

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANÇON
Année 2005-2006 N° 25.06.09

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

**Contribution à l'étude de la structuration du diencéphale
ventral de rat au cours du développement**

THESE

présentée et soutenue publiquement
le 21 Novembre 2006

par

Clotilde AMIOT

Née le 17/01/1975 à Vesoul (70)

Membres du Jury :

BRETON C	Rapporteur	Université de Lille 1
CIOFI P	Rapporteur	INSERM U 378, Bordeaux
WELKER E	Examineur	Université de Lausanne
MOULIN T	Examineur	Université de Franche-Comté
RETAUX S	Examineur	CNRS UPR 2197, Gif-sur-Yvette
RISOLD PY	Directeur de thèse	Université de Franche-Comté
FELLMANN D	Examineur	Université de Franche-Comté

Ces travaux ont été réalisés sous la direction du Docteur Pierre-Yves Risold,
au sein de l'équipe d'accueil EA 3922
« estrogènes, régulation génique et pathologies du système nerveux central »
dirigée par le Professeur Michèle Jouvenot
et membre de l'IFR 133 – IBCT.

J'exprime mes plus vifs remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur Pierre-Yves Risold, dont la grande disponibilité, la rigueur scientifique et l'étendue des connaissances forcent l'admiration. Que ce travail soit le témoignage de ma profonde estime.

J'adresse mes profonds remerciements à Monsieur le Professeur Dominique Fellmann, qui me fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. La confiance qu'il m'a accordée depuis de nombreuses années, ses conseils et sa ténacité m'ont particulièrement touchée.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Professeur Christophe Breton en ayant accepté d'être rapporteur de ce travail et je le remercie de ses remarques constructives. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance.

J'adresse mes profonds remerciements à Monsieur le Docteur Philippe Ciofi, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur et de juger ce travail. Qu'il soit assuré de ma gratitude.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur Egbert Welker, dont la présence à ce jury m'honore. Au cours des mois passés dans son équipe, j'ai été impressionnée par ses très grandes qualités professionnelles et humaines. Son accueil et son intérêt m'ont profondément touchée. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

J'adresse mes respectueux remerciements à Monsieur le Professeur Thierry Moulin, que j'ai l'honneur de compter parmi mes juges. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier vivement Madame le Docteur Sylvie Rétaux d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'elle soit assurée de ma sincère reconnaissance.

Un grand merci à tout le personnel du laboratoire : Gabrielle, Fabrice, Claude J., Annie, Claude C., Christophe H. et Martine, pour leur aide.

A Christophe

A Mathilde

A mes parents

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	2
INTRODUCTION	7
I. Rappel bibliographique	11
II. Rappel sur les neurones à Hcrt et connexions des neurones de l'hypothalamus postérieur	17
III. Fonctions attribuées aux neurones à MCH et à Hcrt	19
IV. Anatomie comparée/phylogenèse	21
V. Gènes du développement	23
VI. Hypothèse de travail et objectifs	35
MATERIELS ET METHODES	36
TAMPONS ET SOLUTIONS	55
RESULTATS	58
I. Genèse des neurones à Hcrt dans le diencephale ventral de rat	59
II. Travaux chez l'embryon	61
A. Définition des axes de l'embryon	61
B. Outils utilisés : spécificité et mise en œuvre	64
C. Distribution spatiotemporelle des différents facteurs de transcription	66
1. Stade embryonnaire E10 et E11	66
2. Stade embryonnaire E12	74
3. Stade embryonnaire E13	86
4. Stade embryonnaire E14	105
5. Stade embryonnaire E15	126
6. Stades embryonnaires ultérieurs et adulte	143
D. Embryons de souris Pax6 ^{-/-} au stade E18	145
DISCUSSION	147
I. Considérations techniques et données de la littérature	149
II. Genèse des neurones à Hcrt	151
III. Territoires d'expression des différents gènes et données de la littérature	154
IV. Expression des différents gènes et différenciation des premiers tractus de fibres	159
DISCUSSION GENERALE	163
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	170
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	173

ABBREVIATIONS

ac	commissure antérieure
ADN	acide désoxyribonucléique
AH	aire hypothalamique antérieure
AHN	noyau hypothalamique antérieur
AL	lobe antérieur de l'hypophyse
AMY	amygdale
ANT	hypothalamus antérieur
AON	noyau olfactif antérieur
AQ	aqueduc cérébral
ard	voute dorsale (« dorsal arch »)
ARH	noyau arqué de l'hypothalamus
ARNm	acide ribonucléique messenger
avec	partie caudale de l'angle ventral
A13	aire dopaminergique A13
BMP	« bone morphogenetic protein »
BrdU	5-bromo-2'-déoxyuridine
BST	noyaux du lit de la strie terminale
CART	« cocaine- and amphetamine-regulated transcript »
cf	flexure céphalique
ctx	cortex cérébral
chp	plexus choroïdes
CP	caudoputamen
cpd	pédoncule cérébral
css	sulcus corticostriatal
DMH	noyau hypothalamique dorsomédian
DH	hypothalamus dorsal
drp	« diencephalic roof plate »
FMA	formations magnocellulaires associées
fr	fasciculus retroflexus
fx	fornix
GABA	acide gamma-amino-butyrique
GP	globus pallidus
GRF	« growth hormone-releasing factor » ou somatocitrine
Hert	hypocrétine/orexine

HIP	hippocampe
hs	sulcus hippocampal
HYP	hypothalamus
HYPv	hypothalamus ventral
ic	capsule interne
IL	lobe intermédiaire de l'hypophyse
IS	immunsérum
ISO	isocortex
OB	bulbe olfactif
lam	lame terminale
let	lame épithéliale
LHA	aire hypothalamique latérale
LS	aire septale latérale
LSN	noyau latéral du septum
MAM	corps mamillaires
MCH	hormone de mélanocortination
rMCH	MCH de rat
sMCH	MCH de saumon
M	manteau
ME	éminence médiane
mf	faisceau médian du télencéphale
mf ant	segment antérieur du faisceau médian du télencéphale
mf post	segment postérieur du faisceau médian du télencéphale
MM	noyau mamillaire médian
MOB	bulbe olfactif principal
MRN	noyau réticulé mésencéphalique
MS	aire médiane du septum
MSN	noyau médian du septum
mtt	faisceau mamillothalamique
NE	neuroépithélium germinatif
NEI	peptide acide glutamique-isoleucine-amide
NF	neurofilament
NGE	peptide glycine-acide-glutamique
NK3	neurokinine-3

NL	lobe postérieur de l'hypophyse
och	chiasma optique
opt	tractus optique
OPV	vésicule optique
OT	tubercule olfactif
os	tige optique
pc	post-coïtal
PAL	pallidum
PH	noyau hypothalamique postérieur
PHA	aire hypothalamique postérieure
PIR	cortex piriforme
PLR	éminence du pallidum
PMv	noyau prémamillaire ventral
PRO	aire préoptique hypothalamique
pts	sulcus pallidothalamique
PVH	noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
PVp	noyau hypothalamique périventriculaire postérieur
RCH	aire rétrochiasmatique
sbv	couche subventriculaire
SEP	septum
SPR	éminence du septum
sfi	sulcus fimbrial
she	sulcus hémisphérique
shy	sulcus hypothalamique
sm	strie médullaire
sme	sulcus médullaire
SN	substance noire
SNC	système nerveux central
SO	noyau supraoptique
sopt	sulcus opticus
sot	tractus supraoptique
sps	sulcus striatopallidal
SR	éminence du striatum
st	strie terminale

ste	sulcus terminal
STN	noyau sous-thalamique
STR	striatum
SUM	noyau supramamillaire
SVZ	zone subventriculaire
TC	tectum
tél	télocéphale
TEM	eminencia thalami
TGv	tegmentum ventral
tpoc	tractus de la commissure post-optique
TH	tyrosine hydroxylase
THd	thalamus dorsal
THv	thalamus ventral
TT	taenia tecta
TUB	hypothalamus tubéral
TUBd	hypothalamus tubéral dorsal
TUBv	hypothalamus tubéral ventral
ven	couche ventriculaire
VL	ventricule latéral
vlt	tractus hypothalamique ventrolatéral
V3	troisième ventricule
V4	quatrième ventricule
VMH	noyau ventromédian
VTA	aire tegmentale ventrale
ZI	zona incerta
zli	zona limitans intrathalamica

INTRODUCTION

L'hypothalamus suscite depuis de nombreuses années l'intérêt d'un nombre croissant d'investigateurs. En effet, bien que ne représentant qu'1% de la masse cérébrale chez l'homme, l'hypothalamus détient un rôle fondamental dans le maintien des grands équilibres homéostatiques et le contrôle des comportements associés à la reproduction. Il contribue ainsi à assurer la survie à la fois des individus et de l'espèce.

Anatomiquement, l'hypothalamus est localisé dans le diencephale ventral et il est séparé en deux moitiés symétriques situées de part et d'autre du troisième ventricule. Le concept d'hypothalamus en tant qu'entité neurologique remonte à la fin du XIX^{ème} siècle, mais la découverte et la description des principales masses neuronales et des faisceaux de fibres constituant cette région datent majoritairement du début du XX^{ème} siècle. Il résulte de ces descriptions une nomenclature riche et multiple, puisque chaque auteur propose sa propre terminologie. Il faut attendre les travaux de Le Gros Clarke en 1938 puis de Crosby et Woodburne en 1940 pour fixer la nomenclature et pour qu'émerge une organisation anatomique de l'hypothalamus acceptée par l'ensemble de la communauté scientifique. D'après ces auteurs, l'hypothalamus se divise en trois zones longitudinales médiolatérales (périverriculaire, médiane et latérale) et en quatre régions rostrocaudales (préoptique, antérieure, tubérale et mamillaire) définies par les noyaux de la zone médiane (préoptique médian, hypothalamique antérieur, ventromédial et mamillaire). Ainsi l'hypothalamus est organisé en douze compartiments contenant l'ensemble des noyaux hypothalamiques reconnus. La zone périverriculaire est une petite région constituée de noyaux relativement bien différenciés. Elle renferme la majeure partie des neurones à projection hypophysaire et elle est essentiellement associée à des fonctions neuroendocrines. La zone médiane, occupée par les noyaux définissant les quatre régions rostrocaudales précédemment citées, est associée aux fonctions d'initiation de certains comportements motivés, tels que les comportements de défense et de reproduction. Enfin la zone latérale constitue un territoire peu différencié, où des neurones se distribuent de manière diffuse parmi les fibres du faisceau médian du télencéphale (*mfb*), elle est associée à la modulation des comportements motivés (Swanson, 1987).

Bien qu'admise par l'ensemble de la communauté scientifique, l'évolution des connaissances de la chémoarchitecture du système nerveux central (SNC) bouscule certaines des certitudes concernant de nombreuses frontières définies par la cytoarchitecture. Il est reconnu notamment que la distribution de neurotransmetteurs et neuropeptides ne respecte qu'exceptionnellement les frontières cytoarchitectoniques. Un exemple parmi d'autres est celui des neurones à vasopressine et à ocytocine. Ces neurones neuroendocriniens se

distribuent dans le noyau paraventriculaire (PVH), les formations magnocellulaires associées (FMA) et le noyau supraoptique (SO). On ne saurait toutefois d'un point de vue anatomique réunir PVH, FMA et SO dans la zone périventriculaire.

Depuis de nombreuses années, notre équipe travaille dans le domaine de la « neuroanatomie chimique » et s'intéresse notamment à l'organisation morphofonctionnelle de deux populations neuronales respectivement productrices de l'hormone de mélanocortination (MCH) et des hypocrélines/orexines (Hcr). Classiquement, ces deux populations sont considérées comme étant spécifiques de l'hypothalamus latéral postérieur (LHA), mais l'analyse détaillée de leur distribution montre que les soma neuronaux les composant sont également localisés dans l'hypothalamus médian au sein des noyaux hypothalamiques antérieur et dorsomédian, ainsi que pour les neurones à MCH dans l'hypothalamus périventriculaire et dans des structures adjacentes à l'hypothalamus, en particulier les régions rostromédianes de la *zona incerta*, qui anatomiquement fait partie du thalamus. Pourtant les neurones à MCH naissent tous à partir des mêmes régions du neuroépithélium germinatif. Ces observations ont été à la base de la description de ladite « zone à MCH », qui correspond aux structures diencephaliques contenant les neurones à MCH. Ce concept de « zone à MCH » s'accommode donc mal des frontières cytoarchitectoniques classiques, puisqu'elle s'étend aux trois zones longitudinales médiolaterales ainsi que de l'hypothalamus antérieur dorsal à l'hypothalamus postérieur.

D'après la littérature, c'est aussi de par des études du développement que la remise en question de l'organisation classiquement admise du diencephale est la plus probante. En effet, par l'analyse de l'expression de gènes à homéoboîte, des auteurs ont réactualisé la théorie neuromérique développée dans les années 50 par Berquist et Kallen puis un peu oubliée (Berquist, 1952 ; Berquist et Kallen, 1954). Cette théorie est aujourd'hui bien acceptée en biologie du développement, notamment en ce qui concerne le rhombencéphale. En effet, les rhombomères sont les meilleurs exemples de différenciation transversale dans le cerveau embryonnaire précoce, comme l'illustre l'expression des gènes de la famille des Hox. Mais un tel consensus n'existe pas pour les régions antérieures du SNC (Nieuwenhuys et coll., 1997). Nombre d'auteurs s'accordent à décrire trois prosomères situés dans le diencephale, mais n'impliquent pas l'hypothalamus. Ces travaux, actuellement peu pris en compte par les anatomistes et physiologistes de l'hypothalamus, remettent totalement en question l'organisation anatomique du diencephale. Ainsi l'hypothalamus ne constituerait plus une entité ventrale mais rostrale au thalamus. Certains auteurs l'excluent simplement du diencephale, sa position étant alors mal précisée entre télencéphale et diencephale.

Sur la base des constatations rapidement exposées ci-dessus, nous émettons l'hypothèse que les données récentes de la chémoarchitecture et du développement de l'hypothalamus doivent nous permettre de réviser l'organisation de cette structure et peut-être en tout premier lieu de vérifier son existence en tant qu'entité neurologique.

I. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

A. NEURONES A MCH

Les neurones producteurs de la préproMCH ont été mis en évidence fortuitement pour la première fois en 1979 par un anticorps anti- α MSH (« α -melanocyte stimulating hormone ») chez le rat, puis dans les dix années suivantes ils ont été décrits avec des anticorps anti-GRF37 (« growth hormone-releasing factor 1-37 »), anti-CRF (« corticotropin-releasing factor » ou corticolibérine) et anti-sMCH (MCH de saumon) (Watson et Akil ; 1979 ; Daikoku et coll., 1985 ; Fellmann et coll., 1986 ; Fellmann et coll., 1987). Chez les mammifères, le gène de la MCH est constitué de trois exons et de deux introns. En raison d'un processus d'épissage alternatif, le transcrit correspond, soit à l'acide ribonucléique messager (ARNm) préproMCH qui comporte les trois exons, soit à l'ARNm préproMGOP (« MCH gene overprinted polypeptide ») qui est dépourvu de l'exon II (Toumaniantz et coll., 1996). Les ARNm sont traduits en protéines : d'une part la préproMCH et d'autre part le MGOP (Griffond et Baker, 2002). La caractérisation du précurseur de la MCH ou préproMCH a permis de découvrir de nouveaux peptides potentiels issus de ce précurseur, en plus de la MCH : il s'agit des neuropeptides glycine-acide-glutamique (NGE) et acide glutamique-isoleucine-amide (NEI) (Nahon, 1994). A ce jour, seuls la MCH et le NEI ont été décrits comme des peptides clivés, à partir de culture de cellules d'hypothalamus de rat (Parkes et Vale, 1992). Reste à déterminer si le NGE peut être généré à partir du précurseur et en quantité physiologiquement significative (Fig. 1).

B. DISTRIBUTION DU SYSTEME MCH CHEZ LE RAT

En 1992, Bittencourt et collaborateurs fournissent la description du système MCH chez le rat par immunohistochimie avec un immunsérum (IS) anti-rMCH et par hybridation *in situ* avec des oligosondes hybridant spécifiquement l'ARNm rMCH (MCH de rat) (Bittencourt et coll., 1992). Ce travail confirme la localisation préférentielle du site de synthèse de la préproMCH dans le diencephale ventral, mais identifie aussi deux autres territoires d'expression minoritaire du gène dans les tubercules olfactifs et le tegmentum dorsal (Bittencourt et coll., 1992, Presse et coll., 1992). Chez des rats femelles en lactation, une expression MCH dans la partie rostrale du noyau paraventriculaire, dans le noyau périventriculaire préoptique et dans la partie médiane du noyau préoptique médian a été décrite dans un travail (Knollema et coll., 1992), mais jamais confirmée depuis. Ainsi, le terme de système à MCH est appliqué aux

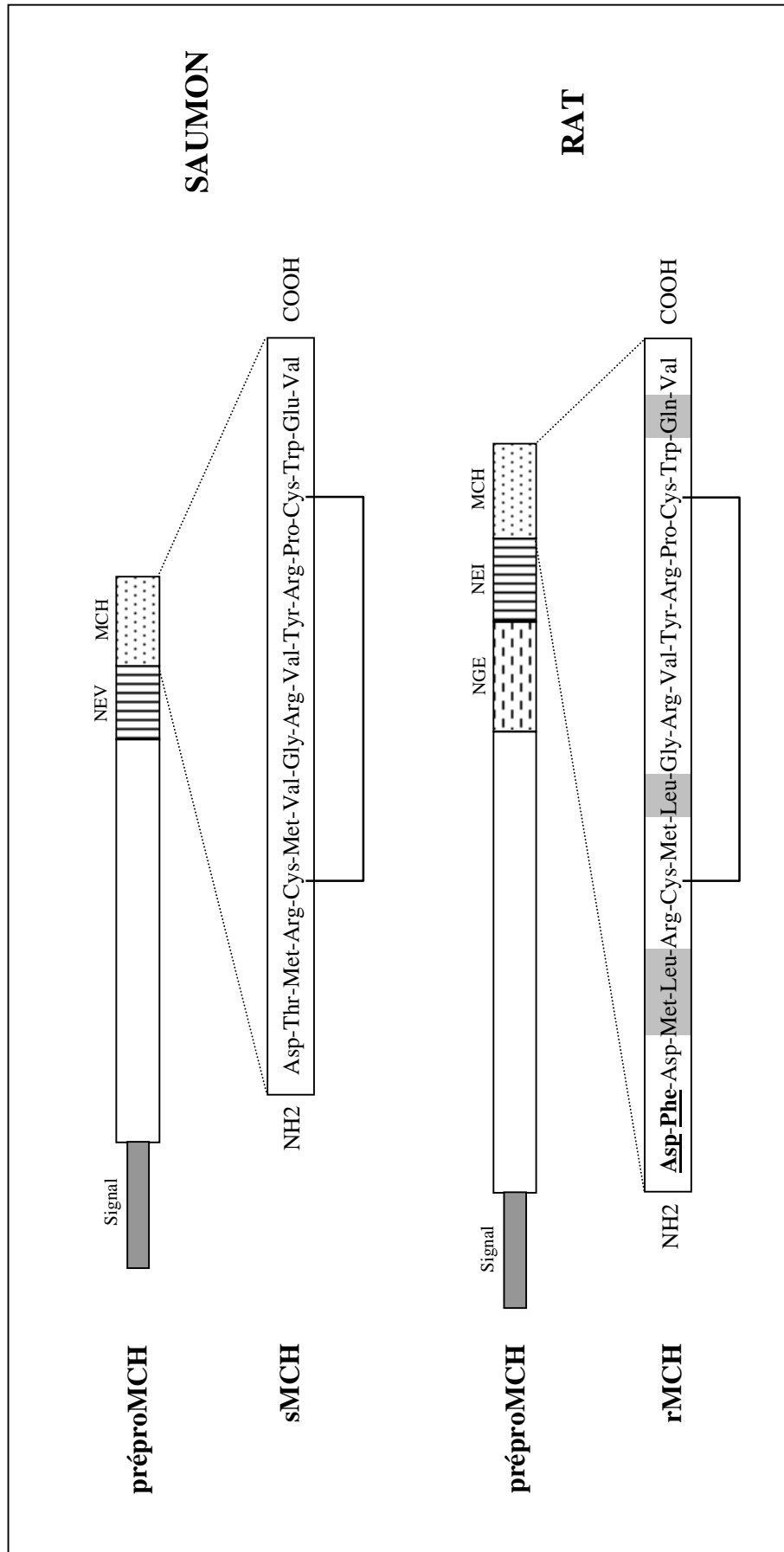


Fig. 1 : Comparaison des précurseurs et des séquences peptidiques de la MCH de saumon et de rat. Dans la séquence peptidique de la MCH de rat, les deux acides aminés supplémentaires en N-terminal sont représentés en gras et soulignés, alors que les quatre acides aminés substitués sont représentés sur fond gris.

neurones du diencephale ventral postérieur décrits ci-dessous. Les autres neurones exprimant ce peptide, fort peu étudiés jusqu'à présent, seront ignorés dans la suite de ce travail.

Dans le diencephale de rat adulte, les neurones à MCH, bien que très souvent considérés comme étant exclusivement localisés dans l'hypothalamus latéral, ont une distribution plus complexe. La majorité des neurones à MCH est regroupée dans les régions tubérales du LHA à proximité du pédoncule cérébral et dans la région périfornicale. Quelques péricaryons sont également localisés dans la partie postérieure du noyau antérieur de l'hypothalamus, dans le noyau dorsomédian, dans la capsule du noyau ventromédian et dans la région périventriculaire. Une fraction importante des neurones de la population MCH est localisée dans la région rostromédiane de la *zona incerta*, structure anatomiquement rattachée au thalamus ventral. On peut estimer cette fraction aux environs de 20%, toutefois aucune donnée quantitative n'est disponible dans la littérature (Fig. 2).

C. NAISSANCE DU CONCEPT DE « ZONE A MCH »

Ces observations anatomiques associées à d'autres données fonctionnelles ou hodologiques (exposées ci-dessous) nous ont encouragés à vérifier l'existence de populations distinctes de neurones à MCH. La stratégie choisie à cette époque a été de vérifier si l'analyse du développement ontogénétique de l'ensemble des neurones à MCH pouvait permettre de mieux caractériser des populations potentielles. En 2001, Brischoux et collaborateurs montrent que ces neurones, bien que localisés dans des structures aussi diverses que celle décrites plus haut, naissent en un pic très large de la même région du neuroépithélium germinatif. Contrairement à ce qui était attendu, cette démonstration renforçait donc l'hypothèse que ces neurones forment une population unique, même si celle-ci n'était pas homogène, et caractérisée en particulier par l'expression du neuropeptide MCH. D'un point de vue strictement « développemental », ces résultats ne corroborent pas ceux plus anciens d'Altmann et Bayer en 1986. En effet d'après ces auteurs, les neurones des trois zones longitudinales de l'hypothalamus sont générés en trois vagues successives de neurogénèse, la plus précoce donnant la zone latérale et la plus tardive la zone périventriculaire. Ainsi selon cette hypothèse, une région du neuroépithélium germinatif donne naissance lors de la première vague aux neurones du LHA, puis lors des deux vagues suivantes aux neurones des noyaux de l'hypothalamus médian puis de la zone périventriculaire. Or les neurones à MCH sont générés en un pic du 10^{ème} au 16^{ème} jour de vie embryonnaire, ce qui correspond à la période totale de genèse de l'hypothalamus. Ces résultats sont donc en contradiction avec l'hypothèse

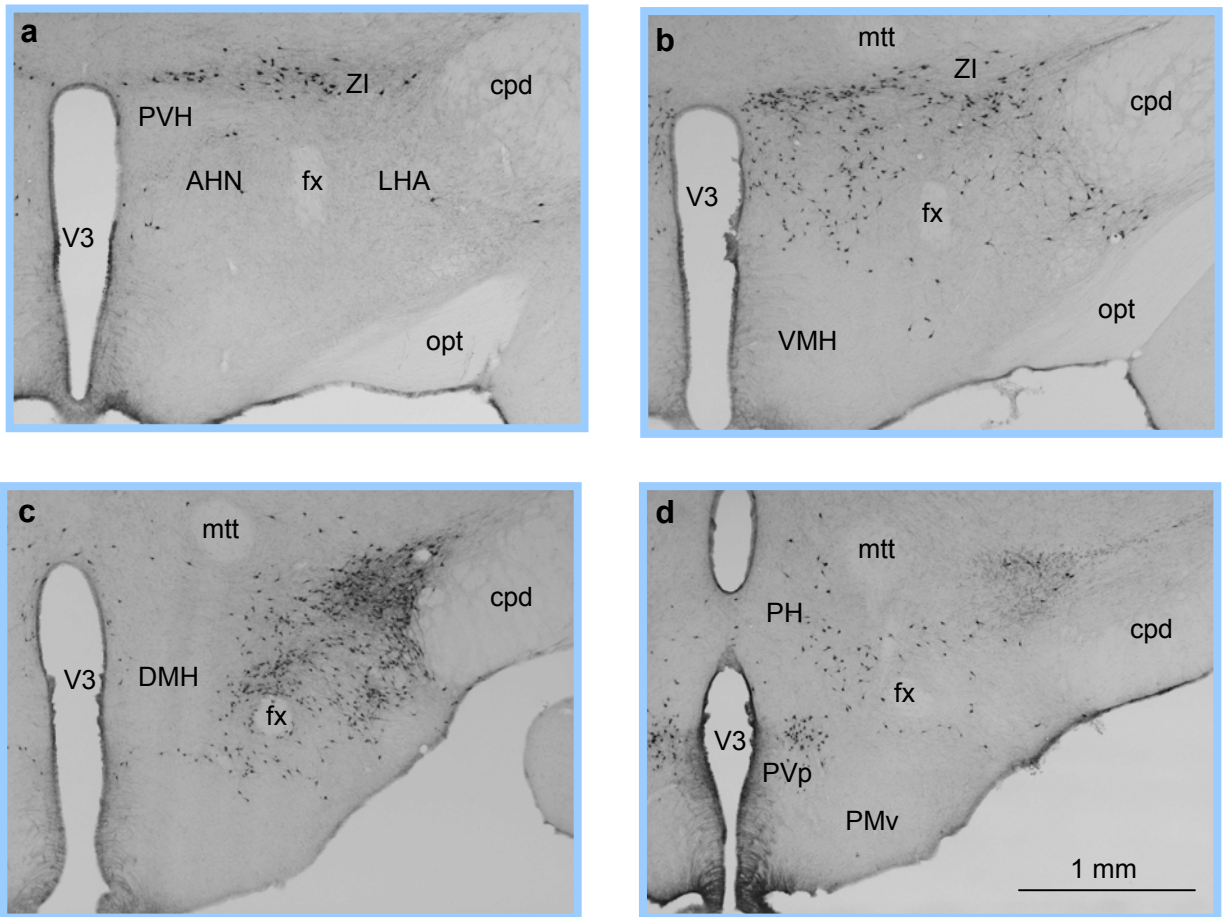


Fig. 2 : Distribution en immunohistochimie des neurones à MCH dans le diencéphale ventral de rat sur quatre coupes coronales ordonnées du niveau le plus rostral au niveau le plus caudal (**a-d**). Noter la présence de nombreux péricaryons MCH en dehors des aires hypothalamiques latérales, notamment dans les régions rostromédianes de la *zona incerta*, le noyau antérieur de l'hypothalamus, la capsule du noyau ventromédian, le noyau postérieur de l'hypothalamus et la partie postérieure du noyau périventriculaire.

des trois vagues (Brischoux et coll., 2001). En revanche, la zone du neuroépithélium germinatif donnant naissance aux neurones à MCH est distincte des zones d'où sont générés les neurones des autres structures hypothalamiques, notamment ventromédianes et antérieures, et surtout les neurones neuroendocriniens magno- et parvocellulaires caractéristiques de la zone périventriculaire de l'hypothalamus (Fig. 3).

Sur la base de ces observations anatomiques (concernant la distribution des neurones à MCH) et ontogénétiques, en 2001, Brischoux et collaborateurs émettent l'hypothèse de l'existence d'une région caractérisée par la distribution des péricaryons MCH ne respectant pas les frontières anatomiques classiques, et occupant une bande de tissu distincte du reste de l'hypothalamus, située entre le fornix et le faisceau mamillothalamique (environ 99% des neurones à MCH sont localisés entre deux plans horizontaux passant par ces deux faisceaux de fibres).

Dans cette région, appelée maintenant « zone à MCH », les neurones à MCH sont colocalisés avec d'autres, notamment ceux producteurs des peptides Hcrt (Peyron et coll., 1998 ; Kilduff et Peyron, 2000). Il est très intéressant de constater que la distribution des projections de ces deux populations neuronales dans l'ensemble du SNC est tout à fait similaire.

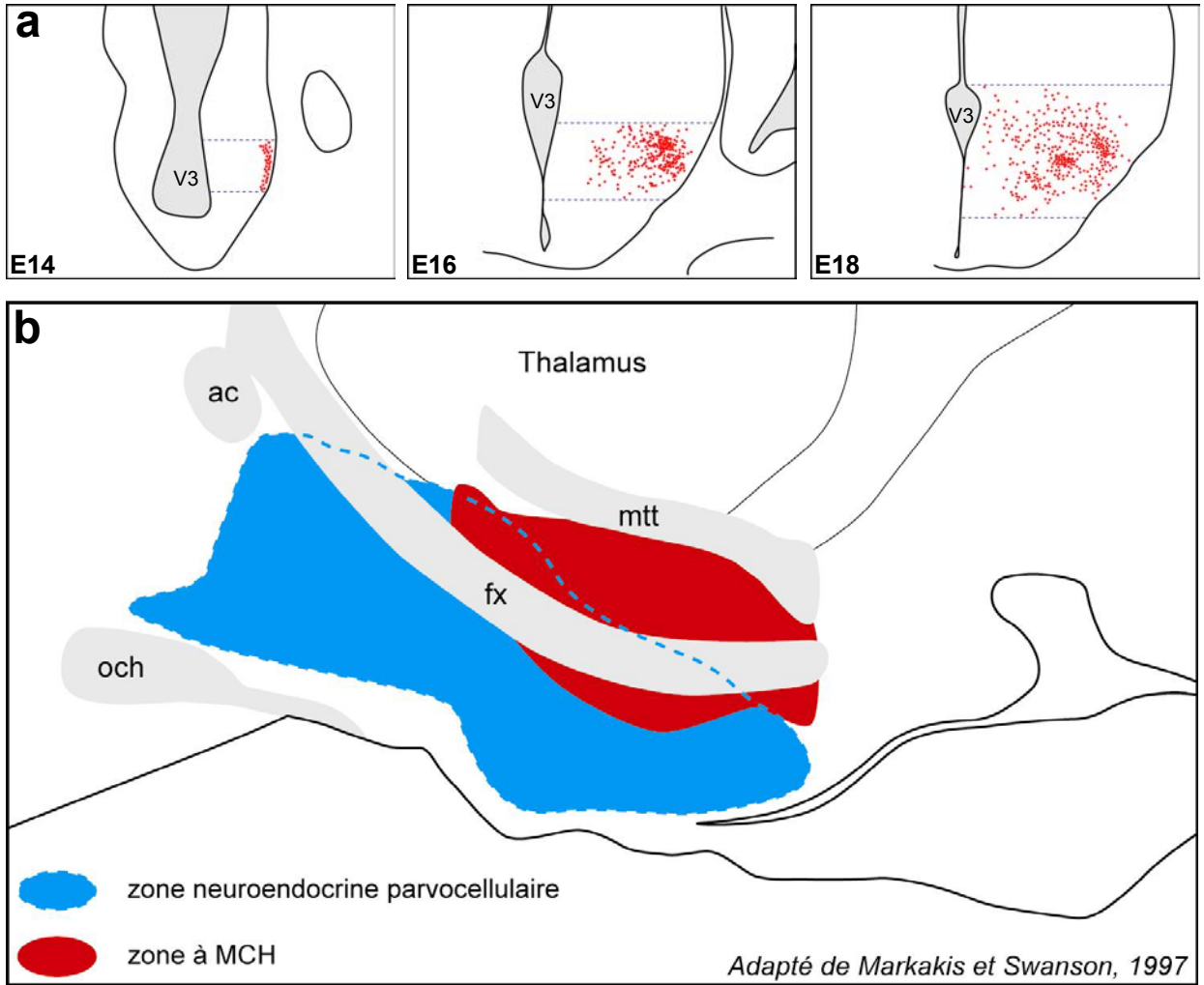


Fig. 3 : a. Distribution spatiotemporelle du peptide MCH des stades embryonnaires E14 à E18. Tous les neurones à MCH semblent être issus de la même région du neuroépithélium germinatif (Brischoux et coll., 2001). **b.** Représentation schématique de la « zone à MCH » et de la zone neuroendocrine sur une coupe sagittale d'hypothalamus de rat.

II. RAPPEL SUR LES NEURONES A HYPOCRETINE ET CONNEXIONS DES NEURONES DE L'HYPOTHALAMUS POSTERIEUR

Les neurones à Hcrt ont été mis en évidence pour la première fois par un anticorps dirigé contre la prolactine ovine. En réalité comme pour les neurones à MCH, il s'agissait d'une réaction croisée, puisque les neurones à Hcrt ne contiennent pas l'ARNm de la prolactine (Risold et coll., 1999). En 1998, deux groupes découvrirent de façon concomitante les peptides spécifiques de ces neurones, qu'ils nommèrent respectivement hypocrétines 1 et 2, et orexines A et B (Sakurai et coll., 1998 ; De Lecea et coll., 1998 ; Peyron et coll., 1998). Les deux noms persistent, toutefois plaideraient en faveur du terme hypocrétine une légère antériorité et l'existence de nombreux rôles de ces peptides en plus de leur rôle orexigène. Deux caractéristiques des neurones à Hcrt nous intéressent particulièrement : ils sont très largement colocalisés avec les neurones à MCH (pour plus de précisions : voir Cvetkovic et coll., 2004) ; par ailleurs comme les neurones à MCH, ils projettent de manière diffuse dans le SNC et surtout ils innervent l'ensemble du manteau cortical. L'existence de projections des neurones à MCH et à Hcrt étendues à l'ensemble du manteau cortical constitue une particularité importante dans le cadre du concept de « zone à MCH ». En effet dans un article de revue publié en 1997, Risold et collaborateurs fournissent une analyse détaillée de l'organisation des connexions entre l'hypothalamus et le cortex cérébral : l'ensemble de l'hypothalamus est innervé par des projections corticofuges (venant du cortex) ; en revanche, seules les structures hypothalamiques postérieures projettent directement dans le cortex cérébral. En terme quantitatif, ces projections issues de l'hypothalamus latéral postérieur ont été estimées comme étant moins nombreuses que celles issues du thalamus dorsal, mais plus nombreuses que celles originaires du télencéphale basal (Saper, 1985 et 1987), et fonctionnellement, elles constituent très certainement plus qu'un simple rétrocontrôle. Les neurones à MCH ont été identifiés comme étant une des sources de ces projections depuis 1985. Les neurones à Hcrt ont été plus récemment identifiés comme en étant une autre. Cependant les neurones histaminergiques des noyaux tubéromamillaires partagent les mêmes caractéristiques hodologiques que les neurones à MCH et à Hcrt et enfin le noyau hypothalamique postérieur et le noyau supramamillaire innervent abondamment la formation hippocampale. Il est intéressant de noter que ces deux dernières structures, sous le contrôle d'afférences pontiques, jouent un rôle important dans la genèse de la rythmicité thêta de l'hippocampe, ce qui plaide en faveur d'un rôle important de modulation de l'activité télencéphalique depuis les régions hypothalamiques postérieures, et qui peut être étendu aux

neurones à MCH et à Hcr1 pour lesquels les données expérimentales sont encore très peu nombreuses.

Les projections MCH et Hcr1 étant diffuses, elles sont observées avec des densités très variables dans de très nombreux territoires du SNC jusque dans la moelle épinière (Bittencourt et coll., 1992). Dans le cadre de notre étude, un point important à considérer concerne l'origine des projections MCH vers le cortex et la moelle épinière. En effet dans deux articles publiés en 2002 et 2004, notre groupe a montré que les neurones à l'origine des projections spinales sont distincts de ceux à projections corticopètes (Brischoux et coll., 2002 ; Cvetkovic et coll., 2004). Les premiers sont exclusivement localisés dans le LHA ; les seconds sont aussi observés dans la *zona incerta*. Les seconds expriment le peptide CART (« Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript ») ainsi que le récepteur neurokinine 3 (NK3). Enfin il est intéressant pour l'étude « développementale » présente de signaler que les premiers naissent massivement avant le 12^{ème} jour de vie embryonnaire, tandis que le pic de genèse des seconds se situe entre le 12^{ème} et le 13^{ème} jours de vie embryonnaire. Ainsi même si les neurones à MCH naissent à partir de la même région du neuroépithélium germinatif, leurs phénotypes chimiques ainsi que la distribution de leur projection varient en fonction de leur date de naissance.

III. FONCTIONS ATTRIBUEES AUX NEURONES A MCH ET A Hcrt

Chez les poissons, la MCH joue un rôle sur la pigmentation de la peau par action directe sur les mélanophores ou par action indirecte par l'intermédiaire d'une inhibition de la libération d' α -MSH par le lobe intermédiaire de l'hypophyse (Baker, 1994 ; Baker et coll., 1986). La MCH aurait également un rôle sur l'axe corticotrope : ce peptide serait en effet un facteur inhibiteur de la libération d'adrénocorticotropine (ACTH) en cas de stress, soit par un effet direct sur les cellules corticotropes, soit par une modulation centrale de la libération de corticolibérine (Baker, 1994 ; Baker et Bird, 1992).

Chez les mammifères, la MCH est un neurotransmetteur et/ou neuromodulateur auquel de nombreuses fonctions ont été attribuées. Ainsi le système MCH semble coordonner les comportements instinctifs de prise alimentaire et de reproduction, ou encore participer à l'intégration de processus complexes associés aux réponses émotionnelles, à la cognition et à l'activation générale du SNC. Toutefois certaines des fonctions de la MCH font parfois l'objet de controverses et les mécanismes d'action de ce peptide restent à élucider (pour revue, Griffond et Baker, 2002).

Plusieurs études ont été entreprises chez les mammifères afin de rechercher un rôle de la MCH sur l'axe corticotrope similaire à celui observé chez les poissons. De ces travaux émanent des résultats contradictoires : par une étude *in vitro*, il a été montré que la MCH n'a aucun effet sur la sécrétion d'ACTH (Navarra et coll., 1990) et des études *in vivo* ont mis en évidence, soit une stimulation (Jezova et coll., 1992), soit une inhibition de la sécrétion d'ACTH (Bluet-Pajot et coll., 1995). Toutefois chez le rat, un stress chronique conduit à une diminution du taux d'ARNm MCH et les glucocorticoïdes semblent exercer un contrôle positif sur l'activité du gène MCH (Presse et coll., 1992).

Les neurones à MCH sont contrôlés par des afférences directes provenant du noyau suprachiasmatique, qui est le « pacemaker » du rythme circadien (Abrahamson et coll., 2001) et chez des rats élevés en conditions d'éclairage jour/nuit 12 h/12 h, il existe une production circadienne de MCH endogène (Presse et Nahon, 1993).

Divers résultats de notre laboratoire et d'autres équipes tendent à remettre en cause l'implication directe de la MCH dans les phénomènes de prise alimentaire (Griffond et coll., 1997b ; Grillon et coll., 1997). Ainsi des expériences de lésions limitées du noyau ventromédian de l'hypothalamus provoquent une stimulation de la synthèse de MCH, pour autant ces animaux ne sont pas hyperphagiques et ils présentent des valeurs d'insulinémie et de glycémie normales (Deray et coll., 1994 ; Griffond et coll., 1995). De plus, les

observations concernant le rôle orexigène ou anorexigène de la MCH sont contradictoires (Presse et coll., 1996 ; Qu et coll., 1996 ; Rossi et coll., 1997). Par ailleurs, les données anatomiques ne vont pas dans le sens d'un effet direct de la MCH sur le comportement alimentaire : en effet les noyaux hypothalamiques comme le noyau paraventriculaire et le noyau arqué, qui sont impliqués avec certitude dans la prise alimentaire, ne sont innervés que de façon diffuse par les neurones à MCH.

Les hypocrétines/orexines sont impliquées dans des fonctions similaires à celles de la MCH et interviennent notamment dans la régulation des cycles veille/sommeil. Chez le rat, l'injection intraventriculaire d'Hcrt stimule la prise alimentaire et la dépense énergétique. Les Hcrt sont également impliquées dans la régulation de la sécrétion des neurohormones et des hormones hypophysaires, ainsi que dans le contrôle des fonctions cardiovasculaires (Martynska et coll., 2005 ; Harris et Aston-Jones, 2006).

IV. ANATOMIE COMPAREE / PHYLOGENESE

Les neurones à MCH sont retrouvés dans l'hypothalamus de tous les vertébrés. Chez certaines espèces, plusieurs groupes de neurones ont été décrits. Chez le poisson en position hypothalamique ventrale et préoptique, a été identifié un groupe de neurones neuroendocrines libérant la MCH dans la neurohypophyse. L'action hormonale de ce peptide sur les mélanophores, décrite chez les téléostéens, est à l'origine de son nom. Toutefois seuls les neurones de l'hypothalamus postérieur sont constamment retrouvés chez toutes les espèces dont la lamproie. Les études menées au laboratoire ou par d'autres équipes ont cependant montré que chez les vertébrés dits « inférieurs » (ex : cyclostomes, chondrichthyens, téléostéens, anoures), ces neurones sont observés dans le noyau hypothalamique postérieur dorsal, qui est situé en position périventriculaire (Fig. 4 a-d). En effet chez ces espèces, les territoires hypothalamiques latéraux ne sont pas colonisés par les neurones, bien que ces territoires soient traversés par les tractus de fibres qui connectent le télencéphale au tronc cérébral et qui correspondent au *mfb* et au pédoncule cérébral des mammifères.

Les premiers neurones à MCH latéraux sont repérés chez certains reptiles, particulièrement chez la tortue, mais chez des lézards tels que *Pardarcis muralis* (lézard des murailles), ils restent périventriculaires. Le système à MCH colonise donc abondamment les aires hypothalamiques latérales, mais uniquement chez les mammifères (Fig. 4 e). Ce « gradient de migration phylogénétique » n'est pas une exclusivité des neurones à MCH, il est également observé pour d'autres populations neuronales comme par exemple les neurones magnocellulaires. Ces derniers forment, chez les mammifères, les noyaux supraoptiques et les formations magnocellulaires associées et chez la lamproie ou la grenouille, ils ne sont observés que dans le noyau paraventriculaire.

Chez toutes les espèces, les projections issues des neurones de l'hypothalamus postérieur sont distribuées de manière diffuse dans le SNC. De manière constante, il existe une innervation plus dense du télencéphale basal par des projections transitant par le *mfb*, ainsi que de régions de la rétículo (Fig. 4 f). Chez toutes les espèces, des projections sont retrouvées jusque dans la moelle épinière. Les mammifères, notamment plusieurs espèces de rongeurs de laboratoire particulièrement étudiées, présentent une innervation abondante du pallium (cortex cérébral) qui semble moindre chez les espèces dites « inférieures », mais il n'existe pas de données quantifiées objectives dans ce domaine (Baker et Rance, 1983, Cardot et coll., 1994 ; Bird et coll., 2001 ; Lazar et coll., 2002 ; Kawauchi et Baker, 2004).

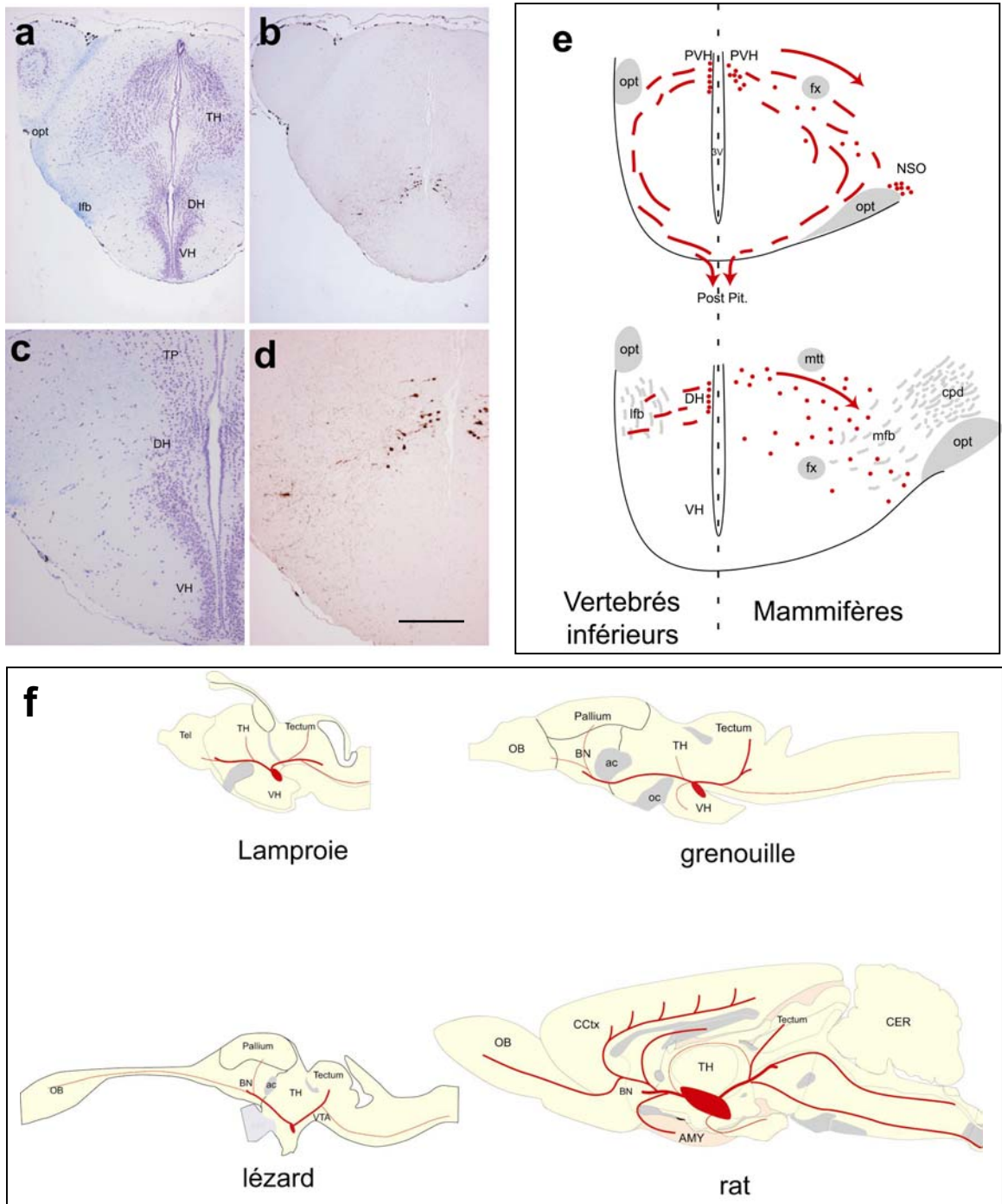


Fig. 4 : Distribution des neurones à MCH chez les vertébrés « inférieurs ». **a-d**. Distribution des cellules immunoréactives à l'immunsérum anti-MCH sur des coupes coronales d'hypothalamus de grenouille (*Rana temporaria*). Les corps cellulaires sont en position périventriculaire dans le noyau hypothalamique dorsal (DH) (**b, d**). Sur les coupes voisines colorées au violet de crésyl, les zones latérales sont pauvres en cellules (**a, c**). **e**. Illustration schématique du « gradient de migration phylogénétique » chez les vertébrés « inférieurs » et chez les mammifères. **f**. Illustration schématique de la distribution des projections MCH chez diverses espèces de vertébrés. **Légende** : BN : noyau de la base du télencéphale ; CER : cervelet ; CCtx : cortex cérébral ; DH : noyau hypothalamique dorsal ; lfb : faisceau latéral du télencéphale ; NSO : noyau supraoptique ; Post Pit. : posthypophyse ; TH : thalamus ; TP : tuberculum postérieur ; VH : hypothalamus ventral ; 3V : troisième ventricule. Barre d'échelle : (a-b) 200 μ m, (c, d) 100 μ m.

V. GENES DU DEVELOPPEMENT

Le concept de « zone à MCH » décrit chez les mammifères s'accommode mal des frontières neuroanatomiques classiques et il est en contradiction avec l'hypothèse de neurogenèse de l'hypothalamus en trois vagues successives, à l'origine respectivement des zones latérale, médiane et périventriculaire. En revanche, il se rapproche de certaines données récentes de la segmentation du diencéphale.

Pendant une période de son développement, le SNC est caractérisé par l'apparition de segments organisés transversalement le long du tube nerveux, décrits et nommés neuromères par Von Baer. Au milieu du XX^{ème} siècle, Berquist et Kallen (Nieuwenhuys et coll., 1997) montrent que ces segments ou renflements sont des zones à très forte activité mitotique, à l'origine de neurones différenciés, qui vont ensuite migrer pour donner les régions du SNC. En effet le tube neural embryonnaire est constitué d'un neuroépithélium pseudostratifié indifférencié, et au sein des neuromères, les progéniteurs neuronaux sont le siège de l'expression combinée et localisée de gènes spécifiques indispensables à la maturation des structures ou de certaines populations neuronales (Puelles et Rubenstein, 1993). En 1994, Rubenstein et collaborateurs proposent une subdivision du cerveau antérieur en six segments transversaux appelés prosomères (et en domaines longitudinaux parallèles à l'axe longitudinal du tube neural). Les prosomères P1, P2, P3 constituent le diencéphale, alors que les prosomères P4, P5, P6 forment le prosencéphale secondaire, dont les régions ventrale et dorsale correspondent respectivement à l'hypothalamus et aux vésicules télencéphaliques. D'après l'ouvrage de Nieuwenhuys et collaborateurs en 1997, chez les vertébrés, la plus grande partie du cerveau postérieur est vraisemblablement composée d'au moins six rhombomères consécutifs (R1 à R6) et le mésencéphale de deux mésomères (M1 et M2), la frontière entre M1 et P1 étant marquée par la commissure postérieure. Le diencéphale comporte alors trois neuromères : le synencéphale limité en avant par le *fasciculus retroflexus*, le parencéphale postérieur délimité en avant par la *zona limitans intrathalamica (zli)*, enfin le parencéphale antérieur. Les régions dorsale et ventrale du synencéphale donneraient ainsi respectivement le prétectum et le noyau du « medial longitudinal fasciculus », le thalamus dorsal et l'épithalamus dériveraient du parencéphale postérieur et le thalamus ventral du parencéphale antérieur. De grandes incertitudes persistent quant au nombre et à la configuration des neuromères dans la partie la plus rostrale du tube neural, c'est-à-dire dans l'hypothalamus, l'aire préoptique et les hémisphères cérébraux (Fig. 5).

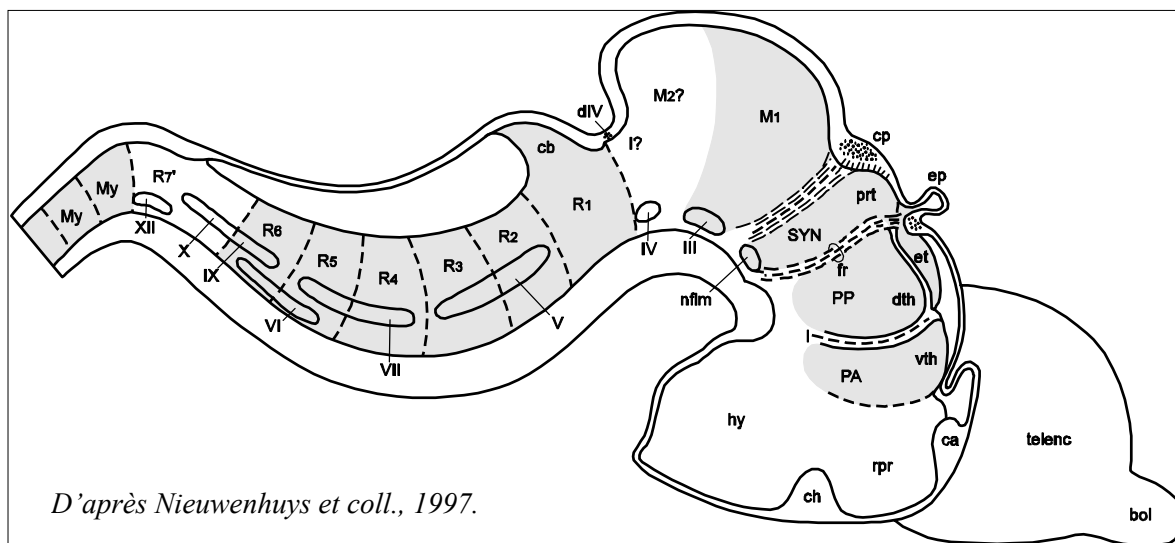


Fig. 5 : Segmentation des régions antérieures du tube nerveux. Les régions grisées correspondent aux territoires neuromériques dont les frontières sont avérées. Noter l'absence de frontière dans l'hypothalamus et dans le télencéphale. Nomenclature : cf. livre.

En 2003, Puelles et collaborateurs esquissent un modèle modifié dans lequel le prosencéphale (télencéphale et hypothalamus) est un protosegment complexe non subdivisé en prosomères ; par contre les prosomères P1 à P3 (préectum, thalamus et préthalamus) constituent le cerveau antérieur caudal.

Dans le but de caractériser les prosomères, certains auteurs ont étudié, chez les mammifères, la distribution de l'expression de plusieurs gènes du développement (Lumsden et Krumlauf, 1996 ; Wilson et Rubenstein, 2000). Ces gènes dits à homéoboîte ont été mis en évidence chez les invertébrés, où ils contrôlent la segmentation du corps et la différenciation phénotypique de lignées cellulaires (Gehring, 1987). Les gènes de la superfamille des gènes à homéoboîte possèdent une séquence de 180 nucléotides ou homéoboîte, qui code une séquence de 60 acides aminés ou homéodomaine, ce dernier conférant à la protéine des propriétés de liaison à l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN). Ainsi beaucoup de gènes à homéoboîte sont des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans la structuration et la différenciation cellulaire au cours du développement.

Chez l'animal, par des analyses phylogénétiques, deux classes distinctes de gènes à homéoboîte ont été identifiées : ANTP et PRD, ainsi que diverses classes : notamment LIM, POU, SINE et TALE. La classe ANTP se divise en deux groupes : le groupe des gènes NK-like, ainsi que le groupe des gènes Hox et des gènes apparentés aux gènes paraHox. Le groupe des gènes NK-like comprend notamment les familles de gènes Dlx, Nk2.1, Nkx2.2. Le groupe des gènes Hox et des gènes apparentés aux gènes paraHox est constitué par les familles de

gènes Hox, Cdx, Gsx, Xlox, Evx, Mox, En, Gbx et Mnx (chacune de ces familles contient un ou plusieurs gènes). La classe PRD comprend les gènes « paired-like » et les gènes Pax (Holland et Takahashi, 2005) (Fig. 6).

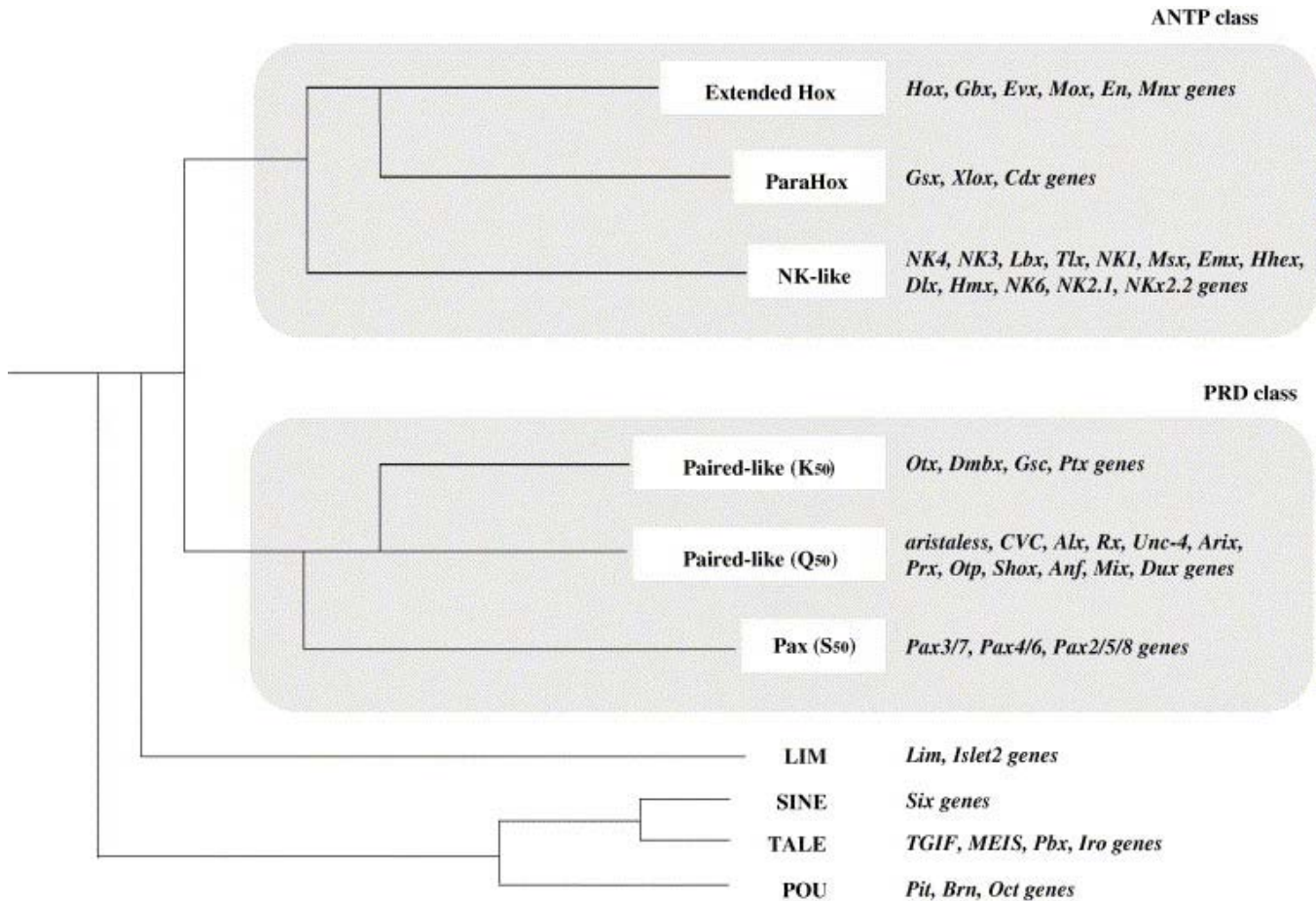


Fig. 6 : Classification de la superfamille des gènes à homéoboîte *selon Holland et Takahashi, 2005.*

Ainsi les produits protéiques d'expression des gènes de ces nombreuses grandes familles réguleraient la transcription. Ils contiennent différents domaines de liaison à l'ADN conservés au cours de l'évolution : homéodomaine, « paired-domain », « POU-domain », « helix-lopop-helix », « zinc finger domain », « fork head domain » (Stoykova A et Gruss P, 1994).

Les marqueurs les plus étudiés pour le développement du diencephale sont les facteurs de transcription Pax6, Nkx2.1, Nkx2.2, Dlx, Olf1, Lhx9 et le facteur diffusible « Sonic Hedgehog » (Shh).

Pax6

La famille des gènes Pax, identifiée chez la drosophile puis dans divers organismes, comprend huit membres contenant tous une séquence conservée, la « paired-box ». La protéine Pax6, constituée de 422 acides aminés, comporte un « paired-domain » de 128 acides aminés, codé par la « paired-box » et localisé près de l'extrémité N-terminale. Cette protéine contient également (comme Pax3 et Pax7) un homéodomaine de 61 acides aminés localisé vers son extrémité C-terminale. Le domaine de liaison à l'ADN de type « paired-domain » joue un rôle clé quant aux mécanismes moléculaires des différents effets de Pax6 (Haubst et coll., 2004).

Chez les mammifères, Pax6 est exprimé dans des territoires restreints du cerveau antérieur (télencéphale et diencephale), moyen et postérieur, dans la moelle épinière, l'œil et le nez (Stoykova et coll., 1996 ; Mastick et coll., 1997 ; Manuel et Price, 2005). Dans l'hypophyse, son expression transitoire permet la mise en place de l'étroite frontière séparant les types cellulaires dorsaux et ventraux, ainsi que l'établissement de taux néonataux corrects d'hormone de croissance et de prolactine (Kioussi et coll., 1999 ; Bentley et coll., 1999). Pax6 est exprimé dans le système visuel à savoir dans le cristallin, la cornée, la rétine neurale et pigmentaire, ainsi que dans le système olfactif, plus précisément au sein de l'épithélium dans les cellules non neuronales telles que les cellules sustentaculaires, les cellules basales et les glandes de Bowman (Davis et Reed, 1996).

Chez la souris, le gène Pax6 est exprimé précocément au cours du développement, dès le 8-8,5^{ème} jour post-coïtal (pc) (Walther et Gruss, 1991 ; Stoykova et Gruss, 1994). Dans le diencephale, il est exprimé dans une population de progéniteurs du neuroépithélium germinatif : cette population est Nkx2.2 positive et possède un sous-groupe exprimant Dlx. Il est également présent dans des neurones initiaux, apparaissant à E9,5, exprimant une combinaison de facteurs de transcription et localisés dans le thalamus ventral présomptif : ce sont les futurs neurones dopaminergiques A13 de la partie médiane de la *zona incerta*. Il joue donc un rôle dans la spécification de l'identité des neurones du cerveau antérieur (Mastick et Andrews, 2001). Pax6 est également nécessaire au maintien de l'identité moléculaire des progéniteurs corticaux (Toresson H et coll., 2000).

Pax6 est notamment observé au niveau de la *zli*, qui sépare le thalamus ventral du thalamus dorsal (Valverde et coll., 2000).

Chez la souris, une mutation semi-dominante du gène Pax6 est responsable du phénotype « Small Eye (Sey) », dont l'équivalent humain serait l'aniridie congénitale (Hill et coll., 1991). Chez ces souris, le diencephale présente une morphologie anormale et une densité

cellulaire moindre (Warren et Price, 1997). La commissure postérieure est absente et le prosencéphale caudal (P1) est partiellement transformé en une structure mésencéphalique. Pax6 permet donc de définir la frontière entre le prosencéphale et le mésencéphale (Mastick et coll., 1997 ; Manuel et Price, 2005). De plus, des gènes dont l'expression est normalement réduite au thalamus ventral et à la *zli* (comme Nkx2.2) sont exprimés de façon ectopique dans le thalamus (notamment Nkx2.2 et Lim1/Lhx1 dans le thalamus dorsal). D'où un rôle de Pax6 dans la distribution spatiotemporelle dorsoventrale (Pratt et coll., 2000 ; Manuel et Price, 2005). Les populations catécholaminergiques du thalamus ventral, de l'hypothalamus et du télencéphale, où Pax6 est normalement exprimé, se développent anormalement (Vitalis et coll., 2000). Par ailleurs, les neurones thalamiques sont incapables de projeter correctement à travers le télencéphale ventral vers leurs cibles dans le cortex (Pratt et coll., 2002 ; Jones et coll., 2002 ; Manuel et Price, 2005). Chez les rats « Small Eye », il existe également une anomalie du trajet axonal thalamocortical. Cette anomalie est en rapport avec l'absence d'expression de Pax6 dans des groupes de cellules situés le long du circuit thalamocortical (partie ventrale du thalamus ventral et amygdale) (Kawano et coll., 1999). De plus, chez les souris mutées, le tractus mamillothalamique est absent (Valverde et coll., 2000). Les deux premiers et principaux tractus longitudinaux du cerveau antérieur, le tractus de la commissure post-optique (*tpoc*) et la strie médullaire, ne se forment pas : ceci résulte de l'absence d'interaction entre Pax6 et les axones pionniers. En effet, Pax6 est impliqué, au cours du développement, dans l'établissement de codes d'adhérence régionale, médiés par la R-cadhérine (Cdh4) et permettant de guider ces axones pionniers (Stoykova et coll., 1997 ; Andrews et Mastick, 2003 ; Nural et Mastick, 2004, Manuel et Price, 2005). En l'absence de Pax6, les gènes *Dlx* sont retrouvés en situation ectopique (Toresson et coll., 2000).

Nkx2.1 et Nkx2.2

Nkx2.1, également appelé TTF1 (« Thyroid Transcription Factor »), a été identifié dans les cellules folliculaires de la thyroïde puis dans les pneumocytes. L'utilisation d'un anticorps anti-TTF1 est utile au diagnostic néoplasique en pathologie carcinologique pleuropulmonaire et thyroïdienne (Lau et coll., 2002). La protéine Nkx2.1, qui contient un homéodomaine se liant à l'ADN, est un facteur de transcription essentiel à la mise en place du cerveau antérieur ventral chez les oiseaux, les mammifères et les amphibiens (Lau et coll. 2002 ; Gonzalez et coll. 2002).

Chez la souris et le poulet, Nkx2.1 fait partie des gènes les plus précocément exprimés dans la plaque neurale. Ainsi chez la souris, l'expression cérébrale de Nkx2.1 débute dès le 9^{ème} jour pc, elle est localisée au cerveau antérieur et semble être spécifique des structures diencephaliques telles que l'hypothalamus, la neurohypophyse et le chiasma optique, et de structures télencéphaliques (caudoputamen, globus pallidus). Notons que ce gène est exprimé à la fois dans les zones ventriculaire et du manteau (Price, 1993 ; Qiu et coll., 1998). Chez les souris Nkx2.1-/-, les projections originaires de la couche V du cortex et se dirigeant selon un trajet descendant vers le pédoncule cérébral, présentent un trajet anormal lorsqu'elles traversent le télencéphale basal et l'hypothalamus. Par contre, la perte de fonction de Nkx2.1 n'altère pas le trajet des projections thalamocorticales. Des expériences *in vitro* semblent montrer que le télencéphale basal et l'hypothalamus contiennent une activité qui repousse la croissance des axones corticaux (Marin et coll., 2002).

Nkx2.2, isolé chez la souris, fait partie d'une famille de gènes à homéoboîte, dont les homéodomains sont homologues à ceux de la famille des gènes NK-2 chez la drosophile (Price et coll., 1992). Le gène Nkx2.2 comprend 2026 paires de bases et code pour une protéine de 273 acides aminés contenant une homéoboîte, une boîte NK-2 et un décapeptide en N-terminal (Hartigan et Rubenstein, 1996).

