 2011; deCarvalho et al., 2014)

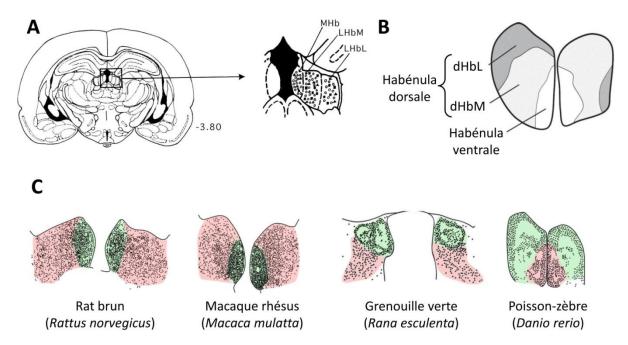
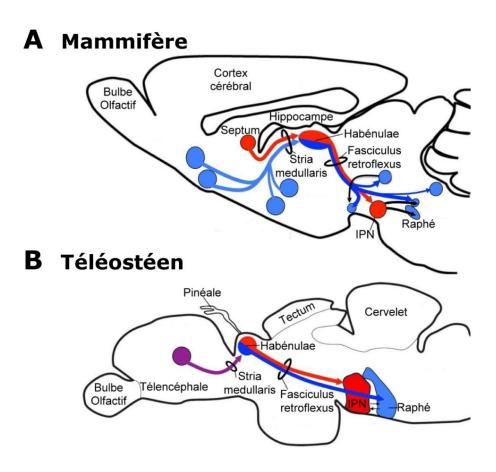


Figure 6: Organisation des habenulæ chez les vertébrés. (A) Schéma d'une coupe transverse de cerveau de rat montrant la position des habenulæ ainsi qu'un agrandissement d'une habénula détaillant ses subdivisions latérales (LHbM et LHbL) et médiales (MHb) (Zhao & Rusak, 2005). (B) Schéma d'une coupe frontale d'habenulæ de poisson-zèbre montrant ses subdivisions dorsales (dHbL et dHbM) et ventrales (Aizawa, 2013). (C) Schémas de coupes frontales d'habenulæ montrant les subdivisions homologues des habenulæ médiales (vert) et latérales (rose) du rat (rongeur), chez le macaque (primate), la grenouille (amphibien) et le poisson-zèbre (téléostéen) (Aizawa et al., 2011). MHb, habénula médiale ; LHbM, partie médiale de l'habénula latérale ; dHbL, partie latérale de l'habénula dorsale; dHbM, partie médiale de l'habénula dorsale.

Les comparaisons entre les cartes d'expression de neurotransmetteurs et de marqueurs moléculaires tels que Kctd8/12 ou la protocadhérine 10 soutiennent l'hypothèse d'une homologie entre les habenulæ dorsale du poisson-zèbre et médiale de rongeurs d'une part et entre les habenulæ ventrale de poisson-zèbre et latérale de rongeurs d'autre part (Figure 6 C) (Amo et al., 2010 ; deCarvalho et al., 2014). Un autre argument fort en faveur de cette homologie est la conservation chez l'ensemble des vertébrés, de projections habénulaires efférentes vers le mésencéphale (Aizawa et al., 2005 ; Gamse et al., 2005). En effet, les habenulæ dorsales des téléostéens (Villalón et al., 2012) et médiales des rongeurs (Herkenham & Nauta, 1977 ; Voogd et al., 1998 ; Klemm, 2004) projettent vers le noyau interpédonculaire (IPN) alors que les habenulæ ventrales des téléostéens et une partie des fibres efférentes des habenulæ latérales de rongeurs projettent vers les noyaux du raphé (Figure 7 A et B). Ces projections se font par le biais du fasciculus retroflexus (ou tractus habénulo-interpédonculaire), principale voie efférente

des habenulæ, que l'on retrouve chez les mammifères (Voogd *et al.*, 1998 ; Klemm, 2004)), les lézards (Distel & Ebbesson, 1981 ; ten Donkelaar, 1998b), les téléostéens (Meek & Nieuwenhuys, 1998 ; Villalón *et al.*, 2012) et chez la lamproie (Nieuwenhuys & Nicholson, 1998 ; Yáñez *et al.*, 1999) (Figure 7).



**Figure 7: Conservation des projections habénulaires chez les vertébrés.** Représentation schématique en vue sagittale des principales projections afférentes (via la *stria medullaris*) et efférentes (via le *fasciculus retroflexus*) des habenulæ chez un mammifère, le rat (A) et un téléostéen, le poissonzèbre (B). En rouge, projections des habenulæ médiales (A) et dorsales (B). En bleu, projections des habenulæ latérales (A) et ventrales (B). L'antérieur se situe à gauche et la partie dorsale en haut. IPN, noyau interpédonculaire (Aizawa *et al.*, 2011).

Le lien entre les habenulæ et le télencéphale se fait via la strie médullaire (*stria medullaris*), principale fibre afférente des habenulæ (Butler & Hodos, 2005). La majorité des fibres contribuant à la strie médullaire chez le rat proviennent des ganglions de la base, du système limbique et du tronc cérébral pour les habenulæ latérales et du septum pour les habenulæ médiales (Klemm, 2004) (Figure 7 A). À part chez le rat, les données disponibles sont plus

éparses et limitées mais des études chez d'autres vertébrés tendent à montrer que la strie médullaire est une voie afférente très conservée et cela bien que les multiples contributions issues du télencéphale ventral vers les habenulæ soient variables selon les espèces. Par exemple, la lamproie possède des projections à destination des habenulæ provenant du bulbe olfactif, du pretectum et des ganglions de la base (Stephenson-Jones *et al.*, 2012). Chez les lézards, ces projections proviennent du striatum, du système limbique ainsi que de l'hypothalamus (ten Donkelaar, 1998b; Butler & Hodos, 2005) alors que chez le poisson-zèbre, les projections sont issues du noyau entopédonculaire (Aizawa, 2013) (Figure 7 B).

#### 1.2.2. Les fonctions de l'épithalamus

Les connaissances à propos du rôle de l'épithalamus ont longtemps été cantonnées aux fonctions du complexe pinéal. Les fonctions des habenulæ font l'objet d'un nombre croissant d'études depuis la dernière décennie. Ces études montrent notamment leur implication dans des comportements complexes et la prise de décision, dans les réponses à la douleur, au stress et au sommeil. Le dysfonctionnement de cette structure a également été associé à des pathologies.

#### a) Rôles du complexe pinéal

Une des grandes fonctions de l'épithalamus est liée au contrôle des rythmes circadien et saisonnier. Chez tous les vertébrés, la glande pinéale sécrète de la mélatonine dans le sang et le liquide cérébro-spinal la nuit. Chez les mammifères, le complexe pinéal est internalisé et ne possède pas de cellules photosensibles. Chez ces espèces, il a un rôle dans la synchronisation du rythme circadien dont l'entrainement est régulé par le noyau suprachiasmatique; les cellules photosensibles de la rétine sont utilisées pour la détection du cycle le jour/nuit (Falcón, 1999; Falcón *et al.*, 2009). Chez les espèces possédant une glande pinéale non internalisée comme les téléostéens, les lézards et les oiseaux, le complexe pinéal possède les trois éléments nécessaires à la formation d'un système circadien complet : des cellules photoréceptrices, la « montre »

nécessaire à l'entrainement circadien et des cellules capables de produire de la mélatonine. Les axones efférents de la pinéale sont inhibés par la lumière et ne relâchent des neurotransmetteurs excitateurs qu'en cas de faible luminosité (la nuit) (Falcón, 1999; Falcón *et al.*, 2009). Des cultures d'explants ont montré une régulation du cycle circadien intra-pinéale chez ces espèces sauf chez les oiseaux. Chez le poulet, l'entrainement circadien est imposé par le noyau supra-chiasmatique visuel et aucun rythme n'est observé si il est ablaté (Cassone *et al.*, 1990). Chez les mammifères, la régulation du rythme circadien pourrait impliquer les habenulæ puisqu'il a également été démontré chez le rat, qu'une illumination de la rétine induisait une activation de certaines cellules des habenulæ latérales et médiales et que les cellules de l'habénula latérale maintenaient une rythmicité circadienne en culture *in vitro* (Zhao & Rusak, 2005; Hikosaka, 2010) (Figure 8 A).

#### b) Rôle des habenulæ

Les habenulæ sont impliquées dans un spectre plus large de fonctions. Elles ont un rôle dans des régulations physiologiques (sommeil, reproduction) ou dans des comportements complexes (apprentissage, comportement maternel, addiction).

Un rôle sur le contrôle du sommeil a par exemple été montré chez les individus présentant une lésion des habenulæ qui induit une perturbation du sommeil paradoxal. On retrouve aussi une augmentation de l'activité neuronale dans les habenulæ pendant les anesthésies générales telle qu'elle est observée au cours du sommeil (Hikosaka, 2010). Les MHb pourraient également jouer un rôle important dans l'hibernation et sa maintenance. Chez l'écureuil, on observe en plus d'une augmentation de l'activité dans les neurones des LHb, une synthèse de mélatonine dans les MHb. Une synthèse d'interleukine-18, connue pour induire le sommeil lorsqu'elle est injectée directement dans le cerveau intra-ventriculairement, y est également observée (Yu et al., 2002; Hikosaka, 2010).

Chez de nombreuses espèces, la détection électromagnétique est importante pour la capture de proies ou pour effectuer des migrations. L'exposition de la lamproie à des champs électriques entraine des modifications comportementales différentes selon que le champ soit anodique ou cathodique et active deux voies dont l'axe habénula-noyau interpédonculaire (axe Hb-IPN) (Chung-Davidson *et al.*, 2004). Cet axe Hb-IPN est également impliqué dans la perception des mouvements de la tête où on observe une variation de l'activité neuronale de l'habénula latérale du rat en relation avec la vitesse angulaire de la tête (Sharp *et al.*, 2006 ; Hikosaka, 2010). D'autres rôles ont également été proposés pour les habenulæ comme chez le rat où il n'y a pas de mise en place de comportements maternels chez les femelles présentant des lésions des habenulæ (Corodimas *et al.*, 1995). Une implication importante des habenulæ dans le traitement de l'information liée aux interactions sociales positives (comportement de jeux) et négatives (isolement) a été montrée chez le rat adolescent (van Kerkhof *et al.*, 2013).

Les habenulæ sont impliquées dans certaines addictions telles que celle au tabac. Une forte concentration de sous-unités de récepteurs acétylcholines nicotiniques est présente dans les MHb et dans l'IPN des mammifères et leur contribution aux symptômes physiques et psychologiques du manque a été montrée lors du sevrage (Antolin-Fontes *et al.*, 2014).

#### c) Régulations comportementales par des systèmes neuromédiateurs

Les comportements décrits précédemment ont comme points communs leurs régulations par les voies dopaminergiques ou sérotoninergiques. Les études chez les primates et les rongeurs ont permis d'établir le rôle de ces neurotransmetteurs dans la régulation de ces comportements ou leur implication dans certains troubles psychiatriques : dépressions majeures, psychose induite par des drogues et la schizophrénie. Chez les animaux, une augmentation de l'hyperactivité, une baisse de la capacité de concentration et des réponses moteurs désynchronisées sont observées en cas de lésions habénulaires. Ces troubles sont dus à une dérégulation des neurones dopaminergiques. De nombreuses expériences semblent en effet montrer un rôle inhibiteur des habénula sur l'activation des neurones dopaminergiques des

noyaux mésencéphaliques (Hikosaka, 2010). Récemment, une étude chez le poisson-zèbre a montré que les habenulæ ont la capacité de moduler les comportements d'attraction et d'évitement en liaison avec des stimuli olfactifs. Une faible activation des habenulæ induisant un comportement d'attraction et une forte activation des habenulæ induisant un comportement d'évitement. Cette différence s'expliquant par le degré d'activation de l'axe Habenulæ-IPN, largement GABAergique (inhibiteur) (Krishnan *et al.*, 2014).

Des expériences ont montré que la réponse dopaminergique tenait un rôle prépondérant dans l'apprentissage. Au cours d'une activité donnant lieu à récompenses, une hyper-activation des neurones dopaminergiques est observée si la récompense est plus importante qu'espérée dans le but de faciliter l'action à l'origine de celle-ci. Inversement, dans le cas d'une récompense moins importante que prédite, une inhibition de cette réponse dopaminergique induira une suppression de l'action ayant entrainé une réponse négative. Les habenulæ latérales prennent part à ce type d'apprentissage en inhibant, le cas échéant, l'activité dopaminergique (Figure 8 B) (Schultz, 1998 ; Matsumoto & Hikosaka, 2007 ; Hikosaka, 2010).

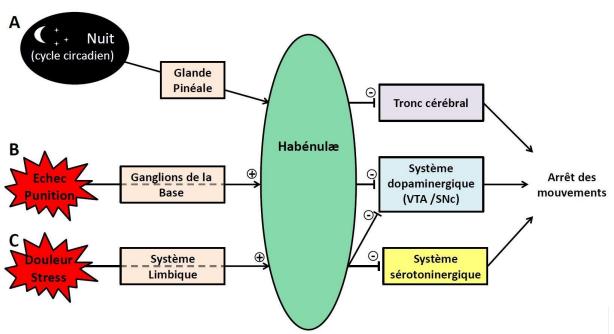


Figure 8: Mécanismes communs proposés pour différentes fonctions comportementales des habenulæ. (A) Le cycle circadien est détecté par la glande pinéale qui produit de la mélatonine la nuit. L'augmentation de l'activité neuronale dans les habenulæ provoque l'arrêt des mouvements. (B) L'échec et la punition sont intégrés par les ganglions de la base et induisent une augmentation de l'activité neuronale dans les habenulæ qui inhibe la sécrétion de dopamine et l'arrêt des mouvements. (C) Dans le

cas d'événements douloureux, stressants ou aversifs, intégrés par le système limbique, l'activation neuronale des habenulæ va inhiber les systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques conduisant à un arrêt des mouvements. VTA, aire tegmentale ventrale; SNc, Substance noire *pars compacta* (d'après Hikosaka, 2010).

Ce type de modulation par les habenulæ semble également jouer un rôle dans l'apprentissage d'évitement en inhibant la réponse dopaminergique en cas de stimuli aversifs (incluant la douleur) et dans la réponse au stress. L'excitation des neurones habénulaires en réponse au stress altère aussi le système sérotoninergique qui lui-même influe sur la motivation pour exécuter des tâches avec un objectif défini (Figure 8 C) (Sutherland, 1982; Hikosaka, 2010). Une étude de Lee *et al.* en 2014 montre également qu'une augmentation de la dendritogénèse dans les habenulæ du poisson-zèbre entrainait une baisse des comportements associés à l'anxiété (Lee *et al.*, 2014).

Le point commun entre ces différentes fonctions semble être l'inhibition de l'activité motrice dans des conditions aversives. Cette hypothèse, émise par Hikosaka en 2010, se base sur l'augmentation de l'activité des habenulæ en conditions aversives et sur leur capacité à supprimer l'activité motrice en inhibant fortement les neurones dopaminergiques, régulateurs clés du mouvement et de la motivation. Cette fonction pourrait avoir évolué à partir de la capacité de l'épithalamus à réguler les mouvements en fonction du cycle circadien (Hikosaka, 2010).

#### 1.3. Les asymétries épithalamiques chez les vertébrés

Une caractéristique remarquable de l'épithalamus est que cette structure cérébrale est la seule qui présente des asymétries que l'on retrouve chez tous les grands groupes de vertébrés. Ces asymétries varient considérablement en fonction des espèces ; elles sont très marquées chez certaines espèces (cyclostomes, chondrichtyens, actinoptérygiens) mais non détectées jusqu'à présent chez d'autres (comme les mammifères). Ces asymétries ont été décrites en détail chez le poisson-zèbre et dans une moindre mesure chez les téléostéens ; elle est parcellaire chez les autres groupes de vertébrés. Ce paragraphe fait le point des connaissances sur le sujet, ainsi que des données qui émergent actuellement quant à leur fonction.

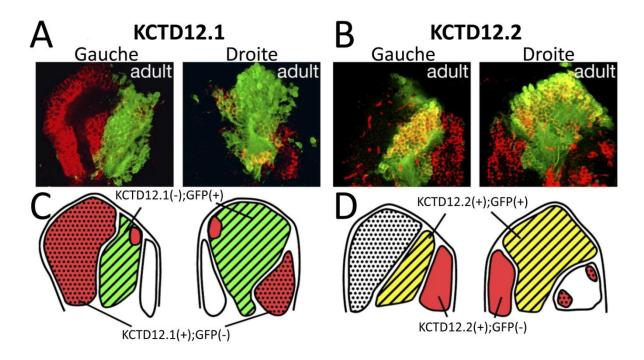
#### 1.3.1. Les asymétries épithalamiques chez le poisson-zèbre

Comme indiqué précédemment (§ 1.2), l'épithalamus du poisson-zèbre comprend deux habenulæ et un complexe pinéal constitué d'un organe pinéal et d'une parapinéale. Les asymétries observées concernent non seulement les habenulæ mais aussi la parapinéale. Chez 95% des individus sauvages, on retrouve une glande parapinéale décalée sur la gauche par rapport au plan médian et une habénula gauche plus grosse que la droite. Chez les 5% restants, on retrouve les mêmes asymétries de la parapinéale et des habenulæ, mais avec une latéralité inversée. Leur latéralité peut donc varier entre individus mais elle est toujours couplée entre ces structures (Concha et al., 2003 ; Gamse et al., 2003). Ces asymétries sont décrites ci-après dans le cas de la latéralité gauche dominante.

#### a) Les asymétries habénulaires

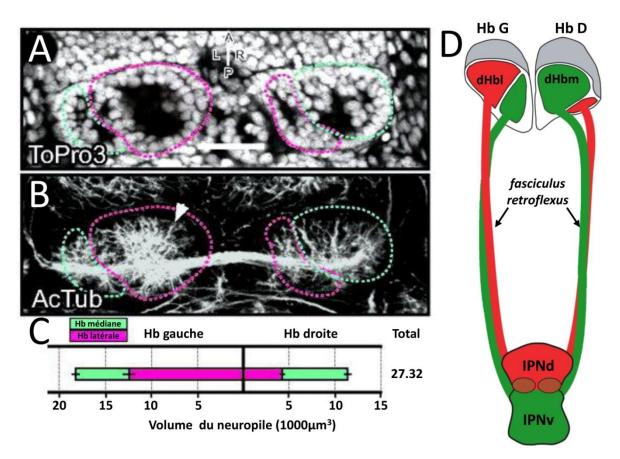
La première asymétrie du complexe habénulaire concerne la taille globale de chaque habénula puisque la gauche présente une taille globale plus importante que la droite (Concha *et al.*, 2000 ; Signore *et al.*, 2009 ; Villalón *et al.*, 2012). Cette asymétrie résulte de différences entre les habenulæ dorsales, aucune asymétrie entre les habenulæ ventrales n'ayant été détectée à ce

jour (deCarvalho et al., 2014). Une analyse plus détaillée fondée sur l'expression de marqueurs génétiques permet de d'établir la présence de deux sous-domaines, un médial et un latéral, dans chacune des deux habenulæ dorsales. Ces sous-domaines présentent une asymétrie volumique entre les deux habenulæ; l'habénula latérale gauche est plus grosse que la droite et inversement l'habénula médiale droite est plus grosse que la gauche (Figure 9) (Aizawa et al., 2005 ; Gamse et al., 2005). Cette subdivision habénulaire se base sur l'expression de trois gènes paralogues qui codent des sous-unités de canaux potassiques les KCTD (potassium (K+) channel tetramerization domain) et qui participent à la formation du complexe récepteur hétéromultimèrique des GABAB (Schwenk et al., 2010). KCTD12.1, exprimé dans le sous-domaine latéral de l'habénula dorsale, a un territoire d'expression plus étendu à gauche (Figure 9 A) (Gamse et al., 2003) alors que ceux de KCTD12.2 et de KCTD8, exprimés dans le sous-territoire médial, sont plus étendus à droite (Figure 9 B) (Gamse et al., 2005). Le facteur de transcription à domaine POU Brn3a (Pou4f1) est également utilisé pour marquer ce domaine médial (He et al., 1989 ; Aizawa et al., 2005 ; Quina et al., 2009). En plus de l'expression régionalisée de ces sous-unités de récepteurs GABAergique, d'autres neurotransmetteurs sont également distribués asymétriquement entre les deux habenulæ. Les gènes impliqués dans la voie cholinergique (Hong et al., 2013) ainsi que les marqueurs des voies sérotoninergique (Norton et al., 2008) et glutamatergique (Haug et al., 2013) sont plus exprimés dans l'habénula droite que dans la gauche.



**Figure 9: Asymétries des habenulæ du poisson-zèbre.** (A-B) Coupes transversales d'habenulæ montrant la distribution de l'ARNm de *KCTD12.1* (A) et de *KCTD12.2* (B) chez un poisson-zèbre adulte Tg(brn3a-hsp70:GFP)<sup>rw0110b</sup> exprimant de la GFP (vert) dans l'habénula médiale. Les domaines d'expression de *KCTD12.1* et *KCTD12.2* sont schématisés dans (C) et (D) respectivement. Les domaines exprimant la GFP et KCTD12.2 sont colorés en jaune (d'après Aizawa *et al.*, 2007).

Des différences au niveau de l'organisation cellulaire sont également observées entre les habenulæ gauche et droite. Ainsi, des mesures volumétriques du neuropile, qui est constitué des protrusions neuronales (axones et dendrites) ainsi que des cellules gliales, montrent que celui-ci occupe un volume plus important à gauche qu'à droite avec une densité plus élevée (Figure 10). Cette différence est en grande partie due à l'habénula médiale gauche qui a un volume de neuropile environ trois fois plus important que l'habénula médiale droite (Figure 10 C) (Taylor et al., 2011).



**Figure 10 :** Asymétries du neuropile et des projections des habenulæ du poisson-zèbre. (A) Coupe transversale d'habenulæ de poisson-zèbre (96hpf) marquée au ToPro3 (marqueur nucléaire). (B-C) Asymétrie du neuropile dans les habenulæ de poisson-zèbre (96hpf). (B) Marquage des neurotubules (dendrites et axones) par immunohistochimie. La différence de volume entre les deux habenulæ est pointée par une flèche. (C) Quantification du volume du neuropile des habenulæ droite et gauche (d'après Taylor *et al.*, 2011). (D) Schéma représentant l'organisation asymétrique des habenulæ et de ses projections vers l'IPN chez le poisson-zèbre adulte (d'après Aizawa *et al.*, 2007). dHbl, partie latérale de l'habénula dorsale ; dHbm, partie médiale de l'habénula dorsale ; IPN, noyau interpédonculaire ; IPNd, IPN dorsal ; IPNv, IPN ventral ; HbD, habénula droite ; HbG, habénula gauche ; hpf, heures après fécondation. Échelle 50μm.

Enfin, la troisième asymétrie remarquable des habenulæ du poisson-zèbre concerne leurs projections asymétriques. Comme chez tous les vertébrés, les projections efférentes des habenulæ (dorsales chez les téléostéens) innervent les parties dorsale et ventrale du noyau interpédonculaire par le *fasciculus retroflexus* (Meek & Nieuwenhuys, 1998). Chez le poissonzèbre, les projections sont dites « latérotopiques », les parties médiales des habenulæ dorsales projettent vers la partie ventrale de l'IPN alors que les parties latérales projettent vers l'IPN dorsal (Figure 10 D) (Aizawa *et al.*, 2005 ; Gamse *et al.*, 2005). Une partie de l'IPN dorsal reçoit également quelques projections des habenulæ médiales.

#### b) Les asymétries du complexe pinéal

Chez le poisson-zèbre, la base de la tige de la pinéale occupe une position légèrement asymétrique à la gauche de la ligne médiale (Figure 11 A) (Liang *et al.*, 2000) mais la principale asymétrie du complexe pinéal concerne la glande parapinéale.

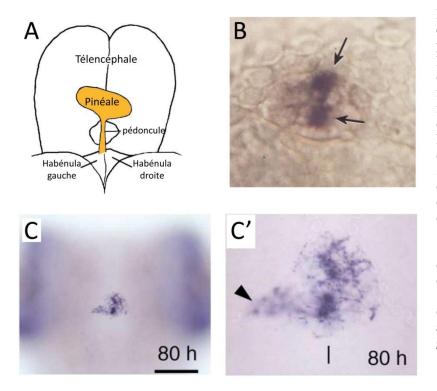


Figure 11: Asymétrie du complexe pinéal chez le poisson-zèbre. (A) Schéma de la région du diencéphale dorsal de d'adulte en vue dorsale montrant la glande pinéale mature (en jaune) composée d'une vésicule reliée l'épithalamus par le pédoncule, ou tige. (d'après Liang et al., 2000). (B) Vue dorsale d'un embryon de 3 jours montrant distinctement deux structures exprimant le gène ZfAANAT-2 (flèches) (Gothilf et al., 1999). (C) Expression du gène ZfOtx5 dans l'épithalamus embryon de 80h, agrandi dans (C'), montrant la présence d'une parapinéale asymétrique après migration (flèche) à la gauche de la pinéale. Échelle : 100μm. (Gamse et al., 2002)

L'existence d'une glande parapinéale chez le poisson-zèbre a été visualisée pour la première fois en 1999, avec la mise en évidence de deux groupements cellulaires distincts exprimant l'arylalkylamine *N*-acétyltransférase-2 (AANAT-2), une enzyme impliquée dans la synthèse de la mélatonine (Figure 11 B) ((Gothilf *et al.*, 1999). La présence de cette structure et la chronologie de sa migration vers la gauche ont par la suite été confirmées à l'aide de marqueurs spécifiques du complexe pinéal comme *Otx5* (Gamse *et al.*, 2002) (Figure 11 C-C') ou de la parapinéale comme *Gfi1* (Dufourcq *et al.*, 2004) et *Sox1a* (Clanton *et al.*, 2013).

## 1.3.2. Des asymétries retrouvées dans tous les grands groupes de vertébrés

#### a) Asymétries morphologiques

Comme chez le poisson-zèbre, des asymétries en taille et d'organisation cellulaire des habenulæ ont été observées dans de nombreux taxa de vertébrés (Figure 12) (Concha & Wilson, 2001). Chez la myxine, membre des cyclostomes, bien que les habenulæ gauche et droite semblent être fusionnées et ne former qu'une entité unique, une analyse microscopique permet de les distinguer et de montrer que l'habénula de droite est de taille plus importante (Figure 12 a). En outre, des différences d'organisation cellulaire permettent de les subdiviser en deux ; une partie dorsale et une ventrale située plus postérieurement d'où part le *fasciculus retroflexus* (Jansen, 1930 ; Wicht & Nieuwenhuys, 1998). Chez la lamproie, l'asymétrie habénulaire est spectaculaire que ce soit au niveau de la taille ou de l'organisation neuronale (Figure 12 b). L'habénula droite hypertrophiée se subdivise en 3 parties : dorsale, médiale et ventrale ; *a contrario* l'habénula gauche ne comprend pas de subdivision (Stephenson-Jones *et al.*, 2012). Les projections efférentes de l'habénula droite apparaissent également plus larges que son pendant gauche (Johnston, 1902 ; Nieuwenhuys & Nicholson, 1998).

Chez les chondrichthyens (Figure 12 c), l'habénula gauche est de taille plus importante (Smeets, 1998). Les asymétries observées comprennent aussi des différences au niveau de l'organisation neuronale, notamment de la myélinisation des axones (Kemali & Miralto, 1979).

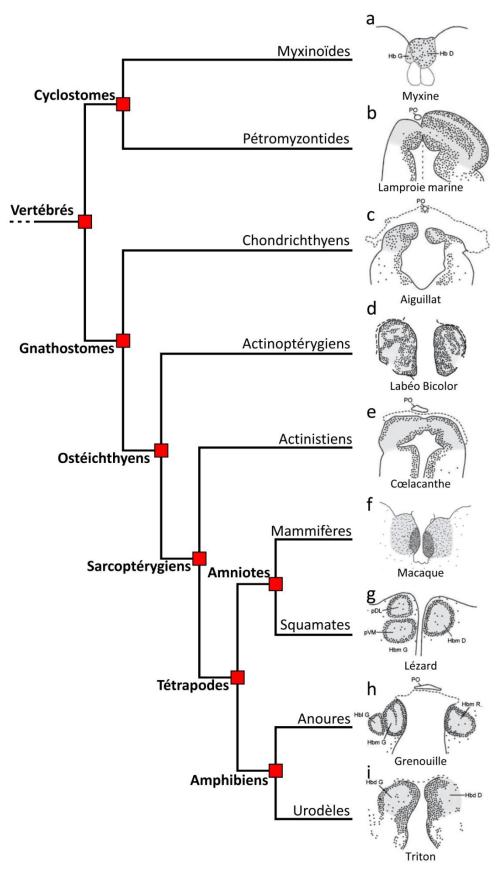


Figure 12 : Représentation schématique des habenulæ de différents vertébrés en lien avec leur position phylogénétique. (a-i) Schémas de coupes transversales, au niveau de l'épithalamus, de la myxine *Eptatretus stouti* (a), de la lamproie marine *Petromyzon marinus* (b), du requin *Squalus acanthias* 

(c), du téléostéen *Epalzeorhynchos bicolor* (d), du cœlacanthe *Latimeria chalumnae* (e), du macaque *Macaca mulatta* (f), du lézard *Uta stansburiana* (g), de la grenouille *Rana esculenta* (h) et du triton *Triturus cristatus* (i). D, droite; G, gauche; Hb, habénula; Hbd, habénula dorsale; Hbl, habénula latérale; Hbm, habénula médiale; pDL, partie dorso-latérale; PO, organe pinéal; pVM, partie ventro-médiale. (a-c; e; g-i) d'après Concha & Wilson, 2001; (d) d'après Villalón *et al.*, 2012; (f) d'après Mikula *et al.*, 2007)

Chez les actinoptérygiens, des asymétries au niveau cytoarchitectural et des projections axonales se retrouvent chez de très nombreuses espèces, comme l'ont montré plusieurs études publiées ces dernières années, notamment chez les téléostéens (Figure 12 d) (Meek & Nieuwenhuys, 1998). Comme chez le poisson-zèbre, la plupart des téléostéens ont une habenulæ gauche plus grosse mais cette asymétrie en taille peut être inversée selon les espèces et même selon le sexe comme chez les femelles de *F. gardneri* qui ont une habénula droite de plus grande taille (Villalón *et al.*, 2012). Par contre, on retrouve chez les téléostéens, une conservation des projections asymétriques des habenulæ dorsales vers l'IPN (Villalón *et al.*, 2012); projections de dHbL vers l'IPN dorsal et de dHbM vers l'IPN ventral (Aizawa *et al.*, 2005; Gamse *et al.*, 2005) (Figure 13).

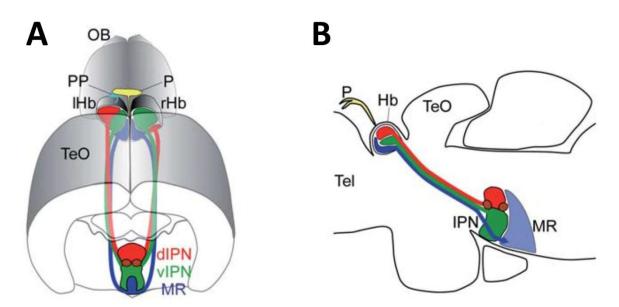


Figure 13: Représentations schématiques des projections des habenulæ de poisson-zèbre (Téléostéen) en vue dorso-oblique (A) et latérale (B). En bleu, projections des habenulæ ventrales vers le noyau du raphé médian. Les projections des habenulæ dorsales vers l'IPN sont représentées en rouge (dHb latéral) et en vert (dHb médiales). IPN, noyau interpédonculaire; dIPN, IPN dorsal; vIPN, IPN ventral; Hb, habénula; lHb et rHb, habénula gauche et droite respectivement; MR, raphé médian; OB, bulbe olfactif; P, pinéale; PP, parapinéale; Tel, télencéphale; Te0, tectum opticum (Amo et al., 2010)

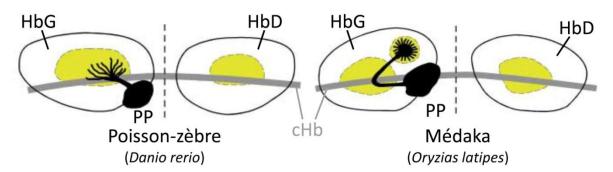
Des asymétries en taille et de l'organisation cellulaire sont également présentes chez les sarcoptérygiens. Peu de données existent sur les habenulæ du cœlacanthe (actinistiens) mais une habénula gauche de taille plus importante a été décrite (Figure 12 e) (Nieuwenhuys, 1998).

En ce qui concerne les amphibiens, les asymétries habénulaires peuvent être spectaculaires chez certains anoures (ten Donkelaar, 1998a; ten Donkelaar, 1998c), comme c'est le cas des grenouilles du genre *Rana*. Chez ces espèces, les habenulæ se subdivisent en un noyau dorsal et un noyau ventral. L'habénula gauche est de plus grande taille et présente, à la différence de la droite, une division de son noyau dorsal en deux parties, une médiale et une latérale (Figure 12 h) (Frontera, 1952; Braitenberg & Kemali, 1970; Morgan *et al.*, 1973; Concha & Wilson, 2001). Il est également à noter que le degré de ces asymétries diffère entre les femelles et les mâles et qu'il connait aussi des variations saisonnières (Kemali *et al.*, 1990). En comparaison, peu d'études ont été menées chez les urodèles, dont les habenulæ sont également subdivisées dorsoventralement. Chez le Triton *Tritus cristatus* (Figure 12 i), seule une asymétrie au niveau de l'organisation cellulaire des habenulæ dorsales est visible mais aucune différence de taille n'a été relevée (Braitenberg & Kemali, 1970) alors que chez le pleurodèle l'habénula gauche est plus grosse (Joven *et al.*, 2013).

Cette variabilité morphologique concerne également les amniotes. Chez les squamates, comme le lézard *Uta stansburiana*, l'habénula gauche est de taille plus importante avec des différences cytoarchitecturales par rapport à l'habénula droite. Cette espèce comprend en outre une division médio-latérale des habenulæ avec une subdivision unique de l'habénula médiale gauche en une partie dorsale et une partie ventrale (Figure 12 g) (Engbretson *et al.*, 1981 ; ten Donkelaar, 1998b ; Concha & Wilson, 2001). Cette subdivision de l'habénula médiale gauche ne semble pas être présente chez tous les squamates comme le lézard tégu *Tupinambis nigropunctatus* (Cruce, 1974). Chez le poulet (*Gallus gallus*), une asymétrie sexe-dépendante de habénula médiale est observée. En effet, les mâles possèdent une habénula droite de plus grande taille contrairement aux femelles qui ont des habenulæ symétriques (Gurusinghe & Ehrlich,

1985 ; Dubbeldam, 1998). Chez les mammifères, on ne retrouve pas de telles asymétries morphologiques très marquées (Figure 12 f) et la symétrie habénulaire semble être la règle générale (Voogd *et al.*, 1998) ; seules quelques exceptions ont été observées comme chez les rats et les souris touchés par l'albinisme (Concha & Wilson, 2001).

Chez les espèces possédant une glande parapinéale, des asymétries sont également retrouvées à ce niveau. Comme chez le poisson-zèbre, la glande parapinéale des téléostéens est décalée par rapport à la ligne médiane et retrouvée proche de l'habénula gauche sur laquelle elle projette (Figure 14) (Signore *et al.*, 2009). Par ailleurs, on retrouve également chez des espèces possédant une parapinéale, ou organe pariétal, des projections vers l'habénula gauche même lorsque celle-ci est localisée au niveau de la ligne médiane (Engbretson *et al.*, 1981 ; Concha & Wilson, 2001). C'est par exemple le cas chez la lamproie (Stephenson-Jones *et al.*, 2012).



**Figure 14 : Position de la parapinéale chez le poisson-zèbre et le médaka.** Schémas de la position relative de la parapinéale et de ses efférents en vue dorsale chez le poisson-zèbre et le médaka. La glande parapinéale et ses projections efférentes sont représentées en noir; en gris, la commissure habénulaire et en jaune le neuropile. La ligne en pointillé représente la ligne médiane. cHb, commissure habénulaire ; HbD, habénula droite ; HbG, Habénula gauche ; PP, parapinéale. (d'après Signore *et al.*, 2009)

#### b) Asymétries moléculaires

Les caractérisations moléculaires de l'épithalamus, fondées sur l'analyse de phénotypes neuronaux (dont l'expression de neurotransmetteurs ou de neuromédiateurs) font l'objet d'un nombre croissant d'études. Elles sont généralement ciblées sur l'adulte et ont été réalisées dans un spectre étendu de vertébrés mais peu d'asymétries moléculaires ont pu être mises en évidence.

La calbindin-D<sub>28K</sub> (Calb1) et la calrétinine (Calb2) sont des protéines à motifs mains EF (EF hand) qui ont été utilisées dans le passé comme marqueurs de sous-population neuronale (Baimbridge et al., 1992). Leur présence dans différents sous-domaines habénulaires a été démontrée par immunohistochimie (IHC) chez de nombreux vertébrés comme dans les habenulæ dorsales de l'urodèle (Pleurodeles waltl) (Joven et al., 2013) et des distributions asymétriques ont été décrites chez les chondrichthyens, les amniotes et les actinoptérygiens. La Calbindin-D<sub>28K</sub> est ainsi retrouvée par IHC dans les habenulæ gauches de la petite roussette (Scyliorhinus canicula, Chondrichthyens) (Figure 15 D) (Rodríguez-Moldes et al., 1990) et du lézard Psammodromus algirus (Figure 15 A) (Dávila et al., 2000). On la retrouve également bilatéralement mais de façon plus étendue dans l'habénula droite chez deux actinoptérygiens non téléostéens, un polyptère (Polypterus senegalus) (Graña et al., 2013) et un esturgeon (Acipenser baerii) (Figure 15 B-C) (Graña et al., 2012). Une distribution asymétrique de la Calrétinine a été observée dans les habenulæ chez un plus large spectre de vertébrés. Elle est retrouvée en plus grande quantité dans l'habénula gauche chez la lamproie (Yáñez et al., 1999), chez les actinoptérygiens Polypterus senegalus (Graña et al., 2013) et Acipenser baerii (Graña et al., 2012) mais observée unilatéralement dans les habenulæ gauches chez le téléostéen Chelon labrosus (Figure 15 E) (Díaz-Regueira & Anadón, 2000) et chez la grenouille Rana esculenta (où elle se localise dans le sous-domaine médian de l'habénula) (Figure 15 F) (Guglielmotti et al., 2004). Des cellules positives pour la Calrétinine ont également été évoquées dans l'habénula gauche du lézard Psammodromus algirus mais la spécificité du signal n'est pas confirmée (Dávila et al., 2000). Chez les mammifères et chez l'urodèle (Pleurodeles waltl) en revanche, la Calrétinine est distribuée de façon symétrique entre les deux habenulæ (Jacobowitz & Winsky, 1991; Fortin et al., 1996; Joven et al., 2013).

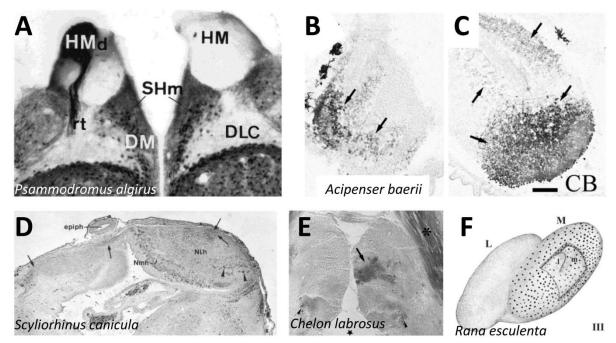
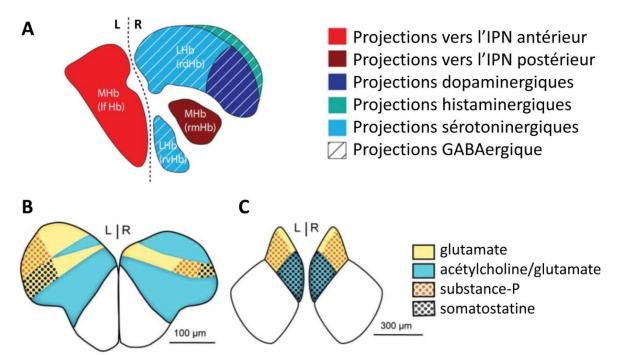


Figure 15: Expressions asymétriques de la Calbindine et de la Calrétinine dans les habenulæ. Photos d'immunohistochimies dirigées contre la calbindine (ou CB) (A-D) et la calrétinine (ou CR) (E). (A) Coupe transversale au niveau de l'épithalamus d'un lézard (Dávila *et al.*, 2000), en noir cellules CB+. Coupe au niveau des habenulæ gauche (B) et droite (C) de l'esturgeon (Graña *et al.*, 2012), les flèches montrent les cellules CB+. (D) Coupe transversale au niveau de l'épithalamus de roussette (Rodríguez-Moldes *et al.*, 1990), les flèches montrent les cellules CB+. (E) Coupe au niveau des habenulæ du mulet (Díaz-Regueira & Anadón, 2000), la flèche montre les cellules CR+. Schéma montrant les zones CR+ de l'habénula médiale gauche de grenouille (Guglielmotti *et al.*, 2004). (A) Dorsal en haut et côté gauche à gauche, (D; E) Dorsal en haut et côté gauche à droite.

L'étude de la régionalisation des différents types de neurotransmetteurs montre que comme chez le poisson-zèbre, de nombreuses espèces présentent une territorialisation asymétrique des habenulæ. Toutefois, les distributions observées apparaissent très variables selon les espèces et en-dehors des grandes subdivisons indiquées plus haut, l'évolution de l'organisation en sousterritoires des habenulæ reste mal comprise. La voie cholinergique, préférentiellement exprimée à droite chez le poisson-zèbre, fournit un exemple de ces variations. Des neurones cholinergiques sont ainsi uniquement observés dans l'habénula droite chez la lamproie (Figure 16 A) (Pombal *et al.*, 2001) alors que dans les habenulæ de la petite roussette, une distribution asymétrique est observée (Anadón *et al.*, 2000). Chez l'esturgeon, à l'inverse de la lamproie, les cellules cholinergiques se restreignent à l'habénula gauche, plus petite aussi chez cette espèce (Adrio *et al.*, 2000).

Plusieurs autres voies impliquant des neurotransmetteurs sont retrouvées différentiellement exprimées entre les habenulæ gauche et droite mais avec des variations de leur profil selon les espèces. Chez la lamproie par exemple, les noyaux monoaminergiques (Dopamine, sérotonine, l'histamine et la GABA) et leurs projections sont retrouvés exclusivement dans l'habénula droite (Figure 16 A) (Stephenson-Jones *et al.*, 2012) alors que l'expression de marqueurs des voies sérotoninergiques, glutamatergiques et GABAergiques sont bilatérales (mais asymétriques) chez le poisson-zèbre (Figure 16) (deCarvalho *et al.*, 2014).



**Figure 16 : Exemple d'asymétries moléculaires chez les vertébrés.** Schémas de coupes transversales d'habenulæ comparant différentes asymétries moléculaires chez la lamproie (A), le poisson-zèbre (B) et la souris (C). (A) Les différentes couleurs représentent les projections efférentes et donc les territoires spécifiques de chaque neurotransmetteurs. lfHb, habénula gauche ; LHb, habénula latérale ; MHb, habénula médiale ; rdHb, habénula dorsale droite ; rmHb, habénula médiale droite ; rvHb, habénula ventrale droite (d'après Stephenson-Jones *et al.*, 2012). (B ;C) Les différentes couleurs représentent les territoires spécifiques de chaque neurotransmetteur ou hormone (somatostatine). En blanc sont représentées les habenulæ ventrales (d'après deCarvalho *et al.*, 2014). L, gauche ; R, droite

Enfin, il est intéressant de noter que des neuromédiateurs, des neuropeptides et même des hormones montrent une régionalisation asymétrique dans les habenulæ de vertébrés. Par exemple, il y a plus de cellules immuno-réactives pour le neuropeptide Y dans l'habénula droite de la lamproie (Barreiro-Iglesias *et al.*, 2010) alors que la substance-P, qui appartient à famille

des tachykinines, se retrouve en plus grande quantité dans l'habénula gauche (Auclair et al., 2004). La tachykinine 1 se retrouve aussi en plus grande quantité dans l'habénula gauche du poisson-zèbre (Hong et al., 2013) alors qu'inversement, la tachykinine 3 est en plus grande quantité dans l'habénula droite (Figure 16) (Biran et al., 2012; Ogawa et al., 2012). Une asymétrie de la substance-P se retrouve également chez le lézard *Uta stansburiana*, mais uniquement dans l'habénula gauche (Engbretson et al., 1982) ainsi que chez la grenouille *Rana esculenta* (Concha & Wilson, 2001). En 1999, une étude a montré la présence d'oxyde nitrique (NO), un neuromédiateur gazeux, dans l'habénula gauche de la *Rana esculenta*, grâce à la mise en évidence d'une activité de la NO synthase pendant le développement embryonnaire et chez l'adulte (Guglielmotti & Fiorino, 1999).

Au bilan, ces données suggèrent fortement des spécialisations fonctionnelles distinctes de chaque habénula chez un grand nombre d'espèces. Des similitudes dans les cartes d'expression de neurotransmetteurs ont été proposées entre poisson-zèbre et la souris (Figure 16 B-C) (deCarvalho *et al.*, 2014) mais la variabilité observée et le caractère parcellaire des données rendent difficile une vue synthétique fondée sur la reconstruction phylogénétique.

#### 1.3.3. Fonctions des asymétries habénulaires

Les rôles des asymétries épithalamiques n'ont pour l'instant été étudiées que chez les téléostéens, et notamment le poisson-zèbre *Danio rerio*. Chez ce dernier, les premières expériences sur la latéralisation du cerveau et les comportements associés ont été effectuées en exploitant les caractéristiques d'une lignée mutante, *fsi* (frequent *situs-inversus*) (Barth *et al.*, 2005). Cette lignée mutante *fsi* est caractérisée par une proportion d'individus *situs inversus*, c'est-à-dire à la latéralité inversée, bien supérieure à la population sauvage. Ces premières études ont comparé les réactions des individus *fsi* ayant un phénotype de latéralisation sauvage à celles d'individus *fsi* ayant un phénotype de latéralisation inversée (*situs inversus*) au cours de tests comportementaux, préalablement établis, qui permettent la mise en évidence de biais de

latéralisation chez cette espèce. Par exemple, au cours du test du miroir et du test de l'approche vers une cible à mordre (Miklósi & Andrew, 1999; Miklósi et al., 2001), les deux groupes de mutants fsi ont eu des comportements latéralisés inversés. En revanche, d'autres tests, comme la direction du mouvement de fuite en cas de stimuli inattendus ou dans un nouvel environnement, n'ont révélé aucune différence entre les individus sauvages et ceux présentant des latéralités inversées (Barth et al., 2005). Facchin et al. ont montré en 2009 qu'une inversion de la latéralité (par injection de morpholinos dirigés contre la protéine Spaw, voir partie 2.2), n'entrainait aucune modification au niveau des comportements latéralisés testés par Barth et al. (Facchin et al., 2009). Ces résultats suggèrent que d'autres structures cérébrales que les habenulæ pourraient être impliquées dans le contrôle de comportements latéralisés et/ou qu'une variabilité ait été induite par les différentes origines et fonds génétiques des souches de poissonzèbres utilisées.

D'autres études ont été menées chez les cichlidés, une famille de téléostéens très diversifiée. La diversité de cette famille s'étend aux habenulæ qui peuvent présenter des variations en taille et en latéralité selon le sexe et l'espèce. Des expériences de latéralisation chez *Geophagus brasiliensis* s'intéressant aux différences d'asymétries habénulaires interindividuelles, ont montré une corrélation entre le degré de variation de ces asymétries et l'importance de la latéralisation comportementale. Aucune relation n'a toutefois été établie au niveau de la population (Reddon *et al.*, 2009). Par contre, chez *Amatitlania nigrofasciata*, pour un mâle et une femelle présentant un degré d'asymétrisation habénulaire équivalent, on observe un même biais dans l'importance de la latéralisation comportementale mais avec des directions opposées (mâles vers la droite et femelles vers la gauche) (Gutiérrez-Ibáñez *et al.*, 2011).

Plus récemment, une série de travaux reposant sur des techniques d'imagerie fonctionnelle chez le poisson-zèbre a permis de mettre en évidence de façon directe des asymétries dans l'intégration des informations sensorielles et des réponses comportementales contrôlées par les habenulæ. Dreosti *et al.* ont montré qu'un traitement asymétrique de stimuli sensoriels était

observé dans les habenulæ de poisson-zèbre. En cas de stimuli visuels, lumières émises par une diode rouge, une réponse neuronale est induite dans l'habénula dorsale gauche alors qu'en cas de stimuli olfactifs, odeur de nourriture, c'est dans l'habénula dorsale droite qu'est observée la réponse neuronale (Figure 17 A). Cette latéralisation est transmise au noyau interpédonculaire dorsal et ventral, grâce à l'asymétrie des projections efférentes des habenulæ (Figure 17 B) (Dreosti *et al.*, 2014).

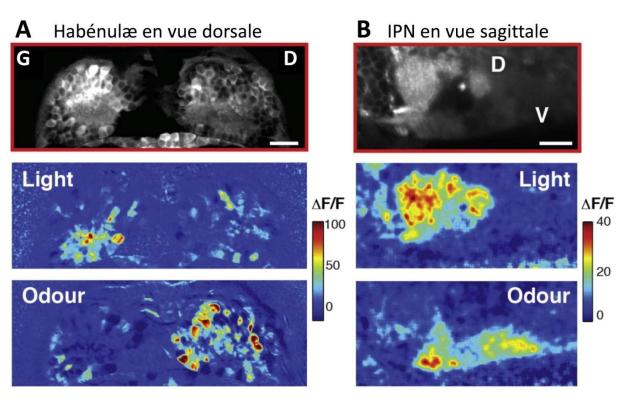


Figure 17: Traitement asymétrique des informations sensorielles par les habenulæ. Images d'un plan z unique au microscope bi-photonique des habenulæ dorsales (A en haut) et de l'IPN (B en haut) de poisson-zèbre (4 jours après fécondation) avec les signaux calciques correspondant à des stimulations lumineuses (au milieu) et olfactives (en bas) non latéralisées. Le  $\Delta F/F$  correspond aux changements de fluorescences relatives, exprimé en pourcentage. (A) D, droite ; G, gauche. (B) D, dorsal ; V, ventral. Échelle  $20\mu m$  (d'après Dreosti *et al.*, 2014)

Les mêmes expériences ont été menées sur trois types de mutants habénulaires différents : le premier groupe présentant des phénotypes *situs inversus*, le deuxième dit « double droite » présentant un isomérisme droit (perte des caractères spécifiques à l'habénula gauche) et le troisième dit « double gauche » présentant un isomérisme gauche. Dans cette expérience, les mutants *situs inversus* ont montré une inversion des réponses à la lumière et aux odeurs entre

les côtés gauche et droit (Figure 18 B) sans aucune modification au niveau de l'IPN (Figure 18 B'). Chez les mutants au phénotype « double droite », une bilatéralisation de la réponse aux odeurs couplée à une baisse significative de la réponse à la lumière est observée dans les habenulæ (Figure 18 C); dans l'IPN dorsal, une très faible réponse à la lumière est observée (Figure 18 C'). Concernant les mutants au phénotype « double gauche », la stimulation lumineuse a induit une réponse dans les deux habenulæ et dans l'IPN dorsal, contrairement à la stimulation olfactive qui a entrainé une très faible réponse au niveau des habenulæ et de l'IPN ventral (Figure 18 D et D') (Dreosti *et al.*, 2014).

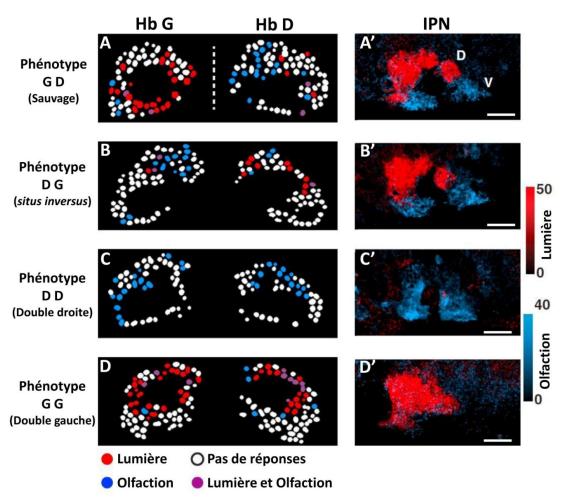


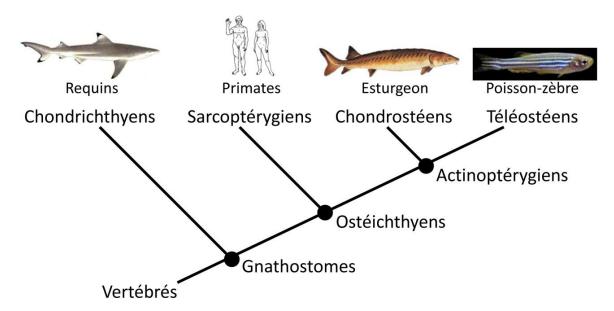
Figure 18 : Réponses des neurones des habenulæ à des stimuli environnementaux. (A-D) Schémas représentant les cellules des habenulæ, telles qu'observées dans la figure 17, en fonction de leurs réponses aux différents stimuli et du phénotype habénulaire testé : sauvage (A), situs inversus (B), « double droite » (C) et « double gauche » (D) ; (A'-D') les réponses correspondant à ces stimuli observés au niveau de l'IPN. (A-D) En fonction de leurs réponses aux stimuli, les corps cellulaires des neurones sont représentés en rouge (réponse à la lumière), en bleu (réponse à l'odeur), en violet (réponse aux deux stimuli) et en blanc (pas de réponse). HbD, habénula droite ; HbG, habénula gauche ; IPN, noyau interpédonculaire ; D, dorsal ; V, ventral. Échelle  $20\mu m$  (d'après Dreosti et al., 2014)

Ces expériences démontrent pour la première fois, l'existence d'une latéralisation des habenulæ pour le traitement de stimuli environnementaux et d'une transmission de ces signaux vers un noyau qui est, lui, symétrique, sans perte des informations latéralisées.

Les réponses olfactives observées dans l'habénula présentent par ailleurs une organisation spatiale bien définie, ce qui n'est pas le cas des fibres afférentes provenant des bulbes olfactives. Cette organisation est en partie superposable avec celle de neurones habénulaires qui médient des comportements adaptatifs comme la réponse conditionnée à des aversifs (peur). Le rôle des habenulæ dans la modulation des réponses comportementales, attraction ou répulsion, à des stimuli olfactifs a de fait été directement démontré chez le poisson-zèbre (Jetti *et al.*, 2014 ; Krishnan *et al.*, 2014).

# 2. Mécanismes de formation des asymétries épithalamiques: le modèle poisson-zèbre

De par la facilité de son maintien en laboratoire, son temps de génération rapide et les caractéristiques de l'embryon (transparent, facilement manipulable, de taille réduite et la rapidité du développement), le poisson-zèbre (actinoptérygien, téléostéen, Figure 19) est devenu un modèle vertébré incontournable en génétique du développement. Il s'est imposé comme le modèle de référence pour l'étude des mécanismes de formation des asymétries épithalamiques de par la puissance des outils génétiques disponibles chez cette espèce, mais aussi parce qu'il est le seul, parmi les organismes modèles traditionnels des vertébrés, à présenter des asymétries épithalamiques marquées, et cela dès les stades embryonnaires (Concha et al., 2009; Snelson & Gamse, 2009; Roussigné et al., 2012).

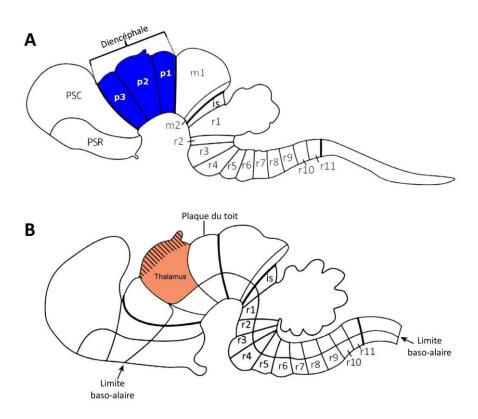


**Figure 19: Position phylogénétique du poisson-zèbre.** Le poisson-zèbre est un membre des téléostéens (vertébrés, Gnathostomes, Ostéichthyens, Actinoptérygiens). Sources des images : le requin *Carcharhinus melanopterus* (biodiversityexplorer.org); Primates, *Homo sapiens* (wikipédia.org); Esturgeon, *Acipenser fulvescens* (wikipedia.org); Poisson-zèbre, *Danio rerio* (ifr83.upmc.fr)

Ce paragraphe fait le point des mécanismes de développement des structures qui composent l'épithalamus chez cette espèce. Il décrit ensuite les asymétries observées chez cette espèce ainsi que les mécanismes cellulaires et génétiques qui contrôlent leur formation.

# 2.1. Spécification de l'épithalamus

L'épithalamus est une structure diencéphalique (Figure 20 A) et qui dans le modèle prosomérique d'organisation du cerveau embryonnaire (Puelles, 2001; Puelles, 2009) se forme à partir du thalamus, territoire le plus dorsal du prosomère 2 (Figure 20. B). Selon ce modèle, la glande pinéale et les habenulæ se forment à partir de deux subdivisions distinctes de ce prosomère, la plaque du toit et de la partie dorsale de la plaque alaire du prosomère 2 respectivement (Puelles *et al.*, 2013).