Chez la souris et le poulet, Nkx2.2 fait aussi partie des premiers gènes à être exprimés dans la plaque neurale et il se distribue tout le long de l'axe antéropostérieur à la fois dans le neuroépithélium et le manteau (Qiu et coll., 1998). Chez le poulet, ce gène est initialement induit dans le neuroépithélium flanquant le plancher de la plaque basale ; plus tardivement les cellules Nkx2.2 positives migrent en position ventrale et dorsolatérale dans les régions environnantes de substance blanche et de substance grise, où elles prolifèrent et coexpriment plusieurs gènes marqueurs des oligodendrocytes. Nkx2.2 est également exprimé dans les progéniteurs des oligodendrocytes en migration dans la rétine (Xu et coll., 2000 ; Fu et Qiu, 2001). Par ailleurs, dans la moelle épinière dorsale, l'expression combinée de trois gènes, dont Nkx2.2, conduit à la différenciation des neurones sérotoninergiques (Cheng et coll., 2003). Chez la souris, il existe une corrélation spatiale entre les premiers trajets d'axones longitudinaux et les domaines d'expression de Nkx2.2 (Shimamura et coll., 1995). L'expression cérébrale de ce gène débute chez la souris aux alentours du 9^{ème} jour pc. Au 12,5^{ème} jour pc, Nkx2.2 est observé au sein du diencephale dans l'hypothalamus, le thalamus ventral et la partie la plus postérieure du thalamus dorsal juste au dessus de la *zli*. Il est aussi exprimé dans les aires hypothalamiques paraventriculaires et discrètement dans le cerveau

postérieur ventral. Aux stades plus tardifs, son domaine d'expression s'étend au futur corps géniculé ventral (Price, 1993).

Dlx

Les gènes Dlx constituent une famille hautement conservée de gènes à homéoboîte, homologues au gène « distal-less » (Dll) de la drosophile (Bulfone et coll. 1993 ; Merlo et coll., 2000). Les protéines Dlx sont localisées dans le noyau, toutefois Dlx5 peut aussi être retrouvé dans le cytoplasme (Eisenstat et coll., 1999).

Les gènes Dlx ont été retrouvés en dehors du cerveau dans des territoires des ébauches de la tête (arcs branchiaux, ectoderme facial, ganglions crâniens), ainsi que dans des régions plus distales des membres (ectoderme des membres) et du bourgeon génital. Dlx5 et Dlx6 sont exprimés dans les ostéoblastes en différenciation. L'étude des gènes cibles de Dlx1, Dlx2, Dlx3 et Dlx5 dans les cellules germinales de souris a permis de mettre en évidence leur rôle dans la formation du placenta, l'organisation crâniofaciale, la morphogenèse des organes sensoriels, l'ostéogenèse. Dlx5 et Dlx6 auraient un rôle dans le développement des membres. Dlx1 et Dlx2 sont exprimés au cours du développement du bulbe olfactif et certains gènes Dlx pendant la morphogenèse des organes sensoriels (Merlo et coll. ; Panganigan et Rubenstein, 2002). Des membres de la famille Dlx sont aussi exprimés dans les cellules ganglionnaires, amacrines et horizontales de la rétine embryonnaire et post-natale. En effet, Dlx joue un rôle dans la différenciation terminale des progéniteurs des cellules ganglionnaires rétinienne, nés tardivement (De Melo et coll., 2004). Dlx7 est exprimé dans la moelle osseuse, plus particulièrement dans les cellules érythroïdes et aurait un rôle dans le contrôle de l'apoptose (Merlo et coll., 2000).

Les domaines d'expression des gènes à homéoboîte des familles Emx, Dlx et Pax ont été utilisés comme marqueurs des subdivisions antéropostérieures du cerveau antérieur au cours du développement chez la souris, le poulet, la tortue et la grenouille (Fernandez et coll., 1998). Chez la souris, dans toutes les régions du cerveau antérieur, les cellules Dlx négatives de la zone ventriculaire se différencient progressivement et expriment au cours de la neurogenèse Dlx2 puis Dlx1, Dlx 5, Dlx 6 (Eisenstat et coll., 1999). Dlx1 est détecté dès le 10^{ème} jour pc (Price, 1993). Chez les vertébrés, les gènes Dlx sont appariés deux à deux : Dlx1/Dlx2, Dlx3/Dlx4, Dlx5/Dlx6 et les fonctions de Dlx1 et/ou Dlx2 sont nécessaires à l'expression correcte de Dlx5/Dlx6 (Zerucha et coll., 2000 ; Zhu et Bendall, 2006). Tous les gènes Dlx sont exprimés dans des territoires limités du télencéphale basal et du diencephale.

Dlx1 et Dlx2 sont retrouvés dans le cerveau antérieur, où leurs distributions sont quasiment identiques, mais sont absents du cerveau moyen et postérieur. Dlx1 est détecté dès le 10^{ème} jour pc dans le chiasma optique et les parois du diencephale, au 12^{ème} jour pc dans le striatum et le diencephale (thalamus et hypothalamus). Au 12-13^{ème} jour pc, Dlx1 est exprimé dans les éminences ganglionnaires médiane et latérale (éminences pallidale et striatale), l'aire suprachiasmaticque, l'aire entopédonculaire postérieure (pallidum), la corde cellulaire hypothalamique (hypothalamus tubéral), le neuroépithélium et le manteau du thalamus ventral et de l'hypothalamus, et dans le futur corps géniculé ventral. Aux stades tardifs (vers le 16^{ème} jour pc), il est possible de discerner une expression de Dlx1 dans le striatum, la *zona incerta*, le noyau réticulé, le corps géniculé ventral, les noyaux préoptiques et les noyaux de la région hypothalamique antérieure. La limite caudale de l'expression de Dlx1 et de Dlx2 est la *zli*. Après 16 jours de gestation, il y a une diminution de l'expression de Dlx1 dans le thalamus ventral, l'hypothalamus et le striatum. Mais l'expression de Dlx se maintient chez l'adulte dans le bulbe olfactif.

Ainsi les gènes Dlx sont essentiels à la différenciation des ganglions de la base, ils jouent un rôle dans le développement de la zone subventriculaire et dans la différenciation des neurones striataux. Ils sont aussi nécessaires au développement des interneurons du néocortex et du bulbe olfactif (Bulfone et coll., 1993 ; Bulfone et coll. 1993 ; Price, 1993 ; Liu et coll., 1997 ; Anderson et coll., 1997 ; Anderson et coll., 1999 ; Eisenstat et coll., 1999 ; Merlo et coll., 2000 ; Larsen CW et coll., 2001). Dlx2 régule deux aspects de la différenciation neuronale : la sortie du cycle cellulaire et la capacité de croissance de dendrites MAP2 (« Microtubule-Associated Protein »)-positives (Ding et coll., 1997). L'expression des gènes Dlx est intimement associée aux neurones exprimant l'acide gamma-amino-butérique (GABA) dans le cerveau antérieur rostral de l'embryon (Stühmer et coll., 2002 ; Panganigan et Rubenstein, 2002).

Les gènes Dlx étant exprimés dans les mêmes cellules, les mutants pour un seul de ces gènes présentent un phénotype faiblement altéré (Eisenstat et coll., 1999). Chez les souris Dlx1/2^{-/-}, on observe un nombre réduit et une différenciation défectueuse des neurones à projection striatale et des interneurons du néocortex. Le trajet des axones thalamocorticaux est dévié à l'intérieur des ganglions de la base (qui sont aussi anormalement développés) et du néocortex. Les cellules périglomérulaires et granulaires des bulbes olfactifs (représentées par les interneurons GABAergiques) sont absentes. Ce défaut résulte d'un blocage de la migration et de la différenciation des cellules dérivées de la zone subventriculaire. Les neurones du thalamus ventral sont certes formés, mais ils n'expriment ni Pax6, ni Dlx ; Dlx régule donc la

différenciation des neurones dopaminergiques du thalamus ventral (Merlo et coll., 2000 ; Garel et coll., 2002 ; Andrews et coll., 2003).

Olf1/EBF1

Olf1/EBF1 chez le rongeur et Collier chez la drosophile sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des protéines Collier/Pif1/EBF (COE). Ces protéines, malgré leur grande homologie de séquence, jouent des rôles divers au cours du développement chez les vertébrés et invertébrés (Dubois et Vincent, 2001). Le gène Olf1 (« Olfactory1 ») ou EBF1 (« Early B-cell Factor 1 »), isolé chez la drosophile, appartient à la famille des gènes codant pour des facteurs de transcription contenant un motif « Helix-Loop-Helix » (HLH) (Wang et Reed, 1993 ; Wang et coll., 1997). La famille des facteurs de transcription HLH Olf1/EBF-like contient quatre membres. Chez la souris, deux des autres membres, O/E2 et O/E3, identifiés en 1997, ne sont exprimés à un niveau élevé que dans l'épithélium olfactif (Wang et coll., 1997). Le quatrième membre O/E4, cloné en 2002, présent dans l'épithélium olfactif mais absent dans l'organe voméronasal, pourrait interagir avec les autres membres pour réguler l'expression des gènes dans les neurones olfactifs (Wang et coll., 2002). Olf1 est donc impliqué dans la régulation des gènes de l'olfaction, mais aussi dans la différenciation des lymphocytes B et le développement du SNC. Ainsi chez la souris, Olf1 est présent au cours du développement dans les neurones olfactifs, les lymphocytes B et plusieurs tissus (Wang et coll., 1997). Chez les mammifères, les protéines O/E semblent en effet être impliquées dans la différenciation des cellules provenant des trois feuilletts embryonnaires (Liberg et coll., 2002).

L'expression de Olf1 est particulièrement importante dans les cellules post-mitotiques sensorielles dès le début de la différenciation du système nerveux (Davis et Reed, 1996). Seul gène de cette famille à être exprimé dans le striatum, il contrôle la différenciation cellulaire au sein de cette structure (Garel et coll., 1999 ; Lobo, 2006).

Le dérèglement de Olf1 induit en effet des anomalies de la transition entre zone subventriculaire et manteau, ainsi qu'une diminution de la taille du striatum et des défauts de mise en place des fibres thalamocorticales traversant le striatum (Garel et coll., 1999). Chez les souris « Knock Out » ou hétérozygotes pour O/E2 et O/E3, les neurones olfactifs ne projettent plus vers le bulbe olfactif dorsal (Wang et coll., 2003).

Les gènes EBF sont nécessaires à l'initiation de la différenciation neuronale et à la migration des progéniteurs neuroépithéliaux en direction du manteau, mais ils ne sont pas requis pour la

sortie du cycle cellulaire. Ils pourraient également participer de l'état de différenciation cellulaire ainsi induit et être impliqués dans la spécification de sous-populations neuronales du SNC (Garcia-Dominguez et coll., 2003).

Shh

Les signaux de type Hedgehog (Hh) sont essentiels à l'organogenèse du tractus gastrointestinal chez les mammifères (Ramalho-Santos et coll., 2000). Chez la souris, le développement dorsal du cerveau postérieur et de la moelle épinière est indépendant de Shh, par contre un signal Shh-dépendant régulerait la prolifération et la survie des populations cellulaires dorsales mésencéphaliques et diencephaliques (Ishibashi et McMahan, 2002). Sonic Hedgehog (Shh) a un rôle dans la ventralisation du tube neural et la formation de l'hypothalamus (Scholpp et coll., 2006).

Shh est un facteur sécrété exprimé au niveau de la *zli*, qui est un domaine du neuroépithélium de la plaque alaire séparant le thalamus dorsal du thalamus ventral (Kiecker et Lumsden, 2004 ; Vieira et coll., 2005). La *zli* est en effet la seule structure de la plaque alaire exprimant des molécules de signalisation de la famille Hedgehog (Figdor et Stern, 1993 ; Puellas et Rubenstein, 2003). L'expression de Shh est notée initialement dans la zone ventriculaire de la *zli* présomptive, où *Nkx2.2* est d'ailleurs largement exprimé (Kitamura et coll., 1997). La différenciation de la *zli* à partir de cellules progénitrices localisées dans la plaque alaire est initiée par un signal venant de la plaque basale, dépendant de Shh, mais elle est inhibée par des facteurs émanant du diencephale dorsal (Zeltser, 2005).

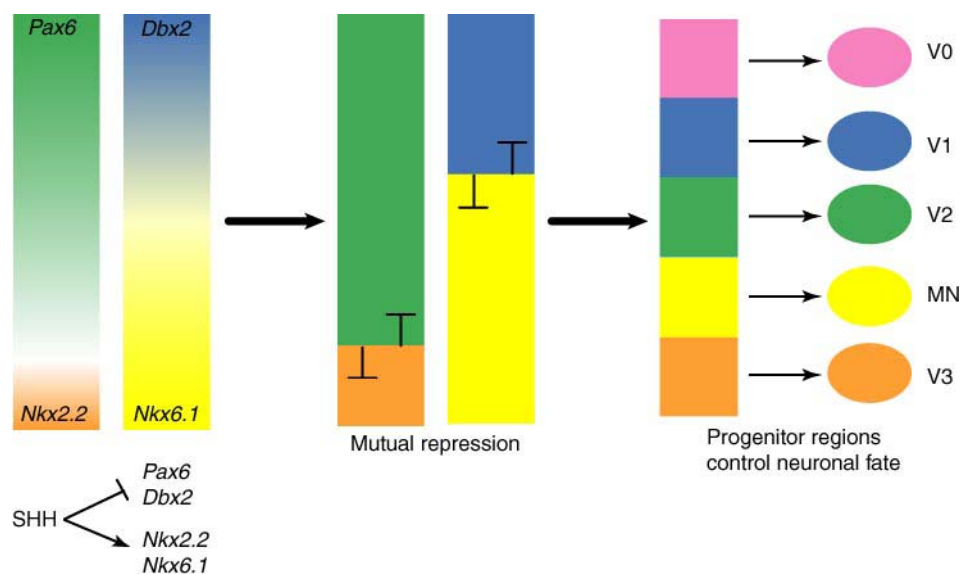
Il est bien établi que les précurseurs précoces des oligodendrocytes sont induits par Shh depuis la zone ventriculaire ventrale tout le long de l'axe neural. Une étude réalisée chez le poulet montre qu'aux stades plus tardifs, les progéniteurs des oligodendrocytes peuvent aussi être générés à partir des zones ventriculaire et subventriculaire dorsales du cerveau moyen, et ces progéniteurs coexpriment *Nkx2.2* (Fu et coll., 2003).

Chez le poulet, la signalisation Shh est nécessaire à l'expression de gènes région-spécifique dans le thalamus dorsal et le thalamus ventral. Par l'intermédiaire de la sécrétion de Shh, la *zli* fonctionne comme un centre local de signalisation, régulant l'acquisition de l'identité de ces régions diencephaliques (Kiecker et Lumsden, 2004 ; Vieira et coll., 2005). Chez le poisson zèbre, Shh est exprimé dans la *zli* et dans un territoire médioventral continu, s'étendant de l'hypothalamus antérieur au cerveau postérieur et passant par le tegmentum. Il a été démontré dans cette espèce que la maturation correcte du diencephale nécessite un signal Hh provenant

de la *zli*. Chez les souris *Shh* mutées, il existe des malformations du diencéphale, notamment des territoires thalamiques ventraux (Scholpp et coll., 2006).

Shh joue un rôle dans la croissance et la prolifération (Scholpp et coll., 2006). Chez la souris, l'action conjointe de *Shh* et *BMP7* (« Bone Morphogenetic Protein » 7) peut induire une différenciation de cellules nerveuses en cellules dopaminergiques hypothalamiques (Ohyama et coll., 2005). Un réseau génétique incluant notamment *Nkx2.2* et une cascade génétique *Shh*-dépendante contrôlent le développement des neurones dopaminergiques du cerveau moyen (Prakash et Wurst, 2006).

Chez le poisson, l'expression de *Nkx2.2b* dans le plancher de la plaque basale est régulée positivement par *Shh* (Schafer et coll., 2005). Un signal *Shh* provenant du pôle ventral induit donc l'expression nouvelle de gènes à homéoboîte tels que *Nkx2.2*. Il réprime aussi l'expression existante d'autres gènes comme *Pax6* (Briscoe et Ericson, 2001) (Fig. 7).



Copyright © 2002, Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Fig. 7 : Exemple d'interactions entre *Shh* et facteurs de transcription et entre facteurs de transcription eux-mêmes.

Dans la moelle épinière, différents types de neurones (V0-V3 et MN [motoneurones]) résultent de l'expression de combinaisons uniques de facteurs de transcription. Certains de ces facteurs, comme *Nkx2.2* et *Nkx6.1*, s'expriment sous l'influence de *Shh*. D'autres se répriment mutuellement : par exemple *Nkx2.2* et *Pax6*.

Conclusion

Des interactions à la fois intégratives et antagonistes entre les facteurs de transcription à homéodomaine contribuent à la distribution spatiotemporelle du télencéphale (Corbin et coll., 2003). Les zones de chevauchement des domaines d'expression de plusieurs gènes régulateurs, tels que *Dlx2*, *Nkx2.1*, *Nkx2.2* et *Shh*, coïncident avec les sites fournissant l'information du trajet des axones rétiniens au niveau du chiasma optique au cours du développement (Marcus et coll., 1999). Chez la souris, la tortue et la grenouille, les gènes à homéoboîte et notamment ceux des familles *Dlx* et *Pax*, sont utilisés comme marqueurs des subdivisions antéropostérieures du cerveau antérieur au cours du développement (Fernandez et coll., 1998). Dans le cerveau de souris, le territoire d'expression de *Nkx2.2* avoisine et chevauche partiellement les territoires d'expression de deux autres gènes du développement, *Nkx2.1* et *Dlx*. Dans le prosencéphale et particulièrement dans le diencéphale, les territoires d'expression de ces trois gènes coïncident avec les frontières anatomiques. Ces gènes joueraient donc un rôle dans la différenciation du diencéphale en ses différentes sous-régions définies anatomiquement et fonctionnellement (Price et coll., 1992).

Chez les mammifères, les profils d'expression de ces gènes du développement impliqués dans la mise en place du diencéphale donnent donc un aperçu de la régionalisation du diencéphale et aident à repérer des territoires présomptifs de certaines structures adultes. Toutefois, l'étude des territoires d'expression de ces différents gènes d'intérêt ne permet pas d'élucider d'éventuelles frontières prosomériques, qui restent discutées.

VI. HYPOTHESE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

A. HYPOTHESE DE TRAVAIL

Nos travaux concernent l'hypothalamus latéral postérieur de rat, où sont notamment colocalisés les neurones à Hcr et les neurones à MCH. La distribution de ces deux populations neuronales ne respecte pas les frontières cytoarchitectoniques classiques de l'hypothalamus. Les neurones à MCH, qui sont détectés précocément au cours du développement, dérivent d'un territoire particulier du neuroépithélium germinatif, et la zone de distribution des neurones à MCH appelée « zone à MCH » contient au moins deux sous-populations définies en fonction de leur date de naissance et de leur phénotype chimique (Brischoux et coll., 2001 et 2002). Ce concept de « zone à MCH » évoque donc certains aspects de la segmentation du diencephale décrits grâce à l'étude de gènes du développement. Au sein des prosomères, les progéniteurs neuronaux sont en effet le siège de l'expression combinée et localisée de gènes spécifiques, indispensables à la maturation des structures ou de certaines populations neuronales (Puelles et Rubenstein, 1993 ; Rubenstein et coll., 1994), et les principaux gènes du développement exprimés dans le diencephale sont les gènes à homéoboîte Pax6, Nkx2.1, Nkx2.2, Dlx et Olf1.

La confirmation de l'existence de la « zone à MCH » en tant qu'entité anatomique, ainsi que la compréhension de sa mise en place ontogénétique, en tenant compte des données actuelles concernant le développement du diencephale, devraient nous permettre de mieux comprendre l'organisation de l'hypothalamus.

B. OBJECTIFS SPECIFIQUES

Puisque les neurones à Hcr sont colocalisés avec les neurones à MCH, l'idée est d'obtenir des données sur la genèse des neurones à Hcr, de les comparer avec celles existantes sur les neurones à MCH et de vérifier leur compatibilité.

Ce travail vise également à analyser les distributions spatiotemporelles de ces gènes du développement abondamment exprimés dans le diencephale, notamment dans l'hypothalamus, et de les comparer à la distribution des neurones à MCH, ainsi qu'aux premiers tractus de fibres. Ce type d'approche méthodologique n'est malheureusement pas applicable aux neurones à Hcr, car ce peptide n'est pas exprimé précocément.

La distribution des gènes sera décrite dans le diencephale et le télencéphale en général, toutefois notre attention portera particulièrement sur leur distribution dans l'hypothalamus.

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIEL D'ETUDE

A. ANIMAUX

Notre travail a été effectué sur des rats de la souche « Sprague Dawley » (IFFA-Credo). Ces animaux ont été élevés en condition d'éclairage naturel, avec boisson et nourriture à volonté.

La première partie du travail, concernant la genèse des neurones à Hcrt, a été effectuée sur des rats mâles adultes pesant 250 à 350 g, nés de femelles gestantes injectées par le 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) aux stades embryonnaires E10 à E16. Pour chaque stade, 3 individus au minimum ont été analysés (E10 = 3, E11 = 3, E12 = 5, E13 = 6, E14 = 3, E15 = 3, E16 = 3).

La seconde partie du travail a été effectuée sur des fœtus de rats prélevés chez des femelles gestantes entre E10 et E16. Pour chaque stade, deux portées ont été réalisées au minimum. Le nombre total d'embryons utilisés était de n=65 (E10=11, E11=8, E12=10, E13=12, E14=8, E15=12, E16=3, E18=1). Les stades fœtaux ont été déterminés par l'examen du frottis vaginal réalisé le matin suivant la nuit au cours de laquelle les femelles ont été mises en contact avec les mâles : la présence de spermatozoïdes sur le frottis permet de considérer les femelles comme gestantes, les fœtus étant alors à leur premier jour de développement embryonnaire (E0). En cas de négativité du frottis vaginal, les femelles ont été mises en contact avec les mâles la nuit suivante et les frottis ont de nouveau été réalisés le lendemain matin. Des observations ont aussi été effectuées sur des cerveaux de rats adultes.

L'expression de MCH a également été analysée dans 18 cerveaux d'embryons de souris de la souche C57BL/6 au 18^{ème} jour de vie embryonnaire : 6 souris étaient de type sauvage, 6 présentaient une mutation pour le gène Pax6 à l'état hétérozygote et 6 à l'état homozygote (Hill et coll., 1991). Ces derniers animaux nous ont gracieusement été donnés par le Docteur Franck Favor (Allemagne).

B. INJECTIONS DE BrdU

Pour l'étude de la genèse des neurones à hypocretine, les femelles gestantes ont reçu une injection intrapéritonéale d'une solution de BrdU préparée selon la méthode décrite par Markakis et Swanson en 1987 [150 mg de BrdU (Sigma) par kg de poids corporel, dans une solution de NaOH 0,07 M à 65°C].

Le BrdU est un analogue de l'uridine qui s'incorpore à la place d'une thymidine endogène au cours du cycle cellulaire durant la phase de synthèse de l'ADN (phase S), et ce pendant les 30 min à 2 heures suivant son injection. Les neurones dont les noyaux contiennent une forte concentration de BrdU sont donc nés au moment de l'injection.

C. METHODE DE FIXATION DES CERVEAUX

1. Choix des fixateurs

La qualité des résultats obtenus en microscopie photonique est très largement conditionnée par la méthode de préparation du matériel. La fixation consiste à obtenir à la fois une bonne conservation des structures cellulaires et de l'antigénicité des molécules étudiées ainsi que des ARNm.

Le fixateur utilisé a été une solution de paraformaldéhyde* 1% dans un tampon phosphate 0,1M*, pH 7,4 (PFA 1%).

2. Protocole d'anesthésie

Les animaux (rats mâles adultes ou femelles gestantes) ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une solution d'hydrate de chloral 7%* (1 ml pour 200 g de poids corporel).

3. Protocole de fixation

Les cerveaux de rats adultes ont été fixés par perfusion intracardiaque du liquide de fixation.

Le protocole mis en œuvre a été le suivant :

- la cage thoracique a été ouverte, l'aorte descendante clampée, le cœur dégagé puis l'oreillette droite et le ventricule gauche ont été fendus,
- une canule a été introduite dans le ventricule gauche jusqu'à l'aorte ascendante,
- le réseau vasculaire de l'animal a été rincé par perfusion de 200 ml d'une solution de NaCl 0,9%,
- les tissus ont ensuite été fixés par le passage de PFA 1%, préparé dans une solution de tampon phosphate 0,1M et maintenu à 4°C.

Les fœtus de rats ont été prélevés chez des femelles gestantes. Le protocole mis en œuvre a été le suivant :

- les femelles gestantes ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'une solution d'hydrate de chloral 7% (1 ml pour 200 g de poids corporel),

- après dissection de la paroi abdominale, les cornes utérines ont été prélevées et déposées sur une boîte de Pétri contenant une solution de NaCl 0,9%,
- les embryons, extraits des cornes utérines, ont été délivrés de leur enveloppe,
- la fixation des tissus a été obtenue par immersion pendant 24 heures dans la solution de PFA 1% des embryons entiers aux stades précoces (E10-E13) ou uniquement de leurs têtes aux stades plus tardifs (E14-E16).

Les cerveaux d'embryons de souris avaient déjà été fixés dans du PFA 1% lorsque nous les avons reçus.

D. PREPARATION DU MATERIEL HISTOLOGIQUE POUR LA MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Après fixation, les cerveaux de rats adultes, les têtes d'embryons (E14 à E18) ou les embryons entiers (E10 à E13) ont immédiatement été prélevés et postfixés dans le même fixateur pendant une nuit à 4°C.

1. Coupes au cryostat

La plus grande partie de ce matériel adulte ou embryonnaire a ensuite été plongée 24 heures dans une solution cryoprotectrice de saccharose 15% dans du tampon phosphate 0,1M*, pH 7,2 puis congelée dans les vapeurs d'azote liquide, stockée à -45°C jusqu'à la coupe. Pour les embryons, la congélation a été réalisée après inclusion dans un milieu d'enrobage (Tissutek, Microm-Francheville). Les cerveaux embryonnaires de souris reçus dans une solution de sucrose ont été congelés au laboratoire.

Ce matériel a ensuite été débité au cryostat à -20°C en coupes sériées de 10 µm d'épaisseur selon un plan de coupe frontal (cerveaux adultes), horizontal par rapport au prosencéphale ou sagittal (embryons) [cf. Résultats, concernant le choix du plan de coupe], coronal ou sagittal (cerveau d'embryons de souris). Les coupes ont été recueillies sur des lames gélatinées* et conservées à -45°C jusqu'à leur utilisation.

2. Coupes à la paraffine

Le reste du matériel obtenu après la postfixation a été déshydraté par des passages successifs dans des bains d'alcool (70°, 90°, 95°, 3x 100°). Ce matériel est ensuite plongé dans 2 bains de butanol, avant d'être inclus en paraffine (Paraplast) selon les techniques usuelles de l'histologie. Ce matériel a ensuite été débité au microtome en coupes frontales sériées de 6 à 7

µm d'épaisseur, recueillies sur des lames avec de l'eau gélatinée, séchées à 56°C et conservées au sec à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

E. COLORATION AU BLEU DE TOLUIDINE 1%

La coloration de coupes adjacentes aux coupes traitées par immunohistochimie et hybridation *in situ* permet l'analyse de la cytoarchitecture du tissu et facilite ainsi la localisation des marquages. Le bleu de toluidine est un colorant de la chromatine, des nucléoles et des corps de Nissl.

Les coupes en paraffine obtenues au microtome ont été plongées dans 3 bains de xylène de 10 min, puis réhydratées à température ambiante dans des bains d'alcool de titre décroissant (100°, 95°, 70°) de 2 min chacun, suivis d'un bain d'eau distillée de 15 min. Les coupes ont ensuite été plongées dans la solution de bleu de toluidine 1%* pendant environ 20 secondes, puis rincées dans 3 bains d'eau distillée afin d'éliminer l'excès de colorant. La coloration a alors été différenciée en plongeant les coupes dans un bain d'alcool 70°, puis dans un bain d'alcool 95° contenant quelques gouttes d'acide acétique (accélère la différenciation). La durée de ces 2 bains est fixée par appréciation *de visu* de la vitesse de différenciation : la coloration est suffisamment différenciée lorsque la myéline est décolorée et le fond des coupes blanc. Les coupes ont ensuite été déshydratées à température ambiante dans 2 bains successifs d'alcool 100° de 5 min chacun, puis plongées dans 3 bains de xylène de 5 min chacun, avant d'être montées entre lame et lamelle de façon permanente dans une résine naturelle (baume du Canada) non miscible à l'alcool.

En ce qui concerne les coupes obtenues au cryostat, le protocole décrit ci-dessus était précédé d'une décongélation des lames dans de l'eau distillée et d'une déshydratation à température ambiante dans des bains d'alcool de titre croissant (70°, 95°, 100°, 100°).

II. TECHNIQUES D'IMMUNOHISTOCHEMIE

Avant le traitement immunohistochimique, les coupes au cryostat montées sur lames gélatinées ont été immergées dans un tampon phosphate salin (PBS)* contenant 0,3% de triton X-100 (PBS-Triton*).

A. ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES

Les anticorps primaires utilisés pour nos études immunohistochimiques ainsi que leurs caractéristiques principales sont présentés dans le tableau 1.

La plupart des anticorps utilisés étaient des anticorps commercialisés. La spécificité de l'immunsérum anti-sMCH, préparé au laboratoire par immunisation de lapins avec des peptides synthétiques, a été vérifiée par des tests d'inhibition en phase liquide, d'immunoaffinité et d'immunoblotting (Fellmann et coll. 1987 ; Risold et coll. 1992), ainsi que par double marquage immunohistochimie/hybridation *in situ* (cet anticorps marque tous les neurones exprimant l'ARNm préproMCH (Fellmann et coll. 1989 ; Bugnon et coll. 1991).

Tableau 1 : Caractéristiques des anticorps primaires utilisés dans cette étude.

Anticorps	Type	Antigènes	Dilution	Origine	Référence
MCH (lapin)	polyclonal	MCH saumon (sMCH)	1/200 - lait	Laboratoire d'Histologie	Risold PY et coll. 1989
OrxA (hypocrétine) (chèvre)	polyclonal	OrxA humaine	1/1000 - lait	Santa Cruz Biotechnology, Inc	Cvetkovic V et coll. 2004
BrdU (souris)	monoclonal	uridine	1/50 - PBST	Becton Dickinson	Brischoux F et coll. 2001
Pax6 (lapin)	polyclonal	C-terminal souris/purifié	1/300 - PBST	Covance, Inc, Berkeley, California, USA	Davis JA et coll. 1996
TTF1 (Nkx2.1) (lapin)	polyclonal	C-terminal humaine	1/200 - lait	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (réf. : sc-13040)	Lazzaro D et coll. 1991
Nkx2.2 (souris)	monoclonal	protéine de poulet	1/10 - PBST	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA	Ju MJ et coll. 2004
Olf1 (lapin)	polyclonal	C-terminal /purifié	1/100 - PBST	Dr Reed RR, Howard Hughes Medical Institute, Baltimore, Maryland , USA	Davis JA et coll. 1996
Dlx (lapin)	polyclonal	homéodomaine de la protéine "distalless" de papillon / purifié	1/400 - PBST	Dr Boekhoff-Falk G, University of Wisconsin-Madison, Medical School	Panganiban G et coll. 2002
TH (lapin)	polyclonal	TH pure isolée de phéochromocytome de rat	1/1000 - lait	Institut Jacques Boy, Reims, France	Labatut R et coll. 1988
NF (souris)	monoclonal	sous-unité de 200 kD	1/500 - PBST	Boehringer Mannheim	Meeker ML et coll. 1993

B. METHODES D'IMMUNOHISTOCHEMIE INDIRECTE

1. Méthode d'immunofluorescence indirecte

La méthode d'immunofluorescence indirecte s'effectue en deux temps :

Premier temps : le site antigénique est reconnu au sein du tissu par l'anticorps primaire. Les coupes ont été incubées une nuit avec l'anticorps primaire à température ambiante en chambre humide. Les anticorps ont été préparés à la concentration appropriée :

- dans une solution de PBS-Triton pour les anticorps polyclonaux purifiés ou les anticorps monoclonaux,
- ou dans une solution « diluant anticorps »* contenant du PBS, du Triton X-100 (perméabilise le tissu et facilite la pénétration de l'anticorps), de l'albumine sérique bovine (BSA-Sigma) (sature les anticorps anti-BSA), des lactoprotéines (Régilait) (concurrence la fixation aspécifique dans le tissu des autres anticorps du sérum) et de l'azotate de sodium (Sigma), pour les anticorps polyclonaux (immunsérums).

Deuxième temps : l'utilisation d'un anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à un fluorochrome, permet de visualiser les sites de synthèse ou d'accumulation de la protéine fixée, par excitation du fluorochrome à une longueur d'onde donnée (microscope à fluorescence). Ainsi après plusieurs rinçages dans du PBS-Triton, les coupes ont été incubées 1 à 2 heures à température ambiante avec un anticorps anti-immunoglobuline G de lapin, de souris ou de chèvre, couplé soit à l'Alexa Fluor (dilution 1/400, Molecular Probes - Interchim) ou au « FluoroProbes 488 Anti Rabbit Ig G Antibodies » (1/200, FluoProbes - Interchim), soit à la cyanine-3 (Cy³TM, 1/400, Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. - Interchim). Ces anticorps secondaires ont été dilués dans le « diluant anticorps ». Après 3 rinçages dans du PBS-Triton, les coupes ont été montées entre lame et lamelle dans un milieu glycérolé (1 volume de glycérol, 1 volume de PBS-Triton). Les coupes ont été ainsi conservées à 4°C et observées au microscope à fluorescence.

L'utilisation de l'anticorps primaire de type monoclonal anti-BrdU [Becton Dickinson] nécessite une étape préalable à la méthode classique d'immunofluorescence indirecte, en raison d'une difficulté d'accès aux sites antigéniques nucléaires. Les coupes ont donc subi une hydrolyse acide par une incubation dans de l'HCl 1N à 65°C pendant 5 min, ont été rincées dans du PBS (2 x 10 min) puis perméabilisées par un bain de PBS-Triton de 30 min, avant d'être finalement incubées avec l'anticorps primaire anti-BrdU.

2. Méthode aux complexes peroxydase anti-peroxydase (PAP)

Cette méthode comportait trois étapes :

La première était identique à la première étape de la méthode d'immunofluorescence indirecte.

Pendant la deuxième étape, les coupes ont été incubées 1 heure avec un anticorps anti-immunoglobuline G spécifique non conjugué, dilué au 1/100 dans du « diluant anticorps ». Après plusieurs rinçages dans du PBS sans Triton X-100, les coupes ont été incubées 1 heure avec le complexe PAP (DAKO) dilué au 1/200 dans du « diluant anticorps » ne contenant pas de Triton X-100.

La troisième étape correspond à la révélation de la peroxydase fixée, qui est obtenue par la précipitation d'un dérivé oxydé de la diaminobenzidine (DAB, Sigma) de couleur brune. Après plusieurs bains de PBS, les coupes ont été incubées de 3 à 10 minutes dans une solution de PBS contenant 0,05% de DAB et 0,01% d'eau oxygénée, substrat de la peroxydase. Lorsque le marquage était estimé correct, les coupes étaient soigneusement rincées dans du PBS. Le marquage obtenu pouvait être contrasté en plongeant les coupes quelques secondes dans une solution de tétraoxyde d'osmium (OsO_4) 0,01% dans de l'eau distillée. Après déshydratation dans des bains successifs d'alcool (70°, 95°, 2 x 100°) de 3 minutes chacun, les coupes ont été plongées trois fois 3 min dans des bains de xylène, avant d'être montées entre lame et lamelle au baume du Canada.

3. Méthodes de double marquage

La combinaison de deux techniques d'immunodétection telles que celles décrites précédemment permet de mettre en évidence, sur une même coupe, deux antigènes différents localisés au sein de la même cellule ou dans deux populations neuronales différentes.

3.1. Double immunofluorescence indirecte

Les deux antigènes d'intérêt sont détectés avec deux anticorps primaires préparés chez deux espèces différentes. Après incubation des coupes avec le premier anticorps primaire, le premier antigène a été révélé avec l'anticorps secondaire « FluoroProbes 488 ». Les coupes ont ensuite été soigneusement lavées dans du PBS-Triton, puis incubées avec le deuxième anticorps primaire révélé avec un anticorps secondaire conjugué à la cyanine-3. Chacune de ces deux étapes a été effectuée suivant le même protocole que celui décrit pour la méthode d'immunofluorescence indirecte. Les marquages ont été observés au microscope à

fluorescence et leur superposition ou juxtaposition a été vérifiée en changeant les combinaisons de filtres.

Cette technique a été utilisée pour les couples d'anticorps primaires suivants :

- anti-BrdU et anti-Hcrt
- anti-NF (anti-neurofilament) et anti-MCH
- anti-Pax-6 et anti-Nkx2.2
- anti-Nkx2.1 et anti-Nkx2.2
- anti-TH (anti-tyrosine hydroxylase) et anti-Nkx2.2
- anti-MCH et anti-Nkx2.2

3.2. Couplage immunoenzymologie-immunofluorescence

Cette méthode permet la mise en évidence de deux antigènes différents à partir de deux anticorps primaires préparés chez des espèces identiques (ou différentes). Le premier antigène a été révélé par la méthode aux complexes PAP décrite précédemment, à l'exclusion des étapes d'intensification du marquage, de déshydratation et de montage des coupes. Les coupes ont ensuite été abondamment lavées dans du PBS-Triton, puis le deuxième antigène a été révélé par la fluorescence avec des anticorps anti-immunoglobuline G conjugués à un fluorochrome, selon la procédure précédemment indiquée. Les coupes ont été montées entre lame et lamelle dans un milieu glycérolé. Les deux types de marquage ont été observés simultanément au microscope à fluorescence en combinant l'éclairage à transmission en fond clair et l'éclairage pour la fluorescence. Cette méthode permet d'éliminer les possibilités de réactions croisées avec des anticorps secondaires tous deux dirigés contre des immunoglobulines G de lapin et a été utilisée dans notre travail pour le couple TH / MCH.

IV. HYBRIDATION IN SITU

A. OBTENTION DE RIBOSONDES Olf1, Dlx, Pax6, et Shh

Les sondes anti-sens (complémentaires des l'ARNm cellulaires) ont été synthétisées à partir des plasmides contenant les différents inserts d'intérêt.

Nous détaillerons ici le protocole d'obtention de la sonde Olf1. Concernant les autres sondes, nous spécifierons uniquement les éléments qui diffèrent de cette description initiale.

1. Obtention de la ribosonde Olf1

Le plasmide pBluescript KS+ (Fermentas), contenant un fragment d'ADNc de 2,25 kb correspondant à une partie de la séquence de l'ARNm Olf1, nous a été fourni par le Docteur S Garel (Ecole Normale Supérieure, Paris).

Le plasmide, reçu sur papier Whatmann, a été réhydraté dans 40 µl d'eau ultra-pure pendant une nuit. Le lendemain matin, après centrifugation, le surnageant a été récupéré, dosé par spectrophotométrie à 260 nm (Biophotometer, Eppendorf), puis stocké à -20°C.

Transformation des bactéries compétentes

La transformation des bactéries DH5α (Invitrogen, laboratoire de Bactériologie-EA 3181-Besançon) a été réalisée par choc thermique selon un protocole classique. Dans un tube stérile de 15 ml (refroidi à 4°C), à 100 µl de bactéries compétentes préalablement décongelées ont été ajoutés 100 à 500 ng de plasmide recombinant. Ce mélange a été incubé 30 minutes dans la glace puis a subi un choc thermique à 42°C pendant 55 secondes et a été remis immédiatement dans la glace pendant 2 minutes, avant d'y ajouter 900 µl de milieu de culture liquide MH (Biorad, laboratoire de Bactériologie-Besançon). Les bactéries ont alors été incubées 1h30 à 37°C sous agitation, puis 100 µl de bactéries ont été étalés sur des boîtes de Pétri contenant une gélose MH AXI (Biorad, laboratoire de Bactériologie), c'est-à-dire un milieu gélosé complété par de l'ampicilline (100 µg/ml), du 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-gal, 40 µg/ml) et de l'isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (IPTG, 40 µg/ml).

Sélection des bactéries recombinantes

Le deuxième jour, soit après une nuit d'incubation à 37°C, les colonies de bactéries recombinantes (dont le plasmide contient l'insert), ont été repérées sur la boîte de Pétri. La

présence du gène de résistance à l'ampicilline permet de sélectionner de façon préférentielle sur le milieu gélosé les colonies transformées par le plasmide. L'insertion de la séquence clonée supprime l'expression du gène *lacZ* codant la β -galactosidase (qui dégrade le substrat chromogénique X-gal), permettant ainsi de différencier par une réaction colorée les colonies de bactéries transformées recombinantes (blanches), des colonies de bactéries transformées non recombinantes (bleues). Quelques colonies recombinantes ont alors été prélevées et repiquées chacune sur un quart de la surface des boîtes de Pétri contenant la même gélose MH AXI, puis ont été mises en culture une nuit à 37°C.

Le troisième jour, une partie de chacun des 4 clones a été stockée séparément dans un milieu « cœur-cervelle » glycérolé (Bectone Dickinson) à -80°C. Dans 10 ml de milieu de culture MH liquide contenant de l'ampicilline (100 μ g/ml), chacun des 4 clones a été ensemencé séparément, puis mis en culture une nuit à 37°C sous agitation.

Extraction de l'ADN plasmidique par « MiniPrep »

Le quatrième jour, l'extraction d'ADN plasmidique a été réalisée à l'aide d'une trousse commerciale (Qiagen), en suivant les recommandations du fournisseur, à partir de 5 ml du précédent liquide de culture bactérienne. Le culot bactérien obtenu après centrifugation (5000 g, 5 minutes) a été remis en suspension dans 250 μ l de tampon P1 contenant de la ribonucléase A (RNase A). La lyse des bactéries a été réalisée en conditions alcalines (NaOH/SDS) à l'aide du même volume de tampon 2 (« lysis buffer »), les tubes ayant été agités par inversion. Le SDS (sodium dodecyl sulfate) solubilise les composants phospholipidiques et protéiques de la membrane cellulaire, conduisant ainsi à la lyse et au relargage du contenu cellulaire, tandis que les conditions alcalines dénaturent les ADN chromosomaux et plasmidiques ainsi que les protéines. La neutralisation de la réaction a été réalisée par l'ajout de 350 μ l de tampon N3 (« neutralization buffer »), les tubes ayant été de nouveau agités par inversion. Pendant cette étape de neutralisation, la forte concentration en sels permet la précipitation de l'ADN chromosomal, des protéines dénaturées, des débris cellulaires et du SDS, tandis que l'ADN plasmidique reste en solution. Après centrifugation (17000 g, 10 minutes, 4°C), le surnageant a été récupéré, appliqué sur une minicolonne fournie avec le kit, puis centrifugé (17000g, 1 min, 4°C) et l'ADN plasmidique est retenu par une membrane. Après lavage par 750 μ l de tampon PE, l'ADN plasmidique a été élué avec 60 μ l d'eau distillée stérile, quantifié à 260 nm, puis stocké à -40°C.

Linéarisation du plasmide

Le plasmide a été linéarisé par l'enzyme de restriction NotI (Roche), selon les données du fournisseur. La réaction de digestion enzymatique a été réalisée à 37°C pendant 3 heures, dans le mélange réactionnel suivant :

ADN plasmidique	10 µg
Tampon H 10X	2 µl
NotI	1 µl (10 U)
Eau ultra-pure	qsp 20 µl

Le vecteur a ensuite été purifié par un volume de phénol-chloroforme-isoamylalcool. La phase aqueuse issue d'une centrifugation est ajoutée à un volume de chloroforme. Une nouvelle centrifugation (12000g, 5 min, 4°C) permet de prélever la phase aqueuse contenant le plasmide linéarisé, qui va précipiter en présence d'éthanol 99° (2 volumes) à -40°C pendant 30 minutes. Le culot issu d'une nouvelle centrifugation (18000g, 25 min, 4°C) a ensuite été lavé avec 100 µl d'éthanol 70°, centrifugé (18000g, 3 min, 4°C), puis séché après élimination du surnageant avec un évaporateur sous vide pendant 2 minutes, repris dans de l'eau ultra-pure et dosé à 260 nm.

Transcription in vitro

L'insert d'intérêt est situé dans le site de polyclonage du plasmide, qui est encadré notamment par le promoteur de l'ARN polymérase T3 (Roche) permettant l'obtention de la sonde antisens. La synthèse de la sonde marquée à la digoxigénine a été réalisée par transcription *in vitro* à l'aide d'un kit de transcription (Roche) : le mélange réactionnel suivant, préparé à 4°C, a été incubé à 37°C dans un thermocycleur pendant 2 heures :

ADN plasmidique linéarisé	1 µg
ARN Polymérase T3 (20 U/µl)	2 µl (40 U)
Tampon de transcription 10X	2 µl
NTP (10 mM contenant du DIG-11-UTP)	2 µl
Inhibiteur de RNase (20 U/µl)	1µl (20 U)
Eau ultra-pure	qsp 20 µl

L'ADN plasmidique a ensuite été digéré à 37°C dans un thermocycleur pendant 20 minutes en présence de 2 µl (20 U) de DNase I.

La réaction a été arrêtée par 2 µl d'EDTA 0,2 M pH 8.

Purification du produit de transcription

Les ribosondes ont été précipitées dans du LiCl 4M (1/10^e du volume) et de l'éthanol 99° (2,5 volumes) pendant 2 heures à -20°C. Après centrifugation (12000g, 20 minutes, 4°C), le surnageant a été éliminé et le culot obtenu a été rincé avec 100 µl d'éthanol 70°C, centrifugé (12000g, 3 min, 4°C), puis séché après élimination du surnageant, repris dans de l'eau ultra-pure et dosé par spectrophotométrie à 260 nm.

La qualité de la transcription et l'intégrité de la ribosonde ont été vérifiées par migration sur gel d'agarose 1,5% d'1 µl de sonde après dénaturation à 80°C pendant 5 minutes.

2. Obtention de la ribosonde Dlx

Le plasmide pPGK-neo, contenant un fragment de 405 pb correspondant aux nucléotides 899 à 1304 de l'ARNm Dlx (GI=6753643), nous a été fourni par le Docteur M Wassef (Ecole Normale Supérieure, Paris).

Le plasmide a été linéarisé par l'enzyme de restriction Hind III (Gibco), selon les données du fournisseur dans le mélange réactionnel suivant :

ADN plasmidique	10 µg
Tampon react2 10X	2 µl
Hind III (10 U/µl)	1 µl (10 U)
Eau ultra-pure	qsp 20 µl

La synthèse de la sonde marquée à la digoxigénine a été réalisée par transcription *in vitro* à l'aide d'un kit de transcription (Roche) et le mélange réactionnel était le suivant :

ADN plasmidique linéarisé	1 µg
ARN polymérase T7 (20 U/µl)	2 µl (40 U)
Tampon de transcription 10X	2 µl
NTP (10 mM contenant du DIG-11-UTP)	2 µl
Inhibiteur de RNase (20 U/µl)	1 µl (20 U)
Eau ultra-pure	qsp 20 µl

A l'issue de la « miniprep », pour cette sonde et les suivantes, la séquence nucléotidique des fragments d'ADNc clonés a été vérifiée à l'aide d'un séquenceur automatique (3130 Genetic Analyzer) avec des amorces universelles -20m13 et M13 reverse en présence de didésoxyribonucléosides triphosphates fluorescents (Kit BigDye^R Terminator v.3.1). Les profils ont été analysés par le logiciel Sequencing Analysis 5.2. Les séquences des inserts ont

été confrontées aux séquences répertoriées dans Genbank™ afin de vérifier l'exactitude de leur identité.

3. Obtention de la ribosonde Pax6

Le plasmide pGem-T easy (Promega), contenant un fragment de 189 pb correspondant aux nucléotides 1669 à 1857 de l'ARNm Pax6 (GI=6981333), a été fabriqué au laboratoire par D Colin au cours de son stage de Master 2 (résultats non publiés).

Les bactéries compétentes JM109 (Promega) ont été utilisées pour la transformation.

Le plasmide a été linéarisé par l'enzyme de restriction NcoI (Roche), selon les données du fournisseur, dans le mélange réactionnel suivant :

ADN plasmidique	10 µg
Tampon H 10X	2 µl
NcoI (10 U/µl)	1 µl (10 U)
Eau ultra-pure	qsp 20 µl

La synthèse de la sonde marquée à la digoxigénine a été réalisée par transcription *in vitro* à l'aide d'un kit de transcription (Roche) et le mélange réactionnel était le suivant :

ADN plasmidique linéarisé	1 µg
ARN Polymérase SP6 (20 U/µl)	2 µl (40 U)
Tampon de transcription 10X	2 µl
NTP (10 mM contenant du DIG-11-UTP)	2 µl
Inhibiteur de RNase (20 U/µl)	1 µl (20U)
Eau ultra-pure	qsp 20 µl

4. Obtention de la ribosonde Shh

Le plasmide pBluescript II SK (Fermentas), contenant un fragment de 2,6 kpb correspondant aux nucléotides 67 à 2676 (GI=40254618), nous a été fourni par le Docteur AP MacMahon (Harvard University - Massachusetts, USA).

Le plasmide a été linéarisé par l'enzyme de restriction EcoRI (Gibco), selon les données du fournisseur dans le mélange réactionnel suivant :

ADN plasmidique	10 µg
Tampon de réaction 10X	2 µl
EcoRI (10 U/µl)	1 µl (10 U)
Eau ultra-pure	qsp 20 µl

La synthèse de la sonde marquée à la digoxigénine a été réalisée par transcription *in vitro* à l'aide d'un kit de transcription (Roche) et le mélange réactionnel était le suivant :

ADN plasmidique linéarisé	1 µg
ARN polymérase T7 (20 U/µl)	2 µl (40 U)
Tampon de transcription 10X	2 µl
NTP (10 mM contenant du DIG-11-UTP)	2 µl
Inhibiteur de RNase (20 U/µl)	1 µl (20 U)
Eau ultra-pure	qsp 20 µl

Les principales caractéristiques des sondes utilisées sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques des sondes utilisées en hybridation *in situ*.

Sonde	Longueur de l'insert	Plasmide	Bactérie	Digestion	Trancrition	Température d'hybridation	Concentration (ng/lame)	Références
Olf1	2,25 kb	pBluescript KS+ (Fermentas)	DH5 α (Invitrogen)	NotI (Roche)	T3 (Roche)	56°C	100	<i>Garcia-Dominguez M et coll. 2003</i>
Dlx	405 b	pPGK-Neo (Dr Wassef)	DH5 α (Invitrogen)	HindIII (Gibco)	T7 (Roche)	60°C	100	<i>Fernandez AS et coll. 1998</i>
Pax6	189 b	pGem-T easy (Promega)	JM109 (Promega)	NcoI (Roche)	SP6 (Roche)	56°C	100	<i>Résultats du laboratoire non publiés</i>
<i>Shh</i>	2,6 kb	<i>pBluescript II SK</i> (Fermentas)	<i>DH5α</i> (Invitrogen)	<i>EcoRI</i> (Gibco)	<i>T7</i> (Roche)	70°C	50	<i>Ramalho-Santos M et coll.2000</i>

B. HYBRIDATION

1. Préparation des coupes de cerveau d'embryons de rat

Les coupes, obtenues au cryostat, conservées à -40°C, ont été sorties du congélateur et postfixées 10 minutes à 4°C dans du PFA 4% en PBS* pH 7,5 préparé extemporanément.

2. Préhybridation

Les lames ont ensuite été rincées rapidement et avec précaution 2 fois 5 minutes dans du PBS pH 7,5 à température ambiante puis 15 minutes dans du SSC 5X. Le tampon SSC* (chlorure de sodium/citrate de sodium) est similaire à une solution saline physiologique et permet d'ajuster le pH et l'osmolarité du tissu à des valeurs normales.

Ensuite ont été déposés, par lame, 150µl de tampon « d'hybridation »* préchauffé à 56°C. Les lames ont ensuite été recouvertes de parafilm et placées en milieu humide à 56°C, sans agitation, pendant 4 heures.

3. Hybridation

Une fois le parafilm enlevé, ont été déposés par lame, 50 µl de tampon d'hybridation contenant 100 ng (50 ng pour Shh) de sonde marquée, préalablement dénaturée à 80°C pendant 5 minutes. Afin de limiter l'évaporation de la sonde au cours de l'hybridation, une lamelle a été scellée à chaque lame avec de la colle « rubbercement » (Royal Talens). Les coupes ont ensuite été placées une nuit en chambre humide, à 56°C (pour Olf1 et Pax6), 60°C (pour Dlx) et 70°C pour Shh.

4. Posthybridation et révélation enzymatique

Le lendemain matin, le rubbercement et les lamelles ont été soigneusement retirés avec une pince, puis les coupes ont été soumises à une série de lavages de « stringence » croissante destinés à éliminer les hybrides non spécifiques : 30 minutes sans agitation dans du SSC 2X à température ambiante, une heure dans du SSC 2X à 56°C et une heure dans du SSC 0,1X à 56°C. Les coupes ont ensuite été rincées 5 minutes dans du tampon 1* à température ambiante, puis incubées 2 heures à température ambiante en présence d'un anticorps anti-DIG conjugué à la phosphatase alcaline (Roche), dilué au 1/1300^{ème} dans du tampon 1 additionné de 0,5% de réactif de blocage des sites aspécifiques (Blocking Reagent, 1096176, Roche) (200 µl/lame). Les coupes ont ensuite été lavées dans 2 bains de 15 minutes de tampon 1 et rincées 5 minutes dans du tampon 3*.

La révélation du marquage a été réalisée à température ambiante en incubant les coupes à l'abri de la lumière pendant une nuit avec 200 µl d'une solution de substrat de la phosphatase alcaline contenant 4,5 µl de NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) et 3,5 µl de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt) (Roche) par ml de tampon 3. La réaction enzymatique a été arrêtée par un bain de 15 minutes dans le tampon TE 1X*. Les coupes ont alors été rincées 10 minutes dans du PBS, puis montées entre lame et lamelle dans un mélange constitué de 50% de PBS et 50% de glycérine.

V. COUPLAGE HYBRIDATION *IN SITU* / IMMUNOHISTOCHIMIE

Cette technique a été utilisée pour le couple Dlx (hybridation *in situ*) – MCH (immunohistochimie) : elle a comporté pour la sonde Dlx les mêmes étapes d'hybridation que celles précédemment décrites jusqu'à la posthybridation, étape d'incubation avec l'anticorps anti-DIG comprise. Les coupes ont ensuite été lavées deux fois 10 minutes dans du tampon 1 puis 10 minutes dans du PBS.

Les coupes ont ensuite été incubées une nuit, à température ambiante, en chambre humide, avec l'anticorps anti-sMCH dilué à la concentration de 1/200 dans une solution de PBS contenant 1% de BSA. Le lendemain matin, après 5 rinçages de 5 minutes dans du PBS/BSA 1%, les coupes ont été incubées pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire « FluoroProbes 488 Anti Rabbit Ig G Antibodies » (FluoProbes - Interchim), dilué au 1/200 dans du PBS/BSA1%. Après plusieurs rinçages (10 minutes dans du PBS/BSA1%, 2 fois 10 minutes dans du PBS, 2 fois 15 minutes dans du tampon 1 et 5 minutes dans du tampon 3), les coupes ont été incubées une nuit avec la solution de NBT/BCIP, afin de révéler le marquage obtenu pour Dlx en hybridation *in situ*. La suite de cette technique était identique aux étapes d'hybridation *in situ* ultérieures à cette révélation, précédemment décrites.

VI. OBSERVATIONS, ACQUISITION ET TRAITEMENT DES IMAGES

Les observations de coupes ont été réalisées avec un microscope à fluorescence Olympus BX51. La nomenclature utilisée pour les régions, noyaux et aires du cerveau est celle définie par Swanson (1992). L'acquisition des images a été effectuée avec une caméra Olympus DP50 et le logiciel AnalySIS 3.1 (Soft Imaging System). Les images ont ensuite été importées dans le logiciel Adobe Photoshop 7.0 pour le traitement. Les cartographies ont été réalisées à l'aide du logiciel Adobe Illustrator Cs.

TAMPONS
ET
SOLUTIONS

I. FIXATIONS ET PERFUSIONS

Hydrate de chloral 7%

Hydrate de chloral 7g
Eau distillée qsp 100 ml

Injecter une dose létale intrapéritonéale de 500 ml pour 100 g de masse corporelle.

Tampon phosphate 0,2 M

Phosphate disodique anhydre 71,62 g
Phosphate monosodique anhydre 27,20 g
Eau distillée qsp 1000 ml
Ajuster le pH à 7,2.

Tampon phosphate 0,1 M – saccharose 15%

Saccharose 15 g
Tampon phosphate 0,2 M 500ml
Eau distillée qsp 500 ml.

Fixateur paraformaldéhyde (PFA) 1 % ou 4 % dans tampon phosphate 0,1 M

1) Solution A : PFA 2% ou 8%

PFA 20 g ou 80 g
Eau distillée 1000 ml

Dissoudre à 60°C au bain-marie et ajouter quelques gouttes de NaOH 1 N pour éclaircir la solution. Filtrer.

2) Solution B : tampon phosphate 0,2 M

Au moment de l'emploi, mélanger les solutions A et B, volume à volume.

II. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Gélatine (pour lames gélatinées)

Gélatine 5 g
Eau distillée 1000 ml
Chauffer 30 min à 60°C puis refroidir à 45°C.
Alun de chrome 4g
Laisser refroidir à température ambiante.
Azide de sodium 500 mg
Filtrer. Plonger les lames 10 min et les sécher à l'étuve à 37°C.

Bleu de toluidine

Bleu de toluidine 0,25 g
Tétraborate de sodium 0,5 g
Eau distillée 100 ml
Filtrer sur papier avant utilisation

III. IMMUNOHISTOCHEMIE

Tampon PBS « Phosphate Buffered Saline »

Chlorure de sodium 8,76 g
Phosphate disodique anhydre 1,42 g
Phosphate monopotassique anhydre 0,27 g
Eau distillée qsp 1000 ml
Ajuster le pH à 7,2-7,4

PBS-Triton

Tampon PBS avec 0,3% de Triton X-100

« diluant anticorps »

Tampon PBS avec 0,3% de Triton, 1% d'albumine sérique bovine, 10% de lactoprotéines (Régilait) et 0,01% d'azoture de sodium (Prolabo).

IV. HYBRIDATION IN SITU

H₂O-DEPC

Diéthylpyrocarbonate 1 ml

Eau distillée 1000 ml

Laisser une nuit à 37°C.

Autoclaver.

PBS 10X

Chlorure de sodium 90 g

Phosphate disodique anhydre 17,7 g

NaOH 4 g

Eau distillée 1000 ml

Ajuster le pH à 7 avec NaOH 5N.

Traiter au DEPC (1 ml pour 1000 ml). Autoclaver.

SSC 10 X

Chlorure de sodium 87,65 g

Citrate de sodium 44,1 g

Eau distillée stérile qsp 1000 ml

Ajuster le pH à 7 avec quelques gouttes de NaOH 10 N

Traiter au DEPC. Autoclaver.

Tampon d'hybridation

Formamide désionisé 12,5 ml

SSC 10 X 12,5 ml

ADN de sperme de saumon 200 µg/ml

Tampon 1

Tris HCl 100 mM 12,114 g

NaCl 150 mM 8,76 g

Eau distillée qsp 1000 ml

Ajuster le pH à 7,5 avec du NaOH 5N.

Tampon 3

Tris base 100 mM 12,114 g

Chlorure de sodium 100 mM 5,84 g

Chlorure de magnésium 50 mM 10,16 g

Eau ultrapure qsp 1000 ml

Ajuster le pH à 9,5 avec HCl 1 N

Tampon TE 10X(à autoclaver)

Tris base 10 mM 12,11 g

EDTA 1mM 3,72 g

Eau distillée qsp 1000 ml

pH 8

RESULTATS

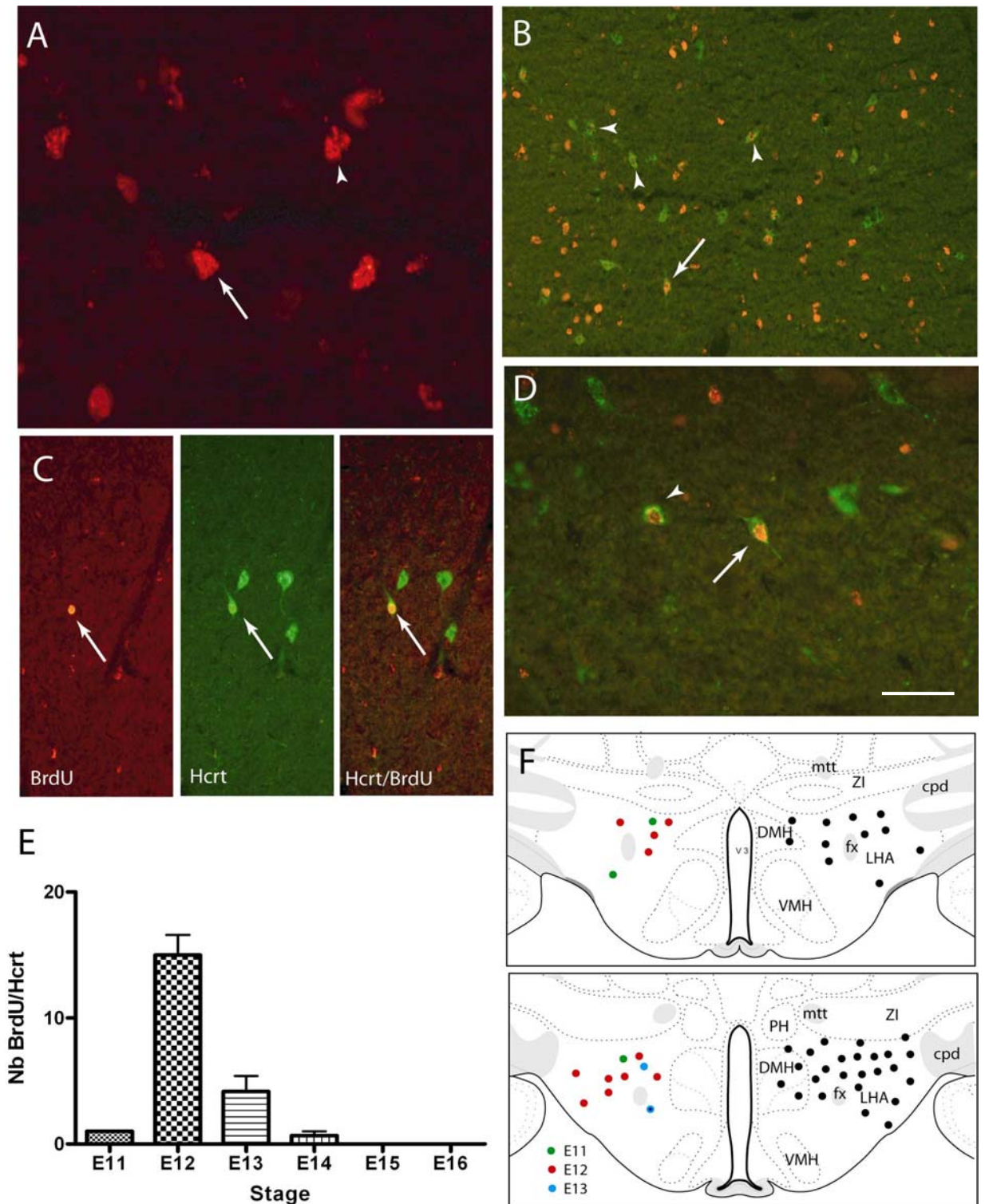
I. GENESE DES NEURONES A HYPOCRETINE DANS LE DIENCEPHALE VENTRAL DE RAT

Ce travail a été effectué sur des coupes de cerveaux de rats nés de mères injectées par le BrdU entre le 10^{ème} et le 16^{ème} jour de vie embryonnaire. Seules les coupes passant par l'hypothalamus ont été analysées.

Les neurones ayant incorporé le BrdU présentent une immunoréactivité de localisation nucléaire et d'intensité variable d'une cellule à l'autre. Les noyaux des cellules ayant subi plusieurs divisions successives après l'incorporation du BrdU présentent un marquage fragmenté et/ou de plus faible intensité. Les cellules ayant intégré le marqueur lors de la phase de réplication de l'ADN du dernier cycle cellulaire précédant leur différenciation sont aisément identifiables à leurs noyaux pleinement et intensément marqués. Par conséquent, seuls les neurones possédant les noyaux les plus fortement marqués indiquent la date de la dernière mitose des neuroblastes, donc la date de naissance de ces neurones (Fig. 8 A) (Gratzner, 1982 ; Miller et Nowakowski, 1988 ; Markakis et Swanson, 1997). D'après la littérature concernant la neurogénèse hypothalamique, il existe un gradient latéromédian en ce qui concerne la distribution des noyaux intensément marqués, mis en évidence grâce à l'utilisation de BrdU ou de thymidine tritiée (Markakis et Swanson, 1997 ; Altman et Bayer, 1978 et 1986). Sur nos coupes, nous avons observé un gradient similaire quant à la distribution des noyaux BrdU positifs (cf. Brischoux et coll., 2001), confortant notre approche méthodologique.

Après double marquage immunohistochimique pour le peptide Hcrt et pour le BrdU (Fig. 8 B-D), il apparaît que les neurones à Hcrt sont générés du 11^{ème} au 14^{ème} jours de vie embryonnaire, avec un pic étroit au 12^{ème} jour, 70% des neurones doublement marqués étant observés chez des rats nés de mères ayant reçu une injection de BrdU au 12^{ème} jour de gestation (Fig. 8 E). Aucun gradient spatiotemporel n'a été observé concernant la distribution de ces neurones (Fig. 8 F).

Ces travaux concernant la genèse des neurones à Hcrt dans le diencéphale ventral de rat ont fait l'objet d'une publication dans l'European Journal of Neuroscience (Amiot et coll., 2005).



Amiot et coll., 2005.

Fig. 8 : **A.** Noyaux marqués par le BrdU : seuls les noyaux intensément et abondamment marqués (flèche) ont été comptés. Les noyaux partiellement marqués (tête de flèche) n'ont pas été comptés. **B-D.** Double immunofluorescence indirecte BrdU (révélé par la Cy3) et Hcrt (révélée par Alexa). Seuls les neurones à Hcrt possédant un noyau intensément immunoréactif pour le BrdU ont été pris en considération (flèches). De nombreux neurones aux noyaux plus faiblement immunoréactifs ont également été observés mais ils n'ont pas été comptés. **E.** Histogramme de la genèse des neurones à Hcrt dans l'hypothalamus. **F.** Distribution schématique des neurones à Hcrt (en noir à droite) et des neurones BrdU/Hcrt positifs (à gauche), représentée sur deux dessins de coupes coronales d'hypothalamus tubéral de rat (niveau rostral en haut et niveau caudal en bas). Adapté de Swanson, 1992. Barre d'échelle : (A) 20 μ m, (B) 100 μ m, (C) 75 μ m, (D) 50 μ m.

II. TRAVAUX CHEZ L'EMBRYON

La deuxième partie de notre étude a été effectuée sur des coupes d'embryons de rat des stades embryonnaires E10 à E16. Le stade E10 correspond à la fermeture du neuropore antérieur et au début de la neurogenèse, tandis que le stade E16 correspond à la fin de la genèse des neurones à MCH et de l'hypothalamus, par ailleurs ce stade coïncide avec la très nette diminution de l'expression dans le diencephale de plusieurs des facteurs de transcription étudiés (cf. résultats décrits ultérieurement).

A. DEFINITION DES AXES DE L'EMBRYON

Afin de faciliter la description spatiotemporelle des différents gènes d'intérêt, il est essentiel de préciser les grands axes du cerveau de rat aux différents stades de son développement embryonnaire. En effet, de par la courbure de l'embryon, des désaccords persistent concernant les différents plans de coupe, notamment horizontaux et transversaux (cf. discussion ; Nieuwenhuys et coll., 1997 ; Puelles et Rubenstein, 1993 et 2003). Ces derniers sont en théorie définis par rapport au grand axe antéropostérieur du tube neural embryonnaire. Cet axe coïncide avec le *sulcus limitans* dans les régions postérieures du SNC et sépare le tube neural en plaque basale et plaque alaire. Malheureusement dans le prosencéphale, il n'existe aucun consensus concernant ce sulcus (Nieuwenhuys et coll., 1997), ainsi selon les auteurs, un plan de coupe horizontal peut également être appelé transversal. Pour nos travaux, nous nous sommes inspiré de deux atlas du développement du cerveau de rat. L'atlas de Foster reprend les critères d'orientation définis par Puelles et Rubenstein, ainsi le *sulcus limitans* se termine en arrière de la vésicule optique.

Dans l'atlas « Developmental Brain maps » de Swanson, l'axe de l'embryon se termine au dessus de la lame terminale au niveau de la commissure blanche antérieure (Fig. 9). Par conséquent, l'axe du prosencéphale change avec le stade embryonnaire, parallèlement à l'évagination des vésicules télencéphaliques. Le plan de coupe varie également en fonction de cet axe : une même coupe peut ainsi être transversale dans le mésencéphale et horizontale dans le télencéphale (Fig. 10).

Dans cette étude chez l'embryon, nous avons utilisé un plan de coupe horizontal très largement inspiré de l'atlas de Foster concernant le développement cytoarchitectonique de l'embryon de rat. Des coupes parallèles à ce plan passent par l'hypothalamus et par une partie du télencéphale antérieur, ainsi que par chacun des territoires d'expression des différents

facteurs de transcription étudiés (cf. infra). De plus, ce plan coïncide pour les stades plus âgés (E15-E16) avec le plan de coupe horizontal classiquement utilisé pour le cerveau adulte (Fig. 11). Nous avons ainsi fixé arbitrairement les surfaces ventrale/dorsale et antérieure/postérieure du prosencéphale, nous affranchissant des discussions en cours concernant le trajet du *sulcus limitans* dans ces régions antérieures du tube nerveux.

Seule une telle rigueur permet de décrire de façon cohérente les marquages observés aux différents stades du développement embryonnaire et de comparer la disposition des différentes structures les unes par rapport aux autres, des stades embryonnaires au stade adulte, facilitant ainsi la discussion. Nous utilisons par ailleurs pour nos études neuroanatomiques chez le rat adulte l'atlas « Brain Maps » également conçu par Swanson. Par souci de cohérence, la nomenclature de référence et les grandes divisions du cerveau correspondent à celles des deux ouvrages précédemment cités (sauf exceptions alors précisées).

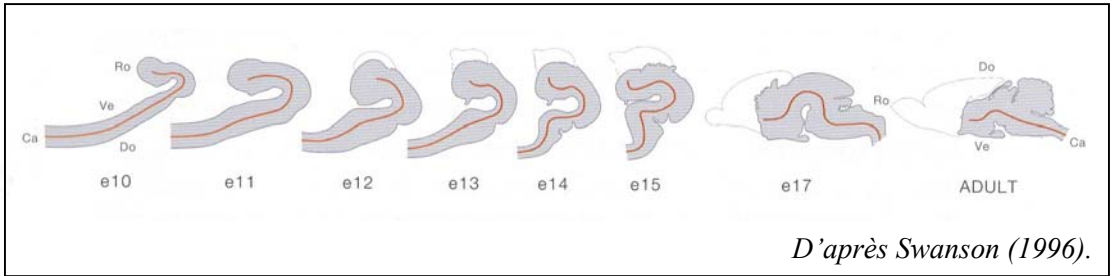


Fig. 9 : Axe du tube nerveux de l'embryon et du cerveau de rat adulte.

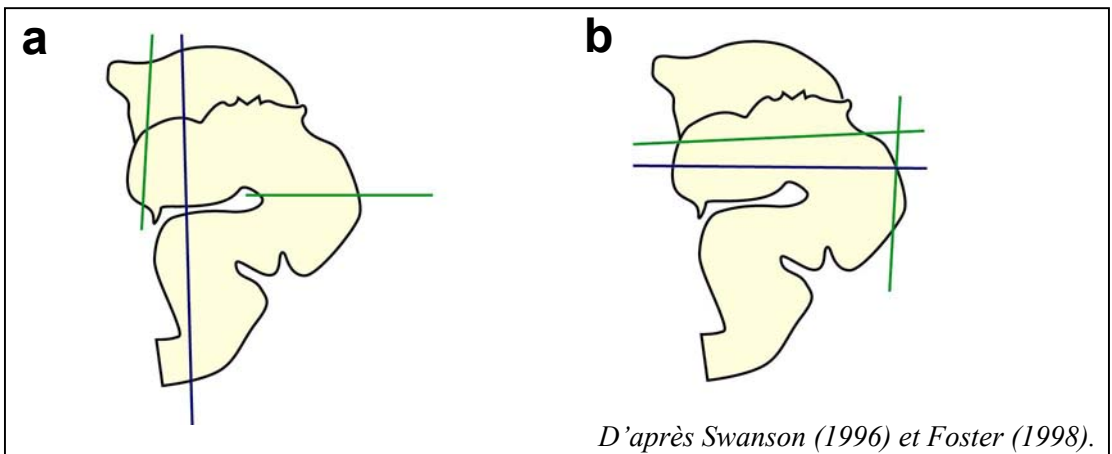


Fig. 10 : Plans de coupe : **a.** Transverses *d'après Swanson* et horizontal *d'après Foster*.
b. Horizontaux *d'après Swanson* et transverse *d'après Foster*.

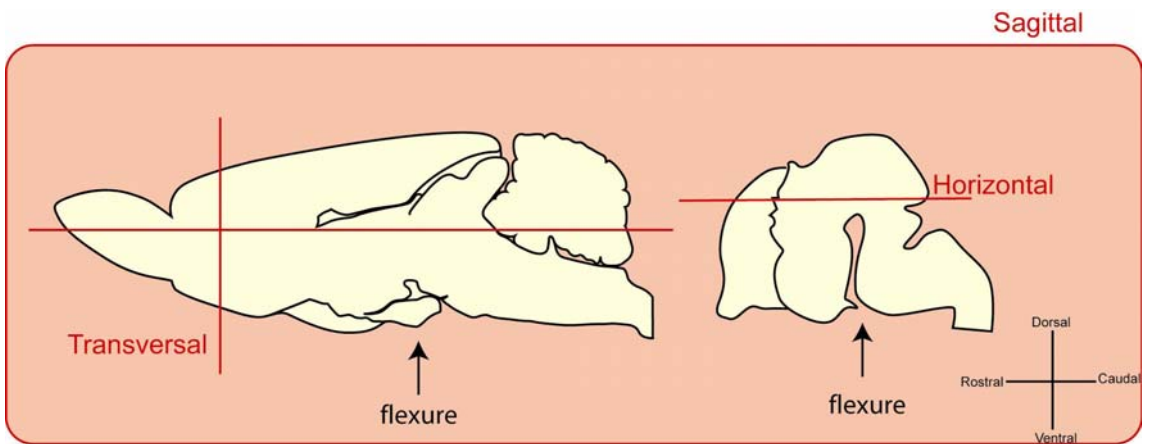


Fig. 11 : Plans de coupe de cerveau de rat adulte et utilisés pour cette étude chez l'embryon.

B. OUTILS UTILISES : SPECIFICITE ET MISE EN ŒUVRE

Afin de choisir les outils adéquats et de déterminer leurs conditions d'utilisation, plusieurs anticorps primaires et sondes d'hybridation ont été utilisés. De nombreux essais et tests ont ainsi été effectués préalablement à l'analyse de l'expression des différentes molécules d'intérêt.

Les méthodes de simple et double immunofluorescence indirecte utilisées dans cette étude étaient conformes à celles utilisées dans un précédent travail de notre laboratoire (Amiot et coll., 2004).

Pour les différents facteurs de transcription étudiés, les arguments suivants étaient en faveur de la spécificité des marquages immunohistochimiques observés :

- Ils ont été obtenus à l'aide d'anticorps commerciaux (cf. tableau n°1) qui sont théoriquement contrôlés, ou à l'aide d'anticorps généreusement donnés par des auteurs et ayant déjà fait l'objet de publications dans des revues internationales.
- Leur localisation était nucléaire : les protéines détectées sont en effet des protéines susceptibles de se lier à l'ADN. Cependant, contre toute attente, l'anticorps anti-Pax6 (Covance) a fourni un marquage cytoplasmique du péricaryon, d'aspect granulaire et un marquage de fibres, chez les embryons de rat aux stades tardifs (E16 et plus) et chez l'adulte. Ce type de marquage n'interférant que peu ou pas avec la présente étude réalisée sur des coupes d'embryons aux stades précoces a donc été ignoré.
- Leurs distributions spatiotemporelles étaient comparables à celles précédemment décrites dans la littérature chez la souris.
- Plusieurs d'entre eux ont pu être confrontés aux marquages obtenus en hybridation *in situ*. Ce fut notamment le cas pour Pax6 sur les coupes d'embryons aux stades précoces.

Pour chaque anticorps, plusieurs dilutions ont été testées sur des coupes d'embryons à divers stades avec la méthode classique d'immunofluorescence décrite précédemment. Nous avons ainsi pu déterminer la concentration à laquelle le marquage était optimal. Les anticorps monoclonaux et polyclonaux purifiés ont été dilués dans du PBS-Triton. Afin de diminuer les possibilités de marquage aspécifique, le diluant contenant 10% de lactoprotéines a été choisi pour diluer les anticorps polyclonaux non purifiés. La qualité du marquage était aussi conditionnée par le choix de l'anticorps secondaire : par exemple, le marquage Nkx2.2 était incomparablement mieux révélé lorsque l'anticorps secondaire utilisé était conjugué à la cyanine-3 (Cy³TM, 1/400, Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.-Interchim) (fluorescence

rouge). Nous ne disposions que de faibles quantités d'immunsérums anti-Dlx et anti-Olf1, c'est pourquoi seuls les stades E13 pour Dlx et E13-E14 pour Olf1 ont pu être analysés avec ces outils. Notons que d'autres anticorps commerciaux que ceux utilisés pour cette étude ont fait l'objet de tests ; malheureusement ils n'ont pas fourni de marquage dans nos conditions et ils n'ont donc pas pu être utilisés dans ce travail. Il s'agit des anticorps : anti-Nkx2.1 (tebu-bio, Santa Cruz Biotechnology, Inc ; réf. : sc-25331), anti-Shh et anti-Pax6 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA), anti-Dlx2 (AbCys, Paris), anti-Nkx2.2 (tebu-bio, Santa Cruz Biotechnology, Inc).

Concernant l'hybridation *in situ*, le protocole a été adapté de celui utilisé par Brischoux et collaborateurs chez le rat adulte. A l'issue de la fabrication de chacune des sondes, une migration sur gel d'agarose 1,5%, d'1 µl de sonde après dénaturation, a été réalisée. L'obtention d'une bande unique, de longueur correspondant à la taille de la sonde fabriquée témoignait de la qualité de la transcription et l'intégrité de la ribosonde (Fig. 12).

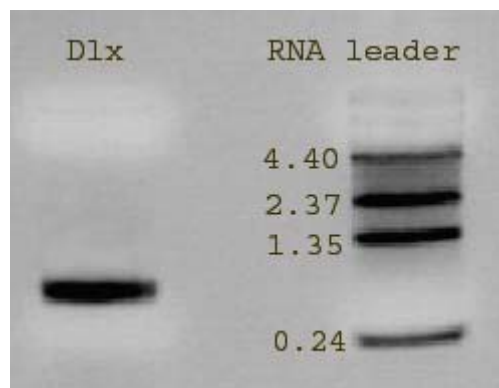


Fig. 12 : Exemple d'obtention d'une bande unique de taille attendue correspondant à la sonde Dlx, après migration sur gel d'agarose.

Lors de l'étape d'hybridation en elle-même, plusieurs concentrations de sonde et différentes températures ont été testées afin de déterminer les paramètres optimaux. Les expériences d'hybridation ont ensuite été réalisées à la température et à la concentration appropriées. Nous avons rencontré des difficultés avec les sondes s'hybridant à haute température, notamment pour la sonde Shh (température d'hybridation=70°C). En effet, malgré de nombreux essais d'utilisation de diverses lames prétraitées par la poly-L-lysine, préparées au laboratoire ou achetées dans le commerce, nous avons systématiquement été confronté à un décollement des coupes histologiques et n'avons donc obtenu que très peu de matériel exploitable avec ces

outils. Enfin, une sonde Nkx2.1 préparée au laboratoire, ne nous a pas permis d'obtenir un marquage satisfaisant : toutes nos données concernant l'expression de ce gène ont donc été obtenues par immunohistochimie.

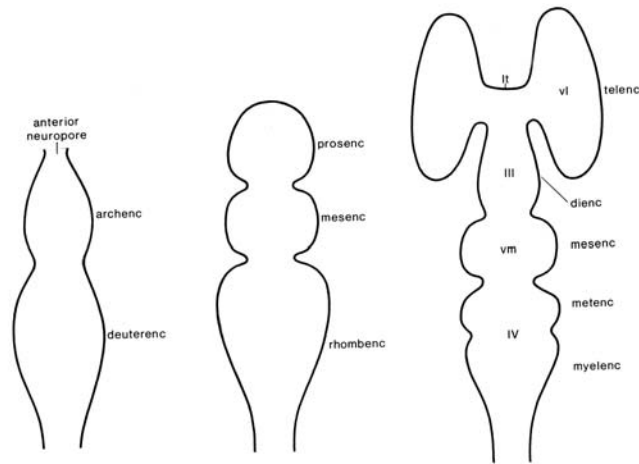
C. DISTRIBUTION SPATIOTEMPORELLE DES DIFFERENTS FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Afin de rendre plus aisée leur comparaison, les différents marquages obtenus seront décrits et illustrés stade par stade, à l'exception des stades les plus précoces (E10 et E11) pour lesquels il n'existe pas de couche du manteau et qui feront l'objet d'un paragraphe commun.

1. Stades embryonnaires E10 et E11

Le stade E10 coïncide avec la fermeture du neuropore antérieur. C'est le stade des trois vésicules primaires. On distingue un stade E10 précoce et un stade E10 tardif (Alvarez-Bolado et Swanson, 1996). Au stade précoce, le toit du cerveau postérieur est formé mais les bords latéraux de la plaque neurale du cerveau antérieur présomptif n'ont pas encore fusionné. Au stade tardif, le neuropore antérieur est fermé et le cerveau est formé de trois vésicules : le prosencéphale (vésicule la plus antérieure), le mésencéphale qui s'est différencié à partir de l'archencéphale et enfin le rhombencéphale (Fig. 13). Dans le neuroépithélium germinatif, qui présente à ce stade un aspect pseudo-stratifié, s'effectuent des divisions cellulaires à l'origine des premiers neurones. Sur des coupes en paraffine colorées par le bleu de toluidine, la couche du manteau n'est pas encore présente à ce stade du développement embryonnaire.

Le stade E11 est caractérisé par l'existence de cinq vésicules : télencéphalique, diencephalique, mésencéphalique, métencéphalique et myélencéphalique. C'est donc à ce stade que se différencie le diencephale (Fig. 13). Les premières cellules de la couche du manteau apparaissent par endroit dans le tube neural, en arrière de la vésicule diencephalique.



D'après Nieuwenhuys et coll., 1997.

Fig. 13 : Représentation schématique de la différenciation des vésicules cérébrales pendant le développement.

A E10 et E11, trois facteurs de transcription parmi ceux étudiés sont exprimés dans le prosencéphale : Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2. La couche du manteau étant inexistante à ce stade, l'expression de ces trois facteurs de transcription s'effectue donc uniquement dans le neuroépithélium germinatif.

Expression de Pax6

Sur des coupes horizontales sériées d'embryons de rat aux stades E10 tardif et E11, nous avons observé une zone d'expression continue de Pax6 dans les territoires télencéphaliques dorsaux (Fig. 14 a-h), diencéphaliques dorsaux (Fig. 14 b-h) et dans le diencéphale ventral à la naissance de la tige optique (Fig. 14 i-m), ainsi que dans la tige optique elle-même (au moins dans sa moitié dorsale) et dans la vésicule optique (Fig. 15 a, e). Dans tous ces territoires, Pax6 est intensément exprimé (Fig. 15 b) et toutes les cellules semblent être immunoréactives. Dans le télencéphale, le marquage disparaît progressivement sur les coupes plus ventrales (Fig. 15 c) et il est absent dans les territoires télencéphaliques ventraux proprement dits. En revanche, l'extinction du marquage Pax6 dans les territoires diencéphaliques correspondant à l'hypothalamus présomptif est beaucoup plus franche (Fig. 15 d) et la transition avec la moitié postérieure de l'hypothalamus et les aires préoptiques présomptives qui ne sont pas marquées, est très nette.

Expression de Nkx2.1

Sur les coupes les plus ventrales (Fig. 14 n-p), nous avons observé une zone continue d'expression de Nkx2.1 dans les territoires hypothalamiques présomptifs, puis le marquage diverge de part et d'autre de la tige optique (soit aussi, de part et d'autre des territoires d'expression de Pax6) (Fig. 14 j-l). En avant de la tige optique, le marquage s'étend dans les territoires préoptiques présomptifs de l'hypothalamus et plus dorsalement, sans envahir totalement les territoires télencéphaliques ventraux. En arrière de la tige optique, le marquage Nkx2.1 d'abord intense s'estompe graduellement avant d'atteindre la flexure céphalique vers les territoires mésencéphaliques ventraux (Fig. 14 d). Dans les aires intensément immunoréactives pour Nkx2.1, toutes les cellules semblent être marquées. (Fig. 15 f).

Expression de Nkx2.2

Contrairement à Pax6 et Nkx2.1 pour lesquels nous n'avons pas observé de continuité du marquage en arrière de la flexure céphalique (nous n'aborderons pas ici l'étude de l'expression de ces gènes, notamment de Pax6, dans les territoires très postérieurs du tube neural), Nkx2.2 est exprimé dans le mésencéphale sous la forme d'une fine bande de tissu, intensément immunoréactive et située en position ventrale dans le mésencéphale postérieur. Au niveau de la flexure, ce marquage occupe une position ventrale intermédiaire (Fig. 14 a-b); il se poursuit dans l'hypothalamus de part et d'autre du *sulcus hypothalamicus* bien réperable à ce stade (Fig. 14 c-f; Fig. 15 g). Dans les régions hypothalamiques plus ventrales, cette bande de tissu Nkx2.2 positive se continue dans la lèvre postérieure et ventrale de la tige optique (Fig. 14 j-l). Au sein du territoire Nkx2.2 positif, l'anticorps ne fournit pas un marquage homogène : nous avons noté la coexistence de noyaux fortement et faiblement immunoréactifs. A travers tout le diencéphale, cette bande de tissu conserve une largeur constante de 120 µm environ.

Expression de Dlx

Aucun marquage n'a été observé en hybridation *in situ* pour Dlx aux stades E10 et E11.

Expression de Olf1

Aucun marquage n'a été observé en hybridation *in situ* pour Olf1 au stade E10. Par contre, au stade E11, nous avons observé un marquage Olf1 de cellules situées dans le rhombencéphale, en position marginale, formant les premiers neurones du manteau. Il existe également dans le neuroépithélium quelques cellules marquées pour Olf1, qui sont probablement en cours de différenciation. Par contre, aucun marquage n'a été observé dans le prosencéphale.

Synthèse des observations aux stades E10 et E11

Nkx2.1 et Pax6 marquent donc des territoires distincts. Dans le diencephale, la zone de contact entre les marquages Nkx2.1 et Pax6 correspond à la bande de tissu Nkx2.2 positive, de sorte que la moitié antérieure de cette bande est Pax6 positive et Nkx2.1 négative, alors que la moitié postérieure est Nkx2.1 positive et Pax6 négative. Nous avons pu observer, dans les noyaux des cellules localisées dans cette bande, une coexpression de Pax6 et Nkx2.2 (Fig. 15 h) ou de Nkx2.1 et Nkx2.2 (Fig. 15 i). A noter l'exception que constitue la région préoptique, puisqu'au niveau de la lèvre antérieure de la tige optique, la zone de contact entre Pax6 et Nkx2.1 n'exprime pas Nkx2.2 (Fig. 14 k-m). En général, Pax6 et Nkx2.1 sont intensément exprimés. Toutefois, nous avons noté une diminution de l'intensité du marquage Pax6 au sein du territoire d'expression de Nkx2.2. Par ailleurs, une large partie du télencéphale ventral ne contient ni Pax6, ni Nkx2.1 (Fig. 14 i-k). A ces stades, aucun marquage dans le prosencéphale n'a été obtenu en hybridation *in situ*, ni pour Olf1, ni pour Dlx.

Fig. 14 : Distribution de l'expression en immunohistochimie de Pax6, Nkx2.1, Nkx2.2 sur des dessins réalisés à partir de coupes histologiques horizontales de cerveau passant par le diencephale, chez le rat aux stades embryonnaires E10-E11, et organisés du niveau le plus dorsal (a) au niveau le plus ventral (p).

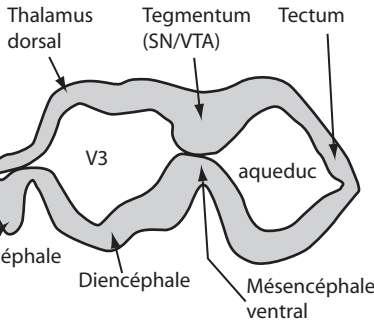
Fig. 14

E10/E11



DORSAL

proscéphale | mésencéphale



■ Pax6 ■ Nkx2.2 ■ Nkx2.1 ■ Nkx2.2

ANT

POST

a

a1

a2

b

b1

b2

c

c1

c2

d

d1

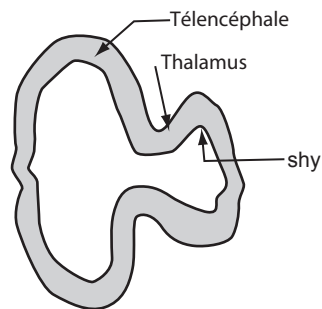
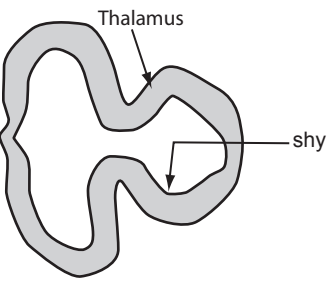
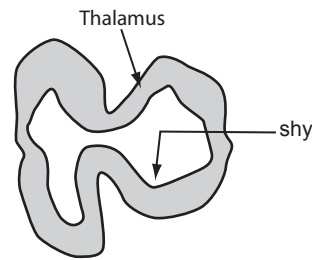
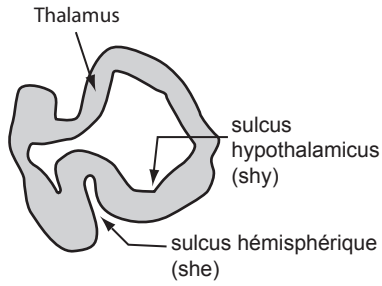
d2

e

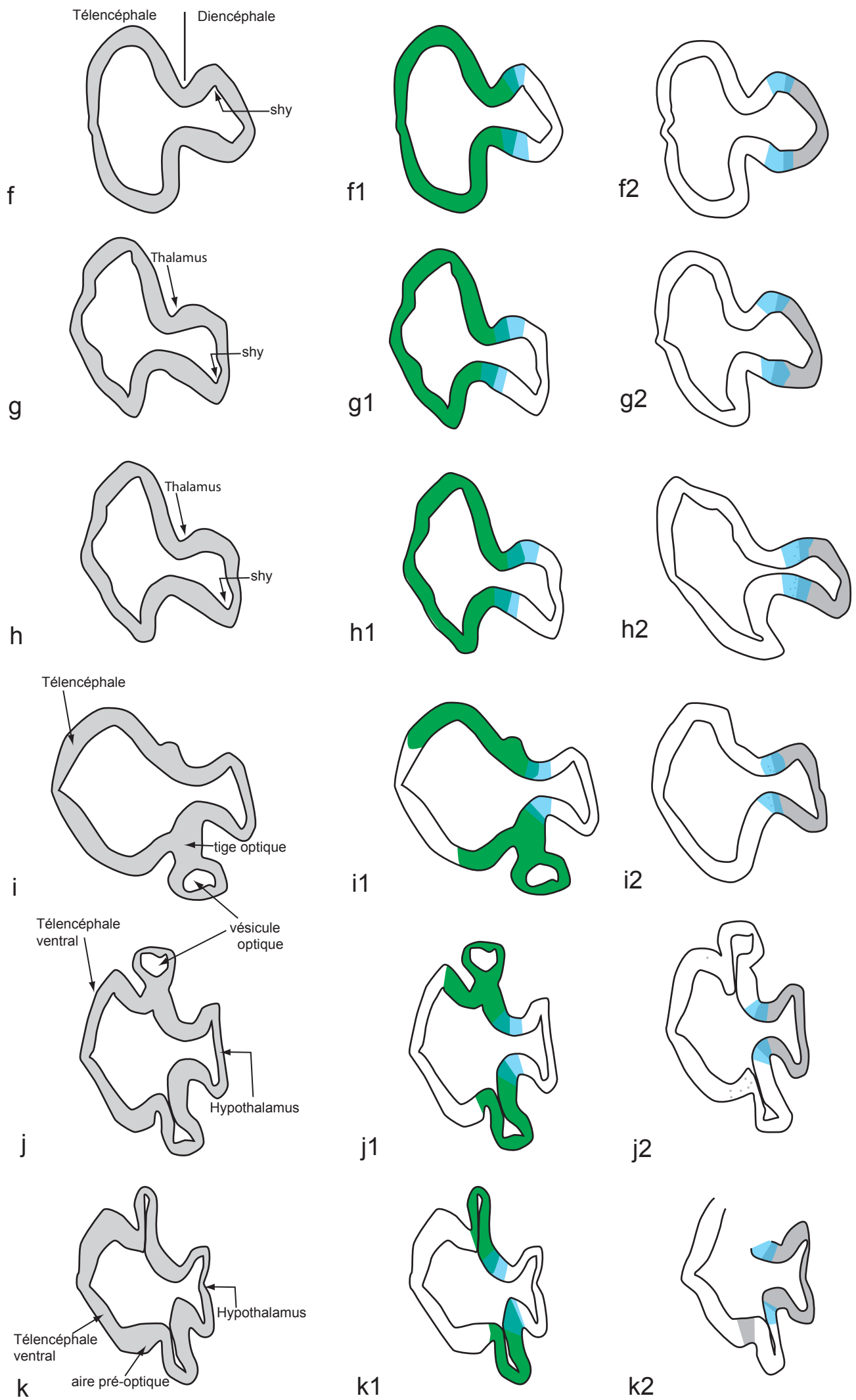
e1

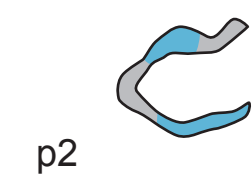
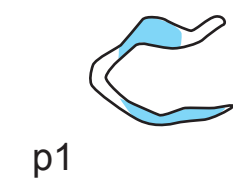
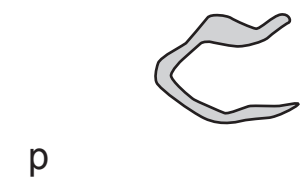
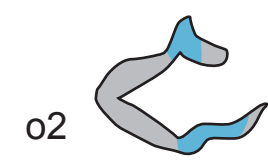
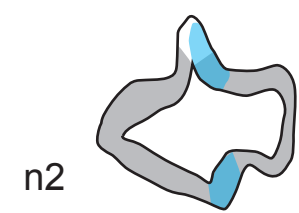
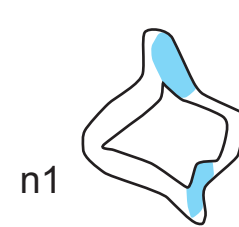
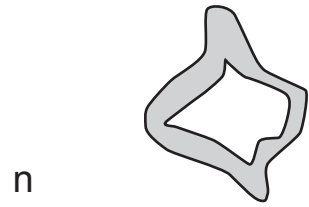
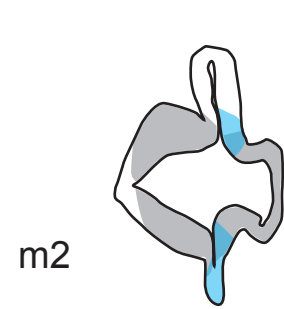
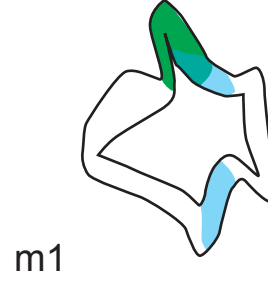
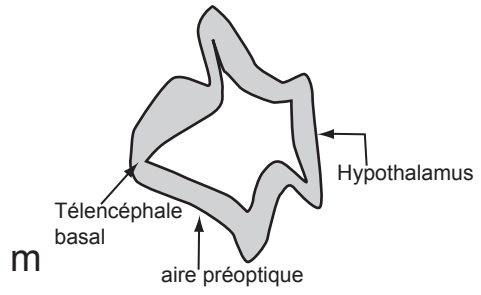
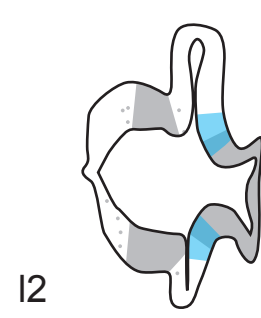
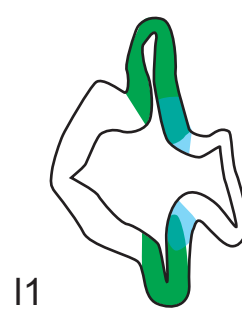
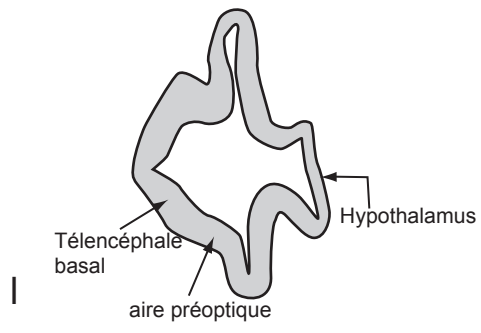
e2

VENTRAL



500 μm





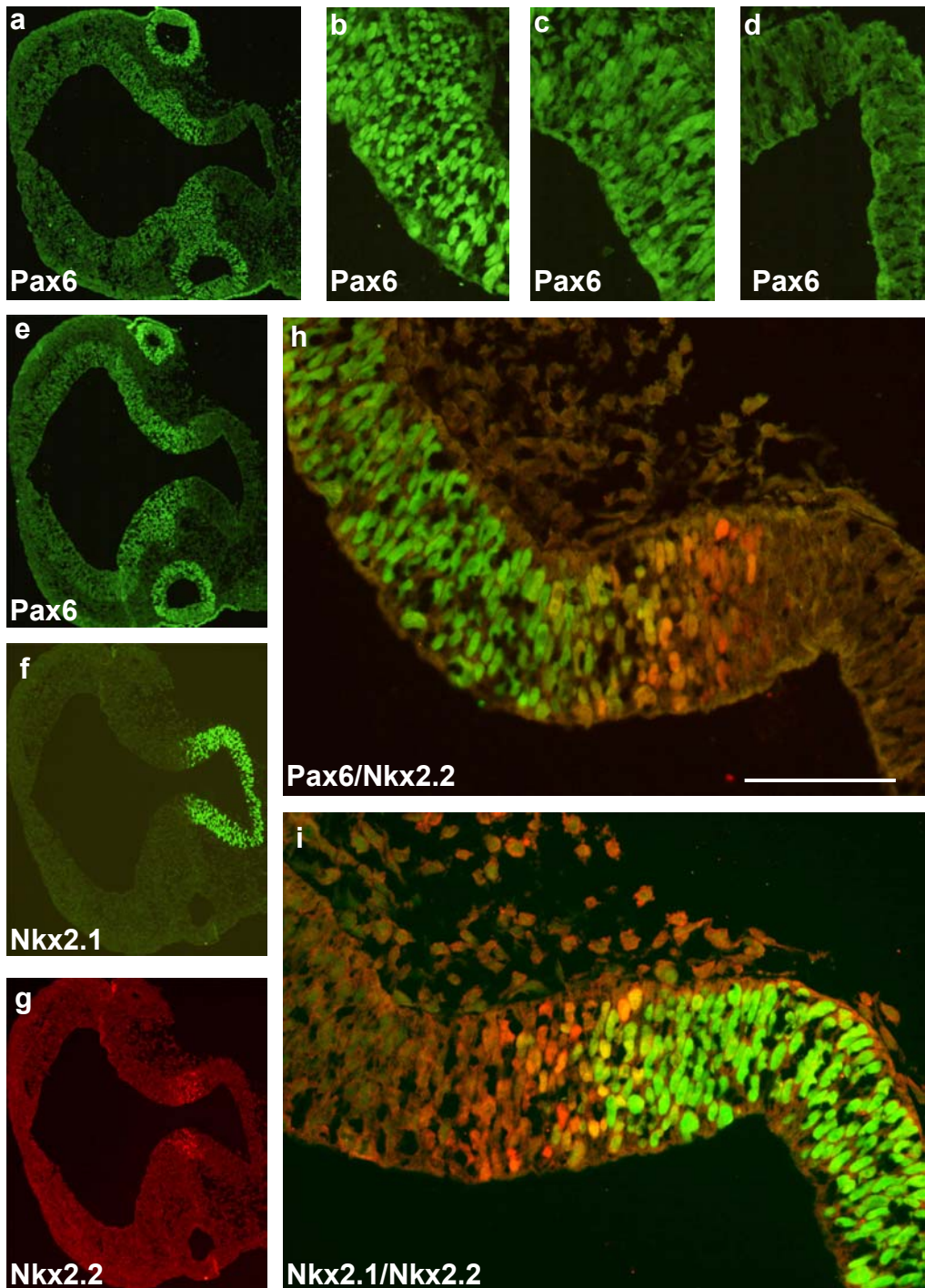


Fig. 15 : Microphotographies illustrant la distribution de Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2 par immunohistochimie sur des coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E10. **a-d.** Distribution de Pax6 sur une coupe passant par l'hypothalamus. **b** illustre une intensité élevée du marquage Pax6, **c** une intensité faible et **d** l'absence de marquage Pax6 dans l'hypothalamus. **e-i.** Distributions comparées de Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2 sur des coupes voisines à faible (**e-g**) ou à fort (**h, i**) grossissements. Barre d'échelle : (a-g) 500 μ m, (h-i) 75 μ m.

2. Stade embryonnaire E12

Au stade E12, les premiers neurones se différencient dans plusieurs territoires diencephaliques au sein du manteau, qui apparaît clairement. Par ailleurs, les vésicules télencéphaliques s'élargissent.

Sur les coupes en paraffine colorées au bleu de toluidine, nous avons observé une zone continue de différenciation du manteau en arrière (régions rétrochiasmatisques) et en avant (pallidum/aires préoptiques) de la tige optique, puis dans les territoires plus dorsaux dans le thalamus ventral présomptif et enfin dans le tegmentum (Fig. 16 ; voir aussi Fig. 18).

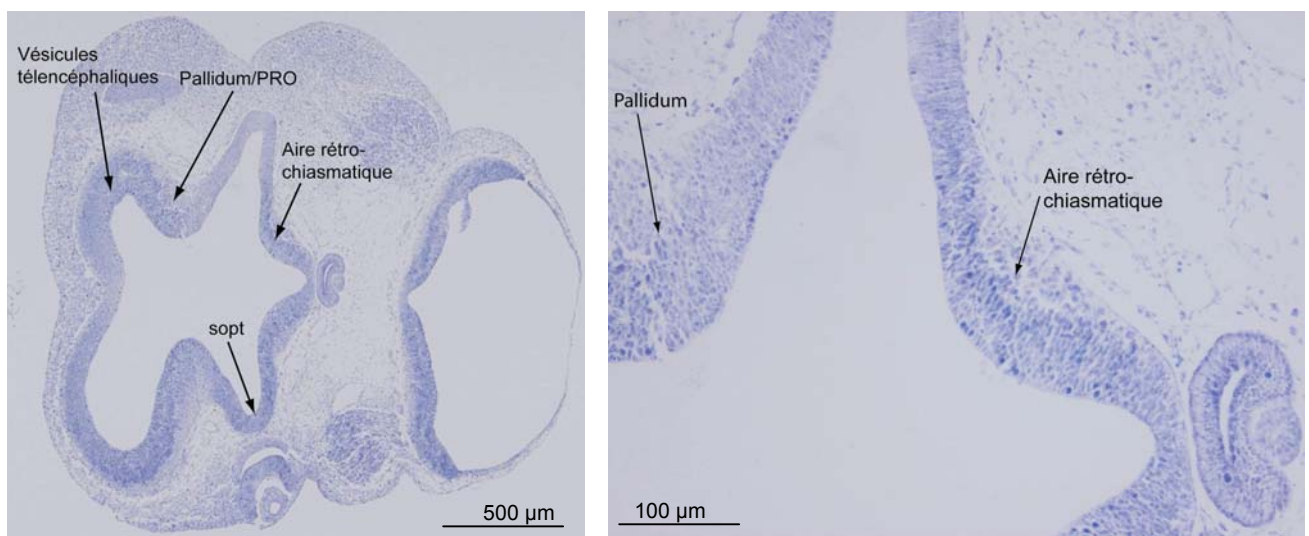


Fig. 16 : Microphotographies de deux coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E12. Coloration au bleu de toluidine.

C'est à ce stade qu'ont été observés des neurones marqués par l'anticorps anti-TH dans la région rétrochiasmatisque : il s'agit des premiers neurones identifiés par leur phénotype chimique dans le diencephale (non illustré).

Avec l'apparition des premiers neurones, se différencient les premiers axones. L'ontogenèse générale des tractus de fibres du prosencéphale chez les vertébrés est malheureusement peu décrite dans la littérature (pour revue, cf. Nieuwenhuys et coll., 1997). Les données récentes concernant l'établissement des premiers tractus de fibres chez les mammifères résultent de travaux effectués chez la souris. Ainsi les premiers tractus longitudinaux se développent chez la souris au stade E9.5. Dans le diencephale, ces premiers axones forment le *tpoc* (Easter et coll. 1993 ; Mastick et coll. 1996). En 1998, Foster décrit chez le rat, au stade E13, un faisceau qu'il nomme le faisceau médian du télencéphale (*mfb*). Le premier jour de gestation étant par convention désigné E1, le stade E13 dans cet atlas équivaut au stade E12 dans notre

travail. Ce tractus semble correspondre au *tpoc* décrit aux stades correspondant chez les autres espèces.

Sur notre matériel, les premières fibres formant le *tpoc*, marquées par l'anticorps anti-NF, ont été observées dans la partie la plus latérale de la zone du manteau (Fig. 17 a). Des fibres du *tpoc* sont également TH positives : en effet ces projections sont issues des neurones rétrochiasmatisques, dont certains peuvent être révélés par l'immunsérum anti-TH (Fig. 17 b). Ces fibres suivent ensuite un trajet en position intermédiaire selon l'axe antéropostérieur jusque dans le tegmentum (mésencéphale). Elles ne forment pas un tractus clairement fasciculé et compact, mais semblent être dissociées les unes des autres (Fig. 17 c-d).

Expression de Pax6

La distribution du marquage Pax6 dans le neuroépithélium est superposable à celle observée aux stades précédents. Pax6 est donc exprimé dans le télencéphale dorsal, le thalamus ventral et la tige optique (Fig. 17 e ; Fig.18 a-k).

Dans la couche du manteau, au sein du diencéphale et plus précisément dans le thalamus ventral, nous avons observé des cellules intensément immunoréactives pour Pax6 (Fig. 18 a-b). Toutefois, alors que toutes les cellules semblent être positives dans les zones du neuroépithélium marquées par Pax6, seules quelques cellules du manteau sont immunoréactives.

Aucune expression de Pax6 n'a été observée dans le manteau de l'hypothalamus.

Expression de Nkx2.1

Dans le neuroépithélium, le territoire d'expression de Nkx2.1 est identique à celui décrit aux stades précédents (Fig. 18 a2-l2). Ainsi le marquage Nkx2.1 est observé dans les régions les plus ventrales de l'hypothalamus. Il diverge ensuite en avant de la tige optique pour s'étendre au télencéphale ventral et en arrière de la tige optique, il s'étend jusqu'au mésencéphale sans toutefois pénétrer ce territoire.

Dans le manteau, Nkx2.1 est intensément exprimé dans le télencéphale basal (pallidum), ainsi que dans l'hypothalamus, en particulier dans les territoires hypothalamiques rétrochiasmatisques jusque dans l'hypothalamus tubéral dorsal (Fig. 18 d2-g2).

Expression de Nkx2.2

Dans le neuroépithélium, comme aux stades E10-E11, nous avons observé une bande de tissu Nkx2.2 positive depuis le mésencéphale jusque dans les territoires diencéphaliques plus ventraux. Toutefois, alors qu'à E10 l'épaisseur de cette bande semble être constante, à E12

l'épaisseur de ce territoire du neuroépithélium germinatif marqué par Nkx2.2 est plus importante dans les territoires diencephaliques dorsaux correspondant au thalamus ventral (Fig. 18 b-e) ($\approx 350 \mu\text{m}$) que dans les territoires diencephaliques ventraux correspondant à l'hypothalamus ($\approx 180 \mu\text{m}$) (Fig.18 f-j).

Dans le manteau, il existe des cellules Nkx2.2 positives dans les territoires hypothalamiques, mais nous n'avons pas observé de marquage Nkx2.2 dans les territoires diencephaliques plus dorsaux correspondant au thalamus ventral présomptif.

Expression de Dlx

Dès les coupes les plus ventrales de l'hypothalamus, nous avons pu détecter un marquage Dlx. Celui-ci apparaît sur les coupes les plus ventrales très dispersé dans la couche du manteau. Dans le neuroépithélium germinatif, nous avons observé des cellules Dlx positives, certes en faible nombre à ce stade, localisées en regard des territoires marqués dans le manteau. En avant de la tige optique, le marquage Dlx est relativement abondant dans les régions préoptique et pallidale présomptives (Fig.18 g-h ; Fig.17 g). Des cellules marquées ont également été observées dans les aires télencéphaliques latérales (Fig.18 b-e). A noter une disparition progressive du marquage Dlx sur les coupes plus dorsales dans le télencéphale. Dans l'hypothalamus, notamment dans l'hypothalamus postérieur, ce n'est qu'à partir des régions dorsales (dorsales à la tige optique) que le marquage Dlx devient abondant (Fig.18 h-f). Des cellules marquées ont également été visualisées au sein du manteau dans les aires diencephaliques plus dorsales de part et d'autre du *sulcus hypothalamicus* jusqu'à la flexure céphalique ; ce territoire correspondant au thalamus ventral (Fig.18 b-e).

Expression de Olf1

Le marquage Olf1 est, comme pour Dlx, essentiellement localisé dans le manteau, mais contrairement à Dlx, il est à ce stade encore peu abondant. C'est dans les aires diencephaliques rostrales au sein du manteau que le marquage Olf1 est le plus abondant (Fig. 17 i, h). Des cellules marquées apparaissent dispersées sur le bord le plus externe des vésicules télencéphaliques, notamment dans les territoires les plus dorsaux (Fig. 17 j). Des cellules ont été observées de façon un peu plus abondante, toujours en bordure extérieure des coupes, dans les territoires télencéphaliques plus ventraux, ainsi qu'au niveau de la bordure externe du pallidum présomptif et enfin sur le bord le plus externe et dorsal de la tige optique (Fig.18 f-g ; Fig. 17 h). Aucune cellule marquée n'a été détectée dans le prosencéphale au sein du neuroépithélium germinatif.

Synthèse des observations au stade E12

Comme à E10-E11, nous avons constaté, dans le neuroépithélium essentiellement, une complémentarité des territoires d'expression de Pax6 et de Nkx2.1.

Comme nous l'avons également décrit au stade précédent, Nkx2.2 se distribue sous forme d'une bande dont chaque moitié est respectivement Pax6 positive et Nkx2.1 positive dans l'hypothalamus. Toutefois, au dessus de la tige optique, la bande Nkx2.2 s'élargit dans le neuroépithélium au sein d'un territoire Pax6 positif. Dans l'hypothalamus, des cellules Nkx2.2 positives coexpriment respectivement Nkx2.1 dans le neuroépithélium et le manteau, et Pax6 dans le neuroépithélium (Fig. 17 e, f). Dans le thalamus ventral, des cellules Nkx2.2 positives du neuroépithélium (Nkx2.2 n'est pas exprimé dans le manteau) coexpriment Pax6. L'apparition dans la couche du manteau des premières cellules Dlx et Olf1 positives accompagne la différenciation du manteau à E12. Ces cellules sont encore peu nombreuses à ce stade, la comparaison de leur distribution avec celles de Pax6 et Nkx2.1 sera donc plus aisée aux stades ultérieurs.

Le stade E12 coïncide avec l'apparition dans le manteau, dans les territoires rétrochiasmatisques, des premiers neurones dont certains sont TH positifs. L'anticorps anti-NF permet la première mise en évidence du *tpoc*, dont certaines fibres sont TH positives et qui est situé dans la bande Nkx2.2 positive.

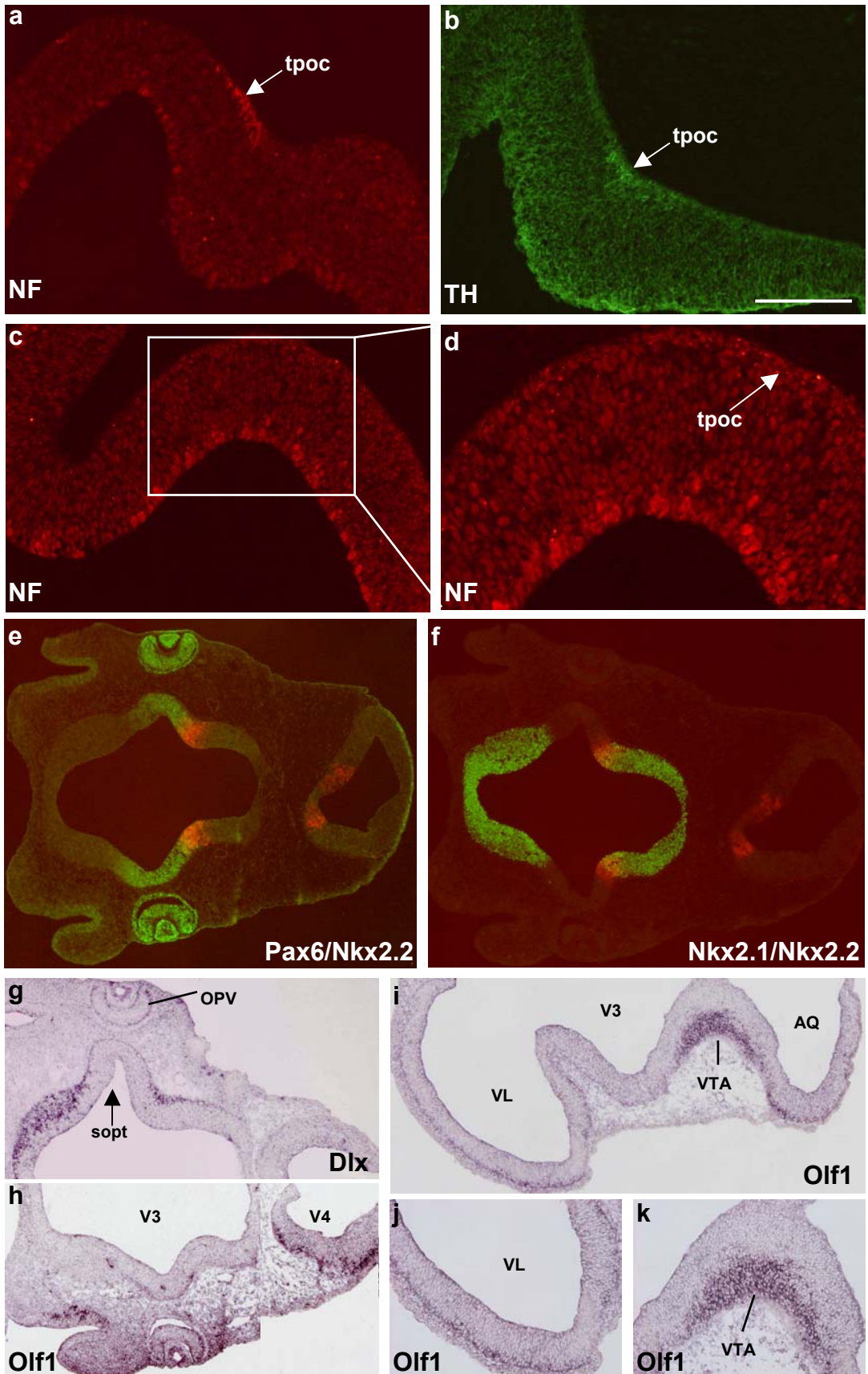
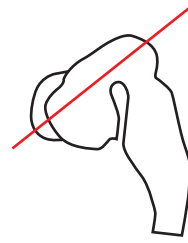


Fig. 17 : Microphotographies de coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E12 illustrant la mise en évidence des premières fibres par immunohistochimie à l'aide des anticorps anti-NF (a, c, d) et anti-TH (b), ainsi que la distribution de Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2 (e, f) ; et par hybridation *in situ* la distribution de Dlx et Olf1 (g-k). Cf. texte pour détails. Barre d'échelle : (a-d) 100 μm, (e-i) 500 μm, (j-k) 250 μm.

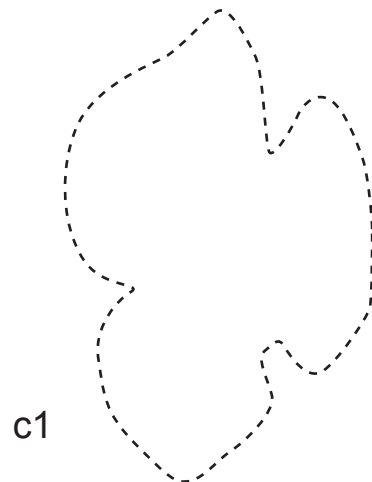
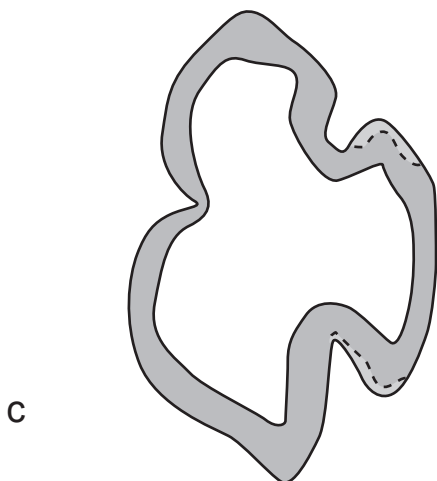
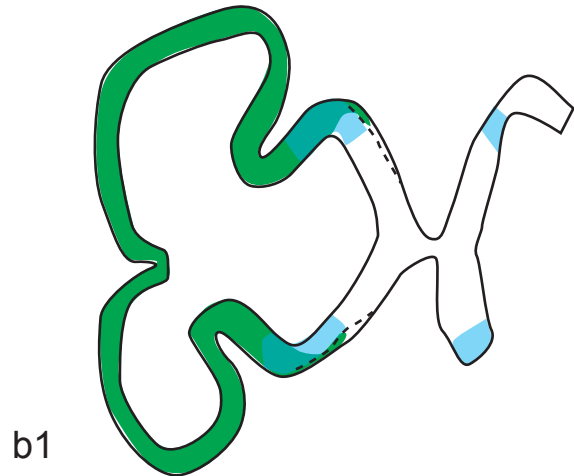
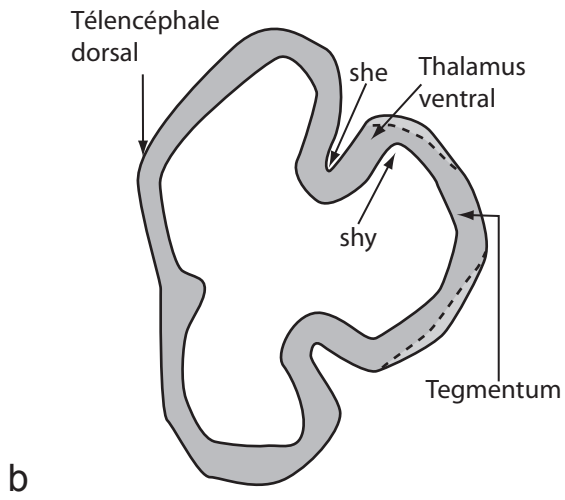
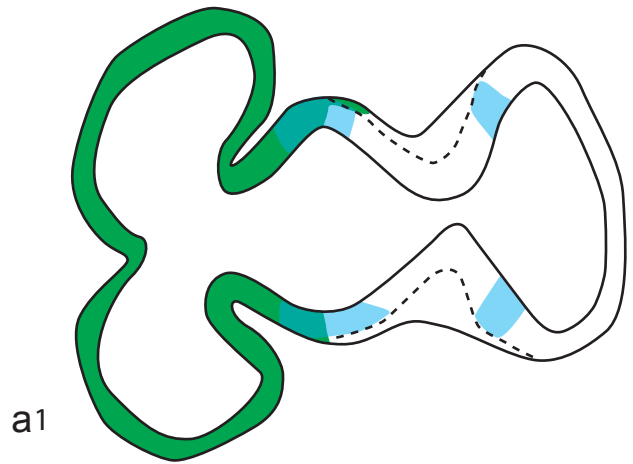
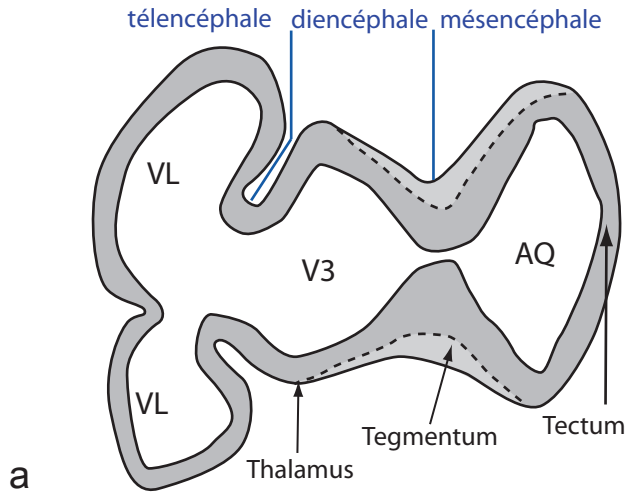
Fig. 18 : Distribution de l'expression en immunohistochimie de Pax6, Nkx2.2, Nkx2.1 et en hybridation *in situ* de Olf1 et Dlx sur des dessins réalisés à partir de coupes histologiques horizontales de cerveau passant par le diencéphale chez le rat au stade embryonnaire E12 et organisés du niveau le plus dorsal (**a**) au niveau le plus ventral (**l**).

Fig. 18

E12



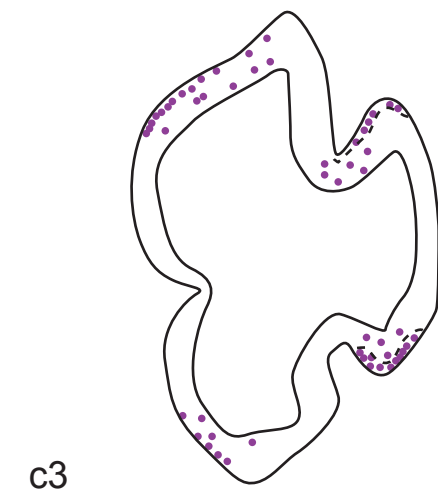
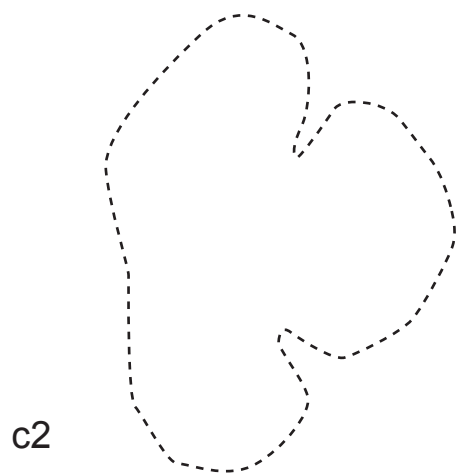
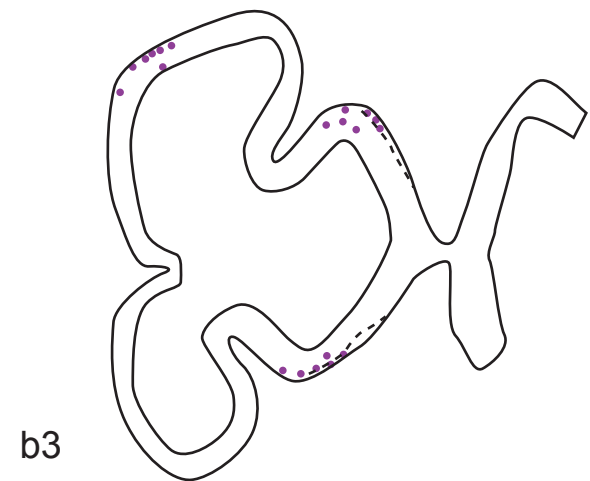
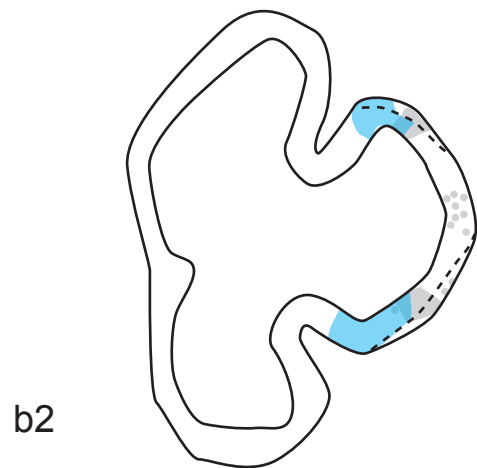
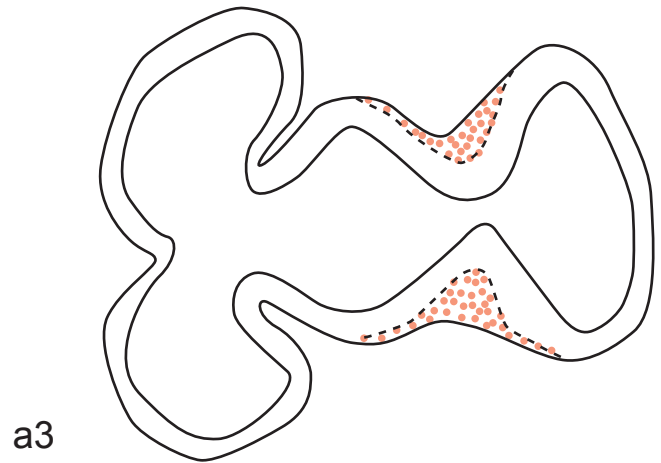
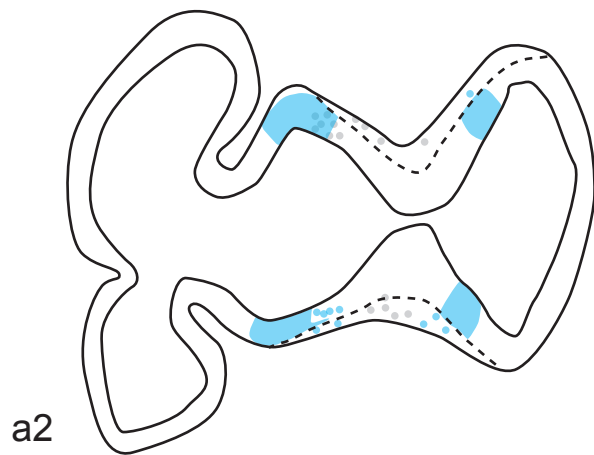
■ Pax6 ■ Nkx2.2

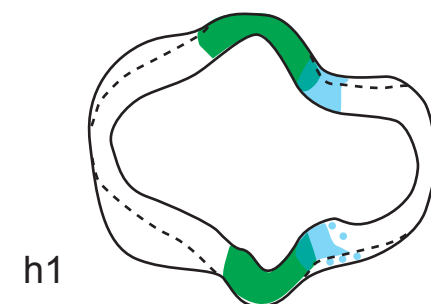
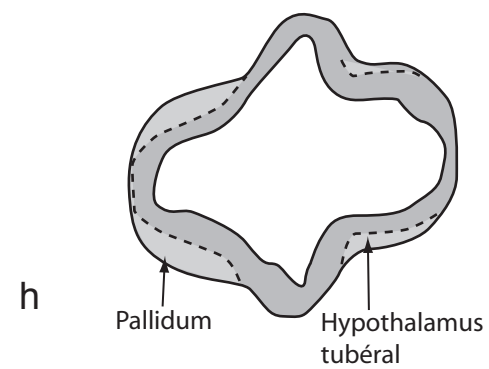
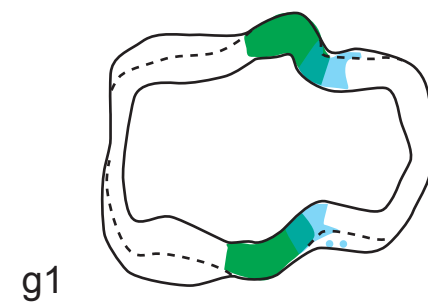
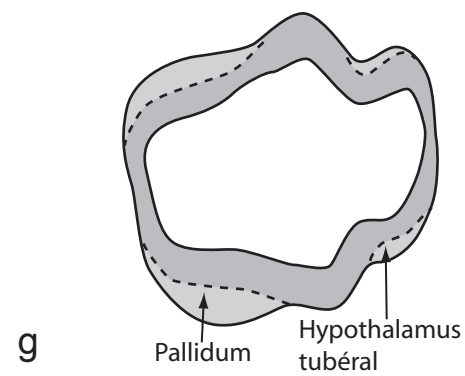
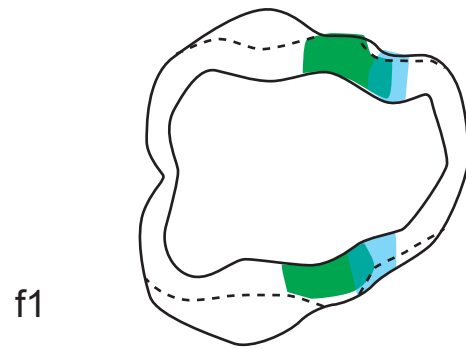
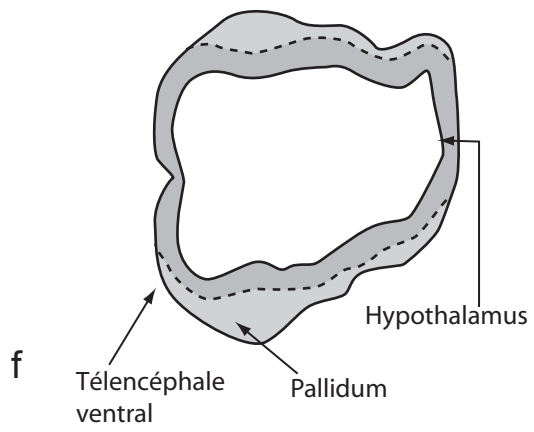
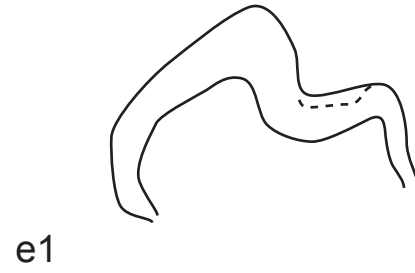
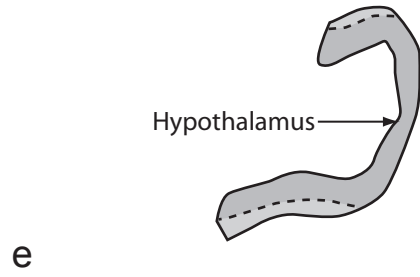
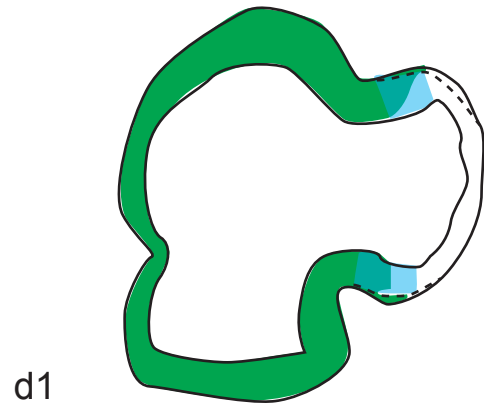
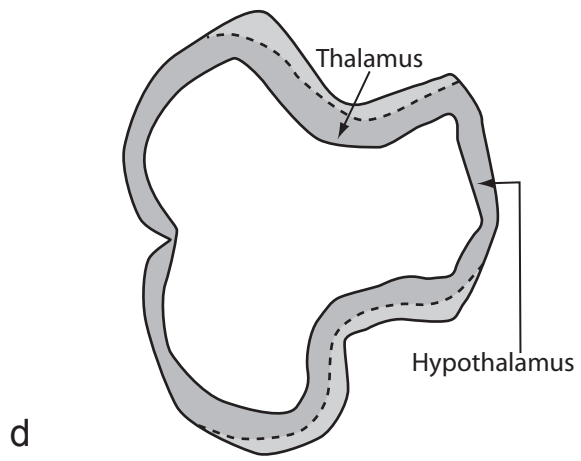


500 μ m

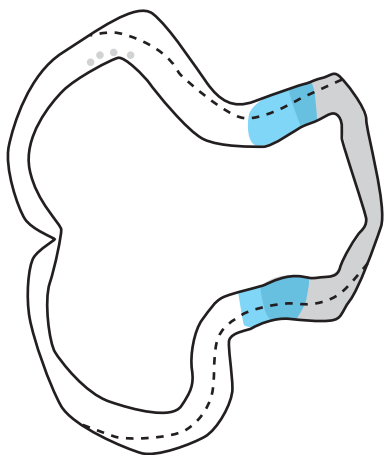
■ Nkx2.1 ■ Nkx2.2

■ Olf1 ■ Dlx1/2

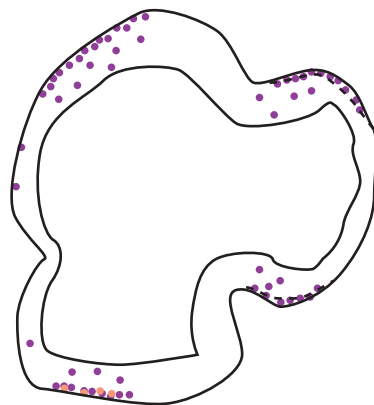




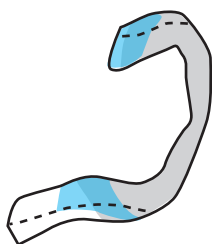
d2



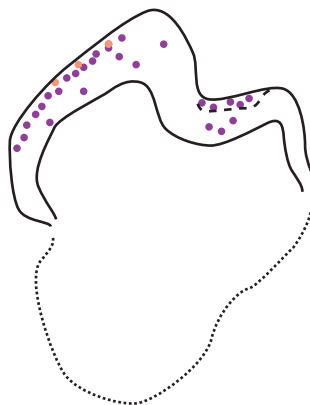
d3



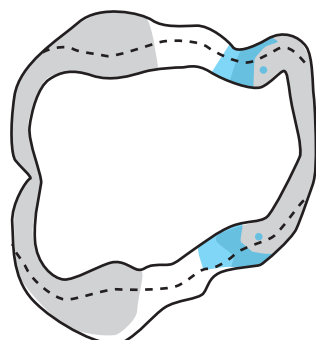
e2



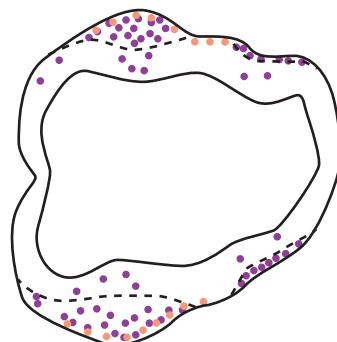
e3



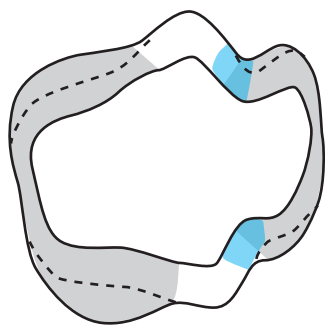
f2



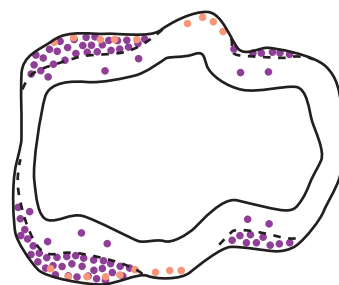
f3



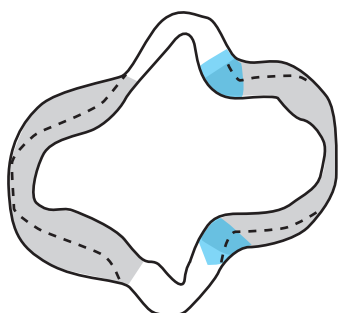
g2



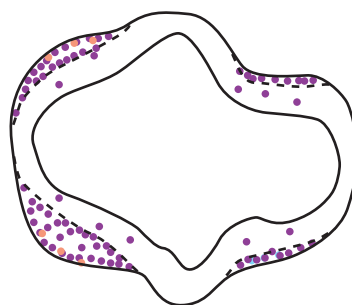
g3

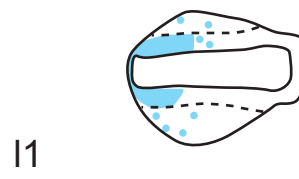
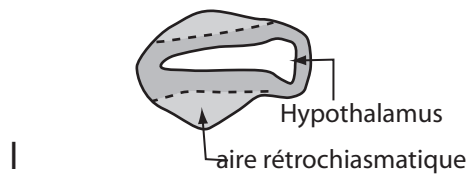
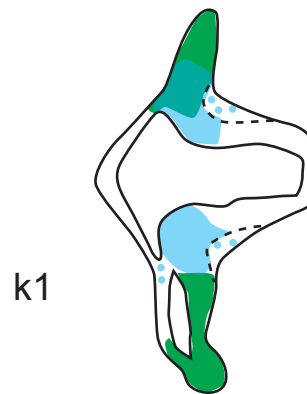
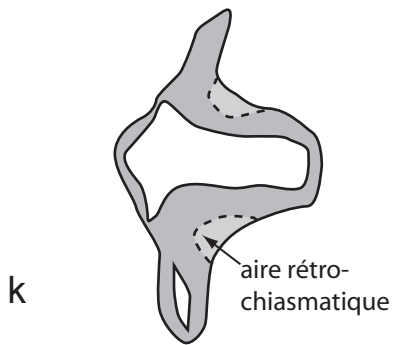
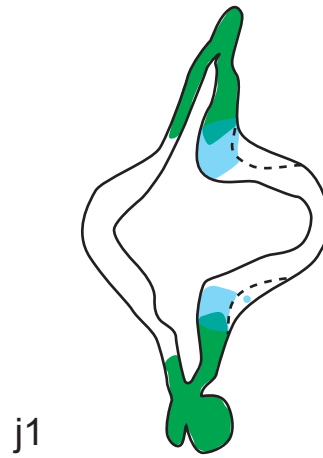
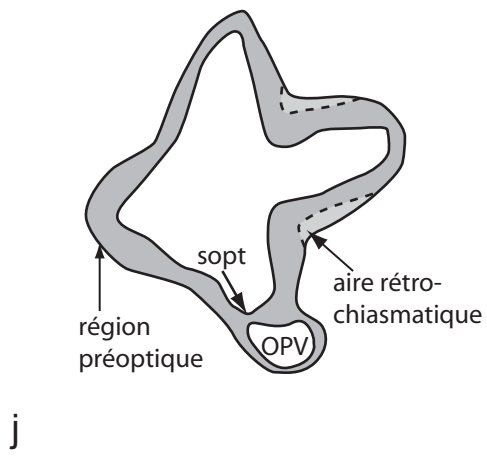
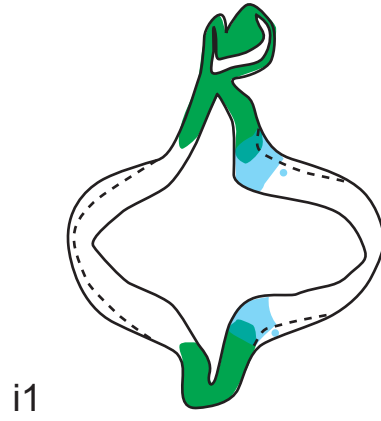
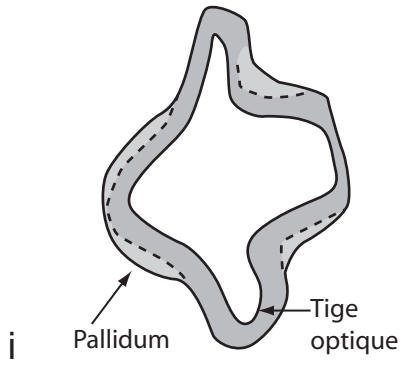


h2

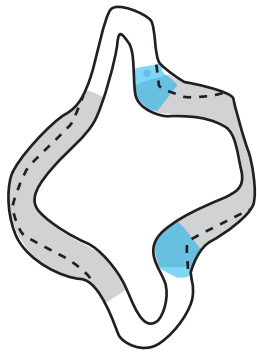


h3

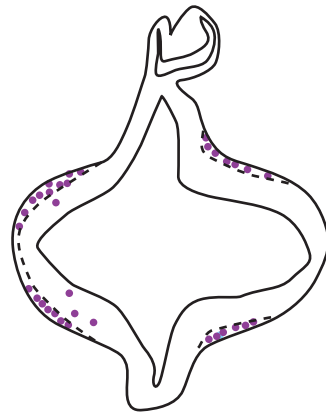




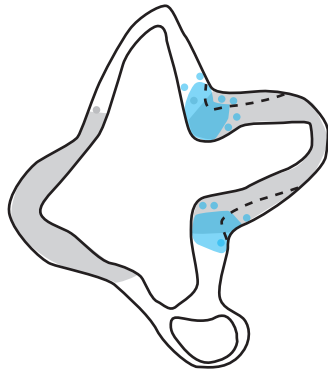
i2



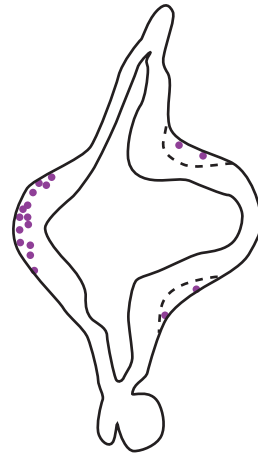
i3



j2



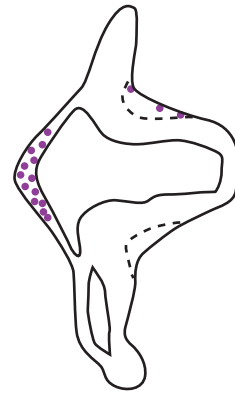
j3



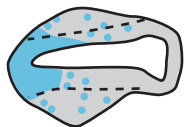
k2



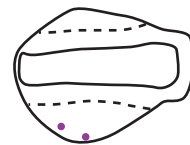
k3



l2



l3



3. Stade embryonnaire E13

Le stade E13 est caractérisé par un épaissement de la couche du manteau, qui intéresse essentiellement les aires télencéphaliques ventrales et diencephaliques ventrales, et qui va de pair avec une différenciation de structures et de tractus de fibres. Sur les coupes en paraffine colorées au bleu de toluidine, on note une complexification des tissus. L'épaississement du manteau s'accompagne de l'apparition de *sulci* profonds, particulièrement dans le télencéphale (Fig. 19).