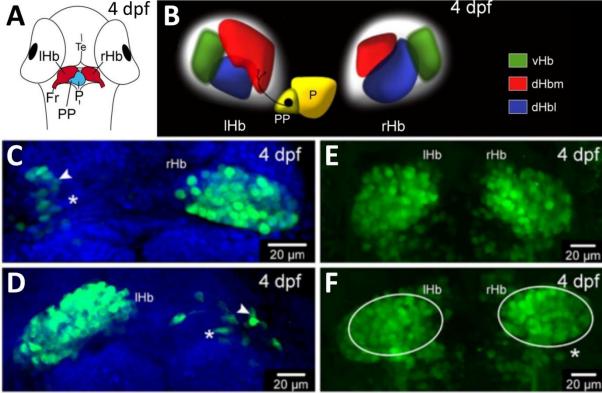
**Figure 20: Territoire de spécification de l'épithalamus.** Schémas en vue sagittale d'un cerveau de vertébré en développement montrant la position du prosomère 2 dans le diencéphale (A) et le territoire de ségrégation de l'épithalamus (hachures) situé dans la partie dorsale du thalamus (B) selon le modèle prosomérique. Ce modèle prosomérique est un modèle qui structure le cerveau en une série d'unités transverses appelées neuromères. is, isthmus; m1-2, mésomères 1 et 2; p1-3, prosomères 1 à 3; PSC, prosencéphale secondaire caudal; PSR, prosencéphale secondaire rostral; r1-11, rhombomères 1 à 11 (d'après Puelles *et al.*, 2013)

#### 2.1.1. Spécification des habenulæ

Chez le poisson-zèbre, les habenulæ dorsale et ventrale dérivent de deux populations cellulaires bilatérales distinctes qui apparaissent bien séparées dès deux jours après

fécondation. Les habenulæ dorsales se forment ainsi à partir d'un groupe de cellules situé dans la partie dorsale du prosomère 2 alors que les habenulæ ventrales dérivent d'une région plus postérieure et ventrale du prosomère 2, dans un territoire situé à la limite entre le thalamus et l'épithalamus appelée ThEPC (thalamic-epithalamic early projecting cluster) (Beretta *et al.*, 2013).

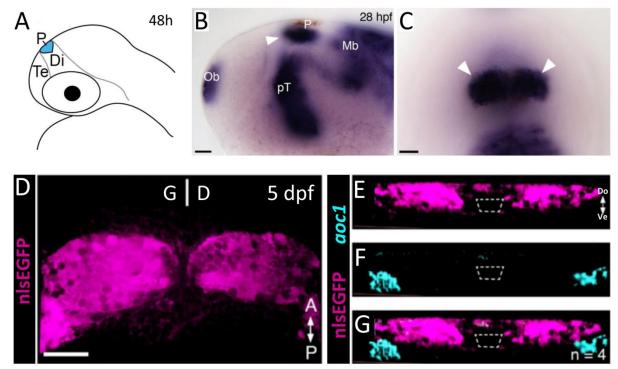
La population cellulaire du ThEPC dont les cellules des habenulæ ventrales sont issues, a pu être déterminée grâce à un lignage cellulaire précis et leur rôle dans la spécification des habenulæ confirmé par des expériences d'ablations. L'ablation des cellules situées de part et d'autre du complexe pinéal chez un embryon de 2 dpf montre, 48h après, une perte d'innervation des habenulæ vers l'IPN, indiquant une absence d'habenulæ dorsales. Cependant, chez ces embryons ablatés, la présence de cellules dans la partie latérale des habenulæ montre que les progéniteurs des habenulæ ventrales n'ont pas été touchés par l'ablation (Figure 21 C-D). À l'inverse, une ablation des cellules ThEPC chez un embryon à 2 dpf induit une perte des habenulæ ventrales à 4 dpf sans impacter les habenulæ dorsales (Figure 21 E-F) (Beretta *et al.*, 2013).



**Figure 21 : Spécification des habenulæ ventrales.** (A) Schéma d'une tête d'embryon de poisson-zèbre de 4 dpf en vue dorsale montrant la position de l'épithalamus (d'après Halpern *et al.*, 2003). (B) Schéma de l'épithalamus de poisson-zèbre en vue dorsale. (C-F) Habenulæ de poisson-zèbre à 4 dpf en vue dorsale chez un embryon Et(otpa:GFP) dont les cellules des habenulæ expriment la GFP (Beretta *et al.*, 2012), après ablation à 2dpf des habenulæ dorsales gauche (C) ou droite (D). Les astérisques montrent le côté où l'ablation a été effectuée et les flèches montrent des cellules GFP+ dans les parties latérales des habenulæ qui formeront les habenulæ ventrales chez l'adulte. Habenulæ de 4dpf chez un embryon Et(-1.0otpa:mmGFP)hd1 contrôle (E) ou ayant subit une ablation des cellules ThEPC (F). Les habenulæ sont entourées par des cercles qui pointent une perte de cellules sur le côté ablaté (montré par un astérisque). dpf, jours après fécondation; Fr, fasciculus retroflexus; lHb, habénula gauche; rHb, habénula droite; dHbm, partie médiale de l'habénula dorsale; dHbl, partie latérale de l'habénula dorsale; vHb, habénula ventrale; P, pinéale; PP, parapinéale; Te, Télencéphale. (d'après Beretta *et al.*, 2013)

La migration des progéniteurs des habenulæ ventrales du territoire ThEPC vers un territoire plus dorsal, adjacent aux habenulæ dorsales, a été montrée par Beretta *et al.* grâce à l'utilisation de protéines photoconvertibles. La formation des habenulæ ventrales implique également le gène *tcf7l2* (T cell factor 4), qui code un facteur de transcription appartenant à la famille d'effecteurs TCF de la voie de signalisation Wnt. Chez ces mutants *tcf7l2*, les habenulæ ventrales ne se forment pas en accord avec l'absence de migration de cellules à partir du territoire ThEPC, la perte de l'innervation du noyau raphé médian par les habenulæ ainsi que la perte de l'expression de *kiss-1*, utilisé comme marqueur des habenulæ ventrales. L'activité de Tcf7l2 étant

dépendante de l'environnement cellulaire, l'implication de la voie Wnt n'a pas été formellement établie dans la formation des habenulæ ventrales (Beretta *et al.*, 2013).



**Figure 22.: Spécification des habenulæ dorsales.** (A) Schéma d'une tête d'embryon de poisson-zèbre de 48h montrant la position de l'épithalamus en bleu (d'après Halpern *et al.*, 2003). Expression de *dbx1b* (en bleu) et d'*otx5* (en rouge) dans le diencéphale dorsal (flèches) d'un embryon de 28h en vue latérale (B) et dorsale (C), échelle : 10μm. (D-G) Le lignage des cellules *dbx1b*-positives (nlsEGFP) montre qu'elles donnent seulement naissance aux habenulæ dorsales. Visualisation à 5 dpf des cellules qui ont exprimé *dbx1b* (nlsEGFP) en vue dorsale (D). Visualisation des cellules qui ont exprimé *dbx1b* (E), expression d'*aoc1*, marqueur spécifique des habenulæ ventrales (F) en vue frontale, dorsale vers le haut. (G) fusion de (E) et (F) montrant que les territoires nlsEGFP-positifs et *aoc1*-positifs ne se superposent pas. Échelle : 50μm (Dean *et al.*, 2014). Di, diencéphale ; dfp, jours après fécondation ; hpf, heure après fécondation ; Ob, bulbe olfactif ; Mb, mésencéphale ; pT, préthalamus ; P, complexe pinéal ; Te, télencéphale (d'après Dean *et al.*, 2014).

Les habenulæ dorsales se forment donc à partir du territoire le plus dorsal du prosomère 2 et sous le contrôle de la voie des FGF (Concha et al., 2003 ; Regan et al., 2009 ; Dean et al., 2014). Les progéniteurs des habenulæ dorsales peuvent être visualisés dès la 24ème heure après fécondation par l'expression du facteur de transcription à homéodomaines dbx1b (devloping brain homeobox 1b) et se situent de part et d'autre du territoire exprimant otx5 (orthodenticle homolog 5), un marqueur du complexe pinéal (Figure 22 B-C) (Gamse et al., 2002). dbx1b est seulement exprimé dans les cellules en prolifération et un lignage cellulaire réalisé par Dean et al. avec un système recombinant Cre-lox a montré que les cellules qui forment des habenulæ

dorsales à 5 dpf ont toutes exprimé *dbx1b* au cours de leur phase de prolifération (Figure 22 D). Ce suivi des cellules *dbx1b*-positives jusqu'au stade larvaire (5 dpf) a également confirmé qu'elles ne participent pas à la formation des habenulæ ventrales (Figure 22 E-F). Enfin, l'expression de *fgf8a*, membre de la famille des facteurs de croissance des fibroblastes FGF (*fibroblast growth factor*), dans le diencéphale dorsal à 24hpf est nécessaire à l'initiation et au maintien de l'expression de *dbx1b* comme le montre la perte de son expression lors des traitements par l'inhibiteur des FGF, SU-5402 (Dean *et al.*, 2014).

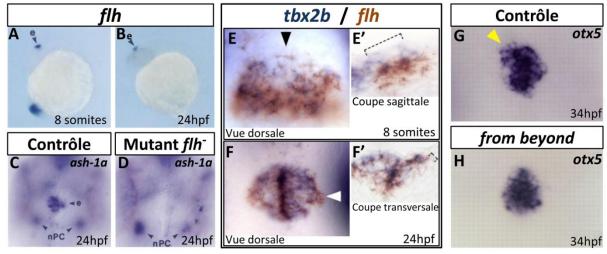
Une spécification correcte des habenulæ dorsales nécessite également la présence de Med12 (voir 2.1.2 ci-dessous pour plus de détails). Il a récemment été montré que chez un mutant Med12, l'expression de *dbx1b* était retardée de 24h perturbant la différenciation des habenulæ dorsales (Wu *et al.*, 2014).

### 2.1.2. Spécification du complexe pinéal

La formation du complexe pinéal se fait à partir d'un territoire dorsal et médian de l'épithalamus présomptif et se déroule en 3 temps. Dans un premier temps, ce territoire est spécifié par l'expression du gène *floating head (flh)*, qui code une protéine à homéodomaines. Dans un second temps, la glande parapinéale va se ségréger à partir de cellules situées dans le premier tiers le plus antérieur de ce territoire, les reste des cellules formant la pinéale. Enfin, la différentiation de ces glandes se fait dans un troisième temps mais ne sera que brièvement évoquée ici.

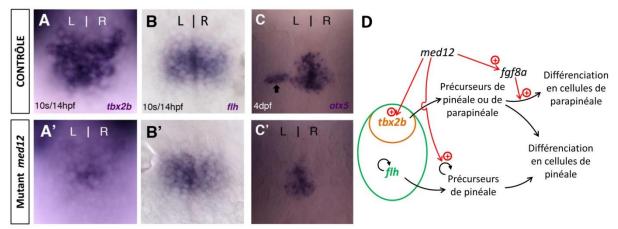
L'initiation de la neurogenèse dans la glande pinéale est régulée par le gène *floating head* (Figure 23 A-B). Chez les mutants présentant un défaut d'expression de ce gène, la neurogenèse s'arrête très tôt (stade 18 somites, environ 16 hpf) (Figure 23 C-D) et le nombre de cellules de la pinéale est très fortement réduit (Masai *et al.*, 1997). Au stade 18 somites, l'expression de ce gène délimite un territoire qui comprend l'ensemble des cellules qui vont participer à la

spécification du complexe pinéal. Le lignage cellulaire du complexe pinéal montre que sa portion la plus antérieure (premier tiers) donne naissance à des cellules de parapinéale et de pinéale, alors que la portion plus postérieure ne contribue qu'à donner des cellules de pinéale . Environ 4h après le début de l'expression de *flh*, le gène *tbx2b* (*T-box 2b*) commence à s'exprimer et leur colocalisation est observée au niveau du complexe pinéal présomptif antérieur (Figure 23 E-F) (Snelson *et al.*, 2008a; Snelson *et al.*, 2008b). L'expression de ces deux gènes recouvre l'étendue du complexe pinéal à 24 hpf (Figure 23 F-F'). Le gène *tbx2b* est nécessaire pour la spécification de la parapinéale (Snelson *et al.*, 2008a) mais pas pour sa différenciation. En effet, les cellules qui expriment *tbx2b* ont le potentiel pour se différencier en cellules photoréceptrices de pinéale ou en cellules de parapinéale. C'est l'expression de *fgf8a*, qui, en agissant en parallèle et indépendamment de *tbx2b*, induit la différentiation des cellules compétentes du complexe pinéal en cellules de parapinéale (Clanton *et al.*, 2013).



**Figure 23 : Spécification du complexe pinéal.** Expression de *flh* chez un embryon de stade 8 somites (A) et de 24h (B) en vue latérale. Expression d'*ash-1a*, gène proneural, chez un embryon contrôle de 24h (C) et un embryon avec une mutation du gène *flh* au stade 24h (D) en vue dorsale. L'absence d'expression d'*ash-1a* montre qu'il n'y a pas de neurogenèse dans le complexe pinéal du mutant *flh* à 24hpf (Cau *et al.*, 2003). e, épiphyse ; nPC, noyaux de la commissure postérieure ; hpf, heures après fécondation (d'après Masai *et al.*, 1997). (E-F') Expressions de *tbx2b* (en bleu) et de *flh* (en rouge) dans le complexe pinéal d'un embryon de stade 8 somites (E-E') et de 24 hpf (F-F') en vue dorsale (E; F). Les noyaux du complexe pinéal coexpriment *tbx2b* et *flh* sauf dans la région dorsale montrée par un crochet sur la coupe sagittale (E') réalisée au niveau de la flèche noire de (E) et dans les régions ventrale et latérale montrée par un crochet sur la coupe transversale (F') réalisée au niveau de la flèche blanche de (F). (G-H) Perte de la parapinéale chez un embryon muté au niveau du gène *tbx2b*, mutant *from beyond*, (H) par rapport à un contrôle (G) révélée par l'expression d'*otx5* à 34hpf en vue dorsale. La présence de la parapinéale est montrée par une flèche chez l'embryon contrôle (d'après Snelson *et al.*, 2008a)

Un autre régulateur important de la spécification du complexe pinéal est le médiateur, un complexe protéique clé dans la régulation de la transcription chez les eucaryotes. Il fait le lien entre l'ARN polymérase II et les facteurs de transcription et joue donc un rôle majeur dans la régulation des gènes de développement (Hentges, 2011). La mutation du gène med12 chez le poisson-zèbre provoque de nombreux défauts développementaux et en particulier au niveau de l'épithalamus; Med12 a notamment un rôle crucial lors de la spécification de la parapinéale. Wu et al. ont montré que la spécification de la parapinéale nécessitait l'activité de tbx2b dans une fenêtre de temps réduite (environ 5h) pendant laquelle les cellules sont compétentes pour se différencier en cellules de parapinéale. Med12 est nécessaire pour que tbx2b soit exprimé dans la bonne fenêtre temporelle ainsi que pour l'activation de la signalisation FGF (Figure 24 A-A'). Chez le mutant med12, une expression de tbx2b est bien observée mais elle débute trop tard pour avoir une influence sur le destin des cellules de la pinéale. Le rôle de Med12 semble donc être de permettre une expression plus rapide de tbx2b en activant l'ARN polymérase II. En plus de ses rôles sur la spécification de la parapinéale et des habenulæ, Med12 est nécessaire au maintien de la maturation des photorécepteurs et des projections neurales de la pinéale initiée par flh. En revanche, on n'observe pas de différence dans l'expression du gène flh chez les mutants med12, ce qui implique qu'il n'a pas de rôle, a priori, dans l'initiation de la maturation des cellules de pinéale (Figure 24 B-B') (Wu et al., 2014).



**Figure 24 : Rôle de Med12 dans la spécification de la parapinéale.** (A-A') Expression de *tbx2b* au niveau du complexe pinéal chez un embryon contrôle (A) et chez un mutant *med12* (A') de 14hpf. (B-B') Expression de *flh* au niveau du complexe pinéal chez un embryon contrôle (B) et chez un mutant *med12* (B') de 14hpf. Contrairement à l'expression de *flh*, l'expression de *tbx2b* est plus faible chez le mutant

*med12*. Cela se traduit par une perte de la parapinéale chez le mutant *med12* (C-C') à 4dpf. L'expression d'*otx5* permet de visualiser une parapinéale chez un embryon contrôle (flèche C) qui n'est pas observée chez le mutant *med12* (C'). (d'après Wu *et al.*, 2014). (D) Schéma montrant les différentes implications de *med12* dans la spécification de la pinéale et de la parapinéale.

Au cours de l'embryogenèse, les cellules de la parapinéale sont donc spécifiées à partir de précurseurs situés dans la partie antérieure du complexe pinéal. Ces cellules de parapinéale migrent par la suite pour se fixer au contact de l'habénula gauche (Regan *et al.*, 2009). La description précise de ces mécanismes (présentés ci-dessous) a démontré le rôle prépondérant de cette migration latéralisée de la parapinéale dans l'établissement des asymétries habénulaires.

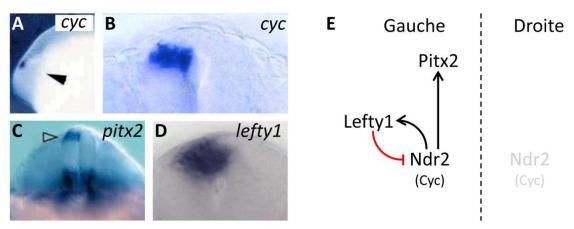
# 2.2. Mécanismes d'établissement des asymétries chez le poisson-zèbre

Ces mécanismes ont fait l'objet de très nombreuses études chez le poisson-zèbre depuis plus de 15 ans et ont conduit à trois conclusions principales. Tout d'abord, une asymétrie précoce de la voie Nodal est observée dans le tube neural mais elle n'est pas nécessaire à l'établissement des asymétries épithalamiques définitives. La glande parapinéale et sa migration jouent en revanche un rôle crucial dans leur formation, via un mécanisme qui reste à élucider. Enfin, les programmes génétiques impliqués ont été en partie élucidés et ils font intervenir notamment les voies Notch et Wnt. Ces trois aspects sont décrits en détail ci-dessous.

### 2.2.1. Les asymétries précoces : un double rôle pour la voie Nodal

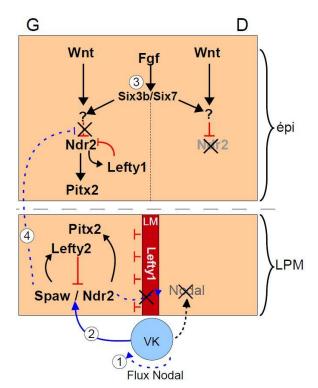
#### a) Une expression asymétrique précoce de la voie Nodal dans le diencéphale dorsal

A la suite des travaux pionniers de Levin *et al.* en 1995 (Levin *et al.*, 1995), de nombreuses études ont démontré l'implication de Nodal, un ligand appartenant à la superfamille des TGF-β (*Transforming Growth Factor-Beta*), dans la formation des asymétries viscérales de chez les différentes espèces modèles de vertébrés (Collignon *et al.*, 1996 ; Lowe *et al.*, 1996 ; Meno *et al.*, 1996 ; Lohr *et al.*, 1997 ; Rebagliati *et al.*, 1998 ; Raya & Izpisúa Belmonte, 2006). Au niveau du diencéphale dorsal du poisson-zèbre, l'asymétrie la plus précoce observée à ce jour correspond à une expression latéralisée de composants de la voie Nodal dès le stade 20 somites, comprenant Ndr-2 [*Nodal-related gene 2* aussi appelé Cyclops (Cyc)] (Figure 25 A et B), Lefty1, un membre des TGF-β impliqué dans une boucle de rétrocontrôle négatif de Nodal (Figure 25 D) (Chen & Shen, 2004 ; Cheng *et al.*, 2004 ; Shen, 2007) et Pitx2c, une des isoformes résultant d'un épissage alternatif du facteur de transcription Pitx2, cible de la voie dans les asymétries viscérales (Campione *et al.*, 1999 ; Schweickert *et al.*, 2000) (Figure 25 C).



**Figure 25:** Expression des composants de la voie Nodal dans l'épithalamus de poisson-zèbre. Images de l'épithalamus gauche de poisson-zèbre montrant l'expression de *ndr2* (ou *cyc*) en vue latérale (A) (d'après Long *et al.*, 2003) et en vue dorsale (B) (d'après Concha *et al.*, 2000), de *pitx2* en vue dorsale (C) (d'après Liang *et al.*, 2000) et de *lefty1* en vue dorsale (D) (d'après Carl *et al.*, 2007). (E) Schéma du module Nodal/Lefty/Pitx2. L'expression de *nodal* dans l'épithalamus gauche induit l'expression de *pitx2* et de *lefty1*, antagoniste de Nodal.

Les mécanismes contrôlant cette expression unilatérale ont été en partie élucidés. Elle nécessite tout d'abord l'activité de southpaw (ndr3), un des trois paralogues de Nodal chez le poisson-zèbre (Fan & Dougan, 2007), qui est exprimé dans le mésoderme latéral gauche (Long et al., 2003). Le mécanisme d'action de Southpaw reste à démontrer mais pourrait impliquer sa diffusion du mésoderme latéral jusqu'à l'épithalamus, Nodal étant connu pour agir comme un morphogène. L'expression asymétrique de la voie Nodal résulte également de la levée, du côté gauche, d'une répression bilatérale médiée par les facteurs de transcription Six3b/Six7. La perte de fonction de ces deux gènes conduit en effet à une expression bilatérale des composants de la voie Nodal dans le diencéphale (Inbal et al., 2007). L'expression diencéphalique de ces deux gènes est elle-même dépendante d'une activité FGF et en accord avec ces données, l'abolition de la signalisation FGF par l'utilisation de l'antagoniste du récepteur SU5402 résulte en une expression bilatérale de lefty1 (Neugebauer & Yost, 2014). Enfin, l'expression asymétrique précoce de la voie Nodal dans le diencéphale fait intervenir la voie Wnt puisque chez le mutant masterblind, muté au niveau du gène axine1, un inhibiteur de la voie Wnt, une expression bilatérale de *lefty1* est induite (Carl *et al.*, 2007). L'effet de cette mutation est indépendant de l'activité de southpaw, ce qui a conduit à un modèle dans lequel la répression de la voie Wnt par l'Axine1 dans le diencéphale, a pour effet une répression bilatérale de la voie Nodal jusqu'à ce qu'un signal Southpaw, issu du mésoderme latéral gauche, permette la levée de cette répression à gauche uniquement (Figure 26) (Carl *et al.*, 2007).



**Figure 26:** Schéma montrant les asymétries moléculaires chez le poisson-zèbre. Un flux Nodal qui casse la symétrie bilatérale de l'embryon est créé au niveau de la vésicule de Kupffer (VK) (1). Cela entraîne l'expression d'un module Nodal/Pitx2 dans le mésoderme latéral gauche (2) (Mercola & Levin, 2001; Hirokawa *et al.*, 2006). La diffusion des ligands Nodal vers le LPM droit est empêchée par l'expression d'antagonistes dans la ligne médiane (Bisgrove *et al.*, 1999; Lenhart *et al.*, 2011).

Au niveau de l'épithalamus, les voies Wnt et FGF inhibent la voie Nodal, la voie des FGF en régulant l'expression des gènes six3b / six7 (3). Aucune interaction n'a pu être établie entre les voies Wnt et FGF. La répression par six3b/six7 et la voie Wnt est levée, à gauche uniquement, par l'activité de southpaw (spaw) (Long et al., 2003) (4). spaw n'est exprimé que dans le LPM gauche et son mode d'action dans l'épithalamus est encore inconnu. D, droite; G, gauche; epi, épithalamus; LM, ligne médiane; LPM, mésoderme latéral; VK, vésicule de Kupffer

#### b) Rôle de la voie Nodal dans la directionnalité des asymétries épithalamiques

Le rôle de la voie Nodal a été étudié grâce à des mutants qui présentent soit une absence d'expression de la voie Nodal soit une expression bilatérale de celle-ci; des inhibiteurs spécifiques de la voie Nodal/Activine, SB-431542 (Inman *et al.*, 2002) et SB-505124 (DaCosta Byfield *et al.*, 2004), ou des morphants visant à inhiber des acteurs-clés de cette voie (morphants Spaw, absence d'expression ou les morphants *no tail*, expression bilatérale) (Concha *et al.*, 2000; Concha *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2003). Les analyses des phénotypes résultant de ces mutations ou inhibitions, se sont dans un premier temps concentrées sur deux aspects, la migration de la glande parapinéale et le patron moléculaire des habenulæ observés à des stades plus avancés de leur différenciation (à partir de 72 hpf). Chez tous les mutants, ou morphants, qui présentent un défaut d'expression de la voie Nodal, les analyses ont montré un maintien des asymétries de ces deux structures. Toutefois, la directionnalité de ces asymétries est randomisée, que la voie Nodal

soit inhibée ou qu'elle soit exprimée bilatéralement. Ces asymétries passent ainsi d'une latéralisation à 95% vers la gauche chez les individus sauvages à un taux équivalent entre la gauche et la droite de 50-50 chez les embryons mutants (Figure 27)(Concha *et al.*, 2000 ; Liang *et al.*, 2000 ; Long *et al.*, 2003).

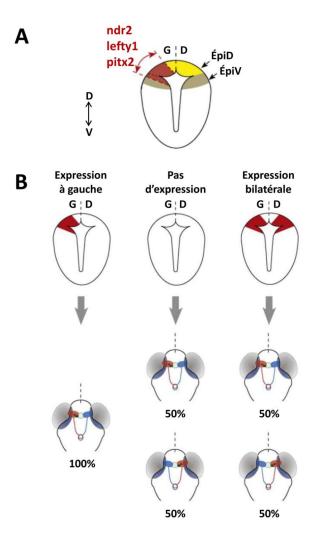


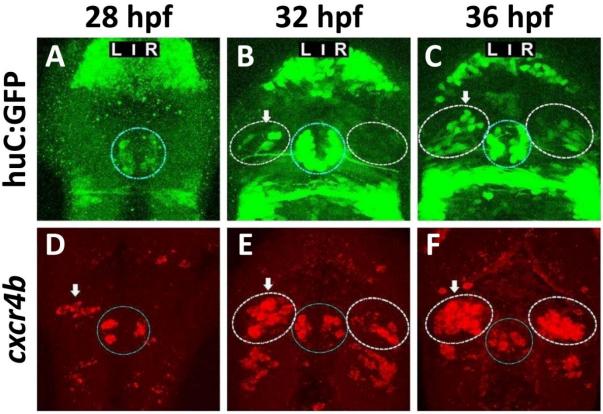
Figure 27: Rôle de la voie Nodal contrôle dans le de directionnalité des asymétries épithalamiques. (A) Schéma d'une vue transversale de l'épithalamus présomptif de poisson-zèbre à 24hpf montrant, en rouge, le territoire d'expression des gènes appartenant à la voie Nodal, ndr2 (cyc), lefty1 et pitx2 sur le côté gauche. Une analyse du devenir cellulaire indique expression asymétrique de la voie Nodal au niveau de l'épithalamus dorsal (ÉpiD, en jaune) et ventral (ÉpiV, en beige).

(B) La directionnalité des asymétries épithalamiques est déterminée par l'expression latéralisée de la voie Nodal. En cas d'absence d'expression ou d'expression bilatérale, la directionnalité des asymétries devient aléatoire, 50% à gauche et 50% à droite (d'après Concha et al., 2009).

Ces données démontrent ainsi que la voie de signalisation Nodal n'est pas essentielle à l'établissement des asymétries épithalamiques chez le poisson-zèbre mais plutôt qu'elle joue un rôle de biais dans la direction de l'asymétrie.

#### c) Rôle de la voie Nodal dans la neurogenèse asymétrique précoce

Si la voie Nodal n'est pas nécessaire à l'établissement proprement dit des asymétries épithalamiques observées plus tardivement, des travaux ont tout de même démontré qu'elle contrôle une asymétrie précoce de la neurogenèse (Roussigné *et al.*, 2009). Chez le poissonzèbre, l'expression de la protéine HuC, marqueur classique de neurogenèse (Marusich *et al.*, 1994), débute à 32 hpf au niveau du diencéphale dorsal gauche uniquement. Cette expression est par la suite observée des deux côtés à 36hpf (Figure 28 A-C). Cette expression d'HuC est ellemême précédée par une expression plus ventrale mais également asymétrique de *cxcr4b* (chemokine receptor 4b) (Figure 28 D-F), qui colocalise avec celle de gènes proneuraux, membres de la famille des facteurs de transcription à motif basique hélice-boucle-hélice (bHLH), tels que *neurogenin1* (*ngn1* ou *neurog1*) et *achaete-scute complex-like 1b* (*ascl1b*). L'expression de ces gènes proneuraux est nécessaire et suffisante pour la formation des neurones (Bertrand *et al.*, 2002), ces données suggèrent fortement que les cellules qui expriment *cxcr4b* sont des précurseurs et/ou des neurones récemment générés des habenulæ (Roussigné *et al.*, 2009).



**Figure 28:** neurogenèse asymétrique des habenulæ. (A-C) images en vue dorsale des habenulæ de poisson-zèbre montrant l'expression d'huC à 28 hpf (A), 32 hpf (B) et 36 hpf (C). (D-F) images en vue dorsale des habenulæ de poisson-zèbre montrant l'expression de *cxcr4b* à 28 hpf (D), 32 hpf (E) et 36 hpf (F). Les cercles en pointillé délimitent la pinéale (en bleu) ou les habenulæ (en blanc). Les flèches montrent les expressions asymétriques de *huC* (B-C) et de *cxcr4b* (D-F). (d'après Roussigné *et al.*, 2009)

Cette neurogenèse asymétrique est perdue ou fortement réduite chez des embryons présentant une inhibition de l'activité Nodal, soit après injection de morpholinos dirigées contre *spaw* ou *no tail*, soit par traitement pharmacologique à l'aide de l'antagoniste SB431542 (Figure 29 B). Ces données indiquent donc que la voie de signalisation Nodal contrôle une asymétrie de la neurogenèse qui intervient très précocement dans la formation des habenulæ du poissonzèbre (Roussigné *et al.*, 2009).

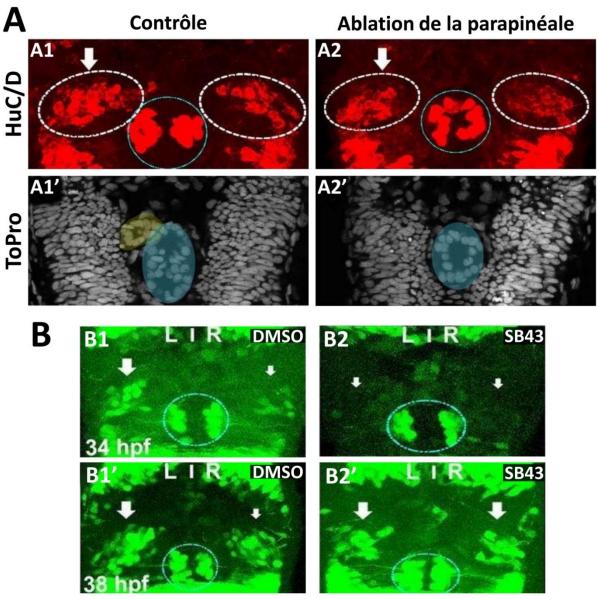


Figure 29: neurogenèse asymétrique dépendante de la voie Nodal mais indépendante de la migration de la parapinéale. (A) Rôle de la parapinéale sur la neurogenèse asymétrique des habenulæ. La neurogenèse est déterminée par la présence d'HuC/D chez l'embryon contrôle (A1) ou ayant subi une ablation de la parapinéale (A2). Une neurogenèse asymétrique est toujours observée en cas d'ablation de la parapinéale (A2 & A2') comparée au contrôle (A1 & A1'). Les flèches pointent la plus forte concentration d'HuC/D dans les habenulæ (cercles en pointillés blancs) (A1 & A2). Les noyaux sont révélés par le marqueur ToPro, la pinéale est en bleu et la parapinéale en jaune (A1' & A2') (B)

Projections confocales de l'épithalamus d'embryons transgéniques Tg(huC:gfp) incubés avec du DMSO (B1-B1') ou avec l'inhibiteur SB431542, spécifique de la voie Nodal (B2-B2'). Les flèches montrent que l'inhibition de la voie Nodal induit une perte de la neurogenèse asymétrique (B2-B2') comparée au contrôle (B1-B1'). (d'après Roussigné *et al.*, 2009)

En conclusion, la voie Nodal joue un double rôle dans la formation des asymétries du système nerveux antérieur. D'abord, elle influence la directionnalité des asymétries épithalamiques mais non leur formation et par la suite, elle est requise pour l'établissement d'une asymétrie neurogénétique précoce dans le diencéphale dorsal. Ces observations conduisent également à la conclusion que chez le poisson-zèbre, cette asymétrie précoce de la neurogenèse dépendante de Nodal, n'est pas essentielle pour l'établissement des asymétries habénulaires observées *in fine*.

# 2.2.2. Rôle clé de la parapinéale et de sa migration dans l'établissement des asymétries épithalamiques

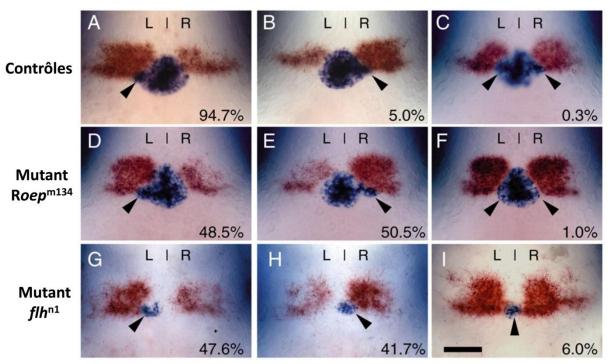
Si la formation des asymétries habénulaires observées ne dépend pas de la voie Nodal chez le poisson-zèbre, un rôle clé est par contre joué dans ce processus par la glande parapinéale. Ce rôle, notamment celui de sa migration latéralisée, a été démontré par plusieurs types d'approches décrites ci-dessous.

#### a) Une corrélation entre la formation des asymétries de la parapinéale et des habenulæ

La première indication de ce rôle provient d'études sur des embryons sauvages et mutants, qui ont fortement suggéré un couplage entre la formation des asymétries habénulaires et la migration de la parapinéale. Comme indiqué ci-dessus, chez le poisson-zèbre, 95% des embryons présentent une latéralité gauche, celle-ci étant inversée dans 5% des cas. Les asymétries de la parapinéale et des habenulæ, respectivement repérées à l'aide de marqueurs tels que *otx5* et *kctd12.1* (ou *lov*), ont une latéralité qui apparait toujours couplée au sein de la population. Cette corrélation est également observée chez les différents mutants qui présentent des défauts dans l'expression de la voie Nodal (Figure 30) (Gamse *et al.*, 2003). C'est le cas chez

les mutants *one eyed pinhead (oep)*, dont la voie de signalisation Nodal n'est pas fonctionnelle. Malgré la létalité de cette mutation, ces mutants *oep* peuvent être sauvés grâce à une injection d'ARNm *oep* au stade une cellule (Mutants Roep) (Yan et al., 1999). Ce sauvetage ne restaure cependant pas l'expression diencéphalique de la voie Nodal. Chez ces mutants Roep, la directionnalité des asymétries est randomisée mais on retrouve tout de même un couplage entre le côté où se situe la parapinéale et la direction des asymétries habénulaires (à gauche ou à droite dans 50% des cas) (Figure 30 D) (Gamse *et al.*, 2003).

Enfin, dans le cas d'habenulæ possédant un isomérisme gauche (comme c'est le cas chez une très faible proportion d'individus sauvages), deux parapinéales sont retrouvées à côté de chacune des deux habenulæ (Figure 30 C).



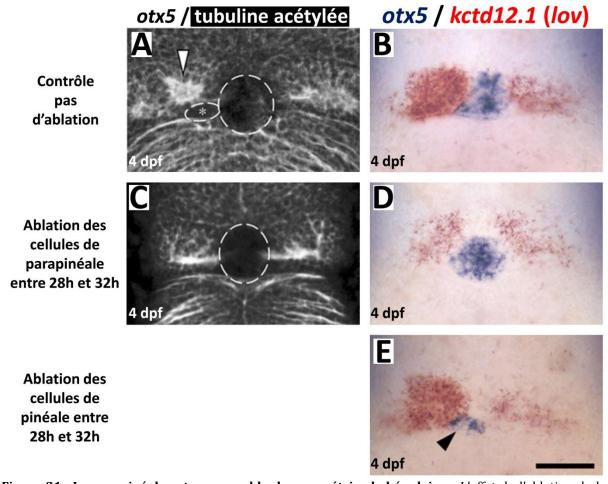
**Figure 30 :** Corrélation entre la position de la parapinéale et la directionnalité des asymétries habénulaires. Expressions à 4 jours après fécondation de *kctd12.1* (en rouge) et d'*otx5* (en bleu) dans l'épithalamus de poisson-zèbres contrôles (A-C), mutés au niveau du gène *oep* (D-F) ou mutés au niveau du gène *flh* (G-I). Chez les contrôles, comme le montre l'expression de *kctd12.1*, l'habénula gauche, située près de la parapinéale (flèche), est plus grosse chez environ 95% des individus (A). Chez 5% des individus, une inversion est observée (parapinéale et habénula plus grosse à droite) (B) et dans de très rares cas, 0,3% des contrôles, deux parapinéales sont observées, accompagnées de deux habenulæ « gauches » (isomérisme gauche) (C). En cas de randomisation des asymétries habénulaires (Mutant R*oep*), la parapinéale se situe près de l'habénula qui exprime plus fortement *kctd12.1* (D-E). Un isomérisme gauche est aussi observé dans 1% des cas (F). Le mutant *flh*, dépourvu de pinéale, présente quand même une latéralisation de l'épithalamus (G-H). Dans 6% des cas, la parapinéale occupe une position centrale et les

deux habenulæ expriment fortemant kctd12.1. Les flèches noires pointent la position de la parapinéale. L, gauche; R, droite. Échelle:  $50\mu m$  (Concha et al., 2003).

L'hypothèse d'un rôle de la pinéale dans la mise en place de ces asymétries a été écartée avec l'utilisation de mutants *floating head* (*flh*) dont le complexe pinéal ne comprend qu'une parapinéale. Chez ces mutants, les asymétries habénulaires sont dirigées dans un peu moins de 50% des cas vers la gauche (Figure 30 G) et un peu plus de 40% vers la droite (Figure 30 H). Par ailleurs, dans 6% des cas, la parapinéale est sur la ligne médiane et un isomérisme gauche est observé au niveau des habenulæ (Figure 30 I) (Concha *et al.*, 2003).

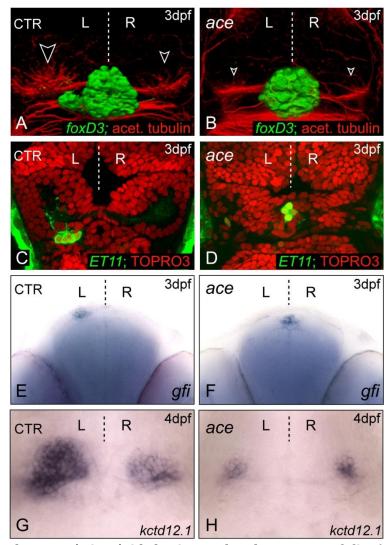
#### b) Des asymétries habénulaires dépendantes de la parapinéale et de sa migration

Les couplages décrits ci-dessus résultent en fait d'un contrôle exercé par la parapinéale sur les habenulæ. Cette dépendance a été démontrée directement par des ablations précises des cellules formant la parapinéale avant sa migration (partie antérieure du complexe pinéal). Ce type d'expérience résulte en effet en un isomérisme droit au niveau des habenulæ, caractérisé par une moindre densité du neuropile (Figure 31 C) et une expression relativement faible de *kctd12.1* dans l'habénula gauche (Figure 31 D) comparée au contrôle ; ce phénotype est l'inverse de celui observé précédemment dans le cas où deux parapinéales sont présentes de part et d'autre de la glande pinéale (Figure 30 C et F) (Concha *et al.*, 2003).



**Figure 31:** La parapinéale est responsable des asymétries habénulaires. L'effet de l'ablation de la parapinéale avant sa migration (entre 28 et 32 hpf) sur les asymétries habénulaires est déterminé par le marquage de la tubuline acétylée (A; C) et les expressions d'*otx5* et de *kctd12.1* (B; D; E). (A-B) embryons contrôles sans ablation de la parapinéale, (C-D) embryon dont les cellules de la parapinéale ont été ablatées, (E) embryon contrôle ayant subi une ablation de la pinéale. La flèche blanche pointe la forte densité du neuropile dans l'habénula gauche, la parapinéale est indiquée par une étoile (A). Les cercles en pointillé délimitent les contours de la pinéale et de la parapinéale (A et C). dpf, jours après fécondation. Échelle : 50μm (Concha *et al.*, 2003).

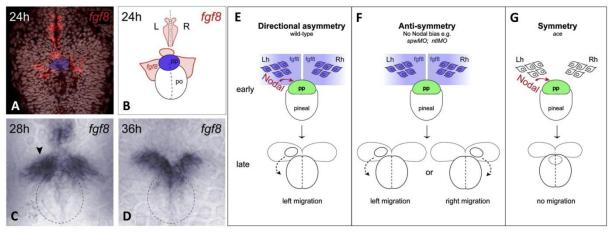
D'autres arguments confirment l'implication de la parapinéale et de sa migration dans la formation des asymétries habénulaires. Déjà impliquée dans sa différentiation, la migration latéralisée de la glande parapinéale est, en effet, dépendante de la voie des FGF comme le démontrent les études sur les mutants fgf8a<sup>ti282</sup> (acerebellar /ace), les morphants fgf8a ou des traitements pharmacologiques à l'aide de l'antagoniste SU5402 (Figure 32) (Regan et al., 2009). Chez ces embryons déficients pour l'activité FGF, le défaut de migration de la parapinéale est ainsi clairement visualisé à l'aide du marqueur spécifique de parapinéale Gfi1.2 (Figure 32 E-F). Il s'accompagne dans tous les cas d'une perte des asymétries épithalamiques, avec un isomérisme droit (Figure 32 A-D; G-H) (Regan et al., 2009).



**Figure 32 : Perte des asymétries épithalamiques chez les mutants** *fgf8a* (*ace*). (A-D) Images confocales d'épithalamus en vue dorsale d'embryons contrôles (A ; C) ou mutants *ace* (B ; D) à 3 dpf. (A-B) Reconstruction 3D du complexe pinéal [en vert, Tg(foxD3:GFP)] et du neuropile des habenulæ (en rouge, tubuline acétylée). (C-D) positionnement à gauche de la parapinéale [en vert, Tg(ET11:GFP)] chez un embryon contrôle (C) et au niveau de la ligne médiane chez un mutant *ace* (D) à 3 dpf. Les noyaux sont marqués en rouge (TOPRO3). (E-F) Expression de *gfi1.2*, marqueur spécifique des cellules de parapinéale, chez un embryon contrôle (E) et un mutant *ace* (F) à 3 dpf. (G-H) expression asymétrique de *kctd12.1* dans les habenulæ d'un embryon contrôle (G) et symétrique chez un embryon *ace* (H) de 4 dpf. dpf, jours après la fécondation ; L, gauche ; R, droite (d'après Regan *et al.*, 2009).

En revanche, il est à noter que l'ablation de la parapinéale n'affecte pas la neurogenèse asymétrique précoce dépendante de l'activité Nodal et décrite ci-dessus. Cette neurogenèse asymétrique débute en fait avant la migration latéralisée de la parapinéale, puisque l'expression gauche de *cxcr4b* est observée dès 28 hpf, à un stade où la parapinéale est encore située au niveau de la ligne médiane. Par ailleurs, une neurogenèse asymétrique, révélée par le plus grand nombre de cellules HuC/D-positive dans l'habénula gauche est maintenue à 36-38hpf, après une

ablation des cellules de la parapinéale réalisée avant le début de sa migration (Figure 29 A) (Roussigné *et al.*, 2009).

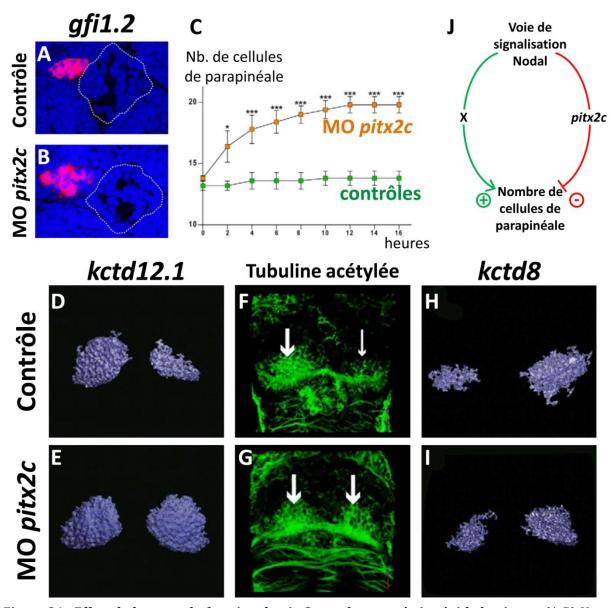


**Figure 33 :** *fgf8a* **est impliqué dans la migration de la parapinéale.** (A-D) Expression légèrement asymétrique de *fgf8a*, en vue dorsale. (A) Expression à 24h, l'expression de fgf8a est en rouge, les noyaux sont marqués par TOPRO3 (en gris), le territoire présomptif de la parapinéale est colorié en bleu. (B) Schéma de l'expression de *fgf8a* à 24h. (C-D) Expression de *fgf8a* à 28h (C) et à 36h (D). (E-F) Schémas représentant les rôles de la voie Nodal et de *fgf8a* dans la migration de la parapinéale. (E) Migration vers la gauche chez le contrôle. (F) Randomisation de la migration de la parapinéale en cas d'une perte d'expression asymétrique de la voie Nodal. (G) Pas de migration latéralisée de la parapinéale en cas de perte de l'expression de *fgf8a* (d'après Regan *et al.*, 2009).

# c) Influence de la taille de la parapinéale : des interactions réciproques entre la voie Nodal et sa cible *pitx2c*

Les données présentées précédemment démontrent clairement que la formation des asymétries habénulaires est strictement dépendante de la glande parapinéale. Une étude récente (Garric *et al.*, 2014) montre que la régulation de la taille de la parapinéale est importante pour l'élaboration des asymétries habénulaires et que de façon inattendue, elle implique la voie Nodal via des interactions antagonistes entre Nodal et une de ses cibles. Ces travaux reposent sur l'étude fonctionnelle de *pitx2c*, dont l'expression asymétrique dans le diencéphale dorsal, est sous le contrôle de la voie Nodal. Ces travaux démontrent que chez les morphants *pitx2c*, le nombre de cellules qui expriment *gfi1.2* est significativement plus élevé (Figure 34 A-B). Cette augmentation est liée à des divisions cellulaires surnuméraires intervenant après le début de la migration de la parapinéale (Figure 34 C). En accord avec l'implication d'un signal issu de la parapinéale contrôlant l'acquisition de l'identité habénulaire gauche et qui serait augmenté chez

ce morphant *pitx2c*, on observe une isomérisation gauche partielle, avec l'acquisition par l'habénula droite d'un certain nombre de caractères gauches. Le marqueur d'asymétries habénulaires *kctd12.1* est, par exemple, plus exprimé dans l'habénula droite chez ces morphants en comparaison avec les contrôles (Figure 34 D-E). Pareillement, le neuropile est plus développé dans l'habénula droite se rapprochant phénotypiquement de celui de l'habénula gauche (Figure 34 F-G). Cette isomérisation partielle est également marquée par le maintien de l'expression de *kctd8* à droite (Figure 34 H-I).



**Figure 34 : Effets de la perte de fonction de pitx2c sur les asymétries épithalamiques**. (A-B) Vues dorsales d'épithalamus montrant l'expression de *gfi1.2* (en rouge) chez un contrôle (A) et un morphant *pitx2c* (B). La pinéale est délimitée par des pointillés blancs. (C) évolution du nombre de cellules de parapinéale au cours de sa migration chez des embryons contrôles (vert, n=5) et des morphants *pitx2c* (orange, n=5) en fonction du temps (en heures). \*P>0.1 ; \*\*\*\*P>0.001. (D-I) Isomérisme gauche partiel des

habenulæ de morphants *pitx2c* (D;F;H) par rapport aux embryons contrôles (E;G;I). Expression de *kctd12.1* chez un contrôle (D) et un morphant *pitx2c* (E) en vue dorsale (reconstruction volumique). Réduction de l'asymétrie du neuropile (tubuline acétylée en vert) chez un morphant *pitx2c* comparé à un contrôle (G). Expression de *kctd8* chez un contrôle (H) et un morphant *pitx2c* (I) en vue dorsale (reconstruction volumique). (J) Modèle représentant l'antagonisme entre Nodal et Pitx2c pour réguler le nombre de cellules de la parapinéale. Pitx2c, activé par Nodal, limite le nombre de cellules de la parapinéale alors que dans le même temps, un second effecteur de la voie Nodal (X) induit une augmentation de ce nombre (d'après Garric *et al.*, 2014).

Ces observations peuvent néanmoins paraître surprenantes par le fait que *pitx2c* soit connu comme étant une cible de la voie Nodal et que son inactivation n'affecte pas la formation des asymétries habénulaires. La voie Nodal exerce, en fait, un double contrôle, dont les effets sont opposés, sur le nombre de cellules de la parapinéale. Un seul de ces deux contrôles est médié par *pitx2c*, l'autre se faisant indépendamment de ce gène. Des traitements reposant sur l'utilisation de l'antagoniste SB-431542 conduisent ainsi sur un fond génétique de type sauvage à une réduction significative du nombre de cellules de la parapinéale, un phénotype inverse que celui qui est induit par l'inactivation de *pitx2c*. De plus, un traitement au SB-431542 chez des embryons morphants pour Pitx2c permet de restaurer un phénotype sauvage, avec un nombre de cellules de parapinéale comparable à celui observé chez un embryon sauvage (Figure 34 J) (Garric *et al.*, 2014).

# 2.3. Morphogenèse asymétrique des habenulæ

Si le signal issu de la parapinéale et essentiel à la formation des asymétries épithalamiques doit encore être identifié, les mécanismes et les acteurs génétiques qui contrôlent ce processus en aval de sa migration ont été partiellement caractérisés. Ces études ont été ciblées sur différents aspects de la neurogenèse, dont les choix de destins cellulaires, la formation du neuropile et l'organisation des progéniteurs neuraux.

# 2.3.1. Une régulation asymétrique de la neurogenèse et des choix de destin cellulaire entre les habenulæ gauche et droite

Comme indiqué ci-dessus, les asymétries majeures observées entre les habenulæ dorsales gauche et droite du poisson-zèbre, proviennent de différences au niveau de la taille entre le sous-domaine latéral (plus grand à gauche) et le sous-domaine médial (plus grand à droite). Le contrôle génétique de ces différences entre la droite et la gauche ont été partiellement élucidés. Ils proviennent d'une asymétrie de la neurogenèse couplée à une régulation temporelle des choix de d'identité neuronale.

#### a) Une neurogenèse et des choix de destins cellulaires asymétriques

Bien que de volume différent chez l'adulte (Villalón *et al.*, 2012), les habenulæ dorsales gauche et droite possèdent le même nombre de cellules chez les larves de 5 jours. À ce stade, les sous-domaines des habenulæ de la larve ont une organisation comparable à celle de l'adulte (Aizawa *et al.*, 2007) et le nombre de cellules qui les compose diffère entre la droite et la gauche (Figure 35 A). Des analyses de la neurogenèse reposant sur des expériences d'incorporation de BrdU ont joué un rôle crucial dans la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la formation de ces asymétries habénulaires.

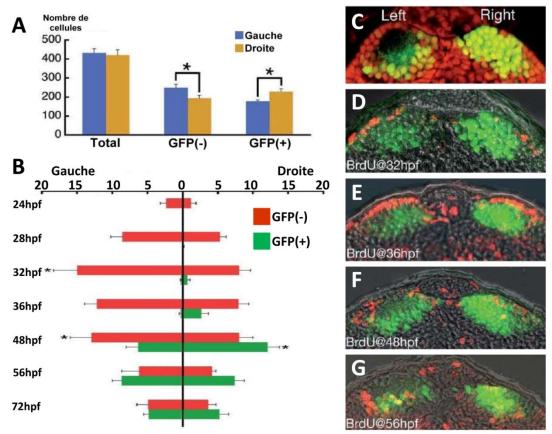


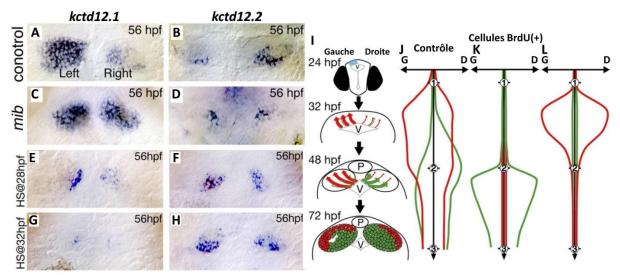
Figure 35: Les sous-domaines habénulaires sont déterminés par une neurogenèse asymétrique. (A) Nombre de cellules dans les habenulæ dorsales gauche et droite d'un mutant Tg(brn3a-hsp70:GFP)<sup>rw0110b</sup> de 5dpf, dans le sous-domaine médial qui exprime la GFP (GFP(+)) et le sous-domaine latéral qui n'exprime pas la GFP (GFP(-)). Nombre de cellules marquées au BrdU en fonction du moment où l'incubation a été réalisée, chez un mutant Tg(brn3a-hsp70:GFP)<sup>rw0110b</sup> de 5dpf. (C) Coupe transversale au niveau des habenulæ d'un mutant Tg(brn3a-hsp70:GFP)<sup>rw0110b</sup> de 5dpf qui exprime de la GFP (vert) dans les habenulæ médiales. Les noyaux sont marqués par du SYTOX orange. (D-G) Coupe transversale au niveau des habenulæ d'un mutant Tg(brn3a-hsp70:GFP)<sup>rw0110b</sup> de 5dpf montrant la position des cellules marquées au BrdU lors d'un pulse à 32hpf (D), 36hpf (E), 48hpf (F), 56hpf (G). Le sous-domaine médial (en vert) exprime la GFP (d'après Aizawa *et al.*, 2007).

Le BrdU est un nucléoside synthétique analogue de la thymidine qui a la capacité de s'incorporer dans l'ADN au cours de la mitose. En incubant les embryons pendant un temps défini dans une solution de BrdU (un pulse), il est possible de visualiser toutes les cellules qui se sont divisées dans cette période et de déterminer à quand remonte la dernière division d'une cellule (sa date de naissance) si la fixation a lieu plus tard (après une chasse). En utilisant ce type d'expérience, Aizawa et al. ont pu mettre en évidence deux caractéristiques de la neurogenèse qui jouent un rôle crucial dans la génération des asymétries habénulaires. Tout d'abord, le devenir des cellules qui sortent des cycles mitotiques est régulé au cours du temps pour contribuer soit au sous-domaine médial (repéré par l'expression d'un transgène contenant la GFP sous le contrôle des signaux de régulation en cis du gène brn3a/pou4f1), soit au sous-

domaine latéral (qui n'exprime pas ce transgène) (Figure 35 C-G). Les neurones nés entre 24 et 36 hpf contribuent ainsi préférentiellement au sous-domaine latéral; cette proportion s'inverse entre 48 et 72 hpf (Figure 35 B; D-G). Par ailleurs, le nombre total de cellules sortant des cycles mitotiques est régulé avec une chronologie différente entre les habenulæ gauche et droite. Les sorties des cycles mitotiques se font dans un premier temps (de 24 à 32 hpf) préférentiellement à gauche, puis dans un second temps (de 48 à 72 hpf) préférentiellement à droite (Figure 35 B) (Aizawa *et al.*, 2007). La superposition de ces deux régulations temporelles fournit une explication cohérente pour les asymétries observées. Pour un nombre final de cellules équivalent dans chacune des deux habenulæ dorsales, il en résulte donc des proportions relatives différentes entre les sous-domaines à gauche et à droite.

#### b) Implication de Notch dans la spécification des sous-domaines habénulaires

La signalisation Notch est bien connue pour son effet inhibiteur sur la différenciation neuronale (Louvi & Artavanis-Tsakonas, 2006) et l'étude par perte et gain de fonction de cette voie montre qu'elle régule la formation des sous-domaines habénulaires (Aizawa *et al.*, 2007). Ainsi chez le mutant *mind bomb* (*mib*<sup>1a52b</sup>), caractérisé par une forte réduction de l'activité Notch (Itoh *et al.*, 2003) et donc une dérepression de la neurogenèse, les asymétries habénulaires sont très largement perdues. Chez ce mutant, le sous-domaine latéral droit, qui se différencie plus tôt, a une taille plus importante (Figure 36 C) et inversement, le sous-domaine médial, qui se différencie plus tardivement, voit sa taille réduite (Figure 36 D). Les auteurs interprètent ce phénotype en faisant l'hypothèse d'une augmentation de la neurogenèse à droite entre 24 et 32 hpf conduisant à une symétrisation du domaine latéral entre les habenulæ gauche et droite mais également à une diminution du réservoir de progéniteurs neuronaux disponible pour la seconde phase de neurogenèse. Inversement, une surexpression de la signalisation Notch entraine un retard dans la différenciation des habenulæ (Figure 36 E-H) induisant une augmentation de la taille de l'habénula médiale gauche au détriment de la latérale (Figure 36 K) (Aizawa *et al.*, 2007 ; Aizawa, 2013).