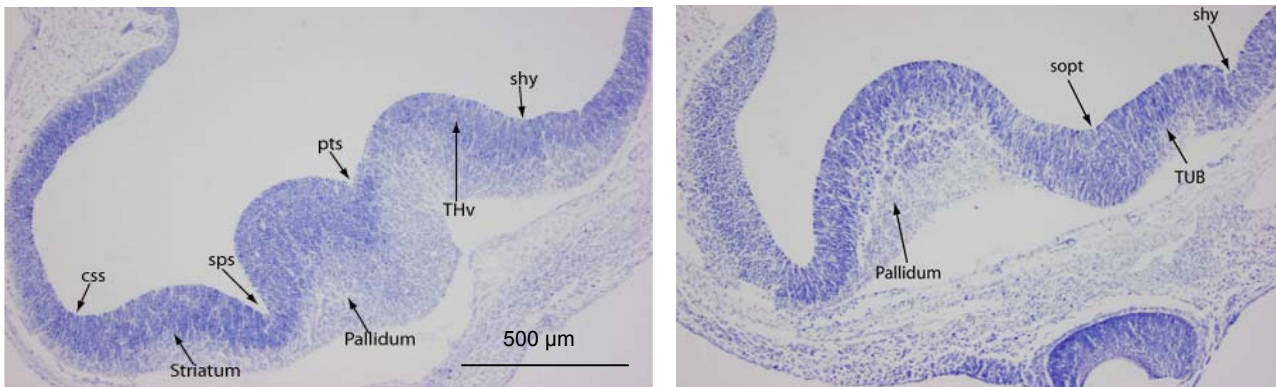


Fig. 19 : Microphotographies de deux coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E13. Coloration au bleu de toluidine.

Dans la couche du manteau, les cellules sont peu différenciées d'un point de vue morphologique, mais une différenciation chimique apparaît plus clairement (Foster, 1998). Un élément essentiel à considérer pour notre étude est la mise en évidence à ce stade des premiers neurones à MCH.

Parallèlement à cet épaissement du manteau, on assiste à une complexification des réseaux axonaux et des tractus de fibres. Au stade E13, l'organisation des différents tractus de fibres est peu décrite dans la littérature chez le rat et les données dont nous disposons sont issues de travaux effectués chez la souris (Easter et coll. 1993 ; Mastick et coll. 1996) (Fig. 20).

A ce stade, le *tpoc* est certes bien différencié, mais surtout des tractus se forment et vont connecter les territoires antérieurs, situés entre la vésicule optique et la vésicule télencéphalique, aux territoires céphaliques postérieurs. Ces auteurs décrivent un tractus longeant le bord dorsal de la tige optique, rejoignant le *tpoc* et se dirigeant vers les territoires diencephaliques, qu'ils nomment le tractus supra-optique (*sot*). Ils décrivent également un tractus dorsal rejoignant les aires diencephaliques dorsales (thalamus dorsal) et qui correspondrait aux premiers axones de la strie médullaire. Dans leur atlas, Alvarez-Bolado et

Swanson assimilent déjà la branche la plus ventrale du *tpoc* au *mfh*. Ils repèrent un tractus qui naît en avant de la tige optique, chemine le long du sulcus hémisphérique et rejoint le *mfh* au dessus de la tige optique, contribuant ainsi à ce faisceau. Il se dirige ensuite vers les aires mésencéphaliques ventrales et donne naissance à une branche dorsale et antérieure (par rapport aux axes précédemment définis) séparant les formations présomptives des noyaux du lit de la strie terminale (BST) du thalamus dorsal, et qui doit correspondre à la strie médullaire (Fig. 21).

Dans notre étude, l'observation des marquages obtenus avec l'anticorps anti-NF nous permet de confirmer la persistance du *tpoc* qui est originaire des territoires rétrochiasmatisques et dont les neurones d'origine et des fibres sont également immunoréactives à l'anticorps anti-TH, ainsi que l'existence d'un tractus supra-optique qui est le premier à rejoindre les aires hypothalamiques dorsales présomptives (Fig. 22 a, b, c).

Expression de Pax6

L'observation au stade E13 de séries de coupes traitées avec l'immunsérum anti-Pax6 confirme l'existence d'un marquage des cellules du neuroépithélium germinatif dans des territoires présomptifs du thalamus ventral et de l'*eminentia thalami* (marquage intense), ainsi que dans des territoires présomptifs du pallium (Fig. 23 a1-j1). Dans le télencéphale, nous avons également observé un marquage (d'intensité modérée) dans le neuroépithélium germinatif destiné à donner des structures du striatum (Fig. 23 b1-f1). Comme aux stades précédents, ce marquage est aussi observé en position plus ventrale dans le neuroépithélium sus-jacent à la tige optique et dans la tige optique elle-même (Fig. 23 k1-s1).

Dans la couche du manteau, de nombreuses cellules se révèlent aussi intensément immunoréactives à l'anticorps anti-Pax6. Notons que comparativement aux stades précédents, leur distribution se complexifie. Le marquage le plus intense est toujours observé dans les cellules du manteau correspondant au futur thalamus ventral, mais ces cellules se dispersent d'une part plus dorsalement vers le thalamus dorsal et le tegmentum, d'autre part en position plus ventrale graduellement dans l'hypothalamus. De plus, des cellules relativement dispersées mais intensément marquées, ont été observées dans la couche du manteau dans des régions du striatum (Fig. 23 d1-f1) et dans des territoires probablement associés au striatum, très latéraux par rapport au pallidum et aux aires préoptiques (Fig. 23 m1-o1), ainsi que dans l'hypothalamus à la limite dorsale de la tige optique (Fig. 23 l1).

Expression de Nkx2.1

A E13, la distribution de l'expression du gène Nkx2.1 est similaire à celle décrite aux stades précédents. Nous avons noté un marquage Nkx2.1 intense, notamment au sein du neuroépithélium germinatif, dans les territoires hypothalamiques les plus ventraux et postérieurs, dans les régions préoptiques et jusque dans le pallidum (Fig. 23). Des cellules aussi intensément immunoréactives que celles décrites dans le neuroépithélium ont été observées latéralement par rapport à celui-ci, à la fois dans l'hypothalamus et le pallidum : ces cellules très immunoréactives pour Nkx2.1 sont situées dans la couche du manteau dans l'hypothalamus préoptique et postérieur, ainsi que dans la zone subventriculaire et le manteau du pallidum. La lame terminale est également bien marquée. En ce qui concerne les régions les plus dorsales de l'hypothalamus, le marquage Nkx2.1 intense semble s'atténuer plus rapidement dans le manteau que dans le neuroépithélium. A noter que l'ébauche du lobe nerveux de l'hypophyse, qui s'évagine des territoires hypothalamiques postérieurs et ventraux (cf. axes antérieur et postérieur précédemment définis), est également intensément immunoréactive à l'immun sérum anti-Nkx2.1. Par contre, l'ébauche du lobe antérieur (poche de Ratcke) est dépourvue de tout marquage (Fig. 24 a).

Expression de Nkx2.2 et de Shh

A E13, la distribution de Nkx2.2 dans le neuroépithélium germinatif est quasiment identique à celle décrite aux stades précédents : nous avons aussi retrouvé une immunoréactivité Nkx2.2 concernant une très large région du neuroépithélium dorsal à la tige optique et se continuant dans les territoires mésencéphaliques (Fig. 23 a1/2-j1/2). Par contre, à ce stade, la distribution de Nkx2.2 dans le manteau semble d'ores et déjà assez complexe. Nous avons en effet observé des cellules marquées dispersées au sein de la couche du manteau dans les aires rétrochiasmiques (Fig. 23 q1/2-s1/2). Puis progressivement en situation plus dorsale, notamment immédiatement dorsalement à la tige optique, nous avons visualisé un territoire Nkx2.2 positif pouvant être divisé en deux moitiés antérieure et postérieure. Dans la moitié postérieure de ce territoire, les cellules marquées occupent le neuroépithélium et toute la largeur de la couche du manteau correspondante. Notons que la présence de ce marquage latéral semble être corrélée à la persistance d'un marquage Nkx2.1 intense. Dans la moitié antérieure de ce territoire, les cellules marquées forment une masse compacte dans le neuroépithélium germinatif et elles se distribuent également dans la couche du manteau sans toutefois en occuper les régions les plus latérales (Fig. 24 b).

Nous avons précédemment décrit un élargissement au sein des territoires d'expression de Nkx2.2 d'une zone qui correspondrait au thalamus ventral. Cette zone élargie est le siège d'un marquage Nkx2.2 exclusivement localisé au neuroépithélium germinatif coïncidant par ailleurs avec une expression intense de Pax6 dans la couche du manteau. Enfin, sur les coupes passant par la flexure mésencéphalique (tegmentum ventral ou SN/VTA), nous avons pu visualiser un marquage Nkx2.2 très intense dans les neurones du manteau. Ce marquage se poursuit dans le mésencéphale.

Les résultats que nous avons pu obtenir avec la sonde Shh ne concernent que quelques coupes et n'ont par conséquent pas pu faire l'objet d'une cartographie. Ils montrent néanmoins que, dans l'hypothalamus postérieur, la distribution de Shh est proche de celle de Nkx2.2. A noter toutefois la différence majeure que constitue l'expression de Shh dans les territoires préoptiques et la lame terminale.

Expression de Dlx

Hybridation *in situ*

La distribution des marquages Dlx dans le neuroépithélium et dans les couches plus latérales feront, à ce stade, l'objet d'un même paragraphe.

Au sein des territoires hypothalamiques ventraux, des cellules présentant un signal d'hybridation Dlx ont été observées dans la couche du manteau des territoires rétrochiasmiques (Fig. 23 q4). Quelques cellules Dlx positives ont pu être visualisées sur le même niveau de coupe dans les zones du manteau très postérieures, proches de l'ébauche du lobe nerveux (Fig. 23 p4-q4). Des cellules intensément marquées se localisent également en avant de la tige optique en position très marginale (Fig. 23 o4) : il pourrait s'agir des premières cellules du manteau. En position plus dorsale, le marquage Dlx devient plus intense dans le manteau à la fois dans les régions préoptiques et dans l'hypothalamus tubéral, tandis que le neuroépithélium de ces territoires renferme peu de cellules marquées (Fig. 23 i4-o4). En ce qui concerne l'hypothalamus dorsal et postérieur, le marquage Dlx est absent des territoires mamillaires présomptifs à la fois dans le neuroépithélium et dans la couche du manteau ; par contre le marquage Dlx est intense dans les territoires de l'hypothalamus tubéral dorsal (Fig 23 j4) : il concerne alors essentiellement la couche du manteau, les cellules marquées restant très dispersées dans le neuroépithélium. Le signal d'hybridation Dlx est très abondant en avant du *sulcus hypothalamicus* dans les territoires correspondant au thalamus ventral et au sein desquels neuroépithélium et couche du manteau sont tous deux bien marqués (Fig. 23 d4-

g4 ; 24 c, d). Par ailleurs, ce marquage envahit toute la région correspondant au thalamus ventral, à l'exception de l'*eminentia thalami*. En ce qui concerne les régions hypothalamiques préoptiques et télencéphaliques, le signal d'hybridation Dlx dans le neuroépithélium germinatif est très dispersé, puis il est de plus en plus abondant au fur et à mesure que les coupes passent par les régions plus dorsales. Dans les régions pallidales présomptives (Fig. 23 j4-i4), nous avons observé un marquage assez intense dans le neuroépithélium germinatif et dans la zone subventriculaire (Fig. 24 c). A ce niveau, l'observation des coupes au microscope à faible grossissement révèle un aspect de ligne très nette qui correspond en réalité à un agrégat de cellules intensément marquées se localisant à la limite entre neuroépithélium et zone subventriculaire. La couche du manteau correspondante renferme, quant à elle, des cellules dispersées exprimant faiblement Dlx. Le marquage Dlx dans les territoires thalamiques ventraux présente un aspect similaire. Au niveau de la région mamillaire, nous avons visualisé deux bandes de cellules marquées : l'une située dans les régions proximales du manteau (à proximité du neuroépithélium), l'autre latérale par rapport à la précédente et située dans les régions les plus latérales du manteau. Les territoires ventriculaires, d'où seront issus les neurones du striatum et des régions olfactives, sont bien marqués et donnent des images semblables à celles observées dans le pallidum (Fig. 23 d4-g4). Notons que dans ces territoires, la couche du manteau ne renferme que peu ou pas de cellules Dlx positives. Enfin, le signal Dlx s'éteint brutalement : aucun marquage n'est observé ni dans le thalamus dorsal, ni dans les territoires télencéphaliques correspondant aux aires corticales présomptives.

Immunohistochimie

Les quelques données obtenues avec l'anticorps anti-Dlx, fourni par le Docteur G Boekhoff-Falk, confirment la distribution observée en hybridation *in situ* (Fig. 24 f).

Expression de Olf1

Hybridation *in situ*

Comparativement à celle des autres gènes, la distribution de l'expression de Olf1 est relativement simple. En effet, le signal Olf1 a été observé de façon quasi exclusive au sein de la couche du manteau dans des structures diencephaliques et télencéphaliques. Dans le diencephale, les aires correspondant au thalamus dorsal présentent le marquage Olf1 le plus intense (Fig. 23 a3-c3) : leur observation au microscope à fort grossissement montre que les cellules sont pratiquement toutes marquées. Sur des coupes plus ventrales, les aires

tegmentales ventrales (future SN/VTA) exhibent encore un marquage très intense. Un signal d'hybridation d'intensité très faible (voire parfois même légèrement supérieur au seuil de détection) persiste dans les aires hypothalamiques postérieures et dorsales (régions mamillaires) (Fig. 23 e3-f3), mais s'éteint dans les régions ventrales aux corps mamillaires. En ce qui concerne l'hypothalamus ventral, un marquage d'intensité modérée à faible a constamment été observé dans la couche du manteau de l'hypothalamus antérieur (Fig 23 m3-p3). Dans le télencéphale, nous avons visualisé un signal Olf1 très intense dans la couche du manteau dans le striatum (Fig. 23 e3-k3). Ce signal diminue graduellement en intensité en direction, postérieurement de l'amygdale et de l'*eminentia thalami*, et ventralement vers les aires pallidales et préoptiques. Enfin des cellules Olf1 positives bien marquées, ont été observées en position marginale (en bordure de coupe) dans les territoires isocorticaux présomptifs.

Immunohistochimie

Les quelques données obtenues en immunohistochimie avec l'anticorps anti-Olf1, fourni par le Docteur RR Reed, confirment la distribution de l'expression de Olf1 observée en hybridation *in situ*. Nous avons toutefois noté quelques exceptions : elles concernent nos territoires d'intérêt, par conséquent il est important de les signaler. Ainsi le marquage hypothalamique, notamment des aires mamillaires et plus précisément des cellules latérales, semble être plus intense en immunohistochimie (comparativement au marquage obtenu dans les autres territoires cérébraux par la même méthode) qu'en hybridation *in situ* (Fig. 24 e).

Synthèse des observations au stade E13

Comme aux stades précédents, nous avons observé une complémentarité des territoires d'expression de Pax6 et de Nkx2.1 dans le neuroépithélium germinatif et le manteau.

La bande Nkx2.2, qui s'étend sur les territoires d'expression de Pax6 et de Nkx2.1, présente une zone élargie se localisant dans le territoire du neuroépithélium du thalamus ventral exprimant Pax6 (Fig. 23 c1-g1). Cette zone élargie est encore mieux visible au stade suivant (cf. illustrations à E14). Dans la couche du manteau, le marquage Nkx2.2 est abondant dans l'hypothalamus, absent dans le thalamus ventral, puis de nouveau présent, dispersé mais intense au niveau de la flexure céphalique. Dans la couche du manteau de l'hypothalamus, l'aspect des formations Nkx2.2 est différent selon que celles-ci appartiennent au territoire Pax6 positif ou au territoire Nkx2.1 positif (Fig. 25 a). Les cellules Nkx2.2 positives localisées dans le territoire Pax6 positif n'expriment pas ce facteur de transcription, tandis que

les cellules Nkx2.2 positives localisées dans le territoire Nkx2.1 positif sont quasiment toutes doublement marquées pour les deux gènes (cellules orange après double marquage-Fig. a6 et b6). Seules quelques cellules Pax6 positives sont observées dans le manteau de l'hypothalamus dorsal, puis elles deviennent progressivement très abondantes dans le manteau du thalamus ventral ; aucune n'exprime Nkx2.2 (Fig. 25 b3).

La distribution de Dlx est relativement complexe. Dorsalement dans nos régions diencephaliques d'intérêt (thalamus ventral), la distribution de Dlx se superpose à celle de Pax6. Dans les régions plus ventrales, parallèlement à la diminution du marquage Pax6 dans la couche du manteau, nous avons observé le signal Dlx essentiellement dans le manteau (moins dans le neuroépithélium) des territoires d'expression de Nkx2.2 et Nkx2.1. Au sein du télencéphale, le signal Dlx a été observé dans le neuroépithélium du striatum exprimant également Pax6 ; dans les aires télencéphaliques ventrales et plus précisément dans le neuroépithélium, la zone subventriculaire et le manteau des aires pallidales, le signal Dlx correspond aux territoires Pax6 négatifs et Nkx2.1 positifs ; enfin dans le manteau des aires préoptiques, nous avons aussi constaté une codistribution Dlx/Nkx2.1.

La distribution de Olf1 est beaucoup plus simple que celle de Dlx, puisqu'elle ne concerne pas le neuroépithélium. Dans le manteau du striatum, nous avons observé un marquage Olf1 très abondant caractéristique, qui disparaît dans les aires pallidales et préoptiques. Dans le diencephale, le signal Olf1 est également très abondant dans le manteau du thalamus dorsal, ainsi que dans le mésencéphale. Ventralement sur les coupes passant par l'hypothalamus, un marquage Olf1 « résiduel », obtenu par hybridation, persiste dans un territoire correspondant aux formations mamillaires. Notons que les résultats d'immunohistochimie montrent un niveau d'expression de la protéine Olf1 plus élevé. Enfin un marquage Olf1 de faible intensité a été visualisé dans le manteau de l'hypothalamus antérieur en regard des territoires du neuroépithélium Pax6 positifs et Nkx2.2 négatifs.

Comme aux stades précédents, le *tpoc* révélé par les immunosérums anti-NF et anti-TH se situe très latéralement dans le manteau en regard des territoires d'expression de Nkx2.2.

Confrontation de la distribution des péricaryons MCH aux territoires d'expression des différents gènes d'intérêt et de TH

Dans notre étude, la première détection immunohistochimique des péricaryons MCH est l'élément fondamental au stade E13 et corrobore les observations précédentes de Brischoux et collaborateurs en 2001. Les premiers neurones immunoréactifs pour MCH se localisent en regard du territoire Nkx2.1 et Nkx2.2 positif dans l'hypothalamus dorsal (Fig. 23 k, l ; Fig.

25c). Sur nos coupes horizontales, l'apparition des neurones à MCH coïncide avec la disparition du signal Pax6 dans le manteau (fin des territoires du thalamus ventral), alors que le marquage Dlx s'étend dans le manteau au sein des territoires Nkx2.1 positifs. Les premières cellules MCH positives sont donc situées dans un territoire Dlx positif. La coexpression dans les mêmes cellules de MCH et des différents facteurs de transcription étudiés est, quant à elle, très difficile à confirmer, en raison de la très faible immunoréactivité de ces premières cellules, c'est pourquoi nous ne détaillerons ce point qu'à partir des stades suivants. Sur des coupes sagittales de cerveau d'embryons à E13, nous avons pu observer les premières fibres MCH positives se dirigeant vers le mésencéphale. L'analyse comparée de la distribution des projections du *tpoc* révélées par l'anticorps anti-NF, à la distribution respectivement des neurones à MCH et des fibres MCH, montre que les premiers neurones à MCH sont adjacents au *tpoc* (ils ne semblent pas être directement entre les fibres de ce tractus) (Fig. 22 d, e, f) et que par contre, les premières projections MCH empruntent clairement ce faisceau (Fig. 22 g, h).

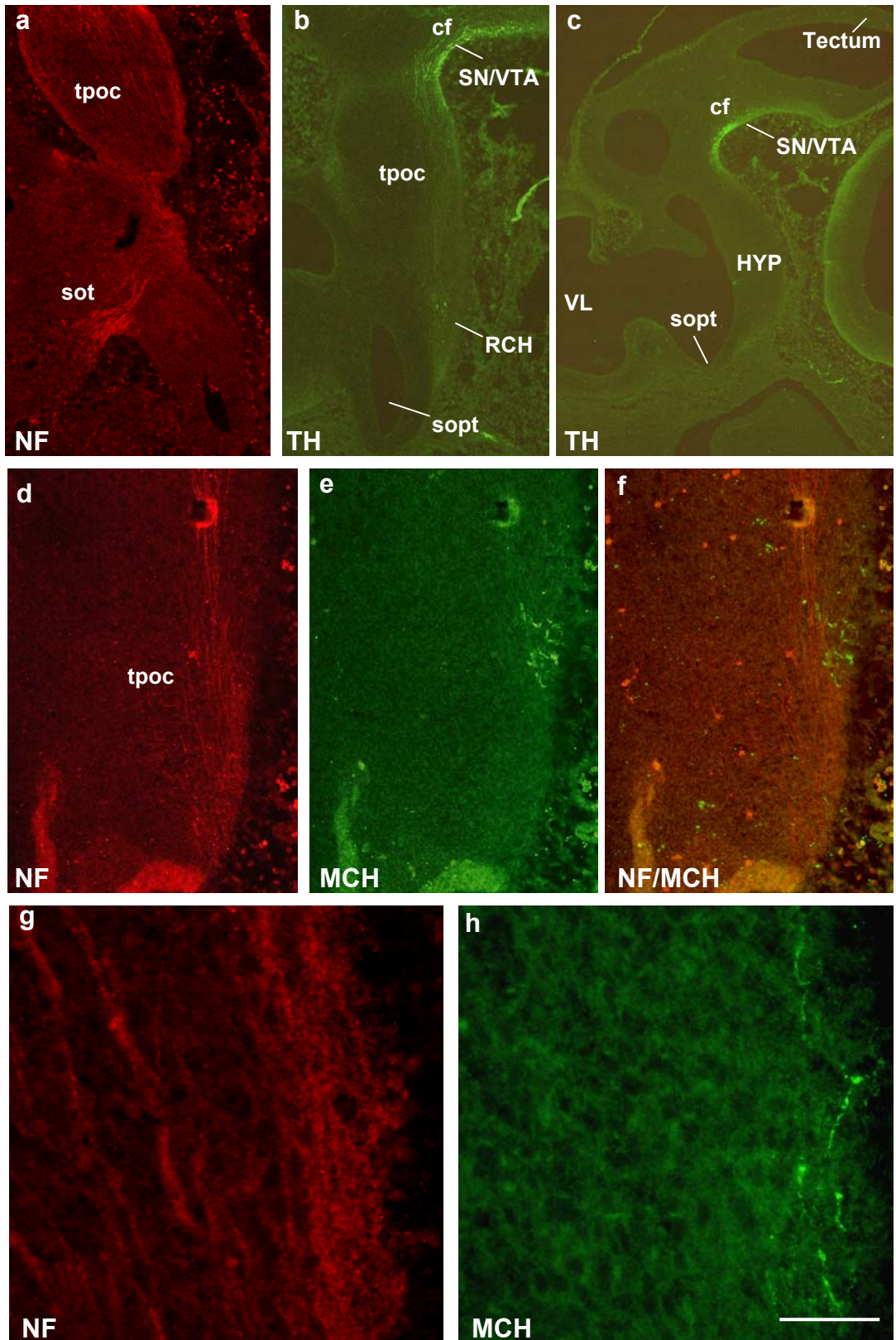
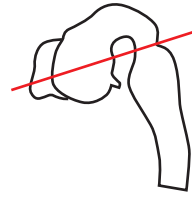


Fig. 22 : Microphotographies de coupes sagittales de cerveau d'embryon de rat au stade E13 illustrant par immunohistochimie la distribution de différents tractus de fibres mis en évidence par les anticorps anti-NF et anti-TH, ainsi que les premiers neurones et fibres MCH positifs. Noter les premières cellules MCH positives à proximité des axones du *tpoc* marqués par l'anticorps anti-NF (**d-f**), et les premiers axones MCH (**h**) qui suivent le trajet des axones du *tpoc* (**g**). Barre d'échelle : (a-c) 500 μ m, (d-f) 100 μ m, (g-h) 20 μ m.

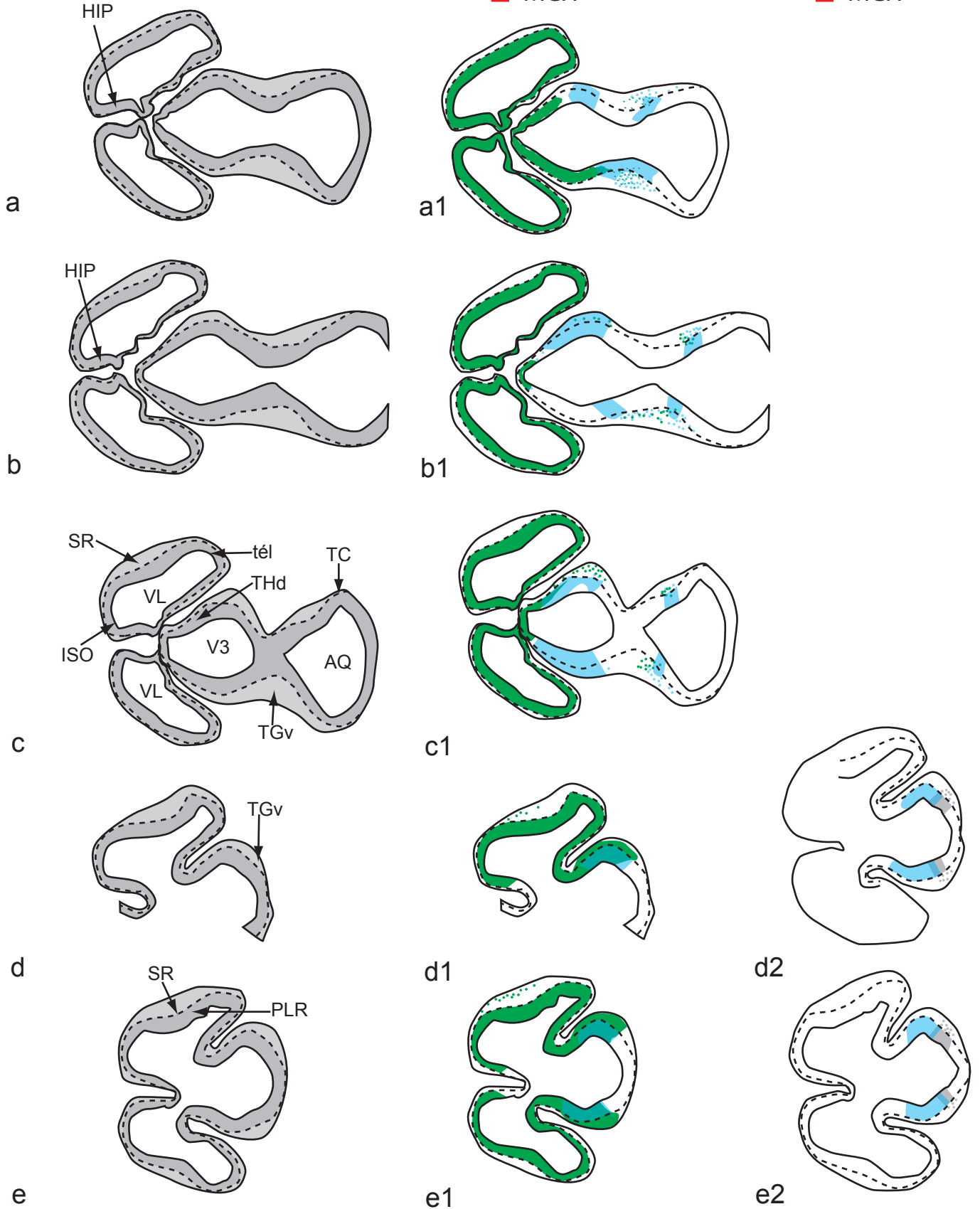
Fig. 23 : Distribution de l'expression en immunohistochimie de MCH, Pax6, Nkx2.2, Nkx2.1 et en hybridation *in situ* de Olf1 et Dlx sur des dessins réalisés à partir de coupes histologiques horizontales de cerveau passant par le diencéphale chez le rat au stade embryonnaire E13 et organisés du niveau le plus dorsal (**a**) au niveau le plus ventral (**s**).

Fig. 23

E13

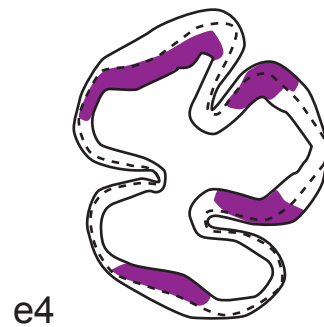
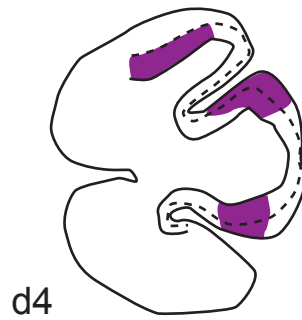
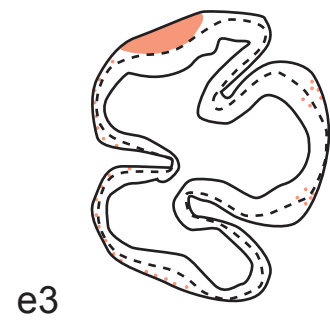
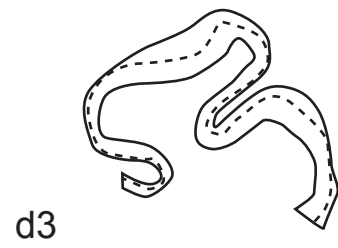
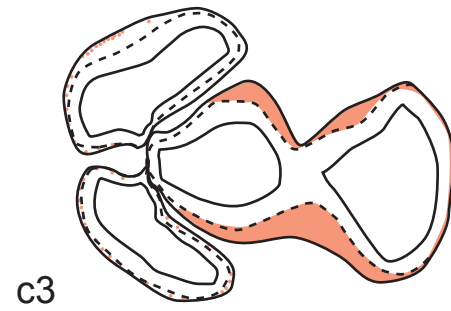
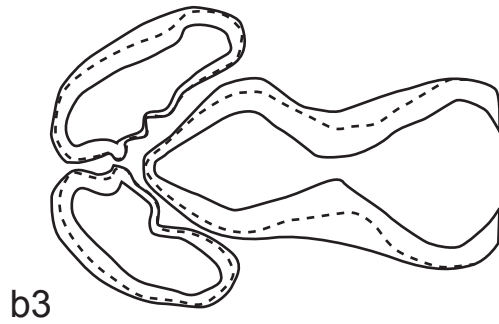
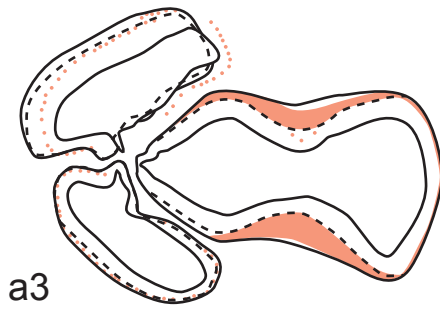


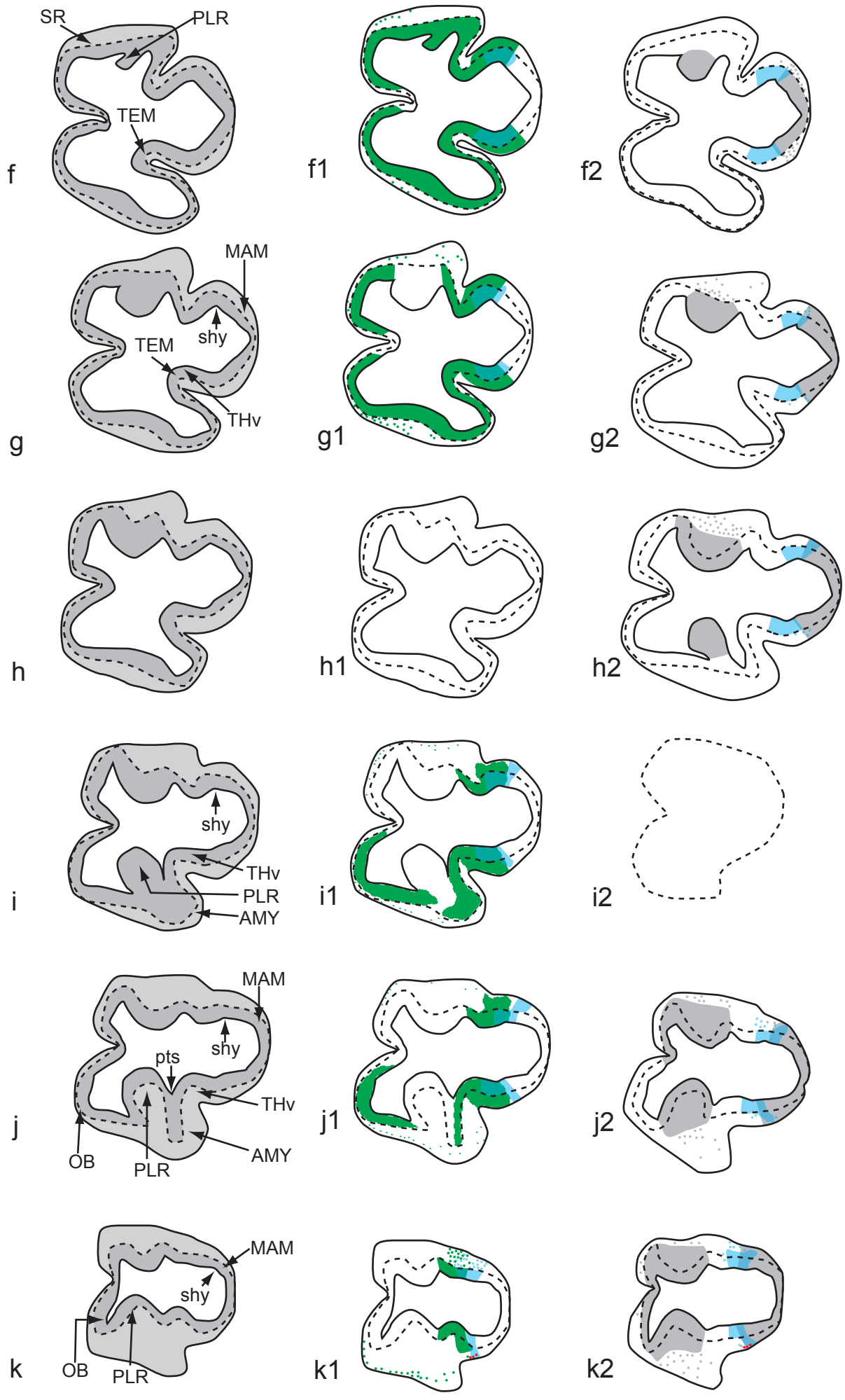
■ Pax6 ■ Nkx2.2 ■ Nkx2.1 ■ Nkx2.2
■ MCH ■ MCH

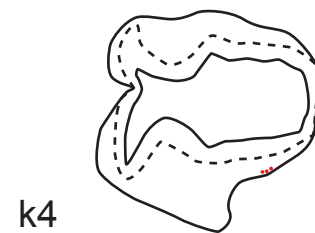
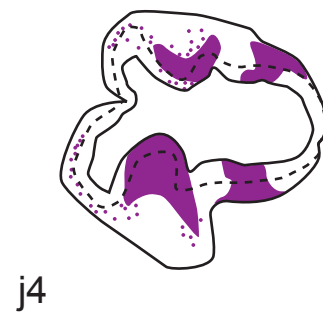
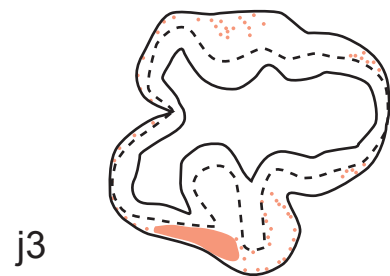
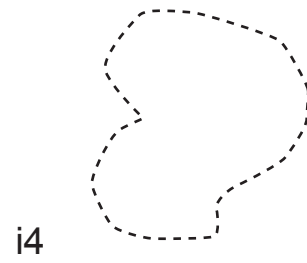
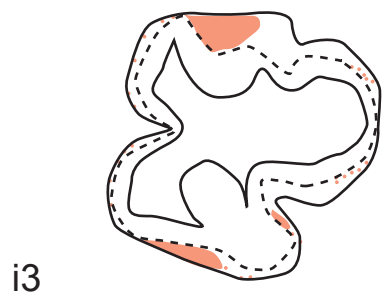
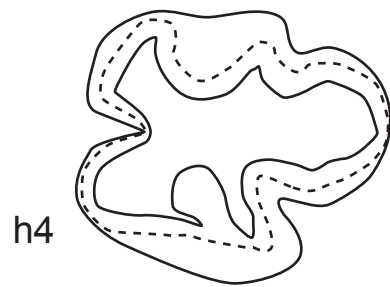
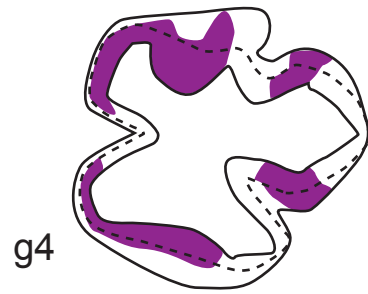
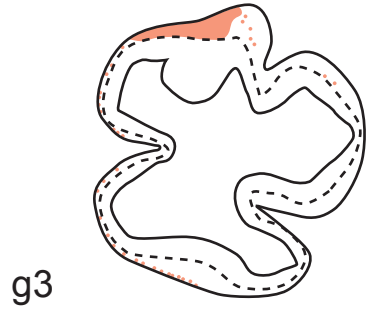


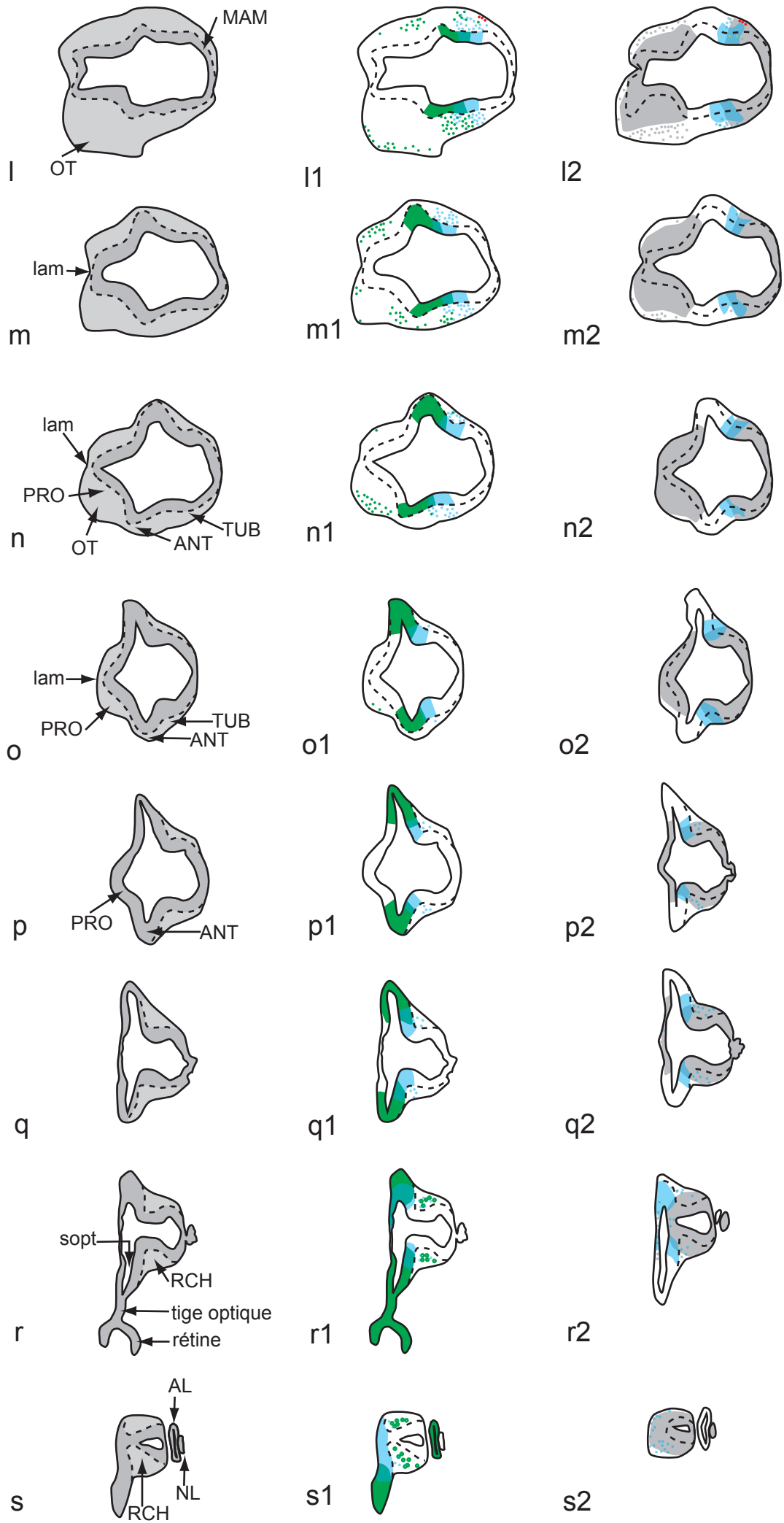
■ Olf1 ■ MCH

■ Dlx1/2 ■ MCH

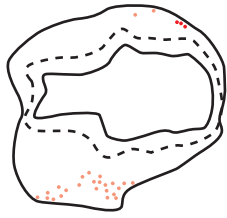








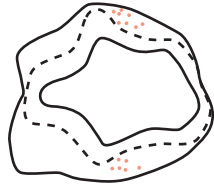
l3



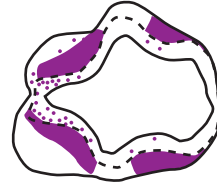
l4



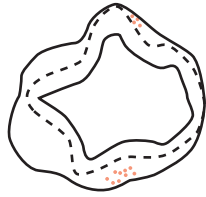
m3



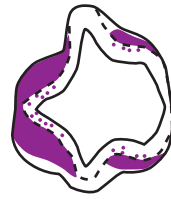
m4



n3



n4



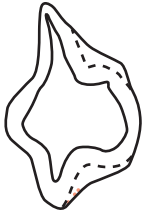
o3



o4



p3



p4



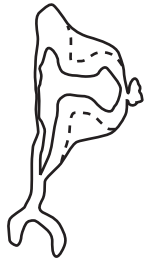
q3



q4



r3



r4



s3



s4



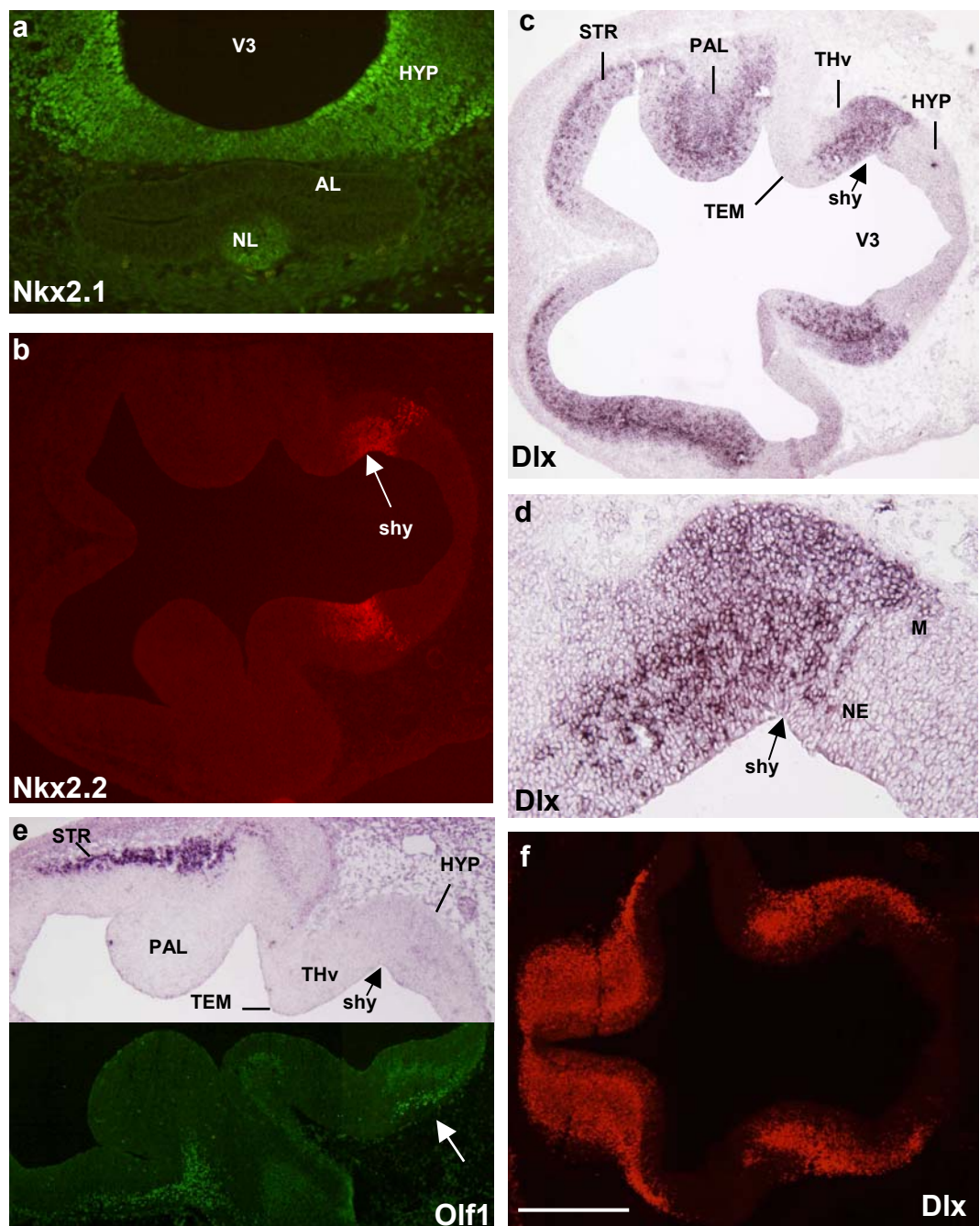


Fig. 24 : Microphotographies de coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E13 illustrant par immunohistochimie la distribution de Nkx2.1, Nkx2.2 et Olf1 (**a**, **b**, **e**), et par immunohistochimie et hybridation *in situ* celle de Olf1 et Dlx (**c-f**). **a**. Noter le marquage Nkx2.1 dans le lobe nerveux de l'hypophyse. **b-e**. Distribution de Nkx2.2, Dlx et Olf1 sur des coupes passant par l'hypothalamus postérieur et le thalamus ventral. Cf. texte pour détails. Le signal Olf1 est intense dans le télencéphale et très faible dans l'hypothalamus postérieur. Par immunohistochimie (moitié inférieure), le marquage Olf1 dans l'hypothalamus semble plus intense. **f**. Marquage Dlx en immunohistochimie. Noter la forte expression de Dlx, essentiellement localisée au sein du manteau, dans les aires préoptiques et hypothalamiques tubérales dorsales. Barre d'échelle : (a) 250 μ m, (b-c et e-f) 500 μ m, (d) 100 μ m.

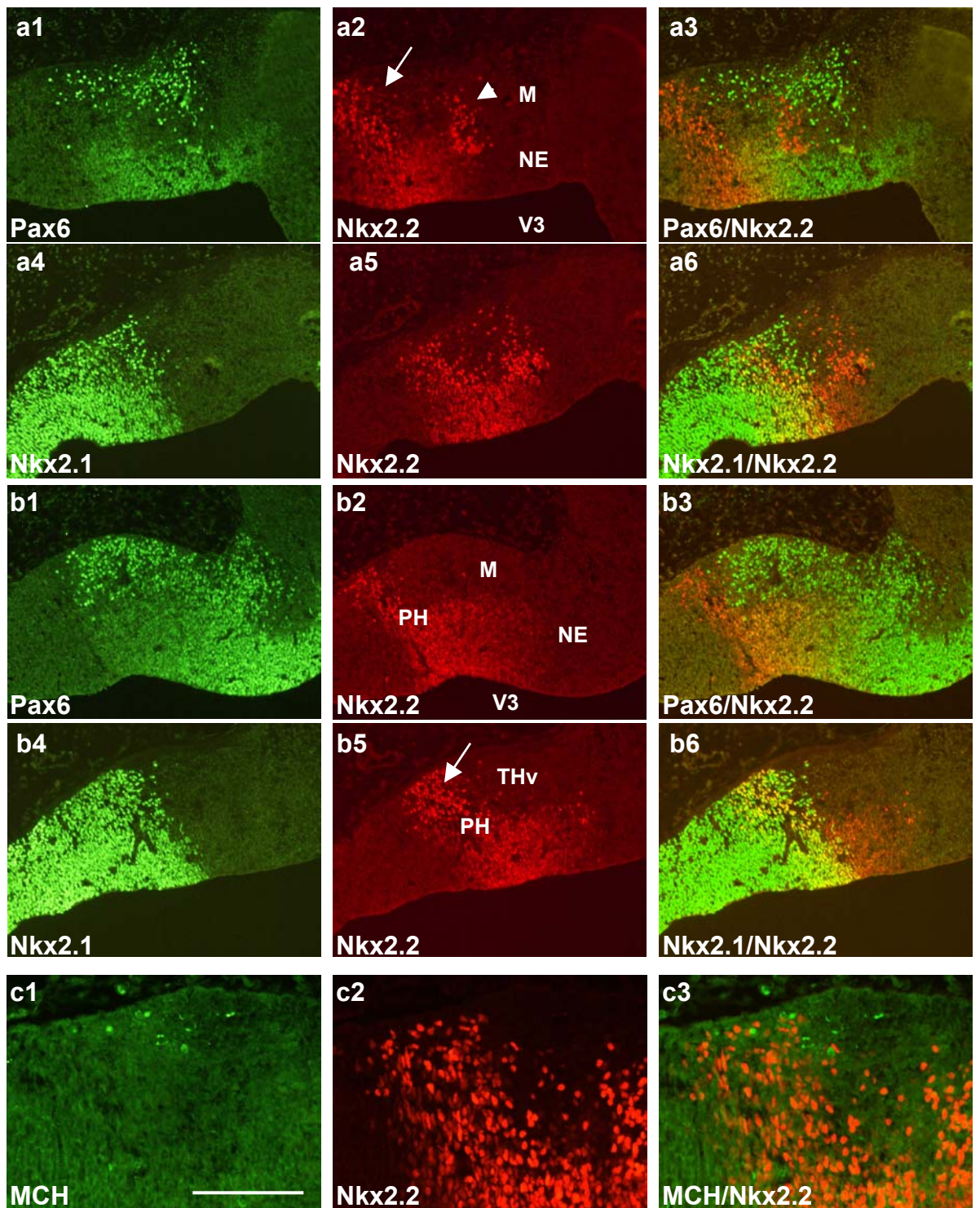


Fig. 25 : Microphotographies de coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E13. **ab**. Distribution complémentaire de Pax6, Nkx2.2 et Nkx2.1 en immunohistochimie. **a**. Dans l'hypothalamus dorsal, Nkx2.2 se distribue sous forme - d'une bande postérieure (flèche longue) située dans la région Nkx2.1 positive et doublement marquée pour Nkx2.2 et Nkx2.1 (**a6**) et - un groupe antérieur (flèche courte) situé dans la zone Pax6 positive mais n'exprimant pas Pax6. Noter que dans le neuroépithélium, la moitié postérieure de la bande Nkx2.2 est Nkx2.1 positive et la moitié antérieure est Pax6 négative. **b**. Dans le thalamus ventral, de nombreuses cellules sont Pax6 positives (**b1**, **b3**) et Nkx2.2 négatives (**b2**, **b3**). Noter que dans le neuroépithélium, le marquage Nkx2.2 s'étend dans le territoire Pax6 positif. Dans l'hypothalamus postérieur (flèche longue en **b5**), les cellules Nkx2.2 positives du neuroépithélium et du manteau sont également Nkx2.1 positives (cellules orange en **b6**). **c**. Les premiers neurones à MCH (**c1**) sont localisés dans la bande postérieure marquée par Nkx2.2 (**c2**). Très peu de neurones à MCH sont doublement marqués (**c3**). Barre d'échelle : (a1-b6) 250 μ m, (c) 100 μ m.

4. Stade embryonnaire E14

Au stade E14, la couche du manteau s'épaissit et continue de se différencier. D'après la littérature, à ce stade la cytoarchitecture seule ne permet pas encore la reconnaissance des structures : en effet les cellules, quelque soit le territoire, présentent un aspect identique immature. Toutefois d'après nos observations, des masses cellulaires semblent s'individualiser (Fig. 26).

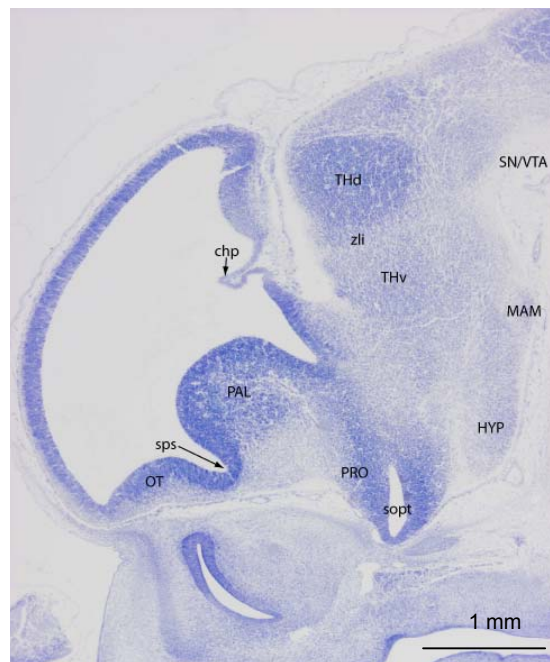


Fig. 26 : Microphotographies d'une coupe sagittale de cerveau d'embryon de rat au stade E14. Coloration au bleu de toluidine.

L'analyse de la distribution de marqueurs chimiques tels que TH témoigne déjà d'une détermination phénotypique beaucoup plus évidente de certaines régions, notamment de la SN/VTA. Les grandes divisions antéropostérieures de l'hypothalamus (préoptique, antérieur, tubéral, mamillaire) sont bien repérables à ce stade et figurent d'ailleurs dans l'atlas d'Alvarez-Bolado et de Swanson. Dans le télencéphale, la différenciation du striatum apparaît nettement. A E14, l'anticorps anti-NF marque trop de structures, c'est pourquoi nous n'avons pas pu l'utiliser pour détecter les faisceaux de fibres en place. Par contre, l'anticorps anti-TH nous a permis de mettre en évidence le *mfb*, révélé par ses projections TH positives, qui est bien apparent et décrit à ce stade. Ainsi l'utilisation de l'anticorps anti-TH nous a permis de visualiser les quelques fibres immunoréactives issues des aires rétrochiasmiques et surtout le tractus des projections mésotélencéphaliques et striatonigrales transitant par le *mfb*, que nous

avons ainsi pu mettre en évidence et cartographier en regard des territoires d'expression des différents facteurs de transcription étudiés (cf. infra).

Expression de Pax6

La distribution de Pax6 est similaire à celle décrite à E13 dans le diencephale et le télencéphale, au sein du neuroépithélium et de la couche du manteau (Fig. 27 ; Fig. 28). En résumé, le marquage le plus intense a été observé dans le neuroépithélium et le manteau du thalamus ventral, ainsi que dans le neuroépithélium du télencéphale dorsal et notamment dans le pallium ; un marquage d'intensité modéré à faible a été constaté dans les régions du neuroépithélium de l'hypothalamus antérieur. Des cellules Pax6 positives ont aussi été observées dans la couche du manteau du striatum, certaines également dans le manteau des régions préoptiques.

Expression de Nkx2.1

Nous avons retrouvé à E14 certains aspects du marquage décrit au stade précédent (Fig. 29). Ainsi dans l'hypothalamus postérieur et ventral, nous avons observé un marquage aussi intense qu'à E13, toujours distribué au sein du manteau et du neuroépithélium (Fig. 29 h1-u1). En avant de la tige optique, dans les régions préoptiques, le marquage Nkx2.1 est intense dans le neuroépithélium et les territoires du manteau proches du neuroépithélium (Fig. 29 n1) et des cellules immunoréactives apparaissent dispersées plus latéralement. Cette dernière observation, bien que non mentionnée alors, avait déjà été faite au stade E13. L'expression de Nkx2.1 se poursuit dans la zone périventriculaire et la zone subventriculaire et le manteau du pallidum. A noter un marquage relativement intense, restreint à certains territoires du septum que nous avons assimilés au septum médian (Fig. 29 i1, j1). Comme aux stades précédents, dans le télencéphale, les aires striatales et pallidales ne sont pas immunoréactives. Dans le diencephale, dans les territoires proches des aires tegmentales ventrales, nous avons constaté une disparition progressive du marquage. A noter dans ces territoires diencephaliques hypothalamiques, une extinction du marquage d'abord ventralement dans le neuroépithélium germinatif (Fig. 29 h1), puis plus dorsalement dans la couche du manteau (Fig. 29 g1).

Expression de Nkx2.2

Le marquage Nkx2.2 reste localisé dans une bande de tissu continue allant des territoires mésencéphaliques aux territoires hypothalamiques plus ventraux. Nkx2.2 est exprimé dans le neuroépithélium du thalamus ventral, puis dans les aires tubérales et antérieures de

l'hypothalamus présomptif jusqu'au niveau du chiasma optique. Dans le manteau, comme aux stades précédents, la distribution de Nkx2.2 est complexe. Sur les coupes les plus dorsales, un marquage particulièrement intense a été observé dans une structure que nous avons identifiée comme étant le noyau réticulé mésencéphalique (Fig. 29 a1). Sur des coupes plus ventrales, les cellules immunoréactives pour Nkx2.2 sont de plus en plus dispersées ; aucune cellule Nkx2.2 positive n'a été détectée dans le thalamus ventral et seules quelques cellules sont présentes dans la région du manteau marquant la limite entre le thalamus ventral et la région mamillaire. Puis le marquage devient à nouveau abondant dans le manteau de l'hypothalamus dorsal tubéral et dorsal antérieur (Fig. 29 h1-m1). Comme au stade précédent, les cellules Nkx2.2 positives forment une bande assez diffuse correspondant à l'hypothalamus tubéral dorsal, mais nous avons pu constater que ces cellules se distribuent selon un gradient clair : en effet, elles sont plus nombreuses à proximité du neuroépithélium que dans les territoires plus latéraux. Dans l'hypothalamus antérieur dorsal, comme à E13, les cellules immunoréactives pour Nkx2.2 forment une masse arrondie relativement compacte et proche du neuroépithélium. Sur les coupes passant par l'hypothalamus ventral, des cellules Nkx2.2 positives assez abondantes forment une masse relativement compacte située en arrière de la tige optique (Fig. 29 t1, u1).

Expression de Dlx

La distribution du marquage Dlx est identique que celui-ci soit obtenu par immunohistochimie ou par hybridation *in situ* (Fig. 29 ; Fig. 28). Nous avons observé deux colonnes de tissu Dlx positif : la première s'étend du striatum et pallidum jusqu'au tubercule olfactif et aux régions préoptiques, la seconde correspond au thalamus ventral et à l'hypothalamus tubéral. Dans les territoires télencéphaliques, le marquage Dlx est abondant à la fois dans le neuroépithélium germinatif et dans la zone subventriculaire. Dans les aires diencephaliques, un marquage abondant a été observé au sein du neuroépithélium et de la couche du manteau dans le thalamus ventral ainsi que dans l'hypothalamus tubéral ; à noter toutefois l'exception que constituent les aires hypothalamiques les plus ventrales au sein desquelles le marquage Dlx disparaît d'abord dans la zone du neuroépithélium puis sur les coupes les plus ventrales dans la couche du manteau (Fig. 29 u2).

Expression de Olf1

Au stade E14, la distribution de Olf1 est plus complexe qu'au stade précédent. D'une manière générale, Olf1 est absent de la couche du neuroépithélium germinatif (Fig. 27 ; Fig. 29). Dans

le télencéphale, au sein du manteau du striatum, nous avons pu visualiser des formations cellulaires compactes exprimant un marquage Olf1 intense. Dans le diencephale, un marquage Olf1, d'intensité modérée à faible, a été observé dans le manteau de l'hypothalamus antérieur (Fig. 27 i1-m1 ; Fig. 29 k2-r2). En immunohistochimie, sur les coupes les plus dorsales, les formations mamillaires renferment également des cellules Olf1 positives (Fig. 27 g1). Ce marquage n'a jamais été retrouvé avec la même intensité par hybridation *in situ*. Dans les territoires voisins du tegmentum ventral, le signal Olf1 est détecté de façon comparable par immunohistochimie et par hybridation *in situ*. Il faut noter qu'un marquage du neuroépithélium germinatif était observé dans ces territoires. Enfin, alors qu'il semble être absent de la majorité de la couche du manteau dans le thalamus ventral, le marquage Olf1 est très intense à la fois en immunohistochimie et en hybridation *in situ* dans le manteau du thalamus dorsal et des aires mésencéphaliques dorsales, y compris du tectum.

Synthèse des observations au stade E14

Au stade E14, la couche du manteau continue de se différencier, la neurogenèse se poursuit et au sein du neuroépithélium, on constate toujours une très forte expression de facteurs de transcription. La distribution de l'expression de nos différents gènes d'intérêt est plus complexe, alors que de plus en plus de régions sont identifiées. Parallèlement, se développent les principaux tractus de fibres. Ainsi l'identification de futures structures adultes est désormais facilitée par la connaissance du phénotype chimique de certains neurones. A E14, il est donc possible de localiser encore plus précisément les territoires d'expression des différents facteurs de transcription étudiés par rapport à des structures adultes présomptives. Le territoire le plus facilement identifiable est la SN/VTA, puisque l'anticorps anti-TH révèle dans cette structure la masse très abondante des neurones dopaminergiques telle qu'elle est observée chez l'animal adulte (Fig. 31). La SN/VTA est également caractérisée par une expression abondante de Olf1, sachant que cette expression de Olf1 dans le manteau de l'aire tegmentale ventrale est bien évidemment non spécifique de cette dernière. Dans les régions plus postérieures, nous avons observé un marquage Olf1 dans le tectum où il est très abondant et également dans le manteau du thalamus dorsal. Conformément aux précédentes observations (Brischoux et coll., 1992), la masse des neurones TH positifs est localisée dans le manteau et quelques cellules expriment TH dans le neuroépithélium germinatif voisin. Ceci indique que les cellules naissent dans les régions du neuroépithélium germinatif, migrent et se différencient dans le manteau. Ces territoires TH positifs du neuroépithélium germinatif expriment également Olf1 (nous n'avons pas effectué de double marquage Olf1/TH pour

confirmer cette observation). Ce territoire de distribution des futurs neurones dopaminergiques de la SN/VTA est encadré par des zones d'intense expression de Nkx2.2. Nous avons pour l'instant des difficultés à identifier cette structure Nkx2.2 positive, localisée en avant de la SN/VTA, mais qui, n'exprimant pas Pax6, ne peut être considérée (selon les critères en vigueur) comme appartenant au thalamus ventral et que nous avons assimilé à du noyau mésencéphalique réticulé (Fig. 31). Nous avons observé des cellules dopaminergiques dans le thalamus ventral, correspondant au groupe de neurones A13 de la *zona incerta* rostromédiane, ainsi que dans l'hypothalamus antérieur. Ces cellules TH positives sont localisées dans des territoires d'expression de Pax6 et Nkx2.2. Les cellules du groupe A13 classiquement expriment Pax6 (Vitalis et coll., 2000) mais pas Nkx2.2. Les cellules dopaminergiques hypothalamiques n'expriment pas non plus Nkx2.2 (Fig. 31). Sur des coupes plus ventrales, les projections issues des neurones dopaminergiques de la SN/VTA sont bien identifiables et permettent de localiser le futur *mfb*. Le trajet de ces fibres s'effectue latéralement dans le manteau, à la limite postérieure des territoires d'expression de Pax6 et de Dlx (Fig. 28). Selon les axes précédemment définis par nos soins, ces territoires Pax6 et Dlx positifs correspondent en avant au thalamus ventral : en effet, ils sont situés en position ventrale par rapport à la *zli*. Précisons toutefois que la *zli* est mal identifiée sur notre matériel, car le plan de coupe que nous avons choisi est quasiment parallèle à celle-ci. Ainsi sur ce niveau de coupe, le *mfb* borde postérieurement le thalamus ventral. Au sein du neuroépithélium du thalamus ventral, nous avons donc observé les marquages Pax6, Dlx et Nkx2.2 (Fig. 31). Il est intéressant de constater que le signal Dlx est confiné au thalamus ventral proprement dit et qu'il ne s'étend pas à l'*eminentia thalami* (Fig. 28 c ; Fig. 29 e ; Fig. 31 ; Fig. 32), qui exprime pourtant abondamment Pax6 dans la zone du neuroépithélium (Fig. 27 h ; Fig. 29 c-d ; Fig. 31 ; Fig. 32). De même, Nkx2.2 est exprimé dans le neuroépithélium du thalamus ventral, mais il est absent de l'*eminentia thalami* (Fig. 31 ; fig. 32).

A E14, la distribution des marquages obtenus pour Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2 dans l'hypothalamus évolue, certes, mais reste conforme aux observations faites aux stades précédents (Fig. 32). Parmi les trois gènes précédemment cités, Nkx2.1 est le seul à être exprimé dans les régions préoptiques. L'hypothalamus antérieur, quant à lui, est défini par l'expression de Pax6 et de Pax6/Nkx2.2, tandis que l'hypothalamus postérieur est défini par l'expression de Nkx2.2/Nkx2.1 et de Nkx2.1 seul pour la région mamillaire. Par ailleurs, les marquages Dlx et Olf1 vont permettre de compléter cette image de la chémoarchitecture de l'hypothalamus. En réalité, l'hypothalamus postérieur n'est pas homogène : sur les coupes passant par les corps mamillaires, le signal Olf1 observé dans le manteau est d'intensité

inégale : modérée en immunohistochimie et faible en hybridation *in situ* (déjà mentionné et illustré à E13). Plus ventralement, le signal Olf1 laisse place à un marquage Dlx (hypothalamus tubéral dorsal), qui va s'estomper en position très ventrale progressivement dans le manteau (hypothalamus tubéral ventral). Comme à E13, nous avons observé dans la couche du manteau des cellules immunoréactives pour Nkx2.2. Soit ces cellules sont situées dans les territoires Nkx2.1 positifs et elles occupent une bande de tissu ; notons que beaucoup de ces cellules Nkx2.2 positives expriment Nkx2.1 (Fig. 30 a). Soit elles sont issues des régions du neuroépithélium exprimant Pax6, elles forment alors une masse de neurones assez compacte, qui est Pax6 négative. Dlx, qui est intensément exprimé dans le thalamus ventral, voit son domaine d'expression s'étendre à l'hypothalamus tubéral dorsal. Le marquage Dlx dans ces territoires se superpose aux signaux Nkx2.1 et Nkx2.2. En revanche, le signal Olf1 absent dans le thalamus ventral, apparaît dans des neurones au sein du manteau de l'hypothalamus antérieur dans des régions n'exprimant pas Nkx2.2 ; il ne se poursuit pas dans la tige optique. Dans le neuroépithélium et le manteau des territoires préoptiques, le marquage Dlx est tout aussi abondant que le signal Nkx2.1. Comme aux stades précédents, le marquage Dlx s'étend dorsalement au sein du pallidum et du striatum, dans le manteau duquel apparaît également un signal Olf1. Enfin, signalons l'existence de cellules immunoréactives pour Pax6 dans les zones très latérales de la couche du manteau du striatum. Ces cellules peuvent en fait correspondre à un marquage du pallium, en effet Pax6 est toujours exprimé dans les cellules du neuroépithélium dans le télencéphale dorsal.

Confrontation de la distribution des péricaryons et fibres MCH aux territoires d'expression des différents gènes d'intérêt

A E14, les neurones à MCH sont plus abondants qu'à E13, ils forment une masse compacte située latéralement au sein du manteau de l'hypothalamus dorsal (dorsal à la tige optique). Ils sont localisés dans le territoire de l'hypothalamus tubéral caractérisé par l'expression dans le neuroépithélium germinatif et la couche du manteau de Nkx2.1, Nkx2.2 et Dlx (Fig. 27 ; Fig. 28 ; Fig. 29 et Fig. 30). Grâce aux expériences de double marquage MCH/Nkx2.2, nous avons montré que seules quelques cellules MCH positives expriment Nkx2.2 (Fig. 30 e-j). Sur des coupes sagittales ou horizontales, nous avons constaté que la vaste majorité des péricaryons MCH est située en position immédiatement postérieure et ventrale par rapport au faisceau TH positif. Au niveau du virage de ce faisceau en direction du télencéphale, nous avons observé quelques péricaryons MCH localisés parmi les fibres. Cette observation est encore plus claire à E15 et sera donc illustrée à ce stade. Les fibres MCH sont légèrement plus abondantes à E14

qu'à E13, elles se situent latéralement par rapport au territoire Nkx2.2 positif et sont adjacentes au faisceau des fibres TH positives. Elles se dirigent vers le mésencéphale.

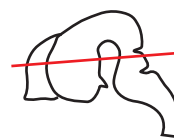
Fig. 27 : Distribution de l'expression en immunohistochimie de MCH, Pax6 et Olf1 et Dlx sur des dessins réalisés à partir de coupes histologiques horizontales de cerveau passant par le diencéphale chez le rat au stade embryonnaire E14 (E14 1) et organisés du niveau le plus dorsal (**a**) au niveau le plus ventral (**m**).

Fig. 28 : Distribution de l'expression en immunohistochimie de MCH, TH, Pax6 et Dlx sur des dessins réalisés à partir de coupes histologiques horizontales de cerveau passant par le diencéphale chez le rat au stade embryonnaire E14 (E14 9) et organisés du niveau le plus dorsal (**a**) au niveau le plus ventral (**k**).

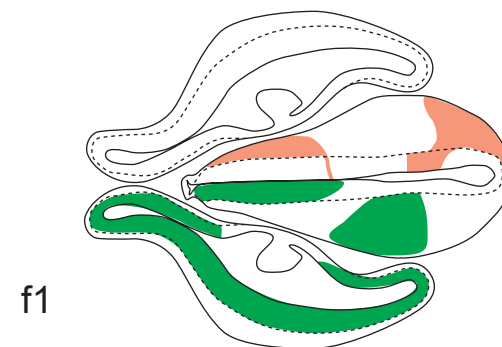
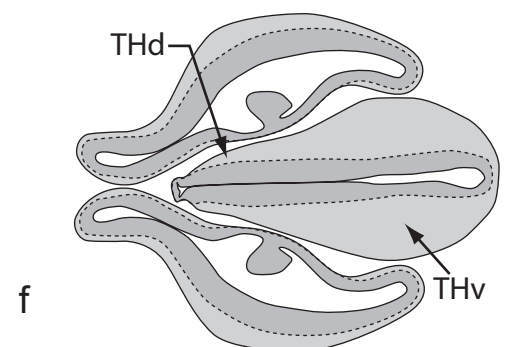
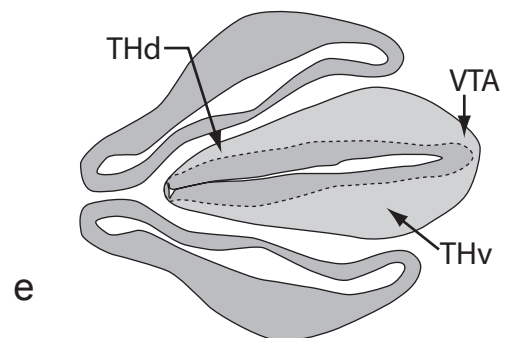
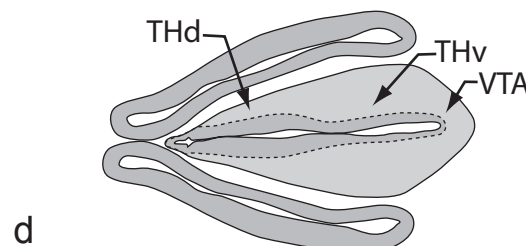
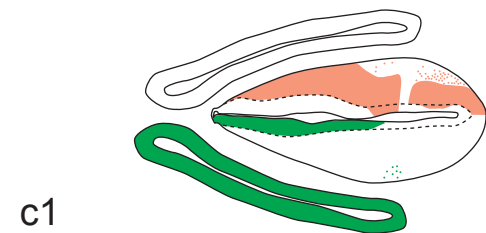
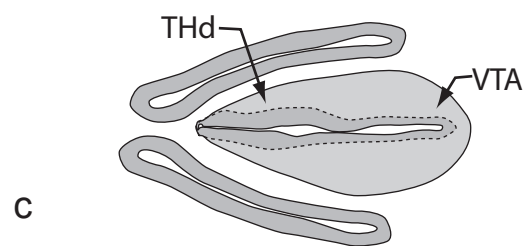
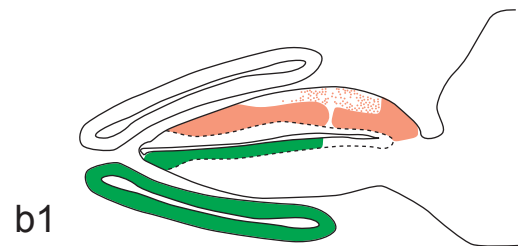
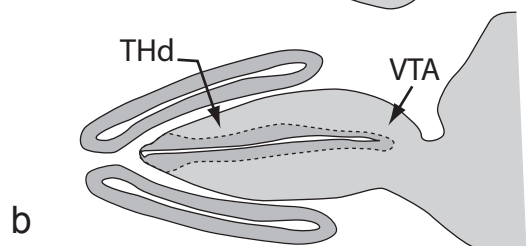
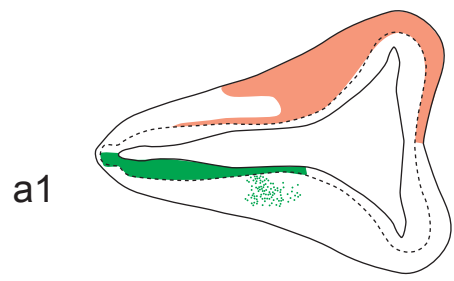
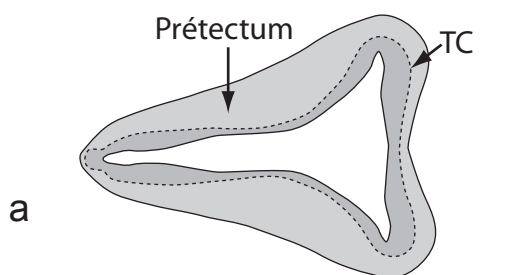
Fig. 29 : Distribution de l'expression en immunohistochimie de MCH, TH, Nkx2.1, Nkx2.2 et en hybridation *in situ* de Olf1 et Dlx sur des dessins réalisés à partir de coupes histologiques horizontales de cerveau passant par le diencéphale chez le rat au stade embryonnaire E14 (E14 54) et organisés du niveau le plus dorsal (**a**) au niveau le plus ventral (**u**).

Fig. 27

E14
(E14 1)



■ Pax6 ■ Olf1 ■ MCH



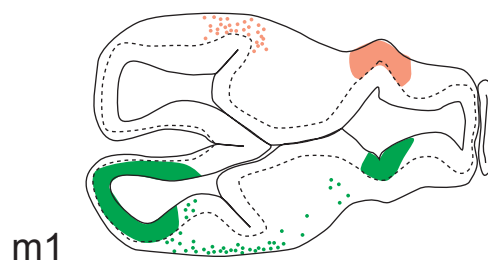
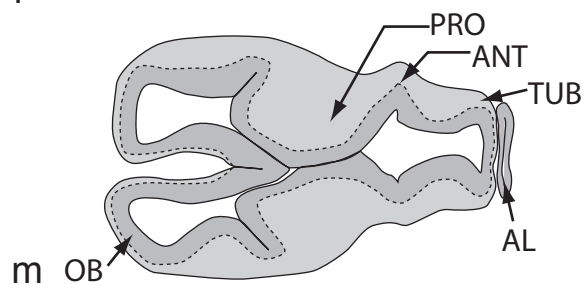
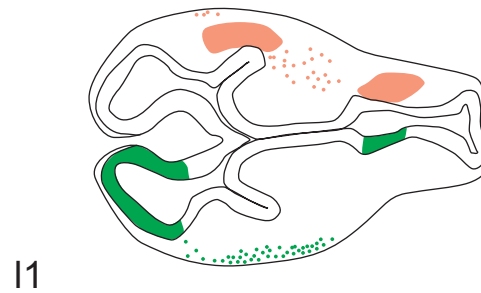
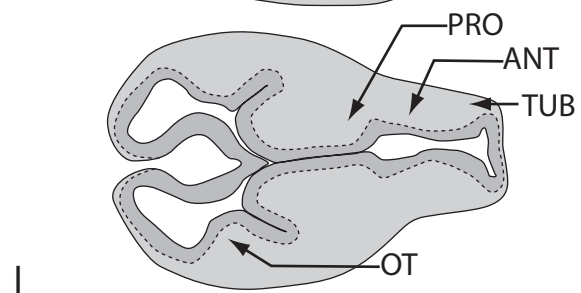
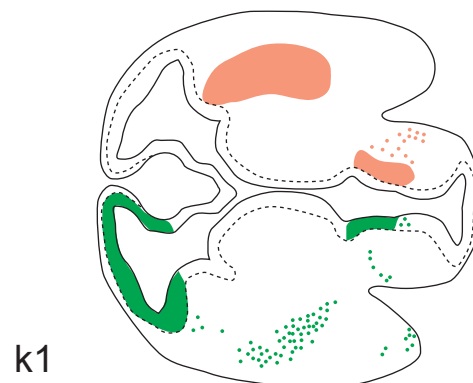
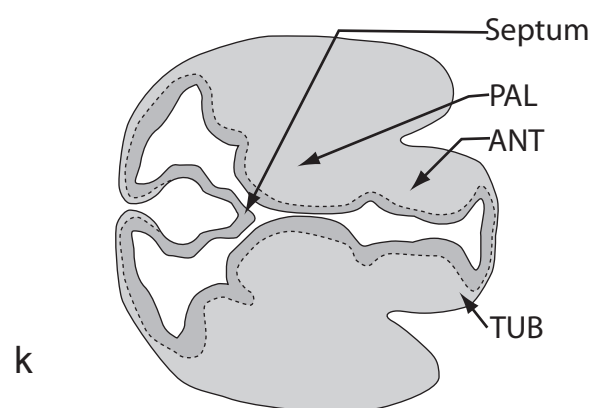
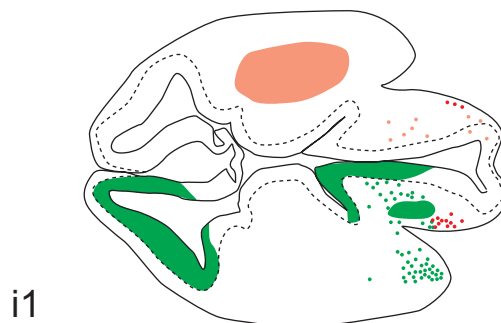
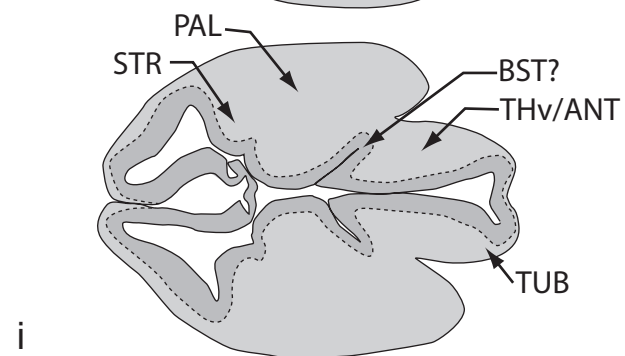
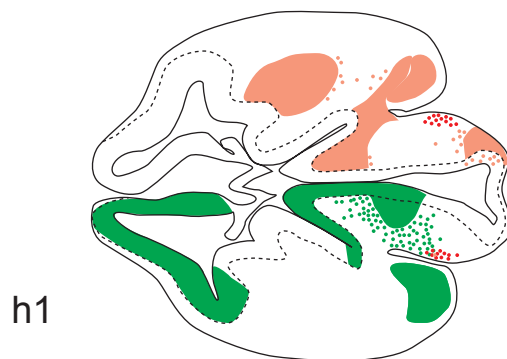
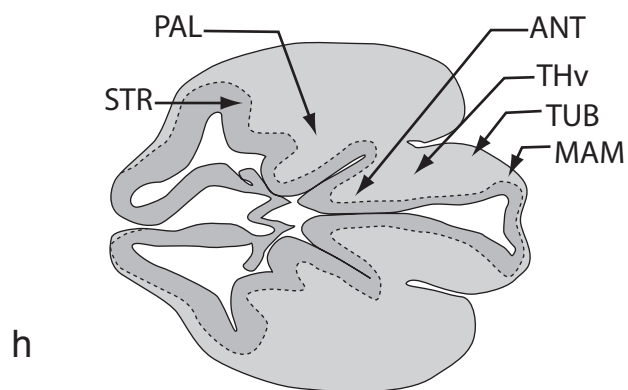
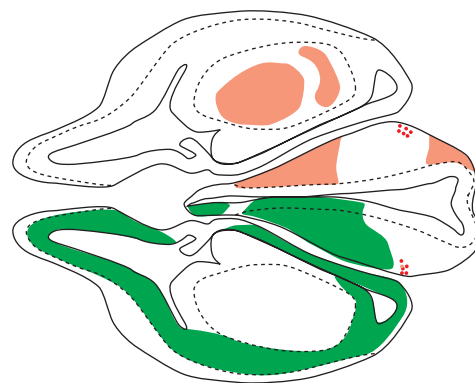
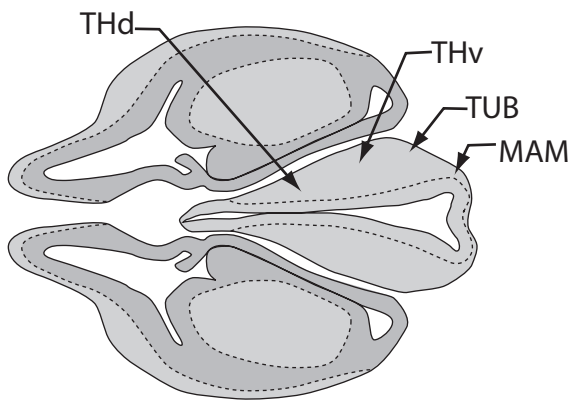
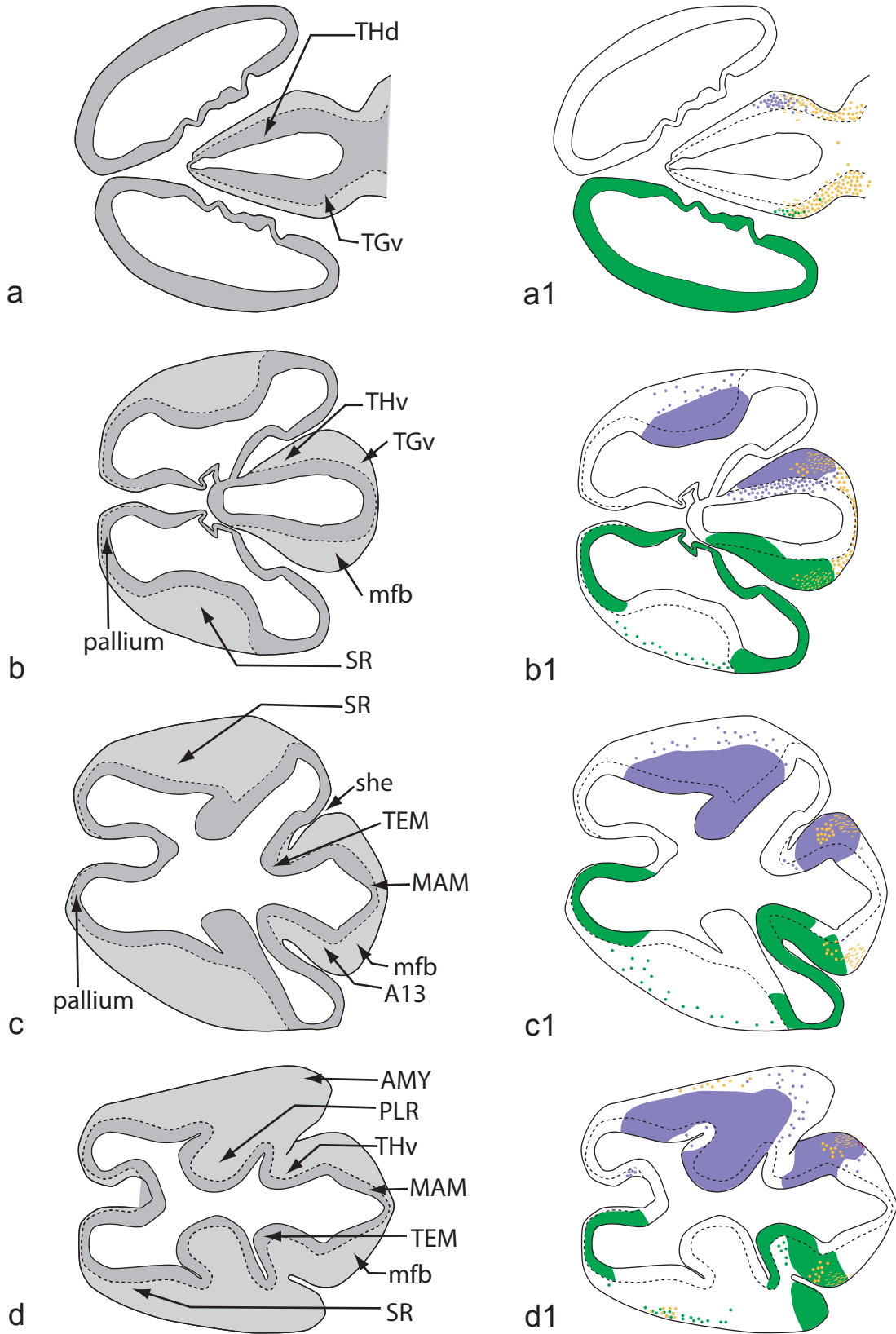


Fig. 28

E14
(E14 9)



■ Pax6 ■ Dlx ■ TH ■ MCH



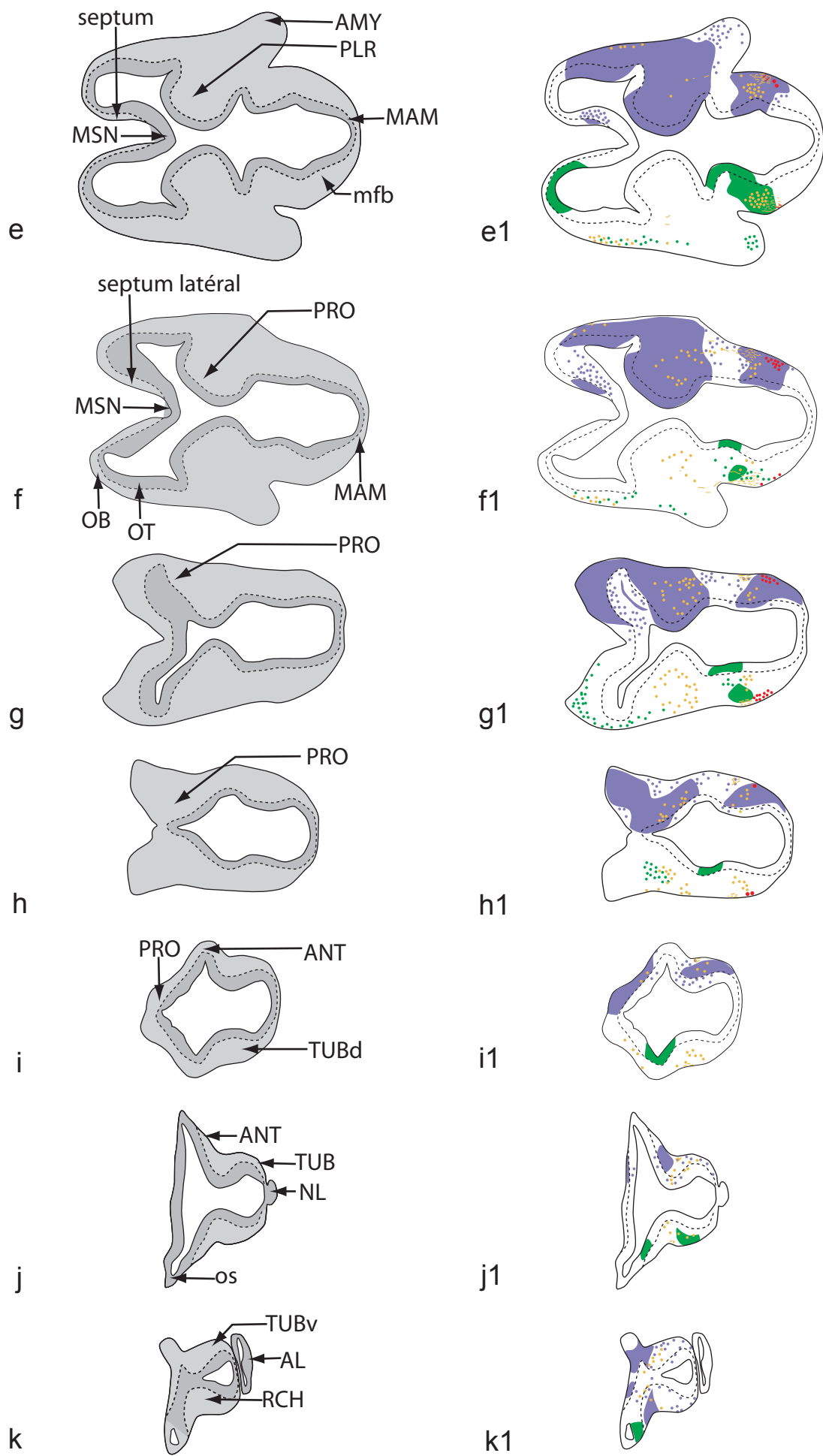
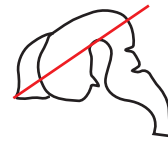
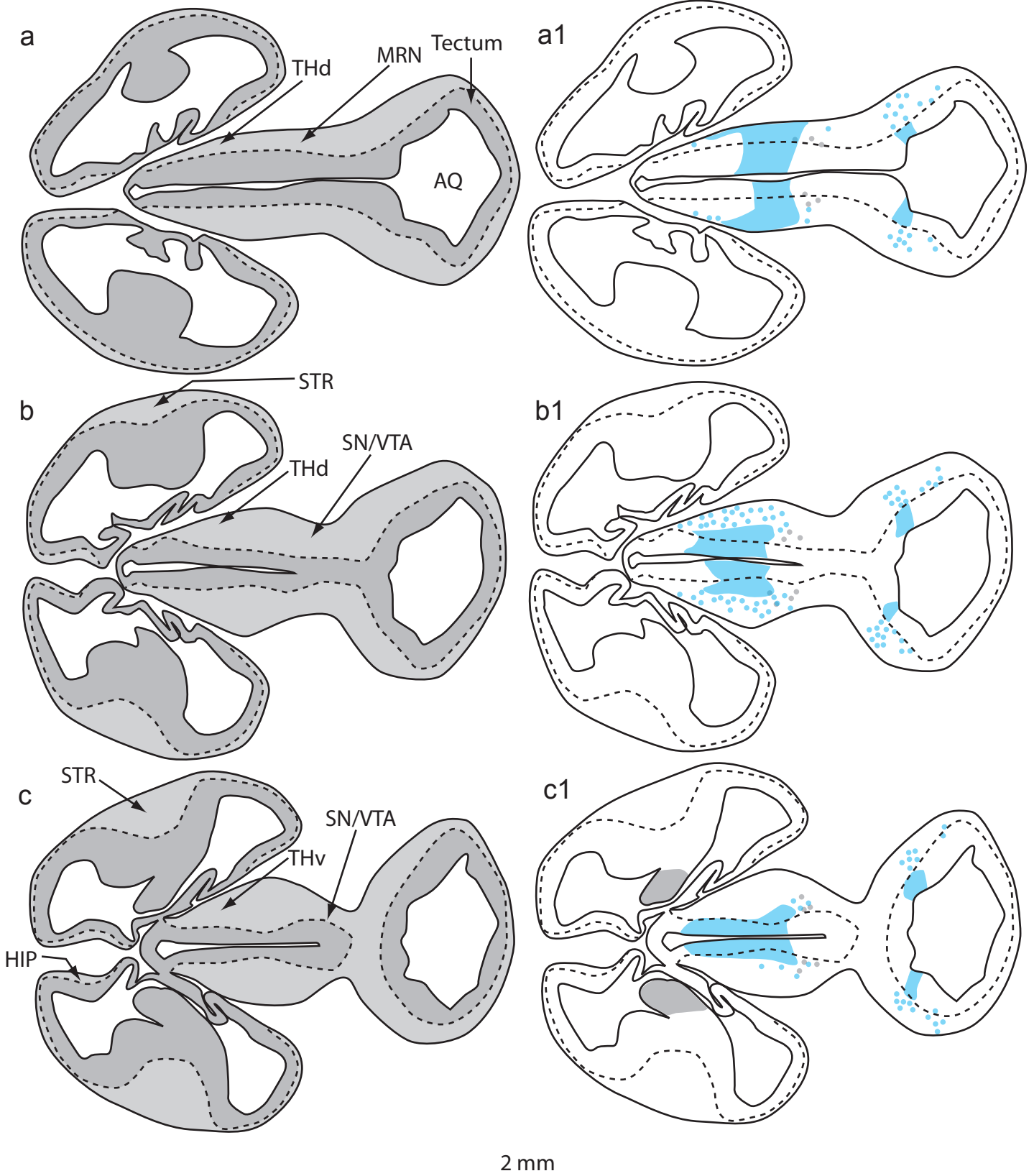


Fig. 29

E14
(E14 54)

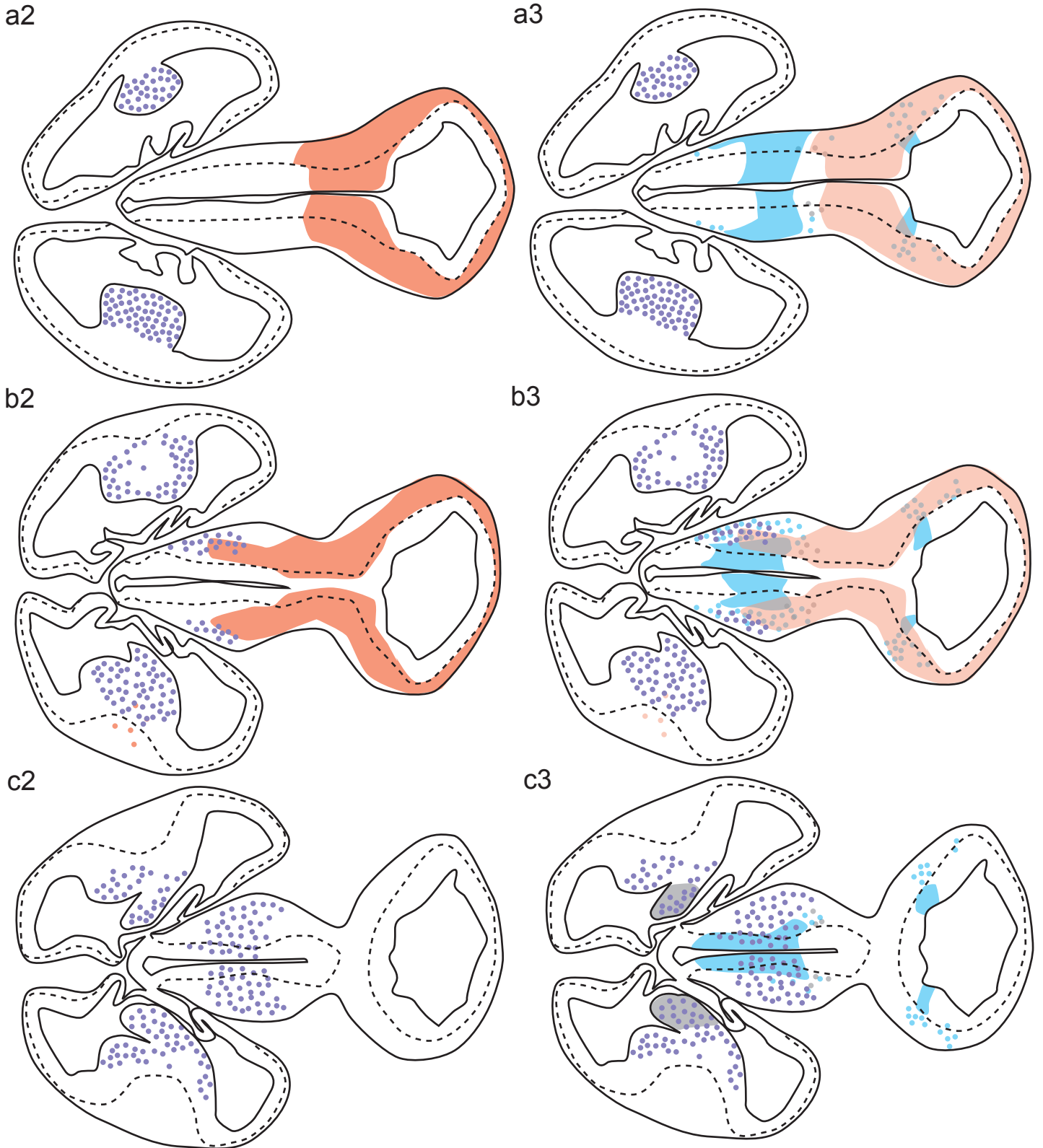


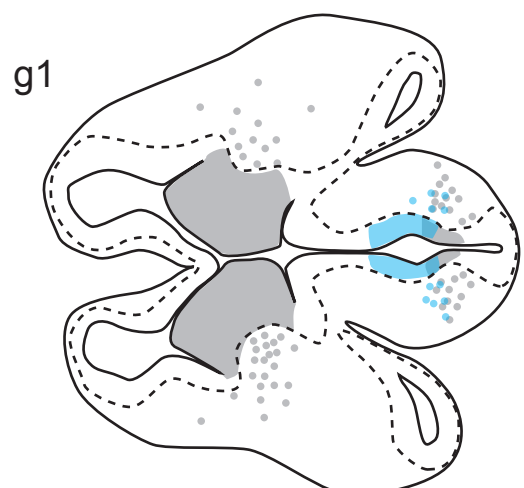
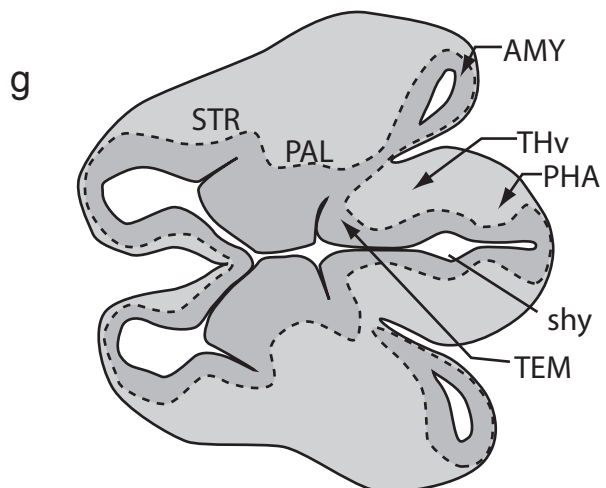
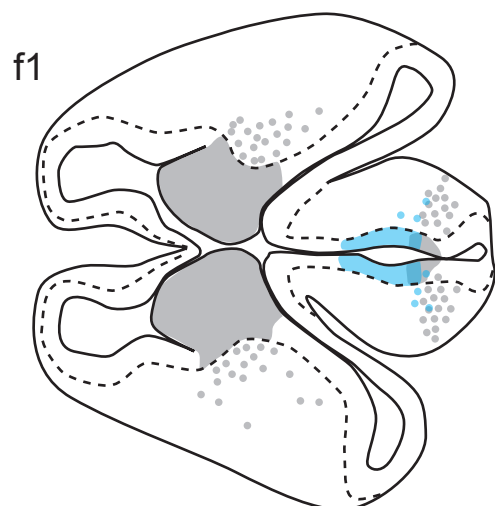
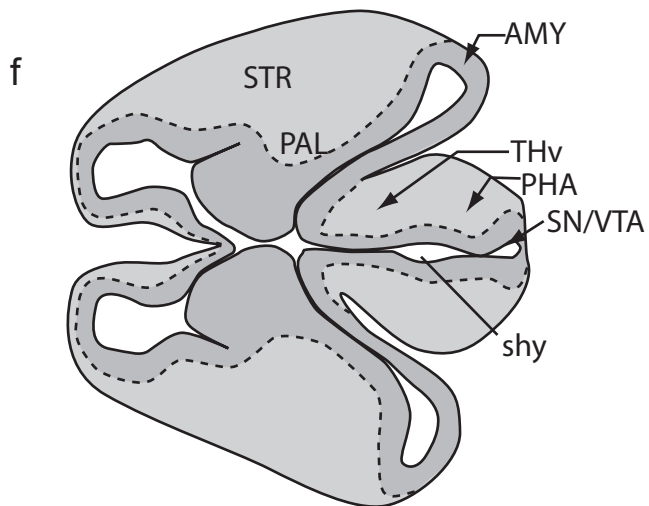
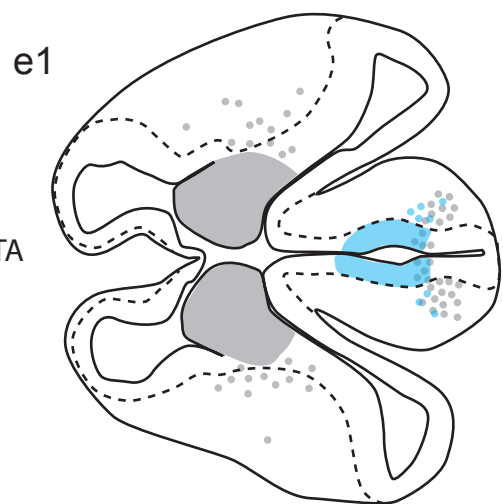
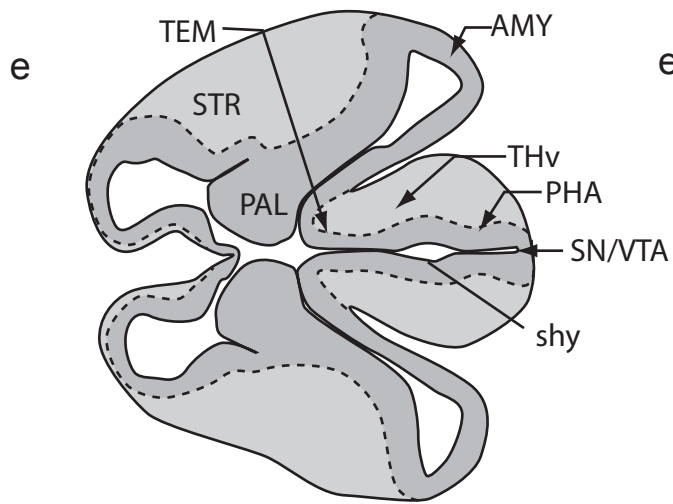
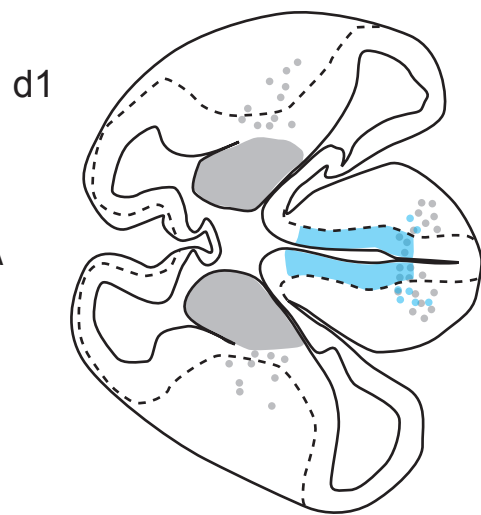
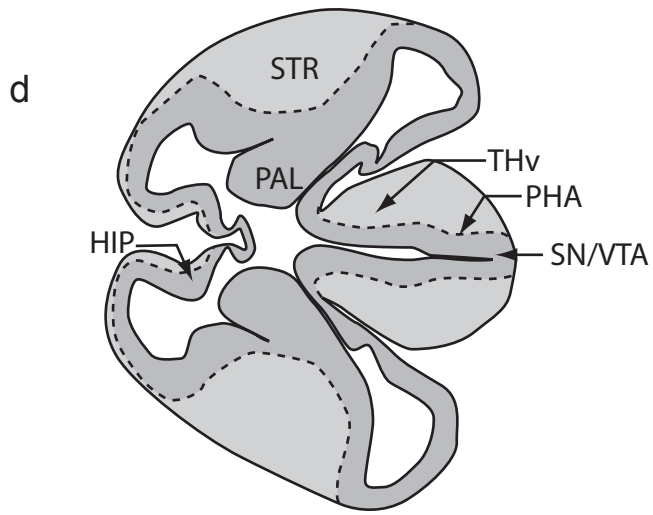
■ Nkx2.1 ■ Nkx2.2



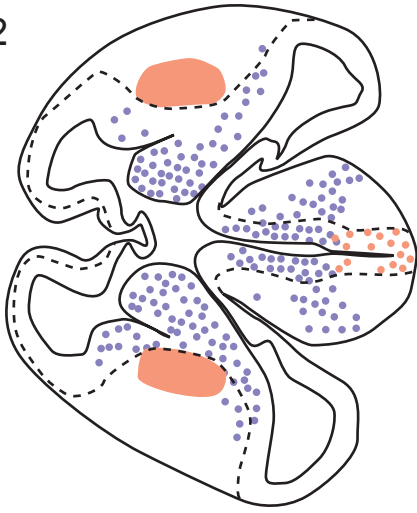
Olf1 Dlx
MCH

Nkx2.1 Nkx2.2
Olf1 Dlx
MCH

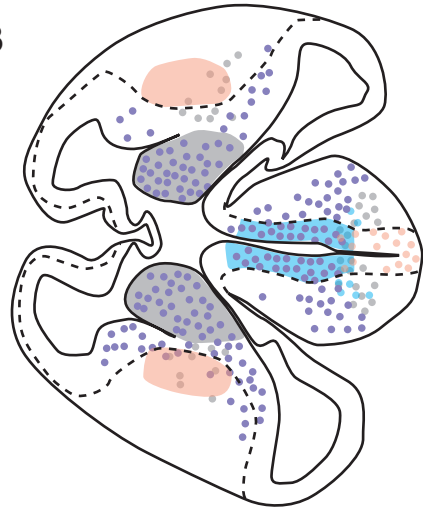




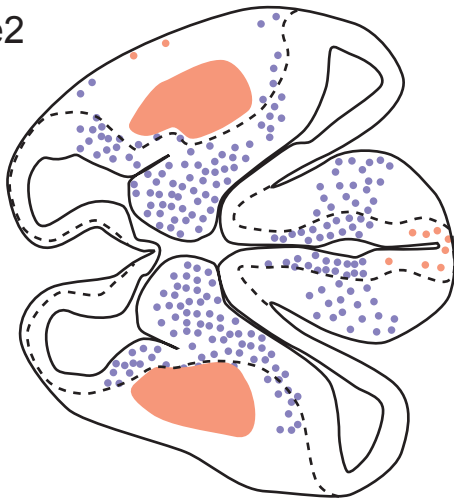
d2



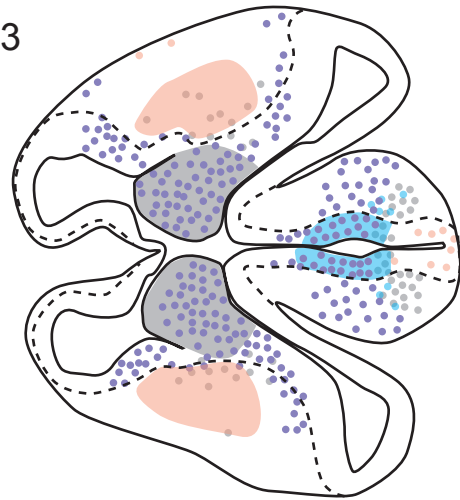
d3



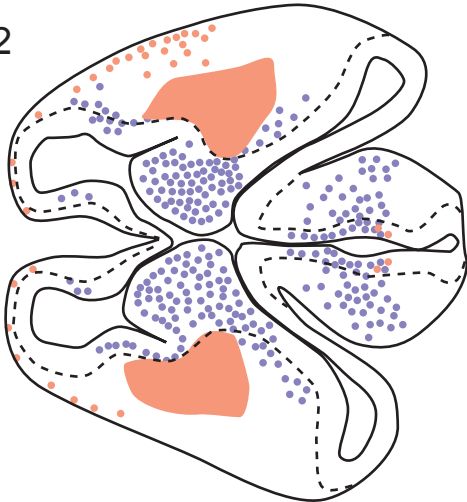
e2



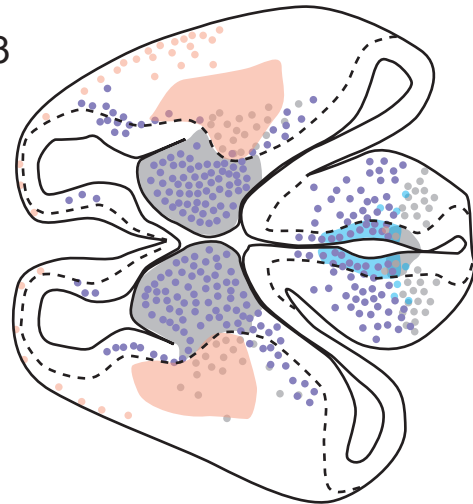
e3



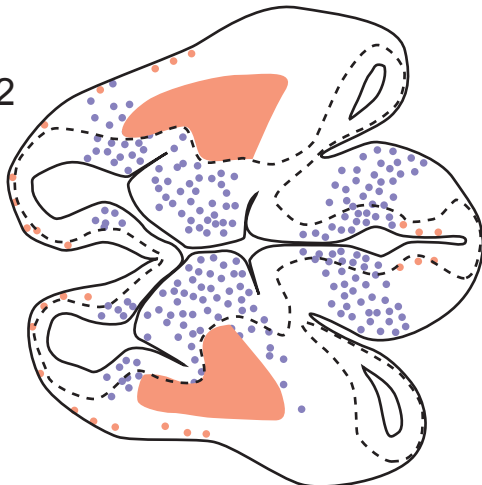
f2



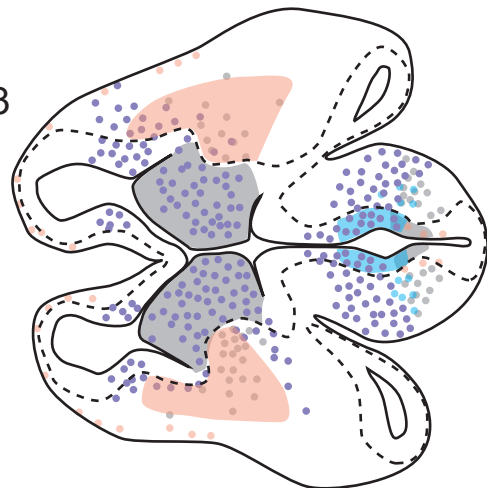
f3

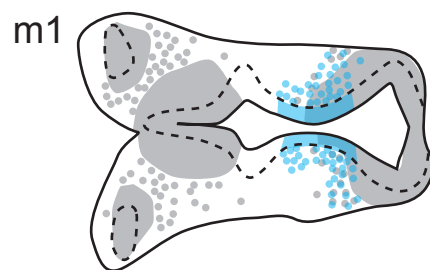
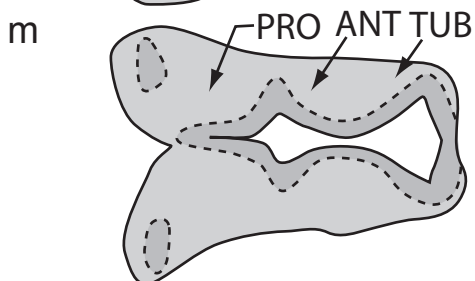
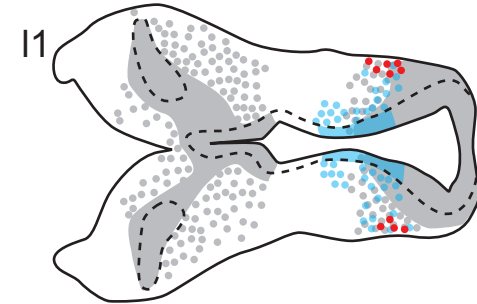
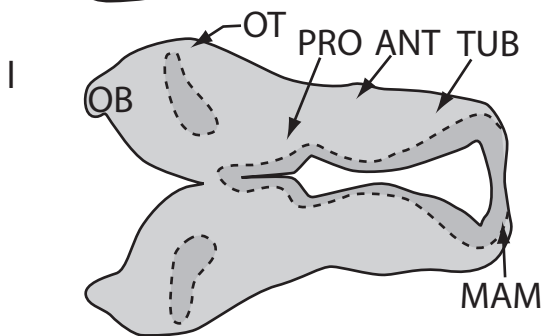
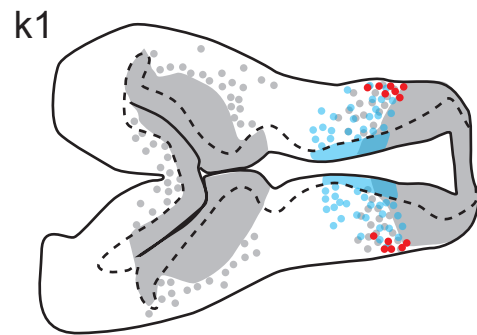
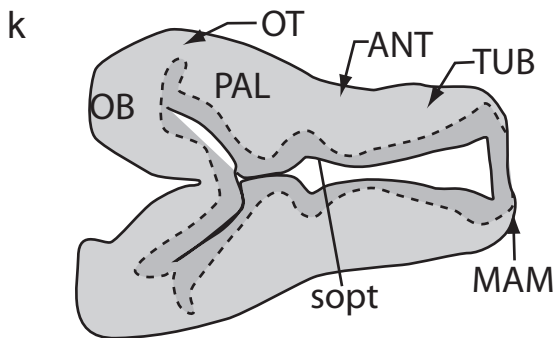
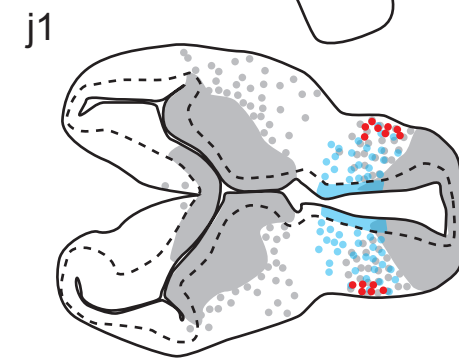
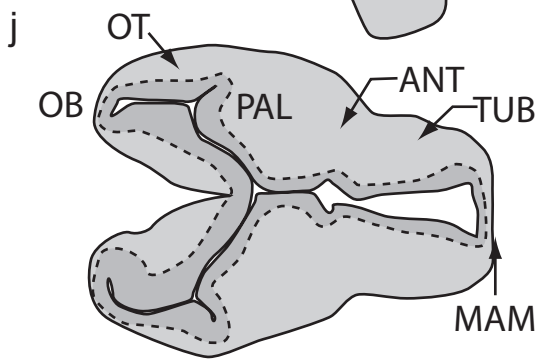
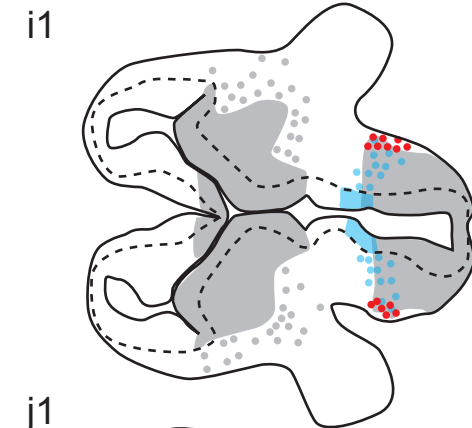
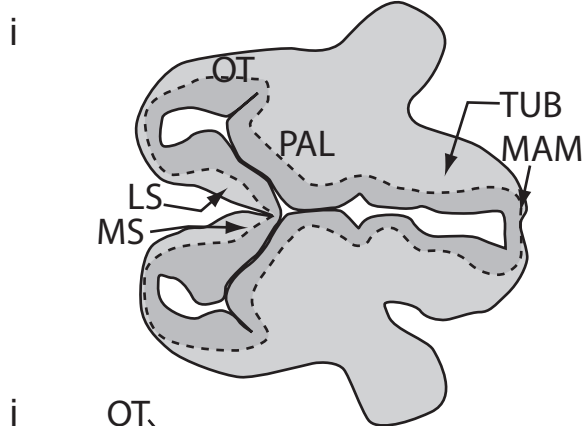
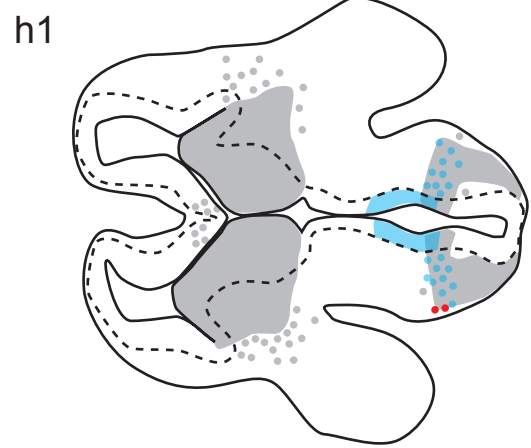
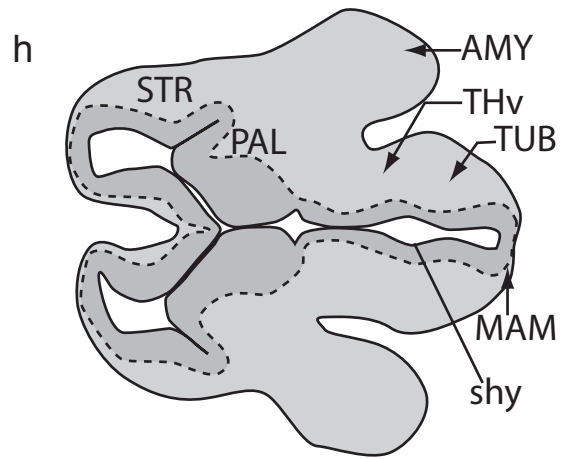


g2

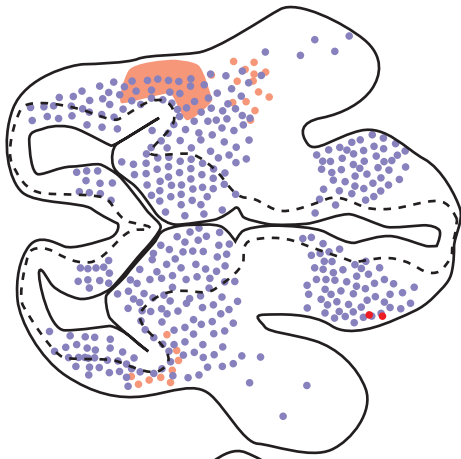


g3

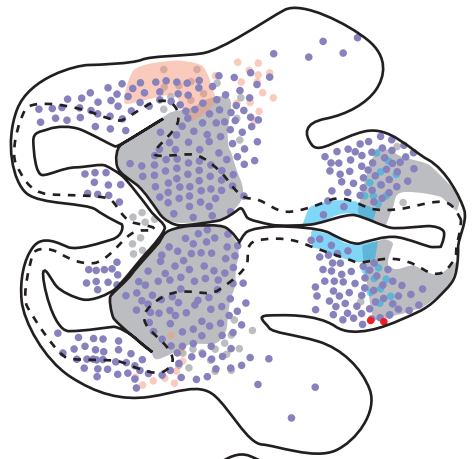




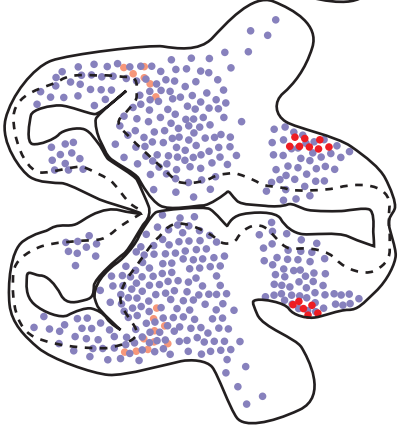
h2



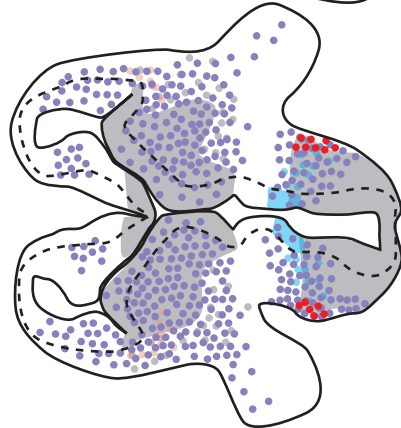
h3



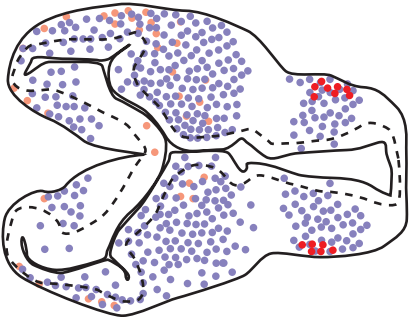
i2



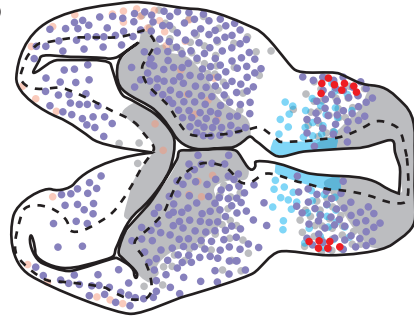
i3



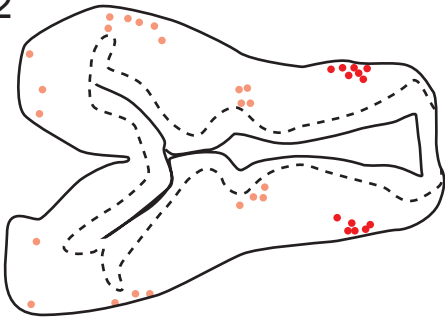
j2



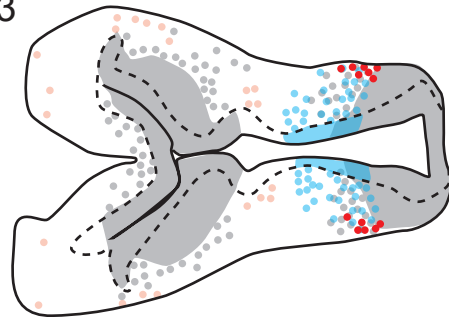
j3



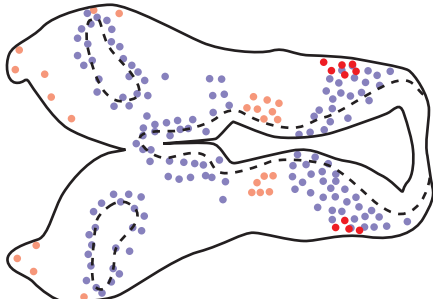
k2



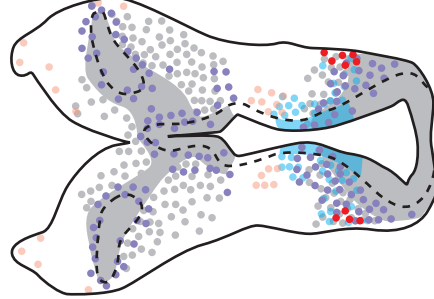
k3



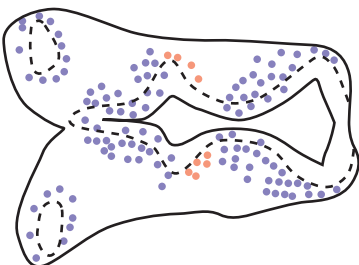
l2



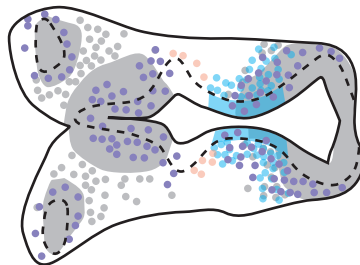
l3

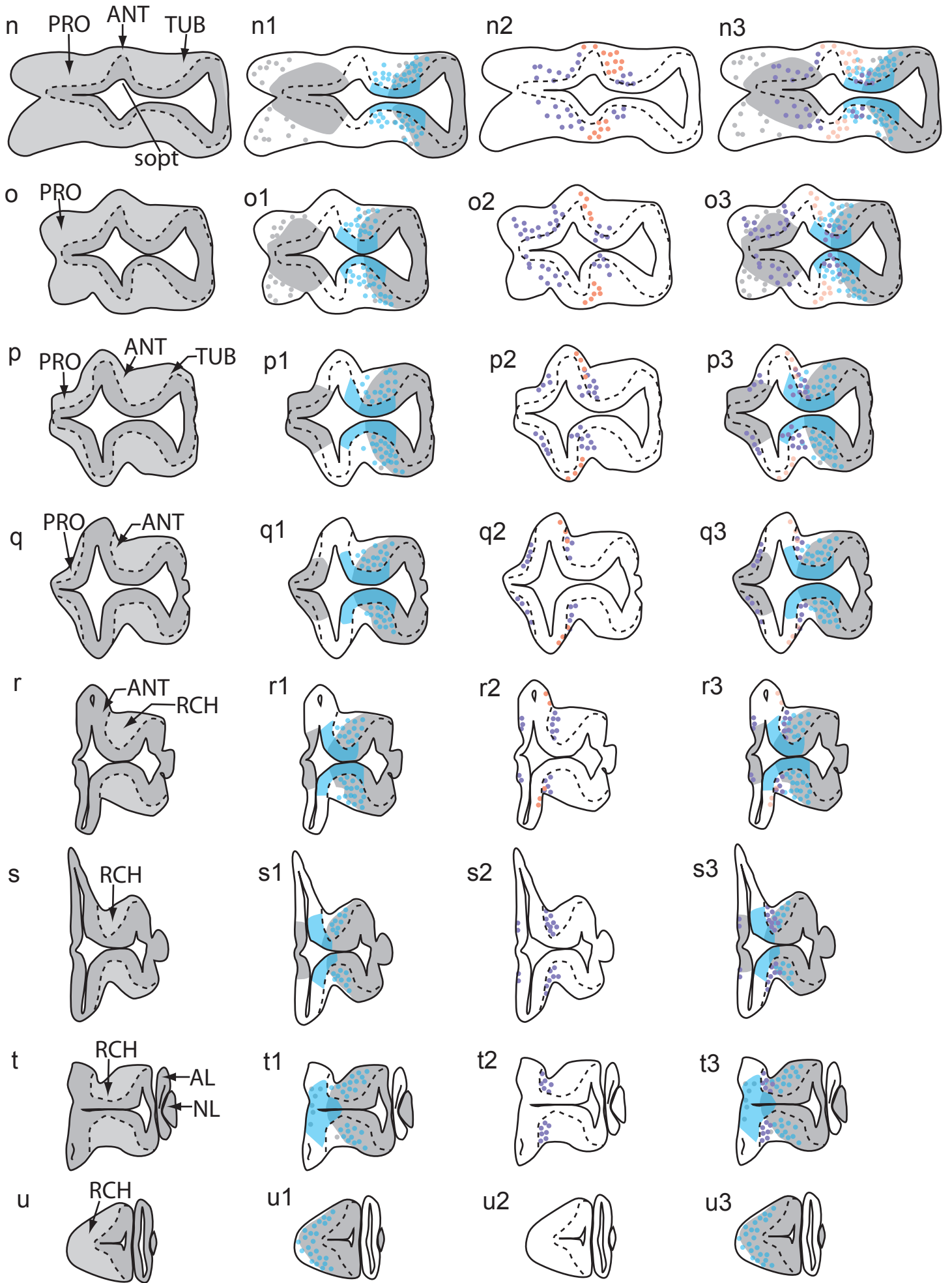


m2



m3





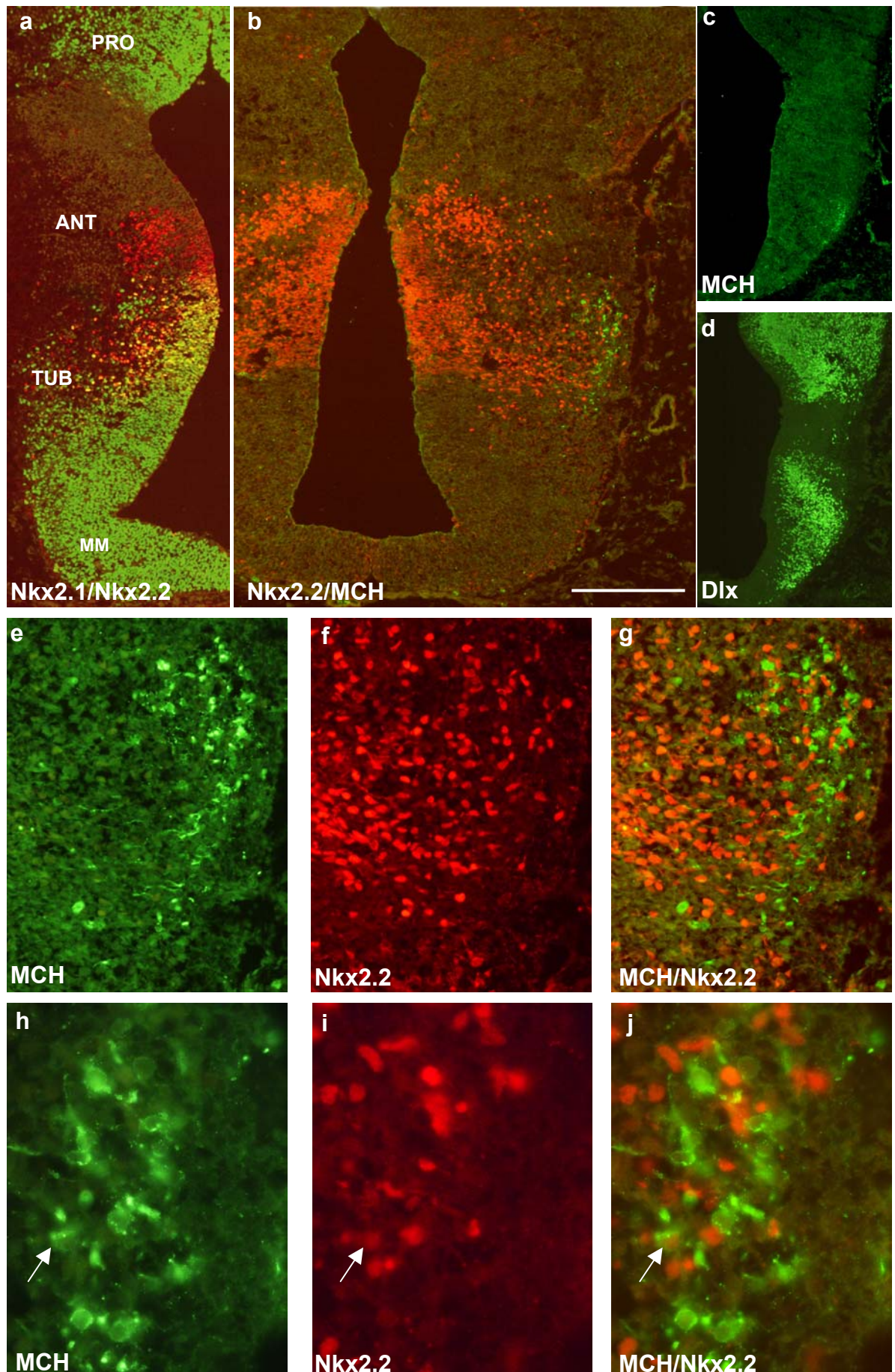


Fig. 30 : Microphotographies de coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E14. **a-d**. Distribution en immunohistochimie de Nkx2.1, Nkx2.2, MCH et Dlx. **e-j**. Doubles marquages immunohistochimiques MCH/Nkx2.2 à fort grossissement. La flèche pointe un péricaryon doublement marqué (**h-j**). Barre d'échelle : (a-b) 1 mm, (c-d) 250 μm, (e-g) 50 μm, (h-j) 30 μm.