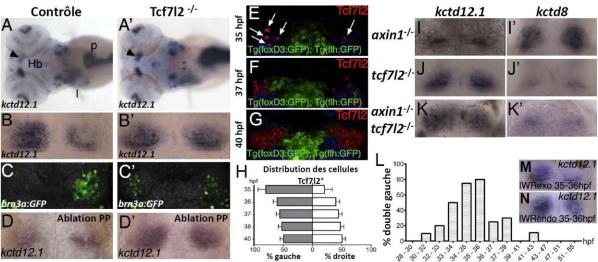
**Figure 36 : Implication de la voie Notch sur la neurogenèse des habenulæ.** (A-H) vues dorsales de l'épithalamus de poisson-zèbre montrant l'expression de *kctd12.1*, marqueur des l'habenulæ latérales (A, C, E et G) et de *kctd12.2*, marqueur des l'habenulæ médiales (B, D, F et H) à 56 hpf chez un embryon contrôle (A-B), un embryon mutant *mind bomb* (*mib*) dépourvu de l'expression de Notch (C-D) et chez un embryon dont la surexpression de la voie Notch a été induite par choc thermique à 28 hpf (E-F) et à 32 hpf (G-H). (I) schémas en vue frontale du développement des habenulæ. En bleu, expression de la voie Nodal entre 18 et 24 hpf; à 32 et 48 hpf, génération des précurseurs neuronaux des habenulæ latérales (en rouge) et médiales (en vert) pour former les sous-domaines habénulaires à 72 hpf. (J-K) représentation schématique du nombre de cellules marquées au BrdU participant à la formation des habenulæ latérales (en rouge) et médiales (en vert) à gauche et à droite en fonction du temps (1, 24 hpf; 2, 48 hpf; 3, 72 hpf) chez un embryon contrôle (J) et l'activité neurogénétique putative chez un embryon dont la neurogenèse est inhibée jusqu'à 48 hpf et un embryon dont la neurogenèse est suractivée par un défaut de la voie Notch. P, pinéale; V, ventricule (d'après Aizawa *et al.*, 2007)

Ces interprétations restent hypothétiques et d'autres études sont nécessaires pour préciser le rôle de la voie Notch. Aucune asymétrie de l'expression des composants de la voie Notch n'a ainsi été décrite à l'exception de *her6*, dont la transcription est contrôlée par *notch1a* et qui est légèrement plus exprimé à droite chez 57% des embryons sauvages à 32 hpf (Aizawa *et al.*, 2007). De plus, le mutant *mib* présente une multitude de défauts conduisant à une létalité avant la fin du développement des habenulæ, dont des altérations de l'expression épithalamique des composants de la voie Nodal. Les perturbations de la neurogenèse observées chez les mutants de cette voie pourraient être liées à d'autres processus qu'un contrôle cellulaire autonome de la neurogenèse par la voie Notch. Le destin des progéniteurs habénulaires pourrait plutôt dépendre d'un environnement global entourant le neurone à sa naissance comme cela a été montré dans le cas de la spécification des cellules de pinéale. En interagissant avec Sox2 (*sex determining region Y-box 2*) (Pavlou *et al.*, 2014) et la voie des BMP (*Bone morphogenetic* 

*protein*) (Quillien *et al.*, 2011), Notch y joue un rôle sur la spécification neuronale plutôt que sur le contrôle temporel de la neurogenèse (Cau *et al.*, 2008).

#### c) Implication de la voie Wnt

La voie Wnt est un autre acteur essentiel de la mise en place des asymétries épithalamiques via une régulation différentielle des choix de destins cellulaires entre les sous-domaines des habenulæ dorsales droite et gauche. Ce rôle a été mis en évidence par l'étude du gène *tcf7l2*, identifié au cours d'un criblage génétique visant à l'identification de mutants présentant des défauts des asymétries habénulaires (Hüsken *et al.*, 2014) (voir partie 2.1.1.b). Les mutants *tcf7l2-/-* présentent un isomérisme gauche des habenulæ, caractérisé par une expression bilatérale de *kctd12.1* (marqueur des habenulæ dorsales latérales), une réduction à droite de l'expression de *Brn3a/Pou4f1* (marqueur des habenulæ dorsales médiales) et des projections symétriques vers l'IPN (Figure 37 A-C'). Chez ces mutants, les asymétries de la neurogenèse précoce et la chronologie du choix de destins cellulaires entre les deux habenulæ dorsales ne semblent pas affectées. Une ablation de la parapinéale n'altère pas non plus ce phénotype mutant montrant que *tcf2tl* est épistatique à cette ablation (Figure 37 D-D').



**Figure 37 : Rôle de Tcf7l2.** (A-D') expression de *kctd12.1* (A-B', D-D') et du transgène *brn3a:GFP* dans les habenulæ à 4 dpf en vues dorsales (A-A') et transversales (B-D') chez un contrôle (A, B et C) et un mutant *tcf7l2-/-* (A', B' et C') et chez des embryons après ablation de la parapinéale (D et D'). (E-H) Expression de *tcf7l2* dans les habenulæ dorsales. (E-G) Vues dorsales des habenulæ montrant les cellules Tcf7l2+ (en rouge) en plus grand nombre à gauche à 35 hpf (E) et à 37 hpf (F) mais en nombre équivalent dès 40 hpf (G). Les flèches pointent le plus grand nombre de cellules Tcf7l2+ à gauche (E). (H) Distribution des cellules Tcf7l2+ entre les habenulæ gauche et droite en fonction du temps. Expression de *kctd12.1* (I, J et K)

et de *kctd8* (I', J' et K') chez un mutant *axin1-/-* (I-I'), un mutant *tcf7l2-/-* (J-J') et le double mutant *axin1-/- /tcf7l2-/-* (K-K')à 4 dpf. (L) graphique montrant le pourcentage d'embryons ayant un phénotype double gauche en fonction du moment où le traitement à la drogue IWR à été effectué. Expression de *kctd12.1* à 4 dpf après un traitement à 35-36 hpf avec IWRexo (contrôle) (M) et IWRendo (N). Hb, habenulæ; l, foie; P, pancréas; PP, Parapinéale (d'après Hüsken *et al.*, 2014).

L'analyse du devenir des neurones chez ces mutants montre que ce gène a un effet inhibiteur sur le choix de l'identité neuronale caractérisant l'habénula dorsale latérale (qui exprime *kctd12.1*), au profit de l'habénula dorsale médiane. De plus, cette mutation de *tcf7l2* est épistatique à celle d'un gène codant pour un inhibiteur de la voie Wnt, l'Axine 1 et dont l'inactivation entraine un isomérisme droit (Figure 37 I-K'). Ces conclusions sont confirmées par des traitements pharmacologiques utilisant la drogue IWR, qui a pour effet de stabiliser l'Axine 1 et donc d'inhiber la voie Wnt. L'application de cette drogue au cours de la différenciation des sous-domaines habénulaires induit une augmentation du volume de l'habénula latérale à droite (Figure 37 L-N). Ces données indiquent donc que le choix de différenciation des progéniteurs neuronaux entre une identité neurale de type habénula latérale ou médiale est modulé par l'activité de la voie Wnt et suggèrent que la parapinéale est responsable d'une inhibition ipsilatérale de cette voie (Hüsken *et al.*, 2014).

Ils émettent également l'hypothèse que les voies Notch et Wnt fonctionneraient indépendamment; la signalisation Notch déterminant le moment où la différenciation des progéniteurs neuronaux a lieu et la voie Wnt participant à l'environnement autour du progéniteur au moment de sa différenciation. L'identité neuronale acquise par le progéniteur est alors déterminée par l'activité de la voie Wnt au moment de sa différenciation; habénula médiale en cas d'activation de la voie Wnt et habénula latérale en cas d'absence d'activité de la voie Wnt (Hüsken & Carl, 2013; Hüsken *et al.*, 2014).

#### d) Implication du réticulum endoplasmique

Un autre mutant, également isolé lors d'un crible génétique, implique une étape plus précoce de la neurogenèse dans la formation des asymétries habénulaires. La mutation correspondante,  $sec61al1^{c163}$  est liée à une troncature prématurée du gène sec61al1, qui code un composant du

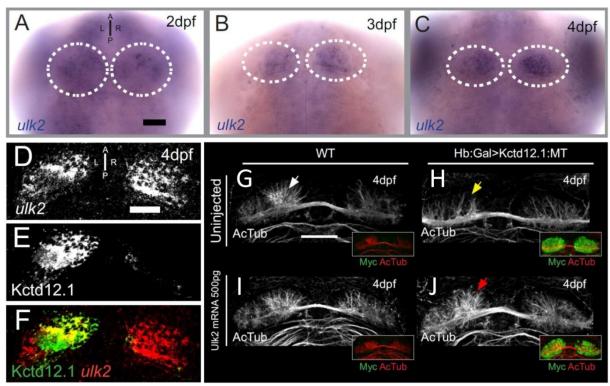
translocon, complexe moléculaire assurant le transport des polypeptides en cours de traduction vers le réticulum endoplasmique. Le phénotype associé à la mutation à l'état homozygote est caractérisé par une augmentation en taille du territoire d'expression de kctd12.1 (sous-domaine latéral) préférentiellement dans l'habénula droite au point de conduire à une quasi-symétrie habénulaire. Ce phénotype reste inchangé en cas de perte de la parapinéale via l'injection de morphants dirigés contre *tbx2b*. Une analyse quantitative de la neurogenèse montre par ailleurs que chez ces mutants, la production de neurones est augmentée dans les deux habenulæ, avec une augmentation de la durée de prolifération. Ces données suggèrent que chez un individu de type sauvage, l'action du gène sec61al, exprimé bilatéralement, conduit à une répression de la neurogenèse qui n'est levée qu'à gauche par des signaux issus de la parapinéale. Cette répression de la neurogenèse pourrait être étroitement liée au contrôle de la polarité apicobasale au niveau des cellules neuroépithéliales ventriculaires. Cette polarité est en effet corrélée au choix de division, symétrique ou asymétrique, effectuée par les progéniteurs du neuroépithélium et elle apparait perturbée chez les mutants sec61al1c163 (Doll et al., 2011). Il est à noter que le rôle de sec61al1n'est pas spécifique aux habenulæ et qu'il concerne beaucoup plus généralement le système nerveux. Cette fonction est cependant modulée différentiellement dans les habenulæ droite et gauche, via une intégration, qui reste à caractériser, avec les mécanismes issus de la parapinéale.

# 2.3.2. Formation asymétrique du neuropile

L'ensemble des données décrites ci-dessus montrent que la formation des asymétries habénulaires résulte en partie d'une intégration différentielle des signaux issus de la parapinéale entre la gauche et la droite ainsi que de plusieurs niveaux de contrôle de la neurogenèse. Comme on l'a vu dans la partie 1.3, les asymétries habénulaires incluent également des différences de volume du neuropile entre la gauche et la droite. Deux acteurs moléculaires nécessaires à la formation de cette asymétrie ont été identifiés, Ulk2, isolé lors d'une recherche de protéines interagissant avec Kctd12.1 dans un crible par double-hybride et Daam1a.

#### a) Rôle de Ulk2

Ulk2 (*Unc-51-Kinase 2*) est une protéine kinase connue pour son rôle dans la régulation des extensions et des ramifications des neurones. Au niveau des axones, Ulk2 induit leur élongation ainsi qu' une inhibition de la formation de ramifications alors qu'au niveau des dendrites, Ulk2 induit la formation et la stabilisation de ramifications (Zhou *et al.*, 2007 ; Taylor *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2014). Au niveau des habenulæ, *ulk2* et *kctd12.1* sont coexprimés au niveau des neurones de la partie latérale de l'habénula dorsale gauche (qui contribue de façon majeure à l'asymétrie du neuropile) (Figure 38 A-F).



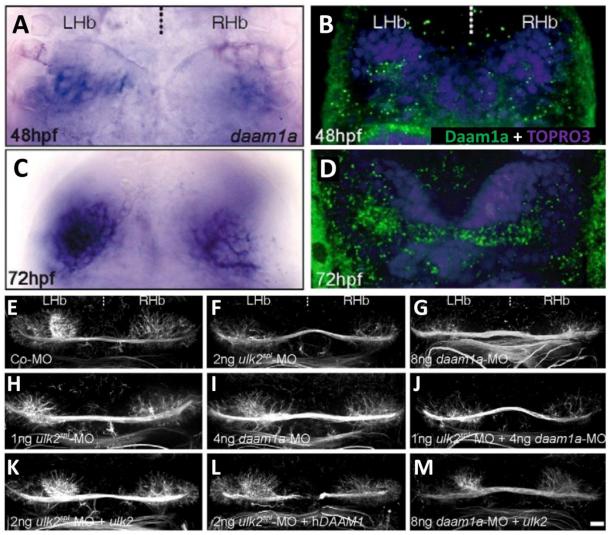
**Figure 38:** Rôles de *kctd12* et d'ulk2 dans la formation du neuropile. (A-C) Expression bilatérale d'ulk2 dans les habenulæ de poisson-zèbre à 2dpf (A), 3dpf (B) et 4dpf (C). (D-F) Images montrant les expressions d'ulk2 (D), de *kctd12.1* (E) et leur co-localisation (*kctd12.1* en vert et *ulk2* en rouge) (F) dans les habenulæ à 4dpf. (G-J) Images montrant le volume du neuropile (marquage de la tubuline acétylée) dans les habenulæ à 4dpf chez un embryon contrôle non injecté (flèche blanche) (G), réduit chez un mutant sur-exprimant *kctd12.1* (flèche jaune) (H), augmenté chez un embryon sur exprimant *ulk2* (I) et restauré chez un mutant sur-exprimant *kctd12.1* et *ulk2* (flèche rouge) (J). En rouge, marquage de la tubuline acétylée et en vert, de la protéine de fusion Kctd12.1:Myc (d'après Taylor *et al.*, 2011).

Trois arguments principaux impliquent *ulk2* dans la formation de l'asymétrie du neuropile via une interaction avec *kctd12.1*. Tout d'abord, l'inactivation du gène par injection de morphants anti-sens conduit à une réduction du neuropile à gauche alors qu'une surexpression conduit à

une augmentation du neuropile à droite (volume et densité équivalents entre les deux côtés dans les deux cas). De plus, un phénotype inverse est observé en cas de surexpression ou d'inactivation de *kctd12.1*; sa surexpression induit une réduction du neuropile alors que son inhibition induit un excès de neuropile (Figure 38 G-J). Enfin, la réduction particulièrement marquée du neuropile à gauche chez les embryons ayant subi une inactivation d'*ulk2* est observée de la même façon en présence ou non de Kctd12.1; cela indique qu'*ulk2* agit en aval de *kctd12.1*. Ces données impliquent donc une nouvelle interaction moléculaire dans l'élaboration des asymétries du neuropile (Taylor *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014).

#### b) Rôle de Daam1a

Un autre acteur impliqué, en aval d'ulk2, dans la génération du neuropile a récemment été identifié en recherchant des gènes différentiellement exprimés entre les habenulæ gauche et droite à l'aide de librairies soustractives de cDNA. Le gène daam1a (dishevelled associated activator of morphogenesis 1a) code une protéine de la famille des formines (Colombo et al., 2013). Les protéines de cette famille, très conservée à l'échelle des eucaryotes, sont impliquées dans la formation du cytosquelette (Wallar & Alberts, 2003). daam1a est exprimé dans le neuropile des habenulæ à partir de 48 hpf (Figure 39 A-D) et y est encore exprimé chez l'adulte. Une électroporation de DAAM1 dépourvue de son domaine régulateur N-terminal dans les habenulæ (induisant une expression de daam1a de façon constitutive) se traduit par une augmentation du volume du neuropile. Les embryons présentant un gène daam1a non fonctionnel ont un phénotype semblable aux morphants ulk2 (sévère réduction du neuropile à gauche, conduisant à des volumes et densités équivalents entre les deux habenulæ) (Figure 39 E-I). Il est possible de restaurer le neuropile chez les morphants *ulk2* par une injection d'ARNm de DAAM1 humain (hDAAM) (Figure 39 L), par contre l'injection d'ARNm de d'ulk2 ne peut pas le restaurer les embryons ayant subi une perte de fonction de daam1a (Figure 39 M), suggérant que *daam1a* agit en aval de *ulk2* pour réguler la formation du neuropile (Colombo *et al.*, 2013).



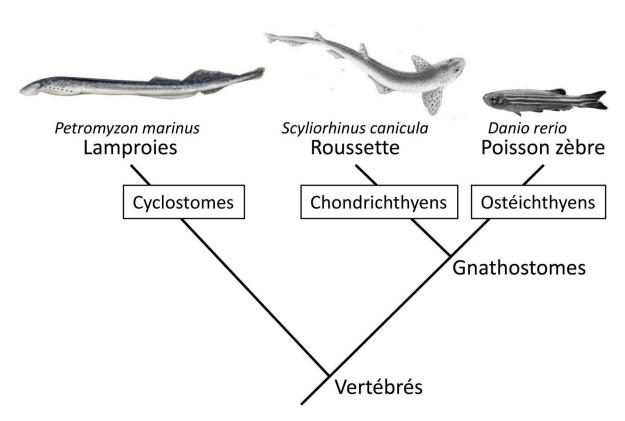
**Figure 39: Rôle de daam1a sur la formation du neuropile.** (A-D) Expression de *daam1a* dans les habenulæ de poisson-zèbre à 48hpf (A) et à 72hpf (C) induisant la présence de la protéine Daam1a à 48hpf (B) et 72hpf (D). Les noyaux sont marqués par TOPRO3 (en violet) (B & D). (E-M) organisation du neuropile (tubuline acétylée) chez un embryon injecté avec un morpholino contrôle (Co-MO) (E), une dose optimale de morpholinos contre *ulk2* (2ng) (F) ou contre *daam1a* (8ng) (G), une dose non optimale de morpholinos contre *ulk2* (1ng) (H) ou contre *daam1a* (4ng) (I) ou des deux (J), une dose optimale de morpholinos contre *ulk2* (2ng) combiné à une injection d'ARNm de d*Ulk2* (K) ou de d*DAAM1* (L), ou une dose optimale de morpholinos contre *daam1a* (8ng) combinée à une injection d'ARNm d'*ulk2* (M). LHb, habénula gauche; RHb, habénula droite. Échelle: 20μM (d'après Colombo *et al.*, 2013).

# 3. Évolution des mécanismes de latéralisation de l'épithalamus

Les mécanismes d'établissement des asymétries n'ont été étudiés que chez le poisson-zèbre (voir partie 2). Pour retracer leur évolution à l'échelle des vertébrés, nous avons étudié ces mécanismes chez deux modèles émergeant de la biologie du développement, la lamproie (cyclostomes) et la roussette (chondrichthyens). Je vais présenter dans cette partie les grandes caractéristiques de ces modèles et leur intérêt particulier pour l'étude des mécanismes de latéralisation de l'épithalamus.

# 3.1. Grandes caractéristiques de la lamproie et de la roussette

# 3.1.1. Positions phylogénétiques



**Figure 40 : Positions phylogénétiques de la lamproie et de la roussette**. Les vertébrés regroupent les cyclostomes (lamproies) et des gnathostomes. Les chondrichthyens (roussettes) et son groupe frère les ostéichthyens (poisson-zèbre, xénope, poulet, souris) composent les gnathostomes.

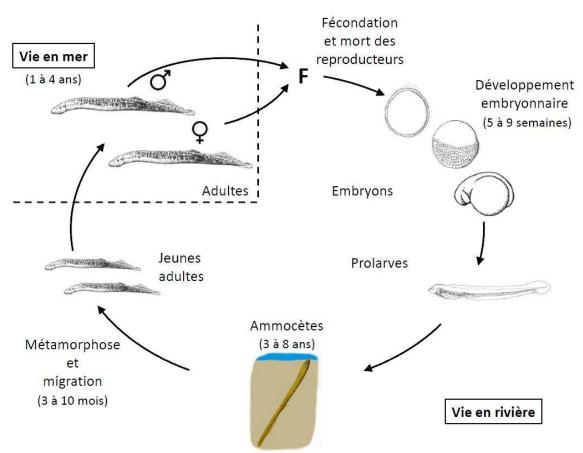
L'ensemble des animaux vertébrés sont répartis en deux groupes : le groupe des cyclostomes, qui comprend les vertébrés dépourvus de mâchoires et celui des gnathostomes qui regroupe l'ensemble des vertébrés à mâchoire (Figure 40). En se basant sur des données moléculaires et paléontologiques, il a été estimé que la divergence entre ces deux groupes de vertébrés se situait entre la période précambrienne (supérieure à 550 Ma) (Blair & Hedges, 2005; Kuraku, 2008) et la période cambrienne (supérieure à 480 Ma) (Osório & Rétaux, 2008; Shimeld & Donoghue, 2012). La monophylie des cyclostomes, qui regroupe les myxines et les lamproies, a été démontrée grâce aux progrès techniques en biologie moléculaires et en génomique (Blair & Hedges, 2005 ; Delsuc et al., 2006 ; Heimberg et al., 2010). Les fossiles de cyclostomes sont rares et le plus ancien, la lamproie Priscomyzon riniensis, a été daté à 360 Ma pendant le Dévonien supérieur (Gess et al., 2006). La lamproie a été préférée comme espèce modèle des cyclostomes pour la moindre difficulté d'obtenir des embryons en comparaison avec la myxine même si un laboratoire japonais a tout de même réussi à obtenir quelques œufs de l'espèce Eptatretus burgeri ces dernières années (Ota & Kuratani, 2008). Les gnathostomes se divisent en deux groupes : les vertébrés à squelette cartilagineux (chondrichthyens) et les vertébrés à squelette osseux (ostéichthyens), dont le poisson-zèbre (Figure 40) (Lecointre & Le Guyader, 2006). La divergence entre ces deux phyla remonte à au moins 423 Ma pendant le Silurien (Zhu et al., 2009; Brazeau & Friedman, 2015). Les chondrichthyens regroupent les holocéphales, les raies et les requins (Chen et al., 2012).

# 3.1.2. Caractéristiques biologiques

#### a) Cycle de vie de la lamproie

Toutes les espèces de lamproies se reproduisent en rivière et y restent tout au long de leur vie larvaire. Moins de la moitié des espèces de lamproies sont parasitiques et elles peuvent vivre en eau douce toute leur vie (*Lampetra planeri*) ou être anadromes, les adultes vivent en mer et

retournent en rivière pour se reproduire (*Petromyzon marinus*) (Figure 41). Après la fécondation de l'œuf (en rivière), le développement embryonnaire des lamproies se fait pendant environ deux semaines jusqu'à une phase prolarvaire qui dure environ trois semaines. Le stade larvaire débute une fois les réserves vitellines absorbées. Sur cette période qui s'étale sur 3 à 8 ans, les ammocètes (= larves de lamproies) grandissent enfouies dans le sédiment en se nourrissant par filtration. Après une métamorphose qui dure environ deux mois, les jeunes adultes des espèces anadromes effectuent une migration de la rivière vers la mer. Quelques années après, ces adultes retournent vers la rivière pour se reproduire puis meurent une fois cette période terminée.



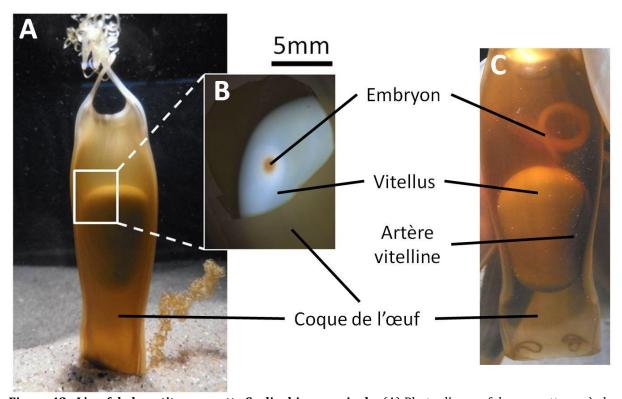
**Figure 41 : Cycle de vie anadrome de la lamproie marine** *Petromyzon marinus.* Le cycle de vie de la lamproie se divise entre la mer (vie adulte seulement) et l'eau douce. Après la reproduction, en rivière, les adultes meurent ; le développement embryonnaire, indirect, débute après la fécondation externe de l'œuf. Le stade prolarve est atteint après 15 jours de développement, puis le stade ammocète après 5 à 9 semaines. Après 3 à 8 ans, une métamorphose transforme les ammocètes en jeunes adultes qui migrent ensuite vers la mer.

La saison de reproduction des lamproies se déroule pendant le printemps, principalement aux mois d'avril et de mai (*Lampetra fluviatilis*, *Lampetra paneri*) jusqu'au début de l'été chez certaines espèces (*Petromyzon marinus*). Le nombre d'œufs pondus par chaque femelle se compte en milliers et la fécondation est externe. Les œufs de lamproie sont télolécithes (avec un grand volume de vitellus) et le clivage holoblastique. Le développement embryonnaire de la lamproie a principalement été étudié chez les espèces des genres *Petromyzon* (Piavis, 1961; Richardson & Wright, 2003) et *Lampetra* (Tahara, 1988) et montrent très peu de différences développementales, au niveau morphologique, entre les différentes espèces (voir table de Tahara en annexe).

#### b) Cycle de vie de la roussette

Parmi les chondrichthyens, la petite roussette *Scyliorhinus canicula* émerge comme l'espèce modèle des requins pour les études développementales. Cette espèce abondante le long des côtes françaises, atlantique et méditerranéenne, peut mesurer jusqu'à un mètre de longueur. La petite roussette se reproduit toute l'année en mer Méditerranée mais uniquement au printemps dans la Manche (Mellinger, 1989). Cette espèce ovipare a une fécondation interne et les femelles ont la capacité de stocker les spermatozoïdes de plusieurs mâles dans une spermathèque ce qui leur permet de pondre toute l'année bien que dans la Manche, les pontes ne se fassent que de mars à septembre (Mellinger, 1989 ; Ivory *et al.*, 2005 ; Griffiths *et al.*, 2012). Le maintien de femelle en captivité rend toutefois possible l'obtention d'œufs toute l'année avec un pic de ponte au printemps. L'œuf de roussette est constitué d'une grande réserve de vitellus (œufs télolécithes) sur laquelle repose l'embryon, protégé par une coque rigide complexe qui lui offre une étanchéité et une grande résistance mécanique (Figure 42) (Foulley & Mellinger, 1980 ; Foulley *et al.*, 1981 ; Mellinger, 1994). Une table résumant les grandes étapes du développement embryonnaire a été publiée par Ballard *et al.* en 1993 (Ballard *et al.*, 1993) (Voir en Annexe). Comme chez le poulet, la fécondation interne ne permet pas d'accéder aux stades les plus

précoces du développement, les œufs sont, en effet, pondus par paires au stade de blastula. Le développement embryonnaire est long puisqu'il s'étend sur 6 mois mais l'avancée du développement peut être suivie aisément grâce à la transparence de la coque et la grande taille de l'embryon. La maturité sexuelle est atteinte après 5 années.



**Figure 42 : L'œuf de la petite roussette Scyliorhinus canicula.** (A) Photo d'un œuf de roussette après la ponte. (B) Photos de l'œuf après ouverture d'une fenêtre, réalisée au scalpel, laissant apparaitre l'embryon. (C) Photo d'un œuf de roussette au stade 31 après la pré-éclosion.

#### 3.1.3. Disponibilité des ressources biologiques

La saisonnalité des pontes de lamproies ne permet pas d'obtenir des embryons toute l'année. Quelques laboratoires de par le monde obtiennent régulièrement des pontes (Nikitina *et al.*, 2009a). Le laboratoire « *Développement et Évolution des Vertébrés* », pionnier dans l'étude de la lamproie et de la roussette, a acquis un savoir faire dans la gestion des pontes de lamproie. Il est possible de récupérer des lamproies adultes pendant leur migration en rivière et de les maintenir en laboratoire quelques semaines afin de récupérer des œufs. Ces œufs sont récupérés en strippant les femelles et la fécondation étant externe, il est aisé de bien contrôler les

premières étapes du développement. Les embryons peuvent être maintenus facilement dans le laboratoire jusqu'au stade pro-larvaire dans de l'eau douce à 16°C.

Contrairement à la lamproie, les œufs de roussette peuvent être obtenus toute l'année. La Station Biologique de Roscoff¹ a mis en place une structure pour maintenir en captivité des roussettes tout au long de l'année et fournir des œufs en grande quantité. Les femelles matures sont sélectionnées après une échographie et gardées dans des bacs d'eau de mer naturelle à 16°C. Les œufs pondus sont récupérés et incubés dans des aquariums également maintenus à 16°C.

# 3.2. Des espèces modèles établies en évo-dévo

Les caractéristiques des cycles de vie de la lamproie et de la roussette rendent impossible l'utilisation des techniques de génétique classique et le maintien de lignées mutantes. L'aire du haut débit, dans laquelle la science est entrée ces dernières années, permet des progrès rapides que ce soit de la génomique jusqu'aux récents systèmes d'édition du génome CRISPR/Cas9.

#### 3.2.1. Outils moléculaires et fonctionnels chez la lamproie

#### a) Données génomiques

L'abondance de la lamproie marine *P. marinus* ainsi que son intérêt économique en Europe et en Amérique du Nord, ont participé à mettre en avant cette espèce et à développer des outils moléculaires et fonctionnels chez cette espèce (Kuratani *et al.*, 2002 ; Osório & Rétaux, 2008 ; Shimeld & Donoghue, 2012 ; Green & Bronner, 2014). Le séquençage de son génome a été publié en 2013 (Smith *et al.*, 2013) et son annotation est réalisée par le consortium européen *Ensembl*<sup>2</sup>. Actuellement, la taille du génome est estimée à 1,92 Gb avec une couverture de 5,0X et un N50

<sup>1</sup> www.sb-roscoff.fr

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> www.ensembl.org/Petromyzon\_marinus/Info/Annotation

de 184,619 kb³. Le génome de la lamproie marine présente quelques particularités en comparaison avec les autres génomes de vertébrés séquencés. La position phylogénétique de *P. marinus* donne une place importante à ce génome pour les études évolutives du génome chez les vertébrés. De plus, le génome de *P. marinus* subit, pendant le développement embryonnaire, un réarrangement au niveau des cellules somatiques qui conduit à une perte d'environ 20% de son ADN génomique (Smith *et al.*, 2009). D'après nos connaissances actuelles, l'ampleur de ce réarrangement est unique chez les vertébrés. Le séquençage de la lamproie apporte également des informations sur les duplications de génomes intervenues à deux reprises chez les vertébrés (Makalowski, 2001; Garcia-Fernàndez, 2005; Kuraku *et al.*, 2009; Cañestro *et al.*, 2013; Smith & Keinath, 2015). Outre le génome, d'autres ressources moléculaires sont disponibles telle que des banques de BAC construite à partir de cellules sanguines par le *BACPAC Resources Center* localisé à l'Institut de Recherche de l'hôpital pour enfants d'Oakland (CHORI¹) ou à partir de cellules germinales, pour ne pas être impacté par le réarrangement somatique (Smith *et al.*, 2010).

Une banque d'ADNc embryonnaire ainsi que de cerveaux larvaires et adultes a également été construite dans le laboratoire. À partir de ces dernières, une collection de 150000 EST a été séquencée par le Génoscope d'Évry. Les collections de clones recombinants des séquences correspondantes sont conservées à -80°C sur des microplaques.

#### b) Avancées expérimentales

Les caractéristiques développementales de la lamproie ont permis d'adapter des techniques expérimentales et fonctionnelles utilisées chez le poisson-zèbre et le xénope permettant une progression rapide des outils disponibles chez cette espèce. Les techniques d'hybridations *in situ* et d'immunohistochimie se font en routine dans le laboratoire. L'accès aux embryons permet également de faire des marquages cellulaires par application de DiI (Nikitina *et al.*, 2009b), de

4 http://bacpac.chori.org

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Données recueillies sur le site ensembl.org/Petromyzon\_marinus/Info/Annotation

réaliser des injections de morpholinos (Nikitina *et al.*, 2009c) ou des traitements pharmacologiques (McCauley & Bronner-Fraser, 2003 ; Sauka-Spengler *et al.*, 2003 ; Sauka-Spengler *et al.*, 2007). Très récemment, un outil d'édition du génome a été développé le système CRISPR/Cas9 (Doudna & Charpentier, 2014 ; Gilles & Averof, 2014). Cette technique, utilisée chez un nombre de plus en plus important d'espèces, permet de réaliser des knock-out ou des knock-in avec une grande sensibilité. L'application de cette technique à la lamproie est actuellement en développement dans le laboratoire de Daniel Meulemans Medeiros (Romášek *et al.*, 2015).

#### 3.2.2. Outils moléculaires et fonctionnels chez la roussette

#### a) Données génomiques

Un projet de séquençage du génome de la roussette a été débuté par le laboratoire en collaboration avec le Génoscope d'Évry. Comme chez la plupart des chondrichthyens, le génome de la roussette est de grande taille (3,35 Gb). Une version préliminaire d'assemblage (couverture 32x) comprend environ 3500000 de contigs/scaffolds avec un N50 de 1,3 kb. Ces données vont compléter les données génomiques récemment publiées chez deux autres espèces de chondrichthyens: la chimère *Callorhinchus milii* (Venkatesh *et al.*, 2007) et la raie *Leucoraja erinacea* (King *et al.*, 2011; Wyffels *et al.*, 2014). Dans ces deux cas, la couverture du génome est élevée mais les assemblages sont de faible continuité.

Le laboratoire possède également une collection de 250000 EST adultes et embryonnaires obtenue par un séquençage Sanger. Les clones recombinants correspondants sont conservés à -80°C dans le laboratoire ce qui permet de synthétiser des sondes moléculaires facilement. Cette collection a été complétée par des données transcriptomiques obtenues par un séquençage Illumina construites à partir d'une large gamme de stades embryonnaires (du stade mid-blastula à l'éclosion) et de tissus adultes. L'assemblage de ces séquences a fourni une base de données de

122000 contigs avec un N50 de 2,2kb. En outre, une base de données d'environ 1000 miRNA candidats prédits a été construite par comparaison avec la séquence génomique.

#### b) Avancées expérimentales

La disponibilité des œufs de roussettes toute l'année est un avantage pour le développement d'outils fonctionnels. Les premières caractérisations moléculaires par hybridation *in situ* ont été réalisées grâce à l'obtention de séquences par PCR dégénérée. L'obtention de la collection d'EST a par la suite permis de faciliter ces caractérisations, notamment pendant les stades précoces (Coolen *et al.*, 2007 ; Godard *et al.*, 2014). En plus des hybridations *in situ* (sur embryon entier et sur coupes), l'équipe a adapté des techniques d'immunofluorescence sur coupe et *in toto*. L'œuf de roussette se prête très bien aux injections d'agents pharmacologiques, tels que les inhibiteurs de la voie Nodal/Activine (SB-505124 et SB-431542), l'inhibiteur des FGF (SU5402) ainsi que l'inhibiteur de la voie Sonic Hedgehog (la cyclopamine) (Godard *et al.*, 2014 ; Santos-Durán *et al.*, 2015).

Une des contraintes de l'embryon de roussette est sa sensibilité aux agents pathogènes et l'ouverture de la coquille entraine la putréfaction rapide de l'œuf. Cet effet est observé pendant le premier mois et demi de développement (jusqu'à ce que l'embryon atteigne le stade 27) ce qui limite donc les possibilités d'expérimentations directes sur l'embryon. Pendant les années 50, le développement embryonnaire de la roussette était étudié et des expériences d'incubations d'embryons *ex-ovo* ont été tentées à l'aide d'antibiotiques (par Vivien en 1954) ou en opérant en chambre humide (par Kopsch en 1950) mais la durée de vie de l'embryon n'a pu être prolongée que de quelques jours tout au plus (Mellinger, 1994). Récemment, des techniques de marquages cellulaires au Dil) et de greffes de billes imprégnées ont été développées dans l'équipe (Godard *et al.*, 2014). La ponte de l'œuf à un stade tardif (blastula) empêche l'utilisation de techniques d'injections type morpholinos ou d'éditions du génome type CRISPR/Cas9. Des approches par perte de fonction de gènes peuvent tout de même être envisagées grâce à l'adaptation de

techniques utilisées chez d'autres espèces comme l'électroporation ou les vivo-morpholinos (Morcos *et al.*, 2008).

#### 3.2.3. Utilisation de la lamproie et de la roussette en évo-dévo

Les études réalisées sur ces espèces ont profité de leur position phylogénétique pour étudier les innovations chez les vertébrés et les gnathostomes. La lamproie a notamment permis d'établir à quel moment s'est fait la double duplication du génome des vertébrés (Kuraku, 2008). Avec les modèles de chondrichthyens, principalement la roussette, la lamproie a également permis de mieux caractériser l'apparition de la mâchoire et des appendices pairs chez les gnathostomes, d'étudier l'apparition des cellules des crêtes neurales et l'évolution des subdivisions du cerveau (Kuratani et al., 2002 ; Osório & Rétaux, 2008 ; Shimeld & Donoghue, 2012 ; Green & Bronner, 2014). La petite roussette *S. canicula* est aussi étudiée pour comprendre l'évolution des génomes (Oulion et al., 2010 ; Oulion et al., 2011) et des dents (Debiais-Thibaud et al., 2011).

L'équipe « Développement et Evolution des Vertébrés » a travaillé ces dernières années sur des mécanismes d'évolution parallèle et de convergence et en particulier sur le développement précoce des vertébrés ou sur la mise en place des axes de polarité (Coolen *et al.*, 2007 ; Coolen *et al.*, 2009 ; Godard & Mazan, 2013 ; Godard *et al.*, 2014). L'embryon de roussette est un bon modèle pour ce type d'études compte tenu de sa grande taille et de sa faible vitesse de développement qui offre une résolution spatiale et temporelle que les modèles classiques de la biologie du développement ne peuvent atteindre (Coolen *et al.*, 2008).

# 3.3. Contexte et objectifs de la thèse

Malgré la présence d'asymétries habénulaires chez un très grand nombre de vertébrés, très peu de choses sont connues sur leur mode de formation. L'épithalamus de poisson-zèbre s'est révélé comme un excellent modèle pour décrypter les mécanismes de la latéralisation mais leur conservation à l'échelle des vertébrés est une question ouverte. C'est dans ce contexte que j'ai débuté ce travail de thèse sur deux espèces de vertébrés non conventionnelles mais aux positions phylogénétiques clés : la lamproie et la petite roussette.

L'épithalamus de la lamproie est composé d'une glande pinéale, d'une parapinéale et de deux habenulæ de tailles différentes, la droite étant beaucoup plus volumineuse que la gauche. Chez la roussette, une glande pinéale est également présente mais aucune parapinéale n'a été détectée. Contrairement à la lamproie, c'est l'habénula gauche qui est plus volumineuse que la droite chez la roussette. Ces espèces présentent donc des habenulæ aux latéralités inversées. Le projet dans lequel s'inscrit mon travail de thèse vise à comprendre l'évolution des mécanismes d'établissement des asymétries épithalamiques chez les vertébrés ainsi que le mode de développement des habenulæ en tirant partie des avantages donnés par la lamproie et la roussette.

# CHAPITRE I - Rôle de la voie Nodal dans l'établissement des asymétries de l'épithalamus

# 1. Contexte et principaux résultats

Contexte du sujet. Lorsque j'ai engagé ce travail, les mécanismes responsables de l'établissement des asymétries épithalamiques étaient déjà bien connus chez le poisson-zèbre (Concha et al., 2009; Snelson & Gamse, 2009). En particulier, les rôles de la voie Nodal avaient été décrits: contrôle de la directionnalité des asymétries mais non de leur établissement proprement dit (Concha et al., 2000); contrôle d'une asymétrie précoce de la neurogenèse (Roussigné et al., 2009). De même, le caractère essentiel de la parapinéale et de sa migration latéralisée avait été démontré (Gamse et al., 2003). Par ailleurs, le poisson-zèbre était le seul vertébré chez lequel les mécanismes contrôlant la formation des asymétries épithalamiques avaient été étudiés. La généralité de ces mécanismes chez les vertébrés et leur mode d'évolution étaient donc de nouvelles questions totalement ouvertes. Leur conservation semblait par ailleurs incertaine chez les chondrichtyens (étant dépourvus de glande parapinéale) (Smeets, 1998) et chez les lamproies (qui possèdent un organe parapinéal localisé sur la ligne médiane qui envoie des projections sur l'habénula gauche mais qui se différencie pendant les stades larvaires, après l'apparition des premières asymétries habénulaires) (Nieuwenhuys & Nicholson, 1998).

Question posée et stratégie expérimentale. Ces données nous ont conduits à engager une analyse des asymétries épithalamiques et des mécanismes les contrôlant chez la roussette *Scyliorhinus canicula* et chez deux espèces de lamproie, *Petromyzon marinus* et *Lampetra planeri*. La littérature disponible, essentiellement centrée sur la description de l'épithalamus adulte, indiquait en effet que ces espèces présentaient des asymétries habénulaires marquées. De plus, sur la base d'un critère de taille, la directionnalité des asymétries était décrite comme inversée entre ces espèces (l'habénula gauche étant de plus petite taille chez la lamproie mais inversement, elles est de plus grande taille chez la roussette) (Nieuwenhuys *et al.*, 1998; Smeets, 1998; Concha & Wilson, 2001; Butler & Hodos, 2005). Par ailleurs, nous disposions de

ressources en séquence (bases de données génomiques et transcriptomiques, collections de clones d'ADNc recombinants caractérisés par un séquençage en 5') et de protocoles expérimentaux (hybridation in situ, immunohistochimie, traitements pharmacologiques) permettant d'aborder cette question par des approches moléculaires et fonctionnelles. Nous avons centré l'analyse sur deux aspects (1) une description des premières asymétries moléculaires dans le diencéphale et l'épithalamus embryonnaire de la roussette et la lamproie et (2) une analyse du rôle de la signalisation Nodal dans la formation des asymétries habénulaires. Notre stratégie expérimentale a reposé sur une approche descriptive par étude de gènes candidats, sélectionnés sur la base des travaux publiés chez le poisson-zèbre, et une approche fonctionnelle par traitements pharmacologiques.

#### *Principaux résultats.* L'approche citée plus haut nous a conduit à quatre résultats principaux :

- (1) Une expression asymétrique des composants de la voie Nodal est observée précocement au niveau du diencéphale dorsal gauche chez la lamproie comme chez la roussette ; cette expression constitue la première asymétrie observée dans le cerveau embryonnaire de ces espèces et est retrouvée du côté gauche chez 100% des individus.
- (2) certains gènes connus pour leur expression embryonnaire asymétrique dans les habenulæ de poisson-zèbre présentent également un profil asymétrique entre les habenulæ gauche et droite au cours du développement de la roussette et de la lamproie; il s'agit notamment des membres de la famille KCTD, qui codent des sous-unités de canaux potassiques.
- (3) aucune asymétrie du complexe pinéal n'est observée aux stades précédant l'apparition des asymétries habénulaires (asymétries de taille et asymétries moléculaires) chez la lamproie et la roussette.
- (4) la voie Nodal est nécessaire à la formation de ces asymétries chez les deux espèces et son abolition induit un isomérisme droit des habenulæ.

Interprétation. Ces données démontrent donc pour la première fois chez les vertébrés un rôle essentiel de la voie Nodal dans la formation des asymétries habénulaires. L'interprétation la plus simple de ces résultats et de ceux décrits chez le poisson-zèbre est que ce rôle de la voie Nodal est un caractère plésiomorphe des vertébrés et qu'il a été perdu secondairement chez le poisson-zèbre, parallèlement à l'émergence d'un rôle de la parapinéale. En outre, ces données mettent en évidence une conservation de la latéralité des asymétries (moléculaire) chez les vertébrés, contrairement à ce qui était généralement admis. Enfin, elles valident la roussette et la lamproie comme des espèces modèles d'intérêt dans l'étude des asymétries épithalamiques, d'un point de vue mécanistique et évolutif.

2. Publication n°1: The ancestral role of nodal signalling in breaking

LR symmetry in the vertebrate forebrain

Ronan Lagadec<sup>1</sup>, Laurent Laguerre<sup>1</sup>, Arnaud Menuet<sup>2</sup>, Anis Amara<sup>1</sup>, Claire Rocancourt<sup>1</sup>, Pierre

Péricard<sup>3</sup>, Benoît G. Godard<sup>1</sup>, Maria Celina Rodicio<sup>4</sup>, Isabel Rodriguez-Moldes<sup>4</sup>, Hélène Mayeur<sup>1</sup>,

Quentin Rougemont<sup>5</sup>, Sylvie Mazan<sup>1\*</sup> and Agnès Boutet<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CNRS, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, FR2424, Development and Evolution of

Vertebrates Group, Station Biologique, F-29688, Roscoff, France.

<sup>2</sup> UMR7355, CNRS, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, University of

Orleans, 3b rue de la Férollerie, F-45071 Orleans Cedex 2, France.

<sup>3</sup> CNRS, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, FR2424, ABiMS, Station Biologique de

Roscoff, F-29688, Roscoff, France.

<sup>4</sup> Department of Cell Biology and Ecology, University of Santiago de Compostela, Santiago de

Compostela, Spain

<sup>5</sup> INRA, Agrocampus Ouest, UMR 985 Ecologie et Santé des Ecosystèmes, F-35042, Rennes,

France

\*Both last authors contributed equally to the work

Authors for correspondence / contact:

Agnès Boutet

CNRS, FR2424; Sorbonne Universités, (UPMC)

Station Biologique

29688 Roscoff, France

Tel: + 33 2 98 29 25 49

Fax: +33 2 98 29 23 24

Email: agnes.boutet@sb-roscoff.fr

Sylvie Mazan

CNRS, FR2424; Sorbonne Universités, (UPMC)

Station Biologique

29688 Roscoff, France

Email: <a href="mailto:smazan@sb-roscoff.fr">smazan@sb-roscoff.fr</a>

93



#### **ARTICLE**

Received 6 Aug 2014 | Accepted 19 Feb 2015 | Published 30 Mar 2015

DOI: 10.1038/ncomms7686

# The ancestral role of nodal signalling in breaking L/R symmetry in the vertebrate forebrain

Ronan Lagadec<sup>1</sup>, Laurent Laguerre<sup>1</sup>, Arnaud Menuet<sup>2</sup>, Anis Amara<sup>1</sup>, Claire Rocancourt<sup>1</sup>, Pierre Péricard<sup>3</sup>, Benoît G. Godard<sup>1</sup>, Maria Celina Rodicio<sup>4</sup>, Isabel Rodriguez-Moldes<sup>4</sup>, Hélène Mayeur<sup>1</sup>, Quentin Rougemont<sup>5</sup>, Sylvie Mazan<sup>1,\*</sup> & Agnès Boutet<sup>1,\*</sup>

Left-right asymmetries in the epithalamic region of the brain are widespread across vertebrates, but their magnitude and laterality varies among species. Whether these differences reflect independent origins of forebrain asymmetries or taxa-specific diversifications of an ancient vertebrate feature remains unknown. Here we show that the catshark *Scyliorhinus canicula* and the lampreys *Petromyzon marinus* and *Lampetra planeri* exhibit conserved molecular asymmetries between the left and right developing habenulae. Long-term pharmacological treatments in these species show that nodal signalling is essential to their generation, rather than their directionality as in teleosts. Moreover, in contrast to zebrafish, habenular left-right differences are observed in the absence of overt asymmetry of the adjacent pineal field. These data support an ancient origin of epithalamic asymmetry, and suggest that a nodal-dependent asymmetry programme operated in the forebrain of ancestral vertebrates before evolving into a variable trait in bony fish.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> CNRS, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, FR2424, Development and Evolution of Vertebrates Group, Station Biologique, F-29688 Roscoff, France. <sup>2</sup> UMR7355, CNRS, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, University of Orleans, 3b rue de la Férollerie, F-45071 Orleans Cedex 2, France. <sup>3</sup> CNRS, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, FR2424, ABiMS, Station Biologique de Roscoff, F-29688 Roscoff, France. <sup>4</sup> Department of Cell Biology and Ecology, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain. <sup>5</sup> INRA, Agrocampus Ouest, UMR 985 Ecologie et Santé des Ecosystèmes, F-35042 Rennes, France. \* These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.M. (email: smazan@sb-roscoff.fr) or to A.B. (email: agnes.boutet@sb-roscoff.fr).

he vertebrate epithalamus derives from a highly conserved diencephalic subdivision, which gives rise to two distinct moieties, the bilaterally paired habenular nuclei and the pineal complex. The latter comprises the pineal organ, present in all vertebrates, and a more variable structure referred to as the parapineal organ, present in teleosts and cyclostomes. The habenulae belong to an ancient conduction system connecting the limbic forebrain to the brainstem and are known to control monoaminergic activity levels in the central nervous system. They have recently aroused a renewed interest as key regulators of adaptive behaviours such as experience-dependent fear responses  $^{1-3}$ . A remarkable property of habenulae is that they exhibit marked left-right asymmetries in size, gene expression and neuronal organization in a number of species belonging to all major vertebrate taxa<sup>3-5</sup>, albeit with a high degree of variability in asymmetry magnitude and laterality<sup>4,6</sup>. In the zebrafish, these neuroanatomical asymmetries correlate with markedly different habenulae responses to sensory stimuli<sup>7,8</sup>. Habenular asymmetry thus provides a model system to (i) decipher the mechanisms underlying L/R asymmetry diversification in vertebrates and (ii) study the relationship between behavioural and morphological adaptations related to forebrain asymmetries throughout vertebrate evolution. How the mechanisms controlling the development of habenular asymmetries have evolved across vertebrates is largely unknown. Extensive work on the ontogeny of habenular asymmetry in zebrafish has revealed that distinct developmental programmes control the generation of asymmetry per se and its directionality (reviewed in refs 3-5,9). In this species, a left-handed expression of nodal pathway components and downstream target Pitx2 is the first molecular indication of a diencephalic asymmetry. The role of nodal is to control asymmetry laterality rather than its establishment per se, as abrogation of nodal signalling results in the randomization of habenular asymmetry rather than its total loss<sup>10,11</sup>. In addition, Fgf8-dependent lateralized migration of the parapineal rudiment plays a key part in the establishment of proper habenular asymmetries, as shown by the right isomerism phenotype observed following parapineal laser ablation or in zebrafish mutants exhibiting parapineal migration or specification defects 12-14. Whether these mechanisms have been conserved throughout vertebrate evolution remains unclear. Asymmetric nodal expression in the forebrain, for instance, has only been reported in teleosts 10,15,16. Analyses of habenular asymmetry establishment in agnathans (or cyclostomes) and cartilaginous fishes (or chondrichthyans) are of major interest to address this issue. Indeed, as, respectively, sister groups of gnathostomes (or jawed vertebrates) and osteichthyans (that is, the third main vertebrate lineage including bony fishes and tetrapods), they occupy key phylogenetic positions to decipher vertebrate ancestral mechanisms and unravel the evolution of asymmetry diversification in different vertebrate lineages<sup>17</sup>. Although both agnathans and chondrichthyans exhibit marked asymmetries in size and neuronal organization between the left and right habenulae<sup>4,18-21</sup>, the existence of conserved pineal-dependent habenular asymmetry as in zebrafish remains unclear in these taxa. Indeed, contrary to the zebrafish, habenular asymmetry establishment in lampreys (cyclostomes) precedes parapineal segregation from the pineal anlage<sup>18,22–26</sup>. Furthermore, the parapineal organ does not migrate to the left as it does in the zebrafish epithalamus but remains at the midline. Finally parapineal axon projections to the left habenula<sup>22</sup> occur at larval stages, that is, well after the habenulae have acquired their L/R identity. Along the same line, chondrichthyans have been reported to lack a parapineal organ and neither neurochemical descriptions nor tract-tracing analyses have been able to reveal asymmetric pineal projections<sup>6,27,28</sup>. Here, we address the origin

and evolution of vertebrate epithalamic L/R asymmetries by analysing the mechanisms controlling their formation in two lamprey species (*Petromyzon marinus* and *Lampetra planeri*) and in the catshark (*Scyliorhinus canicula*), representatives of cyclostomes and chondrichthyans, respectively. We investigate the role of nodal in setting up habenular L/R asymmetry in both species. We show that, although habenular molecular asymmetries are conserved in cyclostomes, chondrichthyans and teleosts, habenular asymmetry in the catshark and lampreys occurs in a nodal-dependent manner, with nodal playing a pivotal role in the generation of L/R asymmetry *per se.* Our work thus highlights an ancient genetic programme already operating in the last common ancestor of vertebrates, and provides an entry point to explore the link between epithalamic asymmetry diversification and behavioural adaptation in the major vertebrate lineages.

#### Results

Conserved diencephalic molecular asymmetries in vertebrates. Orthologues of Nodal, Lefty and Pitx2, three key components of the nodal pathway, can be identified in the catshark and lamprey (Fig. 1, phylogenetic analyses in Supplementary Fig. 1a; Supplementary Table 1). As described in the zebrafish, the catshark orthologues of Nodal, Vg1, Lefty and Pitx2 (ScNodal, ScVg1, ScLeftyB and ScPitx2) and lamprey P. marinus orthologues PmPitxA and PmLefty are expressed in the left part of the lateral plate mesoderm (LPM) at neural plate stages (Supplementary Fig. 1b-f; Fig. 1i,l). Dorsal diencephalon expression in both the catshark and lamprey begins after neural tube closure, from stages 17 to 20 in the catshark and stages 22 to 24 in the lamprey. In both species, all the analysed nodal pathway components are expressed on the left side of the dorsal diencephalon (Figs 1a-o; Supplementary Fig. 1g-j). In the catshark, ScPitx2 is detected throughout all stages analysed (Fig. 1g,h; Supplementary Fig. 2a-c, see below), while in the lamprey, PmPitxA transcripts remain undetectable except at stage 24 (see below Fig. 2 and Supplementary Fig. 2). Importantly, asymmetric diencephalic expression of the Nodal-Lefty-Pitx cassette is observed on the left side in 100% of analysed embryos (Supplementary Table 2).

In the zebrafish, Pitx2 and Lefty are downstream targets of nodal signalling. In the catshark, nodal inhibition through pharmacological treatment using the nodal antagonist SB-505124 leads to the loss of ScPitx2 transcripts specifically in the LPM, when injections are performed at stages 13-14, that is, before nodal expression in the LPM (Supplementary Table 3; compare Fig. 1s,t). When conducted at stage 15-16, just before the start of nodal pathway activation in the central nervous system, SB-505124 injections result in specific loss of nodal activation markers in the diencephalon of both catshark and lamprey P. marinus early embryos (Supplementary Table 3; compare Fig. 1q,r; Supplementary Fig. 1k and compare Fig. 1u-x). In contrast, catshark *ScPitx2* LPM asymmetric expression, as well as its symmetric expression in the pharyngeal region or in the mandibular mesoderm, is not affected in these conditions (Fig. 1q,r and Supplementary Fig. 1k). Taken together, these results indicate that left-sided diencephalic expression of the Nodal-Lefty-Pitx cassette is present in the catshark and lamprey, with a robust laterality in both species.

Conserved habenular asymmetries in catshark and lamprey. On the basis of the relative habenulae size, larger on the left in chondrichthyans and on the right in lampreys, the directionality of epithalamic asymmetries is thought to differ between these two taxa<sup>4</sup>. However, such variations are not supported by the results above showing laterality conservation of the Nodal-Lefty-Pitx cassette on the left side of the diencephalon in the catshark and

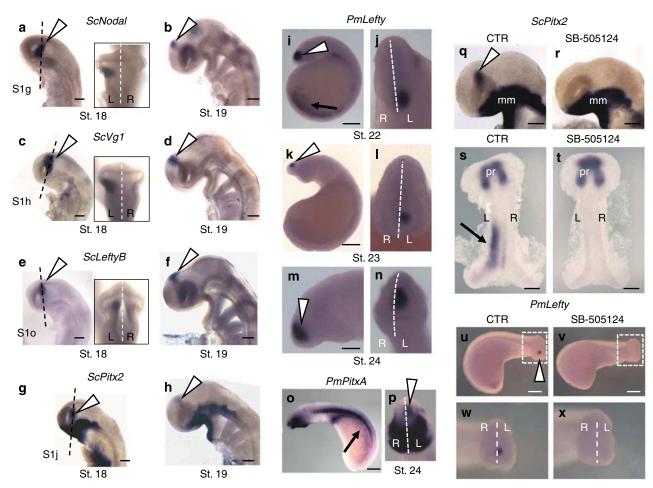


Figure 1 | A Nodal-Lefty-Pitx cassette is asymmetrically expressed in the diencephalon of catshark and lamprey embryos. (a-h) ScNodal, ScVg1, ScLeftyB and ScPitx2 expression in the catshark. (a-h) Represent left lateral views of catshark embryos after hybridization with ScNodal (a,b), ScVg1 (c,d), ScLeftyB (e,f) and ScPitx2 (g,h) probes. (a,c,e,g) and (b,d,f,h) show stage 18 and 19 embryos, respectively. Insets show dorsal views of the head region of the embryos shown in (a,c,e), confirming the left-restricted diencephalic expression of each gene. (i-p) PmLefty and PmPitxA expression in the lamprey P. marinus. (i,k,m,o) Represent left lateral views of lamprey embryos from stage 22 to stage 24 as indicated after hybridization with PmLefty (i-m) and PmPitxA (o) probes. Higher magnification of the head region in m. Frontal views of the head region of the embryos (i,k,m,o) are shown in (j,l,n,p), confirming the left-restricted diencephalic expression of Lefty and PitxA. (q-x) Effect of SB-505124 treatment on ScPitx2 and PmLefty expression. (q-t) Show the expression pattern of ScPitx2 in catshark embryos following short-term treatment with DMSO (CTR: q,s) or with a nodal/activin inhibitor (SB-505124: r,t). (q,r) Show left lateral views of the head region, (s,t) dorsal views. Treatments were conducted from stage 13 to 14 (s,t) or from stage 15 to 16 (q,r), respectively, resulting in the loss of LPM or diencephalon ScPitx2 expression. Similar results were obtained using a lower dose (50 μM) of SB-505124 (Supplementary Table 3). (u,v) Show the expression pattern of PmLefty in lamprey (L. planeri) embryos treated with DMSO (CTR: u) or with a nodal/activin inhibitor SB-505124 (v). (w,x) Higher magnification of the boxed areas in (u,v), showing front views of the head region. Dotted black lines indicate planes of the sections shown in Supplementary Fig. 1g-j. Dotted white lines mark the location of the midline. Black arrows and white arrowheads, respectively, point to gene expressions in the left LPM and in the diencepha

lamprey. Analysis of the expression of habenular asymmetric molecular markers described in teleosts allows further comparisons of the laterality of epithalamic asymmetries between both species. In the catshark, the size difference between the left and right habenulae becomes evident in the anterior-most part of the developing habenulae at stage 31 (Supplementary Fig. 2g). A left restricted *ScPitx2* expression persists in these structures from stages 27 to 31 (Fig. 2a–d; Supplementary Fig. 2a–c). As in the zebrafish<sup>12,29</sup>, expression of the catshark *kctd* orthologues (*ScKctd12a*, *ScKctd12b*, *ScKctd8*) is not restricted to one side, although their expression appears stronger in the left habenula as early as stage 29 (Supplementary Fig. 2d–f). The asymmetry of *ScKctd12a*, *ScKctd12b* and *ScKctd8* in the left and right habenulae is significantly enhanced at stage 31, with additional territories in the left habenula (Fig. 2e–h;

Supplementary Fig. 2g). Laterality of *ScPitx2* expression is conserved in the catshark adult brain (Fig. 3a,b). In contrast, *ScKctd8* and *ScKctd12b* are expressed in both left and right adult habenulae, albeit with different patterns (Fig. 3c–f), as previously described in zebrafish larvae<sup>29</sup>. In the lamprey, a marked size difference between the two habenulae is already visible in stage 27 prolarvae<sup>30</sup> (see below). However, the single member of the Kctd8/12/16 family, termed *PmKctd12* (based on its close relationship with the *Kctd12* class; Supplementary Fig. 1a and Supplementary Table 5), is first expressed at larval stage, restricted to the left habenulae (Fig. 2l). In the adult, however, *PmKctd12* expression is present on both sides, albeit asymmetrically as an anterior signal is only observed in the left habenulae (Fig. 3i,j). *PmPitxA* expression is undetectable in the habenulae at these stages (Figs 2k and 3g,h). Fgf signalling plays a

3

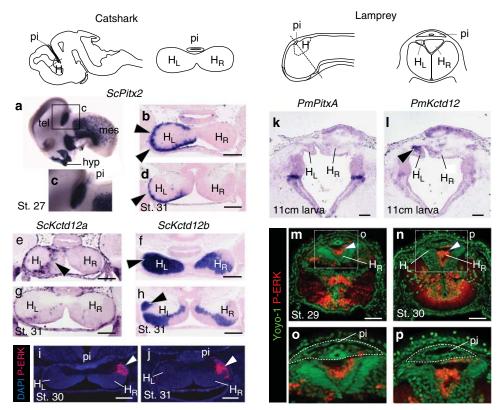


Figure 2 | Conserved molecular asymmetries in the developing habenulae of the catshark and lamprey. The two drawings at the top of each panel correspond to schematic representations of the embryonic catshark (left panel) and lamprey (right panel) brains showing pineal organ and habenulae location. Dotted lines indicate section planes. A schematic representation of these sections is shown beside the drawings. (a-h) Asymmetric expression of *ScPitx2, ScKctd12a* and *ScKctd12b* in the catshark developing habenulae and of *PmPitxA* and *PmKctd12* in *P. marinus* developing habenulae (k,l). (a,c) Display left lateral views of a stage 27 catshark brain after whole-mount hybridization with a *ScPitx2* probe, (c) corresponding to a higher magnification of the region boxed in (a). (b,d), (e,g), (f,h) Show transverse sections of stage 31 habenulae (level of d,g,h more posterior than b,e,f), following *in situ* hybridization with *ScPitx2, ScKctd12a* and *ScKctd12b* probes, respectively. Note that, at this stage, the size difference between the left and right habenulae is visible at anterior levels. (k) and (l) show habenulae transverse sections of a 11-cm *P. marinus* larva, following *in situ* hybridization with *PmPitxA* and *PmKctd12* probes, respectively. Section planes are oriented as shown on the schemes on the top of the figure. (i,j and m-p) Differential accumulation of P-ERK in the left and right habenulae in the catshark and the lamprey. (i,j) and (m,n), respectively, show transverse sections of developing habenulae in stage 30-31 catshark embryos and in stage 29-30 lamprey prolarvae, following fluorescent immunohistochemistry using an anti P-ERK antibody. The fluorescent P-ERK signal is shown in red, nuclei were stained with DAPI (blue, i,j) or YOYO-1 (green, m-p). (o) and (p) show close-up views of the epithalamic regions boxed in (m) and (n), respectively. Black and white arrowheads point to left-sided *in situ* hybridization and right-sided immunohistochemistry signals in (b,d,e,f,h,l) and (i,j,m,n), respe

key role in the generation of habenular asymmetries in the zebrafish. Interestingly, analysis of MAPK-ERK activity in the catshark and lamprey epithalami highlights a strong signal exclusively in the right habenula in both species (Fig. 2i,j,m-p). In the catshark, P-ERK is first observed at stage 30 in the dorsolateral part of the right habenula, and more prominently so at stage 31 (Fig. 2i,j; bright fields shown in Supplementary Fig. 2i,j). This molecular asymmetry is conserved in P. marinus in which a strong P-ERK habenular signal is observed starting from stage 29, with a clear restriction on the right side (Fig. 2m-p). These data provide the first evidence of an asymmetric MAPK-ERK activity in the vertebrate habenulae. As was the case for the Nodal-Lefty-Pitx cassette, no evidence for a laterality shift of these molecular markers was observed in any of the embryos analysed (n = 36). Taken together, these data highlight conservations of molecular habenular asymmetries between the catshark and lamprey, with the same laterality.

Symmetric early pineal development in lamprey and catshark. Migration of the parapineal rudiment is required for the

elaboration of habenular asymmetry in zebrafish. Whether morphogenesis of the lamprey and the catshark pineal field may also be asymmetric at stages preceding, or concomitant with, the establishment of habenular asymmetries is currently unknown. In the catshark, pineal evagination above the developing habenulae begins at stage 21 (ref. 31) and progresses symmetrically, keeping the same proportion between the left and right sides (Supplementary Figs 3, 4b,c). No asymmetric pineal cell cluster protrusion can be detected through stages 21 to 32, as assessed by the expression of pineal complex marker ScOtx5 (Fig. 4a-d; Supplementary Fig. 4c), suggesting absence of pineal asymmetry or migration before the establishment of habenular L/R identity. In addition, no expression of ScGfi1, the catshark orthologue of the zebrafish-specific parapineal marker Gfi1 (ref. 32) (see phylogenetic analysis in Supplementary Fig. 1a), can be observed at the level of the pineal or habenulae (Supplementary Fig. 4d,e). Finally, no evidence for a diencephalic expression of *ScFgf8* can be detected from stage 19 onwards (Supplementary Fig. 4a,b), providing evidence against conservation in the catshark of Fgf8 role in parapineal specification and migration.

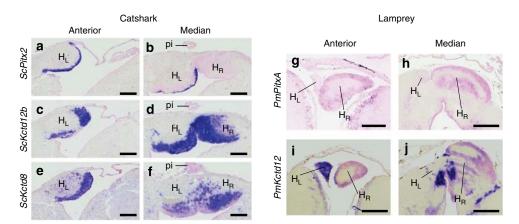


Figure 3 | Molecular and anatomical asymmetries are maintained in the catshark and lamprey adult habenulae. (a-f) Show transverse sections through the adult catshark habenulae at anterior (a,c,e) and median (b,d,f) levels, following *in situ* hybridization with the indicated probes (a,b:ScPitx2; c,d: ScKctd12b; e,f: ScKctd8). Only the left habenula appears in the anterior sections due to its larger size. The left-sided expression of ScPitx2 (a,b) is maintained in the adult while ScKctd12b (c,d) and ScKctd8 (e,f) exhibit a bilateral albeit asymmetric expression. (g-j) Show transverse sections through the adult habenulae in *P. marinus* at anterior (g,i) and median (h,j) levels, following *in situ* hybridization with the indicated probes (g,h: PmPitxA; i,j: PmKctd12). Scale bars, 200 μm. pi = pineal stalk; H<sub>L</sub> = left habenula; H<sub>R</sub> = right habenula.

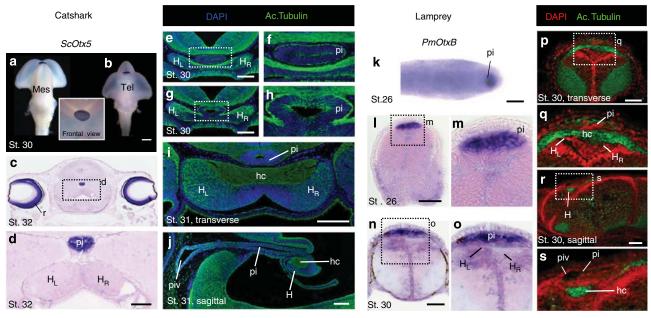


Figure 4 | Absence of overt pineal complex asymmetry in catshark embryos or lamprey prolarvae. (a-j) Characterization of the developing pineal organ in the catshark. (a,b) Show whole-mount views of stage 30 catshark brain following hybridization with a *ScOtx5* probe (dorsal views in (a) antero-ventral view in (b)). (c,d) Show transverse sections through the habenular region and the pineal stalk at stage 32, following hybridization with a *ScOtx5* probe (d higher magnification of the region boxed in c). (e-j) Show sections of the developing epithalamus in catshark embryos following immunohistochemistry with an antibody directed against acetylated tubulin (green) and DAPI staining (blue). (e,g) Represent consecutive transverse sections at the basis of the pineal stalk at stage 30. (f) and (h) are enlarged views of the region boxed in (e) and (g), respectively. (i) and (j) are, respectively, transverse and sagittal sections of the catshark epithalamus at stage 31. (k-s) characterization of the developing pineal organ in the lamprey *P. marinus*. (k) Shows the dorsal view of the head region of a lamprey prolarva (stage 26, anterior to the right) following whole-mount hybridization with a *PmOtxB* probe. (l) and (n) show transverse sections of stage 26 and 30 lamprey prolarvae following hybridization with a *PmOtxB* probe. (m) and (o) Represent close-up views of the boxed areas in (l) and (n), respectively. (p,r) Show sections of the developing epithalamus in lamprey prolarvae following immunohistochemistry with an anti-acetylated tubulin antibody (green) and DAPI staining (red, pseudocolour). (p) and (r) respectively show transverse and sagittal sections of a stage 30 prolarva, (q) and (s) represent close-up views of the areas boxed in (p) and (s). Strong staining at the base of the pineal stalk in (e,i) (catshark) and (p) (lamprey) corresponds to the habenular commissure between the left and right habenulae. This structure is also visible on sagittal sections (catshark, j; lamprey, s). H = habenulae; hc = habenu

In the lamprey, the parapineal organ forms a second pineal outgrowth at the midline, rostrally to the pineal organ<sup>18,30</sup>, and projects to the left habenulae, although this occurs at larval stages<sup>33</sup> (Supplementary Fig. 3). Consistently, no evidence for

parapineal evagination can be observed at stage 30 (that is, when L/R habenular identity is already visible), while the pineal stalk and evagination are clearly visible on sagittal sections (Fig. 4r,s). Importantly, the *PmOtxB*-expressing forebrain territory appears

5

symmetric from stage 26 to 30 (Fig. 4k–o). The difference in size between the two habenulae observed from stage 27 thus does not correlate with overt asymmetry of the *PmOtxB* transcript distribution in the pineal field (Fig. 4n–q). Finally, analysis of neuronal projections in the catshark and lamprey embryonic brains through acetylated tubulin staining show no evidence of asymmetric fibres projecting from the pineal complex to the habenulae (Fig. 4e–j,p,q). Altogether, molecular characterizations provide no evidence of asymmetric cell migrations from the pineal primordium into the left habenulae at stages preceding, or concomitant with, the establishment of habenular asymmetry either in the catshark or the lamprey.

Abrogation of nodal signalling leads to right isomerism. The role of nodal signalling in the generation of epithalamic asymmetry can be directly analysed in the catshark and lamprey through pharmacological treatment using SB-505124. In the catshark, injection of the drug at stage 16, that is, immediately before the onset of nodal signalling activity in the diencephalon, leads 60-70 days later, at stage 31, to the following phenotype. Visceral organ asymmetry is maintained in these conditions, indicating that nodal activity later than stage 16 is not essential for visceral asymmetry establishment (Supplementary Fig. 5a,b). In contrast, habenular L/R asymmetry is lost in all SB-505124 injected embryos (n = 10; Fig. 5, Supplementary Table 6). First, in all treated embryos, the left habenulae decrease to a size comparable to their right counterpart, while a marked size difference in the anterior part of the organ is consistently observed at this stage in control and untreated embryos (compare Fig. 5a,b, Fig. 5c,d). Second, all molecular markers tested become symmetrically expressed after treatment, with a right isomerism (Supplementary Table 7). The left-sided ScPitx2 expression is completely lost (Fig. 5a,b), while the left and right catshark habenulae show a symmetric, right-sided like expression pattern of ScKctd12b (compare Fig. 5c,d), ScKctd12a and ScKctd8 (Supplementary Fig. 5c). In particular, the specific left ScKctd12bexpressing territory normally observed in untreated or control embryos is undetectable in treated embryos (Fig. 5c,d). P-ERK expression, restricted to the right habenula in a control embryo as in all untreated embryos analysed, also becomes bilateral after treatment (compare Fig. 5e,f). In contrast, the pineal rudiment appears appropriately specified, as assessed by its morphology and ScOtx5 expression in treated embryos (Supplementary Fig. 5d,e), making it unlikely that right habenular isomerism might be a secondary effect of pineal malformation. In the lamprey, SB-505124 treatments conducted from stages 21 to 24 also result in habenular defects at stages 27 and 30 (Supplementary Tables 6 and 7). Similarly to treated catshark embryos, habenulae from treated lamprey embryos are completely symmetric, both in terms of size, which increases on the left to the size of the right habenula (compare Fig. 5g,i and Fig. 5h,j), and of expression of P-ERK, which is expressed in both the right and left habenulae at stage 30, contrary to wild-type embryos (compare Fig. 5k and Fig. 5l). In summary, based on size and molecular marker analysis, nodal abrogation leads to a right isomerism in the lamprey and the catshark developing epithalamus.

#### Discussion

Our work investigates the role of nodal signalling in establishing L/R epithalamus asymmetry in the catshark and lamprey, providing novel insights into the ancestral role of nodal signalling in the vertebrate forebrain. We thus reveal the conservation of diencephalic and habenular molecular asymmetry across the three major vertebrate taxa, cyclostomes, chondrichthyans and osteichthyans, supporting the hypothesis that stereotyped L/R

asymmetry directionality in the brain was already present in early vertebrates. Importantly though, and contrary to what has been described in the zebrafish <sup>10,11,34</sup>, we show that establishment of habenular asymmetric identity in the catshark and lamprey occurs through a nodal-dependent mechanism, in the absence of overt asymmetric development of the pineal field. These data shed new light on both the origin and evolution of the mechanisms controlling epithalamic asymmetries in vertebrates.

From a mechanistic standpoint, nodal signalling appears as a conserved determinant of habenular L/R molecular identity in the lamprey and catshark, as assessed by the expression of L/R molecular markers. However, it differentially controls left habenulae size between the two species (its loss resulting in an increase in the lamprey and a reduction in the catshark). Conservation of molecular laterality between the two species indicates that relative habenulae size (larger on the left in the catshark but right in the lamprey) is not, in actual fact, a reliable indicator of L/R identity. This uncoupling may be related to different cellular roles of Nodal signalling in the catshark and the lamprey. An alternative hypothesis may be that nodal differentially controls the size of distinct habenular sub-territories occupying different proportions of the habenulae depending on species. Indeed, reiterated reciprocal expansions/contractions of conserved habenular subregions are known to have taken place during osteichthyan evolution<sup>3,35</sup>. Further analyses of the roles of nodal in the control of cell proliferation, apoptosis and neurogenesis, a process known to be essential to the generation of epithalamic asymmetries in the zebrafish<sup>36,37</sup>, should help to clarify this point.

From an evolutionary standpoint, conservation of the role of nodal signalling in breaking habenular symmetry in both the catshark and lamprey suggests that it is likely to be an ancestral characteristic of vertebrates. Interestingly, this role appears largely lost in the zebrafish, as nodal abrogation results in a laterality shift rather than a loss of habenular asymmetries. However, in this species, nodal has also been shown to control an early asymmetric neurogenesis, preceding, and therefore independent of lateralized parapineal migration<sup>37</sup>. We propose that this role may be a vestigial heritage of an ancestral, parapineal independent nodal role, prevailing in early vertebrates and maintained in the lamprey and catshark (Fig. 6). In support of this hypothesis, a role of nodal signalling in breaking symmetry has been previously reported in non-vertebrate deuterostomes and in protostomes, likely reflecting an ancient function of the pathway. Nodal abrogation thus induces a morphological symmetry of the sensory vesicle in ascidia<sup>38</sup>, the formation of an additional rudiment on the right side of the sea urchin larva<sup>39</sup> and a straight-shelled phenotype in gastropods<sup>40</sup>. Work in *Ciona intestinalis*<sup>38</sup> suggests that this ancestral function of nodal signalling may already have been operating in the anterior nervous system of olfactores, that is, before the emergence of vertebrates.

This ancestral role of nodal is not exclusive of additional parapineal-dependent symmetry breaking mechanisms. The presence or absence of a parapineal organ appears as a highly variable trait across vertebrates and mechanisms responsible for this variability remain totally unknown. Interestingly, *Pitx2* has recently been shown to be involved in restricting parapineal cell number in the zebrafish<sup>41</sup>. Thus, it is tempting to speculate that modulations of *Pitx2* gene expression duration could account for parapineal variability. In line with this hypothesis, we report a correlation between the time-frame of *Pitx2* expression in the catshark (*ScPitx2* persistent) and the lamprey (*PmPitxA* restricted to a narrow developmental time window) and the absence (catshark) or presence (lamprey) of a parapineal organ. The key role of this organ in zebrafish suggests that its reiterated rise or regression across vertebrates may be a factor contributing to the

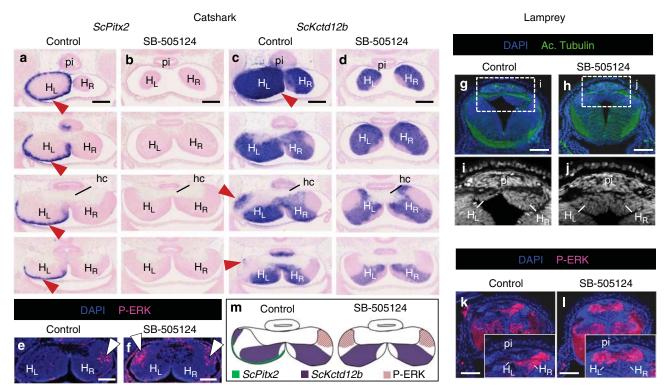


Figure 5 | Nodal abrogation induces a right isomerism in the catshark and lamprey epithalami. (a-f) Effect of SB-505124 treatment on habenular development in the catshark *S. canicula*. (a-f) Show transverse sections of stage 31 control embryos (a,c,e) and SB-505124-treated embryos (b,d,f), following hybridization with *ScPitx2* (a,b) and *ScKctd12b* (c,d) probes, or following immunohistochemistry using an antibody directed against P-ERK (e,f). In (a-d), successive section planes are shown from anterior to posterior levels, with the same orientation as depicted in Fig. 2. (e,f) Show sections at a median level. Red arrowheads in (a,c) point to left-sided hybridization signals present in control embryos but lost in SB-505124 treated embryos. White arrowheads in (e) point to P-ERK signals, restricted to the right in untreated or DMSO-injected embryos but found on both sides in SB-505124-treated embryos (f). A size difference is observed between the left and the right habenulae at anterior levels (larger on the left) in control embryos. Treated embryos exhibit a size reduction of the left habenula. (g-l) Effect of SB-505124 treatment on habenular development in the lamprey *L. planeri*. (g-l) Show transverse sections of stage 27 (g,h) and stage 30 (k,l) embryos following DAPI staining (blue) and immuno-histochemistry with an anti-acetylated tubulin (g,h; green) and an anti-P-ERK antibody (k,l; red). (i) and (j) show DAPI staining of the region boxed in (g) and (h), respectively, at higher magnification. Control embryos (g,i,k) exhibit a larger size of the right habenula and an asymmetric right P-ERK activity (k). In SB-505124-treated embryos (h,j,l), a size increase of the left habenula, resulting in a right isomerism, is observed (j) and the P-ERK signal is equally distributed between the left and right habenulae (l). Insets in (k,l) represent close-up views of the developing epithalamus. (m) Scheme showing molecular changes in habenulae of control and SB-505124-treated embryos. hc = habenular commissure; H<sub>L</sub> =

diversification of habenular asymmetries. In teleosts, nodal signalling may thus have been recruited to bias laterality, possibly concomitantly with the emergence of a new parapineal-dependent mechanism, which now prevails in zebrafish (Fig. 6). Whether additional habenular asymmetries may similarly be induced in a later phase in the lamprey, concomitantly with parapineal organ formation or differentiation, remains to be assessed.

In conclusion, our data support the hypothesis that before the split between chondrichthyans and cyclostomes, nodal signalling provided a robust genetic mechanism underpinning symmetry breaking in the vertebrate forebrain, which then mostly evolved into a laterality overseer as observed in teleosts. Understanding whether, as in zebrafish<sup>7,8</sup>, habenular asymmetries controlled by this ancestral heritable mechanism may influence the processing and integration of sensory information in cyclostomes and chondrichthyans could reveal ancient adaptive mechanisms responsible for the fixation of this trait in the last common ancestor of vertebrates.

#### Methods

**Obtaining catshark and lamprey embryos.** Scyliorhinus canicula embryos were obtained from the Roscoff Marine Station and staged according to a selection of

morphological criteria reported in refs 42,43. Adult *P. marinus* were caught in April 2012 in Châteaulin (Brittany, France) and in June 2013 in Ulla River (northwestern Spain) during their upstream migratory phase and maintained in the laboratory at 17 °C in filtered fresh water until sexual maturation. Gametes were collected by gentle stripping and fertilized. *Lampetra planeri* embryos and larvae were provided by Guillaume Evanno (INRA, UMR 985 ESE, Rennes France). Lamprey embryos and prolarvae were raised in the laboratory in oxygenated fresh water at 17 °C. They were staged according to ref. 44. All experiments were approved by the local ethic committee (Comité Rennais d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale, C2EA-07, authorization n°R-2012-EG-02).

Whole-mount in situ hybridization and sectioning. ScNodal, ScVg1, ScOtx5 and ScFgf8 antisense RNA probes were synthesized from cDNA fragments subcloned in pSPORT1 (ScNodal, ScVg1 and ScFgf8) or pTZ19R (ScOtx5), and sequenced using Universal M13 primers as previously described 31,43,45. GenBank accession codes for the corresponding sequences are KP698591 for ScNodal, KP698592 for ScVg1, AAK85128.1 for ScOtx5, KP698593 for ScFgf8. The P. marinus PmOtxB probe was obtained by degenerate RT-PCR starting from stage 24 to 28 prolarval cDNAs, cloned into the pTZ19U vector and characterized by sequencing using the universal primers M13\_pUC\_rev and M13\_pUC\_fwd. ScPitx2, ScKctd12a, ScKctd12b, ScLeftyB and PmLefty probes were obtained from collections of embryonic S. canicula or prolarval P. marinus cDNA recombinants, characterized by Sanger sequencing and described in refs 43,46. Cloning of the ScGfi1, ScKctd8 and PmKctd12 gene fragment and riboprobe synthesis are described in Supplementary Table 4. Genbank accession codes for the corresponding sequences are shown in Supplementary Table 1. Blast searches in the current P. marinus genome failed to identify a Gfi1 orthologue. Clone identities were confirmed by the phylogenetic analyses presented in Supplementary Fig. 1. For in situ hybridizations,

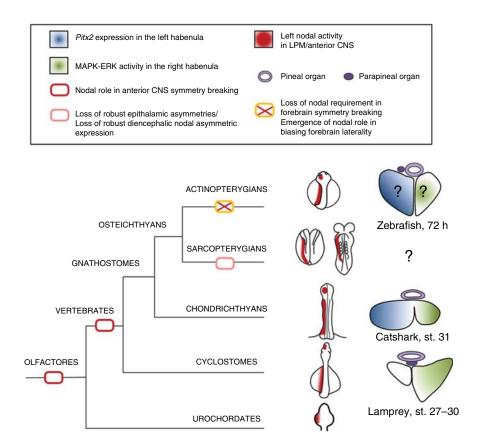


Figure 6 | Evolution of the role of nodal signalling in the formation of L/R asymmetries in the central nervous system. The evolutionary scenario shown is based on analyses conducted in representatives of olfactores (which include vertebrates and tunicates) and of the three major vertebrate taxa, that is, cyclostomes (or agnathans), chondrichthyans (or cartilaginous fishes) and osteichthyans (or bony fishes and tetrapods). Embryos at stages following neural tube closure are schematized to the right of the species tree in the zebrafish, xenopus/mouse, catshark, lamprey and in ciona, from top to bottom. Nodal expression in the LPM or in the diencephalon is shown in red. In line with its ancestrality in vertebrates, an asymmetric diencephalic expression has been observed in the lamprey, catshark and the zebrafish, but not in sarcopterygians thus far. Transverse sections of the developing epithalamus of actinopterygians, catshark and lamprey at the stages indicated are depicted on the right. The presence of pineal or parapineal organs (in light and dark purple, respectively) and their position relative to the habenulae are indicated. Whether the lamprey parapineal, which projects to the left habenula at larval stages, may contribute to the establishment of epithalamic asymmetries remains to be assessed, but our data suggest that it is not essential for initial  $symmetry\ breaking.\ A\ left\ \textit{Pitx2}\ expression\ persisting\ in\ the\ habenulae\ when\ morphologically\ individualized\ (as\ observed\ in\ metamorphic\ flounder\ larvae\ ^{16}$ or the catshark, but not in the lamprey) is shown in blue and a right MAPK-ERK activity (as observed in the catshark and the lamprey) is shown in green. Conservation of right P-ERK and late Pitx2 expressions in the zebrafish remains to be assessed, as indicated by question marks. Boxes on the actinopterygian and sarcopterygian branches of the tree refer to diversifications of the role of nodal in the establishment of epithalamic diversifications in these lineages, the red box on the vertebrate branch refers to the ancestral role of nodal in symmetry breaking in the taxon, as inferred from comparisons between the catshark and lamprey. This role has also been reported in the anterior central nervous system of C. intestinalis, suggesting its ancestrality in olfactores.

digoxigenin-labelled antisense RNA probes were prepared from the selected clones. Whole-mount and section *in situ* hybridizations were conducted using standard protocols adapted to the catshark and lamprey as previously described <sup>43,47,48</sup>. All *P. marinus* probes showed strong hybridization signals in hybridizations of *L. planeri* prolarvae, with indistinguishable expression characteristics.

Immunohistochemistry on lamprey and catshark sections. Specimens fixed in 4% PFA were rinsed in  $1\times$  PBS, dehydrated, embedded in paraffin and cut on a microtome (Leica,  $10\text{--}12\,\mu m$  thick). After epitope unmasking, sections were subjected to immunohistochemistry with an anti-P-ERK (Sigma M-8159, 1:2,000) or an anti-acetylated tubulin (Sigma T-6793, 1:1,000) antibody, using the TSA Plus System kit (Perkin Elmer) according to the manufacturer's conditions. Nuclear staining was achieved using DAP1 or YOYO-3 dye (Invitrogen). Representative embryo sections were scanned with a Leica SP5 confocal laser-scanning microscope.

**Pharmacological treatments of embryos with a nodal inhibitor.** Developing lamprey embryos or catshark embryos were treated with SB-505124 diluted in DMSO, an inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  type I receptors ALK4, ALK5 and ALK7 (ref. 49). For short duration treatments on catshark embryos, 200  $\mu$ l of a

solution containing  $500\,\mu\text{M}$  SB-505124 was injected into the egg case and through the shell either at stages 13 to 14, or at stages 15 to 16. In both cases, the eggs were maintained in oxygenated sea water at 17 °C for 3 days before embryo fixation. Viability in these conditions was higher than 90% in control and treated embryos, but treated embryos failed to survive until stage 31 (while no mortality was observed in control ones). To overcome these lethality problems, the same volume was injected per egg but the drug concentration was lowered to 50 µM for longterm treatments. In this case, the drug was injected at stages 15-16, and the eggs were incubated in oxygenated sea water at 17 °C for ~2 months, until embryos reached stage 31. The effect of the 50 μM drug concentration on ScPitx2 expression at stage 17-18 was also assessed following a 3-day incubation after injection (Supplementary Table 3). In the lamprey, for short-duration treatments, developing embryos (Petromyzon marinus and Lampetra planeri) were placed from stage 21 to 24 into a culture plate containing fresh water with 25 or 75 µM SB-505124 (Fig. 1 and Supplementary Table 3). Long-duration treatments were conducted in Lampetra planeri, using 25 and 50 µM SB-505124 concentrations. Developing embryos were incubated in the presence of the drug from stage 21 to 24 and in fresh water at subsequent stages. A massive mortality (>90%) was observed at stage 26 at the highest drug concentration used (50 µM SB-505124 concentration), and only embryos exposed to a 25 µM SB-505124 concentration were further maintained in culture until fixation at stages 27 and 30. The viability in the latter conditions was > 90%. The effect of this concentration was also assessed on

*PmLefty* expression at stage 24 (Supplementary Table 3). Both in the catshark and lamprey, the same protocol was conducted in parallel for control embryos, except that the injected solution did not contain the drug.

#### References

- Agetsuma, M. et al. The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. Nat. Neurosci. 13, 1354–1356 (2010)
- Hikosaka, O. The habenula: from stress evasion to value-based decisionmaking. Nat. Rev. Neurosci. 11, 503–513 (2010).
- Aizawa, H., Amo, R. & Okamoto, H. Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. Front. Neurosci. 5, 138 (2011).
- Concha, M. L. & Wilson, S. W. Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. J. Anat. 199, 63–84 (2001).
- Concha, M. L., Signore, I. A. & Colombo, A. Mechanisms of directional asymmetry in the zebrafish epithalamus. Semin. Cell Dev. Biol. 20, 498–509 (2009)
- Butler, A. B. & Hodos, W. Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation 2nd edn 739 (John Wiley and Sons, 2005).
- Dreosti, E., Vendrell Llopis, N., Carl, M., Yaksi, E. & Wilson, S. W. Left-right asymmetry is required for the habenulae to respond to both visual and olfactory stimuli. *Curr. Biol.* 24, 440–445 (2014).
- Jetti, S. K., Vendrell-Llopis, N. & Yaksi, E. Spontaneous activity governs olfactory representations in spatially organized habenular microcircuits. *Curr. Biol.* 24, 434–439 (2014).
- Snelson, C. D. & Gamse, J. T. Building an asymmetric brain: development of the zebrafish epithalamus. Semin. Cell Dev. Biol. 20, 491–497 (2009).
- Concha, M. L., Burdine, R. D., Russell, C., Schier, A. F. & Wilson, S. W. A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron* 28, 399–409 (2000).
- 11. Halpern, M. E., Liang, J. O. & Gamse, J. T. Leaning to the left: laterality in the zebrafish forebrain. *Trends Neurosci.* **26**, 308–313 (2003).
- Gamse, J. T., Thisse, C., Thisse, B. & Halpern, M. E. The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon. *Development* 130, 1059–1068 (2003).
- Snelson, C. D., Santhakumar, K., Halpern, M. E. & Gamse, J. T. Tbx2b is required for the development of the parapineal organ. *Development* 135, 1693–1702 (2008).
- Regan, J. C., Concha, M. L., Roussigne, M., Russell, C. & Wilson, S. W. An Fgf8-dependent bistable cell migratory event establishes CNS asymmetry. *Neuron* 61, 27–34 (2009).
- Signore, I. A. et al. Zebrafish and medaka: model organisms for a comparative developmental approach of brain asymmetry. Philos. Trans. R. Soc. London—Ser. B Biol. Sci. 364, 991–1003 (2009).
- Suzuki, T. et al. Metamorphic pitx2 expression in the left habenula correlated with lateralization of eye-sidedness in flounder. Dev. Growth Differ. 51, 797–808 (2009).
- Coolen, M. et al. The Dogfish Scyliorhinus canicula: a reference in jawed vertebrates. CSH Protoc 2008, pdb.emo111 431–446 (2008).
- Villar-Cheda, B. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactivity and development of the pineal complex and habenula of the sea lamprey. Brain Res. Bull. 57, 285–287 (2002).
- Rodriguez-Moldes, I. et al. Immunohistochemical localization of calbindin-D28K in the brain of a cartilaginous fish, the dogfish (Scyliorhinus canicula L.). Acta Anat. (Basel) 137, 293–302 (1990).
- Rodríguez-Moldes, I. et al. Development of the cerebellar body in sharks: spatiotemporal relations of Pax6 expression, cell proliferation and differentiation. Neurosci. Lett. 432, 105–110 (2008).
- Carrera, I., Anadón, R. & Rodríguez-Moldes, I. Development of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cell populations and fiber pathways in the brain of the dogfish Scyliorhinus canicula: New perspectives on the evolution of the vertebrate catecholaminergic system. *J. Comp. Neurol.* 520, 3574–3603 (2012).
- Yáñez, J., Pombal, M. A. & Anadón, R. Afferent and efferent connections of the parapineal organ in lampreys: a tract tracing and immunocytochemical study. J. Comp. Neurol. 403, 171–189 (1999).
- Melendez-Ferro, M. et al. Ontogeny of gamma-aminobutyric acidimmunoreactive neuronal populations in the forebrain and midbrain of the sea lamprey. J. Comp. Neurol. 446, 360–376 (2002).
- Yañez, J. & Anadon, R. Afferent and efferent connections of the habenula in the larval sea lamprey (Petromyzon marinus L.): an experimental study. J. Comp. Neurol. 345, 148–160 (1994).
- Guglielmotti, V. & Cristino, L. The interplay between the pineal complex and the habenular nuclei in lower vertebrates in the context of the evolution of cerebral asymmetry. *Brain Res. Bull.* 69, 475–488 (2006).
- Yáñez, J., Anadón, R., Holmqvist, B. I. & Ekström, P. Neural projections of the pineal organ in the larval sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) revealed by indocarbocyanine dye tracing. *Neurosci. Lett.* 164, 213–216 (1993).

- Mandado, M., Molist, P., Anadón, R. & Yáñez, J. A DiI-tracing study
  of the neural connections of the pineal organ in two elasmobranchs
  (Scyliorhinus canicula and Raja montagui) suggests a pineal projection to the
  midbrain GnRH-immunoreactive nucleus. *Cell Tissue Res.* 303, 391–401
  (2001).
- Carrera, I. et al. GABAergic system of the pineal organ of an elasmobranch (Scyliorhinus canicula): a developmental immunocytochemical study. Cell Tissue Res. 323, 273–281 (2006).
- Gamse, J. T. et al. Directional asymmetry of the zebrafish epithalamus guides dorsoventral innervation of the midbrain target. Development 132, 4869–4881 (2005).
- Melendez-Ferro, M. et al. Early development of the retina and pineal complex in the sea lamprey: Comparative immunocytochemical study. J. Comp. Neurol. 442, 250–265 (2002).
- 31. Sauka-Spengler, T., Baratte, B., Shi, L. & Mazan, S. Structure and expression of an Otx5-related gene in the dogfish Scyliorhinus canicula: evidence for a conserved role of Otx5 and Crxgenes in the specification of photoreceptors. *Dev. Genes Evol.* 211, 533–544 (2001).
- Dufourcq, P., Rastegar, S., Strähle, U. & Blader, P. Parapineal specific expression of gfi1 in the zebrafish epithalamus. Gene Expr. Patterns 4, 53–57 (2004).
- Nieuwenhuys, R., Donkelaar, H. J. & Nicholson, C. The Central Nervous System of Vertebrates 397–495 (Springer, 1998).
- Liang, J. O. et al. Asymmetric nodal signaling in the zebrafish diencephalon positions the pineal organ. Development 127, 5101–5112 (2000).
- Aizawa, H. Habenula and the asymmetric development of the vertebrate brain. *Anat. Sci. Int.* 88, 1–9 (2013).
- Aizawa, H., Goto, M., Sato, T. & Okamoto, H. Temporally regulated asymmetric neurogenesis causes left-right difference in the zebrafish habenular structures. Dev. Cell 12, 87–98 (2007).
- Roussigné, M., Bianco, I. H., Wilson, S. W. & Blader, P. Nodal signalling imposes left-right asymmetry upon neurogenesis in the habenular nuclei. *Development* 136, 1549–1557 (2009).
- 38. Yoshida, K. & Saiga, H. Repression of Rx gene on the left side of the sensory vesicle by Nodal signaling is crucial for right-sided formation of the ocellus photoreceptor in the development of Ciona intestinalis. *Dev. Biol.* 354, 144–150 (2011).
- Duboc, V., Röttinger, E., Lapraz, F., Besnardeau, L. & Lepage, T. Left-right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by nodal signaling on the right side. *Dev. Cell* 9, 147–158 (2005).
- Grande, C. & Patel, N. H. Nodal signalling is involved in left-right asymmetry in snails. *Nature* 457, 1007–1011 (2009).
- Garric, L. et al. Pitx2c ensures habenular asymmetry by restricting parapineal cell number. Development 141, 1572–1579 (2014).
- Ballard, W. W., Mellinger, J. & Lechenault, H. A series of normal stages for development of Scyliorhinus canicula, the lesser spotted dogfish (Chondrichthyes: Scyliorhinidae). J. Exp. Zool. 267, 318–336 (1993).
- Coolen, M. et al. Evolution of axis specification mechanisms in jawed vertebrates: insights from a chondrichthyan. PLoS ONE 2, e374 (2007).
- Tahara, Y. Normal stages of development in the lamprey, Lampetra reissneri (Dybowski). Zool. Sci. 5, 109–118 (1988).
- Compagnucci, C. et al. Pattern and polarity in the development and evolution of the gnathostome jaw: Both conservation and heterotopy in the branchial arches of the shark, Scyliorhinus canicula. Dev. Biol. 377, 428–448 (2013)
- Guérin, A. et al. Neurodevelopment genes in lampreys reveal trends for forebrain evolution in craniates. PLoS ONE 4, 16 (2009).
- 47. Derobert, Y., Baratte, B., Lepage, M. & Mazan, S. Pax6 expression patterns in *Lampetra fluviatilis* and *Scyliorhinus canicula* embryos suggest highly conserved roles in the early regionalization of the vertebrate brain. *Brain Res. Bull.* 57, 277–280 (2002).
- Plouhinec, J. L. et al. Comparative analysis of gnathostome Otx gene expression patterns in the developing eye: implications for the functional evolution of the multigene family. Dev. Biol. 278, 560–575 (2005).
- DaCosta Byfield, S., Major, C., Laping, N. J. & Roberts, A. B. SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. Mol. Pharmacol. 65, 744–752 (2004).

#### **Acknowledgements**

We thank S. Henry, R. Garnier, R. Lasbleiz and G. Schires for their help in catching adult sharks, G. Evanno for providing lamprey embryos and D. Schausi for excellent technical help. EST sequences were obtained with the support of Genoscope, Evry, France and databases were constructed with the support of W. Carré, ABiMS FR2424. We are most grateful to M. Perennou and G. Tanguy from the Biogenouest Genomics and Genomer core facility for their technical support. We thank T. Sauka-Spengler and M. Bronner-Fraser for providing the *PmPitxA* probe and R. Anadon for helpful comments on the manuscript. This work was funded by grants from Région Centre and Région Bretagne (EVOVERT grant number 049755; PEPTISAN grant number 10010133), National

102

Research Agency (grant ANR-09-BLAN-026201), CNRS, Université d'Orléans and Université Pierre et Marie Curie. R.L. is currently supported by doctoral CNRS fellowship, L.L. by post-doctoral ANR contract (grant ANR-09-BLAN-026201), P.P. and B.G. were funded by Région Bretagne.

#### **Author contributions**

S.M. designed the study; R.L., A.B., L.L., A.M., A.A., C.R., B.G. and M.C.R. conducted *in situ* hybridizations, immunohistochemistry and pharmacological treatments; C.R., R.L., L.L., A.M., M.C.R. and Q.R. conducted lamprey egg fertilizations and provided fixed and live embryos for pharmacological treatments; P.P. provided catshark transcriptomic/ EST database; A.B. and H.M. conducted phylogenetic analyses; A.B. amplified and cloned probes; A.B., S.M., R.L., I.R.-M. and M.C.R. interpreted the results; A.B. and S.M. wrote the manuscript with inputs from all authors.

#### **Additional information**

Accession codes: The sequences generated in this study have been deposited in GenBank nucleotide database under the accession codes KF190312 to KJ190316, KM041048, KM041049, KJ623814, KJ623815.

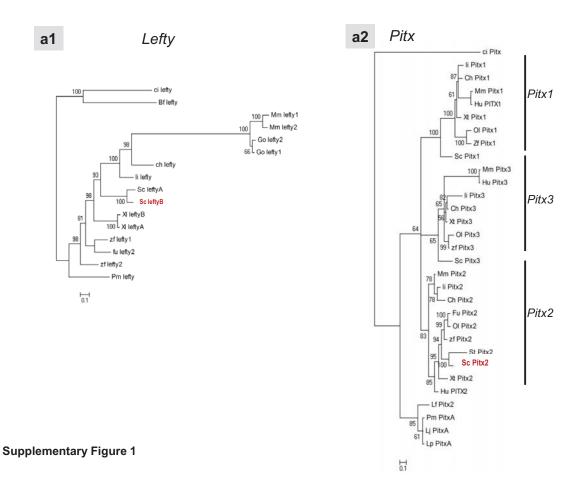
Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/ naturecommunications

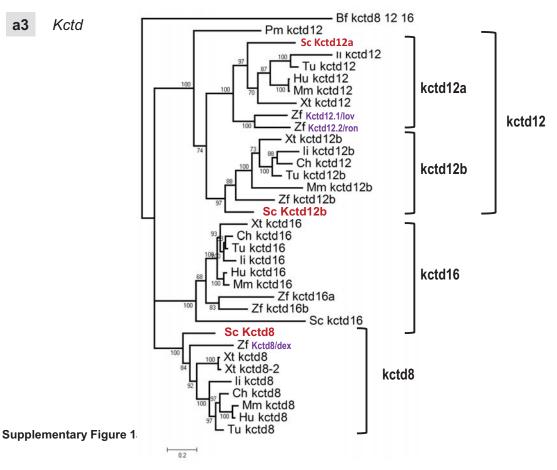
Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

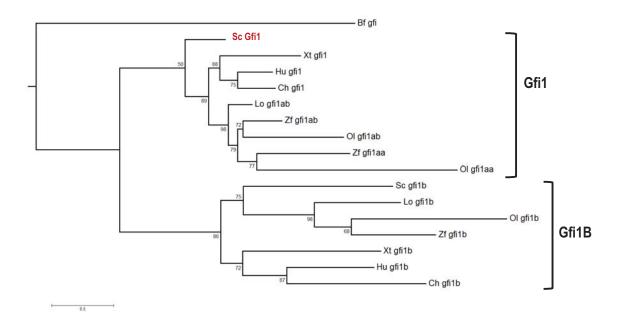
**How to cite this article:** Lagadec, R. *et al.* The ancestral role of nodal signalling in breaking L/R symmetry in the vertebrate forebrain. *Nat. Commun.* 6:6686 doi: 10.1038/ncomms7686 (2015).

**Matériels Supplémentaires** 

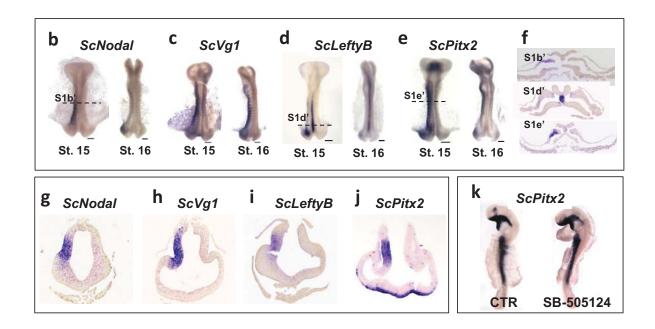




# a4 Gfi1



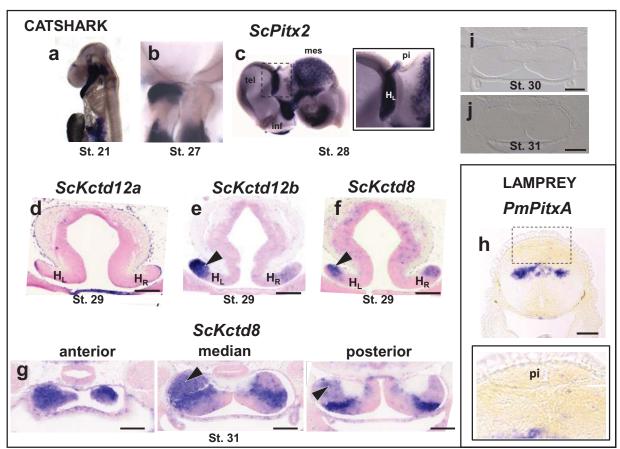
#### **Supplementary Figure 1**



#### Supplementary Figure 1. Asymmetric expression of a Nodal-Pitx cassette in the catshark

- (a) Bayesian (a1,a2,a3) and ML (a4) phylogenetic trees of *Lefty* (a1), *Pitx* (a2), *Kctd* (a3) and *Gfi1* (a4) genes. Amino acid sequences of gene family members were aligned using CLUSTAL W program¹ and manually corrected with BioEdit². For the analysis shown in (a1,a2,a3), Bayesian Inference trees were performed using MrBayes 3.1.2³.4 with the model recommended by ProTest 2.4⁵ under the Akaike information and the Bayesian information criterions. We used the JTT + G model for *Lefty*, *Pitx* and *Kctd* gene families. Convergence was reached when the value for the standard deviation of split frequencies stayed below 0.01. Burn-in was determined by plotting parameters across all runs for both analysis: all trees prior to convergence were discarded and consensus trees were calculated for the remaining trees. One MrBayes run of 2,000,000 generations was used for *Lefty* gene tree (80,000 generation burn-in). One MrBayes run of 7,000,000 generations was used for *Fitx* gene tree (62,040 generation burn-in). One Mr Bayes run of 3,000,000 generations was used for *Kctd* gene tree (4,590 generation burn-in). For the analysis shown in (a4), the tree was constructed by PhyML (version 3.0), integrated into Seaview 4.2, using the Maximum Likelihood method and the LG-F+F<sub>12</sub>+1 substitution model. SPR was used to compute the tree. Branch supports were calculated *a posteriori* and are displayed. The trees were viewed and edited with the TreeExplorer programme in MEGA 4.0<sup>6</sup>. Numbers indicate posterior probabilities. Accession numbers and nomenclature for the sequences used in the phylogenetic reconstructions are provided in Supplementary Table 1.
- (a1) The tree topology obtained supports the conclusion that the catshark harbours two *Lefty* genes, generated by a duplication in the chondrichthyan lineage.
- (a2) The tree topology confirms the presence of three Pitx orthology classes and confirms *ScPitx2* as the representative of the Pitx2 class with a good statistical support (PP=83).
- (a3) The tree topology highlights four strongly supported monophyletic groups in the Kctd8/12/16 family, each of them containing representatives of the major osteichthyan lineages and one catshark gene. This supports the conclusion that these four classes emerged prior to the gnathostome radiation. Lineage specific duplication have occurred in actinopterygians, as assessed by the grouping of ZfKctd12.1/lov and 12.2/ron or ZfKctd16a and Kctd16b as previously observed7. This tree confirms the catshark ScKctd12a, ScKctd12b and ScKctd8 genes as orthologues of respectively ZfKctd12.1/2, ZfKctd12b and ZfKctd8.
- (a4) The tree topology highlights the presence of two gnathostome Gfi1 classes in jawed vertebrates and confirms *ScGfi1* gene as the catshark orthologue of the two duplicates found in the zebrafish, *ZfGfi1* (specifically expressed in the parapineal<sup>8</sup>) and *ZfGfi1aa*

- (b-e) LPM expressions of *ScNodal*, *ScVg1*, *ScLeftyB* and *ScPitx2* in the catshark. Dorsal views of stage 15 (left) and 16 (right) catshark embryos, following *in situ* hybridizations with *ScNodal* (b), *ScVg1* (c), *ScLeftyB* (d) and *ScPitx2* (e) probes and showing asymmetric expression in the developing mesoderm. Dotted lines indicate the planes of the sections shown in Supplementary Fig. 1f
- (g-j) Asymmetric diencephalic expression of ScNodal, ScVg1, ScLeftyB and ScPitx2. Transverse sections of the embryos shown in Figure 1a, 1c, 1e and 1g, showing the asymmetric distribution of ScNodal (g), ScVg1 (h), ScLeftyB (i) and ScPitx2 (j) transcripts in the dorsal diencephalon.
- **(k) Whole-mount views of catshark embryos following SB-505124 treatment.** Left lateral views of a control embryo (left, CTR) and an embryos following treatment using the Nodal antagonist SB-505124 (right) between stages 16 and 18 and whole-mount hybridization with a *ScPitx2* probe. The diencephalic asymmetric signal is lost but the LPM (asymmetric) and pharyngeal (symmetric) expression persists.



Supplementary Figure 2

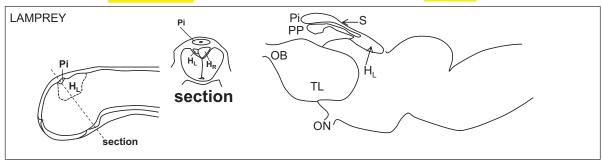
Supplementary Figure 2. Molecular habenular asymmetries in developing catshark and lamprey embryos.

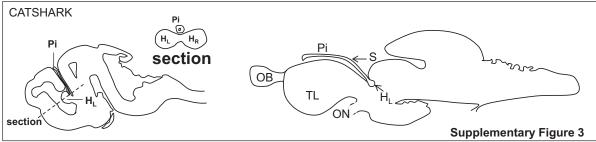
(a-c) Expression of *ScPitx2* in stage 21 and 27 catshark embryos (a, b), and of a stage 28 catshark brain (c, c') following whole-mount hybridization with a *ScPitx2* probe. (a) and (c) show left lateral views, (b) shows a dorsal view of the epithalamic region. A higher magnification view of (c) at the level of the epithalamus (dotted box) is shown in the inset in c.

- (d-f) Asymmetric expression of *ScKctd12a* (d), *ScKctd12b* (e), *ScKctd8* (f) in the catshark habenulae at stage 29. Transverse sections through the developing habenulae of stage 29 catshark embryos following *in situ* hybridisation with the indicated probes. Black arrowheads point to habenular territories showing significantly higher signal intensities on the left side than on the right. Scale bars 200μm
- (g) **Asymmetric expression of** *ScKctd8* **in the catshark habenulae at stage 31.** (g) show transverse sections through the developing habenulae of stage 31 catshark embryos following *in situ* hybridisation with the *ScKctd8* probe, from anterior to posterior levels (from left to right). Black arrowheads points to a dorsal left territory not observed in the right habenula. Scale bars 200µm
- (h) **Absence of habenular** *PmPitxA* **expression in lamprey prolarvae** (stage 28). Transverse section through the head of stage 28 lamprey embryo following *in situ* hybridisation with a *PmPitxA* riboprobe. Boxed area in (h) is enlarged in the inset. While a bar-shaped pattern of *PmPitxA* expression is observed in the neural tube as previously reported at the level of the forebrain<sup>9</sup>, no transcript can be detected in the habenulae. Similar expression patterns were observed on stage 29 embryos. Scale bar 50µm
- (i, j) Bright field images corresponding to Figure 2a and 2b respectively. Scale bars  $200\mu m$

Abbreviations used: mes, mesencephalon; tel, telencephalon; inf, infundibulum; pi, pineal anlage;  $H_L$ , left habenula;  $H_R$ , right habenula

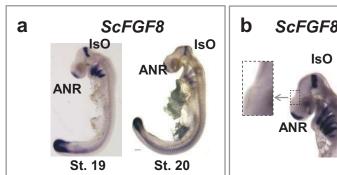




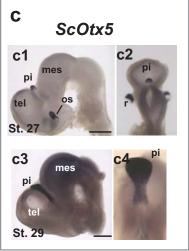


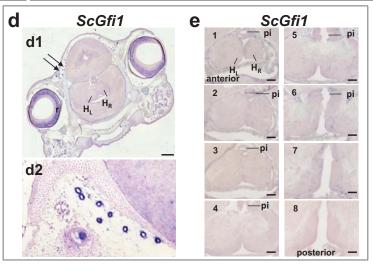
# <u>Supplementary Figure 3</u>: Embryonic and adult schematic representations of the epithalamus in catshark and lamprey.

In lamprey, the pineal primordium is first seen as a small territory specified from the dorsal developing head (Fig. 4c). In the adult, the pineal complex appears as a double evagination from the diencephalic roof. The evagination, which first appears during development, at prolarval stages, corresponds to the pineal organ. The parapineal evagination forms anterior to the former, at larval stages [Nieuwenhuys et al. 1998]. In the catshark, only one evagination emerges from the dorsal diencephalon (see also Supplementary Figure 4c) above the developing habenulae. In the adult, the pineal complex is composed of only one structure: the pineal organ. Abbreviations used: Pi, pineal organ; PP, parapineal organ; H<sub>L</sub>, left habenula, OB, olfactory bulb; TL telencephalic lobe; S, stalk; ON, optic nerve. In all drawings anterior is located to the left.







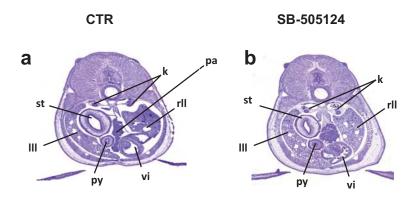


**Supplementary Figure 4** 

#### Supplementary Figure 4: Molecular characterization of the developing pineal gland in the catshark.

- (a) Left lateral views of catshark embryos at stages 19 and 20 following hybridization with a *ScFgf8* probe, showing that *Fgf8* is not expressed in the presumptive epithalamus of the catshark embryo.
- (b) Left lateral views of stage 21 catshark embryos following *in situ* hybridization and showing comparisons between expression of *ScFgf8* (left), *ScLhx5* (middle) and *ScOtx5* (right). Higher magnifications of the dorsal diencephalon (dotted boxes) are shown on the left of each view. *ScFgf8* expression is absent from the dorsal diencephalon, while strongly expressed in the ANR and in the IsO. *ScLhx5* and *ScOtx5* expressions respectively delineate the diencephalon and pineal anlage.
- (c) c1-3 show whole-mount views of stage 27 and 29 catshark brains following hybridization with a *ScOtx5* probe (left lateral views in c1 and c3; dorsal views in c2 and c4). c4 shows higher magnification dorsal view of the pineal organ following the removal of the telencephalic vesicles.
- (d) Absence of *ScGfi1* expression in the developing pineal organ of the catshark. (d1) shows a transverse section of a stage 32 catshark embryo in the habenula region following *in situ* hybridization with a *ScGfi1* probe. *ScGfi1* expression appeared in the developing retina, as observed in zebrafish embryos at 48 hpf [Ref 8]. In addition we observed expression in discrete cell clusters organized in canals (arrows in d1, higher magnification in d2). Based on their dorsal position, lateral to the neural tube, these cells could correspond to developing hair cells of the lateral line system. In zebrafish, hair cells deposited by the migrating posterior lateral line organ are known to be *Gfi1* positive [Ref 8]. In contrast, we failed to detect any *ScGfi1* positive territory at the level of the pineal and habenulae (d1). Scale bar d1: 500μm
- (e) shows transverse serial paraffin sections (named from 1 to 8) through the catshark habenula and pineal stalk at stage 32 (the most anterior section corresponding to picture 1 and the most posterior to picture 8). No staining can be observed in the developing habenula and pineal organ, supporting the absence of a parapineal organ in the catshark. Scale bars 100μm

Abbreviations used: ANR, anterior neural ridge;  $H_R$ , right habenula;  $H_L$ , left habenula; mes, mesencephalon; IsO, isthmic organizer; os, optic stalk; pi, pineal organ; r, retina; tel, telencephalon. Scale bars in Supplementary Fig. 4c (c1 and c3), 500  $\mu$ m.