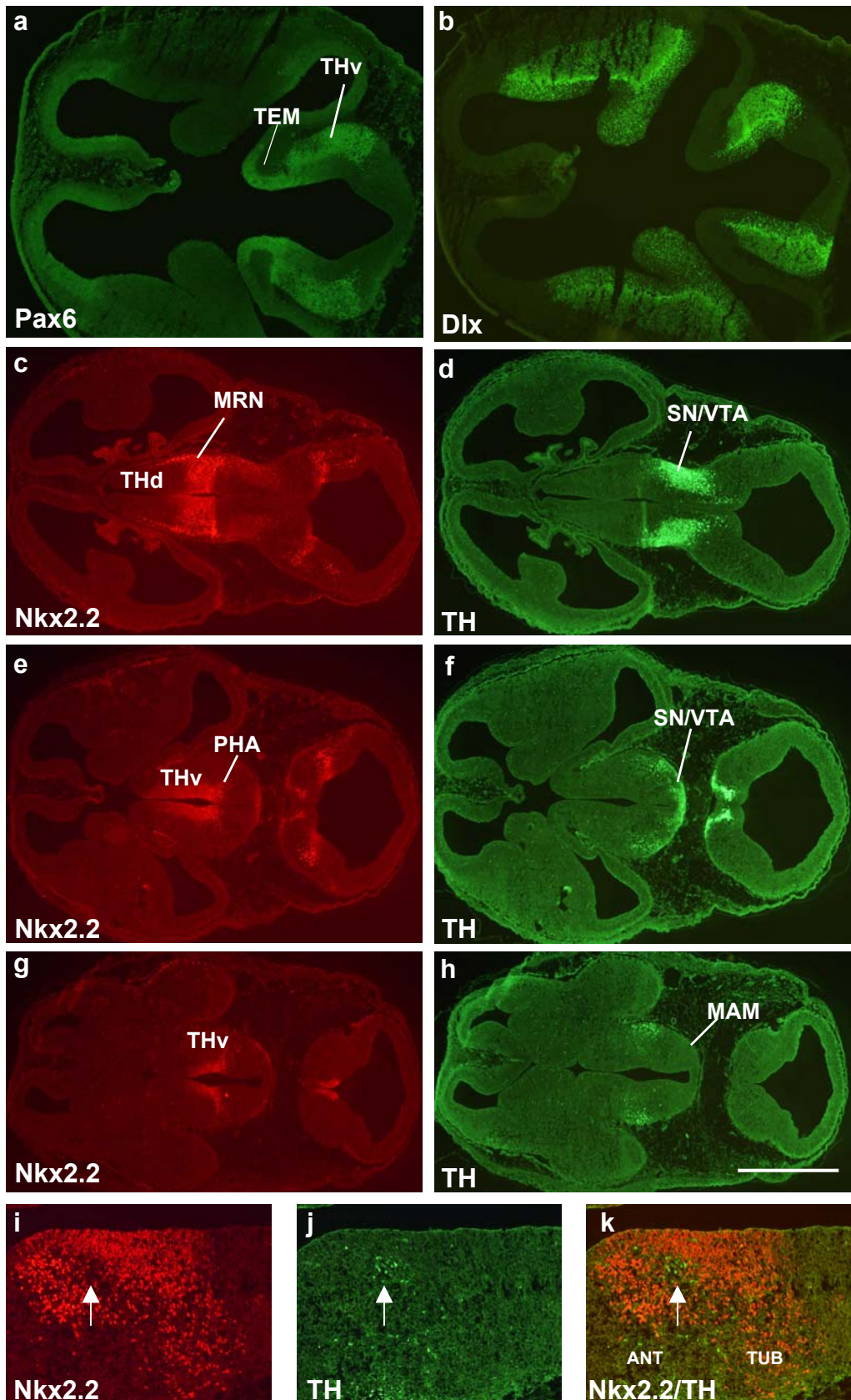


Fig. 31 : Microphotographies de coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E14. **ab**. Distribution de Pax6 et Dlx en immunohistochimie. **c-h**. Distribution de Nkx2.2 et TH en immunohistochimie sur trois coupes organisées du niveau le plus dorsal au niveau le plus ventral (**c-d**, **e-f**, **g-h**). **i-k**. Distribution de Nkx2.2 et TH en immunohistochimie (fort grossissement). Noter que les cellules TH positives sont Nkx2.2 négatives. Barre d'échelle : (a-h) 2 mm, (i-k) 250 μ m.

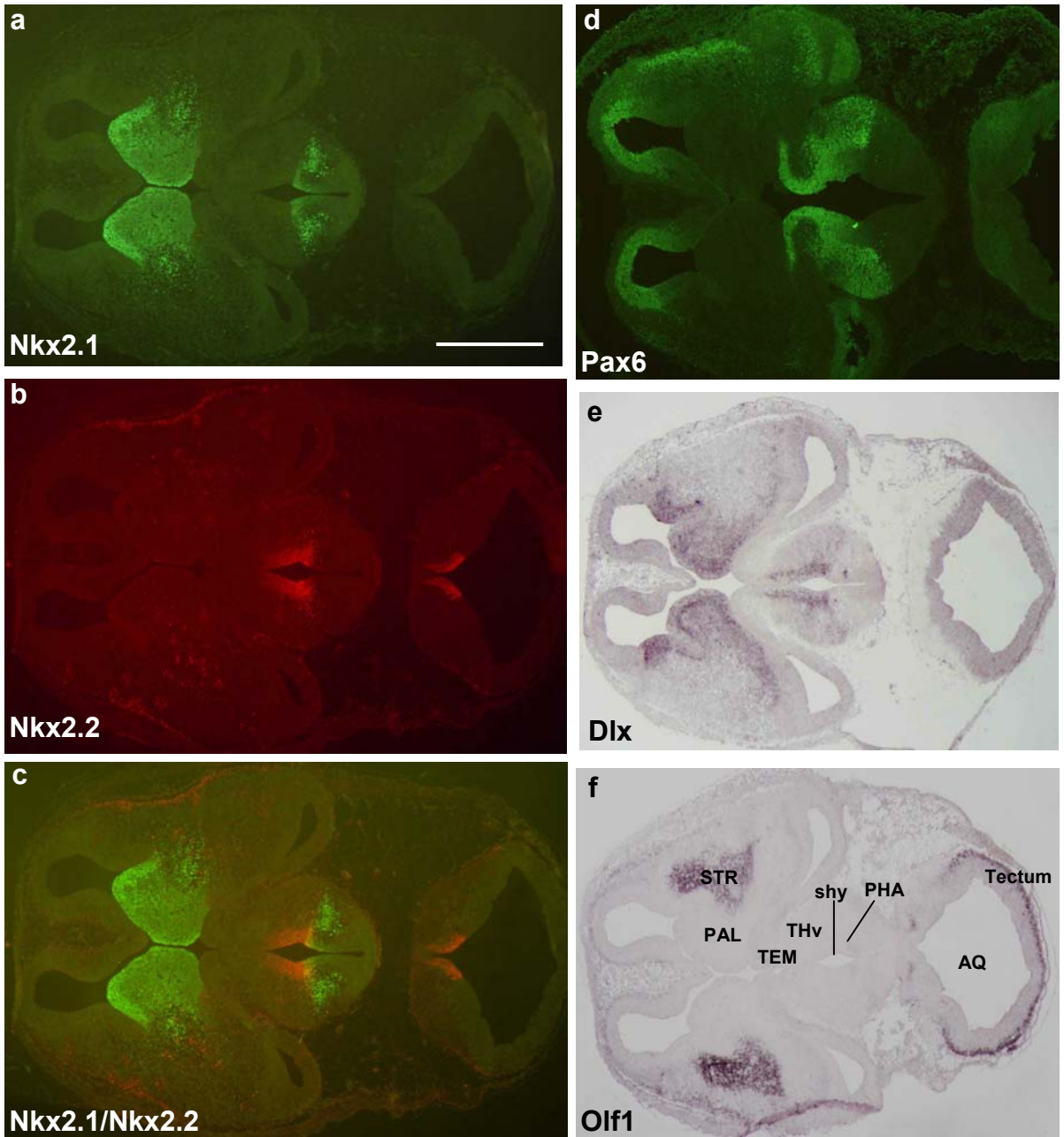


Fig. 32 : Microphotographies de coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E14 illustrant par immunohistochimie la distribution de Nkx2.1, Nkx2.2 et Pax6 (**a-d**) ; et par hybridation *in situ* la distribution de Dlx et Olf1 (**e, f**). Barre d'échelle : 2 mm.

5. Stade embryonnaire E15

Au stade E15, la couche du manteau s'épaissit très nettement et il est désormais possible de caractériser clairement certaines structures (Fig. 33).

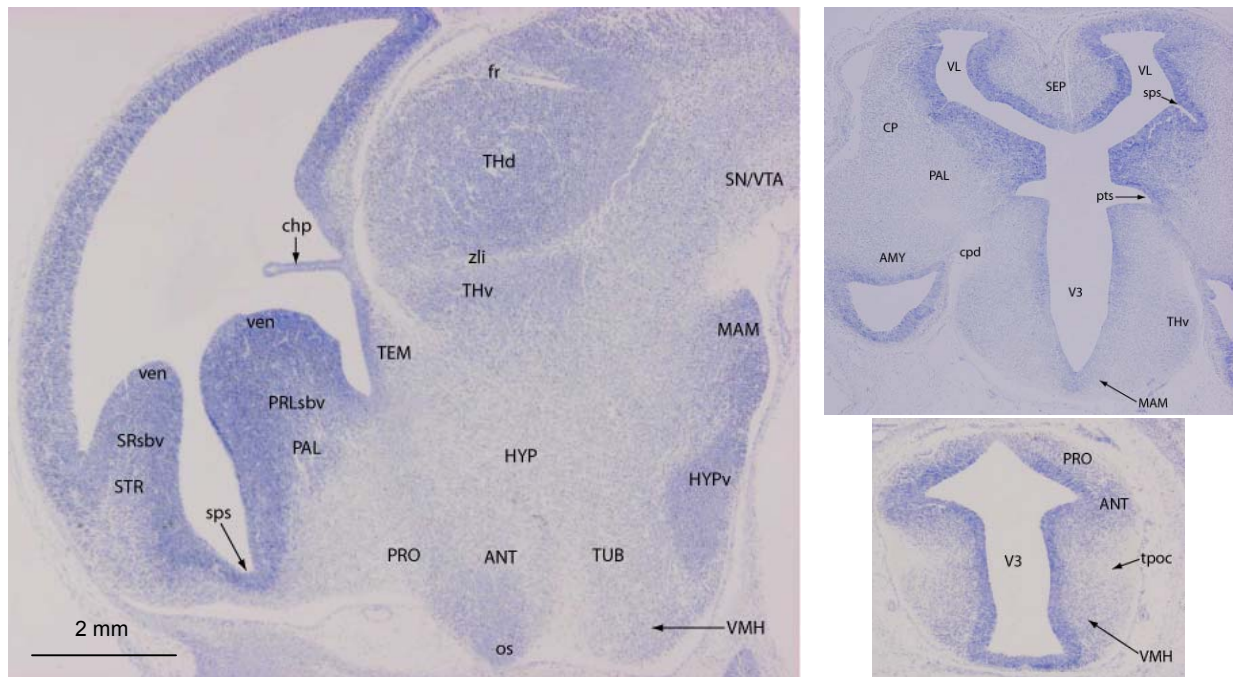


Fig. 33 : Microphotographies de coupes de cerveau d'embryon de rat au stade E15, colorées au bleu de toluidine : une coupe sagittale à gauche et deux coupes horizontales à droite.

Malheureusement, ces premières structures individualisables sont essentiellement localisées dans les territoires postérieurs ou dans le télencéphale ventral et d'après les atlas que nous avons consulté, l'hypothalamus et notamment ses régions ventrales semblent encore mal différenciées d'un point de vue cytoarchitectonique. Seuls certains territoires ventromédiaux semblent contenir une condensation cellulaire un peu plus compacte. Les tractus de fibres sont plus nettement visualisables à ce stade : la capsule interne et le pédoncule cérébral sont notamment bien reconnaissables, le *tpoc* reste le faisceau le plus évident et la mise en évidence du *mfb* nécessite encore l'utilisation de l'anticorps anti-TH.

Expression de Pax6

A E15, la distribution générale de Pax6 est conforme à celle observée aux stades précédents : ainsi une expression très intense de ce gène a été observée dans de très nombreux territoires cérébraux au sein du neuroépithélium germinatif : dans le télencéphale notamment dans le cortex cérébral, dans le thalamus ventral et l'hypothalamus antérieur, jusque dans la tige

optique. Toutefois, l'épaississement du manteau va de pair avec une distribution plus complexe des produits d'expression de ce gène au sein des structures néogénérées. Cependant l'absence quasi totale de différenciation cytoarchitecturale du tissu, notamment hypothalamique, rend une localisation précise du marquage peu aisée. Il est donc parfois difficile d'effectuer une description fine de la distribution du signal Pax6. Notre description restera par conséquent assez générale et nous tenterons dans les paragraphes de synthèse et d'analyse de la distribution TH/MCH de compléter ces informations.

Comme aux stades précédents, le thalamus ventral renferme les neurones les plus intensément immunoréactifs pour Pax6 (fig. 34 a1-f1) : ils forment une masse très compacte dans les amas latéraux précédemment signalés (Fig. 33). Cependant, le marquage observé n'est plus aussi homogène qu'aux stades antérieurs : les masses des fibres de la strie médullaire et de la capsule interne sont certes soulignées par l'expression de Pax6 mais ne renferment pas de cellules exprimant ce facteur de transcription, et les masses cellulaires les plus antérieures (selon nos axes) ne sont plus marquées. En position plus ventrale, comme aux stades précédents, Pax6 n'est pas exprimé dans le manteau de l'hypothalamus sauf dans quelques cellules de l'hypothalamus tubéral dorsal. Par ailleurs, le télencéphale ventral (bulbe olfactif, tubercule olfactif) renferme de nombreuses cellules immunoréactives pour Pax6. Un doute persiste quant à la localisation de cellules situées à la limite entre les territoires préoptiques et les régions postérieures du tubercule olfactif.

Expression de Nkx2.1

Malgré l'épaississement du manteau, contrairement à ce qui a été observé pour Pax6, les domaines d'expression de Nkx2.1 restent relativement stables (Fig. 34). Dans le télencéphale, l'expression de Nkx2.1 persiste au sein du neuroépithélium, de la couche subventriculaire et du manteau du pallidum. Dans le diencéphale, ce facteur de transcription est toujours aussi intensément exprimé dans les régions préoptiques ainsi que dans les régions hypothalamiques ventrales et postérieures. Le seul élément d'incertitude concerne l'étendue de la distribution de ce signal dans les territoires mamillaires, puisque l'immunoréactivité Nkx2.1 ne semble pas s'étendre aux régions mamillaires les plus dorsales.

Expression de Nkx2.2

Nkx2.2 est le premier gène pour lequel nous avons observé une diminution nette de l'intensité du marquage immunohistochimique dans certains territoires du diencéphale, notamment dans le neuroépithélium du thalamus ventral. Ainsi au sein du thalamus ventral, dans les territoires

dorsaux que nous avons assimilés à la *zli*, il reste aisément détectable, mais sur les coupes les plus ventrales, ce signal n'est plus observé que dans une petite région du neuroépithélium de part et d'autre du *sulcus hypothalamicus* (Fig. 34 c2-e2). Dans l'hypothalamus, l'immunoréactivité Nkx2.2 est toujours visualisée, mais semble être d'intensité plus faible qu'aux stades précédents sur tous les embryons analysés. Par contre, nous avons retrouvé un marquage intense de neurones du manteau, qui forment une masse compacte dans l'hypothalamus tubéral ventral (Fig. 34 m2-q2 ; Fig. 35 b). Sur les coupes dorsales au *sulcus opticus*, les cellules Nkx2.2 positives sont moins nombreuses dans le manteau. Deux groupes de cellules s'individualisent. Le premier, plus compact, est situé dans l'hypothalamus antérieur, dans la couche du manteau, à proximité de la couche ventriculaire. Le second occupe une bande de tissu similaire à celle décrite aux stades précédents, en situation postérieure. Au sein de cette bande, les neurones marqués sont plus abondants à proximité de la couche ventriculaire et plus dispersés dans les aires latérales ; et le marquage se poursuit sur les coupes plus dorsales dans des territoires que nous avons assimilés à l'hypothalamus postérieur.

Expression de Dlx

Dlx est très abondamment exprimé dans tout le télencéphale basal : le territoire d'expression de Dlx inclut la couche ventriculaire, la zone subventriculaire et le manteau du pallidum et du striatum, le noyau latéral du septum. Dans le diencéphale, nous avons observé un signal Dlx tout aussi intense, essentiellement dans le manteau d'une vaste portion postérieure du thalamus ventral, puis dans l'hypothalamus dorsal. Ce marquage s'estompe graduellement dans les régions hypothalamiques les plus ventrales, il s'étend au tubercule olfactif et aux régions hypothalamiques préoptiques.

Expression de Olf1

A E15, le signal le plus abondant, obtenu par hybridation *in situ* ou par immunohistochimie, est observé dans le tectum (Fig. 34 a3) et le thalamus dorsal. Le signal semble s'étendre au tegmentum ventral notamment à la SN/VTA présomptive dans la couche germinative. Le manteau du striatum exhibe un marquage d'intensité équivalente. Dans l'hypothalamus, nous avons observé une zone située latéralement par rapport au *sulcus opticus*, adjacente à la zone subventriculaire et qui présente un signal Olf1 modéré au sein du manteau de l'hypothalamus antérieur (Fig. 34 h3-o3 ; Fig 35e). Dans l'hypothalamus postérieur, sur les coupes les plus dorsales, nous avons visualisé un marquage d'intensité modérée voire faible, notamment dans

les régions mamillaires. Enfin sur certaines coupes, nous suspectons la présence d'un marquage dans certaines régions du thalamus ventral telle que l'*eminentia thalami*.

Synthèse des observations au stade E15

A E15, de nombreuses observations effectuées à E14 sont toujours valables. Par conséquent, nous n'insisterons que sur quelques points très précis.

L'expression de Nkx2.2 constitue un élément essentiel puisque nous avons observé une diminution franche de l'expression de ce facteur de transcription dans le neuroépithélium germinatif du thalamus ventral. Par contre, ce gène est très fortement exprimé avec Nkx2.1 dans un groupe de neurones formant une masse compacte dans les régions hypothalamiques ventromédianes (Fig. 35 a-c). Par ailleurs, l'analyse comparée de la distribution de nos différents gènes d'intérêt conduit aux constatations exposées ci-dessous. Les régions mamillaires sont Nkx2.1 et au moins partiellement Olf1 positives. Les régions tubérales sont immunoréactives pour Nkx2.1 et Nkx2.2, les aires tubérales plus dorsales exprimant également Dlx. Au sein de l'hypothalamus antérieur, Pax6 est exprimé dans le neuroépithélium germinatif (Fig. 35 d), et des groupes de cellules Olf1 positives latéralement au marquage Pax6 (Fig. 35 e) et Nkx2.2 positives (Fig. 35 b) sont très nettement distinctes dans le manteau. Les territoires préoptiques coexpriment Nkx2.1 et Dlx, toujours de façon similaire aux territoires du globus pallidus adjacent. Notons enfin une coexpression très intense de Olf1 et de Dlx dans les régions du striatum (au moins dans le striatum dorsal).

Confrontation de la distribution des péricaryons et des fibres MCH aux territoires d'expression des différents gènes d'intérêt et de TH

A E15, les neurones à MCH sont abondants, ils forment un groupe de forme ovoïde et ils se distribuent, sur coupe sagittale, entre les régions mamillaires et les formations hypothalamiques ventromédianes, dans les régions tubérales dorsales. L'observation de la distribution de ces neurones corrobore les descriptions de Brischoux et collaborateurs en 2001 : en effet, les neurones à MCH sont localisés dans les territoires hypothalamiques latéraux, certains sont également visibles en situation plus médiane. La confrontation de la distribution des neurones à MCH à celles des différents facteurs de transcription montre que, comme au stade précédent, les neurones à MCH se distribuent dans la bande de tissu coexprimant Nkx2.2 (Fig. 36 a), Nkx2.1 et Dlx. Cependant tous ces facteurs de transcription sont exprimés plus intensément dans les cellules proches du troisième ventricule, alors que les neurones à MCH sont plus abondants dans les régions latérales du manteau. Les expériences

de double marquage immunohistochimique révèlent que les cellules coexprimant MCH et Nkx2.2 sont rares. Par contre, en combinant la détection de Dlx par hybridation *in situ* et de MCH par immunohistochimie, nous avons constaté que les neurones coexprimant ces deux molécules étaient plus nombreux (Fig. 36 b-c), toutefois tous les neurones à MCH n'étaient pas Dlx positifs, et inversement (de nombreuses cellules Dlx positives n'étaient pas MCH positives). La confrontation de la distribution des neurones à MCH à celle des cellules TH positives montre que les cellules dopaminergiques du thalamus ventral (A13) et de l'hypothalamus antérieur sont localisées en avant des neurones à MCH (Fig. 37 d ; Fig. 38). Notons que ces cellules dopaminergiques du thalamus ventral (Fig. 37 d) et de l'hypothalamus forment des petits groupes compacts, situés pour les derniers entre les formations des neurones Nkx2.2 positifs (Fig. 37 g ; Fig. 38 a-c). A E15, les fibres nigrostriées et mésotélencéphaliques constituent un tractus très net en provenance du tegmentum ventral et se dirigeant vers le télencéphale. Elles passent latéralement au territoire Nkx2.2 positif du thalamus ventral et de l'hypothalamus tubéral dorsal (Fig. 37 ; Fig. 38 d-f). La confrontation de la distribution des neurones à MCH à celle des fibres TH positives montre que les neurones à MCH sont localisés dans le coude que forment ces fibres quand elles prennent la direction du télencéphale (Fig. 38 g-h). Les projections MCH restent peu nombreuses, elles se dirigent toutes vers les territoires postérieurs, et sont observées comme à E14 dans le *mfb* présomptif.

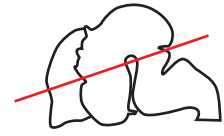
Fig. 34 : Distribution de l'expression en immunohistochimie de MCH, Pax6, Nkx2.1, Nkx2.2 et en hybridation *in situ* de Olf1 sur des dessins réalisés à partir de coupes histologiques horizontales de cerveau passant par le diencephale chez le rat au stade embryonnaire E15 (E15 22) et organisés du niveau le plus dorsal (**a**) au niveau le plus ventral (**r**).

Fig. 37 : Distribution de l'expression en immunohistochimie de MCH, TH et Nkx2.2 sur des dessins réalisés à partir de coupes histologiques horizontales de cerveau passant par le diencephale chez le rat au stade embryonnaire E15 (E15 26) et organisés du niveau le plus dorsal (**a**) au niveau le plus ventral (**q**).

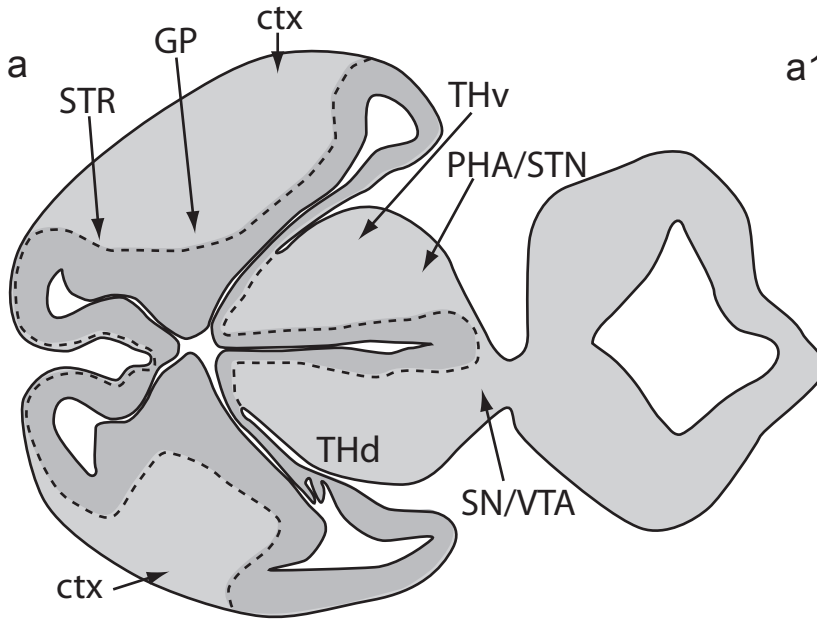
Fig. 34

E15

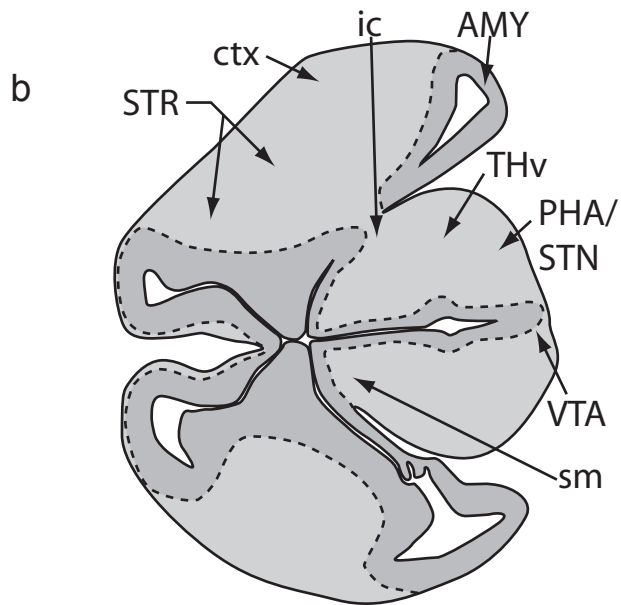
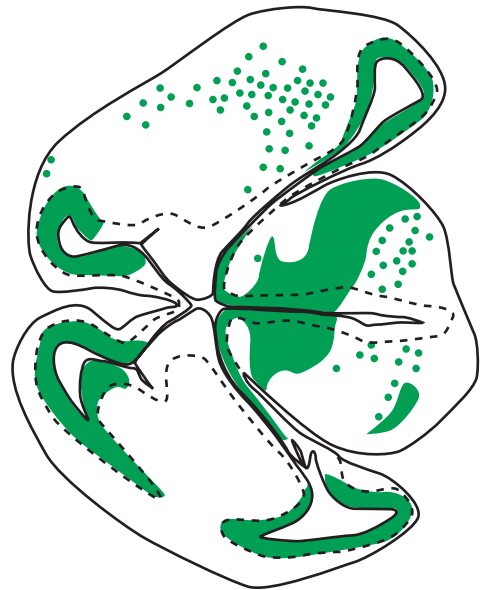
(E15 22)



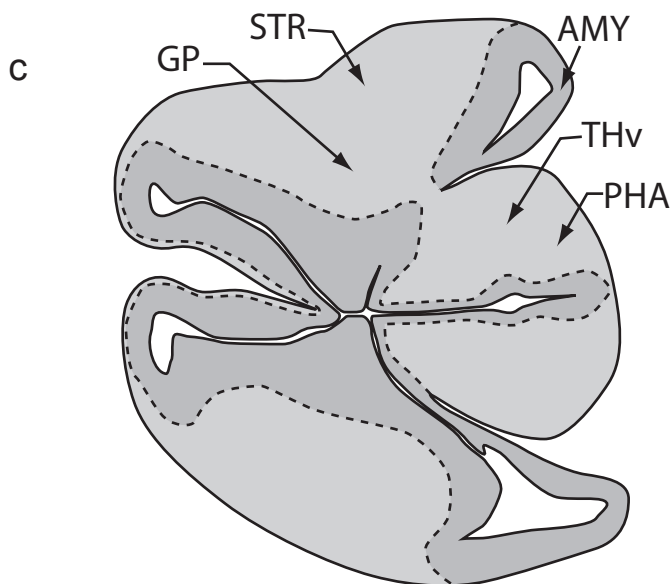
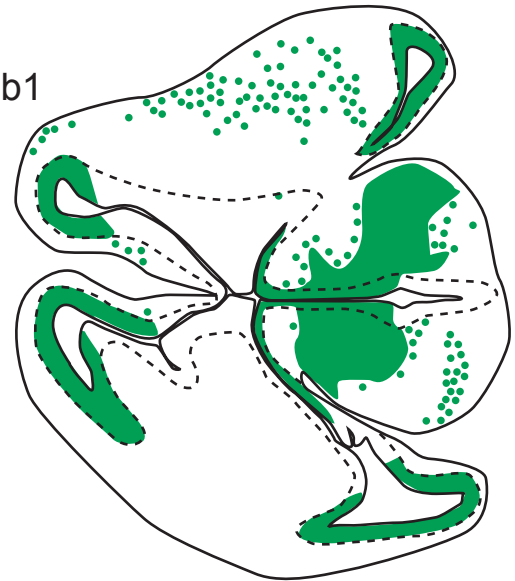
■ Pax6 ■ MCH



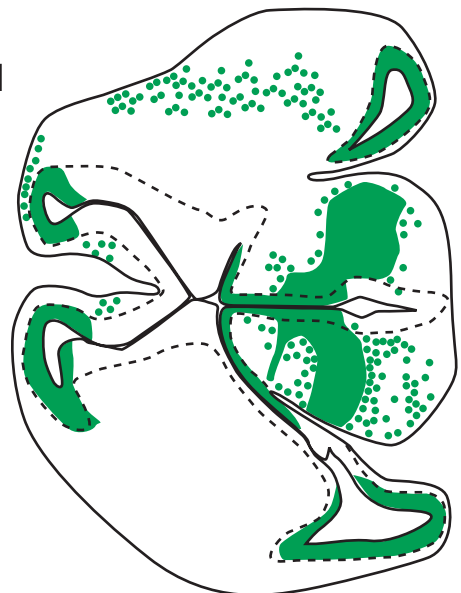
a1



b1



c1

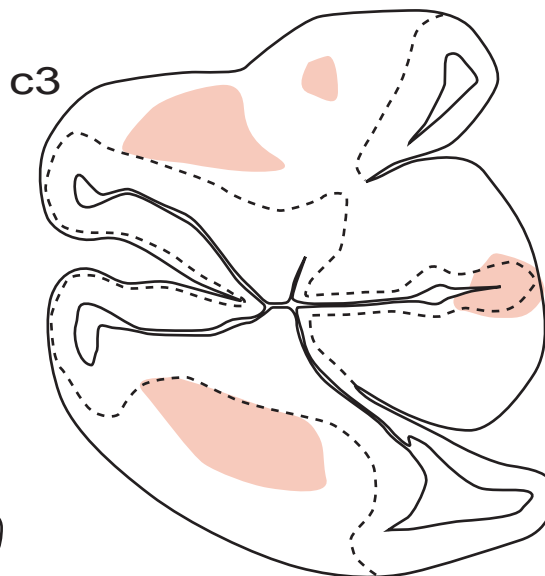
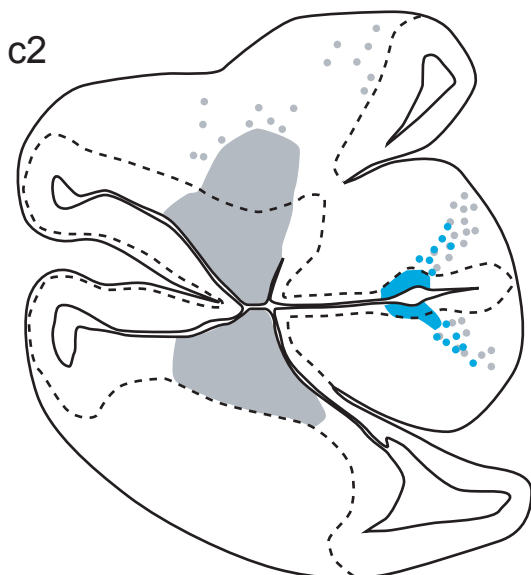
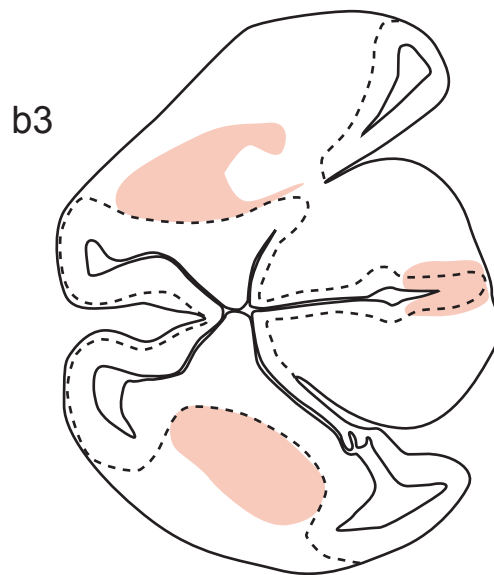
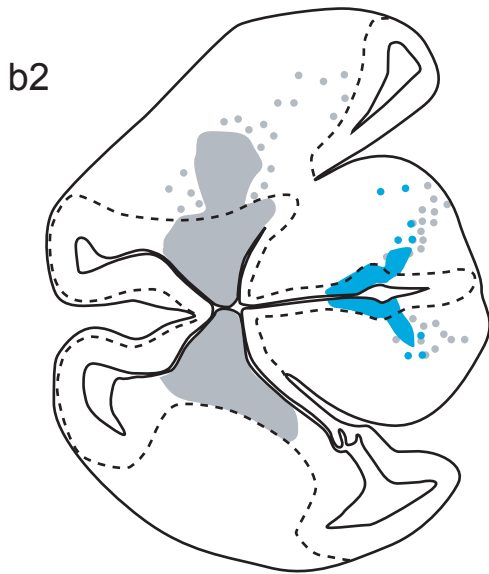
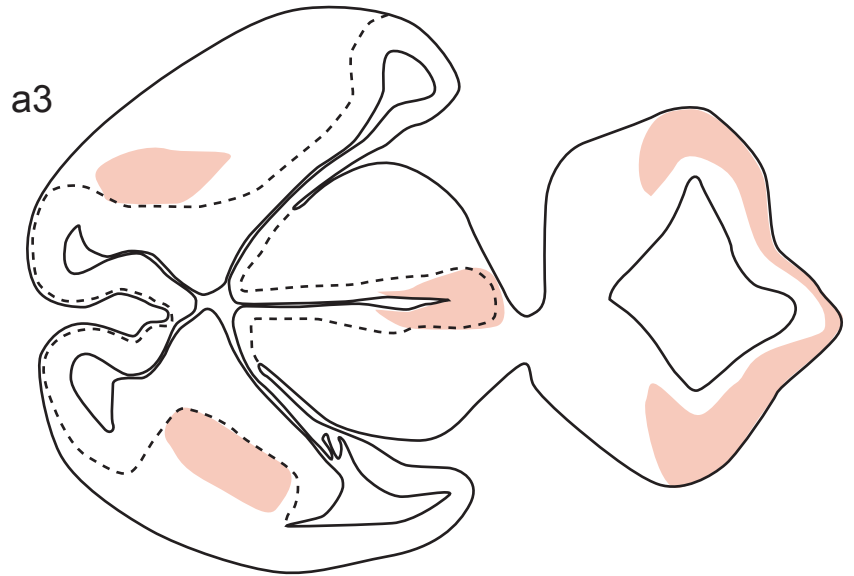
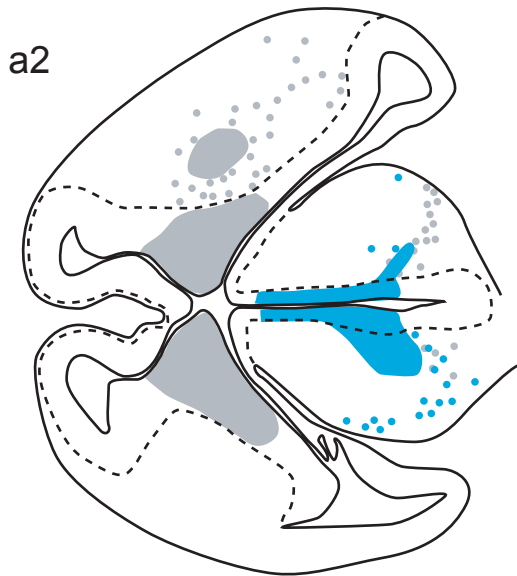


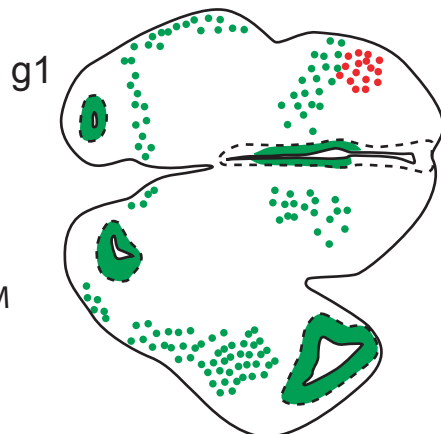
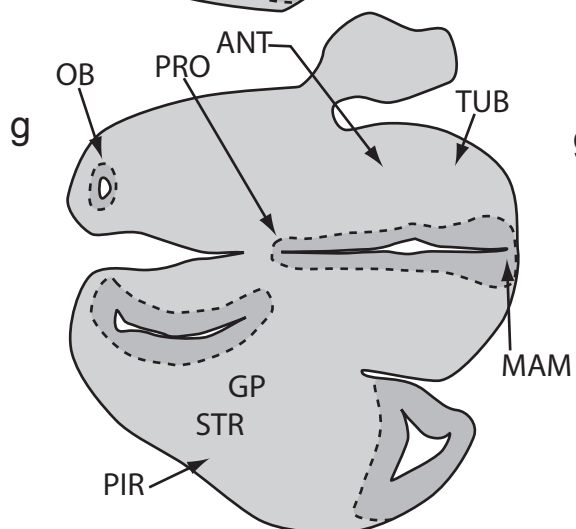
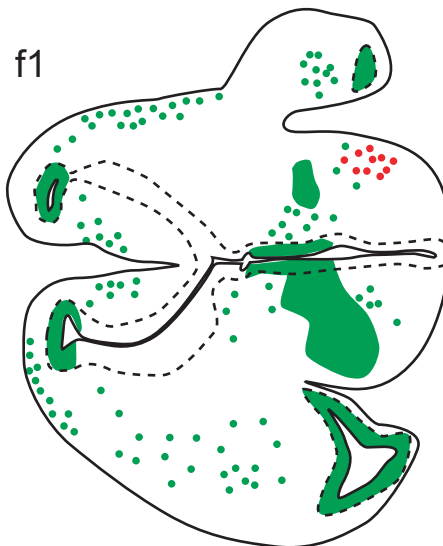
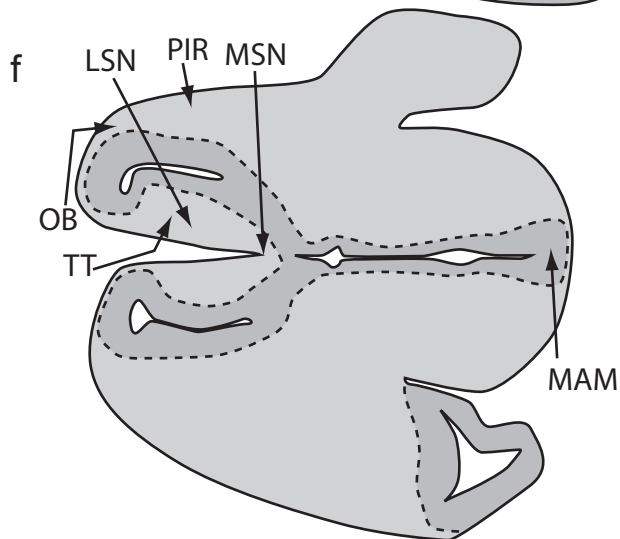
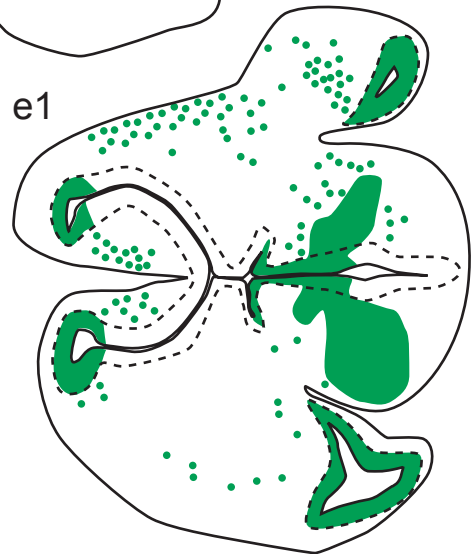
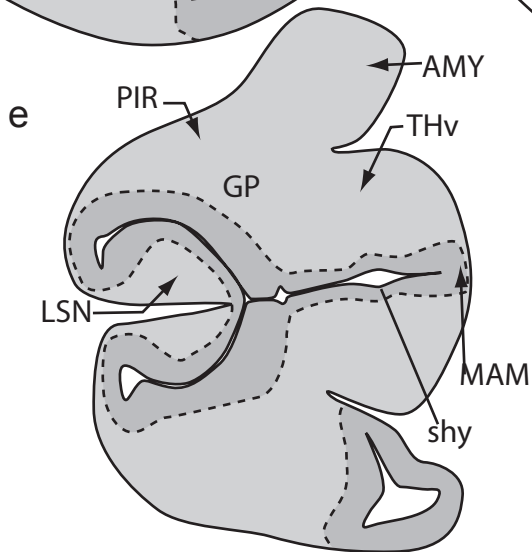
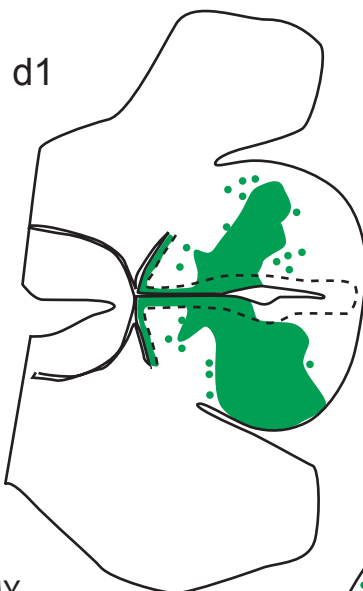
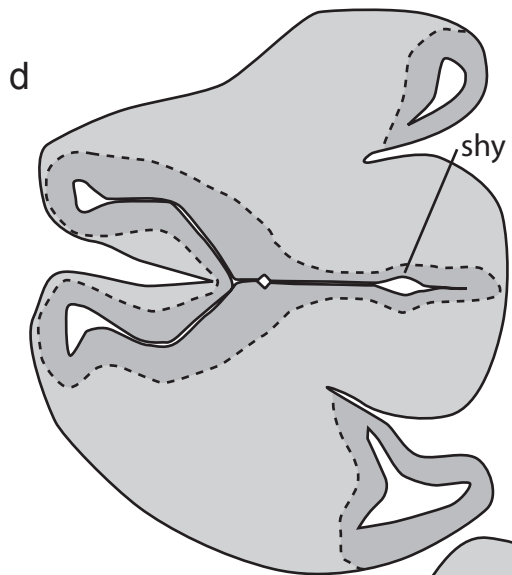
2mm

■ Nkx2.1 ■ Nkx2.2

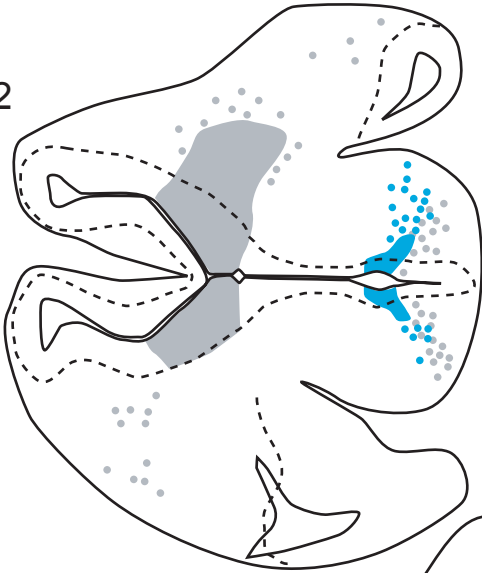
■ Olf1 ■ MCH

■ MCH

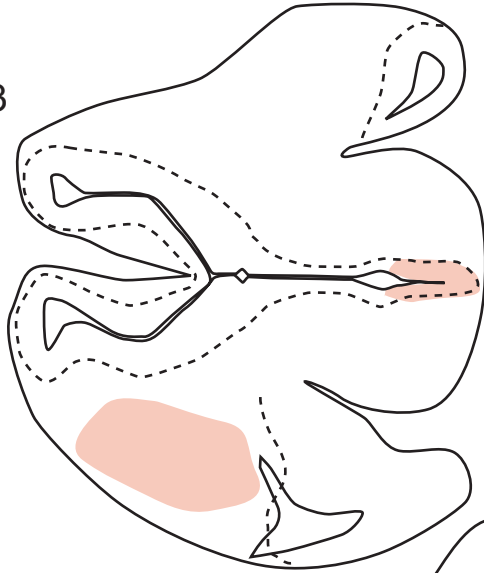




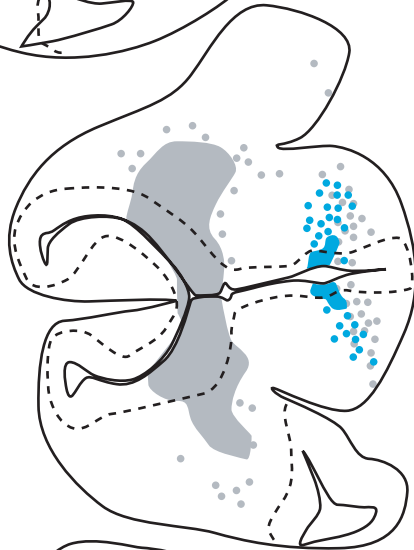
d2



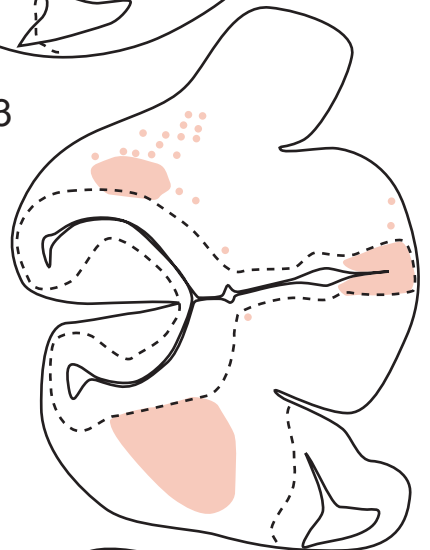
d3



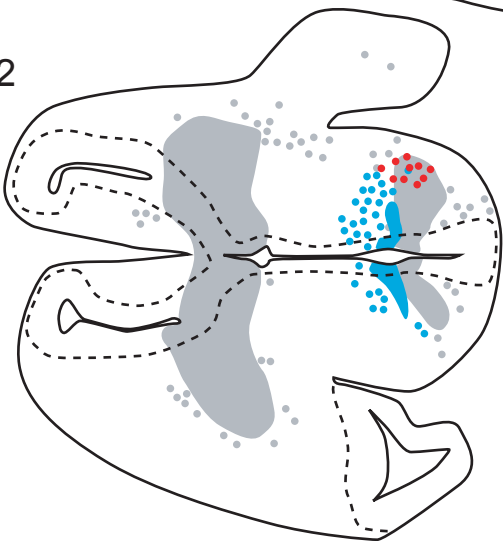
e2



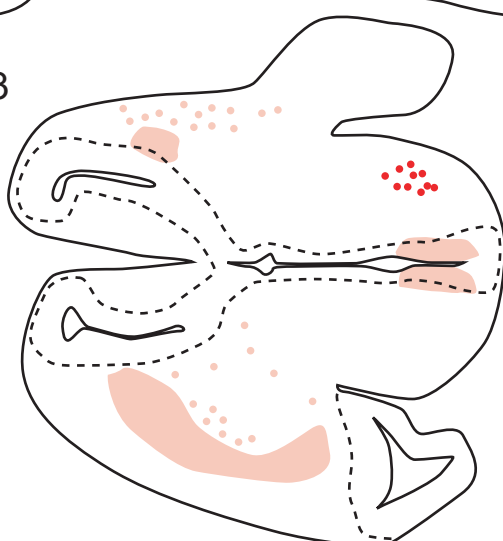
e3



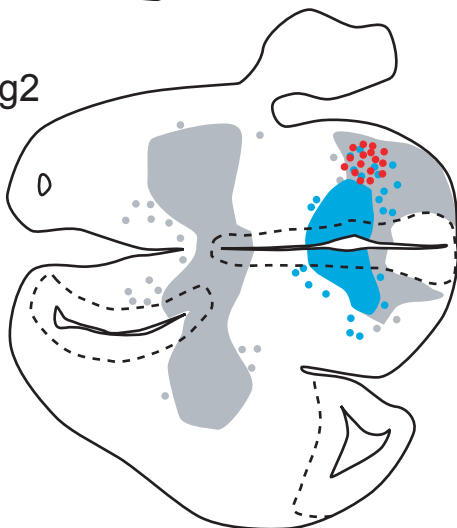
f2



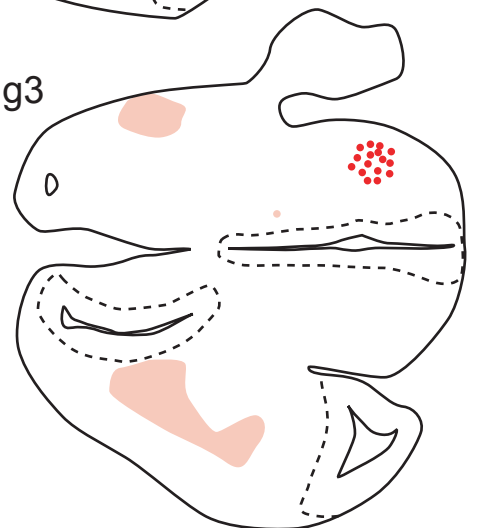
f3

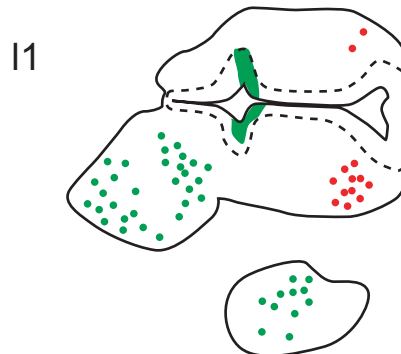
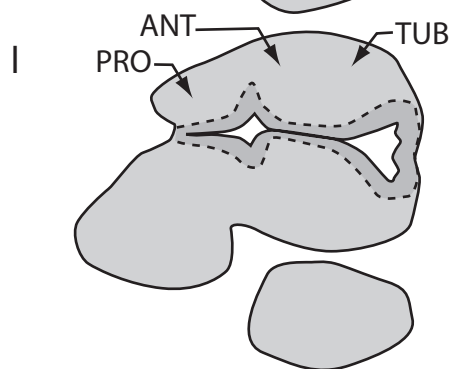
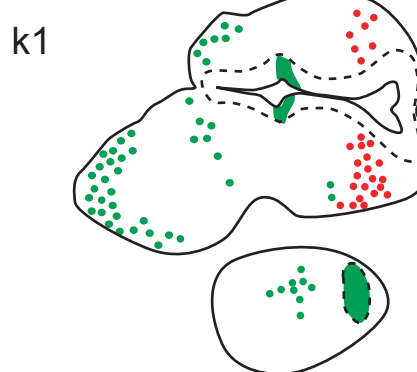
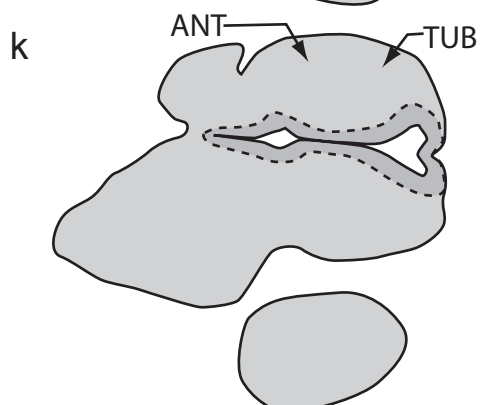
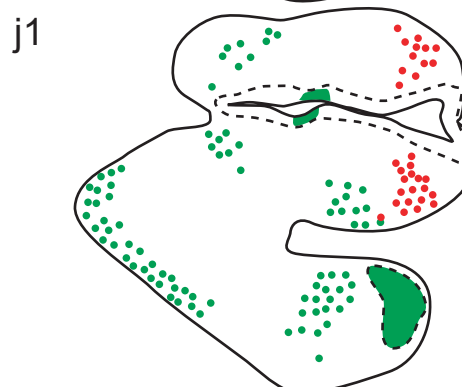
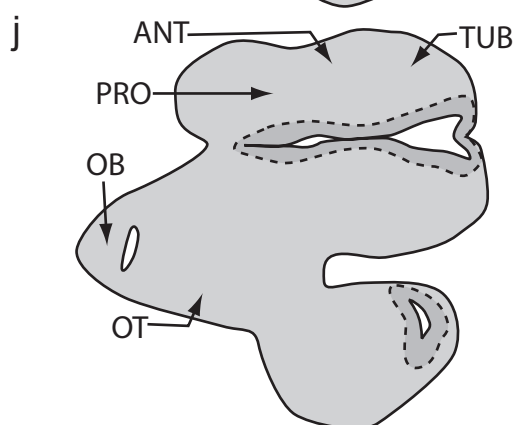
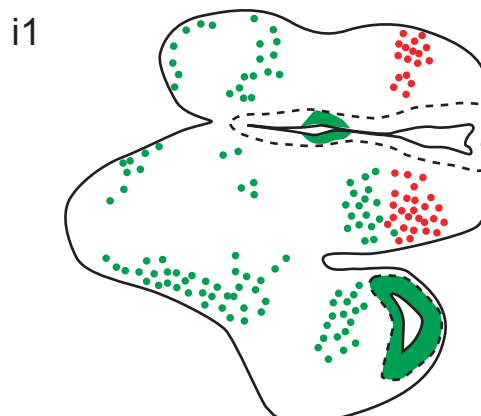
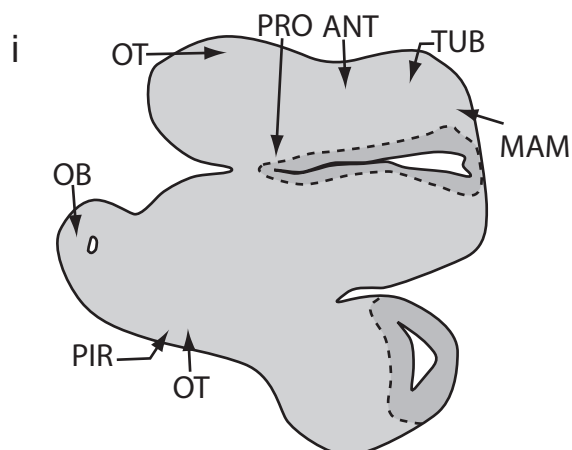
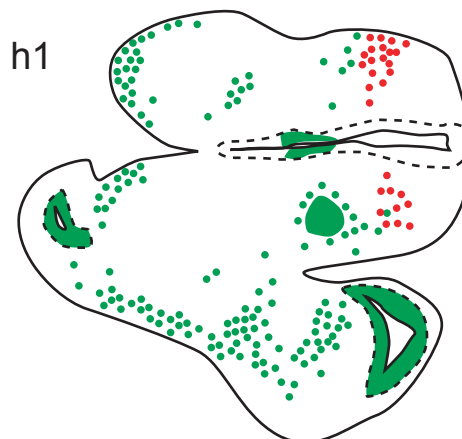
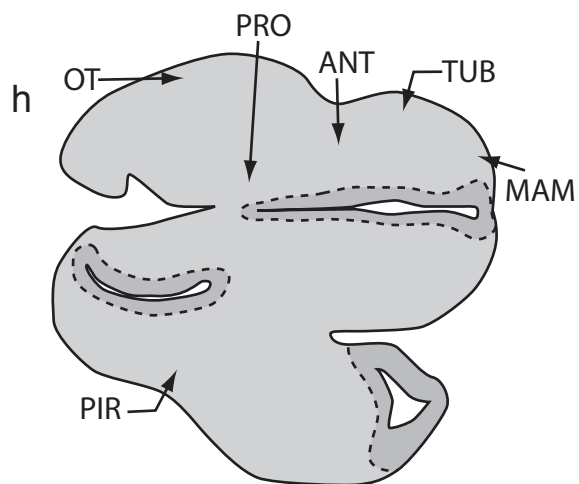