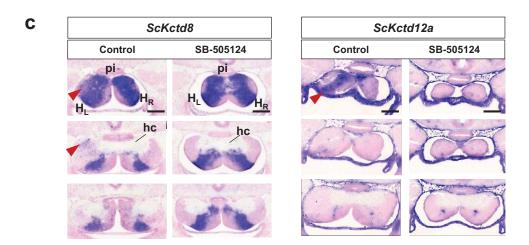


#### Supplementary Figure 5. Effect of long-term SB-505124 treatment in the catshark

#### (a-b) Absence of overt visceral asymmetries following long term SB-505124 treatments.

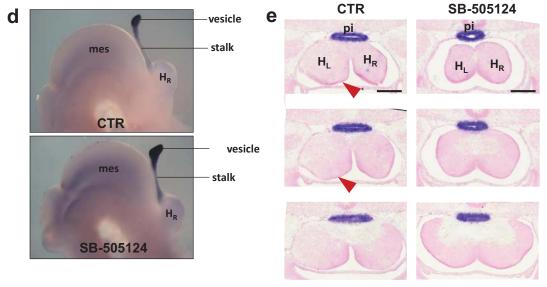
(a,b) show transverse sections at the stomach level of stage 31 catshark embryos following haematoxylin staining. (a) and (b) respectively correspond to control and SB-505124 treated embryos, in the long term treatment conditions described in experimental procedures. The position of visceral organs is asymmetric in control as in treated embryos, while a right isomerism is observed at the epithalamus level (see Fig. 5).

Abbreviations used: st, stomach; III, left liver lobe, rII, right liver lobe; vi, valvular intestine; py, pyloris; k, kidney; pa, pancreas



#### Supplementary Figure 5. Effect of long-term SB-505124 treatment in the catshark

(c) Nodal abrogation induces right *ScKctd8* and *ScKctd12a* expression pattern on both habenulae in the catshark. Pictures show transverse sections of a stage 31 control embryo (left) and a SB-505124 treated embryo (right), following hybridization with a *ScKctd8* or *ScKctd12a* probe. In each case, successive section planes are shown from anterior to Oposterior levels, with the same orientation as depicted in Fig. 2. Red arrowheads point to left-sided hybridization signals present in control embryos but lost in SB-505124 treated embryos, which exhibit a right isomerism. Abbreviations used: H<sub>R</sub>, right habenula; H<sub>L</sub>, left habenula; pi, pineal organ; hc, habenular commissure. Scale bars 200µm.



Supplementary Figure 5. Effect of long-term SB-505124 treatment in the catshark

#### (d-e) The pineal organ is correctly patterned upon SB-505124 treatment on catshark embryos.

(d) shows right views of stage 31 catshark brain following *in situ* hybridization with *ScOtx5* riboprobe. Upper and lower pictures correspond respectively to control and SB-505124 treated embryos, in the long term treatment conditions described in experimental procedures. In both conditions, the pineal organ composed of a stalk topped with a vesicle is perfectly formed. In both brain, telencephalon has been dissected out to offer a better view of the pineal organ. (e) shows transverse sections of control (CTR) and SB-505124 treated embryos following hybridization with a *ScOtx5* riboprobe. In control habenulae difference in size is evident (red arrowheads point to the left big habenula) while right isomerism is observed after Nodal abrogation as described in Fig. 5. In both cases, the pineal complex is correctly located in the epithalamus and expressed *ScOtx5*. Scale bars e: 500µm

Abbreviations used: mes, mesencephalon;  $H_R$ , right habenula;  $H_L$ , left habenula; pi, pineal organ

<u>Supplementary Table 1.</u> Sequences used in the phylogenies shown in Supplementary Figure 1. The first and second colums indicate the gene and species names respectively. The third column indicates the species abbreviations used in the trees shown in Supplementary Fig. 1A. Sequences were retrieved either from Ensembl or Genbank and the corresponding accession numbers are provided in the fourth and fifth columns.

	Lefty gene family					
Gene name	species	Abrev	Ensembl reference	NCBI / GenBank number		
Lefty1	Danio rerio	zf	ENSDARG00000019920			
Lefty1	Mus musculus	Mm	ENSDARG00000044059			
Lefty	Anolis carolinensis	li	ENSACAG00000005997			
Lefty	Ciona intestinalis	ci	ENSCING00000008562			
Lefty	Gallus gallus	ch	ENSGALG00000009256			
Lefty-B	Xenopus laevis	XI		BC169650		
Lefty-A	Xenopus laevis	XI		BC169590		
Lefty2	Danio rerio	Zf	ENSDARG00000044059			
Lefty2	Takifugu rubripes	Fu	ENSTRUG00000007659			
LEFTY2	Gorilla gorilla	Go	ENSGGOG00000000866			
LEFTY1	Gorilla gorilla	Go	ENSGGOG00000014247			
Lefty	Branchiostoma floridae	Bf		XM_002589185.		
Lefty2	Mus musculus	Mm	ENSMUSG00000066652			
Lefty	Petromyzon marinus	Pm	ENSPMAG00000001240			
LeftyA	Scyliorhinus canicula catshark	Sc		GI:126544434		
LeftyB	Scyliorhinus canicula catshark	Sc		KJ190305		

Pitx gene family					
Gene name	species	Abbrev	Ensembl reference	NCBI / GenBani number	
Pitx1	Mus musculus	Mm	Pitx1 ENSMUSG00000021506		
Pitx1	Gallus gallus	Ch	PITX1 ENSGALG00000006365		
Pitx	Ciona Intestinalis	ci	CI-PITX ENSCING00000005285		
PITX1	Homo sapiens	Hu	PITX1 ENSG00000069011		
Pitx1	Oryzias latipes	OI	PITX1 ENSORLG00000000858		
Pitx1	Xenopus tropicalis	Xt	pitx1 ENSXETG00000010401		
Pitx1	Danio rerio	zf	pitx1 ENSDARG00000042785		
Pitx1	Anolis carolinensis	li	ENSACAG00000001380		
Pitx2	Mus musculus	Mm	Pitx2 ENSMUSG00000028023		
Pitx2	Anole carolinensis	li	PITX2 ENSACAG00000010590		
Pitx2	Gallus gallus	Ch	PITX2 ENSGALG00000012086		
Pitx2	Takifugu Rubripes	Fu	PITX2 ENSTRUG00000015597		
Pitx2	Oryzias latipes	OI	A8HG56_ORYLA		
Pitx2	Xenopus tropicalis	Xt	pitx2 ENSXETG00000013330		
Pitx2	Danio rerio	zf	pitx2 ENSDARG00000036194		
Pitx3	Mus musculus	Mm	Pitx3 ENSMUSG00000025229		
Pitx3	Anole carolinensis	li	PITX3 ENSACAG00000014532		
Pitx3	Gallus gallus	Ch	PITX3 ENSGALG00000005613		
PITX3	Homo sapiens	Hu	PITX3 ENSG00000107859		
Pitx3	Oryzias latipes	OI	PITX3 ENSORLG00000001148		
Pitx3	Xenopus tropicalis	Xt	pitx3 ENSXETG00000010022		
Pitx3	Danio rerio	zf	pitx3 ENSDARG0000070069		
PITX2	Homo sapiens	Hu	PITX2 ENSG00000164093		
Pitx2	Scyliorhinus torazame	St		AB625610.1	
Pitx1	Scyliorhinus canicula catshark	Sc		KJ190312	
Pitx2	Scyliorhinus canicula catshark	Sc		KJ190313	
Pitx3	Scyliorhinus canicula catshark	Sc	-	KJ190314	
Pitx2	Lampetra fluviatilis	Lf		FP243322	
PitxA	Petromyzon marinus	Pm	<u> </u>	AJ458324	
PitxA	Lampetra planeri	Lp		AJ458325	
PitxA	Lethenteron japonicum	Li		AB124585	

KCTD gene family				
Gene name	species	Abrev	Ensembl reference	NCBI / GenBani number
Kctd8/12/16	Branchiostoma floridae	Bf		XM_002585519.
Kctd12.1, lov, left- over	Danio rerio	Zf	ENSDART00000101977	
Kctd12a	Syliorhinus canicula catshark	Sc		KM041048
Kctd12b	Syliorhinus canicula catshark	Sc		KJ190315
Kctd12	Anolis carolinensis	li	ENSACAT00000024237	
Kctd12	Pelodiscus sinensis	Tu	ENSPSIT00000001198	
Kctd12	Homo sapiens	Hu	ENST00000377474	
kctd12	Petromyzon marinus	Pm	ENSPMAT00000007497	
Kctd12	Xenopus tropicalis	Xt	ENSXETT00000033765	
Kctd12.2, right-on, ron	Danio rerio	Zf	ENSDART00000075584	
Kctd12b	Danio rerio	Zf	ENSDART00000054620	
Kctd12b	Anolis carolinensis	li	ENSACAT00000006418	
Kctd12	Gallus gallus	Ch	ENSGALT00000015681	
Kctd12b	Pelodiscus sinensis	Tu	ENSPSIT00000013550	
Kctd12a	Mus musculus	Mm	ENSMUST00000184744	
Kctd12b	Mus musculus	Mm	ENSMUST00000112572	
Kctd12b	Xenopus tropicalis	Xt	ENSXETT00000064252	
Kctd8, dexter, dex	Danio rerio	Zf	ENSDART00000126777	
kctd8	Syliorhinus canicula catshark	Sc		KJ190316
Kctd8	Anolis carolinensis	li	ENSACAT00000007091	
Kctd8	Gallus gallus	Ch	ENSGALT00000023001	
Kctd8	Pelodiscus sinensis	Tu	ENSPSIT00000005492	
KCTD8	Homo sapiens	Hu	ENST00000360029	
Kctd8	Mus musculus	Mm	ENSMUST00000054095	
Kctd8-2	Xenopus tropicalis	Xt	ENSXETT00000006696	

Kctd8	Xenopus tropicalis	Xt	ENSXETT00000018480	
Kctd16	Xenopus tropicalis	Xt	ENSXETT00000061134	
Kctd16	Homo sapiens	Hu	ENST00000512476	
Kctd16	Mus musculus	Mm	ENSMUST00000091927	
Kctd16	Gallus gallus	Ch	ENSGALT00000020138	
Kctd16	Anolis carolinensis	li	ENSACAT00000024283	
			ENSACAT00000013833*	
Kctd16	Pelodiscus sinensis	Tu	ENSPSIT00000017573	
Kctd16a	Danio rerio	Zf	ENSDART00000130103	
Kctd16b	Danio rerio	Zf	ENSDART0000022976	
Kctd16	Syliorhinus canicula	Sc	C_comp242952_c0_seq1	KM041049
	catshark			

<sup>\*</sup>Two Ensembl references were found for liKctd16 but these sequences are part of the same gene

	Gfi1 gene family					
Gene name	species	Abrev	Ensembl reference	NCBI / GenBank number		
gfi1 or gfi1ab	Danio rerio	zf	ENSDART00000065139			
gfi1	Scyliorhinus canicula catshark	Sc		KJ623814		
gfi1aa	Danio rerio	zf	ENSDART00000015379			
gfi1ab	Oryzias latipes	OI	ENSORLT000000017312			
gfi1aa	Oryzias latipes	Ol	ENSORLT000000006378			
gfi1ab	Lepisosteus oculatus	Lo	ENSLOCT00000005653			
gfi1	Gallus gallus	Ch	ENSGALT00000009558			
GFI1	Homo sapiens	Hu	ENST00000294702			
gfi1	Branchiostoma floridae	Bf		XM002600129.1		
gfi1	Xenopus tropicalis	Xt	ENSXETT00000049757			
gfi1b	Danio rerio	zf	ENSDART00000114877			
gfi1B	Gallus gallus	Ch	ENSGALT00000005506			
GFI1B	Homo sapiens	Hu	ENST00000339463			
gfi1B	Scyliorhinus canicula catshark	Sc		KJ623815		
gfi1B	Xenopus tropicalis	Xt	ENSXETT00000013728			
Gfi1b	Oryzias latipes	Ol	ENSORLT00000018039			
Gfi1b	Lepisosteus oculatus	Lo	ENSLOCT00000006952			

# <u>Supplementary Table 2</u>: Laterality of the Nodal-Pitx cassette expression in the lamprey and the catshark

	left	No expression	right	n
Catshark, LPM Nodal (stage 15 to 16+) Pitx2 (stage 15 to 16+) Vg1 (stage 15 to 16+) LeftyB (stage 15 to 16+)	100% 100% 100% 27%	0% 0% 0% 73%	0% 0% 0% 0%	18 11 12 11
Catshark , diencephalon Nodal (stage 17 to 20) Pitx2 (stage 17 to 20) Vg1 (stage 17 to 20) LeftyB (stage 17 to 20)	100% 100% 100% 100%	0% 0% 0%	0% 0% 0%	27 30 34 24
Lamprey, LPM Lefty (stage 22) PitxA (stage 24)	57% 100 %	43% 0%	0% 0%	14 11
Lamprey, diencephalon Lefty (stage 22) PitxA (stage 24)	100 % 100 %	0% 0%	0% 0%	147 31

# <u>Supplementary Table 3:</u> Effect of SB-505124 treatments on asymmetric gene expression in the LPM and diencephalon in the catshark and lamprey

GENE EXPRESSION	left	No expression	right	n
CATSHARK, LPM EXPRESSION				
SB-505124 injection: st. 13/14 Embryo fixation : st. 15/16				
Pitx2 (CTR) Pitx2 (SB-505124 - 500 μM)	100% 0%	0% 100%	0% 0%	4 6
CATSHARK, DIENCEPHALIC EXPRESSION				
SB-505124 injection: st. 15/16 Embryo fixation : st. 17/18				
Pitx2 (CTR) Pitx2 (SB-505124 - 500 μM)	100% 0%	0% 100%	0% 0%	20 10
Pitx2 (CTR) Pitx2 (SB-505124 - 50 μM)	86% 0%	14% 100%	0% 0%	7 8
LAMPREY, DIENCEPHALIC EXPRESSION				
SB-505124 tretment : st 21 to 24 Embryo fixation : st. 24				
Petromyzon marinus Lefty (CTR) Lefty (SB-505124 - 25μM) Lefty (SB-505124 - 75μM)	100% 0% 0%	0% 100% 100%	0% 0% 0%	4 3 3
Lampetra planeri Lefty (CTR) Lefty (SB-505124 - 25 μM) Lefty (SB-505124 - 50 μM)	100% 0% 0%	0% 100% 100%	0% 0% 0%	2 2 2

#### Supplementary Table 4: Primers used for gene amplification.

ScGfi1	forward	5' cagtacggattccaaatgcag 3'
	nested forward	5' catctgcatcaccagtctctg 3'
	reverse	5' cactgcaagaatgtcgaacag 3'
	nested reverse	5' gattccagaggaaggtggatc 3'
ScKctd8	forward	5' ctcttctccaggaacaacgtc 3'
	nested forward	5' tcctcttcaggtacatcttgg 3'
	reverse	5' gatgtactcggtgtagctgct 3'
	nested reverse	5' tggagttacaagccaccatgt 3'
PmKctd12	forward	5' gaggtcatcgagctgaacgtg 3'
	nested forward	5' ctacatcctcgactacttgcg 3'
	reverse	5' tagagttgcatgcgaccatgt 3'
	nested reverse	5' gaatgtgaacttcaggtagta 3'

For the *ScGfi1* and *ScKctd8* genes, we used specific primers (see above) designed based on the nucleotide sequence of putative orthologue sequences found in the draft transcriptome obtained by the *Scyliorhinus canicula* genome project (Genoscope). For the *PmKctd8* gene we used specific primers (see above) based on the ENSEMBL nucleotide sequence of *Petromyzon marinus* (kctd12.1-201 ENSPMAT00000007497). The purified PCR products were cloned into the pGEMT-T easy vector (Promega) and amplified fragments were sequenced to check sequence identity (Biogenouest Genomics and Genomer core facility). Digoxigenin-11-UTP (Roche) labelled antisense RNA probes for *ScGfi1*, *ScKctd8* and *PmKctd12* were synthesized from the PCR template cloned into the vector. Gene identities were confirmed by the phylogenetic analyses presented in Supplementary Figure 1.

<u>Supplementary Table 5</u>: Amino acid similarities between the coding sequences of *Kctd* zebrafish genes known to be asymmetrically expressed and related catshark and lamprey genes.

			PmKctd12	ScKctd8
Zebrafish kctd12b	73%	64%	61%	60%
Zebrafish kctd12.2 /	65%	67%	58%	59%
ron				
	66%	71%	56%	58%
lov				
	64%	65%	53%	75%

The results of homology rate comparisons are consistent with those of the phylogenetic analysis for the catshark genes (supplementary Figure 1a4). In the lamprey, PmKctd12 appears most closely related to zebrafish Kctd12b in amino acid similarity comparisons. The phylogenetic tree also confirms the close relationship of this sequence to the Kctd12 group with a strong statistical support (100%). However it remains unconclusive as to its assignment either to the Kctd12a and Kctd12b classes and we therefore termed the corresponding gene PmKctd12.

<u>Supplementary Table 6</u>: Effect of SB-505124 treatments on habenular size in the catshark (st. 31) and the lamprey (st. 27 and 30).

HABENULAR SIZE PHENOTYPE	WILD-TYPE LIKE ASYMMETRY	SYMMETRY	Other	n
CATSHARK  SB-505124 injection: st. 15/16 Embryo fixation: st. 31  CTR SB-505124 - 50 µM	100% 0%	0% 100%	0% 0%	6 10
LAMPREY <i>L. planeri</i> SB-505124 treatment : st. 21 to 24 Embryo fixation : st. 27  CTR SB-505124 - 25 µM	100% 0%	0% 100%	0% 0%	2 4
SB-505124 treatment : st. 21 to 24 Embryo fixation : st. 30 CTR SB-505124 - 25 µM	100% 0%	0% 100%	0% 0%	2 2

The second column indicates the percentage of control (CTR) or SB-505124 treated embryos, which displayed a size asymmetry between the left and right habenulae, as observed in untreated embryos (larger left habenula in the catshark, smaller left habenula in the lamprey). The third column indicates the percentage of embryos showing a size symmetry, suggestive of a right isomerism. No other phenotype (fourth column) was observed. The fifth column indicates the total number of embryos analyzed.

<u>Supplementary Table 7</u>: Effect of SB-505124 treatments on expression of molecular markers in the catshark (st. 31) and the lamprey (st. 30).

Phenotype	Asymmetric wild-type pattern	Right isomerism	Other	n, total
Marker	sypo pattorii			
CATSHARK				
<b>ScPitx2</b> CTR SB-505124	3 0	0	0	3 6
ScKctd12a CTR SB-505124	1 0	0 3	0 0	1 3
ScKctd12b CTR SB-505124	2 0	0 5	0 0	2 5
ScKctd8 CTR SB-505124	1 0	0 3	0 0	1 3
P-ERK CTR SB-505124	1 0	0	0	1
LAMPREY				
<b>P-ERK</b> CTR SB-505124	2 0	0 2	0 0	2 2

For each marker tested (column 1), the first column shows the number of control (DMSO treated) or SB-505124 treated embryos showing an asymmetric, wild-type expression pattern. The second column shows the number of embryos showing a right isomerism. Other phenotypes (fourth column) were never observed. The last column shows the number of embryos hybridized with each marker.

#### Supplementary References.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680.
- 2. Tippmann, H.F. (2004). Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. Brief Bioinform. 5, 82-87.
- 3. Huelsenbeck JP, Ronquist F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics. 17, 754-5.
- 4. Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 19, 1572-4.
- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics 21, 2104-5.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief Bioinform. 9, 299-306.
- Gamse, J.T., Kuan Y.-S., Macurak M., Brösamle C., Thisse B., Thisse C, and Halpern M.E. (2005). Directional asymmetry of the zebrafish epithalamus guides dorsoventral innervation of the midbrain target. Development 132, 4869-4880.
- 8. Dufourcq P., Rastegar S., Strähle U., Blader P. (2004) Parapineal specific expression of gfi1 in the zebrafish epithalamus. Gene Expr Patterns 4; 53-7.
- 9. Boorman C.J., Shimeld S.M. (2002). Cloning and expression of Pitx homeobox gene from the lamprey, a jawless vertebrate. Dev Genes Evol 212, 349-353.

CHAPITRE II – Caractérisation des asymétries habénulaires embryonnaires dépendantes de Nodal chez la petite roussette (Scyliorhinus canicula)

# 1. Introduction

Les résultats du chapitre 1 conduisaient à trois résultats principaux (1) l'expression asymétrique précoce de la voie Nodal dans le diencéphale est conservée entre roussette, lamproie et poisson-zèbre; (2) de même, certains marqueurs de différenciation neuronale exprimés de façon asymétrique dans les habenulæ chez le poisson-zèbre, tels que les gènes de la famille Kctd8/12, le sont également chez la roussette et la lamproie; (3) toutefois ces asymétries sont dépendantes de la voie Nodal chez ces dernières alors que ce n'est pas le cas chez le poisson-zèbre. Ces données posent la question du niveau de conservation des programmes génétiques contrôlant la formation des asymétries habénulaires, respectivement sous le contrôle de la voie Nodal chez la lamproie et la roussette, et sous le contrôle de la parapinéale chez le poisson-zèbre (Gamse et al., 2003). Le but du travail présenté dans ce chapitre a été de fournir des données de référence sur la neurogenèse et les choix de différenciation neuronale chez la roussette, par une analyse détaillée des patrons de prolifération-différenciation et une extension de la caractérisation moléculaire des territoires différenciés, incluant notamment l'étude du gène Pou4f1, sélectivement exprimé dans le sous-noyau médial de l'habénula dorsale chez le poisson-zèbre (Quina et al., 2009). En effet, chez cette espèce, la neurogenèse est régulée de façon différentielle au cours du temps ce qui, dans un contexte de choix de différenciation neuronale également dynamique au cours du temps, contribue à l'élaboration des asymétries dans les habenulæ (Aizawa et al., 2007). Par ailleurs, un mécanisme parallèle, reposant sur une suppression, dépendante de la parapinéale, de l'activité Wnt dans l'habénula gauche joue également un rôle crucial dans ce processus (Hüsken et al., 2014).

Cette première analyse a été centrée sur les stades précédant l'apparition des premières asymétries habénulaires précédemment détectées au stade 31, soit sur les stades 29 à 31. Elle met en évidence un ensemble de nouvelles asymétries, dépendantes de la voie Nodal, dont la

plupart rappellent des asymétries décrites chez le poisson-zèbre. Nous mettons ainsi en évidence :

- des patrons de prolifération-différenciation différents entre les habenulæ gauche et droite, évoquant des régulations différentielles soit de la sortie des cycles mitotiques, soit de la prolifération cellulaire au niveau des progéniteurs neuraux
- de nouvelles asymétries moléculaires dans les territoires différenciés, suggérant un contrôle asymétrique des choix de destins cellulaires opérant indépendamment de la neurogenèse
  - des asymétries de la densité du neuropile comme c'est le cas chez le poisson-zèbre.

Ces données font l'objet d'un manuscrit en préparation inclus ci-après. Nous prévoyons de compléter ces données par :

- des profils d'expression par immunohistochimie, en cours de finalisation et pris en charge par nos collaborateurs dans le groupe d'Eva Candal, ciblés sur la protéine Pax6, connue pour son rôle dans le maintien de la pluripotence des progéniteurs neuraux (Latasa *et al.*, 2009 ; Mi *et al.*, 2013) et sur la Calbindine
- des comptages de cellules positives pour la protéine P-Histone H3 ou ayant incorporé du BrdU dans des fenêtres de temps adaptées, cela en vue d'évaluer les taux de prolifération dans différents territoires habénulaires à gauche et à droite (complément à la figure supplémentaire  $n^{\circ}2$ )
  - une estimation quantitative de la densité de neuropile
- si possible à court terme compte tenu de la disponibilité d'embryons, une étude de la distribution au stade 31 des cellules sortant des cycles mitotiques aux stades 25-27, en effectuant des expériences d'incorporation de BrdU suivies de chasse.

# 2. Manuscrit en préparation

Analysis of proliferation/differentiation patterns and neuropil elaboration reveal novel, Nodal dependent asymmetries in the catshark *S. canicula*: evolutionary implications

**Lagadec, R.** $^1$ ; Hernandez, N. $^3$ ; Menuet, A. $^2$ ; Mayeur, H. $^1$ ; Boutet, A. $^1$ ; Rodriguez-Moldes, I. $^3$ ; Candal, E. $^3$  and Mazan, S. $^1$ 

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> CNRS, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, FR2424, Development and Evolution of Vertebrates Group, Station Biologique, F-29688, Roscoff, France.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> UMR7355, CNRS, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, University of Orleans, 3b rue de la Férollerie, F-45071 Orleans Cedex 2, France.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Department of Cell Biology and Ecology, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

### **INTRODUCTION**

The habenulae are bilateral epithalamic structures, which are part of an ancient and highly conserved neuronal circuit connecting the telencephalon and the brain stem. A remarkable feature of these structures is that they display marked left-right asymmetries in species belonging to all major vertebrate taxa (Butler and Hodos, 2005; Concha and Wilson, 2001; Concha et al., 2009). This characteristic has made them the reference model system for analyses of the mechanisms controlling the establishment of cerebral asymmetries in vertebrates (Roussigné et al., 2012). They also provide an interesting paradigm to analyse how these mechanisms have diversified during evolution, concomitantly with morphological variations (Aizawa, 2013; Aizawa et al., 2011). Size comparisons thus suggest that epithalamic asymmetries substantially vary in their magnitude across vertebrates (Concha and Wilson, 2001). Their nuclei organisation also changes even between relatively closely related species, even though similarities have been noted based on analyses of neurotransmitter phenotypes between amniotes and teleosts (deCarvalho et al., 2014). In line with these variations, a striking mechanistic difference has been highlighted recently, based on a comparison between the zebrafish, the reference model organism to unravel the mechanisms controlling epithalamic asymmetry formation, and the catshark and lamprey, two non-conventional, non-genetic model organisms, respectively belonging to cartilaginous fishes and agnathans, exhibiting marked habenular asymmetries (Lagadec et al., 2015). During epithalamic development, all three species share in common a left activity of Nodal signalling, observed in the dorsal diencephalon shortly after neural tube closure and, at later stages, asymmetric habenular expressions of the potassium channel tetramerisation domain Kctd8/12 family members (Gamse et al., 2005, 2003; Lagadec et al., 2015). However, the mechanisms controlling the latter strongly differ depending on the species considered. In the zebrafish, the parapineal, an accessory organ derived from the pineal field and migrating to the left during development, is essential for habenular asymmetry elaboration, while Nodal signalling appears dispensable for this process, its major role being to restrict the laterality of asymmetries rather than their generation per se (Concha et al., 2009, 2000; Gamse et al., 2003). In contrast, in the catshark and in the lamprey, the formation of habenular asymmetries appears strictly dependent on Nodal signalling, abrogation of the pathway resulting in a right isomerism (Lagadec et al., 2015). No evidence for an asymmetric pineal field is also observed in these species, which argues against a conservation of the parapineal function described in the zebrafish. These data have led to the hypothesis that the formation of habenular asymmetries was controlled by a Nodal dependent mechanism in the vertebrate ancestral state and that this mechanism has been lost in teleosts, concomitantly with the emergence of a novel, parapineal dependent role.

Several distinct evolutionary processes, leading to different predictions as to the extent of conservations between the zebrafish and the lamprey or catshark, could be involved in this mechanistic diversification. For instance, a switch in the regulatory control of ancestral asymmetry genetic programs operating in the habenulae could have occurred during the course of teleost evolution, resulting in a recruitment from an ancestral Nodal dependent control to a parapineal dependent one. This scenario is the most conservative one and it should result in substantial similarities, related to common ancestry, between the habenular asymmetries controlled respectively by Nodal in the catshark and lamprey, and by the parapineal in the zebrafish. In the other end of the spectrum, novel asymmetries and mechanisms could have emerged in the teleost lineage under the control of the parapineal, concomitantly with a possibly gradual, parallel loss of ancestral, Nodal dependent ones. Such innovations are more likely to result in unrelated asymmetries between the zebrafish on the one hand, and the lamprey and catshark on the other one. The identification of related molecular asymmetries, such as the conserved asymmetric expressions of Kctd8/12 family members between the zebrafish, catshark and lamprey, is consistent with the former hypothesis. However, a more exhaustive comparison of asymmetries in the developing habenulae of the zebrafish and the catshark or lamprey is important to assess the degree of asymmetry conservation between these species and refine evolutionary hypotheses accounting for the mechanistic divergence observed. Here, we provide an extensive characterisation of asymmetry elaboration in the catshark developing habenulae, focusing on patterns of proliferationdifferentiation, neurogenesis and neuropil formation at stages preceding the appearance of asymmetries in size and molecular pattern. These data highlight novel asymmetries in the catshark developing habenulae, all of them dependent on Nodal signalling. Most of these asymmetries are reminiscent of those described in the zebrafish developing habenulae, despite extensively divergent morphologies. These data support the hypothesis that the primary factor explaining the divergence between the zebrafish and the catshark may be a shift in the regulation of ancestral genetic programs controlling asymmetry elaboration in the habenulae, from an ancestral dependence on Nodal signalling to a parapineal dependent genetic control. Comparisons between the gene regulatory programs acting downstream of Nodal in the catshark and lamprey but controlled by the parapineal in the zebrafish will be crucial to further test this evolutionary model.

#### **METHODS**

#### **Obtaining catshark embryos**

Scyliorhinus canicula embryos were obtained from the Roscoff Marine Station and staged according to Ballard (Ballard et al., 1993). This study was performed entirely on non-mammalian, catshark embryos, did not involve painful procedures as defined by institutional and national regulations and it is therefore exempt from a special license.

#### **Histological analyses**

Histological analyses were performed on 10-12  $\mu$ M paraffin sections, stained with Mayer's hematoxylin solution (Sigma-Aldrich, MHS32). Representative embryo sections were scanned with a Leica DMI6000B microscope and images were processed using ImageJ.

#### In situ hybridization and sectioning

Specimens fixed in 4% PFA were rinsed in 1xPBS, dehydrated, embedded in paraffin and sectioned following standard procedures (10-12 μM thick sections). *In situ* hybridizations (ISH) of sections were conducted using digoxigenin-labelled antisense RNAs as previously described (Derobert et al., 2002; Plouhinec et al., 2005). Probes were obtained from collections of embryonic *S. canicula* cDNA recombinants, characterized by Sanger sequencing and described in Coolen et al, 2007 (Coolen et al., 2007). Clone identities were confirmed by the phylogenetic analyses presented in Supplementary Fig. 1. Following ISH, nuclei were counterstained using Nuclear Fast Red (Sigma N3020).

## Immunohistochemistry (IHC) and hematoxylin staining on catshark sections

Fluorescent immunohistochemical analyses of sections were conducted using standard protocols adapted to the catshark as previously described (Lagadec et al., 2015). After epitope unmasking, sections were subjected to immunohistochemistry with the following antibodies, used at the indicated concentration: anti-acetylated tubulin (Sigma T-6793, 1:1000), anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibody (Sigma P8825, 1:300) (Quintana-Urzainqui et al., 2014), anti-Histone H3 (phosphor S10) antibody (abcam ab5176, 1:400), anti-human HuC/D antibody (Molecular Probes A-21271, 1:200) (Quintana-Urzainqui et al., 2014) and anti-doublecortin (DCX) antibody (Santa Cruz Biotechnology, 1:300) (Quintana-Urzainqui et al., 2014). Nuclei were stained using DAPI (Invitrogen). Representative embryo sections were scanned with a Leica SP5 confocal laser-scanning microscope with images processed using ImageJ.

#### Pharmacological treatments of embryos with a Nodal inhibitor

Developing catshark embryos were treated by in ovo injections of a SB-505124 solution (concentration 50  $\mu$ M in DMSO) as previously described (Lagadec et al., 2015). Briefly, eggs were incubated in oxygenated sea water at 17°C for approximately two months following the drug injection, until embryos reached stage 31. The same protocol was conducted in parallel for control embryos, except that the injected solution did not contain the drug.

#### **RESULTS**

#### Cellular organisation of the catshark developing habenulae

In order to have a histological reference for the developing habenulae and to investigate asymmetry formation prior to stage 31, we examined histological sections from stages 27 to 31 following hematoxylin staining (Figure 1) and immunofluorescence labelling with an antibody directed against acetylated tubulin (Figure 2). At stage 27, the developing choroid plexus and neuroepithelium are individualized at the dorsal diencephalon level and the habenulae form as two lateral, symmetric evaginations (Figure 1A). They expand laterally to form distinct structures at stage 29 (Figure 1B). At this stage, the habenular commissure (HC) is clearly visible and the developing habenulae contain two territories characterised by different cell organisations, a medial one, exhibiting the cell arrangement of a typical pseudostratified neuroepithelium (PNE), and a more lateral one, consisting of densely packed round shaped cells (Figure 1B). At subsequent stages (stages 30 to 31), as the habenulae expand laterally and thicken, these two territories are maintained but their relative proportion changes. The pseudostratified neuroepithelial cell population, which spans approximately two thirds of the developing habenulae at stage 29, becomes progressively restricted to the medial part of the organ, while the lateral-most territory concomitantly expands (Figure 1C-D;F-G). Analysis of acetylated tubulin distribution using fluorescent immunohistochemistry (IHC) confirms and expands these observations. As early as stage 29, it highlights the presence of a dense network of labelled fibers within the lateral territory of dispersed cells, largely excluding the medial pseudostratified epithelium (Figure 2A-E, H-I). The signal also excludes a thin layer of ventricular cells, which line the ventricular zone, adjacent to the round shaped cell population and lying in the continuity of, and laterally to the medial pseudo-stratified neuroepithelium (Figure 2B, D1-D2, E1-E2). While no overt asymmetry is visible at stages 27-29, comparisons between the left and right habenulae at stages 30-31 reveal asymmetric features not reported previously. First, the HC fibers follow an asymmetric path between the left and the right, running in a more dorsal position at lateral levels of the right habenula. This results in a lateral expansion of fiber distribution in dorsal transverse section (Figure 2D1-D2 and 2I). Second, at stage 31, a lateral sector of higher cell density

on the right than on the left is observed within the round shaped cell territory (Figure 1G1-G2). This difference correlates with a higher neuropil density (Figure 2D1-D2, I1-I2).

#### Asymmetric distribution of proliferating cells in the habenulae

To characterize territories of active cell proliferation, we next analysed PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and phosphorylated histone H3 (PHH3) activities (Hans and Dimitrov, 2001) on serial sections of stage 29 to 31 habenulae (Figure 3) using fluorescent IHC and additionally ISH for PCNA. Territories positive for PCNA RNA and protein, respectively analysed by ISH and IHC, appear largely overlapping at all stages studied (compare signals between Figure 3C-E to F-H). At stage 29, immunostaining is visible at all levels of the ventricular zone, including the pseudostratified neuroepithelium and more lateral ventricular cells (Figure 3A). These expression territories are maintained at subsequent stages but while all nuclei are labelled at the level of the pseudostratified territory, only a subset show PCNA immunoreactivity at more lateral levels (Figure 3B-E). Mitotic cells, identified by PHH3 immunoreactivity, are observed at all levels of the ventricular zone of the left and right habenulae. They are most frequently observed within the PCNA positive medial neuroepithelium territory, but some scattered positive nuclei are also present at more lateral levels of the ventricular zone. BrdU incorporation experiments confirm that at stage 28-30, all levels of the ventricular zone are engaged in active cell proliferation (Supplementary Figure 2). No overt asymmetry can be observed until stage 31 (Figure 3A,B). At this stage, a marked difference in size of the PCNA positive medial pseudostratified epithelium becomes visible between the left and right habenulae (Figure 3E). At dorsal-most levels, this territory is present on the right but absent from the left (Figure 3C-C1). At more ventral levels, it becomes visible in both habenulae but extends further laterally on the left than on the right (Figure 3D-E, D1-E1). In line with this size difference, the total number of PHH3 expressing cells appears significantly higher in the right habenula than in the left one (data not shown).

#### Differential expression of genes controlling neurogenesis between the right and left habenulae

In order to gain insight into the timing of neurogenesis in the catshark habenulae, we next analysed expression of genes known to control this process in vertebrates. We focused on *ScSox2*, the catshark orthologues of *Sox2* known for its role in maintaining the pluripotency of neural progenitors (Bylund et al., 2003; Graham et al., 2003). We also analysed expression of catshark orthologues of *NeuroD* and *Ngn*, focusing on the proneural gene *ScNgn2* and on *ScNeuroD1*, which codes for a neuronal differentiation factor (Chae et al., 2004; Imayoshi and Kageyama, 2014). We indeed found

that the paralogues, ScNgn1 and ScNeuroD2, present in the catshark as in osteichthyans are not expressed in the catshark habenulae (data not shown). ScSox2 is broadly expressed in stage 27 habenulae and it becomes restricted to the medial pseudostratified neuroepithelium and more lateral ventricular zone at stages 30-31 (Figure 4A-E). Comparisons of the ScSox2 expression territory between the left and right habenulae confirm that at stage 31, this territory is significantly more developed laterally on the right than on the left (Figure C-E), while no overt difference is observed at earlier stages (Figure 4A-B). Another asymmetry is reproducibly observed at more lateral levels of the ventricular zone (LVZ), which exhibit a more intense ScSox2 signal in the left than in the right habenula as early as stage 30 (Figure 4B-E). ScNgn2 is expressed in the medial pseudostratified neuroepithelium. As already observed for PCNA and ScSox2, it exhibits a broader lateral expansion of its territory in the right habenula than in the left at stage 31, but not at earlier stages (Figure 4 F-J). ScNeuroD1 is expressed in the developing habenulae from stage 29 to 31 (Figure 4K-O). Its expression territory exhibits very similar expression characteristics at all stages studied. It excludes the most lateral territory of round shaped cells and shows a peak of signal intensity in a territory lying in the periphery of ScNqn2 ventricular expressing domain. A fainter, patchy signal is also present in the immediate vicinity of the medial ventricular zone, which expresses ScSox2 and ScNgn2 (Figure 4K-O). This ventricular zone of patchy expression is asymmetric between the right and left habenulae at stage 31, as observed for ScSox2, ScNqn2 and PCNA expression analyses.

#### Differential patterns of neuronal differentiation between the left and right habenulae

Characterization of differentiating neuronal territories was first conducted by analysing expression of HuC/D, a general neuronal marker also expressed in committed progenitors (Barami et al., 1995; Marusich et al., 1994) and DCX, a microtubule associated protein expressed in migrating neurons (Reiner et al., 2004; Schaar et al., 2004), from stage 29 to 31 (Figure 5). The broad expression characteristics of HuC/D and DCX are very similar from stages 29 to 31. Both share a strong expression in the left and right lateral populations of round shaped cells (Figure 5A-O). Signals observed at stage 31 confirm that the cell density is higher on the right than on the left, in a posterior-lateral sector (Figure 5G-O, compare Figure 5O1 and 5O2). HuC/D but not DCX is additionally expressed in neuronal progenitors migrating from the medial, PCNA positive neuroepithelium (Figure 5C, 5F, 5O), while DCX labels the developing habenular commissure at stages 29 to 30 but not later (Figure 5C, 5F, 5N). Both territories exclude the medial proliferating PCNA, ScSox2 and ScNgn2 positive neuroepithelium at all stages analysed. As expected from PCNA, ScSox2 and ScNgn2 expression profiles, this negative territory appears symmetric until stage 30 (Figure 5A-F) but it shows a marked lateral expansion in the right habenula relative to the left one at

stage 31 (Figure 5G-0). A novel asymmetry is revealed by analysis of HuC/D and DCX signals at the level of the lateral ventricular zone (Figure 5C1-C2, 5F1-F2, 5O3-O4). HuC/D and DCX exclude this cell layer in the left and right habenulae at stage 29 (Figure 5C1-C2). The lateral ventricular cell layer also remains unlabeled on the left at stages 30 and 31 (Figure 5F1, 5O3). In contrast, this cell population starts expressing both markers on the right (Figure 5F2, 5O4), suggesting that at this level, neuronal differentiation starts earlier in the right habenula than in the left one. Of note is the fact that by stage 29, ScPitx2, which is broadly expressed in the neuroepithelium at stage 27, becomes strictly restricted to two cell populations of the left habenula, the lateral ventricular zone and a thicker adjacent domain at the border of the medial pseudostratified neuroepithelium (Supplementary Figure 3). We also analysed expression of ScCalb1, ScKctd12b and ScPou4f1, the catshark orthologues of three regional markers of differentiated neurons, known to be expressed in the vertebrate habenula, calbindin 1, Kctd12b and Pou4f1 (also known as Brn3) (phylogenies in Suppl. Figure 1; Figure 6). We previously reported that ScKctd12b is asymmetrically expressed at stage 31 (Lagadec et al., 2015). We confirm here its broad expression characteristics, ScKctd12b being expressed in both habenulae but with a prominent lateral expansion only observed on the left (Figure 6A-C). Expression of ScPou4f1 was first observed at stage 31. Its territory is contained within the HuC/D and DCX positive domain (Figure 6D-E). The labelling is clearly asymmetric, with the highest signal intensity in a ventral, lateral territory of the left habenula largely excluding Kctd12b expression domain (Figure 6F). ScCalb1 expression is also bilateral and largely restricted to HuC/D and DCX ventro-lateral positive territories of the habenulae (Figure 6G-I). The signal exhibits a marked asymmetry, with a major expression domain restricted to the lateral region of the right habenula, adjacent to the Kctd12b territory (Figure 6I). Of note for all three markers, the territories exhibiting the highest signal intensity are largely excluding each other and display complementary, radial boundaries.

#### All habenular asymmetries are lost upon Nodal abolition, resulting in a right isomerism

In order to assess whether the novel asymmetries identified in this study are dependent on Nodal signalling, we analysed stage 31 embryos submitted to pharmacological treatments using the antagonist SB-505124 in the conditions described previously (Lagadec et al., 2015; Figure 7). We first focused on neurogenetic defects, using *ScSox2*, *ScNgn2* and *ScNeuroD1* probes in ISH of control and SB-505124 treated embryos. As expected, *ScSox2*, *ScNgn2* and *ScNeuroD1* show asymmetric signals at the level of the medial pseudostratified neuroepithelium in control embryos, with a broader expression territory on the right (Figure 7A-B, E-F, I-J). The signals for all three genes become symmetric, with an expanded territory suggestive of a right identity, following treatment (Figure 7C-D, G-H, K-L). Similarly, *ScSox2* expression in the lateral ventricular zone appears symmetric between

the left and right habenulae in SB-505124 treated embryos (Figure 7C-D). ScSox2 transcript distribution also becomes symmetric between the left and right habenulae in the lateral ventricular zone of SB-505124 treated embryos (Figure 7C, D). To further analyse the effect of Nodal abrogation on this cell layer, we conducted IHC using antibodies directed against HuC/D and DCX. Both markers were broadly expressed in the population of round shaped cells in control and SB-505124 embryos (Figure 7M-P). As expected, the signal was absent from the left lateral ventricular cell layer of control embryos (Figure 7N3) while it was detected at the same level on the right (Figure 7N4). This asymmetry disappears in SB-505124 treated embryos, lateral ventricular cells expressing HuC/D and DCX in both habenulae (Figure 7P3-P4). The difference in cell density observed between the left and right habenulae in a lateral sector of the habenulae (lower on the right than on the left in control embryo: compare Figure 7N1 with Figure 7N2) is also abolished upon SB-505124 treatment, both habenulae exhibiting densely packed cells in this sector after treatment, as observed on the right of control embryos (compare Figure 7N2, P1, P2). The neuropil density (higher in the left than in the right lateral habenula of control embryos: Figure 7N1, N2), is concomitantly reduced in the lateral left habenula of treated embryos (compare Figure 7N1 and P1) and it appears very similar between the right and the left (Figure 7P1, P2). Finally, the HC path, which runs more dorsally on the right than on the left in control as in untreated embryos (Figure 7N), becomes symmetric in treated embryos, with right characteristics (Figure 7P).

#### **DISCUSSION**

Although proliferation-differentiation or proneural gene expressions have been reported in the developing epithalamus of several vertebrate species, including xenopus, rodents and a lamprey (Villar-Cheda et al., 2006; Wullimann et al., 2005), detailed analyses of cell proliferation and differentiation in the context of epithalamic asymmetry formation have thus far only been reported in the zebrafish. Our study in the catshark thus provides a novel reference to address this issue, in a model organism, which substantially differs from the zebrafish by its slow development and large organ size. This characterization sheds light on the mode of habenular formation in the catshark and highlights novel molecular and cellular epithalamic asymmetries, reminiscent of those reported in the zebrafish, albeit with variations.

### A radial morphogenetic pattern of habenula formation in the catshark

In the vertebrate nervous system, the most common mode of organ construction involves an insideout pattern of proliferation and cell migration, as exemplified by the cerebral cortex of mammals (Florio and Huttner, 2014). Analyses of neurogenesis in the zebrafish habenulae suggest that their development follows this general morphogenetic pattern, no heterogeneity in proliferationdifferentiation patterns being detected along the ventricular zone in this case (Aizawa et al., 2007). In contrast, the proliferation-differentiation patterns reported here support the conclusion that from stages 29 to 31, neurogenesis in the catshark habenulae is asynchronous between different levels of the ventricular zone, progressing from lateral to medial levels as development proceeds. Thus at stage 29, HuC/D-DCX expressing cells are restricted to lateral levels of the habenulae while at more medial levels, a typical proliferative pseudostratified neuroepithelium spans the whole width of the organ. This partitioning persists until stage 31, with a progressive expansion of the differentiated zone and a gradual medial restriction of the pseudostratified neuroepithelium. This progressive spatial restriction of the proliferative neuroepithelium to medial territories of the ventricular zone is reminiscent of the mode of organ construction from a proliferative marginal zone observed in the zebrafish optic tectum or in the vertebrate retina (Kubota et al., 2002; Nguyen et al., 1999; Reh and Levine, 1998). Habenular growth in the catshark thus displays characteristics of a "radial morphogenetic pattern" (Nguyen et al., 1999), a mode of organ construction involving successive additions of radial blocks of cells, which in this case could take place at medial levels of the developing organ. However, it should be noted that from stages 29 to 31, as the pseudostratified neuroepithelium regresses in the medial part of the epithalamus, a minor population of proliferative cells also persists at lateral levels of the ventricular zone, as shown by the maintenance of PCNA, ScSox2 expression and the incorporation of BrdU at this level. At these stages, the catshark habenulae thus exhibit a dual mode of proliferation-differentiation, relying on a major, localised proliferation centre, while retaining a more minor proliferative activity of the whole ventricular cell population. This mode of organ construction, which combines characteristics of both radial and tangential morphogenetic patterns, could represent an evolutionary transition state between these two patterns, thus providing a paradigm to gain insight into underlying mechanisms. From a mechanistic standpoint, a prevailing radial morphogenetic pattern with a major medial proliferation center as observed in the catshark is expected to result in a graded distribution of neurons along the lateral to medial axis depending on the timing of cell cycle exits, cells at more lateral levels corresponding to older neurons. Interestingly, the major ScKctd12b, ScPou4f1 and ScCalb1 expression territories observed at stage 31 show a lateral to medial relative organization and are delimited by boundaries, which largely follow a radial orientation (see Figure 6J). This molecular profile is consistent with a prevailing radial morphogenetic pattern in the catshark habenulae between stages 29 and 31, also suggesting that the corresponding neuronal phenotype choices from lateral to medial levels may be related to neuronal birthdates.

#### Opposite effects of Nodal signalling in the maintenance of neural progenitors in the left habenula

The molecular and cellular mechanisms controlling the spatial and temporal progression of neurogenesis in the catshark habenulae remain completely unknown. Comparisons of proliferationdifferentiation patterns between the left and the right developing habenulae at stage 31 highlight two novel, Nodal dependent major asymmetries, which provides an entry point to address these mechanisms. First, the medial restriction of the pseudostratified proliferative neuroepithelium appears more pronounced in the left than in the right habenula, an asymmetry which becomes evident between stages 30 and 31 while no significant difference can be observed at stage 29. Second, the ventricular ScSox2 positive progenitors, observed laterally to this territory both in the right and left habenulae at stage 29, persist on the left at stage 31 but disappears on the right. Such differences in progenitor maintenance between the left and the right side suggest a differential regulation either of progenitor proliferation, or of cell cycle exits. Detailed analyses of proliferation rates and of the number of cells exiting cell cycles will be crucial to clarify this point. An unexpected feature is that these two asymmetries significantly differ, not only by the territories concerned (respectively an early neurogenic neuroepithelium exhibiting a pseudostratified organisation suggestive of interkinetic nuclei migrations (Lee and Norden, 2013), and a later appearing territory consisting of a single ventricular cell layer), but also by the effect observed on the pool of ScSox2 expressing neural progenitors. The asymmetry observed in the former thus evokes a prolonged maintenance of these progenitors in the left versus the right habenula in the lateral ventricular territory, while it suggests an earlier restriction of this cell population on the left in the pseudostratified neuroepithelium. Despite these differences, both asymmetries appear dependent on Nodal signalling and are observed in territories exhibiting a left ScPitx2 expression, a canonical target of the pathway in the context of organ asymmetry. Dual roles of P-Smad2/3 mediated signalling on the balance between proliferation and neurogenesis have already been reported, depending on the cellular context. For instance, Gdf11 facilitates the temporal progression of neuronal differentiation in the developing spinal cord (Shi and Liu, 2011), while it inhibits neurogenesis in the olfactory epithelium (Wu et al., 2003). Concerning Nodal signalling in the epithalamus context, it has been shown to promote an early asymmetric neurogenesis in the zebrafish, albeit without major effects on the elaboration of later habenular asymmetries (Roussigné et al., 2009). A related mechanism at stages 29-30 could account for a local depletion of neural progenitors, resulting in the accelerated regression of the pseudostratified neuroepithelium observed at stage 31 in the catshark left habenula. On the other hand, the left maintenance of neural progenitors observed in the lateral ventricular zone could be consistent with the roles in promoting cell proliferation reported for Pitx2 in different systems (Basu and Roy, 2013; Huang et al., 2010; Kioussi et al., 2002; Rulifson et al.,

2007), and notably for the c-isoform expressed in the épithalamus (Lozano-Velasco et al., 2015, 2011; Martínez-Fernandez et al., 2006). The involvement of two mutually non-exclusive mechanisms demonstrated in other systems could help to reconcile these data. First, in the context of myogenic differentiation, Pitx2 has been shown to promote myoblast proliferation but this activity is regulated by phosphorylation and suppressed upon initiation of the differentiation program (Gherzi et al., 2010; Martínez-Fernandez et al., 2006). Second, in the zebrafish, parapineal size has been proposed to involve two distinct, Nodal dependent genetic programs, having opposite effects on the regulation of cell proliferation and respectively mediated by pitx2c and another yet unidentified factor. Abolition of pitx2c activity thus leads to an increase of parapineal cell number, while a double pitx2c-Nodal loss of function restores it to normal level (Garric et al., 2014). A Pitx2c isoform is present in the catshark (Lagadec, Boutet and Mazan unpublished results), and the involvement of two such Nodal dependent programs, having opposite effects on cell proliferation, and respectively prevailing either in the medial pseudostratified neuroepithelium or in the adjacent lateral ventricular cell layer, could account for the differences observed between these two cell populations. Post-transcriptional modulations of Pitx2 activity, possibly mediated by phosphorylation, could contribute to the spatial segregation of two such programs.

#### Asymmetric cell fate choices between the left and right catshark habenulae

We had previously shown that the catshark and zebrafish share asymmetric expressions of Kctd12 family genes. We extend here the molecular asymmetries detected in the catshark to two novel markers, ScPou4f1 and ScCalb1. In the zebrafish, the dorsal habenulae can be subdivided into two asymmetric subnuclei, a lateral and a medial one, and Pou4f1 (also known as Brn3a) is selectively expressed in the latter (Aizawa et al., 2005). This marker thus provides a novel example of a molecular asymmetry conserved between the catshark and zebrafish developing habenulae and it will be of interest to compare the relative location of its expression territory in the adult organ between the two species. Based on ScKctd12b, ScPou4f1 and ScCalb1 expressions, the lateral to medial molecular organisation of the territories differentiated in stage 31 habenulae significantly differs between the left and the right, as most obvious at ventral levels of the organ. At lateral-most levels, ScKctd12b territory is only observed on the left habenula as previously described (Lagadec et al., 2015). More intermediate levels respectively express ScPou4f1 on the left and ScCalb1 on the right while medial levels, adjacent to the pseudostratified neuroepithelium, bilaterally express ScKctd12b, albeit with a broader expansion on the left (Figure 6J). How is the generation of this asymmetry in habenular regionalisation controlled? In the zebrafish, current models for the establishment of habenular molecular asymmetries involve two parallel processes, respectively controlled by Notch and Wnt pathways. The first one relies on an asymmetric temporal regulation of neurogenesis, neuronal differentiation being initiated earlier and being more prominent during early phases of neurogenesis in the left than in the right habenula. The coupling of this process with the temporal regulation of cell fate choices also observed in the zebrafish (early born neural precursors preferentially contributing to the lateral sub-nucleus), provides a first mechanism accounting for the rise of asymmetries in the developing habenulae (Aizawa et al., 2007). The second mechanism relies on an asymmetric control of neuronal differentiation between the left and right habenulae, related to the selective suppression on the left of Wnt signals by the parapineal (Hüsken et al., 2014). This mechanism appears to operate independently from the former, Notch dependent one. In the catshark, the analyses shown here provide no insight into the initiation of neurogenesis since differentiated neurons are already detected at the earliest stage analysed (stage 29) but as detailed above, analyses of proliferation-differentiation patterns in stage 31 habenulae support the conclusion that as in the zebrafish, neurogenesis is asymmetric in the catshark. Such neurogenetic asymmetries, coupled to a temporal regulation of cell fates indeed suggested by the lateral to medial regionalisation observed at stage 31, could contribute to the elaboration of habenular asymmetries. However, the regional pattern observed at stage 31 suggests that an independent differential control of neuronal cell fate choices could also be involved. For instance, in the ventral part of stage 31 habenulae, we observe mirror images of ScPou4f1 and ScCalb1 territories, respectively located on the left and on the right, at comparable locations along the lateral to medial axis of each habenula. Our histological analyses support the conclusion that from stage 27 to 31, the habenulae grow at very similar rates from lateral to medial levels, suggesting that the neurons contained in these territories exit cell cycles during largely overlapping time windows. This makes it unlikely that the difference observed at stage 31 merely results from the temporal control of neurogenesis in a dynamic cellular environment also influencing cell fate choices, suggesting that another asymmetric process may be involved. Pulse-chase BrdU incorporation experiments will be crucial to definitely assess the role of neurogenesis in the asymmetric differentiation pattern observed between the catshark left and right habenulae.

# Asymmetric neuropil distribution in the catshark habenulae

Other asymmetric features observed in this study include differences in the location of HC tract (which exhibits a different curvature on the left and on the right), and in neuropil density (higher on the left) between the left and right habenulae. Like all molecular asymmetries reported previously (Lagadec et al., 2015; see above), this asymmetry is dependent on Nodal signalling in the catshark. A higher extent of neuropil in the left habenula has also been observed in zebrafish (Concha et al.,

2000). Interestingly, this difference is one of the subtle asymmetries partially retained following parapineal ablation (Bianco et al., 2008; Concha et al., 2003). In the zebrafish, the genetic mechanisms underlying this asymmetric neuropil elaboration involve *Kctd12* genes (*Kctd12.1* and *Kctd12.2*), which negatively regulate neuropil development through a direct interaction with the Ulk2 kinase (Lee et al., 2014; Taylor et al., 2011). We find no correlation between the territories positive for *Kctd12* related genes and those showing the lower neuropil density in the catshark. In fact, the latter territory (right, dorsal and ventro-lateral) is negative for *ScKctd12b* expression, which is at odd with a conservation of *Kctd12* genes in the limitation of neuropil development. However as this *Kctd12* role is dependent on Ulk2 activity, definitive conclusions await a more extensive analysis, including the study of the catshark orthologue of Ulk2.

### **CONCLUSION**

Analysis of fiber distribution, proliferation-differentiation patterns and of the early regionalisation in the catshark developing epithalamus highlights novel asymmetries, all of them dependent on Nodal signalling. This confirms our previous conclusion that contrary to the zebrafish, Nodal in the catshark is essential to promote left habenular identity (Lagadec et al., 2015). However, despite an extensive divergence in habenular morphology and mode of organ construction between the two species, our data suggest that as in the zebrafish, asymmetry elaboration may involve an asymmetric control of neurogenesis and of neuronal cell fate selection. These similarities suggest that the mechanisms respectively under the control of the parapineal and of Nodal signalling respectively in the zebrafish and in the catshark may be related. Deciphering and comparing the genetic programs respectively controlled by the parapineal in the zebrafish and by Nodal in the catshark will be crucial to further assess this hypothesis. While the catshark is not amenable to the powerful genetic techniques available in the zebrafish, it may be an excellent model to identify Nodal targets using transcriptomic profiling of the developing habenulae, facilitated by its slow development and large organ size.

## **BIBLIOGRAPHY**

- Aizawa, H., 2013. Habenula and the asymmetric development of the vertebrate brain. Anat. Sci. Int. 88, 1–9. doi:10.1007/s12565-012-0158-6
- Aizawa, H., Amo, R., Okamoto, H., 2011. Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. Front. Neurosci. 5, 1–7. doi:10.3389/fnins.2011.00138
- Aizawa, H., Bianco, I.H., Hamaoka, T., Miyashita, T., Uemura, O., Concha, M.L., Russell, C., Wilson, S.W., Okamoto, H., 2005. Laterotopic Representation of Left-Right Information onto the Dorso-Ventral Axis of a Zebrafish Midbrain Target Nucleus. Curr. Biol. 15, 238–243. doi:10.1016/j.cub.2005.01.014
- Aizawa, H., Goto, M., Sato, T., Okamoto, H., 2007. Temporally Regulated Asymmetric Neurogenesis Causes Left-Right Difference in the Zebrafish Habenular Structures. Dev. Cell 12, 87–98. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.004
- Ballard, W.W., Mellinger, J., Lechenault, H., 1993. A series of normal stages for development of Scyliorhinus canicula, the lesser spotted dogfish (Chondrichthyes: Scyliorhinidae). J. Exp. Zool. 267, 318–336. doi:10.1002/jez.1402670309
- Barami, K., Iversen, K., Furneaux, H., Goldman, S. a., 1995. Hu protein as an early marker of neuronal phenotypic differentiation by subependymal zone cells of the adult songbird forebrain. J. Neurobiol. 28, 82–101. doi:10.1002/neu.480280108
- Basu, M., Roy, S.S., 2013. Wnt/jS-catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein and thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3. J. Biol. Chem. 288, 4355–4367. doi:10.1074/jbc.M112.409102
- Bianco, I.H., Carl, M., Russell, C., Clarke, J.D.W., Wilson, S.W., 2008. Brain asymmetry is encoded at the level of axon terminal morphology. Neural Dev. 3, 9. doi:10.1186/1749-8104-3-9
- Butler, A.B., Hodos, W., 2005. Epithalamus, in: Comparative Vertebrate Neuroanatomy. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 407–415. doi:10.1002/0471733849.ch21

- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B.G., Muhr, J., 2003. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1–3 activity. Nat. Neurosci. 6, 1162–1168. doi:10.1038/nn1131
- Chae, J.H., Stein, G.H., Lee, J.E., 2004. NeuroD: the predicted and the surprising. Mol. Cells 18, 271–288. doi:789 [pii]
- Concha, M.L., Burdine, R.D., Russell, C., Schier, A.F., Wilson, S.W., 2000. A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. Neuron 28, 399–409. doi:10.1016/S0896-6273(00)00120-3
- Concha, M.L., Russell, C., Regan, J.C., Tawk, M., Sidi, S., Gilmour, D.T., Kapsimali, M., Sumoy, L., Goldstone, K., Amaya, E., Kimelman, D., Nicolson, T., Gründer, S., Gomperts, M., Clarke, J.D.W., Wilson, S.W., 2003. Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality. Neuron 39, 423–438. doi:10.1016/S0896-6273(03)00437-9
- Concha, M.L., Signore, I.A., Colombo, A., 2009. Mechanisms of directional asymmetry in the zebrafish epithalamus. Semin. Cell Dev. Biol. 20, 498–509. doi:10.1016/j.semcdb.2008.11.007
- Concha, M.L., Wilson, S.W., 2001. Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. J. Anat. 199, 63–84. doi:10.1046/j.1469-7580.2001.19910063.x
- Coolen, M., Sauka-Spengler, T., Nicolle, D., Le Mentec, C., Lallemand, Y., Da Silva, C., Plouhinec, J.-L., Robert, B., Wincker, P., Shi, D.L., Mazan, S., 2007. Evolution of axis specification mechanisms in Jawed vertebrates: Insights from a chondrichthyan. PLoS One 2. doi:10.1371/journal.pone.0000374
- deCarvalho, T.N., Subedi, A., Rock, J., Harfe, B.D., Thisse, C., Thisse, B., Halpern, M.E., Hong, E., 2014. Neurtransmitter map of the asymmetric dorsal habenular nuclei of Zebrafish. Genesis 52, 636–655. doi:10.1002/dvg.22785
- Derobert, Y., Plouhinec, J.-L., Sauka-Spengler, T., Le Mentec, C., Baratte, B., Jaillard, D., Mazan, S., 2002. Structure and expression of three Emx genes in the dogfish Scyliorhinus canicula: functional and evolutionary implications. Dev. Biol. 247, 390–404. doi:10.1006/dbio.2002.0700

- Florio, M., Huttner, W.B., 2014. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. Development 141, 2182–94. doi:10.1242/dev.090571
- Gamse, J.T., Kuan, Y.-S., Macurak, M., Brösamle, C., Thisse, B., Thisse, C., Halpern, M.E., 2005. Directional asymmetry of the zebrafish epithalamus guides dorsoventral innervation of the midbrain target. Development 132, 4869–4881. doi:10.1242/dev.02046
- Gamse, J.T., Thisse, C., Thisse, B., Halpern, M.E., 2003. The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon. Development 130, 1059–1068. doi:10.1242/dev.00270
- Garric, L., Ronsin, B., Roussigné, M., Booton, S., Gamse, J.T., Dufourcq, P., Blader, P., 2014. Pitx2c ensures habenular asymmetry by restricting parapineal cell number. Development 141, 1572–1579. doi:10.1242/dev.100305
- Gherzi, R., Trabucchi, M., Ponassi, M., Gallouzi, I.-E., Rosenfeld, M.G., Briata, P., 2010. Akt2-mediated phosphorylation of Pitx2 controls Ccnd1 mRNA decay during muscle cell differentiation. Cell Death Differ. 17, 975–983. doi:10.1038/cdd.2009.194
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., Pevny, L., 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. Neuron 39, 749–765. doi:10.1016/S0896-6273(03)00497-5
- Hans, F., Dimitrov, S., 2001. Histone H3 phosphorylation and cell division. Oncogene 20, 3021–3027. doi:10.1038/sj.onc.1204326
- Huang, Y., Guigon, C.J., Fan, J., Cheng, S.Y., Zhu, G.Z., 2010. Pituitary homeobox 2 (PITX2) promotes thyroid carcinogenesis by activation of cyclin D2. Cell Cycle 9, 1333–1341. doi:10.4161/cc.9.7.11126
- Hüsken, U., Stickney, H.L., Gestri, G., Bianco, I.H., Faro, A., Young, R.M.,
  Roussigné, M., Hawkins, T.A., Beretta, C.A., Brinkmann, I., Paolini, A.,
  Jacinto, R., Albadri, S., Dreosti, E., Tsalavouta, M., Schwarz, Q., Cavodeassi,
  F., Barth, A.K., Wen, L., Zhang, B., Blader, P., Yaksi, E., Poggi, L., Zigman, M.,
  Lin, S., Wilson, S.W., Carl, M., 2014. Tcf7l2 Is Required for Left-Right
  Asymmetric Differentiation of Habenular Neurons. Curr. Biol. 24, 2217–2227. doi:10.1016/j.cub.2014.08.006

- Imayoshi, I., Kageyama, R., 2014. bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells. Neuron 82, 9–23. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.018
- Kioussi, C., Briata, P., Baek, S.H., Rose, D.W., Hamblet, N.S., Herman, T., Ohgi, K. a., Lin, C., Gleiberman, A., Wang, J., Brault, V., Ruiz-Lozano, P., Nguyen, H.D., Kemler, R., Glass, C.K., Wynshaw-Boris, A., Rosenfeld, M.G., 2002. Identification of a Wnt/Dvl/β-catenin → Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. Cell 111, 673–685. doi:10.1016/S0092-8674(02)01084-X
- Kubota, R., Hokoc, J.., Moshiri, A., McGuire, C., Reh, T.., 2002. A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. Dev. Brain Res. 134, 31–41. doi:10.1016/S0165-3806(01)00287-5
- Lagadec, R., Laguerre, L., Menuet, A., Amara, A., Rocancourt, C., Péricard, P., Godard, B.G., Celina Rodicio, M., Rodríguez-Moldes, I., Mayeur, H., Rougemont, Q., Mazan, S., Boutet, A., 2015. The ancestral role of nodal signalling in breaking L/R symmetry in the vertebrate forebrain. Nat. Commun. 6, 6686. doi:10.1038/ncomms7686
- Lee, H.O., Norden, C., 2013. Mechanisms controlling arrangements and movements of nuclei in pseudostratified epithelia. Trends Cell Biol. 23, 141–150. doi:10.1016/j.tcb.2012.11.001
- Lee, S., Page-McCaw, P., Gamse, J.T., 2014. Kctd12 and Ulk2 Partner to Regulate Dendritogenesis and Behavior in the Habenular Nuclei. PLoS One 9, e110280. doi:10.1371/journal.pone.0110280
- Lozano-Velasco, E., Contreras, A., Crist, C., Hernández-Torres, F., Franco, D., Aránega, A.E., 2011. Pitx2c modulates Pax3+/Pax7+ cell populations and regulates Pax3 expression by repressing miR27 expression during myogenesis. Dev. Biol. 357, 165–178. doi:10.1016/j.ydbio.2011.06.039
- Lozano-Velasco, E., Vallejo, D., Esteban, F.J., Doherty, C., Hernández-Torres, F., Franco, D., Aránega, A.E., 2015. A Pitx2-miRNA pathway modulates cell proliferation in myoblasts and skeletal-muscle satellite cells and promotes their commitment to a myogenic cell fate. Mol. Cell. Biol. MCB.00536–15. doi:10.1128/MCB.00536-15

- Martínez-Fernandez, S., Hernández-Torres, F., Franco, D., Lyons, G.E., Navarro, F., Aránega, A.E., 2006. Pitx2c overexpression promotes cell proliferation and arrests differentiation in myoblasts. Dev. Dyn. 235, 2930–2939. doi:10.1002/dvdy.20924
- Marusich, M.F., Furneaux, H.M., Henion, P.D., Weston, J. a, 1994. Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. J. Neurobiol. 25, 143–155. doi:10.1002/neu.480250206
- Nguyen, V., Deschet, K., Henrich, T., Godet, E., Joly, J.-S., Wittbrodt, J., Chourrout, D., Bourrat, F., 1999. Morphogenesis of the optic tectum in the medaka (Oryzias latipes): a morphological and molecular study, with special emphasis on cell proliferation. J. Comp. Neurol. 413, 385–404. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19991025)413:3<385::AID-CNE3>3.0.CO;2-P
- Plouhinec, J.-L., Leconte, L., Sauka-Spengler, T., Bovolenta, P., Mazan, S., Saule, S., 2005. Comparative analysis of gnathostome Otx gene expression patterns in the developing eye: implications for the functional evolution of the multigene family. Dev. Biol. 278, 560–575. doi:10.1016/j.ydbio.2004.11.019
- Quintana-Urzainqui, I., Rodríguez-Moldes, I., Candal, E., 2014. Developmental, tract-tracing and immunohistochemical study of the peripheral olfactory system in a basal vertebrate: Insights on Pax6 neurons migrating along the olfactory nerve. Brain Struct. Funct. 219, 85–104. doi:10.1007/s00429-012-0486-2
- Reh, T. a., Levine, E.M., 1998. Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. J. Neurobiol. 36, 206–220. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(199808)36:2<206::AID-NEU8>3.0.CO;2-5
- Reiner, O., Gdalyahu, A., Ghosh, I., Levy, T., Sapoznik, S., Nir, R., Sapir, T., 2004. DCX's phosphorylation by not just another kinase (JNK). Cell Cycle 3, 747–751. doi:10.4161/cc.3.6.909
- Roussigné, M., Bianco, I.H., Wilson, S.W., Blader, P., 2009. Nodal signalling imposes left-right asymmetry upon neurogenesis in the habenular nuclei. Development 136, 1549–1557. doi:10.1242/dev.034793
- Roussigné, M., Blader, P., Wilson, S.W., 2012. Breaking symmetry: The zebrafish as a model for understanding left-right asymmetry in the developing brain. Dev. Neurobiol. 72, 269–281. doi:10.1002/dneu.20885

- Rulifson, I.C., Karnik, S.K., Heiser, P.W., ten Berge, D., Chen, H., Gu, X., Taketo, M.M., Nusse, R., Hebrok, M., Kim, S.K., 2007. Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 6247–6252. doi:10.1073/pnas.0701509104
- Schaar, B.T., Kinoshita, K., McConnell, S.K., 2004. Doublecortin Microtubule Affinity Is Regulated by a Balance of Kinase and Phosphatase Activity at the Leading Edge of Migrating Neurons. Neuron 41, 203–213. doi:10.1016/S0896-6273(03)00843-2
- Shi, Y., Liu, J.-P., 2011. Gdf11 facilitates temporal progression of neurogenesis in the developing spinal cord. J. Neurosci. 31, 883–893. doi:10.1523/JNEUROSCI.2394-10.2011
- Taylor, R.W., Qi, J.Y., Talaga, A.K., Ma, T.P., Pan, L., Bartholomew, C.R., Klionsky, D.J., Moens, C.B., Gamse, J.T., 2011. Asymmetric Inhibition of Ulk2 Causes Left-Right Differences in Habenular Neuropil Formation. J. Neurosci. 31, 9869–9878. doi:10.1523/JNEUROSCI.0435-11.2011
- Villar-Cheda, B., Pérez-Costas, E., Meléndez-Ferro, M., Abalo, X.M., Rodríguez-Muñoz, R., Anadón, R., Rodicio, M.C., 2006. Cell proliferation in the forebrain and midbrain of the sea lamprey. J. Comp. Neurol. 494, 986–1006. doi:10.1002/cne.20851
- Wu, H.H., Ivkovic, S., Murray, R.C., Jaramillo, S., Lyons, K.M., Johnson, J.E., Calof, A.L., 2003. Autoregulation of neurogenesis by GDF11. Neuron 37, 197–207. doi:10.1016/S0896-6273(02)01172-8
- Wullimann, M.F., Rink, E., Vernier, P., Schlosser, G., 2005. Secondary neurogenesis in the brain of the African clawed frog, Xenopus laevis, as revealed by PCNA, Delta-1, Neurogenin-related-1, and NeuroD expression. J. Comp. Neurol. 489, 387–402. doi:10.1002/cne.20634

### **LEGENDS TO FIGURES**

#### Figure 1. Histological structure of developing habenulae in the catshark S. canicula

(A-D, F-G) Transverse sections through the catshark developing habenulae at stages 27 (A), 29 (B), 30 (C, D) and 31 (F, G) following hematoxylin staining. (C) and (D) respectively correspond to sections at dorsal and ventral levels of the organ. (E) Lateral view of the head of a catshark stage 31 embryo showing the plane and level of the sections shown in (F) and (G) and the catshark forebrain axes (anterior to posterior and dorsal to ventral). In (A-D, F-G), posterior (corresponding to mesencephalon location) is to the top of the section, anterior (corresponding to telencephalon location) is to the bottom. (F1-F2) are higher magnifications of the regions boxed in (F), at the level of the pseudostratified neuroepithelium. (G1-G2) are higher magnifications of the regions boxed in (G), at the level of round shaped cells showing a higher cell density on the right than on the left. Black arrowheads point to the transition zone between the developing choroid plexus and habenulae, based on tissue histology. Dotted lines delimit between the pseudostratified neuroepithelium and the round shaped cells (B). Abbreviations used: cp, choroid plexus; HC, habenular commissure; LHb, left habenula; RHb, right habenula; pi, pineal stalk; PNE, pseudo-stratified neuroepithelium. Scale bars=100μm.

# <u>Figure 2.</u> Differences in cellular organisation between the catshark left and right developing habenulae

(A-E) Transverse and (H-I) coronal sections through the catshark developing habenulae at stages 29 (A), 30 (B) and 31 (C-E; H-I) following IHC with an antibody directed against acetylated tubulin (green) and DAPI staining (blue). (F-G) Lateral views of the head of a catshark stage 31 embryo, with red lines indicating the plane and level of the sections respectively shown in (C-E) and (H-I) and schemes of the structure of the developing epithalamus as observed on these sections boxed on the right. Posterior and dorsal are to the top of the sections in (A-E) and in (H-I) respectively. (C1), (D1-D2), (E1-E2), (H1-H2) and (I1-I2) are higher magnifications of the regions boxed in (C), (D), (E), (H) and (I) respectively. Dotted lines delimit the pseudostratified neuroepithelium, more extended on the left than on the right, in (C1) and the HC, thicker laterally on right than on the left, in (D1-D2). Double arrows in (D) show the dorso-lateral expansion of the habenular tract path on the right. LVZ, lateral ventricular zone and same abbreviations as in Figure 1. Scale bars=100μm.

# Figure 3. Asymmetric proliferation profiles during habenular development in the catshark

(A-H) Transverse sections through the catshark developing habenulae at stages 29 (A), 30 (B) and 31 (C-H). (A-E) show sections following fluorescent IHC with an antibody directed against PCNA (A-E; green signal), P-Histone H3 (A-E; red signal). Nuclei in (B-E) were stained with DAPI (blue). (F-H) show sections following ISH using a PCNA RNA probe and Nuclear Fast Red counterstaining. (C1), (D1) and (E1) show higher magnifications of the territories boxed in (C), (D), and (E) respectively. Dotted lines in (C1), (D1) and (E1) delimit PCNA expressing territories, which are asymmetric between the left and the right habenulae. Arrows in (D1), (E1), (G) and (H) point to the lateral boundaries of the proliferating pseudostratified neuroepithelium along the ventricular zone. Abbreviations are the same as in Figure 1. Scale bars=100μm.

# <u>Figure 4.</u> Expression asymmetries of *ScSox2*, *ScNgn2* and *ScNeuroD1* in the developing catshark habenulae

(A), (F, K), (B, G, L) and (C-E, H-J, M-O) Transverse sections through the catshark developing habenulae at stages 27, 29, 30, and 31 respectively. (A-E), (F-J) and (K-O) show in situ hybridisations with *ScSox2*, *ScNgn2* and *ScNeuroD1* respectively. (C-E) show sections of the same embryo, at different levels of the habenulae along the dorso-ventral axis, from dorsal to ventral levels as shown in Figure 2F. Same for (H-J) and (M-O). Black arrows in (D, E, I, J) show the lateral region of the pseudostratified neuroepithelium, which is more expanded on the right than on the left. Abbreviations are the same as in Figure 1. Scale bars=100μm.

# Figure 5. Expression of HuC/D and DCX in the developing catshark habenulae

(A-C), (D-F) and (G-O) Transverse sections through the catshark developing habenulae at stages 29, 30, and 31 respectively. (G-I), (J-L) (M-O) show sections of the same embryo at different levels of the habenulae along the dorso-ventral axis, from dorsal to ventral levels as shown in Figure 2F. (A, D, G, H, I) and (B, E, J, K, L) show the same sections following IHC using antibodies directed against HuC/D (green) and DCX (red) respectively, (C, F, M, N, O) show the corresponding merged images. Nuclei are stained with DAPI (blue). (C1-C2), (F1-F2), (N1-N2), (O1-O4) show higher magnifications of the territories boxed in (C), (F), (N) and (O) respectively. Arrowheads in (C1), (C2), (D1), (O3) point to lateral HuC/D and DCX negative ventricular cells, lining the left and right habenulae at stage 29 (C1, C2) and showing an asymmetric distribution at stages 30-31. Abbreviations are the same as in Figure 1. Scale bars=100μm.

# <u>Figure 6.</u> Regionalised expression of *ScKctd12b*, *ScPou4f1* and *ScCalb1* in stage 31 catshark habenulae

(A-I) Transverse sections through the catshark developing habenulae at stage 31. (A-C), (D-F) and (G-I) show *in situ* hybridisations with *ScKctd12b*, *ScPou4f1* and *ScCalb1* probes respectively. (A-C), (D-F) and (G-I) show sections at different levels of the habenulae along the dorso-ventral axis, from dorsal to ventral levels as shown in Figure 2F. (J) Scheme showing the relative organisation of the main territories of *ScKctd12b*, *ScPou4f1* and *ScCalb1* at posterior levels of stage 31 habenulae. Black arrowheads show asymmetric expression territories of expression (*ScKctd12b* left expression territory in (B-C); *ScPou4f1* left expression territory in (E-F); *ScCalb1* right expression territory in (I)). Abbreviations are the same as in Figure 1. Scale bars=100µm.

#### Figure 7. Effect of Nodal abrogation on habenular asymmetries at stage 31

(A-P) Transverse sections through the catshark developing habenulae at stage 31 in control embryos (A-B, E-F, I-J) or SB-505124-treated (C-D, G-H, K-L, O-P) embryos. The sections shown in (A, C, E, G, I, K, M, O) are located dorsally to those shown in (B, D, F, H, J, L, N, P) respectively. Sections shown in (A-D), (E-H) and (I-L) were submitted to ISH using *ScSox2*, *ScNgn2* and *ScNeuroD1* probes respectively. Sections shown in (M-P) were submitted to IHC using antibodies directed against HuC/D (green) and DCX (red) respectively. Nuclei are shown in blue. (N1-N4) and (P1-P4) show higher magnifications of the territories boxed in (N) and (P) respectively. Black arrows in (A-H) show the lateral region of the pseudostratified neuroepithelium, which is more expanded on the right than on the left in control embryos. This asymmetry is lost in SB-505124 treated embryos. White arrowheads in (N3) point to the HuC/D and DCX negative cell layer of the lateral ventricular zone persisting on the left in control embryos. This continuous layer is absent on the right of control embryos and in SB-505124 treated ones (left and right). Abbreviations are the same as in Figure 1. Scale bars=100μm.

# <u>Figure 8.</u> Scheme depicting habenular neurogenetic defects observed at stage 31 following Nodal abrogation in the catshark

The scheme shows comparisons between control embryos (left column) and SB-505124 treated embryos (right column). In each case, sections are depicted at three different levels along the dorsoventral axis (dorsal-most at the top, ventral-most at the bottom of the figure), with the following colour code: green, HuC/D and DCX positive but *ScNeuroD1* negative territory; blue, HuC/D, DCX, *ScNeuroD1* positive and *ScSox2* negative territory; yellow, *ScSox2* positive territory. The *ScSox2* positive territory also expresses PCNA and, in the medial pseudostratified neuroepithelium (shown hatched), *ScNgn2*. HuC/D and DCX extensively overlap with *ScNeuroD1* territory, itself spanning the outer part of *ScNgn2* territory. All asymmetries observed in control embryos (right expansion of the proliferative pseudostratified neuroepithelium; presence of a continuous *ScSox2* cell layer lining the left habenula) are lost upon Nodal abrogation, resulting in a right isomerism. Other asymmetries not

shown in the figure, such as a lower neuropil density in the right habenula, asymmetric location of the habenular commissure, asymmetric *ScPou4f1* and *ScCalb1* territories, are also lost with a right isomerism phenotype.

## Supplementary Figure 1. Phylogenetic analyses confirming the identification of catshark genes analysed in this study

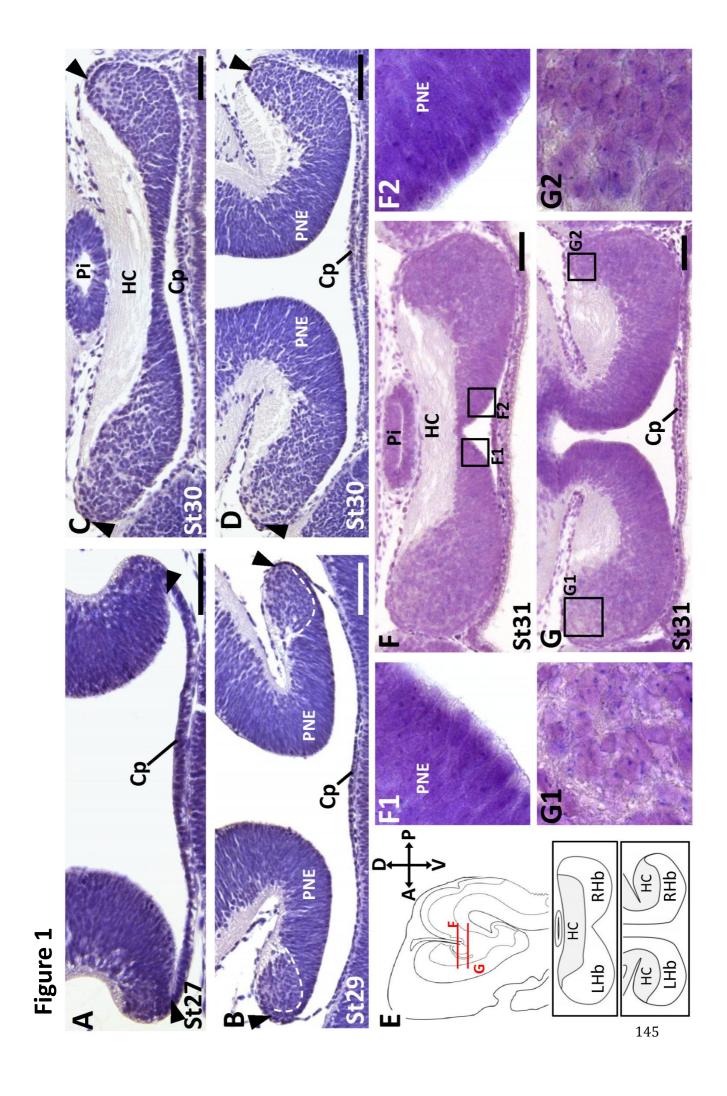
Orthology classes are boxed. Species names are as follows: Bf, Branchiostoma floridae; Cm, Callorhinchus milii; Dr, Danio rerio; Gg, Gallus gallus; Le, Leucoraja erinacea; Ol, Oryzias latipes; Pm, Petromyzon marinus; Sc, Scyliorhinus canicula; Xt, Xenopus tropicalis.

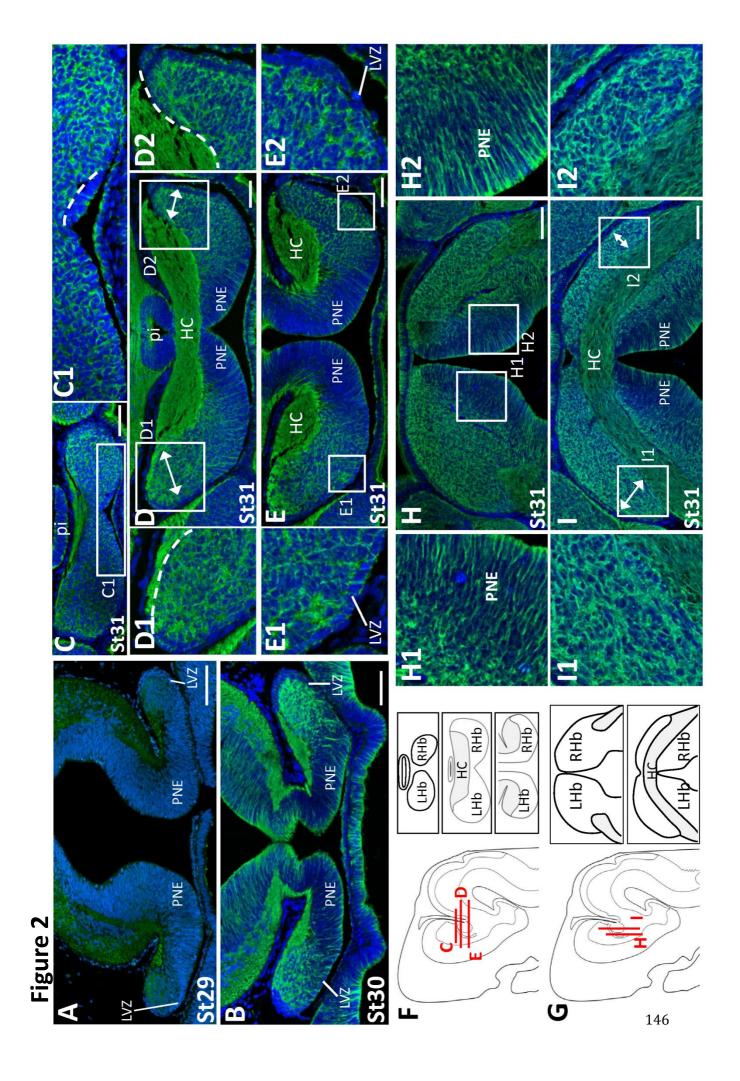
#### Supplementary Figure 2: Distribution of the cells following BrdU incorporation at stages 28 and 29

Left and right columns respectively show transverse sections of stage 28 and 29 catshark habenulae following immuno-detection of BrdU. Embryos were incubated in a BrdU containing solution for 48 hours prior to washing in sea water (2h) and fixation. Sections at the top of the figure correspond to more dorsal levels than those at the bottom of the figure.

### Supplementary Figure 3: expression of *ScPitx2* in stage 27-31 catshark habenulae and comparison with *ScPCNA* at stage 31

(A, B, C-E) transverse sections of catshark habenulae following ISH with a *ScPitx2* probe, respectively at stages 27, 29 and 31. (F-G) transverse sections of catshark habenulae following ISH with a *ScPCNA* probe at stage 31. (C-E) and (F-H) are shown from dorsal to ventral levels of the organ from top to bottom. (C) and (F) are adjacent sections of the same embryo. Same for (D) and (G), (E) and (H). Arrows in (G) and (H) point to the lateral boundary of the pseudostratified epithelium on the left, which differs from the one observed on the right. *ScPCNA* and *ScPitx2* territories overlap at this level.





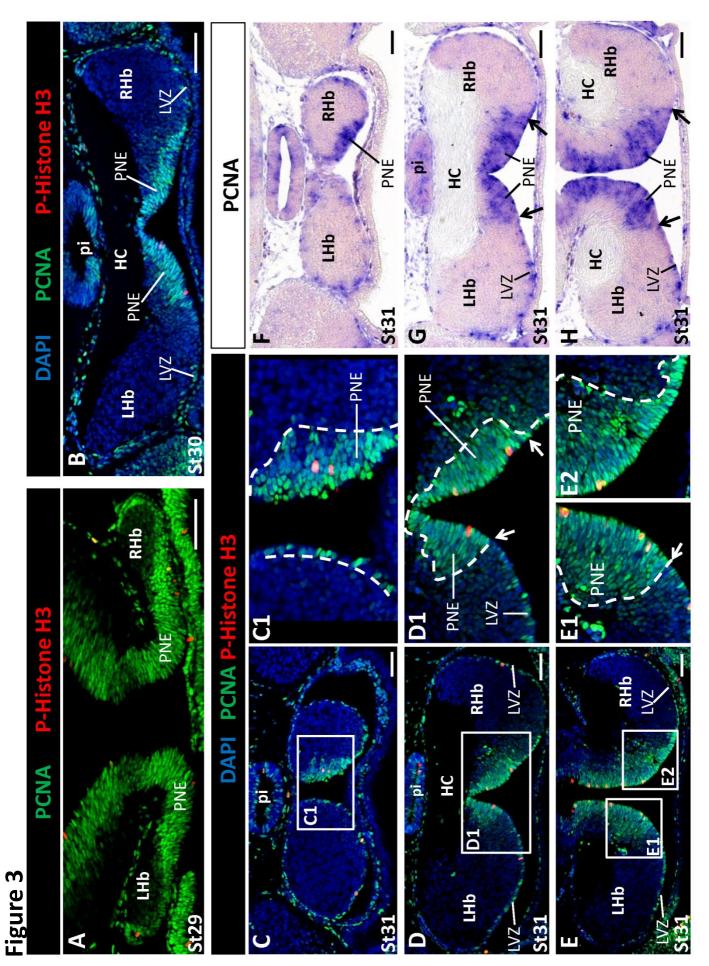
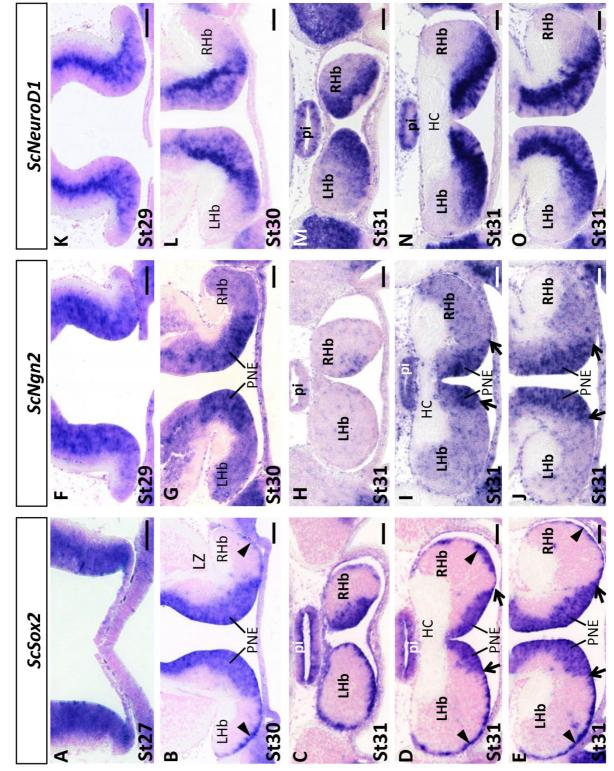


Figure 4



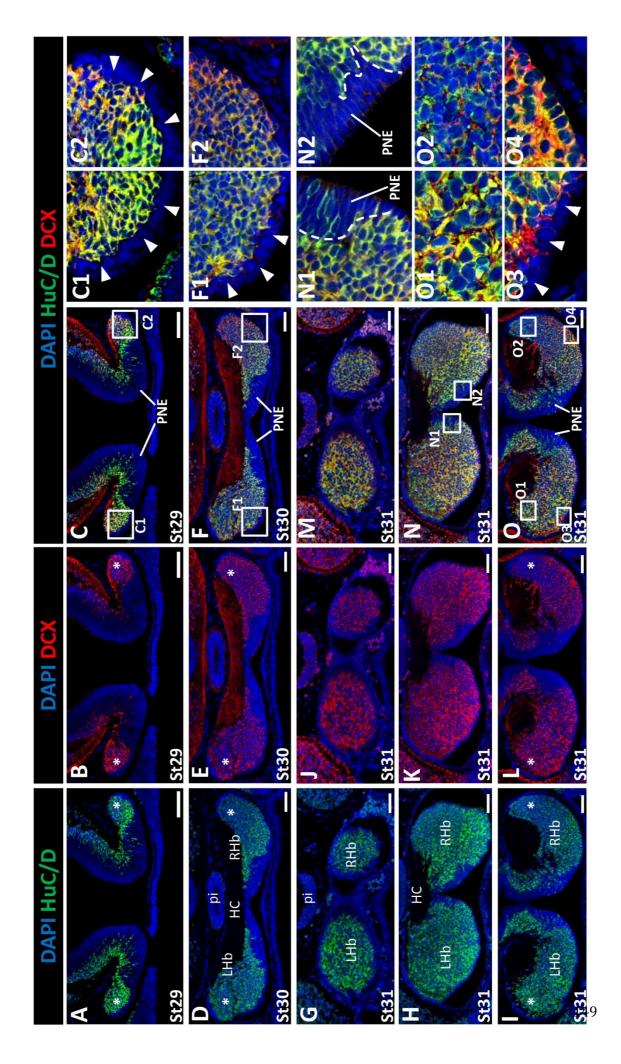
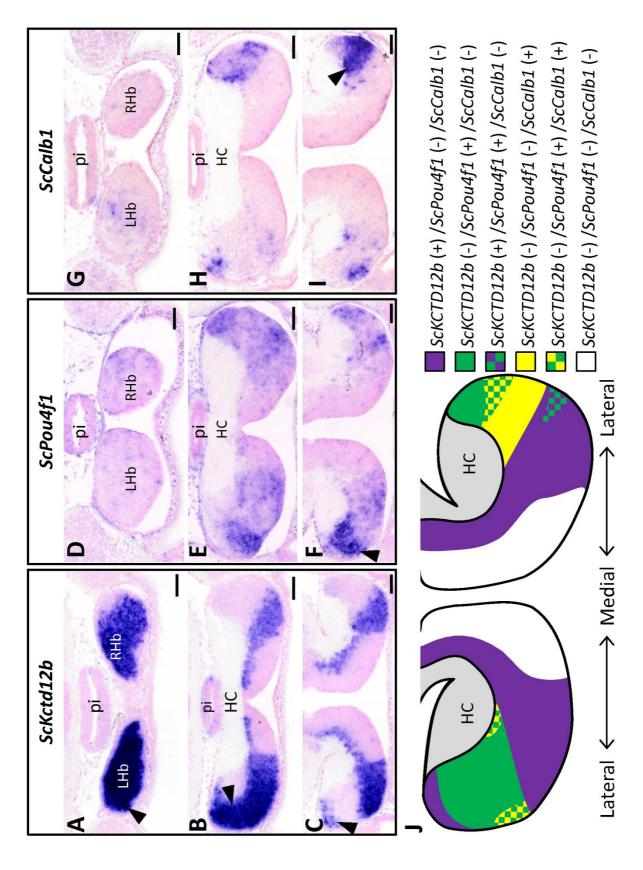
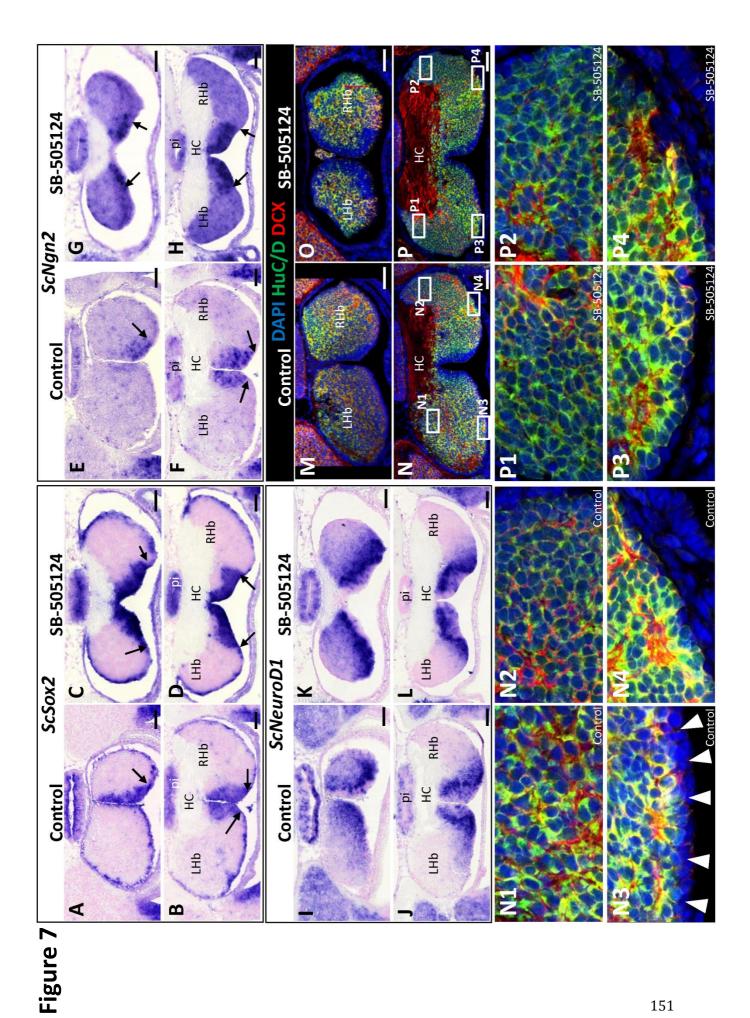


Figure 6





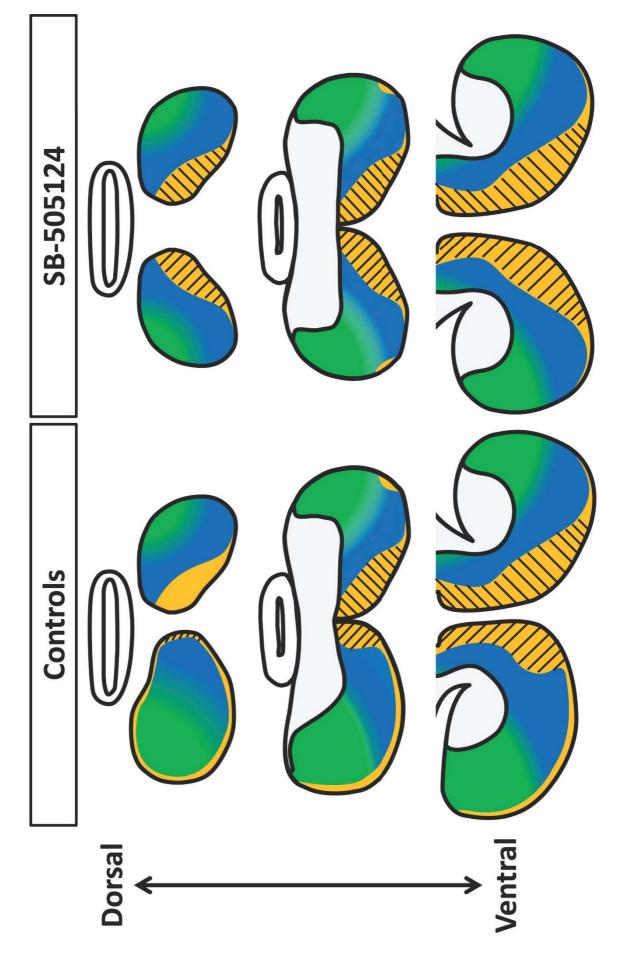
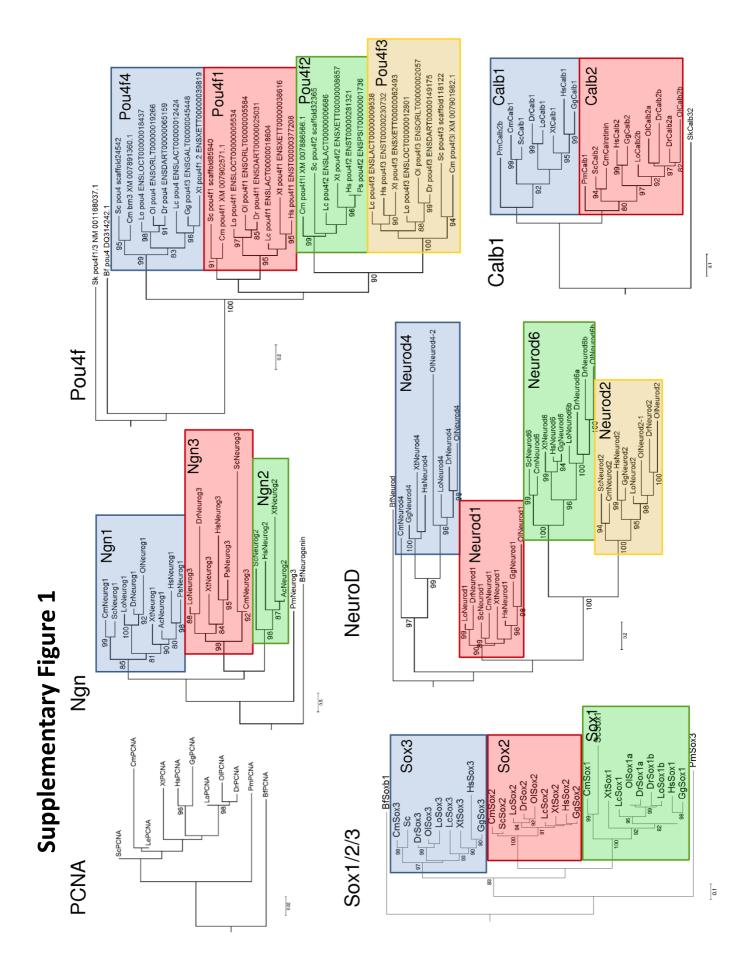
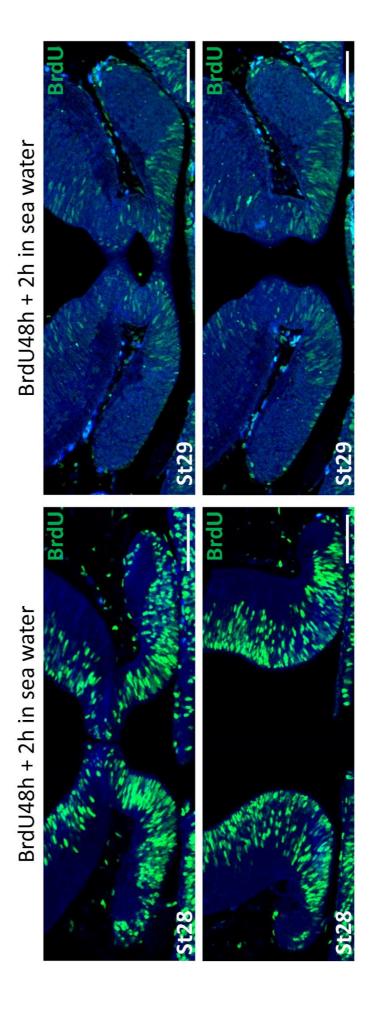
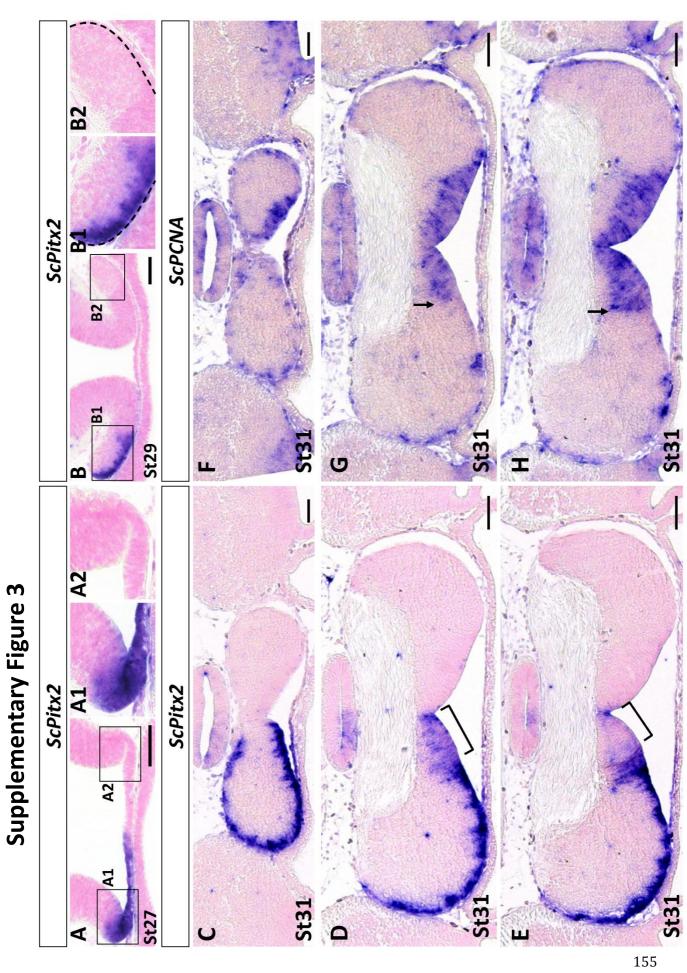


Figure 8







CHAPITRE III – Les asymétries de la neurogenèse dans les habenulæ de roussette : Résultats complémentaires

#### 1. Introduction

Les résultats présentés dans le chapitre 2 fournissent une description détaillée des patrons de prolifération-différenciation dans les habenulæ de roussette. Ces données suggèrent des similitudes entre les mécanismes cellulaires et moléculaires dépendant respectivement de la voie Nodal chez la roussette et de signaux encore non identifiés issus de la parapinéale chez le poisson-zèbre. Le chapitre 3, ci-après, est également centré sur la formation des habenulæ de roussette et fournit une série de résultats complémentaires concernant les trois aspects suivants :

- (1) la régulation temporelle du devenir, au stade 31, des cellules sortant des cycles mitotiques aux stades précédents. Dans le chapitre 2, nous avons proposé qu'entre les stades 29 et 31, la morphogenèse des habenulæ se fasse principalement selon un patron morphogénétique radial (Nguyen et al., 1999) qui, de fait, peut être corrélé à la régionalisation observée au stade 31. Les résultats présentés dans ce chapitre visent à évaluer cette hypothèse, par une étude directe du mode de construction des habenulæ à l'aide d'expériences d'incorporation de BrdU de type « pulse-chase ». Ces données confirment les hypothèses présentées dans le chapitre 2, notamment celle d'une régulation temporelle des devenirs cellulaires, différente entre les habenulæ gauche et droite. Une asymétrie des choix de destins cellulaires en fonction de la chronologie de leur sortie des cycles mitotiques a été bien décrite au cours de la formation des habenulæ chez le poisson-zèbre (cf. introduction §2.3.1 page 67) (Aizawa et al., 2007). Les données obtenues soutiennent l'hypothèse d'une régulation temporelle et asymétrique des choix de différenciation.
- (2) *la chronologie du début de la neurogenèse dans les habenulæ de roussette.* Les résultats présentés dans le chapitre 2 sont essentiellement centrés sur les stades 29 à 31. Ces derniers paraissaient en effet particulièrement pertinents, les premières asymétries cellulaires devenant visibles au stade 31. Ils conduisent cependant à la conclusion que la neurogenèse est déjà engagée au stade 29, ce qui pose la question de la chronologie d'initiation de ce processus. Il

s'agit d'un point important dans les comparaisons avec le poisson-zèbre. En effet, l'initiation de la neurogenèse est asymétrique et restreinte au côté gauche chez cette espèce (cf. introduction §2.2.2. page 64) (Roussigné *et al.*, 2009). Il s'agit de la seule asymétrie dépendante de la voie Nodal chez cette espèce. Nous retrouvons une situation très similaire chez la roussette, même si la dépendance de l'asymétrie précoce observée vis-à-vis de l'activité Nodal reste à confirmer.

(3) la régionalisation des habenulæ au stade 32. Une description moléculaire détaillée des habenulæ est intéressante au stade 31 puisque l'organisation observée à ce stade est assez facile à mettre en rapport avec le mode de construction de l'organe au cours de la neurogenèse. Il est cependant important d'obtenir une description de l'organisation moléculaire des habenulæ à des stades plus tardifs, chez le juvénile ou l'adulte chez lesquels la structure est fonctionnelle. De fait, la partition moléculaire des habenulæ en territoires caractérisés par des phénotypes neuronaux spécifiques, apparait assez différente chez le poisson-zèbre entre les stades larvaires et adultes et cette dynamique doit être prise en compte dans les comparaisons entre organismes modèles. Je présente ici des résultats préliminaires obtenus au stade 32. Ils montrent que la zone médiane de prolifération devient très restreinte à ce stade et mettent en évidence une régionalisation fortement asymétrique et assez différente de celle observée au stade 31.

Ces trois aspects étant assez différents et relativement préliminaires, ils sont brièvement discutés dans ce qui suit, indépendamment les uns des autres, et directement à la suite des résultats.

#### 2. Résultats et discussion

#### 2.1. Asymétries précoces de la neurogenèse

Analyse de la localisation au stade 31 des cellules sorties des cycles mitotiques aux stades 28, 29 et 30.

Afin d'évaluer le mode de construction des habenulæ et la possibilité d'une régulation temporelle des choix de différenciation neuronale, nous avons engagé une étude du devenir au stade 31 des cellules en division aux stades 28, 29 et 30. Les résultats obtenus sont présentés en figure 43. On observe une distribution des cellules marquées différente en fonction du stade auquel l'incorporation de BrdU a eu lieu. D'une façon générale, les cellules marquées aux stades les plus tardifs (29 à 30) sont observées dans des territoires plus restreints à la région médiane des habenulæ que celles marquées à des stades plus précoces (28 à 29), qui se retrouvent en position plus latérale (comparer Figure 43 C, J et Q; D, K et R; F, M et T). Dans ces expériences, certaines régions qui expriment des marqueurs de différenciation neuronale au stade 31 (HuC/D et DCX d'après les résultats obtenus au chapitre 2) ne présentent pas de cellules positives pour le BrdU, que ce soit en cas d'incorporation pendant les stades 28, 29 ou 30. Ces régions se situent dans les territoires les plus latéraux des habenulæ droite et gauche (voir astérisques en figure 43 C-F). En ce qui concerne les asymétries, on en note une dans la densité des cellules sorties des cycles mitotiques au stade 28, au niveau de territoires latéraux. La densité de cellules qui ont incorporé le BrdU à ce stade est plus forte dans l'habénula droite que la gauche (flèches en figure 43 C, D, E).

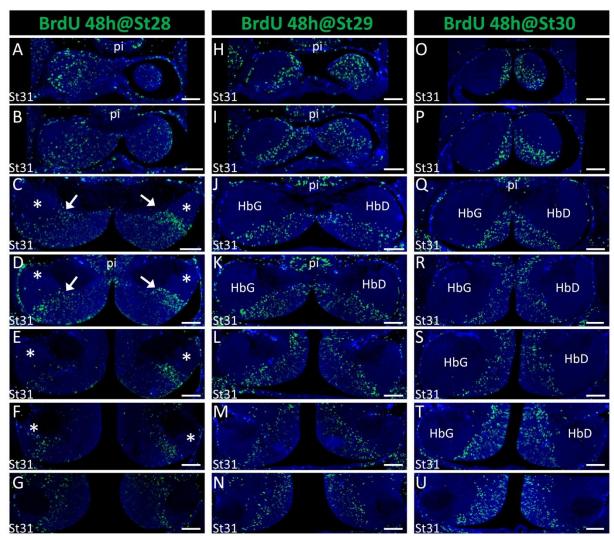
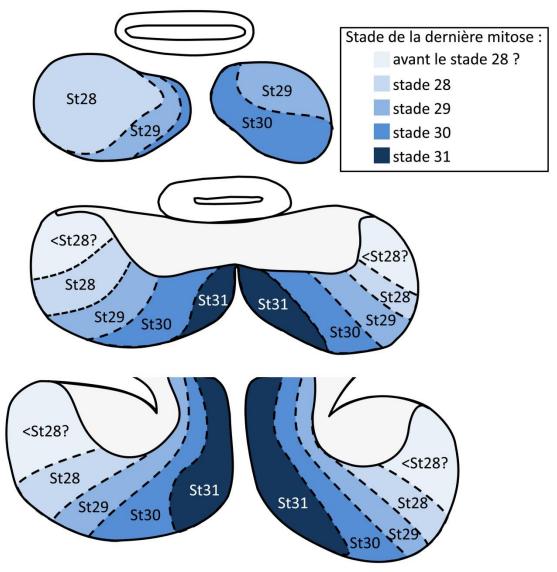


Figure 43 : Asymétries des sorties de cycles mitotiques dans les habenulæ entre les stades 28 et 31. (A-I) coupes transverses des habenulæ d'embryons de roussette au stade 31 après marquage par immunohistochimie fluorescente du BrdU incorporé aux stades 28 (A-G), 29 (H-N) et 30 (O-U). Dans tous les cas, les embryons ont été incubés dans de l'eau de mer filtrée en présence de BrdU à 1 g/L pendant 48 heures aux stades indiqués puis incubés jusqu'au stade 31 dans de l'eau de mer filtrée. Les coupes de A à G, de H à N et de O à U montrent des coupes à différents niveaux de l'axe dorso-ventral, du plus dorsal (A, H, O) au plus ventral (G, N, U). Les astérisques (\*) indiquent les territoires dont les cellules n'ont pas incorporées de BrdU que ce soit au stades 28, 29 ou 30. Les flèches indiquent les différences dans la densité de cellules positives pour le BrdU au stade 28. HbD, habénula droite ; HbG, habénula gauche ; pi, pinéale. Échelle : 100 μm

Ces analyses restent préliminaires mais valident cependant le mode de morphogenèse, des régions latérales vers les régions médianes, proposé au chapitre 2. Elles soutiennent également l'hypothèse selon laquelle les neurones sont localisés à des positions d'autant plus latérales que leur date de naissance est ancienne. La superposition des territoires marqués au BrdU à la régionalisation décrite au chapitre 2 (voir Figures 5 et 6 du chapitre 2) suggère que les choix de

différenciation neuronale sont régulés en fonction du temps et différemment entre les habenulæ gauche et droite. Par ailleurs, on voit que la région la plus dorsale des habenulæ (positive pour ScKctd12b à gauche mais sans territoire dorsal équivalent à droite ; cf. chapitre 1) est colonisée par des cellules qui sortent des cycles mitotiques au stade 28 à gauche mais seulement au stade 29 à droite (Figure 43 A et H). Ces analyses doivent cependant être précisées et complétées. Tout d'abord, des marquages doubles permettant la détection, sur la même coupe, des cellules ayant incorporé le BrdU à un stade donné avec le territoire d'expression de marqueurs de neurones différenciés (et possiblement de sous-domaines habénulaires) ScKctd12a, ScKctd12b, ScPou4f1 et ScCalb1 par hybridation in situ fluorescente, permettraient d'affiner considérablement les chronologies des choix de différenciation neuronale. Cette technique est en cours de mise au point dans le laboratoire avec A. Boutet. Par ailleurs, des comptages du nombre global de cellules sortant des cycles mitotiques à chaque stade restent à effectuer afin d'évaluer et de confirmer l'éventuelle asymétrie de la neurogenèse observée, comme c'est le cas chez le poissonzèbre (Aizawa et al., 2007). Enfin, ce type d'expérience devra être étendu à des stades plus précoces en ce qui concerne les fenêtres d'incorporation du BrdU et le maintien en eau de mer après l'incorporation prolongée jusqu'à des stades plus tardifs pour déterminer la localisation finale des cellules marquées. En effet, en accord avec l'existence de territoires différenciés et néanmoins négatifs pour l'incorporation de BrdU, la neurogenèse débute avant le stade 28 chez la roussette (voir schéma bilan Figure 44 ; cf. §2.2 ci-dessous). Par ailleurs, la régionalisation des habenulæ apparait très dynamique entre les stades 31 et 32 (cf. §2.3 ci-dessous) et de connaitre la localisation finale, dans l'habénula fonctionnelle, des neurones en fonction de leur chronologie de sortie des cycles mitotiques est une information importante pour les comparaisons entre espèces.