g2

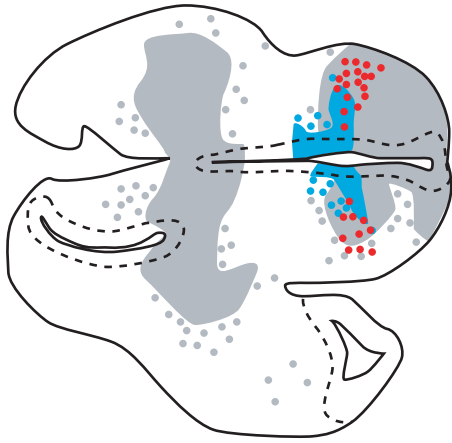


g3

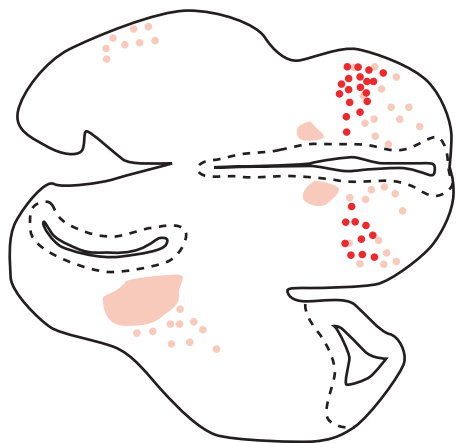




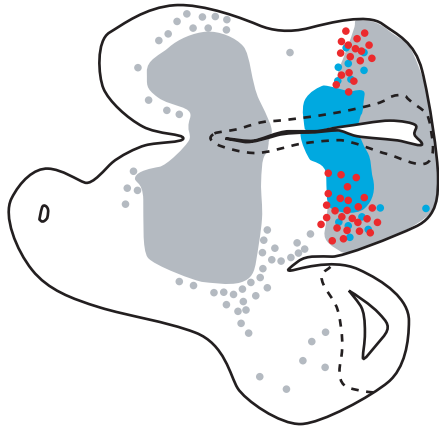
h2



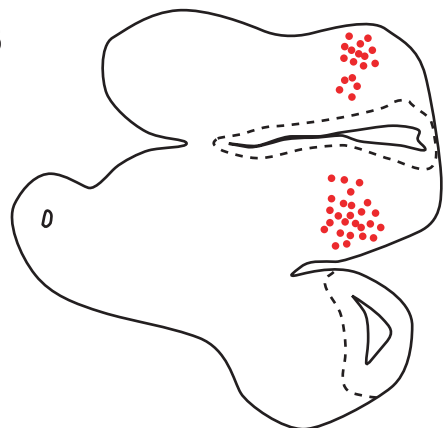
h3



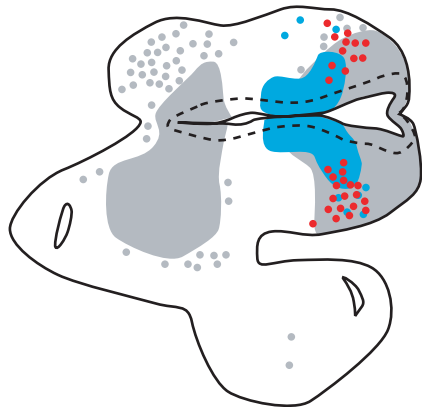
i2



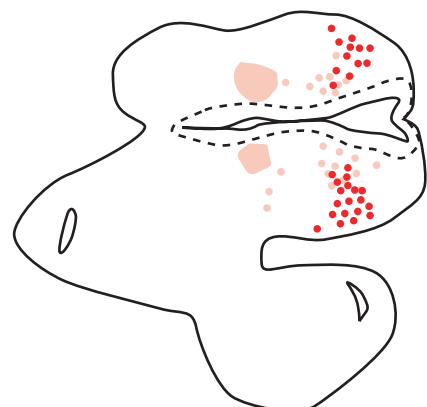
i3



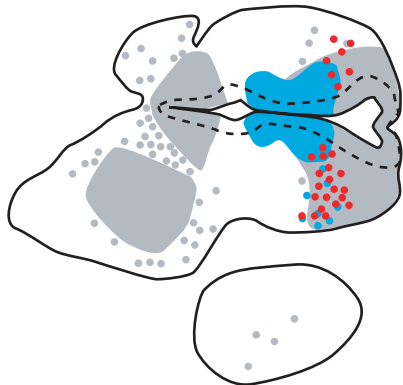
j2



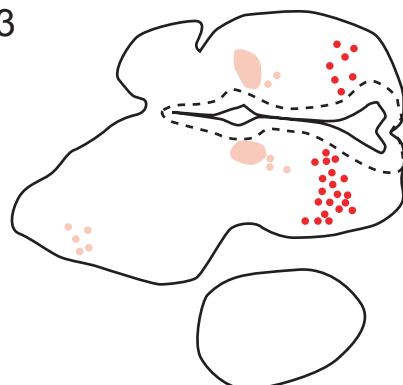
j3



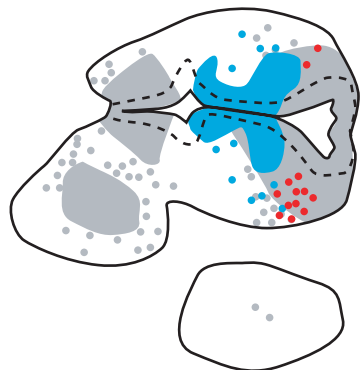
k2



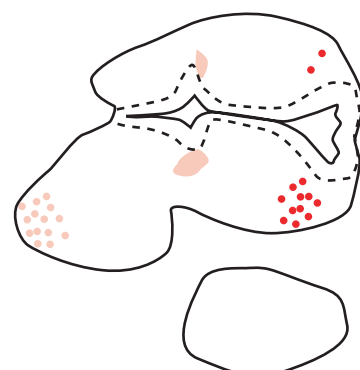
k3

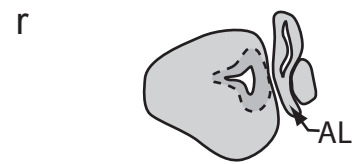
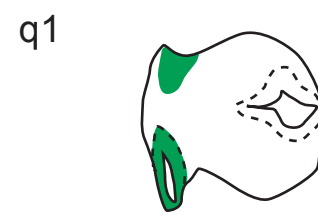
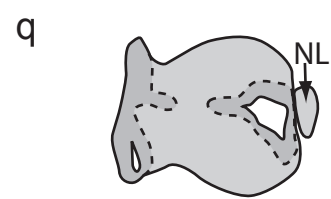
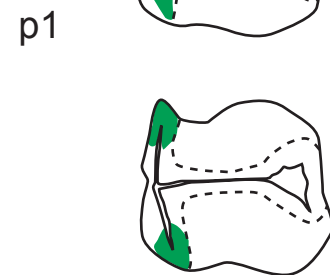
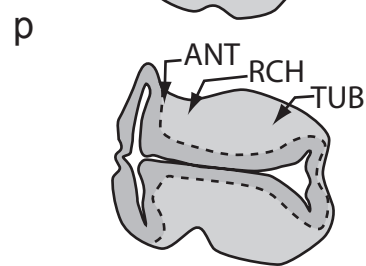
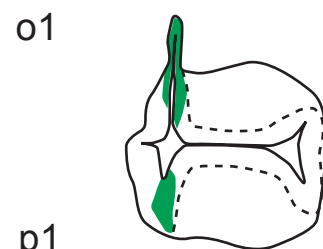
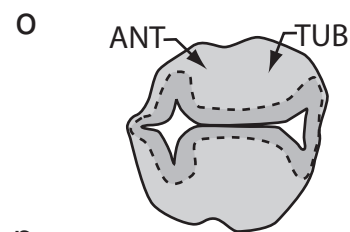
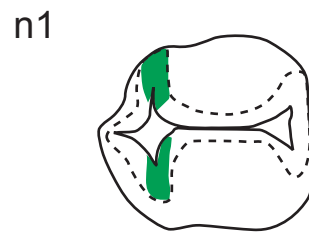
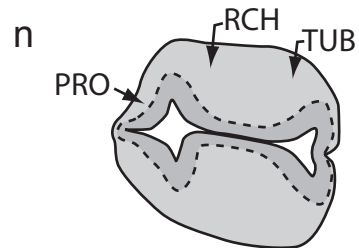
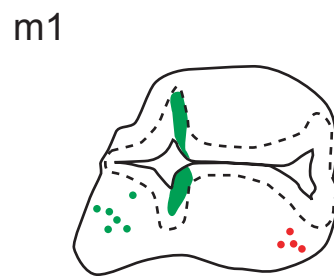
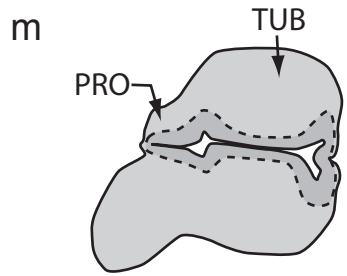


l2

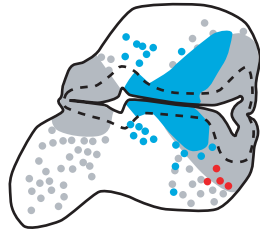


l3





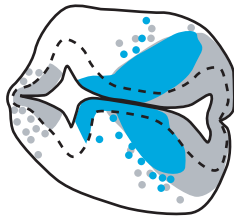
m2



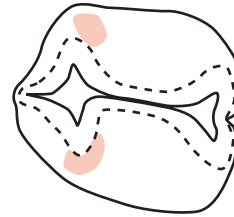
m3



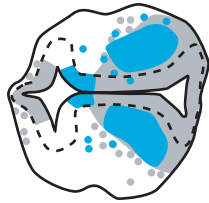
n2



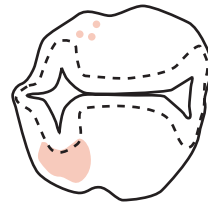
n3



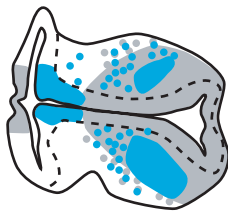
o2



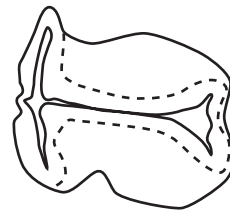
o3



p2



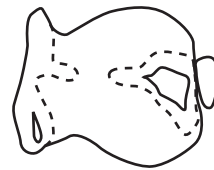
p3



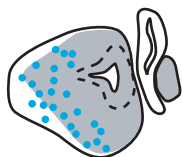
q2



q3



r2



r3



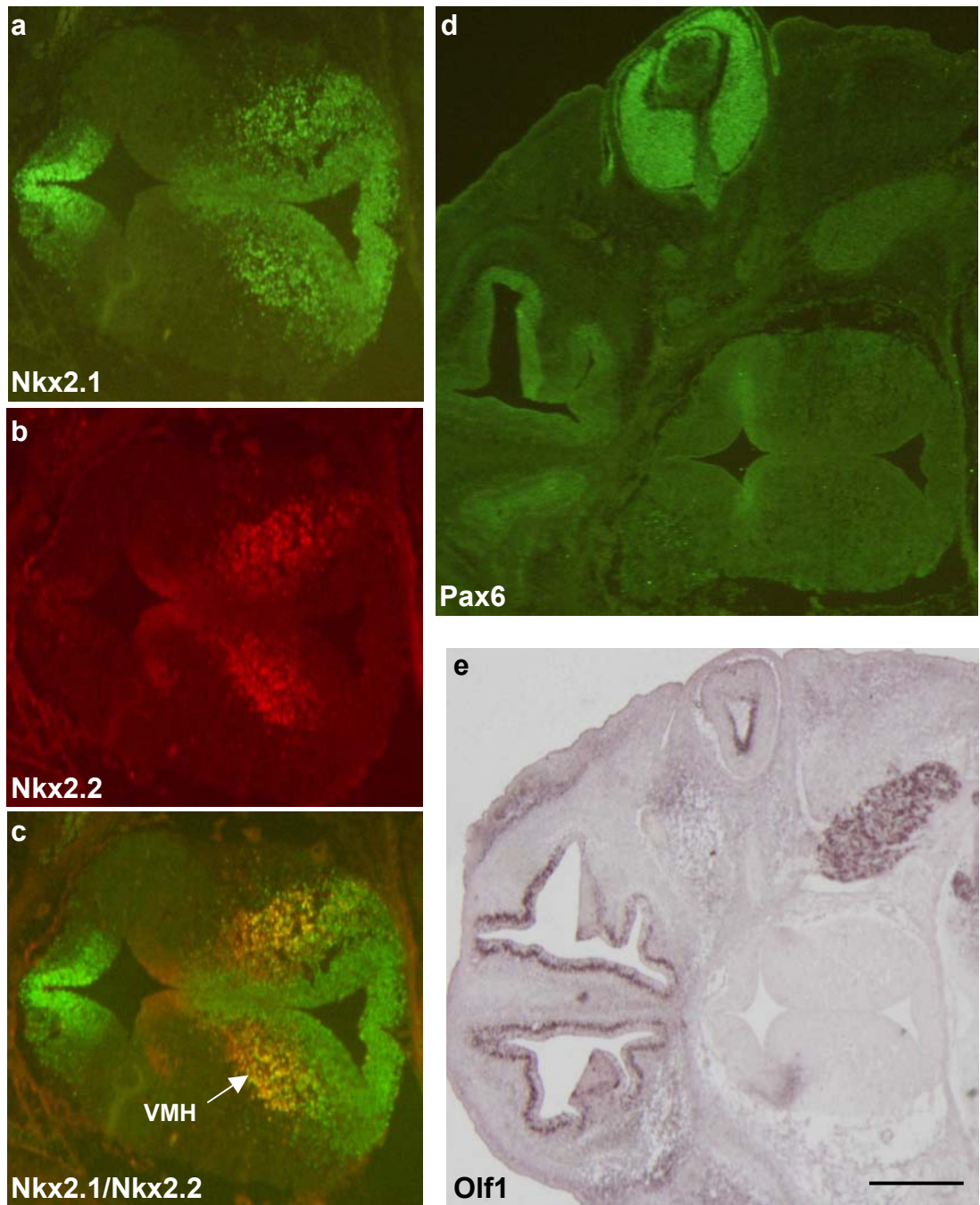


Fig. 35 : Microphotographies de coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E15. Distribution de Nkx2.1, Nkx2.2 et Pax6 en immunohistochimie (a-d) et de Olf1 en hybridation *in situ* (e). Noter que les neurones du VMH sont doublement marqués pour Nkx2.1 et Nkx2.2. Barre d'échelle : (a-c) 750 μ m, (d-e) 1,5 mm.

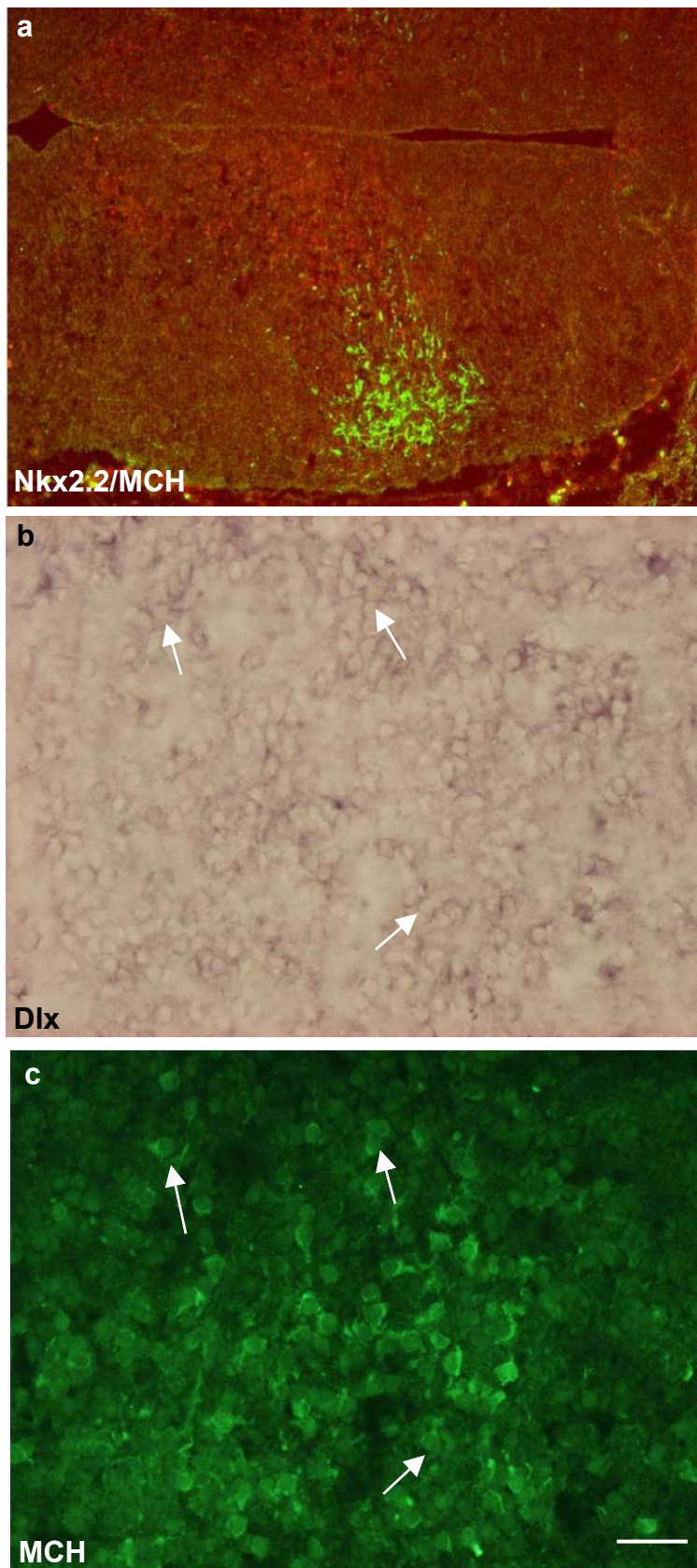
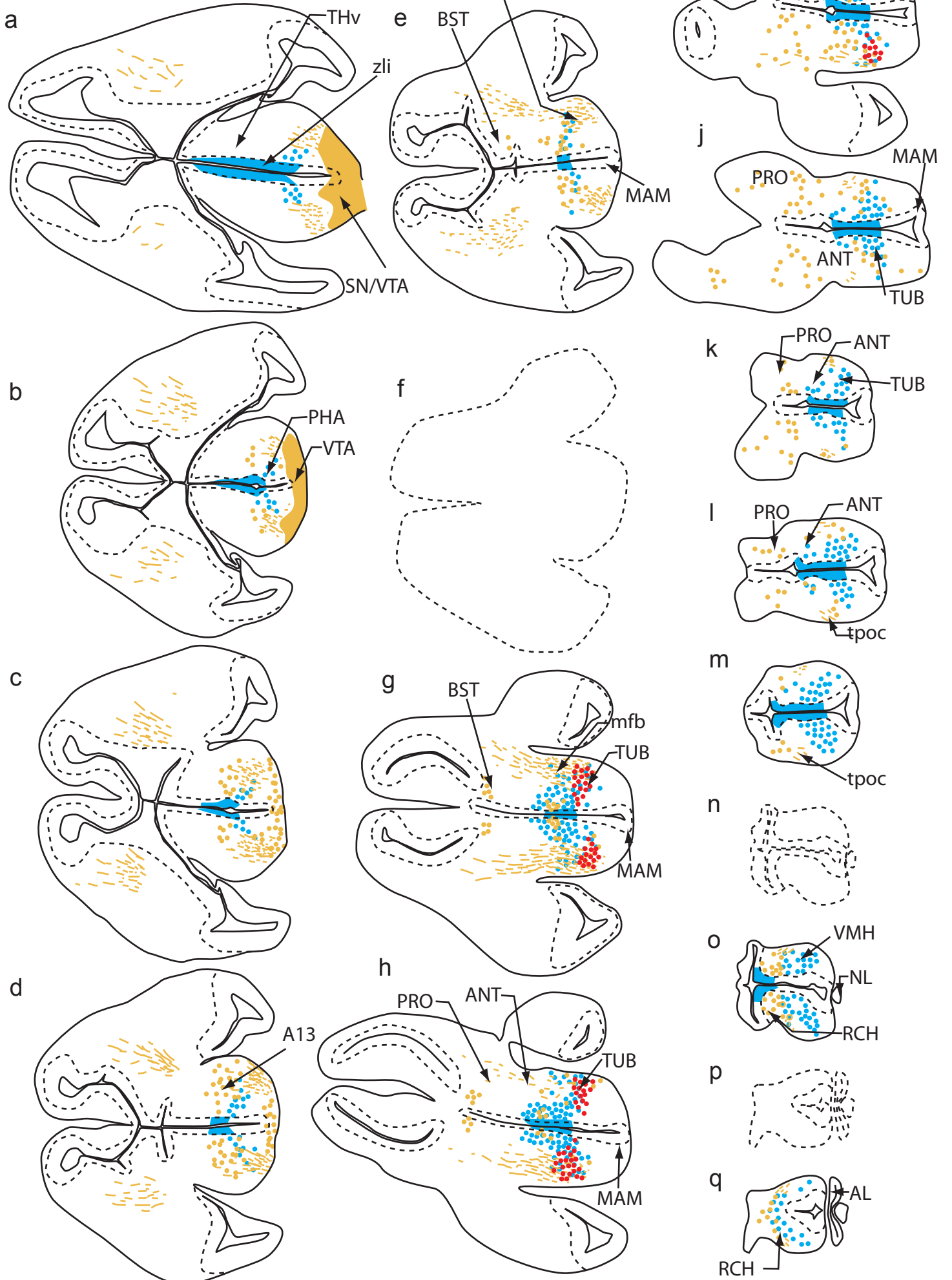


Fig. 36 : Microphotographies de coupes horizontales de cerveau d'embryon de rat au stade E15. **a.** Double marquage immunohistochimique MCH/Nkx2.2. **b-c.** Distribution de Dlx en hybridation *in situ* et du peptide MCH en immunohistochimie sur une même coupe. Les flèches indiquent des exemples de neurones doublement marqués. Barre d'échelle : 25 μ m.

Fig 37

■ Nkx2.2 ■ TH
■ MCH

E15
(E15 26)



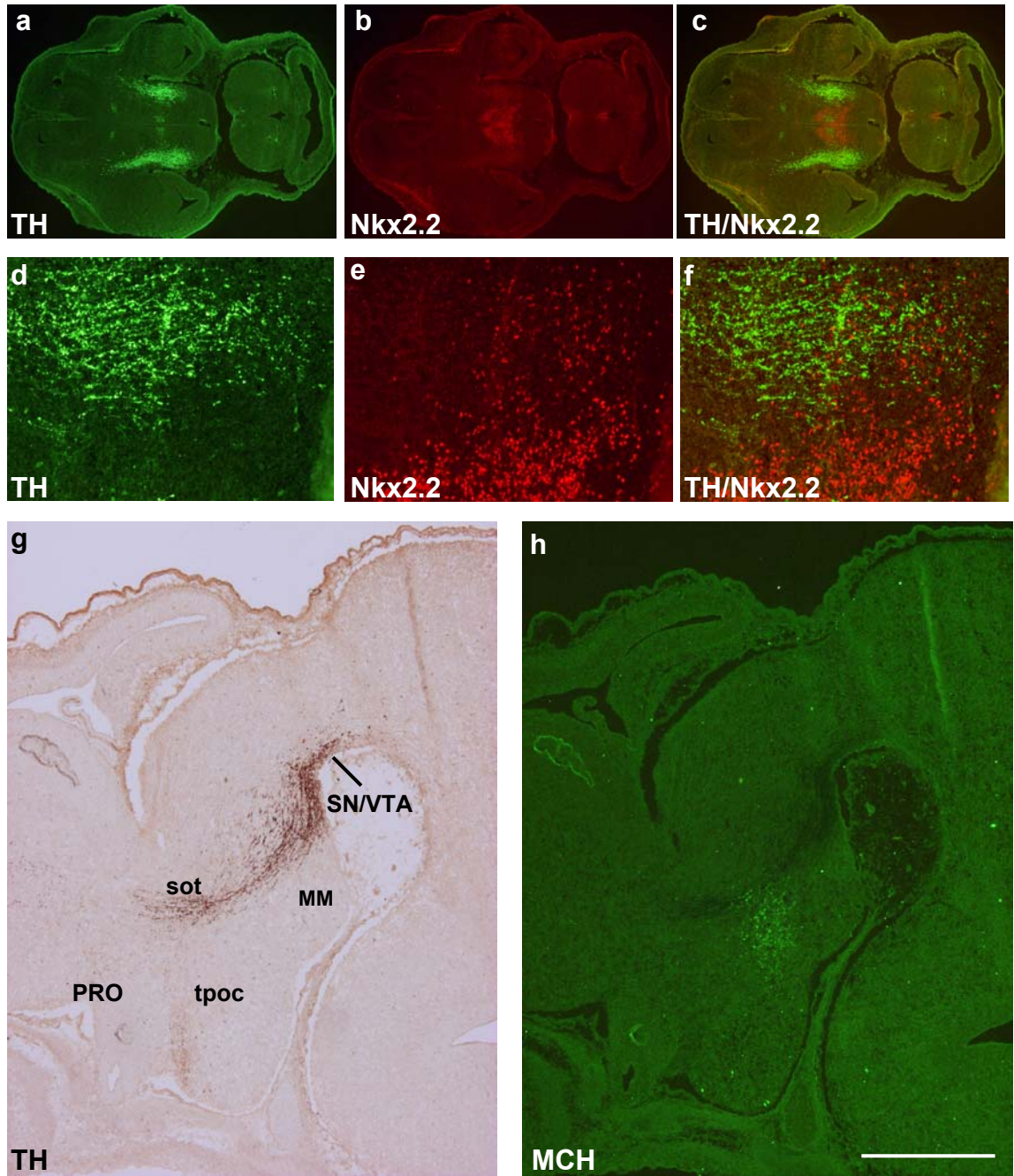


Fig. 38 : Microphotographies de coupes de cerveau d'embryon de rat au stade E15. Distribution en immunohistochimie de TH et Nkx2.2 sur coupe horizontale (a-c) et à plus fort grossissement (d-f). Visualisation sur coupe sagittale des faisceaux de fibres TH positifs grâce à la méthode aux complexes peroxydase anti-peroxydase (g) et du peptide MCH par immunofluorescence indirecte (h). Barre d'échelle : (a-c) 2 mm, (d-f) 100 μ m, (g-h) 1 mm.

6. Stades embryonnaires ultérieurs à E16 et adulte

Les stades embryonnaires plus âgés et adulte ne feront pas l'objet d'une description détaillée. En effet, l'objectif de ce travail est de confronter la distribution spatiotemporelle des neurones à MCH avec celle des différents gènes d'intérêt ; or le stade E16 coïncide avec la fin du pic de genèse des neurones à MCH, de plus les facteurs de transcription étudiés voient leur expression s'atténuer parallèlement à la diminution de l'activité mitotique dans les régions ventriculaires, par ailleurs leur distribution devient complexe. Toutefois, des structures sont clairement identifiables d'un point de vue cytoarchitectonique, c'est notamment le cas des régions ventromédianes de l'hypothalamus. Certaines informations seront donc relatées, elles seront en effet utiles à la discussion.

A E16, dans l'hypothalamus, l'expression de Nkx2.2 diminue dans le neuroépithélium (où il était exprimé), mais elle reste intense dans le noyau ventromédian (Fig. 39 a). Ce noyau exprime également Nkx2.1, et par des expériences de double marquage, nous avons montré que les cellules du noyau ventromédian coexpriment Nkx2.1 et Nkx2.2. Les territoires hypothalamiques plus dorsaux sont, quant à eux, Nkx2.1 négatifs. Dans le prosencéphale, seul le pallidum conserve une expression de Nkx2.1 d'intensité modérée.

Au stade adulte, un signal Nkx2.1 est observé dans le noyau ventromédian, ainsi que dans les régions préoptiques proches du troisième ventricule, le noyau arqué (adjacent au troisième ventricule) et au niveau de la surface piaie (Fig. 39 b-c). Chez l'adulte, le noyau ventromédian n'exprime quasiment plus Nkx2.2. Par contre, un marquage Nkx2.2 nucléaire est observé dans divers territoires hypothalamiques et extrahypothalamiques. Ces noyaux Nkx2.2 positifs sont associés essentiellement aux tractus de fibres (corps calleux, capsule interne), à l'hypothalamus dorsal et aux régions adjacentes à celui-ci avec notamment un groupe de noyaux intensément marqués dans les régions rostromédianes de la *zona incerta*. Les expériences de double marquage MCH/Nkx2.2 montrent qu'aucun noyau Nkx2.2 positif n'est observé dans les péricaryons MCH. Notons que de nombreuses cellules de la couche épendymaire correspondant à la zone à MCH présentent une immunoréactivité nucléaire anti-Nkx2.2 très intense. Aucun marquage Nkx2.2 n'a été retrouvé, ni dans les cellules épendymaires ventrales du troisième ventricule, ni dans les cellules épendymaires des ventricules latéraux. Ces dernières informations nécessitent toutefois une confirmation sur un plus grand nombre d'animaux.

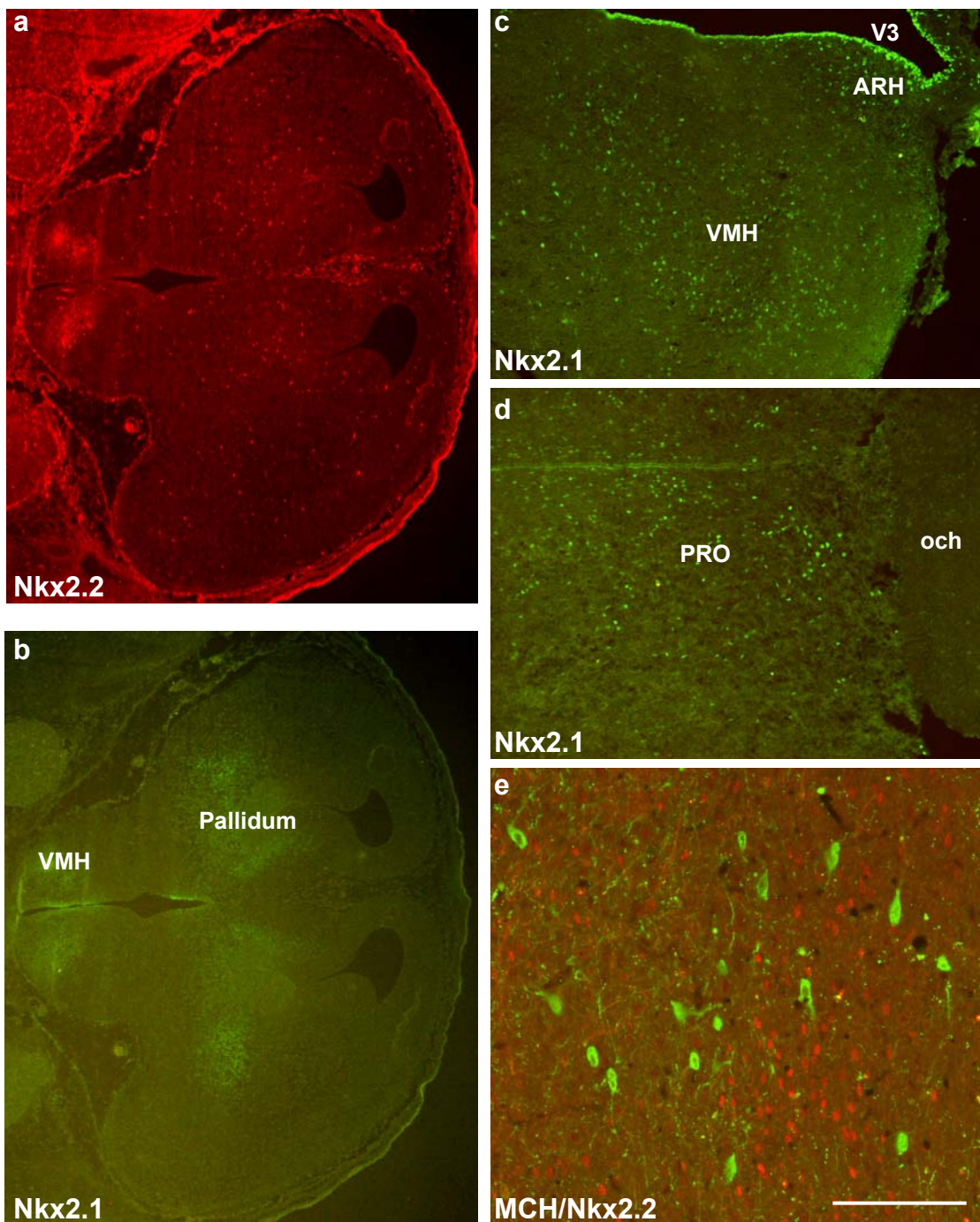


Fig. 39 : Microphotographies de coupes horizontales de cerveau de rat. **ab**. Distribution en immunohistochimie de Nkx2.2 et Nkx2.1 au stade embryonnaire E16. **cd**. Distribution en immunohistochimie de Nkx2.1 chez le rat adulte. **e**. Double marquage immunohistochimique MCH/Nkx2.2 dans l'hypothalamus latéral de rat adulte. Noter que les noyaux Nkx2.2 positifs ne se localisent pas dans les corps cellulaires MCH positifs. Barre d'échelle : (a-b) 1 mm, (c-d), 500 μ m, (e) 100 μ m.

D. EMBRYONS DE SOURIS PAX6^{-/-} AU STADE E18

L'objectif de cette étude visait initialement à déterminer s'il existait, dans le cerveau embryonnaire des souris Pax6^{-/-} au stade E18, une perturbation de l'établissement des projections MCH vers les territoires télencéphaliques. En réalité, peu de fibres MCH sont présentes à ce stade et des projections MCH persistent dans le télencéphale. Par contre, nos résultats indiquent que chez les souris Pax6^{-/-}, le gène MCH est exprimé de façon ectopique dans des territoires du thalamus ventral. Cette immunoréactivité anti-MCH est intracytoplasmique, d'aspect granulaire et semble concerner des neurones. Ces cellules paraissent être de plus petite taille, mais peut-être est-ce dû à une intensité plus faible du marquage (Fig. 40).

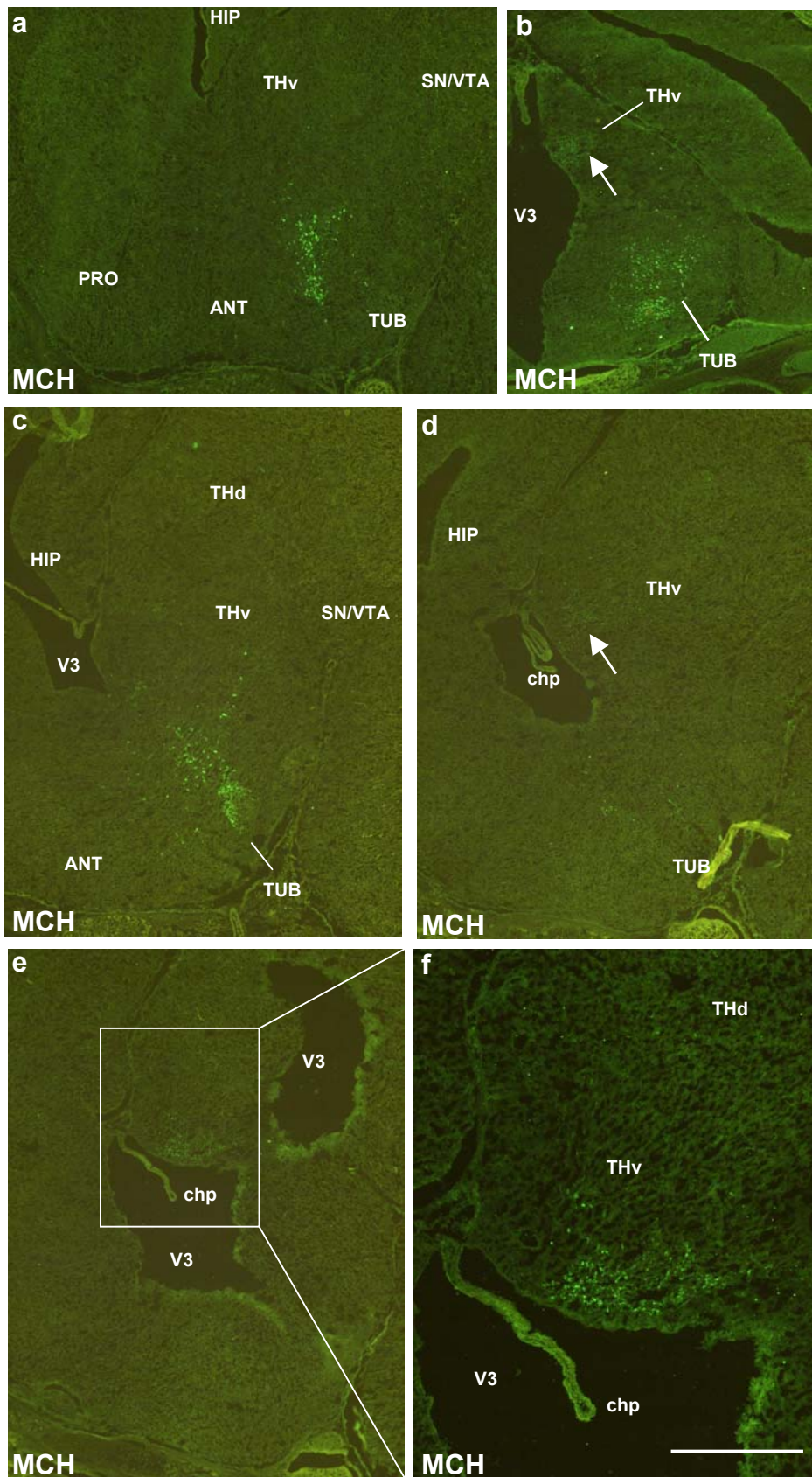


Fig. 40 : **a**. Distribution en immunohistochimie des neurones à MCH sur coupe coronale de cerveau embryonnaire de souris de type sauvage à E18. **b-f**. Distribution en immunohistochimie des neurones à MCH sur coupe oblique (**b**) et sur coupes sagittales (**c-f**) de cerveau d'embryons de souris *Pax6*^{-/-} à E18. Noter l'expression ectopique de MCH dans le thalamus ventral. Barre d'échelle : (a-e) 500 μ m, (f) 100 μ m.

DISCUSSION

Nos travaux ont concerné l'hypothalamus latéral postérieur et tout particulièrement deux populations neuronales qui y sont codistribuées : les neurones à Hcrt et les neurones à MCH. La distribution de ces deux populations ne respecte pas les frontières cytoarchitectoniques classiques de l'hypothalamus. Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser une approche « développementale » pour essayer de mieux comprendre la signification anatomique de la distribution restreinte des neurones à MCH à ladite « zone à MCH » et d'analyser ce que ce concept apporte quant à l'organisation anatomique classiquement admise de l'hypothalamus. Nous avons d'abord déterminé la date de naissance des neurones à Hcrt puis nous avons confronté ces résultats à ceux précédemment obtenus concernant la genèse des neurones à MCH. Notre étude visait ensuite à argumenter la spécificité de la mise en place de la « zone à MCH » en confrontant la distribution spatiotemporelle des neurones à MCH aux profils d'expression de certains gènes du développement impliqués dans la mise en place du diencephale, et également à l'organisation des différents tractus de fibres. Nos principaux résultats indiquent que les neurones à Hcrt naissent en un pic unique au 12^{ème} jour de vie embryonnaire. Par ailleurs, nos résultats montrent que la « zone à MCH » naît et se différencie dans un territoire caractérisé par l'expression d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription et que cette zone est adjacente au premier tractus longitudinal du diencephale ou *tpoc*, issu de neurones de la région rétrochiasmatisque. La description de la distribution détaillée de ces facteurs de transcription et des premiers tractus de fibres dans le diencephale ventral était donc indispensable à l'interprétation de nos informations relatives aux neurones à MCH et à l'analyse de l'organisation de ces aires diencephaliques ventrales.

Dans ce chapitre, nous aborderons dans un premier temps des considérations d'ordre technique et méthodologique, puis nous confronterons nos résultats concernant la genèse des neurones à Hcrt et les territoires d'expression des différents gènes du développement aux données de la littérature. Nous donnerons enfin des éléments de discussion plus généraux concernant la « zone à MCH » et le développement de l'hypothalamus.

I. CONSIDERATIONS TECHNIQUES ET DONNEES DE LA LITTERATURE

Pour ce travail, nous avons choisi comme espèce le rat. Ce choix s'inscrit dans la continuité des travaux de notre laboratoire, qui ont presque exclusivement été réalisés chez cette espèce. L'analyse de la distribution des différents facteurs de transcription chez le rat permet accessoirement de vérifier les descriptions précédemment réalisées chez la souris. Beaucoup d'études du développement font appel à des marquages immunohistochimiques ou obtenus par hybridation *in situ* sur embryons entiers. Dans notre travail, nous n'avons pas utilisé cette approche, nous avons préféré l'utilisation de coupes sériées, puisque notre objectif était de comparer la distribution des produits d'expression de gènes du développement avec celle de neurones présentant une faible intensité de signal, tels que les premiers neurones à MCH aux stades précoces de leur développement. Néanmoins, il a été difficile de préciser certaines limites ou d'éventuelles zones de chevauchement des territoires d'expression de ces différents gènes les uns par rapport aux autres. Seules les expériences de double marquage permettent de déterminer précisément les zones de coexpression de ces marqueurs. Or, toutes les combinaisons de double marquage n'ont pas été possibles, en raison notamment du manque d'anticorps produits chez des espèces différentes. Nous n'avons donc pu réaliser que les doubles marquages Nkx2.2/Pax6, Nkx2.2/Nkx2.1, Nkx2.2/MCH et Nkx2.2/TH ; aucun double marquage n'a pu être effectué pour Nkx2.1/Pax6, d'où la difficulté à établir les limites précises d'expression de ces deux derniers gènes. De même, les limites d'expression de Dlx dans le diencephale postérieur, par rapport aux limites d'expression des gènes Pax6 et Nkx2.1, n'ont pu être précisées sans équivoque.

Les marquages immunohistochimiques observés pour les différents facteurs de transcription étudiés ont été obtenus grâce à des anticorps commerciaux. En faveur de la spécificité de ces marquages, nous rappelons qu'ils étaient nucléaires, que leurs distributions spatiotemporelles étaient comparables à celles précédemment décrites chez la souris (cf. infra) et plusieurs d'entre eux ont pu être confrontés aux marquages obtenus en hybridation *in situ*.

Enfin parmi les problèmes rencontrés, signalons aussi celui du décollement des coupes histologiques, notamment au cours des expériences d'hybridation à haute température. Pour pallier ce problème, une approche méthodologique serait la réalisation d'expériences d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* sur embryon entier, au moins pour les stades précoces.

Chez les mammifères, la neurogenèse est initiée dans le neuroépithélium germinatif correspondant à la zone ventriculaire du cerveau embryonnaire. Au sein de cette région, les

neuroblastes se divisent et ils engendrent une descendance qui, soit quitte le cycle mitotique pour se différencier, soit subit à nouveau un ou plusieurs autres cycles de division cellulaire. Par le passé, l'identification de cellules en prolifération était réalisée par autoradiographie en utilisant la thymidine tritiée, qui s'incorpore à l'ADN à la place de certaines thymidines endogènes pendant la phase S du cycle cellulaire. Au cours des années 70 et 80, cette méthode a été utilisée afin d'étudier la neurogenèse de nombreuses structures du SNC. Il est ainsi possible de marquer les neuroblastes en division, de donner leur taux de prolifération, de déterminer la date de naissance de neurones différenciés et d'analyser la migration de ces cellules nerveuses. Le 5-bromo-2'-désoxyuridine ou BrdU, quant à lui, a initialement été utilisé comme marqueur chromosomique et comme agent tératogène expérimental. En effet, il inhibe l'incorporation de thymidine à l'ADN. L'apparition des techniques immunohistochimiques a permis ensuite l'utilisation du BrdU comme marqueur de prolifération. En 1982, Gratzner produit un anticorps monoclonal anti-BrdU et développe une technique immunohistochimique permettant la détection du BrdU incorporé à l'ADN. Parmi les avantages de l'utilisation du BrdU par rapport à la thymidine tritiée, citons tout d'abord la suppression du danger relatif à l'exposition de l'expérimentateur aux radiations. Par ailleurs, de par la technique immunohistochimique et l'hydrolyse acide, les anticorps anti-BrdU peuvent pénétrer en profondeur, ils permettent ainsi de détecter tous les noyaux marqués sur une coupe histologique de 10 μm d'épaisseur, alors que la faible pénétration des rayonnements β à travers le tissu (2 μm environ) ne permet la détection du marquage qu'à la surface du tissu. De plus, les techniques immunohistochimiques nécessitent un temps de révélation nettement inférieur à celui d'une émulsion autoradiographique (temps d'exposition aux radiations relativement long). Enfin la méthode au BrdU peut être combinée très facilement avec les techniques immunohistochimiques classiques permettant l'identification des neurones. Les données de la littérature relatives à l'utilisation de BrdU comme marqueur de la date de genèse indiquent que cette méthode, combinée à la détection immunohistochimique d'antigènes cytoplasmiques, semble au moins aussi appropriée que celle utilisant la thymidine tritiée. (Miller et Nowakowski, 1988 ; Markakis et Swanson, 1997). En 2001, Brischoux et collaborateurs ont d'ailleurs constaté que la distribution générale du marquage BrdU dans l'hypothalamus se superpose à celle décrite dans la littérature pour la thymidine tritiée (Altman et Bayer, 1978 et 1986) et que la neurogenèse générale de l'hypothalamus suit un gradient latéromédian correspondant à celui décrit par Altman et Bayer par autoradiographie ; nos propres observations confirment également ce point.

II. GENESE DES NEURONES A HYPOCRETINE

La première partie de notre travail visait à déterminer la date de naissance des neurones à Hcrt. La majeure partie des neurones à Hcrt naît donc en un pic étroit à E12. Le pic de genèse des neurones à MCH est observé à E12-E13, donc légèrement plus tard que celui des neurones à Hcrt (Amiot et coll., 2005). Les neurones à MCH sont générés pendant une période de 7 jours de E10 à E16 et ils se distribuent selon un gradient spatiotemporel latéromédian, qui est aisément mis en évidence compte-tenu de la longue période de genèse de ces neurones (Brischoux et coll., 2001). Par ailleurs chez le rat adulte, l'aire de distribution des neurones à Hcrt, réduite aux aires périfornicales de l'hypothalamus, est comprise à l'intérieur de celle des neurones à MCH, qui se localisent également dans les aires adjacentes rostromédiales de la *zona incerta*. Les populations neuronales Hcrt et MCH, qui semblent migrer radialement à partir de l'épithélium germinatif dans la couche du manteau, proviendraient de zones chevauchantes du neuroépithélium germinatif et l'aire de distribution réduite des neurones à Hcrt résulte du caractère étroit de leur pic de genèse (Fig. 41 A-B). Des travaux antérieurs ont montré que le large pic de genèse des neurones à MCH est constitué de deux pics plus étroits correspondant à la genèse de deux sous-populations de neurones à MCH individualisables par leurs projections : une première sous-population naissant à E11 et projetant vers la moelle épinière et une deuxième naissant à E13 et projetant vers le cortex cérébral (Brischoux et coll., 2002 ; Cvetkovic et coll., 2004). Les neurones à Hcrt projettent de façon diffuse selon un modèle comparable aux neurones à MCH. L'étroit pic de genèse des neurones à Hcrt est encadré par celui des deux sous-populations de neurones à MCH (Fig. 41 C). Ceci suggère deux hypothèses : premièrement, les neurones à Hcrt constitueraient une population plus homogène que les neurones à MCH et ils enverraient des collatérales à la fois vers le cortex cérébral et vers la moelle épinière (Amiot et coll., 2005). Des modèles de connexion semblables ont été décrits concernant les groupes de neurones aminergiques avec lesquels les neurones à Hcrt développent des liens étroits tant d'un point de vue anatomique que fonctionnel (Kilduff et Peyron, 2000) et qui envoient des collatérales en de multiples endroits du cerveau dont le télencéphale (Losier et Semba, 1993 ; Simpson et coll., 1997) ; deuxièmement, le stade E12 serait un stade important dans le développement du diencephale puisqu'il correspond au pic de genèse des neurones à Hcrt ; mais surtout la direction des axones MCH en développement serait clairement distincte selon que les neurones dont ils sont issus, naissent avant ou après E12 (Amiot et coll., 2005). Cette hypothèse est sous-tendue par l'existence de ces deux sous-populations neuronales MCH définies par leurs dates de

naissance et leurs projections, ainsi que par les données de la littérature : en effet, le premier tractus décrit dans le diencephale est le *tpoc*, qui naît de la future région rétrochiasmatische et traverse les régions postérieures du tronc cérébral dès E9.5 chez la souris (ce qui correspond aux stades E10.5/E11 chez le rat) (Easter et coll., 1993 ; Mastick et Easter, 1996). Par contre chez le rat à E13-14, les projections dopaminergiques ascendantes s'étendent de la partie ventrale du mésencéphale au futur *mfb* et atteignent la partie basale du télencéphale à E15/E16 (Kalsbeek A et coll., 1992). Ainsi il pourrait exister une corrélation entre le « statut intrinsèque » du diencephale ventral, en particulier la partie caudale de l'hypothalamus, et le développement des structures adjacentes, du moins en ce qui concerne l'extension des connexions vers la partie rostrale du prosencéphale (Fig. 41D).

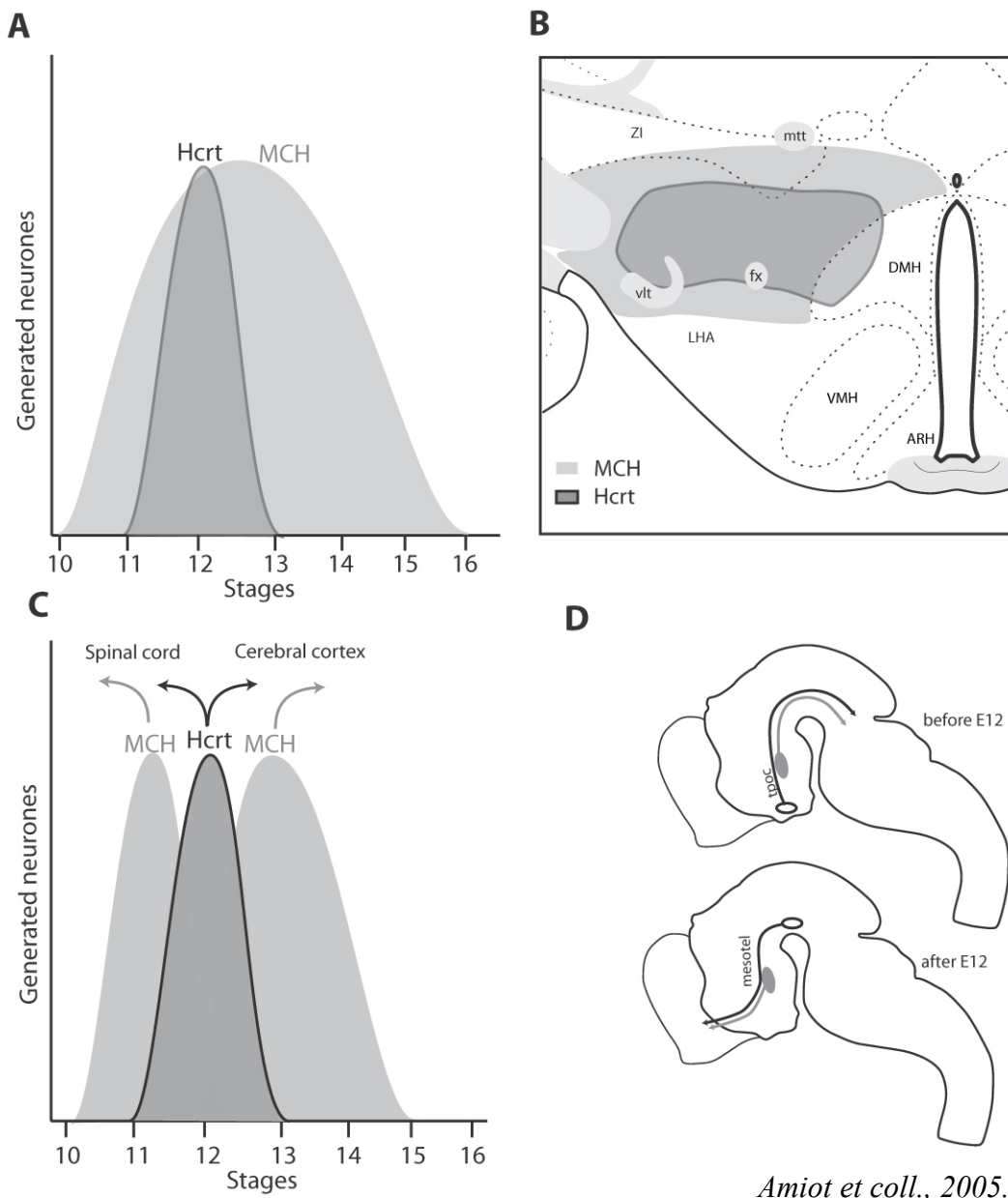


Fig. 41 : A. Comparaison des pics de genèse des neurones à Hcrt et à MCH. Noter que le pic de genèse des neurones à MCH (adapté de Brischoux C et coll., 2001) est plus large et atteint son point culminant plus tardivement que le pic de genèse des neurones à Hcrt. La hauteur relative des deux pics est arbitraire. **B.** Représentation schématique des aires de distribution des populations neuronales Hcrt (en gris foncé) et MCH (en gris clair) sur un niveau de coupe passant par l'hypothalamus tubéral. Noter que l'aire de distribution des neurones à Hcrt est incluse dans la « zone à MCH ». **C.** Comparaison des pics de genèse des neurones à Hcrt et des deux sous-populations de neurones à MCH définies par leurs projections vers la moelle épinière ou le cortex cérébral. Noter que le pic de genèse des neurones à Hcrt est encadré par chacun des deux pics de genèse des neurones à MCH (adapté de Brischoux F et coll., 2002). La hauteur de chaque pic est arbitraire. **D.** Représentation schématique de la direction des projections MCH (en gris) selon que les neurones à MCH sont nés avant ou après E12 [pour les neurones nés après E12, seules les projections rostrales sont représentées ; cf. Cvetkovic et coll., 2004 pour détails]. Le *tractus postopticus* (*tpoc*), qui contient les axones des neurones de la région rétrochiasmatique situés à proximité du cerveau caudal est déjà présent avant E12. Après E12, les axones dopaminergiques provenant du mésencéphale ventral (faisceau mésotélencéphalique) progressent en direction du télencéphale. Cf. texte pour détails.

III. TERRITOIRES D'EXPRESSION DES DIFFERENTS GENES ET DONNEES DE LA LITTERATURE

Conformément aux données de la littérature chez la souris, on distinguera parmi les gènes étudiés, les gènes à expression précoce à savoir Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2, des gènes à expression plus tardive tels que Dlx et Olf1 (Walther et Gruss, 1991 ; Price, 1993 ; Davis et Reed, 1996). Notons également que le facteur diffusible Shh s'exprime précocement. Malheureusement, en raison de problèmes techniques relatifs à un décollement des coupes histologiques lors des expériences d'hybridation *in situ* à haute température, nous n'avons pas pu analyser en détail la distribution spatiotemporelle de cette molécule.

Dans notre étude, les distributions spatiotemporelles des trois gènes à expression précoce correspondent à celles précédemment décrites chez la souris, où Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2 sont observés dès E8 ou E9, avant même la fermeture du tube neural. Dans ce travail réalisé chez le rat, l'analyse de l'expression des différents gènes d'intérêt a été effectuée après la fermeture du tube nerveux (E10 tardif - E11). Dans le diencéphale ventral, l'expression des gènes précoces s'effectue sous forme de deux grands territoires d'expression Pax6 et Nkx2.1, et d'une bande Nkx2.2 positive, qui est une zone de contact et de chevauchement, située à la jonction des deux territoires précédents. Au niveau de la base du cerveau correspondant à la partie la plus ventrale selon nos axes, on observe une déformation du tube neural en rapport avec la naissance de la vésicule optique. Le marquage Pax6 se poursuit dans la tige optique. Le signal Nkx2.1, quant à lui, semble border ventralement la tige optique, puis il est retrouvé dans le télencéphale adjacent. Ces descriptions corroborent celles précédemment faites chez la souris (Puelles et coll., 2004).

L'expression plus tardive de Dlx et Olf1 est concomitante de la différenciation du manteau. Dans notre étude, ces deux gènes sont en effet abondamment exprimés dans le manteau. Nous ne détaillerons pas à nouveau la description de leurs territoires d'expression, qui sont en accord avec les données de la littérature. Ainsi dans le télencéphale dorsal, un marquage Pax6 a été observé dans le neuroépithélium, ainsi qu'un marquage Olf1 périphérique. Pax6, Olf1 et Dlx sont exprimés dans le striatum, Nkx2.1 et Dlx dans le pallidum et l'aire préoptique (Stoykova et coll, 1996 ; Toresson et coll, 2000). Au sein du diencéphale, Pax6 est exprimé dans le neuroépithélium et le manteau du thalamus ventral et dans le neuroépithélium de la tige optique. Nous avons observé une coexpression Pax6/Dlx dans le thalamus ventral, mais pas dans l'*eminentia thalami*, où Dlx n'est pas exprimé. D'après la littérature, l'*eminentia thalami* est souvent intégrée au thalamus ventral. L'absence d'expression de Dlx dans cette

structure pourrait suggérer qu'elle ne devient pas GABAergique contrairement à l'ensemble du thalamus ventral, ce qui plaide en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'*eminentia thalami* donnerait des noyaux thalamiques de la ligne médiane comme les noyaux paraventriculaire et paraténial (*communication personnelle de LW Swanson à PY Risold*). Dans les régions ventrales du diencephale, Nkx2.1 est exprimé au sein des territoires Pax6 négatifs. En réalité, jusqu'aux stades les plus tardifs de notre étude, il existe une exclusion mutuelle de ces facteurs de transcription dans ces territoires.

Outre ces éléments de notre travail corroborant les travaux précédents et notamment l'ensemble des descriptions chez la souris, de cette étude se dégagent également des résultats qui ne vont pas dans le sens des observations précédemment publiées ou pour lesquels les données de la littérature sont inexistantes.

Nous avons rencontré des difficultés lors de l'interprétation de la distribution spatiotemporelle des différents facteurs de transcription dans le télencéphale ventral et préoptique, notamment dans le septum, le tubercule olfactif et la substance innominée. Pour l'étude de ces territoires, qui ne représentent toutefois pas les territoires d'intérêt prioritaire de ce travail, une approche « développementale » permettant de confronter la distribution de gènes du développement à celle de marqueurs neuronaux adultes mais s'exprimant précocement, pourrait s'avérer fort utile.

Les niveaux d'expression de Olf1 en immunohistochimie et en hybridation *in situ* étaient concordants dans de nombreux territoires analysés, notamment dans le tectum, le thalamus dorsal, le striatum et l'hypothalamus antérieur. Précisons que dans ce dernier territoire, l'intensité du signal était modérée à la fois en immunohistochimie et en hybridation *in situ*. Par contre dans l'hypothalamus mamillaire et à E15 dans l'hypothalamus tubéral, nous avons constaté une immunoréactivité Olf1 d'intensité modérée, alors que par hybridation *in situ* le signal Olf1 dans ces mêmes territoires était très faible. La littérature concernant la distribution d'Olf1 est pauvre et les seules données dont nous disposons sont issues d'expériences effectuées avec le même anticorps que celui que nous avons utilisé dans cette étude (Davis et Reed, 1996). Des études complémentaires seront donc nécessaires pour élucider cette discordance concernant l'intensité des signaux Olf1 obtenus en immunohistochimie et par hybridation *in situ* dans les régions hypothalamiques postérieures. Parmi les hypothèses que nous pouvons formuler, citons l'éventuelle reconnaissance par l'anticorps d'une protéine codée par un ARNm différent de l'ARNm Olf1 et exprimée plus spécifiquement dans les régions mamillaires, ou encore des demi-vies de l'ARNm et de la protéine variant en sens

inverse avec une dégradation plus rapide de l'ARNm que de la protéine dans certaines régions. En immunohistochimie, le marquage *Olf1* est d'intensité équivalente dans le manteau de l'hypothalamus antérieur et dans les régions mamillaires. Mais dans le manteau de l'hypothalamus antérieur, l'intensité du signal *Olf1* est comparable en hybridation *in situ* et en immunohistochimie. Cette dernière constatation semble donc exclure une quelconque raison d'ordre technique à ces différences d'intensité de signal entre les deux techniques dans les territoires hypothalamiques postérieurs.

Dans le thalamus ventral, nous avons constaté un élargissement de la bande *Nkx2.2* positive et au sein du neuroépithélium une coexpression de *Pax6* et de *Nkx2.2*. Aux stades précoces E10-E11, cette zone *Nkx2.2* positive est très fine. A E12-E13, elle s'étend ventralement à la *zli* au dessus de la vésicule optique. Cet élargissement intéresse essentiellement la zone d'expression de *Pax6* dans le neuroépithélium. Chez la souris, des auteurs ont décrit aux stades précoces une bande *Nkx2.2* positive étroite chevauchant partiellement la région *Pax6* positive, mais à notre connaissance aucun ne rapporte cet élargissement de la bande *Nkx2.2* positive dans le territoire *Pax6* positif au sein du neuroépithélium du thalamus ventral (Mastick et Andrew, 2001 ; Puellas L et coll., 2004). Nous excluons tout problème technique pouvant expliquer ce résultat, étant donné que le même anticorps a été utilisé dans notre travail et dans certaines de ces études. Parmi les explications potentielles, citons des facteurs liés à l'espèce ou encore au stade étudié. En effet, les distributions peuvent différer entre le rat et la souris. De plus, chez le poulet ou le poisson, qui sont des espèces fréquemment utilisées pour les études du développement, le thalamus ventral est moins développé. Par ailleurs, les travaux de la littérature concernent essentiellement les stades précoces E10, E11 et E12 chez la souris.

Classiquement les gènes *Pax* et *Nkx* s'autoexcluent, c'est le cas par exemple de *Pax6* et de *Nkx2.2* dans les régions postérieures du tube nerveux. Dans notre étude, nous avons constaté dans le neuroépithélium un gradient concernant l'expression de *Pax6* et de *Nkx2.2*, ainsi que l'existence d'une zone de coexpression de ces deux gènes. Mais cette zone de coexpression au sein du neuroépithélium s'étend jusqu'à l'*eminencia thalami* et concerne donc tout le thalamus ventral. Chez le poisson zèbre, *Shh* est exprimé dans la *zli*, ainsi que dans un territoire médioventral continu s'étendant de l'hypothalamus antérieur au cerveau postérieur et passant par le tegmentum. La *zli* qui est *Pax6*, *Shh* et *Nkx2.2* positive, est un territoire morphogène et chez le poisson, *Shh* influence la morphogenèse du diencephale, à la fois du thalamus dorsal et du thalamus ventral (Scholpp et coll., 2006). Dans la moelle, un signal *Shh* provenant du pôle ventral, induit l'expression de *Nkx2.2* et réprime celle de *Pax6* (Briscoe et Ericson,

2001). Par ailleurs, les souris *Shh*^{-/-} présentent une malformation du diencéphale, notamment du thalamus ventral (Scholpp et coll., 2006). A E12-E13 chez le rat, cet élargissement de la bande *Nkx2.2* correspond peut-être à une étape de prolifération cellulaire et de croissance du neuroépithélium à l'origine du thalamus ventral.

Par contre en position ventrale dans l'hypothalamus latéral postérieur, nous n'avons pas observé d'élargissement de la bande *Nkx2.2* positive. Ceci suggère que la *zli* possède un effet morphogène sur les régions dorsales du thalamus ventral, mais pas sur les régions plus ventrales de l'hypothalamus, où *Shh* est pourtant exprimé. Ainsi on peut émettre l'hypothèse de l'existence de deux étapes dans le développement du thalamus ventral, ces deux étapes pouvant éventuellement être concomitantes. On pourrait distinguer une phase de prolifération et de croissance du neuroépithélium sous l'effet de *Shh* et de *Nkx2.2*, et une phase de différenciation neuronale sous l'influence notamment de *Pax6* et de *Dlx*. L'expression de *Nkx2.2* (qui est sous l'influence de *Shh*) intéresse donc le thalamus ventral, mais elle ne s'étend pas de la même manière dans les territoires hypothalamiques voisins de ceux où *Shh* est pourtant exprimé. Dans ces territoires hypothalamiques, la vésicule optique en formation présente une expression très intense de *Pax6*. Les facteurs à l'origine de cette expression de *Pax6* à partir de la vésicule optique pourraient inhiber directement ou indirectement celle de *Shh* et de *Nkx2.2*. Notons enfin que dans les aires préoptiques, l'expression de *Shh* et celle de *Nkx2.1* (que nous avons observée) ont été rapportées, mais pas celle de *Nkx2.2*. De nombreux éléments doivent encore être élucidés quant aux cascades d'expression hypothalamiques qui diffèrent des territoires préoptiques à postérieurs (Fig. 42).

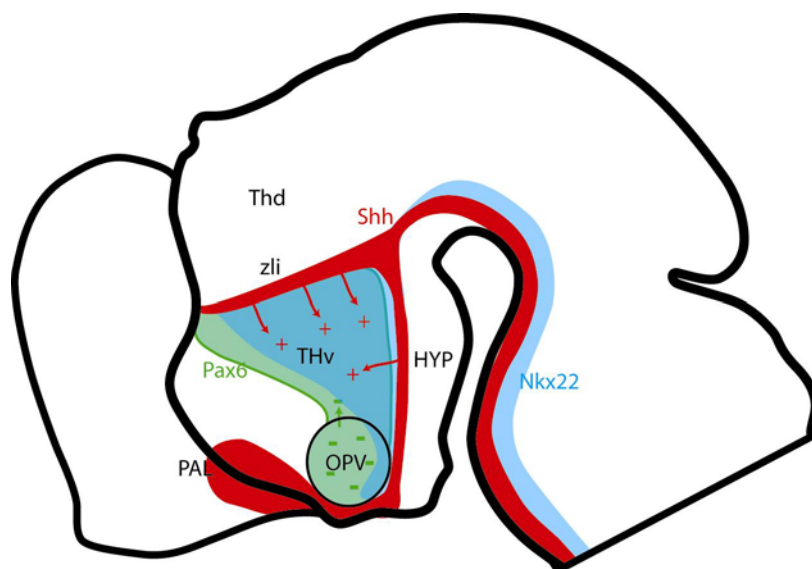


Fig. 42 : Représentation schématique des effets morphogènes potentiels de la *zli* (*Shh*) et de la vésicule/tige optique sur l'expression du facteur de transcription *Nkx2.2* dans le thalamus ventral et l'hypothalamus.

Notre travail corrobore les données issues des travaux de Brischoux et collaborateurs en 2001 concernant l'ontogenèse des neurones à MCH. Ces neurones sont générés en un pic très large du 10^{ème} au 16^{ème} jours de vie embryonnaire, ils naissent de la même région du neuroépithélium germinatif et migrent de façon radiaire jusqu'à leur territoire d'expression définitif ou « zone à MCH ». Notons toutefois que dans notre étude, nous avons observé des fibres MCH dès le stade E13.

Des stades embryonnaires E13 à E15, la « zone à MCH » apparaît comme un territoire caractérisé par l'expression de Nkx2.2, Nkx2.1 et Dlx, ainsi que par l'absence d'expression de Pax6.

Nous avons constaté que des cellules MCH positives présentent une immunoréactivité anti-Nkx2.2, même si celle-ci est faible, et que ces cellules sont peu nombreuses. Nkx2.2 est exprimé dans les progéniteurs des oligodendrocytes en migration (Xu et coll., 2000 ; Fu et Qiu, 2001), mais on connaît aussi le rôle de Nkx2.2 sur la différenciation des neurones sérotoninergiques (Cheng et coll., 2003). Ainsi on peut émettre l'hypothèse d'une migration radiale des neurones à MCH générés à partir des régions Nkx2.2 positives ; les progéniteurs expriment Nkx2.2 au cours de leur migration, mais ce gène n'est plus exprimé dans les cellules lorsque leur différenciation est terminée. Nous ne disposons pas de double marquage MCH/Nkx2.1, toutefois l'existence d'une coexpression Nkx2.1/Nkx2.2 dans la région du neuroépithélium à l'origine des neurones à MCH permet de supposer que Nkx2.1 intervient également dans la différenciation des neurones à MCH. Enfin à E15, beaucoup de neurones à MCH expriment Dlx. Ce facteur de transcription est intimement associé aux neurones exprimant le GABA (Stühmer et coll., 2002 ; Panganiban et Rubenstein, 2002) et nous avons constaté par hybridation *in situ* que chez l'adulte beaucoup de neurones à MCH expriment l'ARNm GAD 65 (résultats non publiés), ce qui suggère un phénotype GABAergique de certains (voire peut-être tous les) neurones à MCH. Concernant Olf1, si une expression de ce gène est suspectée dans la zone à MCH aux stades tardifs (E15), elle n'a pas été retrouvée aux stades précoces de différenciation des neurones à MCH (E13-E14). Cette hypothèse sera discutée par la suite dans le cadre de l'existence de sous-populations de neurones à MCH. Par ailleurs, les neurones à MCH ne sont pas exprimés dans la zone Pax6 positive. Chez l'animal adulte, notons la présence de péricaryons MCH dans la *zona incerta* à proximité des neurones du noyau dopaminergique A13 ou autour du noyau paraventriculaire postérieur. Ces noyaux, qui dérivent des territoires Pax6 positifs donnant le thalamus ventral ou l'hypothalamus antérieur, sont donc colonisés par des neurones à MCH après le stade E15, alors que l'expression des facteurs de transcription et notamment de Pax6, diminue. Cette constatation

peut être corrélée aux observations effectuées chez les souris Pax6^{-/-}. En effet chez ces animaux mutés, il existe une expression de MCH en situation ectopique dans le thalamus ventral. Pax6, dont l'absence n'exclut pas un certain degré de régionalisation du diencephale, semble donc jouer un rôle important dans la différenciation des types neuronaux au sein du thalamus ventral et dans l'établissement de la frontière antérieure/dorsale de la « zone à MCH ».

IV. EXPRESSION DES DIFFERENTS GENES ET DIFFERENTIATION DES PREMIERS TRACTUS DE FIBRES

Les facteurs de transcription comme Nkx2.2 et Pax6 n'interviennent pas uniquement dans la différenciation de types neuronaux spécifiques, ils sont aussi impliqués dans l'établissement correct des projections dans le prosencéphale. Ainsi chez les souris Pax6^{-/-}, les connexions thalamocorticales et mésotélencéphaliques sont perturbées (Manuel et Price, 2005). Chez les souris Nkx2.1^{-/-}, la mise en place du tractus mésotélencéphalique est aussi perturbée, parfois également celle du pédoncule cérébral (Marin et coll., 2002). Les mécanismes précis de l'effet de ces gènes sur l'établissement des connexions sont mal connus, il est toutefois bien établi que Pax6 est impliqué au cours du développement dans l'établissement de codes d'adhérence régionale, qui sont médiés par la R-cadhérine et qui permettent de guider les axones pionniers (Stoykova et coll., 1997 ; Andrews et Mastick, 2003 ; Nural et Mastick, 2004 ; Manuel et Price, 2005).