**Figure 44:** La localisation des cellules des habenulæ en fonction de la période de leur dernière mitose. Schéma montrant la localisation approximative des cellules formant les habenulæ gauche et droite au stade 31 en fonction du stade auquel s'est produit leur dernière mitose. À ce stade, la régionalisation des habenulæ, telle qu'inférée sur la base de l'étude des marqueurs *ScKct12b*, *ScKct12a*, *ScPou4f1* et *ScCalb1* met en évidence un patron qui suggère une relation entre la chronologie de sortie des cycles mitotiques et le phénotype neuronal observé au stade 31. Cette hypothèse doit cependant être vérifiée par marquage double permettant de comparer directement sur la même coupe la localisation des territoires exprimant ces marqueurs et celle des cellules ayant incorporé du BrdU.

# 2.2. Mise en évidence d'une asymétrie précoce de la neurogenèse chez la roussette

Les analyses présentées au chapitre 2 montrent que dès le stade 29, les habenulæ gauche et droite expriment les marqueurs de différenciation neuronale DCX (Doublecortin) et HuC/D au niveau d'un territoire latéral (voir Figures 5 du chapitre 2). Aucune asymétrie claire n'est

observée à ce stade. Les incorporations de BrdU effectués à partir du stade 28 (cf. §2.1 ci-dessus) montre également un territoire latéral qui reste négatif dans chacune des deux habenulæ. Ces données suggèrent donc que la neurogenèse débute à des stades plus précoces (<St28). Afin de préciser le stade d'initiation de la neurogenèse, nous avons analysé la distribution des marqueurs de différenciation neuronale HuC/D et DCX du stade 24 jusqu'au stade 27.

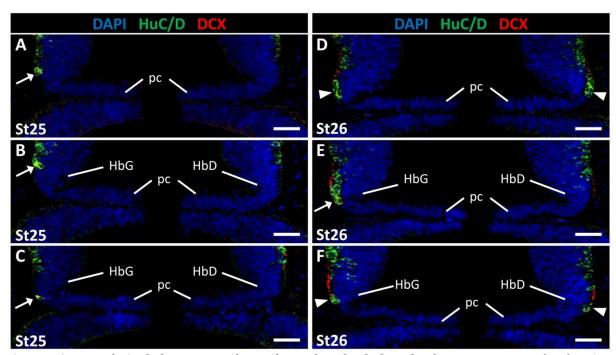


Figure 45 : Asymétrie de la neurogenèse précoce dans les habenulæ de roussette. Les planches A-F montrent des coupes transverses des habenulæ de roussette aux stades 25 (A-C) et 26 (D-F), après immunohistochimie fluorescente à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines HuC/D (en vert) et DCX (Doublecortin) (en rouge). Les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu). Les images vont de la partie la plus dorsale de l'habénula (A, D) vers la plus ventrale (C, F). Les flèches pointent un marquage asymétrique entre les habenulæ gauche et droite (A-C ; E). Les têtes de flèches pointent un marquage symétrique entre les deux habenulæ (D, F). HbD, habénula droite ; HbG, habénula gauche ; pc, plexus choroïdien. Échelle :  $100~\mu m$ 

Aucun marquage n'est observé au stade 24 (non montré). En revanche, on observe sur quelques coupes au stade 25 une à deux cellules marquées pour HuC/D et DCX à gauche, au niveau de l'évagination, la première indication de l'individualisation des habenulæ (Figure 45 A-C) alors qu'un tel marquage n'est jamais observé à droite. Au stade 26, par contre, un marquage HuC/D et DCX devient visible des deux côtés, gauche et droit, au niveau de ces évaginations (Figure 45 D-F). Il apparait très similaire entre la droite et la gauche dans les régions les plus dorsales et ventrales (Figure 45 D, F) mais le territoire marqué apparait beaucoup plus étendu à

gauche à un niveau de coupe intermédiaire (Figure 45 E). En effet, le territoire positif pour HuC/D et DCX s'étend continuellement de la partie la plus dorsale à la plus ventrale de l'habénula gauche alors qu'aucun marquage n'est observé dans la partie intermédiaire de l'habénula droite, selon l'axe dorso-ventral (Figure 45 D-F). Cependant, cette asymétrie apparait comme transitoire. Bien qu'au stade 27, le marquage HuC/D et DCX soit un peu plus étendu dans l'habénula gauche (Figure 46 C), aucune différence claire n'est observée aux stades 29 à 30 (voir chapitre 2).

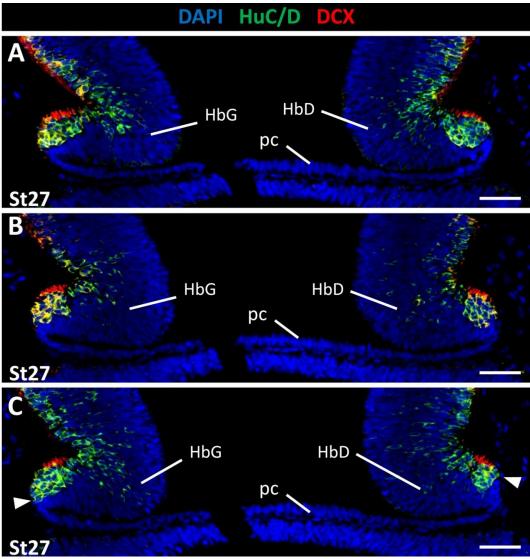


Figure 46: Asymétrie de la neurogenèse précoce dans les habenulæ au stade 27. (A-C) coupes transverses des habenulæ de roussette aux stades 27, après immunohistochimie fluorescente à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines HuC/D (en vert) et DCX (rouge). Les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu). La partie la plus dorsale de l'habénula se situe en haut(A) et la plus ventrale en bas (C). Les têtes de flèches pointent un marquage asymétrique entre les habenulæ gauche et droite (C). HbD, habénula droite ; HbG, habénula gauche ; pc, plexus choroïdien. Échelle :  $100~\mu m$ 

Ces données indiquent donc que comme chez le poisson-zèbre (Roussigné *et al.*, 2009), la neurogenèse chez la roussette présente une asymétrie dans sa chronologie d'initiation qui débute à gauche. Cette similitude est en accord avec l'hypothèse selon laquelle la neurogenèse asymétrique précoce observée chez le poisson-zèbre pourrait être un vestige du mécanisme contrôlant les asymétries et dépendant de la voie Nodal chez l'ancêtre hypothétique commun des vertébrés (cf. chapitre 1). Chez le poisson-zèbre, cette différence est, en effet, dépendante de la voie Nodal (Roussigné *et al.*, 2009) et par ailleurs, elle apparait avoir peu d'impact sur l'élaboration des asymétries habénulaires plus tardives qui sont, elles, largement indépendantes de la voie Nodal (Concha *et al.*, 2000). Ces deux points doivent encore être évalués chez la roussette par : (1) une analyse par perte de fonction de la voie Nodal, telle que décrite au chapitre 1 et (2) une analyse du devenir des cellules qui sortent des cycles mitotiques aux stades 25-27. Celles-ci pourraient notamment se retrouver dans les territoires latéraux, dont les cellules n'ont pas incorporé de BrdU entre les stades 28 et 30 mentionnés précédemment (cf. §2.1 ci-dessus) et où *ScKctd12b* est sélectivement exprimé à gauche.

Chez la roussette, un autre aspect inattendu de ces données est l'absence d'asymétries neurogénétiques évidentes aux stades 29-30, alors que celles-ci deviennent très marquées au stade 31. Cela pose la question de l'existence d'un mécanisme d'amplification des asymétries, qui interviendrait donc à partir du stade 30. Cette question reste totalement ouverte aujourd'hui. Toutefois, la voie de signalisation Sonic Hedgehog pourrait être impliquée dans un tel processus. Nous avons en effet détecté une expression asymétrique droite du gène *ScShh*, qui débute précisément au stade 29, dans la région latérale différenciée à ce stade et reste indétectable à gauche (Figure 47 A-C). Cette expression régionalisée de *Shh* dans l'habénula droite est encore détectée au stade 31 (Figure 47 D-E) et elle devient bilatérale en cas de perte de fonction de la voie Nodal par injection de SB-505124 (Figure 47 G et H). Dans la rétine embryonnaire, cette voie est exprimée dans les cellules ganglionnaires nouvellement différenciées et elle a des effets différents selon les espèces : chez le poisson-zèbre, elle accélère la différenciation des cellules progénitrices de la zone marginale ciliaire adjacente alors qu'elle agit comme un facteur

mitogène des progéniteurs de la rétine chez les amniotes (Amato *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2005). Dans les habenulæ de roussette, le territoire d'expression de *ScShh* est adjacent à la zone ventriculaire latérale, qui exprime des marqueurs de progéniteurs neuraux de façon bilatérale jusqu'au stade 30. Les données décrites dans le chapitre 2 suggèrent que ces cellules pourraient sortir des cycles mitotiques plus rapidement à gauche qu'à droite et ce processus pourrait impliquer un rôle de *ScShh*.

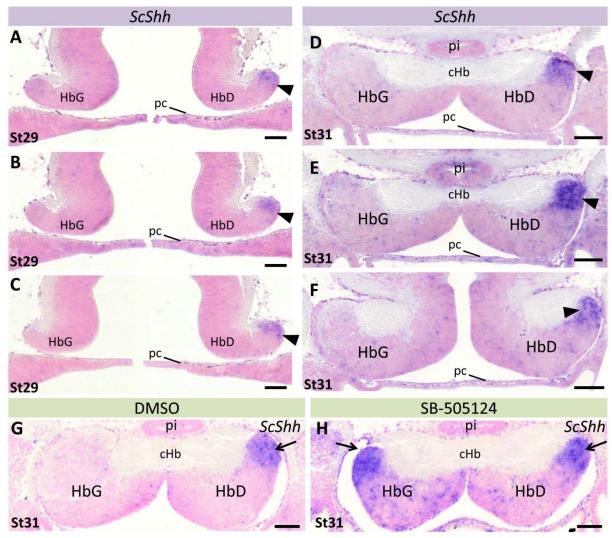
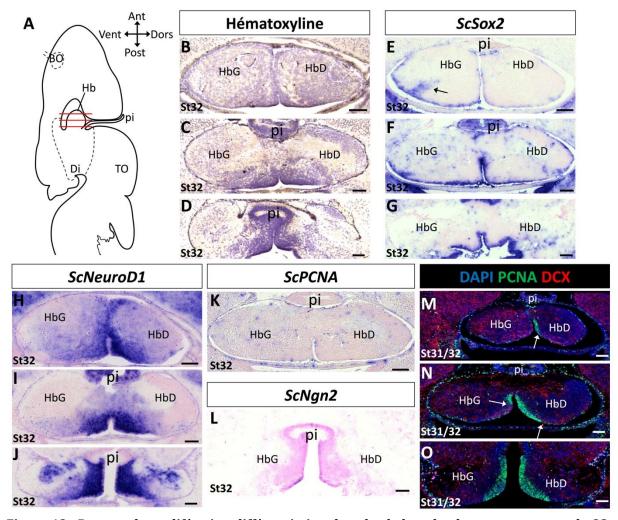


Figure 47: Expression asymétrique de *Shh* dépendante de Nodal dans les habenulæ de roussette. (A-C) coupes transverses des habenulæ de roussette aux stades 29 montrant une expression asymétrique de *ScShh* dans la partie la plus latérale de l'habénula droite. Cette expression se prolonge au stade 31 (D-F). Les parties les plus dorsales des l'habenulæ se situent en haut (A, D) et les plus ventrales en bas (C, F). (G-H) effet d'un traitement au SB-505124 sur l'expression de *ScShh* au stade 31 (H) par rapport à un embryon contrôle (G). Les têtes de flèches pointent le marquage asymétrique de *ScShh* (A-F). Les flèches pointent l'expression asymétrique de *ScShh* chez un embryon contrôle et l'expression bilatérale de *ScShh* chez un embryon traité au SB-505124. cHb, commissure habénulaire; HbD, habénula droite; HbG, habénula gauche; pc, plexus choroïdien; pi, pinéale. Échelle: 100 μm

#### 2.3. Caractérisation moléculaire des habenulæ de roussette au stade 32

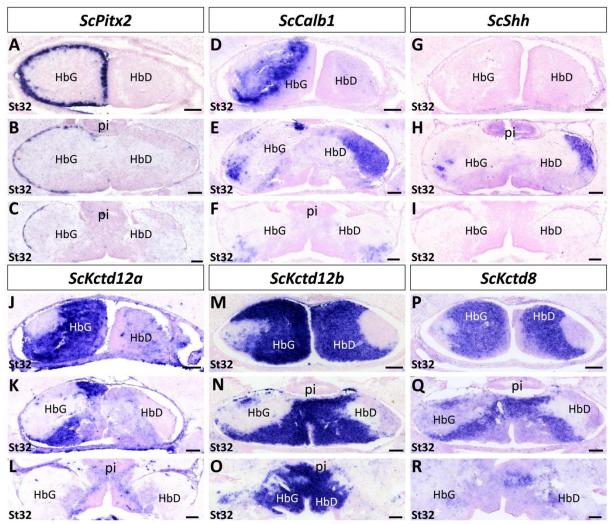
Comme on l'a vu précédemment, la régionalisation des habenulæ au stade 31 présente une organisation fortement asymétrique le long d'un axe médio-latéral, et celle-ci peut être assez aisément corrélée au mode de construction de l'organe. Nous avons engagé une étude de cette organisation aux stades ultérieurs et les résultats préliminaires présentés ci-dessous révèlent un patron dynamique. Au stade 32, l'allongement du rostre s'accompagne d'une réorganisation du télencéphale qui modifie l'orientation des habenulæ. À ce stade, la partie qui était la plus dorsale au stade 31 devient la plus antérieure (Figure 48 A). Au cours de ce travail sur le stade 32, nous avons donc utilisé un plan de coupe orienté selon l'axe antéro-postérieur, afin de faciliter les comparaisons avec les données obtenues au stade 31.

Tout d'abord, l'analyse histologique montre qu'un neuroépithélium pseudo-stratifié subsiste encore à ce stade bien que son épaisseur soit fortement réduite par rapport aux stades précédents. Son expansion reste plus importante à droite qu'à gauche dans la région la plus antérieure (Figure 48 B), les asymétries en taille de ce tissu devenant indétectables dans les régions plus postérieures (Figure 48 C, D). La différence dans les densités cellulaires entre la gauche et la droite est très marquée à ce stade, avec une densité plus faible à gauche, sauf dans les régions médio-ventrales, notamment au niveau du neuroépithélium pseudo-stratifié. L'expression de l'ARN messager codant pour le PCNA disparait (Figure 48 K), de même que celle de la neurogénine 2 (ScNgn2) (Figure 48 L). La présence de la protéine PCNA reste à évaluer au stade 32 puisqu'à un stade intermédiaire 31/32, celle-ci est détectée dans le neuroépithélium pseudo-stratifié de taille fortement réduite à gauche (flèches blanches figure 48 M-O). L'expression de ScSox2 est plus faible à ce stade dans une population cellulaire ventriculaire très réduite, au niveau du neuroépithélium pseudo-stratifié, mais elle subsiste dans les zones ventriculaires plus latérales avec, comme au stade 30, une expression préférentielle à gauche (Figure 48 E-G). Un nouveau territoire d'expression interne apparait par ailleurs dans la région antérieure de l'habénula gauche (flèche noire figure 48 E). L'ensemble de ces données suggère une diminution de la neurogenèse qui a lieu au niveau de l'épithélium pseudo-stratifié. Des analyses à des stades ultérieurs devront être effectuées pour déterminer précisément quand celle-ci prend fin.



**Figure 48 : Patrons de prolifération-différenciation dans les habenulæ de roussette au stade 32.** (A) Schéma montrant une section parasagittale du cerveau de roussette au stade 32, avec en rouge, les plans et niveaux des coupes dans les habenulæ présentés en (B-O). (B-L) Coupes transverses des habenulæ de roussette au stade 32 après coloration histologique à l'hématoxyline (B-D) ou après hybridation in situ avec des sondes *ScSox2* (E-G), *ScNeuroD1* (H-J), *ScPCNA* (K) et *ScNgn2* (L). (M-O) coupes transversales des habenulæ de roussette à un stade 31/32 après une immunohistochimie dirigée contre le PCNA (en vert) et DCX (en rouge). Les noyaux sont marqués au DAPI (en bleu). Dans le cas de (B-D), (E-G), (H-J) et (M-N) les coupes sont orientées de haut en bas des plus antérieures (B, E, H et M) aux plus postérieures (D, G, J et O). La flèche noire montre un territoire supplémentaire exprimant *ScSox2* (E). Les flèches blanches montrent une asymétrie dans la taille du neuroépithélium pseudo-stratifié (M-O). BO, bulbe olfactif; Di, diencéphale; HbG, Habénula gauche; HbD, habénula droite; pi, pinéale; TO, toit optique. Échelle : 100 μm

La régionalisation moléculaire des habenulæ met en évidence un patron assez différent de celui observé au stade 31. L'expression du gène ScPitx2 subsiste, exclusivement à gauche comme précédemment, dans les territoires ventriculaires (non pseudo-stratifiés) mais disparait du neuroépithélium pseudo-stratifié qui subsiste ventralement (Figure 49 B-C). L'expression de ScCalb1, prédominante dans une région latérale à droite au stade 31, persiste à ce niveau mais présente un domaine additionnel majeur, dans la région antérieure gauche (Figure 49 D-E). ScShh reste également exprimé dans une région latérale de l'habénula droite superposable au territoire positif pour ScCalb1 mais également dans un domaine antérieur de l'habénula gauche (Figure 49 H). Celle de ScKctd12a présente comme précédemment un territoire d'expression majeur restreint à l'habénula antérieure gauche (Figure 49 J-K). L'expression de ScKctd12b est, comme au stade 31, majoritairement bilatérale mais avec un territoire d'expression asymétrique qui est plus étendu à gauche dans la partie antérieure et dorsale (Figure 49 M) et à droite dans une région intermédiaire le long de l'axe antéro-postérieur (Figure 49 N). Un territoire négatif localisé latéralement subsiste également à ce stade (Figure 49 M-N). Le territoire d'expression de ScKctd8 est inclus dans celui de ScKctd12b mais avec une moindre expression au niveau ventriculaire à un niveau de coupe intermédiaire (Figure 49 Q) et dans toute l'habénula à un niveau de coupe plus postérieur (Figure 49 R). Dans le cas de ScKctd12b et ScKctd8, ces territoires sont assez comparables à ceux caractérisés chez l'adulte (cf. chapitre 1) même si le domaine négatif pour leur expression semble occuper une proportion relative plus importante dans l'organe adulte qu'au stade 32. On observe également un territoire latéral à droite qui exprime ScCalb1 et ScShh mais qui est négatif pour les trois paralogues ScKctd8, 12a et 12b. En résumé, la comparaison de la régionalisation moléculaire des habenulæ aux stades 31 et 32 évoque un réarrangement assez important de leur morphologie. Il sera important d'étendre cette caractérisation à des stades ultérieurs et d'autres marqueurs de phénotype neuronal (tels que *ScPou4f1*). Cette analyse fournira également une référence pour la recherche de corrélations entre les phénotypes neuronaux observés et les dates de naissance des neurones correspondants.



**Figure 49 : Régionalisation des habenulæ de roussette au stade 32.** (A-R) Coupes transverses des habenulæ de roussette au stade 32 après hybridation in situ avec des sondes *ScPitx2* (A-C), *ScCalb1* (D-F) , *ScShh* (G-I), *ScKctd12a* (J-L), *ScKctd12b* (M-O) et *ScKctd8* (P-R). Les coupes sont orientées de haut en bas des plus antérieures (A, D, G, J, M et P) aux plus postérieures (C, F, I, L, O et P) comme présentées figure 48. HbG, Habénula gauche ; HbD, habénula droite; pi, pinéale. Échelle : 100 μm

#### 3. Conclusion

Ces données démontrent une nouvelle asymétrie de la neurogenèse (neurogenèse précoce observée à gauche), qui rappelle celle observée chez le poisson-zèbre (Roussigné *et al.*, 2009). Elles mettent également en évidence un remodelage assez important du patron moléculaire des habenulæ entre les stades 31 et 32. Ces données soulignent l'importance d'étendre la

caractérisation spatio-temporelle de la neurogenèse et l'étude de la chronologie des choix de différenciation neuronale à une fenêtre de développement allant du début de la neurogenèse (stade 25-26) jusqu'à sa fin (au stade 32). Une telle analyse est essentielle pour pouvoir faire le bilan des similitudes avec le poisson-zèbre, qui présente un mode de développement très différent de par la rapidité des processus et la taille des organes étudiés.

# DISCUSSION GÉNÉRALE

# 1. Intérêt d'une étude des asymétries épithalamiques chez la roussette et la lamproie

Cette étude, centrée sur deux modèles vertébrés non conventionnels, fournit les premières données mécanistiques sur la formation des asymétries épithalamiques chez un autre organisme que le poisson-zèbre. Elle ouvre de nouvelles perspectives à la fois sur des aspects évolutifs et mécanistiques. Les apports principaux, ainsi que ces perspectives, sont détaillés ci-dessous.

#### 1.1. Apports en termes évolutifs

Quel rôle ancestral pour la parapinéale : une remise en perspective des mécanismes décrits chez le poisson-zèbre.

L'épithalamus est une structure du cerveau fondamentalement asymétrique chez la plupart des vertébrés. Les connaissances accumulées chez le poisson-zèbre ont mis en évidence un rôle crucial de la parapinéale, dans la formation des asymétries habénulaires. La migration de cette structure, elle-même latéralisée, est biaisée par une expression ipsilatérale de la voie Nodal, cette dernière n'étant cependant pas indispensable à la formation des asymétries épithalamiques. Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent que ce mécanisme n'est pas partagé par tous les vertébrés, apportant ainsi un nouvel éclairage sur l'évolution des mécanismes de formation des asymétries cérébrales. Ainsi, contrairement à la situation observée chez le poisson-zèbre, la voie Nodal joue un rôle crucial chez la lamproie et chez la roussette. De fait, nous n'obtenons aucune indication de l'existence, même transitoire, d'un organe dérivé du champ pinéal et susceptible de jouer un rôle comparable à celui de la parapinéale chez le poisson-zèbre. Cette observation pose la question de l'homologie de cet organe chez les vertébrés le possédant. Une telle structure est présente chez la lamproie mais pas chez la myxine ni chez les chondrichthyens. Parmi les ostéichthyens, on la retrouve principalement chez les actinoptérygiens, le poisson-castor (Amia calva, amiiformes) et les téléostéens ainsi que chez certains sarcoptérygiens comme le cœlacanthe Latimeria chalumnae et les lézards mais n'a pas été observée chez les amphibiens, les oiseaux ou les mammifères (Concha & Wilson, 2001). Le rôle démontré de la parapinéale chez le poisson-zèbre pourrait donc être un caractère dérivé spécifique des téléostéens. Aucune corrélation claire ne peut ainsi être établie entre la présence d'une parapinéale et celle d'asymétries au niveau des habenulæ. On retrouve des espèces sans parapinéale et asymétriques à ce niveau (myxines, chondrichthyens et poulet) et des espèces sans parapinéale et symétriques (mammifères) (Gurusinghe & Ehrlich, 1985; Nieuwenhuys *et al.*, 1998; Concha & Wilson, 2001; Butler & Hodos, 2005). Par ailleurs, nous avons vu que la lamproie possédait une parapinéale et était dotée d'asymétries épithalamiques marquées. Cependant, une implication de la parapinéale dans la formation de ces dernières, au moins aux stades les plus précoces, n'est pas soutenue par les données actuellement disponibles. L'hypothèse la plus parcimonieuse est que le rôle prépondérant de la parapinéale observé chez les téléostéens correspond à un état dérivé chez les vertébrés et qu'il pourrait constituer une synapomorphie des téléostéens.

#### Une latéralité des asymétries épithalamiques conservée à l'échelle des vertébrés.

En 2001, Concha & Wilson ont proposé que l'asymétrie dirigée vers la gauche (habénula gauche de taille plus importante que la droite) corresponde à un état apomorphe par rapport à l'asymétrie dirigée vers la droite (Concha & Wilson, 2001). Cette hypothèse était basée sur la distribution phylogénétique des latéralisations de l'épithalamus soit vers la droite (myxines, lamproies, actinoptérygiens non téléostéens), soit vers la gauche (amphibiens, chondrichthyens) soit en son absence (mammifères, oiseaux) et en prenant en compte la position phylogénétique traditionnellement admise pour les myxines en tant que groupe frère des vertébrés. La monophylie des cyclostomes (lamproies et myxines) aujourd'hui généralement admise invalide cependant cette hypothèse et ne permet plus de déterminer la directionnalité de l'asymétrie de l'ancêtre hypothétique commun des vertébrés. Dans ce contexte la lamproie et la roussette se révèlent comme des espèces clés pour comprendre l'évolution de ce caractère. Ces deux espèces ont des latéralités habénulaires inversées en termes de tailles. Néanmoins, nous avons montré

que l'expression asymétrique de la voie Nodal, nécessaire à la formation de ces asymétries, est toujours observée du même côté, le gauche. Ce travail montre donc un découplage entre l'expression asymétrique de la voie Nodal et le développement morphologique de l'asymétrie en aval. La différence dans la direction de l'asymétrie en taille observée entre les lamproies, les chondrichthyens et actinoptérygiens ne provient donc pas d'une inversion totale de la latéralité entre les espèces.

#### De nouvelles hypothèses évolutives et une remise en perspective de la notion de modèle.

L'ensemble de ces données permet de préciser l'état ancestral des mécanismes contrôlant la formation des asymétries épithalamiques et il conduit à émettre de nouvelles hypothèses quant à leur l'évolution:

- (1) l'ancêtre hypothétique commun des vertébrés possédait un épithalamus asymétrique avec une des deux habenulæ de taille plus importante (gauche ou droite). La directionnalité de cette asymétrie était un caractère robuste à l'échelle de l'espèce, puisque partagée par tous les individus.
- (2) l'établissement de ces asymétries était contrôlé par une expression unilatérale de la voie Nodal, dans le diencéphale dorsal gauche. Les mécanismes contrôlant la taille de l'organe en aval de Nodal apparaissent caractérisés par une évolvabilité importante, puisqu'ils ont permis des inversions de la latéralité (au niveau morphologique) au cours de l'évolution des différents taxa de vertébrés et peut être même à des pertes des asymétries en tailles dans certains cas.
- (3) le rôle de la parapinéale décrit chez le poisson-zèbre dans l'établissement des asymétries est le résultat d'une innovation, dont le degré reste à évaluer par rapport au rôle ancestralement tenu par la voie Nodal. La conservation de ce rôle de la parapinéale chez le médaka suggère que ce mécanisme pourrait être une synapomorphie des téléostéens.

Ce travail remet aussi en perspective la notion de modèle, selon l'angle d'étude que l'on adopte. Le poisson-zèbre est un modèle puissant et incontournable chez les vertébrés, notamment pour décrypter les mécanismes de formation des asymétries. Toutefois des hypothèses évolutives ne peuvent être fondées sur l'étude d'une seule espèce, comme le montre bien notre étude. Par ailleurs, il n'est pas exclu qu'en sélectionnant une espèce pour son développement embryonnaire rapide et la petitesse de sa taille, paramètres fondamentaux en génétique du développement, on sélectionne, par la même occasion, des adaptations liées à ces contraintes développementales, qui conduisent à des divergences par rapport aux mécanismes ancestraux, compliquant ainsi les inférences évolutives. Comme nous le montrons ici, l'étude d'autres modèles choisis sur des critères différents (tels que des critères évolutifs), bien que souvent plus difficilement manipulables en laboratoire, s'avèrent complémentaires et indispensables pour ce type d'études.

#### 1.2. Des apports en termes d'interprétation mécanistique

D'un point de vue mécanistique, l'implication de la voie Nodal dans la formation d'asymétries n'est pas une surprise en soi puisqu'elle a été décrite dans de nombreux autres contextes (Duboc *et al.*, 2005 ; Grande & Patel, 2009 ; Yoshida & Saiga, 2011 ; Watanabe *et al.*, 2014 ; Soukup *et al.*, 2015).Comme déjà rappelé ci-dessus, ce travail montre cependant, pour la première fois chez les vertébrés, le rôle prépondérant de cette voie dans la formation des asymétries épithalamiques. Il soulève par ailleurs de nouvelles questions quant aux mécanismes impliqués.

## Quelle base moléculaire pour le découplage entre les latéralités des asymétries moléculaires et celle de taille ?

Chez la lamproie et la roussette, les composants de la voie Nodal sont exprimés dans le diencéphale dorsal gauche mais cette latéralité d'expression n'est pas couplée à la latéralité

observée au niveau de la taille des habenulæ (plus grande à gauche chez la roussette mais à droite chez la lamproie). Au niveau de l'épithalamus, la voie Nodal semble donc avoir un effet opposé sur la taille des habenulæ chez ces deux espèces.

## Quel degré de conservation entre les programmes respectivement contrôlés par Nodal chez la lamproie et la roussette et par la parapinéale chez le poisson-zèbre ?

Le travail de caractérisation moléculaire entrepris chez la roussette apporte quelques pistes pour décrypter ce rôle notamment au niveau cellulaire. L'activité de *Pitx2* a été montrée comme dépendante du contexte cellulaire. L'isoforme Pitx2c est en effet capable de réguler la balance entre prolifération et différenciation en jouant sur l'activité des cyclines D1 et D2 dans les myoblastes (Martínez-Fernandez et al., 2006; Gherzi et al., 2010; Lozano-Velasco et al., 2015). Au niveau de l'habénula gauche de la roussette, la ségrégation spatiale mais aussi temporelle de Pitx2 est compatible avec une différence d'activité de Pitx2 puisque la perte de fonction de Nodal avec le SB-505124 a des effets opposés sur ces deux territoires. Ce type d'effets opposés de la voie Nodal est observé chez le poisson-zèbre au cours du développement de la parapinéale puisque que le nombre de cellules composant cette structure est en partie déterminée par la balance entre Nodal et Pitx2c (cf. introduction §2.2.2. page 64) (Garric et al., 2014). Au niveau des habenulæ de vertébrés, Pitx2c pourrait donc être un acteur majeur de la balance prolifération/différenciation, dont l'importance dans l'établissement des asymétries a déjà été montrée chez le poisson-zèbre (Aizawa et al., 2007). Il est intéressant de noter qu'une expression de Pitx2c est visible au niveau de l'habénula gauche du médaka (Jaszczyszyn et al., 2007) et compte tenu des similitudes dans les mécanismes de développement des asymétries habénulaires observées entre le poisson-zèbre et le médaka (Signore et al., 2009), il est possible qu'une telle expression de Pitx2c soit présente dans l'habénula gauche du poisson-zèbre. Des variations dans l'importance relative de ces mécanismes selon les espèces pourraient rendre compte du découplage observé

Si une différence mécanistique importante est démontrée par nos données (asymétries habénulaires contrôlées par la voie Nodal chez la lamproie et la roussette, et un signal encore non identifié issu de la parapinéale chez le poisson-zèbre), le degré de divergence entre les programmes génétiques impliqués reste une question ouverte. De fait, la voie Nodal induit une neurogenèse asymétrique précoce chez le poisson-zèbre, même si celle-ci joue au plus un rôle mineur dans l'établissement des asymétries habénulaires (Roussigné *et al.*, 2009). Par ailleurs, certains défauts subsistent chez le poisson-zèbre après ablation de la parapinéale (Concha *et al.*, 2003). Enfin, les données obtenues chez la roussette suggèrent l'implication d'asymétries de la neurogenèse et des choix de destins cellulaires comme c'est le cas chez le poisson-zèbre. Il est donc envisageable que les mêmes programmes génétiques puissent être retrouvés chez toutes ces espèces, en aval du contrôle exercé par la voie Nodal ou par la parapinéale. Cela impliquerait soit une moindre variabilité des programmes ancestraux, soit des processus de convergence du fait de contraintes développementales, environnementales ou comportementales encore non identifiées. Le décryptage de ces programmes, en aval de Nodal chez la roussette ou la lamproie et en aval de la parapinéale chez le poisson-zèbre sera crucial pour répondre à ces questions.

#### 2. Perspectives

#### 2.1. Nodal, au centre d'un programme génétique essentiel

Afin d'évaluer les degrés de conservation des programmes génétiques impliqués dans l'établissement des asymétries épithalamiques chez les vertébrés, il est essentiel de comparer ces programmes en aval de Nodal, chez la lamproie et la roussette, ou de la parapinéale chez le poisson-zèbre. Les asymétries de l'épithalamus constituent un système accessible et original pour étudier l'évolution de réseaux de gènes à l'échelle de la macroévolution chez les vertébrés. L'épithalamus est une structure présentant une grande variabilité morphologique chez les vertébrés dont l'homologie ne pose pas question et dont une divergence mécanistique a été bien

identifiée entre différents taxa. Les questions qui se posent dans le cas d'innovations morphologiques (p. ex. le cerveau embryonnaire présentant cinq subdivisions, les crêtes neurales, la mâchoire) qui impliquent des évolutions de réseaux de régulation géniques (GRN) sont complexes. L'évolution des GRN reste mal connue. Ces réseaux ont une organisation hiérarchique dont la sensibilité aux contraintes développementales et environnementales dépend de leur position dans le réseau. Les conséquences évolutives d'une modification de ce réseau vont dépendre du niveau auquel une fonction aura été affectée (Peter & Davidson, 2011; Ettensohn, 2013). L'implication de l'épithalamus dans des processus adaptatifs variés en fait un système intéressant pour l'étude de l'évolution de ces GRN. Dans ce système, la voie Nodal tient une place centrale en contrôlant l'activation de différents réseaux de gènes qui soit induisent l'expression du phénotype spécifique à l'habénula gauche, soit inhibent l'expression du phénotype spécifique à l'habénula droite chez la lamproie et la roussette. Chez les téléostéens, l'essentiel de ces programmes développementaux, contrôlés par la parapinéale, commencent à être caractérisés. L'exploitation des caractéristiques et de la complémentarité des deux modèles, lamproie et roussette, va permettre de mieux caractériser la conservation de ces réseaux de gènes et leur évolution.

#### 2.2. Stratégies expérimentales

#### Modalités de la neurogenèse chez la roussette et la lamproie

La description de la neurogenèse dans les habenulæ de la roussette est très avancée mais elle doit encore être complétée afin de mieux caractériser les différents taux de prolifération entre les différents territoires et entre les deux habenulæ (comptage de cellules positives pour la P-Histone H3 et le BrdU) (cf. chapitre 2 et 3). L'impact de cette neurogenèse asymétrique sur le devenir des cellules doit également être précisé par la révélation de l'expression des marqueurs de sous-territoires spécifiques (ISH) couplée à une IHC dirigé contre le BrdU.

La caractérisation des habenulæ de la lamproie reste à faire. Des expériences d'incorporation de BrdU à 1g/L ont également été menées chez l'espèce *Lampetra fluviatilis* et doivent être analysées. Ces incorporations ont été réalisées sur 24h aux stades 25, 26, 27, 28-29 et 30 pour être fixées au stade 30+ (Tahara, 1988), des fixations intermédiaires ont également été réalisées à chaque stade. Des patrons de différenciation pourront également être établis grâce à des IHC dirigés contre les protéines HuC/D et DCX. Ces données vont permettre de comparer les patterns de prolifération/différentiation habénulaires de la lamproie avec ceux de la roussette et du poisson-zèbre. Des caractérisations moléculaires et fonctionnelles des habenulæ de la lamproie déjà publiées (Pombal *et al.*, 2001 ; Auclair *et al.*, 2004 ; Stephenson-Jones *et al.*, 2012) vont permettre de déterminer si une corrélation existe entre la fonction des neurones et leur date de naissance.

Enfin, le rôle de la voie Notch sera étudié en fonction des possibilités d'inhibitions pharmacologiques qui doivent être testées (DAPT) chez la lamproie et la roussette.

#### **Approches transcriptomiques**

Les approches transcriptomiques permettent d'évaluer et comparer les répertoires génétiques exprimés par certaines populations cellulaires dans différentes conditions sans connaissances a priori. Elles sont particulièrement bien adaptées à l'étude des asymétries épithalamiques, via la comparaison entre les habenulæ droite ou gauche ou la recherche des gènes contrôlés par Nodal. Par ailleurs, la lenteur du développement et la taille relativement importante de l'épithalamus, notamment chez la roussette, est un avantage. Enfin de nouvelles approches (RNA tomographie) permettent d'ajouter une information spatiale à ces données. Ces approches ont été engagées. Une comparaison de transcriptome entre les habenulæ droite et gauche de roussette au stade 31 a déjà été réalisée sur plusieurs pools de tissus, sans qu'il soit nécessaire d'avoir recours à une étape d'amplification des ADNc. Les résultats sont en cours d'analyse, en collaboration avec B. Billoud (UMR 8227), mais les résultats préliminaires semblent valider le protocole utilisé. On retrouve notamment une expression asymétrique des

gènes précédemment étudiés par une approche de type gènes candidats (*ScPitx2*, *ScShh* et *ScKctd12b*). Ces approches seront étendues à d'autres stades embryonnaires chez la roussette. Chez la lamproie compte tenu de la petite taille du cerveau embryonnaire, nous chercherons à utiliser la technique de tomographie ARN (Junker *et al.*, 2014). Cette technique qui se base sur le séquençage à haut débit des ARN totaux de coupes, réalisées au cryostat, générées à partir de trois plans de coupes orthogonaux. Cette technique permet de cartographier la totalité du transcriptome d'un tissu en trois dimensions. L'ensemble de ces techniques va permettre de comparer les transcriptomes des habenulæ gauche et droite de roussette et de lamproie afin de caractériser les différents réseaux de gènes impliqués dans l'établissement des asymétries. Cette analyse permettra de disposer de listes de gènes différentiellement exprimés entre les habenulæ gauche et droite.

#### Approches fonctionnelles.

Des approches fonctionnelles pourront par la suite être envisagées sur la base de ces résultats. Chez la lamproie, celles-ci pourront être envisagées par injection d'oligonucléotides anti-sens de type morpholinos ou par édition du génome avec le système CRISPR/Cas9. Le rôle d'autres voies de signalisation pourra également être étudié chez ces modèles et notamment celui de la voie Wnt, largement impliquée chez le poisson-zèbre en aval de l'activité de la parapinéale. Plusieurs agents pharmacologiques ont été testés dans le laboratoire dont les activateurs de la voie Wnt, le BIO (6-bromoindirubin-3'-oxime) et l'azakenpaullone, des inhibiteurs de GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) (résultats non publiés obtenus par A. Boutet). Shh étant exprimé de façon asymétrique dans l'habénula droite de roussette, l'effet sur les asymétries d'une perte de fonction de la signalisation Shh sera également étudié, en réalisant des injections in ovo de cyclopamine, un inhibiteur déjà utilisé dans le laboratoire (Santos-Durán et al., 2015). L'effet de ces pertes et gains de fonction sera étudié en centrant les analyses sur la neurogenèse et sur la différenciation neuronale à plusieurs stades, en utilisant comme référence les descriptions actuellement en cours dans le laboratoire.

#### Rôles des asymétries habénulaires dans le contrôle du comportement

À plus long terme, il serait également intéressant de tester l'effet de l'abolition des asymétries habénulaires, telles qu'obtenues chez la roussette suite à l'inactivation pharmacologique de la voie Nodal. Ces traitements n'affectent en effet pas la viabilité des embryons jusqu'à des stades tardifs et il pourrait être possible d'obtenir des juvéniles aux habenulæ symétriques. Des tests comportementaux sont développés chez la petite roussette (Southall & Sims, 2003; Kimber et al., 2011; Jacoby et al., 2012; Kimber et al., 2014) et ces derniers pourraient être adaptés pour tester le rôle des asymétries épithalamiques sur le comportement. Ces expériences pourront fournir une des clés de l'influence du comportement sur l'évolution des asymétries pour mieux appréhender les dynamiques de l'évolution des asymétries spécifiques à chaque taxon.

### 2.3. Impacts attendus

L'ensemble de ces travaux pourrait contribuer à notre compréhension des mécanismes contrôlant le développement et l'évolution des asymétries épithalamiques chez les vertébrés. Il permettrait également de comprendre les contraintes qui régissent l'architecture des réseaux de régulation génétique dans ce système. Enfin, il pourrait ouvrir la voie à des études du rôle des asymétries dans le contrôle du comportement chez un modèle original.

## **ANNEXES**

## 1. Table de développement de la petite roussette Scyliorhinus canicula

La description du développement embryonnaire de la roussette *S.canicula* a été réalisée par Ballard *et al.* en 1993 (Ballard *et al.*, 1993)

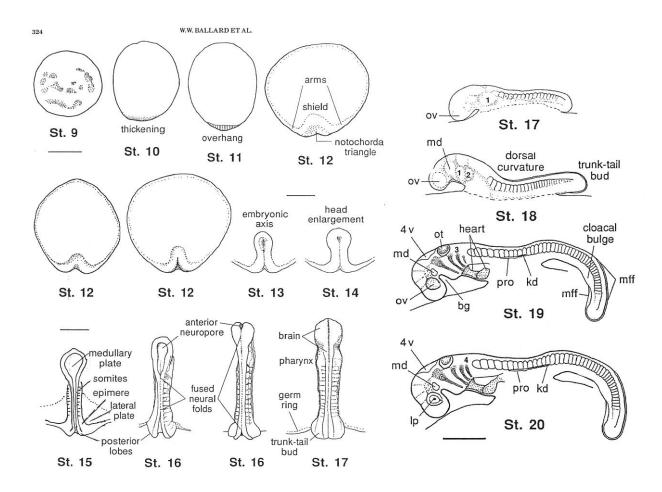


Figure 50a : Planche présentant les stades embryonnaires 9 à 20 de la petite roussette *Scyliorhinus canicula*. (Ballard *et al.*, 1993)

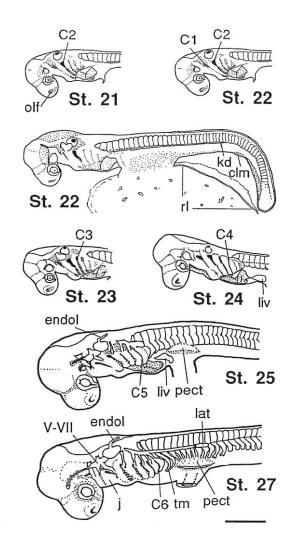


Figure 50b : Planche présentant les stades embryonnaires 21 à 31 de la petite roussette *Scyliorhinus canicula*. (Ballard  $et\ al.$ , 1993)

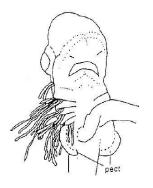


Figure 50c: Schéma d'un embryon de petite roussette *Scyliorhinus canicula* au stade 31 (Ballard *et al.*, 1993)

Une description des stades embryonnaires décrits par Ballard a également été réalisée par Mellinger (Mellinger, 1994):

#### Œufs trouvés dans les oviductes

Stade 1 : de la fécondation jusqu'à 100 blastomères

**Stade 2** : plus de 100 blastomères, encore saillants

Stade 3 : blastomères très nombreux, non saillants ; coque complètement formée

#### Œufs généralement pondus ; stades précédant l'épibolie

**Stade 4** : croissant postérieur limité à moins de la moitié du blastodisque **Stade 5** : croissant postérieur étendu à la moitié du blastodisque, ou plus

Stade 6 : croissant postérieur réduit

**Stade 7**: croissant postérieur disparu; épibolie non encore amorcée

#### Début d'épibolie ; formation de l'embryon

Stade 8 : le blastodisque masque le vitellus blanc dans son secteur caudal

Stade 9 : le blastodisque masque complètement le vitellus blanc

Stade 10: blastodisque épaissi sur son rebord caudal, sans surplomb

Stade 11: surplomb caudal, qui consiste en un repli épithélial

Stade 12 : écusson embryonnaire, formant une encoche caudale dans le blastodisque

**Stade 13**: axe embryonnaire, sans plaque céphalique

Stade 14: axe embryonnaire muni d'une plaque céphalique un peu plus large

**Stade 15**: neurula, à plaque neurale complètement ouverte

Stade 16: neurula, à tube neural clos dans sa région moyenne

### Métamérisation pharyngienne ; achèvement de la production de somites

**Stade 17**: première paire de poches branchiales visibles par transparence; tube neural clos

**Stade 18**: poches branchiales n°1 et 2 présentes ; encoche buccale peu profonde (vue de profil)

**Stade 19**: poches branchiales n° 1-3; encoche buccale profonde

Stade 20: poches branchiales n° 1-4; pharynx encore imperforé

Stade 21: fentes branchiales n°2 et orifice buccal

Stade 22: fentes branchiales n°1 et 2

Stade 23: fentes branchiales n°1-3

**Stade 24**: fentes branchiales n°1-4; la bouche prend la forme d'un losange

Stade 25: fentes branchiales n°1-5

**Stade 26** : fentes branchiales n°1-6, munies d'ébauches de filaments branchiaux, sauf les n° 1 et 6 ; série complète de somites

#### Développement des filaments branchiaux externes, avant la prééclosion

<u>Stade 27</u>: apparition d'ébauches de filaments branchiaux dans les fentes n°1 (futurs évents); bouche encore losangique

Stade 28 : bouche de forme ovale, allongée transversalement

**Stade 29**: fente buccale de forme arquée (mandibule proéminente)

<u>Stade 31</u>: ébauche du rostre, formant un angle droit avec l'axe du corps ; la prééclosion survient habituellement au milieu de ce stade ; les interruptions du repli cutané sagittal forment des angles aigus

#### De la prééclosion jusqu'à l'éclosion

 $\underline{\textbf{Stade 32}}$  : l'ébauche du rostre s'allonge, au-delà de 90° ; diamètre de la VVE non encore réduit, bien que le transfert du vitellus ait commencé

Stade 33 : réduction nette du diamètre de la VVE

**Stade 34** : VVE vidée de son vitellus, réduite à un "bouton" ou disparue ; l'embryon est immobilisé dans la coque, qu'il remplit complètement

### 2. Table de développement de la lamproie

La description exhaustive du développement embryonnaire de la lamproie a été réalisée chez différentes espèces et plusieurs tables de développement ont été publiées, sur la lamproie *Lampetra reissneri* (Tahara, 1988) et sur la lamproie marine *Petromyzon marinus* (Piavis, 1961; Richardson & Wright, 2003). Au cours de ce travail, je me suis référé à la description réalisée par Tahara.

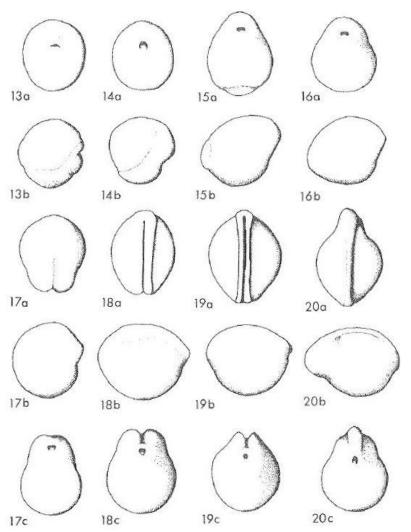


Figure 51a: Planche présentant les stades embryonnaires 13 à 20 de la lamproie *Lampetra reissneri*. (Tahara, 1988)

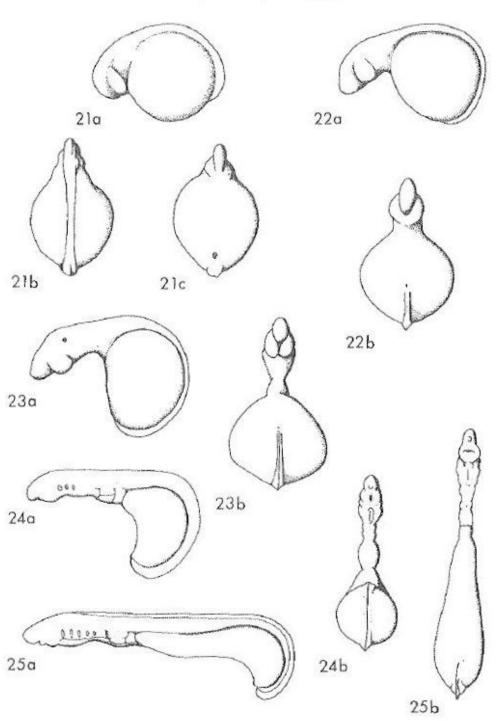


Figure 51b: Planche présentant les stades embryonnaires 21 à 25 de la lamproie *Lampetra reissneri*. (Tahara, 1988)

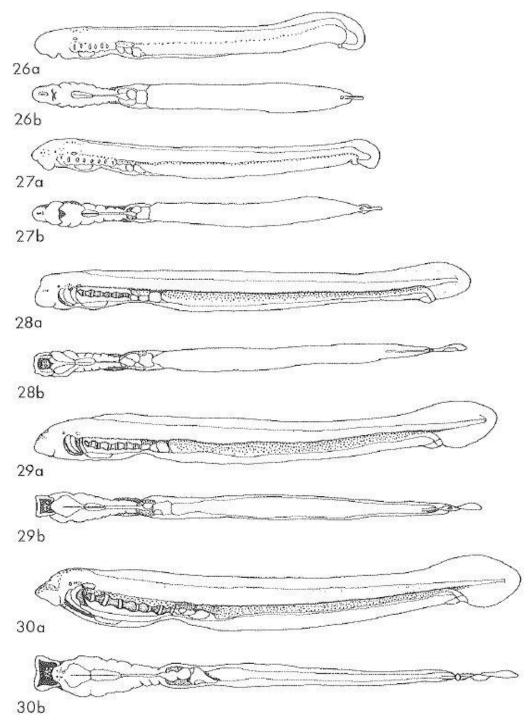


Figure 51c: Planche présentant les stades embryonnaires 26 à 30 de la lamproie *Lampetra reissneri*. (Tahara, 1988)

# **TABLE DES FIGURES**

F	Figure 1 : Exemples de bilatériens présentant des asymétries du SNC	12	
F	Figure 2 : Asymétries morphologiques chez quelques protostomiens	14	
F	Figure 3 : Asymétries chez l'humain et le poulet	16	
F	Figure 4 : Organisation de l'épithalamus chez les vertébrés	17	
F	Figure 5 : Morphologies de la parapinéale chez les vertébrés	18	
F	Figure 6 : Organisation des habenulæ chez les vertébrés	20	
F	Figure 7 : Conservation des projections habénulaires chez les vertébrés	21	
F	Figure 8 : Mécanismes communs proposés pour différentes fonctions comportementales d	les	
habe	nulæ	25	
F	Figure 9 : Asymétries des habenulæ du poisson-zèbre	29	
F	Figure 11 : Asymétrie du complexe pinéal chez le poisson-zèbre	31	
F	Figure 12 : Représentation schématique des habenulæ de différents vertébrés en lien av	ec	
leur position phylogénétique33			
F	Figure 13 : Représentations schématiques des projections des habenulæ de poisson-zèbre	34	
F	Figure 14 : Position de la parapinéale chez le poisson-zèbre et le médaka	36	
F	Figure 15 : Expressions asymétriques de la Calbindine et de la Calrétinine dans les habenul	æ.	
		38	
F	Figure 16 : Exemple d'asymétries moléculaires chez les vertébrés	39	
F	Figure 17 : Traitement asymétrique des informations sensorielles par les habenulæ	42	
F	Figure 19 : Position phylogénétique du poisson-zèbre	45	
F	Figure 20 : Territoire de spécification de l'épithalamus	46	
F	Figure 21 : Spécification des habenulæ ventrales	48	
F	Figure 22. : Spécification des habenulæ dorsales4	49	
F	Figure 23 : Spécification du complexe pinéal	51	
F	Figure 25 : Expression des composants de la voie Nodal dans l'épithalamus de poisson-zèb	re.	
		55	
F	Figure 26 : Schéma montrant les asymétries moléculaires chez le poisson-zèbre	56	

Figure 27 : Rôle de la voie Nodal dans le contrôle de la directionnalité des asymétr	ies
épithalamiquesépithalamiques	57
Figure 28 : neurogenèse asymétrique des habenulæ.	.58
Figure 29 : neurogenèse asymétrique dépendante de la voie Nodal mais indépendante de	e la
migration de la parapinéale	.59
Figure 30 : Corrélation entre la position de la parapinéale et la directionnalité des asymétr	ies
habénulaires	61
Figure 31 : La parapinéale est responsable des asymétries habénulaires	63
Figure 32 : Perte des asymétries épithalamiques chez les mutants fgf8a (ace)	64
Figure 33 : fgf8a est impliqué dans la migration de la parapinéale	65
Figure 34 : Effets de la perte de fonction de pitx2c sur les asymétries épithalamiques	66
Figure 35: Les sous-domaines habénulaires sont déterminés par une neurogene	èse
asymétrique	69
Figure 36 : Implication de la voie Notch sur la neurogenèse des habenulæ	71
Figure 37 : Rôle de Tcf7l2	.72
Figure 38 : Rôles de <i>kctd12</i> et d' <i>ulk2</i> dans la formation du neuropile	.75
Figure 39 : Rôle de daam1a sur la formation du neuropile	.77
Figure 40 : Positions phylogénétiques de la lamproie et de la roussette	.78
Figure 41 : Cycle de vie anadrome de la lamproie marine <i>Petromyzon marinus</i>	80
Figure 42 : L'œuf de la petite roussette Scyliorhinus canicula	82
Figure 43 : Asymétries des sorties de cycles mitotiques dans les habenulæ entre les stac	des
28 et 31	.60
Figure 44 : La localisation des cellules des habenulæ en fonction de la période de le	eur
dernière mitose1	.62
Figure 45 : Asymétrie de la neurogenèse précoce dans les habenulæ de roussette 1	.63
Figure 46 : Asymétrie de la neurogenèse précoce dans les habenulæ au stade 27	64

Figure 47: Expression asymétrique de Shh dependante de Nodal dans les habenulæ de		
roussette		
Figure 48 : Patrons de prolifération-différenciation dans les habenulæ de roussette au stade		
32168		
Figure 49 : Régionalisation des habenulæ de roussette au stade 32170		
Figure 50a: Planche présentant les stades embryonnaires 9 à 20 de la petite roussette		
Scyliorhinus canicula. (Ballard et al., 1993)		
Figure 50b: Planche présentant les stades embryonnaires 21 à 31 de la petite roussette		
Scyliorhinus canicula		
Figure 50c : Schéma d'un embryon de petite roussette Scyliorhinus canicula au stade 31 185		
Figure 51a : Planche présentant les stades embryonnaires 13 à 20 de la lamproie Lampetro		
reissneri. (Tahara, 1988)		
Figure 51b : Planche présentant les stades embryonnaires 21 à 25 de la lamproie Lampetro		
reissneri. (Tahara, 1988)188		
Figure 51c : Planche présentant les stades embryonnaires 26 à 30 de la lamproie Lampetro		
reissneri (Tahara 1988)		

# RÉFÉRENCES

- **Adrio, F., Anadón, R. & Rodríguez-Moldes, I.** (2000) Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the central nervous system of a chondrostean, the Siberian sturgeon (Acipenser baeri). *Journal of Comparative Neurology*, 426, 602–621.
- **Aizawa, H.** (2013) Habenula and the asymmetric development of the vertebrate brain. *Anatomical Science International*, 88, 1–9.
- Aizawa, H., Bianco, I.H., Hamaoka, T., Miyashita, T., Uemura, O., Concha, M.L., Russell, C., Wilson, S.W. & Okamoto, H. (2005) Laterotopic Representation of Left-Right Information onto the Dorso-Ventral Axis of a Zebrafish Midbrain Target Nucleus. *Current Biology*, 15, 238–243.
- **Aizawa, H., Goto, M., Sato, T. & Okamoto, H.** (2007) Temporally Regulated Asymmetric Neurogenesis Causes Left-Right Difference in the Zebrafish Habenular Structures. *Developmental Cell*, 12, 87–98.
- **Aizawa, H., Amo, R. & Okamoto, H.** (2011) Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Frontiers in Neuroscience*, 5, 1–7.
- **Amato, M.A., Boy, S. & Perron, M.** (2004) Hedgehog signaling in vertebrate eye development: A growing puzzle. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 899–910.
- Amo, R., Aizawa, H., Takahoko, M., Kobayashi, M., Takahashi, R., Aoki, T. & Okamoto, H. (2010) Identification of the zebrafish ventral habenula as a homolog of the mammalian lateral habenula. *The Journal of neuroscience*, 30, 1566–1574.
- Amunts, K., Schleicher, A., Bürgel, U., Mohlberg, H., Uylings, H.B.M. & Zilles, K. (1999) Broca's region revisited: Cytoarchitecture and intersubject variability. *The Journal of Comparative Neurology*, 412, 319–341.
- Anadón, R., Molist, P., Rodríguez-Moldes, I., López, J.M., Quintela, I., Cerviño, M.C., Barja, P. & González, A. (2000) Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of an elasmobranch, the lesser spotted dogfish (Scyliorhinus canicula). *Journal of Comparative Neurology*, 420, 139–170.
- Andres, K.H., Düring, M. Von & Veh, R.W. (1999) Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *Journal of Comparative Neurology*, 407, 130–150.
- Antolin-Fontes, B., Ables, J.L., Görlich, A. & Ibañez-Tallon, I. (2014) The habenulo-interpeduncular pathway in nicotine aversion and withdrawal. *Neuropharmacology*.
- **Auclair, F., Lund, J.P. & Dubuc, R.** (2004) Immunohistochemical distribution of tachykinins in the CNS of the lamprey Petromyzon marinus. *Journal of Comparative Neurology*, 479, 328–346.
- **Baimbridge, K.G., Celio, M.R. & Rogers, J.H.** (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends in Neurosciences*, 15, 303–308.