Il est admis que les axones dopaminergiques d'origine mésencéphalique suivent le *tpoc* à contresens. Nous avons vu qu'au niveau de la zone à MCH, ils quittent le *tpoc* et progressent en direction des vésicules télencéphaliques. Nkx2.1 joue un rôle de guide lors de la mise en place de ces axones. Chez les souris Nkx2.1^{-/-}, de nombreux axones dopaminergiques ne pénètrent pas dans le télencéphale mais suivent le *tpoc* jusqu'à son origine dans la région rétrochiasmatic. Ainsi Nkx2.1 a été décrit comme ayant une action répulsive et inhibitrice sur la croissance des axones dopaminergiques d'origine mésencéphalique en direction de l'hypothalamus (Marin et coll., 2002). Cependant une autre hypothèse serait que ces axones quittent le *tpoc* pour suivre un autre tractus d'axones pionniers. En effet, le *sot* se développe peu de temps après le *tpoc* (Mastick et Easter, 1996). Les cellules à l'origine du *sot* sont situées entre la vésicule optique et la vésicule cérébrale, et elles sont aussi à l'origine de la strie médullaire qui est le second tractus longitudinal établi dans le prosencéphale. Compte-tenu de leur localisation et la distribution de leurs efférences, ces cellules pourraient

correspondre à des régions médiales du pallidum présomptif. Chez le rat adulte, ces régions envoient des axones dans l'habenula via la strie médullaire et dans la substance noire via le pédoncule cérébral. Comme Nkx2.1 est abondamment exprimé dans l'ébauche du pallidum, le *sot* pourrait être interrompu chez les souris Nkx2.1^{-/-} et l'établissement des connexions entre télencéphale et diencéphale caudal/mésencéphale ventral pourrait être perturbé. Si cette hypothèse s'avère être exacte, les projections MCH en direction de la moelle épinière suivraient le *tpoc* et celles à direction télencéphalique remonteraient le *sot*. Cette hypothèse pourrait s'appliquer à d'autres structures de l'hypothalamus. En effet, toutes les structures hypothalamiques projetant vers la moelle épinière naissent le long du *tpoc* ou du moins à partir de la bande Nkx2.2 positive du neuroépithélium germinatif. C'est notamment le cas de l'aire rétrochiasmatisque, du noyau paraventriculaire (avec ses divisions parvicellulaires dorsale et médiale/partie ventrale), de la « zone à MCH » ou du noyau hypothalamique postérieur. Un doute persiste en ce qui concerne le noyau tubéromammillaire qui renferme les neurones histaminergiques et dont les territoires neuroépithéliaux d'origine n'ont pas été caractérisés. Toutes les structures hypothalamiques projetant vers le cortex sont localisées dans l'hypothalamus postérieur (« zone à MCH », noyaux hypothalamiques postérieur, supramammillaire et tubéromammillaire). Ces mêmes structures, ainsi que le noyau sous-thalamique, rattaché par certains auteurs à l'hypothalamus postérieur (Swanson, 2003), ont des projections topographiquement organisées sur le télencéphale basal en particulier sur le pallidum (Vertes et Kocsis, 1997 ; Leranth et Vertes, 2000), certaines se poursuivant vers le pallium (Risold et coll., 1997). Ces projections ont un trajet parallèle à celui des projections mésotélencéphaliques dans le *mfb*. On peut alors être tenté de diviser ce faisceau en deux portions : l'une dans l'hypothalamus postérieur, originellement constituée des fibres du *tpoc* et du *sot*, rassemblant les projections hypothalamiques descendantes vers la moelle ainsi que celles ascendantes vers le cortex cérébral et le télencéphale basal ; l'autre dans l'hypothalamus antérieur et préoptique, originellement constituée des fibres du *sot*, rassemblant les projections descendantes du télencéphale basal et empruntée par les projections ascendantes issues du mésencéphale ventral et de l'hypothalamus postérieur (Fig. 43).

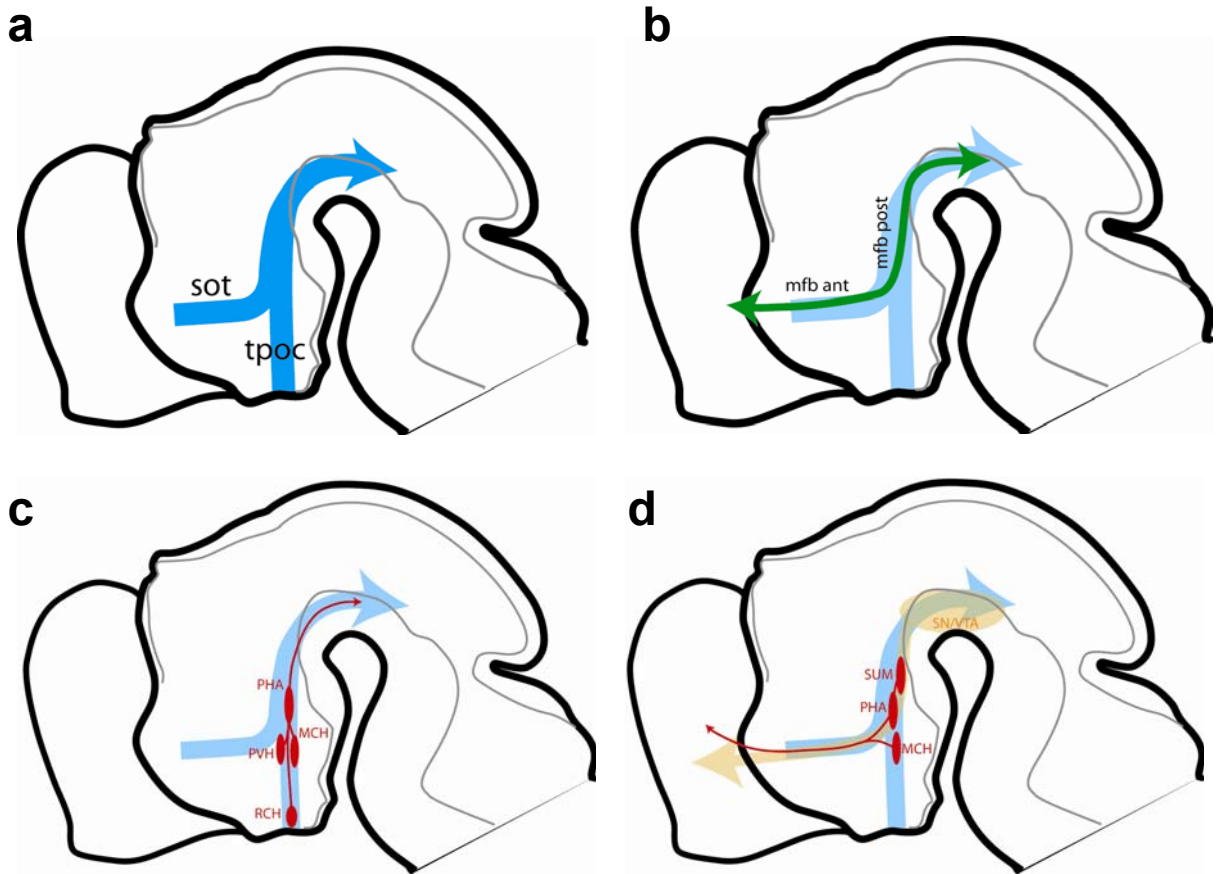


Fig. 43 : **a.** Représentation schématique du trajet du tractus de la commissure post-optique (*tpoc*) et du tractus supraoptique (*sot*) dans le diencéphale et le mésencéphale. **b.** D'après nos hypothèses (cf. texte), le faisceau médian du télencéphale (*mfb*) peut être divisé en deux parties : une partie postérieure alignée sur le *tpoc* et le *sot* ; une partie antérieure alignée sur le *sot*. **c.** Les groupes de neurones hypothalamiques projetant sur la moelle épinière, ainsi que les neurones à MCH, sont sur le trajet du *tpoc*. **d.** Les groupes de neurones hypothalamiques projetant sur l'isocortex et l'hippocampe sont aussi uniquement localisés dans l'hypothalamus postérieur et sur le trajet des projections de la SN/VTA vers le télencéphale.

Les travaux antérieurs du laboratoire démontrent l'existence de deux sous-populations de neurones à MCH : une première sous-population de neurones nés à E11 projetant vers la moelle épinière et une deuxième sous-population de neurones nés à E13 projetant vers le cortex cérébral (Brischoux F et coll., 2001). Ces derniers constituent 66% des neurones à MCH et contrairement aux premiers, ils expriment le récepteur NK3 et le peptide CART. En plus de leurs projections corticales, les neurones MCH/NK3+ sont à l'origine de projections topographiquement organisées sur les structures télencéphaliques basales contenant les principaux groupes cellulaires cholinergiques à projections corticales et également de projections vers diverses structures réticulées. Le facteur temps constitue donc un élément déterminant pour la différenciation de phénotypes spécifiques au sein de la population MCH. Dans ce travail, les premiers neurones à MCH sont détectés par immunohistochimie à E13, soit deux jours après leur pic de genèse. Les premières fibres MCH positives sont observées au même stade dans le *tpoc* à proximité du mésencéphale, ce que confirment les observations précédentes relatives aux projections des premiers neurones à MCH vers l'arrière du tube neural. Les neurones à MCH nés à E13 s'établissent alors que les axones mésotélencéphaliques progressent dans le *mf* à E14/15 et ces neurones innervent le télencéphale. Le facteur de transcription *Olf1* est abondamment exprimé dans le striatum, qui chez l'animal adulte contient de nombreux neurones exprimant CART ou NK3. Il est alors tentant de corréliser une induction plus tardive de *Olf1* dans la zone à MCH avec la différenciation du phénotype de la deuxième sous-population des neurones à MCH (à projection télencéphalique) et la croissance des axones mésostriés. Cette hypothèse demande cependant à être confirmée par des travaux complémentaires. Il serait intéressant de vérifier si les autres neurones hypothalamiques à projections corticales se différencient également tardivement par rapport aux neurones des mêmes structures projetant notamment dans la moelle. Enfin, nous avons précisé dans l'introduction que le stade E12 semble être un stade important dans la genèse du diencéphale, notamment de l'hypothalamus. Avant E12, les neurones à MCH projettent vers la moelle épinière, et après E12, vers le cortex cérébral. Ce stade E12 correspond également au pic de genèse des neurones à Hcr, qui sont susceptibles de projeter à la fois dans le cortex et la moelle. Cependant le stade E12 n'est pas corrélé à une modification de la distribution spatiotemporelle des facteurs de transcription tels que Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2. Il coïncide néanmoins avec une différenciation claire du manteau, donc des neurones et des premiers tractus de fibres.

DISCUSSION

GENERALE

I. « ZONE A MCH »

Le fait que la « zone à MCH » dérive d'un territoire particulier du neuroépithélium germinatif (Brischoux et coll., 2001) nous a conduit à supposer que cette zone devait constituer une entité neurologique susceptible d'être caractérisée par une cascade d'expression de gènes, distincte de celle des autres territoires hypothalamiques. Grâce à l'analyse des territoires d'expression de cinq gènes impliqués dans le développement du diencephale (Pax6, Nkx2.1, Nkx2.2, Olf1, Dlx), nous avons pu confirmer que la « zone à MCH » naît et se différencie dans un territoire caractérisé par l'expression d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription. Ainsi dès la naissance des premières cellules du manteau, au moins trois des gènes étudiés sont clairement exprimés dans ce territoire : il s'agit de Nkx2.1, Nkx2.2 et Dlx. Par ailleurs, nous supposons l'existence d'un effet répressif direct ou indirect du gène Pax6. Il est important de noter que les distributions spatiotemporelles observées pour ces gènes spécifiques au sein de la « zone à MCH » sont stables tout au long de la période de genèse de l'hypothalamus. Certes l'expression de Nkx2.2 faiblit à E15, mais ce stade correspond à la fin de la genèse des neurones à MCH. De plus, dans les régions voisines de la « zone à MCH », ces gènes ont des territoires d'expression combinée différents : ainsi les régions mamillaires sont Nkx2.1 positives, l'hypothalamus antérieur est Pax6 et Nkx2.2 positif mais Nkx2.1 négatif, et les régions préoptiques sont Nkx2.1 et Dlx positives. Par ailleurs, si la « zone à MCH » correspond approximativement aux aires tubérales dorsales, elle se distingue des aires tubérales ventrales et notamment du noyau ventromédian caractérisé par une masse compacte de cellules Nkx2.1 et Nkx2.2 positives aux stades E14-E16, par l'absence d'expression de Dlx dans ce dernier territoire.

II. CONCEPT DE DEVELOPPEMENT DE L'HYPOTHALAMUS

La caractérisation de la « zone à MCH » par l'expression spécifique de facteurs de transcription permet par comparaison de caractériser les régions voisines. L'interprétation de ces résultats, en rapport avec les données de la littérature sur la segmentation diencephalique, devrait aider à une meilleure compréhension de la structuration des différentes régions hypothalamiques.

En 1994, Rubenstein et Puelles proposaient une subdivision du cerveau antérieur en six régions neuromériques appelées prosomères. Les prosomères P1, P2, P3 constituent le diencephale, alors que les prosomères P4, P5, P6 forment l'hypothalamus (ventralement) et le télencéphale (dorsalement). Les frontières prosomériques coïncident avec l'expression de

plusieurs gènes importants pour la spécification neuronale. La frontière entre P2 et P3, qui correspond à la *zli* et qui exprime *Shh*, semble être essentielle à la mise en place du cerveau antérieur (Nieuwenhuys et coll., 1997). En 2003, Puelles et collaborateurs esquissent un modèle modifié dans lequel le prosencéphale (télencéphale et hypothalamus) est un protosegment complexe non subdivisé en prosomères ; par contre les prosomères P1 à P3 (prétegmentum, thalamus et préthalamus) constituent le « cerveau antérieur caudal ».

L'utilisation de marqueurs adultes tels que MCH et TH permet de caractériser précocément un territoire adulte présomptif au sein du manteau. Cette identification de structures adultes présomptives dans l'hypothalamus constitue un des points d'intérêt majeur de notre étude. Plusieurs de nos observations ne concordent pas avec les divisions de Puelles et collaborateurs. Tout d'abord pour ces auteurs, le plancher du prosomère P3 (correspondant au thalamus ventral ou préthalamus suivant leur nomenclature) est occupé par les champs de Forel. Or, les champs de Forel forment une structure classique du thalamus ventral, immédiatement adjacente à la *zona incerta* et comme cette dernière, riche en neurones GABAergiques. Par conséquent, si le plancher de P3 est constitué par ces neurones, le marquage *Dlx* devrait s'étendre jusqu'au plancher de ce « segment ». De plus, ce gène marque les territoires GABAergiques présomptifs dans le prosencéphale en général et dans le thalamus ventral en particulier. Par ailleurs, les champs de Forel ne sont pas en position ventrale chez l'animal adulte. Enfin sur nos coupes, nous n'avons pas observé d'espace correspondant aux champs de Forel entre la substance noire/l'aire tegmentale ventrale qui sont bien marquées par l'anticorps anti-TH et le corps mamillaire qui est *Nkx2.1* positif. Enfin le fait que la « zone à MCH » envahisse des territoires rostromédians de la *zona incerta* chez l'animal adulte (autour du noyau A13) indique que la « frontière prosomérique » P3-hypothalamus n'est pas strictement établie et que la zone de jonction *Pax6/Nkx2.2/Nkx2.1* acquière une certaine plasticité tardivement au cours du développement. Ces différents éléments nous ont incité à ne pas interpréter nos résultats dans le cadre de la théorie prosomérique.

Les anatomistes divisent classiquement l'hypothalamus en quatre zones antéropostérieures (préoptique à mamillaire). Les frontières de ces différentes divisions ont longtemps fait l'objet de controverses : la région préoptique a notamment longtemps balancée entre territoires télencéphaliques ventraux et hypothalamiques proprement dit, jusqu'à ce que des données hodologiques et fonctionnelles soulignent sa participation à des fonctions comportementales et neuroendocriniennes clairement associées à l'hypothalamus. Nos résultats concernant la

distribution des facteurs de transcription s'accordent assez bien avec cette partition. Chez l'embryon de rat, nous avons en effet remarqué que la distribution spatiotemporelle des gènes Pax6, Nkx, Dlx et Olf1 était compatible avec la caractérisation dans l'hypothalamus de mammifères des aires préoptique, antérieure, tubérale et postérieure/mamillaire (Fig. 44). Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2 sont exprimés dans le neuroépithélium avant la fermeture du tube neural, c'est-à-dire au stade de la plaque neurale. Pendant cette période très précoce, de nombreux phénomènes d'interactions moléculaires et d'inductions tissulaires ont lieu. Les mieux caractérisés concernent les territoires épichordaux, qui sont soumis à l'influence du tissu mésodermale constituant la chorde sous-jacente au neuroépithélium. Ces phénomènes sont liés à l'action de protéines morphogènes, telles que Shh ou les « Bone Morphogenetic Proteins » (BMPs) et conduisent à l'apparition de domaines longitudinaux d'expression de facteurs de transcription, et notamment des Nkx (dont Nkx2.2) et des Pax (dont Pax6), permettant de déterminer l'axe dorsoventral dans la moelle lors de la fermeture du tube. Au stade de la plaque neurale, l'hypothalamus occupe les territoires les plus antérieurs de la plaque. Cette région du neuroépithélium subit d'importantes modifications lors de la fermeture du tube : formation de la flexure céphalique ramenant l'hypothalamus en position ventrale suivant nos axes, formation de la vésicule prosencéphalique qui donnera ensuite les vésicules télencéphaliques et la vésicule diencéphalique. Mais l'hypothalamus est peut-être moins affecté par ces modifications qu'il ne l'est par la différenciation des vésicules optiques. Nonobstant, on retrouve dans l'hypothalamus des territoires longitudinaux d'expression des gènes précoces, qui rappellent ceux décrits pour les régions épichordales. Les territoires antérieurs de la plaque neurale sont situés en position préchordale et les influences du mésoderme sous-jacent sont moins bien comprises. Des auteurs ont tenté grâce à la distribution de ces gènes de retrouver l'axe dorsoventral et ils ont ainsi défini une plaque alaire et une plaque basale dans le prosencéphale comme dans la moelle. Cependant comme indiqué précédemment pour le *sulcus limitans*, il n'existe aucun consensus à ce sujet. En fait, nos observations sembleraient plutôt indiquer que les différentes régions d'expression des gènes reflètent l'organisation antéro-postérieure de l'hypothalamus. Ces territoires préoptique, antérieur, tubéral et mamillaire de l'hypothalamus pourraient donc être la résultante de phénomènes d'inductions et d'interactions moléculaires dès le stade de la plaque neurale. Chez les vertébrés, la division de l'hypothalamus en aires antéro-postérieures similaires, comme cela a été décrit chez les mammifères, n'est donc pas surprenante (Squire et coll., 1999).

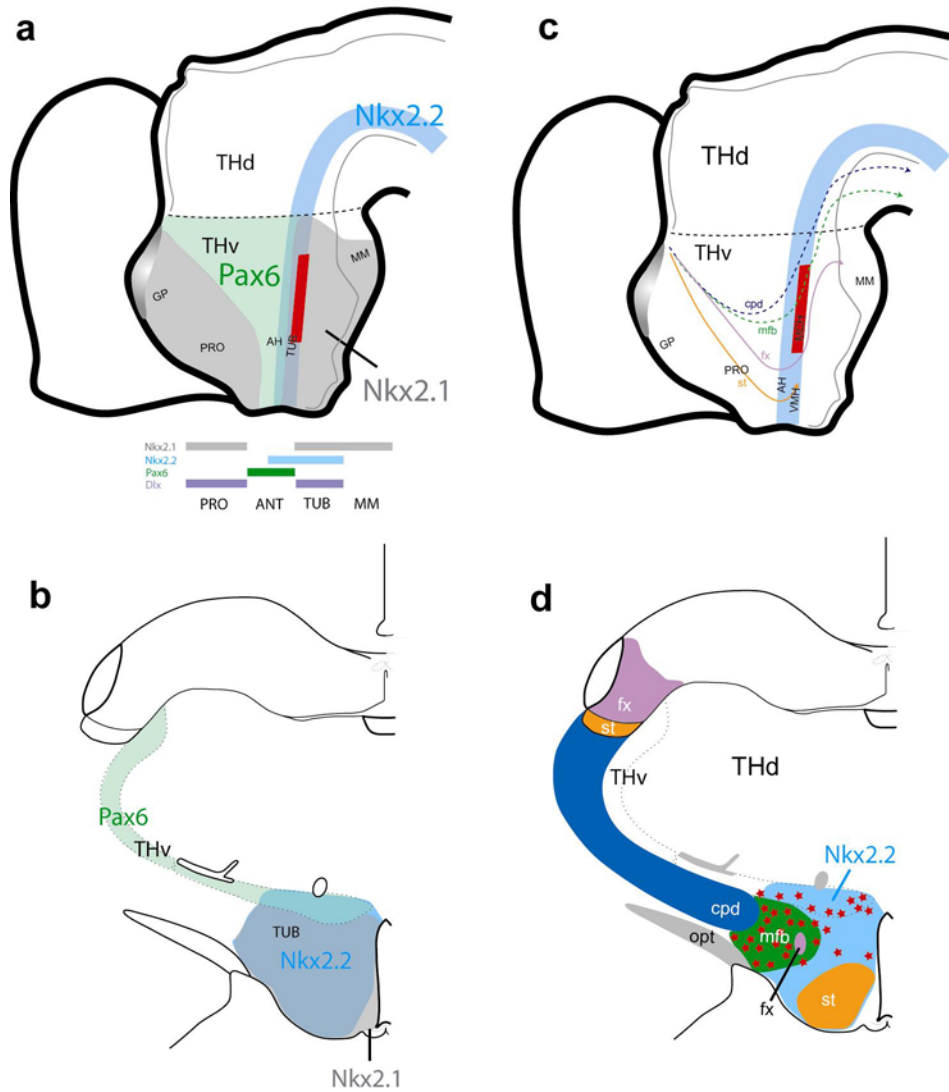


Fig. 44 : **a.** Représentation schématique de la distribution des facteurs de transcription Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2 dans les régions préoptique, antérieure, tubérale et mamillaire présomptives de l'hypothalamus sur un schéma sagittal du diencephale embryonnaire de rat. Les barres de couleur illustrent les combinaisons d'expression de ces mêmes gènes et de Dlx dans les quatre aires antéropostérieures de l'hypothalamus (préoptique, antérieure, tubérale et mamillaire). Noter que la « zone à MCH » (en rouge) est originaire d'une très fine bande Nkx2.1, Nkx2.2 et Dlx positive. **b.** Illustration schématique de la part relative d'expression de Pax6, Nkx2.1 et Nkx2.2 sur une coupe transversale du diencephale de rat adulte passant par l'hypothalamus tubéral (« zone à MCH »). [Comparer avec **d**]. **c.** Représentation schématique de la distribution topographiquement organisée des tractus de fibres originaires du télencéphale dans l'hypothalamus. Ces tractus, suivant leur origine (cf. texte), traversent et/ou innervent des territoires distincts de l'hypothalamus : la strie terminale (st) traverse les aires préoptiques, antérieures et tubérales ventrales ; le fornix (fx) innerve les noyaux mamillaires et souligne la frontière antérieure et ventrale de la « zone à MCH » (en rouge) ; le faisceau médian du télencéphale (mfb) traverse les territoires hypothalamiques dorsaux/latéraux vers le télencéphale ; le pédoncule cérébral (cpd) longe latéralement l'hypothalamus dorsal et le thalamus ventral également en direction du tronc cérébral. **d.** Illustration de la distribution de ces tractus sur une coupe frontale du diencephale de rat adulte passant par la « zone à MCH ». Noter les neurones à MCH (symbolisés par des étoiles rouges) ; le domaine d'expression de Nkx2.2 (en bleu clair) chez l'embryon ; la strie terminale (en orange) : elle innerve abondamment la région ventromédiane de l'hypothalamus tubéral ; le fornix (en violet) ; le faisceau médian du télencéphale (en vert) et le pédoncule cérébral (en bleu foncé).

Les auteurs divisent également l'hypothalamus en trois zones longitudinales (périvericulaire à latérale). Notre étude de l'analyse de l'expression de plusieurs facteurs de transcription et du peptide MCH n'aide pas à leur caractérisation. En fait, la compréhension de la différenciation de ces aires nécessite de prendre en considération les données exposées dans l'introduction concernant l'anatomie comparée du système à MCH et la différenciation des premiers tractus de fibres. En effet chez les mammifères, le système à MCH est dit « de l'hypothalamus latéral ». En 2001, les travaux de Brischoux et collaborateurs ont montré que le système à MCH s'étend dans une zone de tissu depuis le troisième ventricule jusque dans les aires latérales entre les fibres du *mfh*, et les travaux d'anatomie comparée ont montré que chez les vertébrés dits « inférieurs », ces neurones sont périvericulaires : ainsi chez la lamproie ou la grenouille, bien qu'un hypothalamus postérieur soit différencié, il n'existe pas de neurones latéraux. La différenciation de neurones latéraux résulte donc de la migration depuis les régions ventriculaires de neurones qui vont ensuite coloniser les aires latérales et cette migration doit s'effectuer pendant le développement chez les mammifères. Ces constatations sont véritablement en accord avec l'hypothèse d'une « zone à MCH » en tant qu'entité neurologique. Ces mêmes constatations ainsi que nos observations sont aussi en accord avec les travaux d'Altman et Bayer qui ont décrit en 1986 les zones latérales de l'hypothalamus comme naissant des territoires dorsaux du neuroépithélium hypothalamique. Les neurones magnocellulaires du noyau supraoptique suivent le même courant de migration dans l'hypothalamus antérieur à partir des territoires du neuroépithélium générant aussi le noyau paraventriculaire (Fig. 4 e).

Notre raisonnement peut-il aussi concerner la zone médiane de l'hypothalamus ? En 1986, Altmann et Bayer indiquaient que le noyau antérieur de l'hypothalamus est généré à partir « d'une composante rostrale de l'hypothalamus antérieur », alors que le noyau ventromédian est généré à partir « d'une composante caudale de l'hypothalamus antérieur ». D'après notre étude, le noyau ventromédian naît clairement de la zone du neuroépithélium coexprimant *Nkx2.1* et *Nkx2.2* en situation ventrale par rapport à la zone coexprimant ces deux gènes et générant les neurones à MCH. Le noyau antérieur naît dans les aires juste rostrales, qui par déduction doivent correspondre chez l'embryon à des territoires *Pax6/Nkx2.2* positifs. Nombreuses sont les données de la littérature indiquant que les noyaux de la zone médiane de l'hypothalamus, dont les noyaux antérieur et ventromédian, sont interconnectés et forment une unité fonctionnelle dont l'appellation anglo-saxonne est « the behavioral control column » (Swanson, 2000). La caractéristique essentielle de ces noyaux relève du fait qu'ils sont traversés et innervés par la strie terminale par laquelle transitent des fibres de l'amygdale

(Petrovich et coll., 2001). Ce tractus conduit des informations phéromonales et olfactives aux noyaux hypothalamiques préoptique, antérieur et ventromédian, qui sont impliqués dans l'initiation des comportements liés à la reproduction. Si l'hypothalamus latéral/dorsal occupe le lit du *mf*, la zone médiane de l'hypothalamus est, quant à elle, dépendante de la strie terminale. Le fornix, qui connecte le subiculum dorsal aux noyaux mamillaires, marque la frontière antérieure et ventrale de la « zone à MCH ». Cette observation reflète l'organisation topographique des projections descendantes du télencéphale sur le diencephale chez les mammifères. Les tractus correspondants sont moins bien ou ne sont pas individualisés chez les vertébrés « inférieurs ». Chez les mammifères, les neurones issus du neuroépithélium autour du III^{ème} ventricule et destinés à donner l'hypothalamus latéral et médian, migrent et s'installent entre les fibres et interagissent avec ces tractus.

Quant à la zone périventriculaire de l'hypothalamus, elle est caractérisée par les liens privilégiés des neurones, qui y sont distribués, avec les organes circumventriculaires et en particulier avec l'éminence médiane et/ou le lobe nerveux de l'hypophyse. Jusqu'à quel point est-il possible d'associer système neuroendocrinien et zone périventriculaire ? Nous rappellerons en effet la localisation des neurones magnocellulaires dans le noyau supraoptique ou des neurones à GnRH (« gonadotrophin-releasing hormone ») dans le septum, mais nous retiendrons néanmoins leurs liens étroits avec les organes circumventriculaires. Le caractère phylogénétiquement ancien des neurones neuroendocrines ne sera pas discuté dans ce travail.

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

Des études antérieures ont montré que la « zone à MCH » est générée à partir d'une région spécifique du neuroépithélium germinatif. Dans ce travail, nous confirmons cette observation et nous montrons que cette zone résulte de l'expression d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription. Cependant nos observations peuvent aussi être interprétées dans le contexte beaucoup plus large de l'organisation anatomique de l'hypothalamus. En effet, nos résultats nous semblent plus faciles à expliquer dans le cadre de la division classique de l'hypothalamus en quatre territoires rostrocaudaux tels qu'ils ont été décrits par les auteurs du XX^{ème} siècle, que dans le sens d'une théorie de division prosomérique du diencephale. D'après la littérature, des gènes de la famille des Pax et Nkx sont impliqués dans des processus fondamentaux du développement et leurs domaines d'expression résultent de phénomènes d'inductions moléculaires dès le stade de la plaque neurale. Ainsi au cours des stades embryonnaires précoces, la distribution des facteurs de transcription étudiés dans ce travail permet déjà d'identifier des territoires hypothalamiques préoptique à postérieur. Par contre, la différenciation médiolatérale de l'hypothalamus résulterait de processus plus tardifs, impliquant à la fois des phénomènes de migration de cellules et leurs interactions coordonnées avec des facteurs extrinsèques qui pourraient être associés à la différenciation de tractus de fibres connectant le télencéphale et le tronc cérébral. Les neurones à MCH semblent constituer un bon outil pour l'étude de ces phénomènes, puisqu'ils sont détectés précocement. Par ailleurs, leur phénotype change suivant le stade durant lequel ils sont générés.

Nous envisageons de poursuivre nos travaux visant à associer la différenciation chimique à la différenciation morphologique/cytoarchitectonique de l'hypothalamus.

Nous continuerons donc d'identifier, par immunohistochimie et hybridation *in situ*, les facteurs susceptibles d'intervenir dans ces interactions et nous comparerons leur distribution spatiotemporelle à celle des neurones à MCH au cours du développement. Deux familles de molécules feront l'objet de ces investigations : le facteur diffusible Shh et les facteurs de transcription de la famille des LIM. En effet, d'après la littérature, Shh est un facteur morphogène exprimé dans le diencephale et il induit l'expression des gènes Nkx. Les gènes de la famille des LIM interviennent, quant à eux, dans la genèse de neurones spécifiques dans le prosencéphale et leur zone d'expression diencephalique est compatible avec celle des neurones à MCH.

Parallèlement, nous souhaiterions identifier l'effet de l'inactivation de certains de ces gènes sur la morphogénèse du diencephale et en particulier de la « zone à MCH ». Ces travaux ont été initiés par l'étude des cerveaux de souris mutées pour le gène Pax6. Nous avons ainsi pu constater une expression ectopique de MCH dans des territoires voisins du thalamus, ce qui

semblait indiquer l'existence d'un effet répressif direct ou indirect du gène Pax6 sur la différenciation du phénotype MCH. Ces travaux devraient également porter sur des animaux Nkx2.1-/-, Nkx2.2-/- et Shh-/-.

Des observations pourront également être effectuées sur matériel embryonnaire humain, dont l'obtention va nécessiter l'accord des autorités compétentes.

Nos travaux viseront également à préciser les phénomènes de prolifération/migration cellulaire et de croissance axonale aboutissant à la formation de l'hypothalamus postérieur et en particulier de la « zone à MCH ».

La stratégie envisagée est une analyse séquentielle de la coexpression de BrdU, de MCH et de plusieurs facteurs de transcription (Nkx2.1, Nkx2.2 et Pax6) sur des embryons de rat aux stades E11, E13 et E15, prélevés 2, 6, 12 et 24 heures après l'injection à une femelle gestante d'une solution de BrdU. Ces observations seront également analysées en rapport avec la différenciation des tractus de fibres tels que le *tpoc*, qui est le premier tractus longitudinal différencié dans le prosencéphale, et le *mfb*. Ce travail nous permettra de mieux comprendre les phénomènes de prolifération cellulaire au sein du neuroépithélium et de migration des neurones jusqu'à l'obtention de leur phénotype différencié. Il permettra aussi de mieux comprendre la mise en place des sous-populations de neurones à MCH caractérisées par leurs projections, voire la mise en place de l'hypothalamus postérieur dans son ensemble.

Une approche *in vitro* visant à étudier l'effet des divers gènes d'intérêt sur la mise en place de connexions spécifiques entre les territoires télencéphalique et hypothalamique pourra compléter cette étude : elle consistera en des cocultures d'explants mésencéphaliques et télencéphaliques d'embryons aux mêmes stades (par exemple des explants hypothalamique à E11 et mésencéphalique/télencéphalique à E11) ou à des stades différents (par exemple des explants hypothalamique à E11 et mésencéphalique/télencéphalique à E13). L'établissement de projections entre les différents explants pourra être mise en évidence par immunohistochimie à l'aide d'anticorps anti-MCH, anti-NF ou anti-tubuline III ou par l'utilisation de DiI. Ces expériences pourront également être effectuées à partir d'explants hypothalamiques de souris GFP (« green fluorescent protein »)-positives.

Elles pourront être poursuivies par l'analyse en culture de l'effet d'une inhibition de la synthèse de facteurs de transcription.

La poursuite de ces travaux doit nous permettre d'accéder à une meilleure compréhension de l'organisation anatomique et fonctionnelle de l'hypothalamus chez les mammifères, ce qui constitue une étape essentielle à la compréhension du plan fondamental d'organisation du prosencéphale chez les vertébrés.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

ABRAHAMSON EE, LEAK RK, MOORE RY

The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems.
Neuroreport 2001 ; 12 : 435-440.

ALTMAN J, BAYER SA

Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons.
J Comp Neurol 1978 ; 182 : 973-994.

ALTMAN J, BAYER SA

Development of the diencephalon in the rat. III. Ontogeny of the specialized ventricular linings of the hypothalamic third ventricle.
J Comp Neurol 1978 ; 182 : 995-1016.

ALTMAN J, BAYER SA

The development of the rat hypothalamus.
In : BECK F, HILD W, ORTMANN R, PAULY JE, SCHIEBLER TH, Eds.
Advances in anatomy, embryology and cell biology. Vol 100.
Berlin : Springer-Verlag, 1986.

ALVAREZ-BOLADO G, SWANSON LW

Developmental brain maps : structure of the embryonic rat brain.
Amsterdam : Elsevier, 1996.

AMIOT C, MUSARD JF, HADJIYIASSEMIS M, JOUVENOT M, FELLMANN D, RISOLD PY, ADAMI P

Expression of the secreted FAD-dependant sulfydryl oxidase (QSOX) in the guinea pig central nervous system.
Brain Res Mol Brain Res 2004 ; 125 : 13-21.

AMIOT C, BRISCHOUX F, COLARD C, LA ROCHE A, FELLMANN D, RISOLD PY

Hypocretin/orexin-containing neurons are produced in one sharp peak in the developing ventral diencephalon.
Eur J Neurosci 2005 ; 22 : 531-534.

ANDERSON SA, QIU M, BULFONE A, EISENSTAT DD, MENESES J, PEDERSEN R, RUBENSTEIN JL

Mutations of the homeobox genes Dlx-1 and Dlx-2 disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons.
Neuron 1997 ; 19 : 27-37.

ANDERSON S, MIONE M, YUN K, RUBENSTEIN JL

Differential origins of neocortical projection and local circuit neurons : role of Dlx genes in neocortical interneuronogenesis.
Cereb Cortex 1999 ; 9 : 646-654.

ANDREWS GL, MASTICK GS

R-Cadherin is a Pax6-regulated, growth-promoting cue for pioneer axons.
J Neurosci 2003 ; 23 : 9873-9880.

ANDREWS GL, YUN K, RUBENSTEIN JL, MASTICK GS

Dlx transcription factors regulate differentiation of dopaminergic neurons of the ventral thalamus.

Mol Cell Neurosci 2003 ; 23 : 107-120.

BAKER BI

Melanin-concentrating hormone updated: functional considerations.

Trends Endocrinol Metab 1994 ; 5 : 120-126.

BAKER BI, BIRD DJ

The biosynthesis of melanin-concentrating hormone in trout kept under different conditions of background colour and stress, as determined by an in vitro method.

J Neuroendocrinol 1992 ; 4 : 673-679.

BAKER BI, BIRD DJ, BUCKINGHAM JC

Effects of chronic administration of melanin-concentrating hormone on corticotrophin, melanotrophin, and pigmentation in the trout.

Gen Comp Endocrinol 1986 ; 63 : 62-69.

BENTLEY CA, ZIDEHSARAI MP, GRINDLEY JC, PARLOW AF, BARTH-HALL S, ROBERTS VJ

Pax6 is implicated in murine pituitary endocrine function.

Endocrine 1999 ; 10 : 171-177.

BERGQUIST H

Studies on the cerebral tube in vertebrates. The neuromeres.

Acta Zool (Stockholm) 1952 ; 33 : 117-187.

BERGQUIST H, KALLEN B

Notes on the early histogenesis and morphogenesis of the central nervous system in vertebrates.

J Comp Neurol 1954 ; 100 : 627-659.

BITTENCOURT JC, PRESSE F, ARIAS C, PETO C, VAUGHAN J, NAHON JL, VALE W, SAWCHENKO PE

The melanin-concentrating hormone system of the rat brain : an immuno- and hybridization histochemical characterization.

J Comp Neurol 1992 ; 319 : 218-245.

BLUET-PAJOT MT, PRESSE F, VOKO Z, HOEGER C, MOUNIER F, EPELBAUM J, NAHON J-L

Neuropeptide-E-I antagonizes the action of melanin-concentrating hormone on stress-induced release of adrenocorticotropin in the rat.

J Neuroendocrinol 1995 ; 7 : 297-303.

BRISCHOUX F, CVETKOVIC V, GRIFFOND B, FELLMANN D, RISOLD PY

Time of genesis determines projection and neurokinin-3 expression patterns of diencephalic MCH neurons containing melanin-concentrating hormone.

Eur J Neurosci 2002 ; 16 : 1672-1680.

BRISCHOUX F, FELLMANN D, RISOLD PY

Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons : a hypothalamic 'MCH area' hypothesis.

Eur J Neurosci 2001 ; 13 : 1733-1744.

BRISCHOUX F, GRIFFOND B, FELLMANN D, RISOLD PY

Early and transient ontogenetic expression of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in the rat mesencephalon : correlation with tyrosine hydroxylase expression.

J Neurobiol 2002 ; 52 : 221-229.

BRISCOE J, ERICSON J

Specification of neuronal fates in the ventral neural tube.

Curr Opin Neurobiol 2001 ; 11 : 43-49.

BUGNON C, BAHJAOUI M, FELLMANN D

A simple method for coupling in situ hybridization and immunocytochemistry : application to the study of peptidergic neurons.

J Histochem Cytochem 1991 ; 39 : 859-862.

BULFONE A, KIM H-J, PUELLES L, PORTEUS MH, GRIPPO JF, RUBENSTEIN JL

The mouse *Dlx-2* (*Tes-1*) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in midgestation mouse embryos.

Mech Dev 1993 ; 40 : 129-140.

BULFONE A, PUELLES L, PORTEUS MH, FROHMAN MA, MARTIN GR, RUBENSTEIN JL

Spatially restricted expression of *Dlx-1*, *Dlx-2* (*tes-1*), *Gbx-2*, and *Wnt-3* in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries.

J Neurosci 1993 ; 13 : 3155-3172.

CHENG L, CHEN CL, LUO P, TAN M, QIU M, JOHNSON R, MA Q

Lmx1b, *Pet-1*, and *Nkx2.2* coordinately specify serotonergic neurotransmitter phenotype

J Neurosci 2003 ; 23 : 9961-9967

CORBIN JG, RUTLIN M, GAIANO N, FISHELL G

Combinatorial function of the homeodomain proteins *Nkx2.1* and *Gsh2* in ventral telencephalic patterning.

Development 2003 ; 130 : 4895-4906.

CROSBY EC, WOODBURNE RT

The comparative anatomy of the preoptic area and the hypothalamus.

Assoc Res Nerv Ment Dis 1940 ; 20 : 52-169.

CVETKOVIC V, BRISCHOUX F, JACQUEMARD C, FELLMANN D, GRIFFOND B, RISOLD PY

Characterization of subpopulations of neurons producing melanin-concentrating hormone in the rat ventral diencephalon.

J Neurochem 2004 ; 91 : 911-919.

DAIKOKU S, OKAMURA Y, KAWANO H, TSURUO Y, MAEGAWA M, SHIBASAKI T

CRF-containing neurons of the rat hypothalamus.
Cell Tissue Res 1985 ; 240 : 575-584.

DAVIS J, REED RR

Role of Olf-1 and Pax-6 transcription factors in neurodevelopment.
J Neurosci 1996 ; 16 : 5082-5094.

DE LECEA L, KILDUFF TS, PEYRON C, GAO X, FOYE PE, DANIELSON PE, FUKUHARA C, BATTENBERG EL, GAUTVIK VT, BARTLETT FS, FRANKEL WN, VAN DER POL AN, BLOOM FE, GAUTVIK KM, SUTCLIFFE JG

The hypocretins : hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity.
Proc Natl Acad Sci USA 1998 ; 95 : 322-327.

DE MELO J, DU G, FONSECA M, GILLESPIE L-A, TURK WJ, RUBENSTEIN JL, EISENSTAT DD

Dlx1 and Dlx2 function is necessary for terminal differentiation and survival of late-born retinal ganglion cells in the developing mouse retina.
Development 2004 ; 132 : 311-322.

DERAY A, GRIFFOND B, COLARD C, JACQUEMARD C, BUGNON C, FELLMANN D

Activation of the rat melanin-concentrating hormone neurons by ventromedial hypothalamic lesions.
Neuropeptides 1994 ; 27 : 185-194.

DING M, ROBEL L, JAMES AJ, EISENSTAT DD, LECKMAN JF, RUBENSTEIN JL, VACCARINO FM

Dlx-2 homeobox gene controls neuronal differentiation in primary cultures of developing basal ganglia.
J Mol Neurosci 1997 ; 8 : 93-113.

DUBOIS L, VINCENT A

The COE-Collier/Olf1/EBF-transcription factors : structural conservation and diversity of developmental functions.
Mech Dev 2001 ; 108 : 3-12.

EISENSTAT DD, LIU JK, MIONE M, ZHONG W, YU G, ANDERSON SA, GHATTAS I, PUELLES L, RUBENSTEIN JL

DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation.
J Comp Neurol 1999 ; 414 : 217-237.

EASTER SS Jr, ROSS LS, FRANKFURTER A

Initial tract formation in the mouse brain
J Neurosci 1993 ; 13 : 285-299.

FELLMANN D, BUGNON C, RISOLD PY

Unrelated peptide immunoreactivities coexist in neurons of the rat lateral dorsal hypothalamus : human growth hormone-releasing factor1-37-, salmon melanin-concentrating hormone- and α -melanotropin-like substances.

Neurosci Lett 1987 ; 74 : 275-280.

FELLMANN D, BUGNON C, VERSTEGEN J, LAVRY GN

Coexpression of human growth hormone-releasing factor 1-37-like and α -melanotropin-like immunoreactivities in neurones of the rat lateral dorsal hypothalamus.

Neurosci Lett 1986 ; 68 : 122-126.

FELLMANN D, BRESSON J-L, BRETON C, BAHJAOUI M, ROUILLON A, GOUGET A, BUGNON C

Cloning of cDNAs encoding a rat neuropeptide immunologically related to salmon melanin-concentrating hormone.

Neurosci Lett 1989 ; 106 : 23-28.

FERNANDEZ AS, PIEAU C, REPERANT J, BONCINELLI E, WASSEF M

Expression of the Emx-1 and Dlx-1 homeobox genes define three molecularly distinct domains in the telencephalon of mouse, chick, turtle and frog embryos : implications for telencephalic subdivisions in amniotes.

Development 1998 ; 125 : 2099-2111.

FIGDOR MC, STERN CD

Segmental organization of embryonic diencephalon.

Nature 1993 ; 363 : 630-634.

FOSTER GA

Chemical neuroanatomy of the prenatal rat brain. A developmental atlas.

Oxford : Oxford University Press, 1998.

FU H, QIU M

Migration and differentiation of Nkx-2.2+ oligodendrocyte progenitors in embryonic chicken retina.

Brain Res Dev Brain Res 2001 ; 129 : 115-118.

FU H, CAI J, RUTLEDGE M, HU X, QIU M

Oligodendrocytes can be generated from the local ventricular and subventricular zones of embryonic chicken midbrain.

Brain Res Dev Brain Res 2003 ; 143 : 161-165.

GARCIA-DOMINGUEZ M, POQUET C, GAREL S, CHARNAY P

Ebf gene function is required for coupling neuronal differentiation and cell cycle exit.

Development 2003 ; 130 : 6013-6025.

GAREL S, MARIN F, GROSSCHEDL R, CHARNAY P

Ebf1 controls early cell differentiation in the embryonic striatum.

Development 1999 ; 126 : 5285-5294.

GAREL S, YUN K, GROSSCHEDL R, RUBENSTEIN JL

The early topography of thalamocortical projections is shifted in Ebf1 and Dlx1/2 mutant mice.

Development 2002 ; 129 : 5621-5634

GEHRING WJ

Homeo boxes in the study of development.

Science 1987 ; 236 : 1245-1252.

GONZALEZ A, LOPEZ JM, MARIN O

Expression pattern of the homeobox protein NKX2-1 in the developing Xenopus forebrain.

Brain Res Gene Expr Patterns 2002 ; 1 : 181-185

GRATZNER HG

Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine : a new reagent for detection of DNA replication.

Science 1982 ; 218 : 474-475.

GRIFFOND B, BAKER BI

Cell and molecular cell biology of melanin-concentrating hormone.

Int Rev Cytol 2002 ; 213 : 233-277.

GRIFFOND B, GRILLON S, DUVAL J, COLARD C, JACQUEMARD C, DERAY A, FELLMANN D

Occurrence of secretogranin II in the prolactin-immunoreactive neurons of the rat lateral hypothalamus : an in situ hybridization and immunohistochemical study.

J Chem Neuroanat 1995 ; 9 : 113-119.

GRIFFOND B, RISOLD PY, FELLMANN D

Anatomical and functional insights on the diencephalic MCH system.

In : KNIGGE K, PRASAD A, PRETEL S, WAGNER JE, Eds.

MCH and seizures : neuromolecular and neuroendocrine aspects.

Trivandrum : Research Signpost, 1997b : 69-86.

GRILLON S, HERVE C, GRIFFOND B, FELLMANN D

Exploring the expression of the melanin-concentrating hormone messenger RNA in the rat lateral hypothalamus after goldthioglucose injection.

Neuropeptides 1997 ; 31 : 131-136.

HARRIS GC, ASTON-JONES G

Arousal and reward : a dichotomy in orexin function.

Trends Neurosci 2006 ; 29 : 571-577.

HARTIGAN DJ, RUBENSTEIN JL

The cDNA sequence of murine Nkx-2.2.

Gene 1996 ; 168 : 271-272.

HAUBST N, BERGER J, RADJENDIRANE V, GRAW J, FAVOR J, SAUNDERS GF, STOYKOVA A, GOTZ M

Molecular dissection of Pax6 function : the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development.

Development 2004 ; 131 : 6131-6140.

HILL RE, FAVOR J, HOGAN BL, TON CC, SAUNDERS GF, HANSON IM, PROSSER J, JORDAN T, HASTIE ND, VAN HEYNINGEN V

Mouse Small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene.

Nature 1991 ; 354 : 522-525.

HOLLAND PW, TAKAHASHI T

The evolution of homeobox genes: implications for the study of brain development.

Brain Res Bull 2005 ; 66 : 484-490.

ISHIBASHI M, McMAHON AP

A sonic hedgehog-dependent signaling relay regulates growth of diencephalic and mesencephalic primordia in the early mouse embryo.

Development 2002 ; 129 : 4807-4819.

JEZOVA D, BARTANUSZ V, WESTERGREN I, JOHANSSON BB, RIVIER J, VALE W, RIVIER C

Rat melanin-concentrating hormone stimulates adrenocorticotropin secretion: evidence for a site of action in brain regions protected by the blood-brain barrier.

Endocrinology 1992 ; 130 : 1024-1029.

JONES L, LOPEZ-BENDITO G, GRUSS P, STOYKOVA A, MOLNAR Z

Pax6 is required for the normal development of the forebrain axonal connections.

Development 2002 ; 129 : 5041-5052.

JU MJ, AROCA P, LUO J, PUELLES L, REDIES C

Molecular profiling indicates avian branchiomotor nuclei invade the hindbrain alar plate.

Neuroscience 2004 ; 128 : 785-796.

KALSBECK A, VOORN P, BUIJS RM

Development of dopamine-containing systems in the CNS.

In : BJÖRKLUNG A, HÖKFELT T, TOHYAMA M

Handbook of chemical neuroanatomy. Volume 10: Ontogeny of transmitters and peptides in the CNS.

Amsterdam : Elsevier, 1992. p. 63-112.

KAWANO H, FUKUDA T, KUBO K, HORIE M, UYEMURA K, TAKEUCHI K, OSUMI N, ETO K, KAWAMURA K

Pax-6 is required for thalamocortical pathway formation in fetal rats.

J Comp Neurol 1999 ; 408 : 147-160.

KIECKER C, LUMSDEN A

Hedgehog signaling from the ZLI regulates diencephalic regional identity.

Nat Neurosci 2004 ; 7 : 1242-1249

KILDUFF TS, PEYRON C

The hypocretin/orexin ligand-receptor system : implications for sleep and sleep disorders.
Trends Neurosci 2000 ; 23 : 359-365.

KIOUSSI C, O'CONNELL S, St-ONGE L, TREIER M, GLEIBERMAN AS, GRUSS P, ROSENFELD MG.

Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development.
PNAS 1999 ; 96 : 14378-14382.

KITAMURA K, MIURA H, YANAZAWA M, MIYASHITA T, KATO K

Expression patterns of Brx1 (Rieg gene), Sonic hedgehog, Nkx2.2, Dlx1 and Arx during zona limitans intrathalamica and embryonic ventral lateral geniculate nuclear formation.
Mech Dev 1997 ; 67 : 83-96.

KNOLLEMA S, BROWN ER, VALE W, SAWCHENKO PE

Novel hypothalamic and preoptic sites of prepromelanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid and peptide expression in lactating rats.
J Neuroendocrinol 1992 ; 4 : 709-717.

LABATUT R, RICHARD F, MILNE B, QUINTIN L, LECESTRE D, PUJOL JF

Long-term effects of RU24722 on tyrosine hydroxylase of the rat brain.
J Neurochem 1988 ; 51 : 1367-74.

LARSEN CW, ZELTSER LM, LUMSDEN A

Boundary formation and compartition in the avian diencephalons.
J Neurosci 2001 ; 21 : 4699-4711.

LAU SK, LUTHRINGER DJ, EISEN RN

Thyroid transcription factor-1: a review.
Appl Immunohistochem Mol Morphol 2002 ; 10 : 97-102.

LAZZARO D, PRICE M, DE FELICE M, DI LAURO R

The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain.
Development 1991 ; 113 : 1093-1104.

LE GROS CLARK WE

Morphological aspects of the hypothalamus.
In : LEGROS CLARK WE, BEATTIE J, RIDDOCH G, DOTT NM, Eds.
The hypothalamus. Morphological, functional, clinical and surgical aspects.
Edinburgh : Oliver and Boyd, 1938 : 1-68.

LERANTH C, VERTES RP

Neuronal networks that control the septal pacemaker system : synaptic interconnections between the septal complex, hippocampus, supramammillary area, and median raphe.
In : The Behavioral Neuroscience of the Septal Region. R Neuman Ed.
New York : Springer-Verlag, 2000. p. 15-47.

LIBERG D, SIGVARDSSON M, AKERBLAD P

The EBF/Olf/Collier family of transcription factors : regulators of differentiation in cells originating from all three embryonal germ layers.

Mol Cell Biol 2002 ; 22 : 8389-8397.

LIU JK, GHATTAS I, LIU S, CHEN S, RUBENSTEIN JL

Dlx genes encode DNA-binding proteins that are expressed in an overlapping and sequential pattern during basal ganglia differentiation.

Dev Dyn 1997 ; 210 : 498-512.

LOBO MK, KARSTEN SL, GRAY M, GESCHWIND DH, YANG XW

FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains.

Nat Neurosci 2006 ; 9 : 443-452.

LOSIER BJ, SEMBA K

Dual projections of single cholinergic and aminergic brainstem neurons to the thalamus and basal forebrain in the rat.

Brain Res 1993 ; 604 : 41-52.

LUMSDEN A, KRUMLAUF R

Patterning the Vertebrate Neuroaxis.

Science 1996 ; 274 : 1109-1115.

MANUEL M, PRICE DJ

Role of Pax6 in forebrain regionalization.

Brain Res Bull 2005 ; 66 : 387-393.

MARCUS RC, SHIMAMURA K, SRETAVAN D, LAI E, RUBENSTEIN JL, MASON CA

Domains of regulatory gene expression and the developing optic chiasm : correspondence with retinal axon paths and candidate signaling cells.

J Comp Neurol 1999 ; 403 : 346-358.

MARTYNSKA L, WOLINSKA-WITORT E, CHMIELOWSKA M, BIK W, BARANOWSKA B

The physiological role of orexins.

Neuro Endocrinol Lett 2005 ; 26 : 289-292.

MARIN O, BAKER J, PUELLE L, RUBENSTEIN LR

Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections.

Development 2002 ; 129: 761-773.

MARKAKIS EA, SWANSON LW

Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system.

Brain Res Brain Res Rev 1997 ; 24 : 255-291.

MASTICK GS, EASTER SS Jr

Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain.
Dev Biol 1996 ; 173 : 79-94.

MASTICK GS, DAVIS NM, ANDREW GL, EASTER SS Jr

Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain.
Development 1997 ; 124 : 1985-1997.

MASTICK GS, ANDREW GL

Pax6 regulates the identity of embryonic diencephalic neurons.
Mol Cell Neurosci 2001 ; 17 : 190-207.

MEEKER ML, FAREL PB

Coincidence of Schwann cell-derived basal lamina development and loss of regenerative specificity of spinal motoneurons.
J Comp Neurol 1993 ; 329 : 257-268.

MERLO GR, ZEREGA B, PALEARI L, TROMBINO S, MANTERO S, LEVI G

Multiple functions of Dlx genes.
Int J Dev Biol 2000 ; 44 : 619-626.

MILLER MW, NOWAKOWSKI RS

Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system.
Brain Res 1988 ; 457 : 44-52.

NAHON JL

The melanin-concentrating hormone : from the peptide to the gene.
Crit Rev Neurobiol 1994 ; 8 : 221-262.

NAVARRA P, TSAGARAKIS S, COY DH, REES LH, BESSER GM, GROSSMAN AB

Rat melanin-concentrating hormone does not modify the release of CRH-41 from rat hypothalamus or ACTH from the anterior pituitary in vitro.
J Endocrinol 1990 ; 127 : R1-R4.

NIEUWENHUYTS R, DONKELAAR H, NICHOLSON C

The Central Nervous System of Vertebrates.
Berlin : Springer, 1997.

NURAL HF, MASTICK GS

Pax6 guides a relay of pioneer longitudinal axons in the embryonic mouse forebrain.
J Comp Neurol 2004 ; 479 : 399-409.

OHYAMA K, ELLIS P, KIMURA S, PLACZEK M

Directed differentiation of neural cells to hypothalamic dopaminergic neurons.
Development 2005 ; 132 : 5185-5197.

PANGANIBAN G, RUBENSTEIN JL

Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes.
Development 2002 ; 129 : 4371-4386.

PARKES D, VALE W

Secretion of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-EI from cultured rat hypothalamic cells.

Endocrinology 1992 ; 131 : 1826-1831.

PETROVICH GD, CANTERAS NS, SWANSON L.W

Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems.

Brain Res Rev 2001 ; 38 : 247-289.

PEYRON C, TIGHE DK, VAN DEN POL AN, DE LECEA L, HELLER HC, SUTCLIFFE JG, KILDUFF TS

Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems.

J Neurosci 1998 ; 18 : 9996-10015.

PRATT T, VITALIS T, WARREN N, EDGAR JM, MASON JO, PRICE DJ

A role of Pax6 in the normal development of the dorsal thalamus and its cortical connections.

Development 2000 ; 127 : 5167-5178.

PRATT T, QUINN JC, SIMPSON TI, WEST JD, MASON JO, PRICE DJ

Disruption of early events in thalamocortical tract formation in mice lacking the transcription factors Pax6 or Foxg1.

J Neurosci 2002 ; 22 : 8523-8531.

PRAKASH N, WURST W

Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons.

J Physiol 2006 ; 575 : 403-410.

PRESSE F, HERVIEU G, IMAKI T, SAWCHENKO PE, VALE W, NAHON JL

Rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid expression : marked changes during development and after stress and glucocorticoid stimuli.

Endocrinology 1992 ; 131 : 1241-1250.

PRESSE F, NAHON JL

Differential regulation of melanin-concentrating hormone gene expression in distinct hypothalamic areas under osmotic stimulation in rat.

Neuroscience 1993 ; 55 : 709-720.

PRESSE F, SOROKOVSKY I, MAX J-P, NICOLAIDIS S, NAHON JL

Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat.

Neuroscience 1996 ; 71 : 735-745.

PRICE M

Members of the Dlx- and Nkx2-gene families are regionally expressed in the developing forebrain.

J Neurobiol 1993 ; 10 : 1385-1399.

PRICE M, LAZZARO D, POHL T, MATTEI MG, RUTHER U, OLIVO JC, DUBOULE D, DI LAURO R

Regional expression of the homeobox gene Nkx-2.2 in the developing mammalian forebrain.
Neuron 1992 ; 8 : 241-255.

PUELLES L, MARTINEZ S, MARTINEZ-DE-LA-TORRE M, RUBENSTEIN JL

Gene maps and related histogenetic domains in the forebrain and midbrain.

In : PAXINOS G

The rat nervous system. 3rd Ed.

Amsterdam : Elsevier academic press, 2004. p. 3-25.

PUELLES L, RUBENSTEIN JL

Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization.

Trends Neurosci 1993; 16 : 472-479.

PUELLES L, RUBENSTEIN JL

Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model.

Trends Neurosci. 2003 ; 26 : 469-476.

QIU M, SHIMAMURA K, SUSSEL L, CHEN S, RUBENSTEIN JL

Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression relative to other Nkx genes during vertebrate CNS development.

Mech Dev 1998 ; 72 : 77-88.

QU D, LUDWIG DS, GAMMELTOFT S, PIPER M, PELLEYMOUNTER MA, CULLEN MJ, MATHES WF, PRZYPEK J, KANAREK R, MARATOS-FLIER E

A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour.

Nature 1996 ; 380 : 243-247.

RALLU M, CORBIN JG, FISHELL G

Parsing the prosencephalon.

Nat Neurosci 2002 ; 3 : 943-951.

RAMALHO-SANTOS M, MELTON DA, McMAHON AP

Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development.

Development 2000 ; 127 : 2763-2772.

RETAUX S, ROGARD M, BACH I, FAILLI V, BESSON MJ

Lhx9 : a novel LIM-homeodomain gene expressed in the developing forebrain.

J Neurosci 1999 ; 19 : 783-793.

RISOLD PY, FELLMANN D, RIVIER J, VALE W, BUGNON C

Immunoreactivities for antisera to three putative neuropeptides of the rat melanin-concentrating hormone precursor are coexpressed in neurons of the rat lateral dorsal hypothalamus.

Neurosci Lett 1992 ; 136 : 145-149.

RISOLD PY, GRIFFOND B, KILDUFF TS, SUTCLIFFE JG, FELLMANN D

Preprohypocretin (orexin) and prolactin-like immunoreactivity are coexpressed by neurons of the rat lateral hypothalamic area.

Neurosci Lett 1999 ; 259 : 153-156.

RISOLD PY, THOMPSON RH, SWANSON LW

The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex.

Brain Res Brain Res Rev 1997 ; 24 : 197-254.

ROSSI M, CHOI SJ, O'SHEA D, MIYOSHI T, GHATEI MA, BLOOM SR

Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight.

Endocrinology 1997 ; 138 : 351-355.

RUBENSTEIN JL, MARTINEZ S, SHIMAMURA K, PUELLES L

The embryonic vertebrate forebrain : The prosomeric model.

Science 1994 ; 266 : 578-580.

SAKURAI T, AMEMIYA A, ISHII M, MATSUZAKI I, CHEMELLI RM, TANAKA H, WILLIAMS SC, RICHARDSON JA, KOZLOWSKI GP, WILSON S, ARCH JR, BUCKINGHAM RE, HAYNES AC, CARR SA, ANNAN RS, McNULTY DE, LIU WS, TERRETT JA, ELSHOUBAGY NA, BERGSMAN DJ, YANAGISAWA M

Orexins and orexin receptors : a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior.

Cell 1998 ; 92 : 573-585.

SAPER CB

Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections.

J Comp Neurol 1985 ; 237 : 21-46.

SAPER CB

Diffuse cortical projection systems : anatomical organization and role in cortical function.

In : PLUM F, Ed.

Handbook of physiology. The nervous system, Vol V.

Baltimore : Waverly Press, 1987 : 169-210.

SCHAFFER M, KINZEL D, NEUNER C, SCHARTL M, VOLFF JN, WINKLER C

Hedgehog and retinoid signalling confines nkx2.2b expression to the lateral floor plate of the zebrafish trunk.

Mech Dev 2005 ; 122 : 43-56.

SCHOLPP S, WOLF O, BRAND M, LUMSDEN A

Hedgehog signalling from the zona limitans intrathalamica orchestrates patterning of the zebrafish diencephalons.

Development 2006 ; 133 : 855-864.

SHIMAMURA K, HARTIGAN DJ, MARTINEZ S, PUELLES L, RUBENSTEIN JL

Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube.

Development 1995 ; 121 : 3923-3933.

SIMPSON KL, ALTMAN DW, WANG L, KIRIFIDES ML, LIN RC, WATERHOUSE BD

Lateralization and functional organization of the locus coeruleus projection to the trigeminal somatosensory pathway in rat.

J Comp Neurol 1997; 385 : 135-147.

SQUIRE LR, BLOOM FE, McCONNEL SK, ROBERTS JL, SPITZER NC, ZIGMOND MJ

Neural induction and pattern formation.

In : Fundamental Neuroscience. 2^d Ed.

Amsterdam : Academic press, 2003. p. 363-390.

STOYKOVA A, GRUSS P

Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns.

J Neurosci 1994 ; 14 : 1395-1412.

STOYKOVA A, FRITSCH R, WALTHER C, GRUSS P

Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice.

Development 1996 ; 122 : 3453-3465.

STOYKOVA A, GÖTZ M, GRUSS P, PRICE J

Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain.

Development 1997 ; 124 : 3765-3777.

STÜHMER T, ANDERSON SA, EKKER M, RUBENSTEIN JL

Ectopic expression of the Dlx genes induces glutamic acid decarboxylase and Dlx expression.

Development 2002 ; 129 : 245-252.

SWANSON LW

The hypothalamus.

In : BJÖRKLUND A, HÖKFELT T, SWANSON LW, Eds.

Handbook of chemical neuroanatomy, Vol 5 : Integrated systems of the CNS, Part I.

Amsterdam : Elsevier, 1987 : 1-124.

SWANSON LW

Brain maps: structure of the rat brain.

Amsterdam : Elsevier, 1992.

SWANSON LW

Cerebral hemisphere regulation of motivated behaviour.

Brain Res 2000 ; 886 : 113-164.

SWANSON LW

Brain maps III : structure of the rat brain.

Amsterdam : Elsevier, 2003.

TORESSON H, POTTER SS, CAMPBELL K

Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon : opposing roles for Pax6 and Gsh2.

Development 2000 ; 127 : 4361-4371.

TOUMANIANTZ G, BITTENCOURT JC, NAHON JL

The rat melanin-concentrating hormone gene encodes an additional putative protein in a different reading frame.

Endocrinology 1996 ; 137 : 4518-4521.

VALVERDE F, GARCIA C, LOPEZ-MASCARAQUE L, DE CARLOS JA

Development of the mammillothalamic tract in normal and Pax-6 mutant mice.

J Comp Neurol 2000 ; 419 : 485-504.

VERTES RP, KOCSIS B

Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus.

Neuroscience 1997 ; 81 : 893-926.

VIEIRA C, GARDA AL, SHIMAMURA K, MARTINEZ S

Thalamic development induced by Shh in the chick embryo.

Dev Biol 2005 ; 284 : 351-363.

VITALIS T, CASES O, ENGELKAMP D, VERNEY C, PRICE DJ

Defects of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor Pax6.

J Neurosci 2000 ; 20 : 6501-6516.

WALTHER C, GRUSS P

Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS.

Development 1991 ; 113 : 1435-1449.

WANG MM, REED RR

Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast.

Nature 1993 ; 364 : 121-126.

WANG SS, TSAI RY, REED RR

The characterization of the Olf-1/EBF-Like HLH transcription factor family : implications in olfactory gene regulation and neural development.

J Neurosci 1997 ; 17 : 4149-4158.

WANG SS, BETZ AG, REED RR

Cloning a novel Olf-1/EBF-like gene, O/E-4, by degenerate oligo-based direct selection.

Mol Cell Neurosci 2002 ; 20 : 404-414.

WANG SS, LEWCOCK JW, FEINSTEIN P, MOMBAERTS P, REED RR

Genetic disruptions of O/E2 and O/E3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection.

Development 2004 ; 131 : 1377-1388.

WARREN N, PRICE DJ

Roles of Pax-6 in murine diencephalic development.
Development 1997 ; 124 : 1573-1582.

WATSON SJ, AKIL H

The presence of two α -MSH positive cell groups in rat hypothalamus.
Eur J Pharmacol 1979 ; 58 : 101-103.

WILSON SW, RUBENSTEIN JL

Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon.
Neuron 2000 ; 28 : 641-651.

XU X, CAI J, FU H, WU R, QI Y, MODDERMAN G, LIU R, QIU M

Selective expression of Nkx-2.2 transcription factor in chicken oligodendrocyte progenitors and implications for the embryonic origin of oligodendrocytes.
Mol Cell Neurosci 2000 ; 16 : 740-753.

ZELTSER LM

Shh-dependent formation of the ZLI is opposed by signals from the dorsal diencephalon.
Development 2005 ; 132 : 2023-2033.

ZERUCHA T, STUHMER T, HATCH G, PARK BK, LONG Q, YU G, GAMBAROTTA A, SCHULTZ JR, RUBENSTEIN JL, EKKER M

A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain.
J Neurosci 2000 ; 20 : 709-721.

ZHU H, BENDALL AJ

Dlx3 is expressed in the ventral forebrain of chicken embryos : implications for the evolution of the Dlx gene family.
Int J Dev Biol 2006 ; 50 : 71-75.