- **Ballard, W.W., Mellinger, J. & Lechenault, H.** (1993) A series of normal stages for development of Scyliorhinus canicula, the lesser spotted dogfish (Chondrichthyes: Scyliorhinidae). *Journal of Experimental Zoology*, 267, 318–336.
- **Barreiro-Iglesias, A., Anadón, R. & Rodicio, M.C.** (2010) New insights on the neuropeptide Y system in the larval lamprey brain: Neuropeptide Y immunoreactive neurons, descending spinal projections and comparison with tyrosine hydroxylase and GABA immunoreactivities. *Neuroscience*, 167, 396–413.
- Barth, A.K., Miklósi, Á., Watkins, J., Bianco, I.H., Wilson, S.W. & Andrew, R.J. (2005) fsi Zebrafish Show Concordant Reversal of Laterality of Viscera, Neuroanatomy, and a Subset of Behavioral Responses. *Current Biology*, 15, 844–850.
- Beretta, C.A., Dross, N., Guiterrez-Triana, J.A., Ryu, S. & Carl, M. (2012) Habenula circuit development: Past, present, and future. *Frontiers in Neuroscience*, 6, 1–10.
- Beretta, C.A., Dross, N., Bankhead, P. & Carl, M. (2013) The ventral habenulae of zebrafish develop in prosomere 2 dependent on Tcf7l2 function. *Neural development*, 8, 19.
- **Berker, E.A., Berker, H.A. & Smith, A.** (1986) Translation of Broca's 1865 report. Localization of speech in the third left frontal convolution. *Archives of neurology*.
- **Bertrand, N., Castro, D.S. & Guillemot, F.** (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 517–530.
- **Biran, J., Palevitch, O., Ben-Dor, S. & Levavi-Sivan, B.** (2012) Neurokinin Bs and neurokinin B receptors in zebrafish-potential role in controlling fish reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 10269–10274.
- **Bisgrove**, **B.W.**, **Essner**, **J.J. & Yost**, **J.H.** (1999) Regulation of midline development by antagonism of lefty and nodal signaling. *Development*, 126, 3253–3262.
- **Blair**, **J.E. & Hedges**, **S.B.** (2005) Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 2275–2284.
- **Braitenberg, V. & Kemali, M.** (1970) Exceptions to bilateral symmetry in the epithalamus of lower vertebrates. *The Journal of Comparative Neurology*, 138, 137–146.
- Brandler, W.M., Morris, A.P., Evans, D.M., Scerri, T.S., Kemp, J.P., Timpson, N.J., St Pourcain, B., Smith, G. Da, Ring, S.M., Stein, J., Monaco, A.P., Talcott, J.B., Fisher, S.E., Webber, C. & Paracchini, S. (2013) Common Variants in Left/Right Asymmetry Genes and Pathways Are Associated with Relative Hand Skill. *PLoS Genetics*, 9.
- **Brazeau, M.D. & Friedman, M.** (2015) The origin and early phylogenetic history of jawed vertebrates. *Nature*, 520, 490–497.
- **Butler, A.B. & Hodos, W.** (2005) Epithalamus. In *Comparative Vertebrate Neuroanatomy*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 407–415.

- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., Bebber, F. van, Lowe, L.A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R. & Blum, M. (1999) The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development*, 126, 1225–1234.
- Cañestro, C., Albalat, R., Irimia, M. & Garcia-Fernàndez, J. (2013) Impact of gene gains, losses and duplication modes on the origin and diversification of vertebrates. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24, 83–94.
- Carl, M., Bianco, I.H., Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Czerny, T. & Wilson, S.W. (2007) Wnt/Axin1/β-Catenin Signaling Regulates Asymmetric Nodal Activation, Elaboration, and Concordance of CNS Asymmetries. *Neuron*, 55, 393–405.
- Cassone, V.M., Forsyth, A.M. & Woodlee, G.L. (1990) Hypothalamic regulation of circadian noradrenergic input to the chick pineal gland. *Journal of Comparative Physiology A*, 167, 187–192.
- Cau, E., Quillien, A. & Blader, P. (2008) Notch resolves mixed neural identities in the zebrafish epiphysis. *Development (Cambridge, England)*, 135, 2391–2401.
- **Chase, R.** (1986) Brain cells that command sexual behavior in the snail Helix aspersa. *Journal of Neurobiology*, 17, 669–679.
- Chase, R. (2000) Structure and function in the cerebral ganglion. *Microscopy research and technique*, 49, 511–520.
- Chen, C. & Shen, M.M. (2004) Two Modes by which Lefty Proteins Inhibit Nodal Signaling. *Current Biology*, 14, 618–624.
- Chen, M., Zou, M., Yang, L. & He, S. (2012) Basal jawed vertebrate phylogenomics using transcriptomic data from solexa sequencing. *PLoS ONE*, 7, 1–6.
- **Cheng, S.K., Olale, F., Brivanlou, A.H. & Schier, A.F.** (2004) Lefty Blocks a Subset of TGFβ Signals by Antagonizing EGF-CFC Coreceptors. *PLoS Biology*, 2, e30.
- Chung-Davidson, Y.-W., Yun, S.-S., Teeter, J. & Li, W. (2004) Brain pathways and behavioral responses to weak electric fields in parasitic sea lampreys (Petromyzon marinus). *Behavioral neuroscience*, 118, 611–619.
- Clanton, J.A., Hope, K.D. & Gamse, J.T. (2013) Fgf signaling governs cell fate in the zebrafish pineal complex. *Development*, 140, 323–332.
- Collignon, J., Varlet, I. & Robertson, E.J. (1996) Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature*, 381, 155–158.
- Colombo, A., Palma, K., Armijo, L., Mione, M., Signore, I.A., Morales, C., Guerrero, N., Meynard, M.M., Pérez, R., Suazo, J., Marcelain, K., Briones, L., Härtel, S., Wilson, S.W. & Concha, M.L. (2013) Daam1a mediates asymmetric habenular morphogenesis by regulating dendritic and axonal outgrowth. *Development*, 140, 3997–4007.

- Concha, M.L., Signore, I.A. & Colombo, A. (2009) Mechanisms of directional asymmetry in the zebrafish epithalamus. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20, 498–509.
- Concha, M.L., Burdine, R.D., Russell, C., Schier, A.F. & Wilson, S.W. (2000) A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron*, 28, 399–409.
- Concha, M.L. & Wilson, S.W. (2001) Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *Journal of Anatomy*, 199, 63–84.
- Concha, M.L., Russell, C., Regan, J.C., Tawk, M., Sidi, S., Gilmour, D.T., Kapsimali, M., Sumoy, L., Goldstone, K., Amaya, E., Kimelman, D., Nicolson, T., Gründer, S., Gomperts, M., Clarke, J.D.W. & Wilson, S.W. (2003) Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality. *Neuron*, 39, 423–438.
- Coolen, M., Sauka-Spengler, T., Nicolle, D., Mentec, C. Le, Lallemand, Y., Silva, C. Da, Plouhinec, J.-L., Robert, B., Wincker, P., Shi, D.L. & Mazan, S. (2007) Evolution of axis specification mechanisms in Jawed vertebrates: Insights from a chondrichthyan. *PLoS ONE*, 2.
- Coolen, M., Menuet, A., Chassoux, D., Compagnucci, C., Henry, S., Lévèque, L., Silva, C. Da, Gavory, F., Samain, S., Wincker, P., Thermes, C., D'Aubenton-Carafa, Y., Rodríguez-Moldes, I., Naylor, G., Depew, M., Sourdaine, P. & Mazan, S. (2008) The dogfish Scyliorhinus canicula: A reference in jawed vertebrates. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3, 1–14.
- Coolen, M., Menuet, A. & Mazan, S. (2009) Towards a synthetic view of axis specification mechanisms in vertebrates: insights from the dogfish. *Comptes Rendus Biologies*, 332, 210–218.
- Corodimas, K.P., Rosenblatt, J.S., Matthews-Felton, T.R. & Morrell, J.I. (1995) Role of Neurons in the Lateral Habenula for the Expression of Maternal Behavior. *Current Directions in Psychological Science*.
- Coutelis, J.-B., González-Morales, N., Géminard, C. & Noselli, S. (2014) Diversity and convergence in the mechanisms establishing L/R asymmetry in metazoa. *EMBO reports*, 15, 926–937.
- **Cruce, J. a.** (1974) A cytoarchitectonic study of the diencephalon of the tegu lizard, Tupinambis nigropunctatus. *The Journal of Comparative Neurology*, 153, 215–238.
- **DaCosta Byfield, S., Major, C., Laping, N.J. & Roberts, A.B.** (2004) SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology*, 65, 744–752.
- **Dávila, J.C., Guirado, S. & Puelles, L.** (2000) Expression of calcium-binding proteins in the diencephalon of the lizard Psammodromus algirus. *Journal of Comparative Neurology*, 427, 67–92.

- **Dean, B.J., Erdogan, B., Gamse, J.T. & Wu, S.-Y.** (2014) Dbx1b defines the dorsal habenular progenitor domain in the zebrafish epithalamus. *Neural Development*, 9, 20.
- **Debiais-Thibaud, M., Oulion, S., Bourrat, F., Laurenti, P., Casane, D. & Borday-Birraux, V.** (2011) The homology of odontodes in gnathostomes: insights from Dlx gene expression in the dogfish, Scyliorhinus canicula. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 307.
- **deCarvalho, T.N., Subedi, A., Rock, J., Harfe, B.D., Thisse, C., Thisse, B., Halpern, M.E. & Hong, E.** (2014) Neurtransmitter map of the asymmetric dorsal habenular nuclei of Zebrafish. *Genesis*, 52, 636–655.
- **Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D. & Philippe, H.** (2006) Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*, 439, 965–968.
- **Dharmaretnam, M. & Rogers, L.J.** (2005) Hemispheric specialization and dual processing in strongly versus weakly lateralized chicks. *Behavioural Brain Research*, 162, 62–70.
- **Díaz, E., Bravo, D., Rojas, X. & Concha, M.L.** (2011) Morphologic and immunohistochemical organization of the human habenular complex. *Journal of Comparative Neurology*, 519, 3727–3747.
- **Díaz-Regueira**, S. & Anadón, R. (2000) Calretinin expression in specific neuronal systems in the brain of an advanced teleost, the grey mullet (Chelon labrosus). *The Journal of Comparative Neurology*, 426, 81–105.
- **Distel, H. & Ebbesson, S.O.E.** (1981) Habenular projections in the monitor lizard (Varanus benegalensis). *Experimental Brain Research*, 43-43, 449–458.
- **Doll, C.A., Burkart, J.T., Hope, K.D., Halpern, M.E. & Gamse, J.T.** (2011) Subnuclear development of the zebrafish habenular nuclei requires ER translocon function. *Developmental Biology*, 360, 44–57.
- **Donkelaar, H.J. ten**. (1998a) Anurans. In *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1151–1314.
- **Donkelaar, H.J. ten**. (1998b) Reptiles. In *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1315–1524.
- **Donkelaar, H.J. ten**. (1998c) Urodeles. In *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1045–1150.
- **Doudna, J.A. & Charpentier, E.** (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 1258096–1258096.
- **Dreosti, E., Vendrell-Llopis, N., Carl, M., Yaksi, E. & Wilson, S.W.** (2014) Left-right asymmetry is required for the habenulae to respond to both visual and olfactory stimuli. *Current Biology*, 24, 440–445.
- **Dubbeldam, J.L.** (1998) Birds. In *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1525–1636.

- **Duboc, V., Röttinger, E., Lapraz, F., Besnardeau, L. & Lepage, T.** (2005) Left-right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by nodal signaling on the right side. *Developmental Cell*, 9, 147–158.
- **Dufourcq, P., Rastegar, S., Strähle, U. & Blader, P.** (2004) Parapineal specific expression of gfi1 in the zebrafish epithalamus. *Gene Expression Patterns*, 4, 53–57.
- **Engbretson, G.A., Reiner, A. & Brecha, N.** (1981) Habenular asymmetry and the central connections of the parietal eye of the lizard. *The Journal of Comparative Neurology*, 198, 155–165.
- **Engbretson, G.A., Brecha, N. & Reiner, A.** (1982) Substance P-like immunoreactivity in the parietal eye visual system of the lizard Uta stansburiana. *Cell and Tissue Research*, 227, 543–554.
- **Essen, D.C. Van**. (2005) A Population-Average, Landmark- and Surface-based (PALS) atlas of human cerebral cortex. *NeuroImage*, 28, 635–662.
- **Ettensohn, C. a.** (2013) Encoding anatomy: Developmental gene regulatory networks and morphogenesis. *Genesis*, 51, 383–409.
- Facchin, L., Burgess, H. a, Siddiqi, M., Granato, M. & Halpern, M.E. (2009) Determining the function of zebrafish epithalamic asymmetry. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364, 1021–1032.
- **Falcón, J.** (1999) Cellular circadian clocks in the pineal. *Progress in Neurobiology*, 58, 121–162.
- Falcón, J., Besseau, L., Fuentès, M., Sauzet, S., Magnanou, E. & Boeuf, G. (2009) Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163, 101–111.
- **Fan, X. & Dougan, S.T.** (2007) The evolutionary origin of nodal-related genes in teleosts. *Development Genes and Evolution*, 217, 807–813.
- **Fortin, M., Asselin, M.C. & Parent, A.** (1996) Calretinin immunoreactivity in the thalamus of the squirrel monkey. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 10, 101–117.
- **Foulley, M.-M. & Mellinger, J.** (1980) Étude chronologique, structurale et biométrique de l'œuf et de son développement chez la petite roussette (Scyliorhinus canicula) élevée en eau de mer artificielle. *Reproduction Nutrition Développement*, 20, 1835–1848.
- **Foulley, M.-M., Wrisez, F. & Mellinger, J.** (1981) Observation sur la perméabilité asymétrique de la coque de l'oeuf de Roussette (Scyliorhinus canicula). *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences*, 293, 389–394.
- **Frasnelli, E., Vallortigara, G. & Rogers, L.J.** (2012) Left-right asymmetries of behaviour and nervous system in invertebrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 1273–1291.

- **Frontera**, **J.G.** (1952) A study of the anuran diencephalon. *The Journal of Comparative Neurology*, 96, 1–69.
- Gamse, J.T., Thisse, C., Thisse, B. & Halpern, M.E. (2003) The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon. *Development*, 130, 1059–1068.
- Gamse, J.T., Kuan, Y.-S., Macurak, M., Brösamle, C., Thisse, B., Thisse, C. & Halpern, M.E. (2005) Directional asymmetry of the zebrafish epithalamus guides dorsoventral innervation of the midbrain target. *Development*, 132, 4869–4881.
- Gamse, J.T., Shen, Y.-C., Thisse, C., Thisse, B., Raymond, P.A., Halpern, M.E. & Liang, J.O. (2002) Otx5 regulates genes that show circadian expression in the zebrafish pineal complex. *Nature genetics*, 30, 117–121.
- **Garcia-Fernàndez**, **J.** (2005) The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nature reviews. Genetics*, 6, 881–892.
- Garric, L., Ronsin, B., Roussigné, M., Booton, S., Gamse, J.T., Dufourcq, P. & Blader, P. (2014) Pitx2c ensures habenular asymmetry by restricting parapineal cell number. *Development*, 141, 1572–1579.
- Gess, R.W., Coates, M.I. & Rubidge, B.S. (2006) A lamprey from the Devonian period of South Africa. *Nature*, 443, 981–984.
- Gherzi, R., Trabucchi, M., Ponassi, M., Gallouzi, I.-E., Rosenfeld, M.G. & Briata, P. (2010) Akt2-mediated phosphorylation of Pitx2 controls Ccnd1 mRNA decay during muscle cell differentiation. *Cell death and differentiation*, 17, 975–983.
- **Gilles, A.F. & Averof, M.** (2014) Functional genetics for all: engineered nucleases, CRISPR and the gene editing revolution. *EvoDevo*, 5, 43.
- **Godard, B.G. & Mazan, S.** (2013) Early patterning in a chondrichthyan model, the small spotted dogfish: Towards the gnathostome ancestral state. *Journal of Anatomy*, 222, 56–66.
- Godard, B.G., Coolen, M., Panse, S. Le, Gombault, A., Ferreiro-Galve, S., Laguerre, L., Lagadec, R., Wincker, P., Poulain, J., Silva, C. Da, Kuraku, S., Carre, W., Boutet, A. & Mazan, S. (2014) Mechanisms of endoderm formation in a cartilaginous fish reveal ancestral and homoplastic traits in jawed vertebrates. *Biology Open*, 3, 1098–1107.
- **Goldsmith, A.D., Sarin, S., Lockery, S. & Hobert, O.** (2010) Developmental control of lateralized neuron size in the nematode Caenorhabditis elegans. *Neural Development*, 5, 33.
- Gothilf, Y., Coon, S.L., Toyama, R., Chitnis, A.B., Namboodiri, M. a a & Klein, D.C. (1999) Zebrafish serotonin N-acetyltransferase-2: Marker for development of pineal photoreceptors and circadian clock function. *Endocrinology*, 140, 4895–4903.
- Goto, K., Kurashima, R., Gokan, H., Inoue, N., Ito, I. & Watanabe, S. (2010) Left–Right Asymmetry Defect in the Hippocampal Circuitry Impairs Spatial Learning and Working Memory in iv Mice. *PLoS ONE*, 5, e15468.

- **Graña, P., Huesa, G., Anadón, R. & Yáñez, J.** (2012) Immunohistochemical study of the distribution of calcium binding proteins in the brain of a chondrostean (Acipenser baeri). *The Journal of Comparative Neurology*, 520, 2086–122.
- Graña, P., Folgueira, M., Huesa, G., Anadón, R. & Yáñez, J. (2013) Immunohistochemical distribution of calretinin and calbindin (D-28k) in the brain of the cladistian Polypterus senegalus. *Journal of Comparative Neurology*, 521, 2454–2485.
- **Grande, C. & Patel, N.H.** (2009) Nodal signalling is involved in left–right asymmetry in snails. *Nature*, 457, 1007–1011.
- **Green, S. a. & Bronner, M.E.** (2014) The lamprey: A jawless vertebrate model system for examining origin of the neural crest and other vertebrate traits. *Differentiation*, 87, 44–51.
- Griffiths, A.M., Jacoby, D.M.P., Casane, D., McHugh, M., Croft, D.P., Genner, M.J. & Sims, D.W. (2012) First analysis of multiple paternity in an oviparous shark, the small-spotted catshark (Scyliorhinus canicula L.). *Journal of Heredity*, 103, 166–173.
- **Guglielmotti, V., Cristino, L., Sada, E. & Bentivoglio, M.** (2004) The epithalamus of the developing and adult frog: Calretinin expression and habenular asymmetry in Rana esculenta. *Brain Research*, 999, 9–19.
- **Guglielmotti, V. & Cristino, L.** (2006) The interplay between the pineal complex and the habenular nuclei in lower vertebrates in the context of the evolution of cerebral asymmetry. *Brain Research Bulletin*, 69, 475–488.
- **Guglielmotti, V. & Fiorino, L.** (1999) Nitric oxide synthase activity reveals an asymmetrical organization of the frog habenulae during development: A histochemical and cytoarchitectonic study from tadpoles to the mature Rana esculenta, with notes on the pineal complex. *Journal of Comparative Neurology*, 411, 441–454.
- **Gurusinghe**, C.J. & Ehrlich, D. (1985) Sex-dependent structural asymmetry of the medial habenular nucleus of the chicken brain. *Cell and Tissue Research*, 240, 149–152.
- Gutiérrez-Ibáñez, C., Reddon, A.R., Kreuzer, M.B., Wylie, D.R. & Hurd, P.L. (2011) Variation in asymmetry of the habenular nucleus correlates with behavioural asymmetry in a cichlid fish. *Behavioural Brain Research*, 221, 189–196.
- Halpern, M.E., Liang, J.O. & Gamse, J.T. (2003) Leaning to the left: Laterality in the zebrafish forebrain. *Trends in Neurosciences*, 26, 308–313.
- **Halpern, M.E., Güntürkün, O., Hopkins, W.D. & Rogers, L.J.** (2005) Lateralization of the vertebrate brain: taking the side of model systems. *The Journal of neuroscience*, 25, 10351–10357.
- **Harris, J.A., Guglielmotti, V. & Bentivoglio, M.** (1996) Diencephalic asymmetries. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20, 637–643.

- **Haug, M.F., Gesemann, M., Mueller, T. & Neuhauss, S.C.F.** (2013) Phylogeny and expression divergence of metabotropic glutamate receptor genes in the brain of zebrafish (Danio rerio). *The Journal of Comparative Neurology*, 521, 1533–60.
- He, X., Treacy, M.N., Simmons, D.M., Ingraham, H.A., Swanson, L.W. & Rosenfeld, M.G. (1989) Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature*, 340, 35–41.
- **Heimberg, A.M., Cowper-Sal-lari, R., Sémon, M., Donoghue, P.C.J. & Peterson, K.J.** (2010) microRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 19379–19383.
- **Hentges, K.E.** (2011) Mediator complex proteins are required for diverse developmental processes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22, 769–775.
- **Herkenham, M. & Nauta, W.J.** (1977) Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *The Journal of Comparative Neurology*, 173, 123–146.
- **Hikosaka, O.** (2010) The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nature reviews. Neuroscience*, 11, 503–513.
- Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y. & Takeda, S. (2006) Nodal Flow and the Generation of Left-Right Asymmetry. *Cell*, 125, 33–45.
- **Hobert, O.** (2014) Development of left/right asymmetry in the Caenorhabditis elegans nervous system: From zygote to postmitotic neuron. *Genesis*, 52, 528–543.
- Hong, E., Santhakumar, K., Akitake, C. a., Ahn, S.J., Thisse, C., Thisse, B., Wyart, C., Mangin, J.-M. & Halpern, M.E. (2013) Cholinergic left-right asymmetry in the habenulo-interpeduncular pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 21171–21176.
- Hugdahl, K., Heiervang, E., Ersland, L., Lundervold, A., Steinmetz, H. & Smievoll, A.I. (2003) Significant relation between MR measures of planum temporale area and dichotic processing of syllables in dyslexic children. *Neuropsychologia*, 41, 666–675.
- **Hüsken, U. & Carl, M.** (2013) The Wnt/beta-catenin signaling pathway establishes neuroanatomical asymmetries and their laterality. *Mechanisms of Development*, 130, 330–335.
- Hüsken, U., Stickney, H.L., Gestri, G., Bianco, I.H., Faro, A., Young, R.M., Roussigné, M., Hawkins, T.A., Beretta, C.A., Brinkmann, I., et al. (2014) Tcf7l2 Is Required for Left-Right Asymmetric Differentiation of Habenular Neurons. *Current Biology*, 24, 2217–2227.
- **Inbal, A., Kim, S.H., Shin, J. & Solnica-Krezel, L.** (2007) Six3 Represses Nodal Activity to Establish Early Brain Asymmetry in Zebrafish. *Neuron*, 55, 407–415.

- Inman, G.J., Nicolás, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J. & Hill, C.S. (2002) SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology*, 62, 65–74.
- Itoh, M., Kim, C.H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.J., Maust, D., Yeo, S.Y., Lorick, K., Wright, G.J., Ariza-McNaughton, L., Weismann, A.M., Lewis, J., Chandrasekharappa, S.C. & Chitnis, A.B. (2003) Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of notch signaling by delta. *Developmental Cell*, 4, 67–82.
- **Ivory, P., Jeal, F. & Nolan, C.P.** (2005) Age Determination, Growth and Reproduction in the Lesser-spotted Dogfish, Scyliorhinus canicula (L.). *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 35, 89–106.
- **Jacobowitz, D.M. & Winsky, L.** (1991) Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 304, 198–218.
- **Jacoby, D.M.P., Sims, D.W. & Croft, D.P.** (2012) The effect of familiarity on aggregation and social behaviour in juvenile small spotted catsharks Scyliorhinus canicula. *Journal of Fish Biology*, 81, 1596–1610.
- **Jansen, J.** (1930) The brain of myxine glutinosa. *The Journal of Comparative Neurology*, 49, 359–507.
- **Jaszczyszyn, Y., Haeussler, M., Heuzé, A., Debiais-Thibaud, M., Casane, D., Bourrat, F. & Joly, J.-S.** (2007) Comparison of the expression of medaka (Oryzias latipes) pitx genes with other vertebrates shows high conservation and a case of functional shuffling in the pituitary. *Gene*, 406, 42–50.
- **Jetti, S.K., Vendrell-Llopis, N. & Yaksi, E.** (2014) Spontaneous Activity Governs Olfactory Representations in Spatially Organized Habenular Microcircuits. *Current Biology*, 24, 434–439.
- **Johnston, J.B.** (1902) The brain of petromyzon. *Journal of Comparative Neurology*, 12, 1–86
- **Joven, A., Morona, R., Moreno, N. & González, A.** (2013) Regional distribution of calretinin and calbindin-D28k expression in the brain of the urodele amphibian Pleurodeles waltl during embryonic and larval development. *Brain Structure and Function*, 218, 969–1003.
- **Jozet-Alves, C., Romagny, S., Bellanger, C. & Dickel, L.** (2012) Cerebral correlates of visual lateralization in Sepia. *Behavioural Brain Research*, 234, 20–25.
- Junker, J.P., Noël, E.S., Guryev, V., Peterson, K.A., Shah, G., Huisken, J., McMahon, A.P., Berezikov, E., Bakkers, J. & Oudenaarden, A. van. (2014) Genome-wide RNA Tomography in the Zebrafish Embryo. *Cell*, 159, 662–675.

- Kawakami, R., Shinohara, Y., Kato, Y., Sugiyama, H., Shigemoto, R. & Ito, I. (2003) Asymmetrical allocation of NMDA receptor epsilon2 subunits in hippocampal circuitry. *Science*, 300, 990–994.
- **Kemali, M., Guglielmotti, V. & Fiorino, L.** (1990) The asymmetry of the habenular nuclei of female and male frogs in spring and in winter. *Brain Research*, 517, 251–255.
- **Kemali, M. & Miralto, A.** (1979) The habenular nuclei of the elasmobranch "Scyllium stellare": Myelinated perikarya. *American Journal of Anatomy*, 155, 147–152.
- Kerkhof, L.W.M. van, Damsteegt, R., Trezza, V., Voorn, P. & Vanderschuren, L.J.M.J. (2013) Functional integrity of the habenula is necessary for social play behaviour in rats. *European Journal of Neuroscience*, 38, 3465–3475.
- **Kimber, J.A., Sims, D.W., Bellamy, P.H. & Gill, A.B.** (2011) The ability of a benthic elasmobranch to discriminate between biological and artificial electric fields. *Marine Biology*, 158, 1–8.
- **Kimber, J.A., Sims, D.W., Bellamy, P.H. & Gill, A.B.** (2014) Elasmobranch cognitive ability: Using electroreceptive foraging behaviour to demonstrate learning, habituation and memory in a benthic shark. *Animal Cognition*, 17, 55–65.
- **King, B.L., Gillis, A.J., Carlisle, H.R. & Dahn, R.D.** (2011) A Natural Deletion of the HoxC Cluster in Elasmobranch Fishes. *Science*, 334, 1517–1517.
- **Klemm, W.R.** (2004) Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks. *Medical science monitor*, 10, RA261–A273.
- Krishnan, S., Mathuru, A.S., Kibat, C., Rahman, M., Lupton, C.E., Stewart, J., Claridge-Chang, A., Yen, S.-C. & Jesuthasan, S. (2014) The Right Dorsal Habenula Limits Attraction to an Odor in Zebrafish. *Current Biology*, 24, 1167–1175.
- **Kuraku**, S. (2008) Insights into cyclostome phylogenomics: pre-2R or post-2R. *Zoological science*, 25, 960–968.
- **Kuraku, S., Meyer, A. & Kuratani, S.** (2009) Timing of genome duplications relative to the origin of the vertebrates: Did cyclostomes diverge before or after? *Molecular Biology and Evolution*, 26, 47–59.
- **Kuratani, S., Kuraku, S. & Murakami, Y.** (2002) Lamprey as an evo-devo model: Lessons from comparative embryology and molecular phylogenetics. *Genesis*, 34, 175–183.
- **Latasa, M.J., Cisneros, E. & Frade, J.M.** (2009) Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 53, 895–908.
- **Lecointre, G. & Guyader, H. Le**. (2006) *Classification phylogénétique du vivant*. 3rd edn. Belin.

- **Lee, S., Page-McCaw, P. & Gamse, J.T.** (2014) Kctd12 and Ulk2 Partner to Regulate Dendritogenesis and Behavior in the Habenular Nuclei. *PLoS ONE*, 9, e110280.
- **Lenhart, K.F., Lin, S.-Y., Titus, T.A., Postlethwait, J.H. & Burdine, R.D.** (2011) Two additional midline barriers function with midline lefty1 expression to maintain asymmetric Nodal signaling during left-right axis specification in zebrafish. *Development*, 138, 4405–4410.
- Levin, M., Johnson, R.L., Stern, C.D., Kuehn, M.R. & Tabin, C. (1995) A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell*, 82, 803–814.
- Liang, J.O., Etheridge, A., Hantsoo, L., Rubinstein, A.L., Nowak, S.J., Izpisúa Belmonte, J.C. & Halpern, M.E. (2000) Asymmetric nodal signaling in the zebrafish diencephalon positions the pineal organ. *Development*, 127, 5101–5112.
- **Lohr, J.L., Danos, M.C. & Yost, J.H.** (1997) Left-right asymmetry of a nodal-related gene is regulated by dorsoanterior midline structures during Xenopus development. *Development*, 124, 1465–1472.
- **Long, S., Ahmad, N. & Rebagliati, M.R.** (2003) The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. *Development*, 130, 2303–2316.
- **Louvi, A. & Artavanis-Tsakonas, S.** (2006) Notch signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 93–102.
- Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.V.E., Potter, S.S., Overbeek, P. & Kuehn, M.R. (1996) Conserved left–right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature*, 381, 158–161.
- Lozano-Velasco, E., Vallejo, D., Esteban, F.J., Doherty, C., Hernández-Torres, F., Franco, D. & Aránega, A.E. (2015) A Pitx2-miRNA pathway modulates cell proliferation in myoblasts and skeletal-muscle satellite cells and promotes their commitment to a myogenic cell fate. *Molecular and Cellular Biology*, MCB.00536–15.
- **Makalowski**, **W.** (2001) Are We Polyploids? A Brief History of One Hypothesis. *Genome Research*, 11, 667–670.
- Martínez-Fernandez, S., Hernández-Torres, F., Franco, D., Lyons, G.E., Navarro, F. & Aránega, A.E. (2006) Pitx2c overexpression promotes cell proliferation and arrests differentiation in myoblasts. *Developmental Dynamics*, 235, 2930–2939.
- Marusich, M.F., Furneaux, H.M., Henion, P.D. & Weston, J. a. (1994) Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *Journal of Neurobiology*, 25, 143–155.
- **Masai, I., Heisenberg, C.P., Barth, A.K., Macdonald, R., Adamek, S. & Wilson, S.W.** (1997) Floating head and masterblind regulate neuronal patterning in the roof of the forebrain. *Neuron*, 18, 43–57.

- **Matsumoto, M. & Hikosaka, O.** (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature*, 447, 1111–1115.
- **McCauley, D.W. & Bronner-Fraser, M.** (2003) Neural crest contributions to the lamprey head. *Development*, 130, 2317–2327.
- **Meek, J. & Nieuwenhuys, R.** (1998) Holosteans and Teleosts. In *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 759–937.
- **Mellinger**, **J.** (1989) Reproduction et développement des chondrichthyens. *Océanis*, 15, 283–308.
- **Mellinger, J.** (1994) L'œuf de roussette (Scyliorhinus canicula) au laboratoire: un matériel de recherche pour l'embryologiste, l'éthologiste, le physiologiste. *Ichtyophysiologica Acta*, 17, 9–27.
- Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y. & Hamada, H. (1996) Left–right asymmetric expression of the TGFβ-family member lefty in mouse embryos. *Nature*, 381, 151–155.
- **Mercola**, **M. & Levin**, **M.** (2001) Left-right asymmetry determination in vertebrates. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 779–805.
- Mi, D., Carr, C.B., Georgala, P. a., Huang, Y.T., Manuel, M.N., Jeanes, E., Niisato, E., Sansom, S.N., Livesey, F.J., Theil, T., Hasenpusch-Theil, K., Simpson, T.I., Mason, J.O. & Price, D.J. (2013) Pax6 Exerts regional control of cortical progenitor proliferation via direct repression of Cdk6 and Hypophosphorylation of pRb. *Neuron*, 78, 269–284.
- **Miklósi, Á. & Andrew, R.J.** (1999) Right eye use associated with decision to bite in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 105, 199–205.
- Miklósi, Á., Andrew, R.J. & Gasparini, S. (2001) Role of right hemifield in visual control of approach to target in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 122, 57–65.
- Mikula, S., Trotts, I., Stone, J.M. & Jones, E.G. (2007) Internet-enabled high-resolution brain mapping and virtual microscopy. *NeuroImage*, 35, 9–15.
- **Morcos**, P., Li, Y. & Jiang, S. (2008) Vivo-Morpholinos: A non-peptide transporter delivers Morpholinos into a wide array of mouse tissues. *BioTechniques*, 45, 613–623.
- **Morgan, M.J., O'Donnell, J.M. & Oliver, R.F.** (1973) Development of left-right asymmetry in the habenular nuclei of Rana temporaria. *The Journal of Comparative Neurology*, 149, 203–214.
- **Neugebauer**, **J.M. & Yost**, **J.H.** (2014) FGF signaling is required for brain left-right asymmetry and brain midline formation. *Developmental Biology*, 386, 123–134.
- Nguyen, V., Deschet, K., Henrich, T., Godet, E., Joly, J.-S., Wittbrodt, J., Chourrout, D. & Bourrat, F. (1999) Morphogenesis of the optic tectum in the medaka (Oryzias latipes): a

- morphological and molecular study, with special emphasis on cell proliferation. *The Journal of Comparative Neurology*, 413, 385–404.
- **Nieuwenhuys, R.** (1998) The Coelacanth Latimeria chalumnae. In *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1007–1043.
- **Nieuwenhuys, R. & Nicholson, C.** (1998) Lampreys, Petromyzontoidea. In *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 397–495.
- Nieuwenhuys, R., Donkelaar, H.J. ten & Nicholson, C. (1998) *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- **Nikitina, N., Bronner-Fraser, M. & Sauka-Spengler, T.** (2009a) The sea lamprey Petromyzon marinus: A model for evolutionary and developmental biology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4, 1–6.
- **Nikitina**, **N.**, **Bronner-Fraser**, **M. & Sauka-Spengler**, **T.** (2009b) DiI cell labeling in lamprey embryos. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4, 4–6.
- **Nikitina, N., Bronner-Fraser, M. & Sauka-Spengler, T.** (2009c) Microinjection of RNA and morpholino oligos into lamprey embryos. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4, 4–7.
- **Norton, W.H.J., Folchert, A. & Bally-Cuif, L.** (2008) Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, 511, 521–542.
- Ogawa, S., Ramadasan, P.N., Goschorska, M., Anantharajah, A., We Ng, K. & Parhar, I.S. (2012) Cloning and expression of tachykinins and their association with kisspeptins in the brains of zebrafish. *Journal of Comparative Neurology*, 520, 2991–3012.
- Ortiz, C.O., Faumont, S., Takayama, J., Ahmed, H.K., Goldsmith, A.D., Pocock, R., McCormick, K.E., Kunimoto, H., Iino, Y., Lockery, S. & Hobert, O. (2009) Lateralized Gustatory Behavior of C. elegans Is Controlled by Specific Receptor-Type Guanylyl Cyclases. *Current Biology*, 19, 996–1004.
- **Osório, J. & Rétaux, S.** (2008) The lamprey in evolutionary studies. *Development Genes and Evolution*, 218, 221–235.
- **Ota, K.G. & Kuratani, S.** (2008) Developmental biology of hagfishes, with a report on newly obtained embryos of the Japanese inshore hagfish, Eptatretus burgeri. *Zoological science*, 25, 999–1011.
- Oulion, S., Debiais-Thibaud, M., D'Aubenton-Carafa, Y., Thermes, C., Silva, C. Da, Bernard-Samain, S., Gavory, F., Wincker, P., Mazan, S. & Casane, D. (2010) Evolution of Hox Gene clusters in gnathostomes: Insights from a survey of a shark (Scyliorhinus canicula) transcriptome. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 2829–2838.
- Oulion, S., Borday-Birraux, V., Debiais-Thibaud, M., Mazan, S., Laurenti, P. & Casane, D. (2011) Evolution of repeated structures along the body axis of jawed vertebrates, insights from the Scyliorhinus canicula Hox code. *Evolution and Development*, 13, 247–259.

- **Pascual, A., Huang, K.-L., Neveu, J. & Préat, T.** (2004) Neuroanatomy: brain asymmetry and long-term memory. *Nature*, 427, 605–606.
- Pavlou, S., Astell, K., Kasioulis, I., Gakovic, M., Baldock, R., Heyningen, V. Van & Coutinho, P. (2014) Pleiotropic effects of Sox2 during the development of the zebrafish epithalamus. *PLoS ONE*, 9.
- **Peter, I.S. & Davidson, E.H.** (2011) Evolution of gene regulatory networks controlling body plan development. *Cell*, 144, 970–985.
- **Piavis, G.W.** (1961) Embryological Stages In The Sea Lamprey And Effects Of Temperature Development. *Fish And Wildlife Service*, 61, 111–143.
- **Pombal, M.A., Marín, O. & González, A.** (2001) Distribution of choline acetyltransferase-immunoreactive structures in the lamprey brain. *Journal of Comparative Neurology*, 431, 105–126.
- **Puelles, L.** (2001) Brain segmentation and forebrain development in amniotes. *Brain Research Bulletin*, 55, 695–710.
- **Puelles, L.** (2009) Forebrain Development: Prosomere Model. In *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier, pp. 315–319.
- **Puelles, L., Harrison, M., Paxinos, G. & Watson, C.** (2013) A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. *Trends in Neurosciences*, 36, 570–578.
- Quillien, A., Blanco-Sanchez, B., Halluin, C., Moore, J.C., Lawson, N.D., Blader, P. & Cau, E. (2011) BMP signaling orchestrates photoreceptor specification in the zebrafish pineal gland in collaboration with Notch. *Development (Cambridge, England)*, 138, 2293–2302.
- **Quina, L.A., Wang, S., Ng, L. & Turner, E.E.** (2009) Brn3a and Nurr1 mediate a gene regulatory pathway for habenula development. *The Journal of Neuroscience*, 29, 14309–14322.
- **Raya, A. & Izpisúa Belmonte, J.C.** (2006) Left-right asymmetry in the vertebrate embryo: from early information to higher-level integration. *Nature reviews. Genetics*, 7, 283–293.
- **Rebagliati, M.R., Toyama, R., Fricke, C., Haffter, P. & Dawid, I.B.** (1998) Zebrafish nodal-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Developmental Biology*, 199, 261–272.
- **Reddon, A.R., Gutiérrez-Ibáñez, C., Wylie, D.R. & Hurd, P.L.** (2009) The relationship between growth, brain asymmetry and behavioural lateralization in a cichlid fish. *Behavioural Brain Research*, 201, 223–228.
- **Regan, J.C., Concha, M.L., Roussigné, M., Russell, C. & Wilson, S.W.** (2009) An Fgf8-Dependent Bistable Cell Migratory Event Establishes CNS Asymmetry. *Neuron*, 61, 27–34.
- **Ribolsi, M., Daskalakis, Z.J., Siracusano, A. & Koch, G.** (2014) Abnormal Asymmetry of Brain Connectivity in Schizophrenia. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8, 1–11.

- **Richardson, M.K. & Wright, G.M.** (2003) Developmental transformations in a normal series of embryos of the sea lamprey Petromyzon marinus (Linnaeus). *Journal of Morphology*, 257, 348–363.
- **Richardson, M.K., Admiraal, J. & Wright, G.M.** (2010) Developmental anatomy of lampreys. *Biological Reviews*, 85, 1–33.
- Rodríguez-Moldes, I., Timmermans, J.P., Adriaensen, D., Groodt-Lasseel, M.H.A., Scheuermann, D.W. & Anadón, R. (1990) Asymmetric distribution of calbindin-D28K in the ganglia habenulae of an elasmobranch fish. *Anatomy and Embryology*, 181, 389–391.
- **Rogers, L.J.** (2008) Development and function of lateralization in the avian brain. *Brain Research Bulletin*, 76, 235–244.
- Romášek, M., Square, T., Jandzik, D. & Meulemans Medeiros, D. (2015) CRISPR/Cas system in the sea lamprey: A tool for understanding ancestral gene functions in vertebrates [WWW Document]. URL http://www.sicb.org/meetings/2015/schedule/abstractdetails.php?id=1005 [accessed on 2015].
- Roussigné, M., Bianco, I.H., Wilson, S.W. & Blader, P. (2009) Nodal signalling imposes left-right asymmetry upon neurogenesis in the habenular nuclei. *Development*, 136, 1549–1557.
- **Roussigné, M., Blader, P. & Wilson, S.W.** (2012) Breaking symmetry: The zebrafish as a model for understanding left-right asymmetry in the developing brain. *Developmental Neurobiology*, 72, 269–281.
- Royer, C., Delcroix, N., Leroux, E., Alary, M., Razafimandimby, A., Brazo, P., Delamillieure, P. & Dollfus, S. (2015) Functional and structural brain asymmetries in patients with schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophrenia Research*, 161, 210–214.
- Santos-Durán, G.N., Menuet, A., Lagadec, R., Mayeur, H., Ferreiro-Galve, S., Mazan, S., Rodríguez-Moldes, I. & Candal, E. (2015) Prosomeric organization of the hypothalamus in an elasmobranch, the catshark Scyliorhinus canicula. *Frontiers in Neuroanatomy*, 09, 1–17.
- **Sauka-Spengler, T., Meulemans, D., Jones, M. & Bronner-Fraser, M.** (2007) Ancient Evolutionary Origin of the Neural Crest Gene Regulatory Network. *Developmental Cell*, 13, 405–420.
- **Sauka-Spengler, T., Baratte, B., Lepage, M. & Mazan, S.** (2003) Characterization of Brachyury genes in the dogfish S. canicula and the lamprey L. fluviatilis. Insights into gastrulation in a chondrichthyan. *Developmental Biology*, 263, 296–307.
- **Schultz, W.** (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, 80, 1–27.
- **Schweickert, A., Campione, M., Steinbeisser, H. & Blum, M.** (2000) Pitx2 isoforms: Involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. *Mechanisms of Development*, 90, 41–51.

- Schwenk, J., Metz, M., Zolles, G., Turecek, R., Fritzius, T., Bildl, W., Tarusawa, E., Kulik, A., Unger, A., Ivankova, K., *et al.* (2010) Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature*, 465, 231–235.
- **Sharp, P.E., Turner-Williams, S. & Tuttle, S.** (2006) Movement-related correlates of single cell activity in the interpeduncular nucleus and habenula of the rat during a pellet-chasing task. *Behavioural Brain Research*, 166, 55–70.
- **Shen, M.M.** (2007) Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development*, 134, 1023–1034.
- **Shimeld, S.M. & Donoghue, P.C.J.** (2012) Evolutionary crossroads in developmental biology: cyclostomes (lamprey and hagfish). *Development*, 139, 2091–2099.
- **Signore, I.A., Guerrero, N., Loosli, F., Colombo, A., Villalón, A., Wittbrodt, J. & Concha, M.L.** (2009) Zebrafish and medaka: model organisms for a comparative developmental approach of brain asymmetry. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364, 991–1003.
- **Smeets, W.J.A.J.** (1998) Cartilaginous Fishes. In *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 551–654.
- Smith, J.J., Antonacci, F., Eichler, E.E. & Amemiya, C.T. (2009) Programmed loss of millions of base pairs from a vertebrate genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 11212–11217.
- Smith, J.J., Stuart, A.B., Sauka-Spengler, T., Clifton, S.W. & Amemiya, C.T. (2010) Development and analysis of a germline BAC resource for the sea lamprey, a vertebrate that undergoes substantial chromatin diminution. *Chromosoma*, 119, 381–389.
- **Smith, J.J. & Keinath, M.C.** (2015) The sea lamprey meiotic map improves resolution of ancient vertebrate genome duplications. *Genome Research*, 1–10.
- Smith, J.J., Kuraku, S., Holt, C., Sauka-Spengler, T., Jiang, N., Campbell, M.S., Yandell, M.D., Manousaki, T., Meyer, A., Bloom, O.E., et al. (2013) Sequencing of the sea lamprey (Petromyzon marinus) genome provides insights into vertebrate evolution. *Nature genetics*, 45, 415–21, 421e1–2.
- **Snelson, C.D., Santhakumar, K., Halpern, M.E. & Gamse, J.T.** (2008a) Tbx2b is required for the development of the parapineal organ. *Development*, 135, 1693–1702.
- **Snelson, C.D., Burkart, J.T. & Gamse, J.T.** (2008b) Formation of the asymmetric pineal complex in zebrafish requires two independently acting transcription factors. *Developmental Dynamics*, 237, 3538–3544.
- **Snelson, C.D. & Gamse, J.T.** (2009) Building an asymmetric brain: Development of the zebrafish epithalamus. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 491–497.
- **Sorensen, A.D.** (1894) Comparative study of the epiphysis and roof of the diencephalon. *Journal of Comparative Neurology*, 4, 153–170.

- **Soukup, V., Yong, L., Lu, T.-M., Huang, S.-W., Kozmik, Z. & Yu, J.-K.** (2015) The Nodal signaling pathway controls left-right asymmetric development in amphioxus. *EvoDevo*, 6, 5.
- **Southall, E.J. & Sims, D.W.** (2003) Shark skin: a function in feeding. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270 Suppl, S47–S49.
- **Stephenson-Jones, M., Floros, O., Robertson, B. & Grillner, S.** (2012) PNAS Plus: Evolutionary conservation of the habenular nuclei and their circuitry controlling the dopamine and 5-hydroxytryptophan (5-HT) systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, E164–E173.
- Sun, T., Patoine, C., Abu-Khalil, A., Visvader, J., Sum, E., Cherry, T.J., Orkin, S.H., Geschwind, D.H. & Walsh, C. a. (2005) Early asymmetry of gene transcription in embryonic human left and right cerebral cortex. *Science*, 308, 1794–1798.
- **Sun, T. & Walsh, C. a**. (2006) Molecular approaches to brain asymmetry and handedness. *Nature reviews. Neuroscience*, 7, 655–662.
- **Sutherland, R.J.** (1982) The dorsal diencephalic conduction system: A review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 6, 1–13.
- **Tahara, Y.** (1988) Normal Stages of Development in Lamprey, Lampetra reissneri (Dybowski). *Zoological Science*, 5, 109–118.
- Taylor, R.W., Qi, J.Y., Talaga, A.K., Ma, T.P., Pan, L., Bartholomew, C.R., Klionsky, D.J., Moens, C.B. & Gamse, J.T. (2011) Asymmetric Inhibition of Ulk2 Causes Left-Right Differences in Habenular Neuropil Formation. *Journal of Neuroscience*, 31, 9869–9878.
- **Toga, A.W. & Thompson, P.M.** (2003) Mapping brain asymmetry. *Nature reviews. Neuroscience*, 4, 37–48.
- Venkatesh, B., Kirkness, E.F., Loh, Y.H., Halpern, A.L., Lee, A.P., Johnson, J., Dandona, N., Viswanathan, L.D., Tay, A., Venter, J.C., Strausberg, R.L. & Brenner, S. (2007) Survey sequencing and comparative analysis of the elephant shark (Callorhinchus milii) genome. *PLoS Biology*, 5, 932–944.
- **Villalón, A., Sepúlveda, M., Guerrero, N., Meynard, M.M., Palma, K. & Concha, M.L.** (2012) Evolutionary plasticity of habenular asymmetry with a conserved efferent connectivity pattern. *PLoS ONE*, 7.
- **Voogd, J., Nieuwenhuys, R., Dongen, P.A.M. van & Donkelaar, H.J. ten.** (1998) Mammals. In *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1637–2097.
- **Wallar, B.J. & Alberts, A.S.** (2003) The formins: Active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 13, 435–446.

- Wan, C.Y., Marchina, S., Norton, A. & Schlaug, G. (2012) Atypical hemispheric asymmetry in the arcuate fasciculus of completely nonverbal children with autism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1252, 332–337.
- Wang, Y., Dakubo, G.D., Thurig, S., Mazerolle, C.J. & Wallace, V.A. (2005) Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development (Cambridge, England)*, 132, 5103–5113.
- Watanabe, H., Schmidt, H.A., Kuhn, A., Höger, S.K., Kocagöz, Y., Laumann-Lipp, N., Özbek, S. & Holstein, T.W. (2014) Nodal signalling determines biradial asymmetry in Hydra. *Nature*, 515, 112–115.
- Wicht, H. & Nieuwenhuys, R. (1998) Hagfishes (Myxinoidea). In *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 497–549.
- Wu, S.-Y., Borsetti, N.H. de, Bain, E.J., Bulow, C.R. & Gamse, J.T. (2014) Mediator subunit 12 coordinates intrinsic and extrinsic control of epithalamic development. *Developmental Biology*, 385, 13–22.
- Wyffels, J., King, B.L., Vincent, J., Chen, C., Wu, C.H. & Polson, S.W. (2014) SkateBase, an elasmobranch genome project and collection of molecular resources for chondrichthyan fishes. *F1000Research*, 3.
- Yan, Y.-T., Gritsman, K., Ding, J., Burdine, R.D., Corrales, J.D., Price, S.M., Talbot, W.S., Schier, A.F. & Shen, M.M. (1999) Conserved requirement for EGF-CFC genes in vertebrate left-right axis formation. *Genes & Development*, 13, 2527–2537.
- Yáñez, J., Pombal, M.A. & Anadón, R. (1999) Afferent and efferent connections of the parapineal organ in lampreys: A tract tracing and immunocytochemical study. *Journal of Comparative Neurology*, 403, 171–189.
- **Yoshida, K. & Saiga, H.** (2011) Repression of Rx gene on the left side of the sensory vesicle by Nodal signaling is crucial for right-sided formation of the ocellus photoreceptor in the development of Ciona intestinalis. *Developmental Biology*, 354, 144–150.
- Yu, E.Z., Hallenbeck, J.M., Cai, D. & McCarron, R.M. (2002) Elevated arylalkylamine-Nacetyltransferase (AA-NAT) gene expression in medial habenular and suprachiasmatic nuclei of hibernating ground squirrels. *Molecular Brain Research*, 102, 9–17.
- **Yu, S., Avery, L., Baude, E. & Garbers, D.L.** (1997) Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: a new family of chemosensory receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 3384–3387.
- **Zhao, H. & Rusak, B.** (2005) Circadian firing-rate rhythms and light responses of rat habenular nucleus neurons in vivo and in vitro. *Neuroscience*, 132, 519–528.
- Zhou, X., Babu, J.R., Silva, S. da, Shu, Q., Graef, I. a, Oliver, T., Tomoda, T., Tani, T., Wooten, M.W. & Wang, F. (2007) Unc-51-like kinase 1/2-mediated endocytic processes

regulate filopodia extension and branching of sensory axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 5842–5847.

**Zhu, M., Zhao, W., Jia, L., Lu, J., Qiao, T. & Qu, Q.** (2009) The oldest articulated osteichthyan reveals mosaic gnathostome characters. *Nature*, 458, 469–474.

## **Summary**

# Mechanisms of lateralization in the epithalamus of the catshark and the lamprey

Vertebrates are part of the bilaterally symmetric animals but this one is not perfect and numerous asymmetries can be seen between the left and right sides, especially in the nervous system. The epithalamus has proven itself to be the model system for brain lateralization mechanisms' studies. This structure derived from the dorsal diencephalon contains by the bilaterally paired habenular nuclei and the pineal complex, which includes the pineal gland and parapineal organ. The habenulae exhibit more or less marked left-right asymmetries among most of the major vertebrate taxa. The parapineal is also asymmetrical but it is absent in many taxa. Zebrafish is the model system for the studies of the developmental mechanisms of epithalamic asymmetries. In this species, a lateralized parapineal migration is required for the establishment of habenular asymmetries. The underlying genetic mechanisms have also been partially decrypted. The first conspicuous asymmetry in the dorsal diencephalon corresponds to a left-sided expression of components of the Nodal signalling pathway. This asymmetric Nodal signalling activity is essential to induce an early neurogenetic asymmetry but not necessary the formation of epithalamic asymmetries per se. Its role is restricted to provide a bias to the parapineal organ's lateralized migration, and thus influence the laterality of epithalamic asymmetries. Indeed, habenular asymmetries are induced by the final position of the parapineal organ. Conservation of these mechanisms described in zebrafish across vertebrates remains an open question.

During this thesis, I tried to understand the evolution of these mechanisms by studying a Chondrichthyes, the catshark *Scyliorhinus canicula* and cyclostomes, the lampreys *Petromyzon marinus* and *Lampetra planeri*. Their phylogenetic position and the major asymmetries in size observed between their left and right habenulae make these species good model systems to understand the origin of these mechanisms in vertebrates. My work leads to three main conclusions:

- (1) As in zebrafish, we have found an asymmetric expression of the components of the Nodal signalling pathway in the left dorsal diencephalon of the catshark and the lamprey. The laterality of the asymmetry is conserved between these three species, which allows us to exclude a reversed laterality in lampreys like it was proposed on the basis of arguments related to the size of habenular nuclei.
- (2) The Nodal signalling pathway is required for the establishment of habenular asymmetries in the catshark and lamprey thus suggesting an ancestral role in the development of epithalamic asymmetries.
- (3) A detailed analysis of proliferation-differentiation patterns in the catshark habenulae during their development highlighted multiple cellular and molecular asymmetries. In particular it showed the existence of an earlier left-sided asymmetric neurogenesis.

These studies provide new insights about the origin and diversification of the mechanisms controlling the establishment of vertebrates' brain asymmetries. The study of the lamprey and the dogfish, two unconventional model systems open new perspectives for their understanding.

#### Key words:

Left-Right asymmetry / Evo-Devo / Habenula / Nodal / Neurogenesis / Lamprey / Catshark

## Résumé

# Mécanismes de latéralisation de l'épithalamus chez la lamproie et la roussette

Les vertébrés font partie des animaux à symétrie bilatérale mais celle-ci n'est pas parfaite et de nombreuses asymétries sont visibles entre les côtés gauche et droit, notamment au niveau du système nerveux. L'épithalamus s'est imposé comme le modèle de référence pour l'étude des mécanismes de latéralisation du cerveau. Cette structure dérivée du diencéphale dorsal se compose de deux noyaux bilatéraux, les habenulæ et du complexe pinéal, qui regroupe les glandes pinéale et parapinéale. Les habenulæ présentent des asymétries plus ou moins marquées chez tous les grands groupes de vertébrés. La parapinéale est également asymétrique mais elle est absente dans de nombreux taxa. Chez le poisson zèbre, espèce modèle de référence pour l'étude des mécanismes de formation des asymétries épithalamiques, une migration latéralisée de la parapinéale est nécessaire à l'élaboration des asymétries habénulaires. Les mécanismes génétiques sous-jacents ont également été en partie décryptés. La première asymétrie visible dans le diencéphale dorsal correspond à une activité de la voie de signalisation Nodal à gauche. Si cette voie Nodal est essentielle pour induire une asymétrie neurogénétique précoce, elle ne l'est pas pour la formation des asymétries épithalamiques définitives. Son rôle se restreint à biaiser la directionnalité des asymétries en influençant la migration de la parapinéale. Les asymétries habénulaires sont induites par la position finale de la parapinéale. La conservation à l'échelle des vertébrés des mécanismes décrits chez le poisson-zèbre reste une question ouverte.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai cherché à comprendre l'évolution de ces mécanismes en étudiant un chondrichtyen, la roussette *Scyliorhinus canicula* et des cyclostomes, les lamproies *Petromyzon marinus* et *Lampetra planeri*. Leur position phylogénétique ainsi que les asymétries majeures en taille observées entre les habenulæ gauche et droite font de ces espèces de bons modèles pour comprendre leur origine chez les vertébrés. Mes travaux conduisent à trois conclusions principales :

- (1) on retrouve, comme chez le poisson zèbre, une expression asymétrique de la voie Nodal dans le diencéphale dorsal gauche de la lamproie et de la roussette; la directionnalité de cette asymétrie est conservée entre les trois espèces, ce qui permet d'exclure une inversion de latéralité précédemment proposée chez la lamproie sur la base d'arguments de taille relative des habenulæ
- (2) La voie Nodal est essentielle à la formation des asymétries habénulaires chez la roussette et la lamproie, ce qui suggère un rôle ancestral dans l'élaboration des asymétries épithalamiques.
- (3) une analyse détaillée des patrons de prolifération-différenciation des habenulæ au cours du développement de la roussette met en évidence des asymétries moléculaires et cellulaires multiples; elle démontre en particulier l'existence d'une neurogenèse asymétrique qui débute plus précocement à gauche.

Ces travaux donnent un éclairage nouveau sur l'origine et la diversification des mécanismes contrôlant la formation des asymétries cérébrales chez les vertébrés. L'étude de la roussette et la lamproie, deux organismes modèles non conventionnels, ouvrent de nouvelles perspectives pour leur compréhension.

#### Mots clés :