

*Etude des rôles des facteurs de transcription  
Onecut dans la différenciation des neurones  
moteurs de la moelle épinière*

**Agnès Roy**

**Promoteur: Professeur Frédéric Clotman**

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme  
de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Mars 2012



Il m'est agréable d'adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont apporté de près ou de loin, aide et conseils lors de l'élaboration de cette thèse de doctorat.

Tout d'abord, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon promoteur, le professeur Frédéric Clotman, pour m'avoir conseillée, encouragée et soutenue tout au long de ma thèse avec patience et disponibilité, et pour la confiance qu'il m'a accordée.

La bonne humeur, les rires, la gentillesse et la disponibilité de tous les instants d'Emilie Audouard, d'Agnès Espana-Bessy, de Cédric Francius et d'Audrey Harris ont contribué pour beaucoup au fait que ces quatre années de thèse dans le laboratoire NEDI me laisseront de très bons souvenirs : merci à vous tous ! Merci également à Karolina, Vincent, Guillaume, Benoît, Julien et Romélia.

Ces années de doctorat ont été l'occasion de nombreuses collaborations, de discussions et de rencontres avec des chercheurs et des doctorants de tous les horizons qui ont enrichi mon travail. Je ne citerai pas de noms ici, de peur d'en oublier certains.

Je dédie cette thèse à toute ma famille, en particulier à mes parents, Cécile et Quentin pour m'avoir toujours encouragée et s'être inquiétés du bon déroulement de mes études. Merci également à Anthony dont la présence et le soutien, même à l'autre bout du monde, n'ont jamais défailli.

Je ne pourrais conclure sans remercier les membres du CPO (AC, Chachi, Blonde, Didine, KD, LA et Taupe) que j'ai eu la chance de rencontrer pendant mes études. Merci les « girls » pour votre présence tout au long de ces années de dur labeur, pour les bons soupers, et tous les moments de complicité partagés.



## RESUME

Au cours du développement embryonnaire, les neurones moteurs (MN) sont générés à partir de cellules progénitrices localisées dans la partie ventrale de la moelle épinière. Les nouveaux MN sont post-mitotiques et se diversifient en différents sous-types spécifiquement dédiés au contrôle des muscles squelettiques (MN somatiques) ou des organes viscéraux (MN viscéraux). La famille des facteurs de transcription Onecut comporte trois membres chez les mammifères nommés Hepatocyte Nuclear Factor-6 (HNF-6), Onecut-2 (OC-2) et OC-3. Ces activateurs transcriptionnels sont exprimés de façon transitoire dans les premières étapes de la différenciation des MN médullaires. Ce patron d'expression suggère que les protéines OC interviennent dans la mise en place de la diversité neuronale au sein de la moelle épinière ventrale. Le but de mon travail est d'étudier les rôles des facteurs de transcription Onecut au cours de la diversification des MN médullaires.

L'analyse d'embryons mutants Onecut, combinée avec des expériences en gain de fonction dans la moelle embryonnaire de poulet, démontre que cette famille d'activateurs transcriptionnels régule la diversification des MN à tous les niveaux de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière. En effet, en absence des facteurs Onecut, la proportion entre MN somatiques et viscéraux est altérée au niveau thoracique, un excès de MN viscéraux étant généré au détriment des MN somatiques. Dans la région des membres, les MN responsables de l'innervation des muscles fléchisseurs perdent leur identité au profit de celle des MN assurant l'innervation des muscles extenseurs.

De plus, nous avons démontré qu'*Isl1* est une cible transcriptionnelle directe des facteurs Onecut qui sont, dès lors, essentiels pour maintenir son expression durant la diversification des MN médullaires. Finalement, nous avons identifié un nouveau marqueur des MN viscéraux, Smad-interacting-protein (Sip)-1, qui pourrait agir de manière opposée à celle des protéines OC dans la production de la population viscérale.

Toutes ces observations indiquent que les facteurs OC sont impliqués dans des réseaux géniques au sein desquels ils coopèrent avec de multiples régulateurs afin de contrôler différents aspects de la diversification des MN dans la moelle épinière en développement.



## LISTE des ABBREVIATIONS

|          |                                         |
|----------|-----------------------------------------|
| A/P      | Antero-postérieur                       |
| ApoER2   | Apolipoprotein E receptor.              |
| AR       | Acide rétinoïque                        |
| BMP      | Bone Morphogenic Proteins               |
| BDNF     | Brain-derived neurotrophic factor       |
| CBP      | CREB-binding protein                    |
| cdk      | Kinase cycline-dépendante               |
| Dab1     | Disabled-1                              |
| D/V      | Dorso-ventral                           |
| e        | Stade embryonnaire                      |
| FGF      | Fibroblast growth factor                |
| GDF      | Growth differentiation factor           |
| GDNF     | Glial cell-derived neurotrophic factor  |
| HGF      | hepatocyte growth factor                |
| HMC      | Colonne motrice hypaxiale               |
| HNF6     | Hepatocyte nuclear factor 6             |
| LMC      | Colonne motrice latérale                |
| LMCI     | Division latérale de la LMC             |
| LMCm     | Division médiane de la LMC              |
| Mitf     | Microphthalmia-associated transcription |
| MMC      | Colonne motrice médiane                 |
| MN       | Neurones moteurs                        |
| MusK     | Muscle specific kinase                  |
| NGF      | Nerve growth factor                     |
| NLI      | Nuclear LIM interactor                  |
| OC       | Onecut                                  |
| p300/CAF | p300/CBP-associated factor              |
| PGC      | Colonne motrice pré- ganglionnaire      |
| pMN      | progéniteur des MN médullaires          |
| Raldh2   | Retinaldéhyde deshydrogenase-2          |
| Shh      | Sonic hedgehog                          |
| SIP1     | Smad-interacting Protein-1              |
| SNC      | Système nerveux central                 |
| TTR      | Transthyrétine                          |
| VLDLR    | Very low density lipoprotein receptor   |



# TABLE des MATIERES

## RESUME

## LISTE des ABBREVIATIONS

## AVANT-PROPOS

|                                                                                                                                                                                           |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1. INTRODUCTION</b>                                                                                                                                                                    | <b>13</b>  |
| 1.1. Polarité du tube neural et neurogenèse                                                                                                                                               | 14         |
| 1.1.1. Polarité A/P du tube neural                                                                                                                                                        | 14         |
| 1.1.2. Polarité D/V du tube neural                                                                                                                                                        | 20         |
| 1.1.3. Neurogenèse et spécification neuronale                                                                                                                                             | 23         |
| 1.2. Diversification neuronale et migration                                                                                                                                               | 31         |
| 1.2.1. Migration et diversification neuronale                                                                                                                                             | 31         |
| 1.2.2. Contrôle de la migration neuronale                                                                                                                                                 | 36         |
| 1.3. Le guidage axonal                                                                                                                                                                    | 41         |
| 1.4. Formation des synapses, mortalité cellulaire et affinage                                                                                                                             | 48         |
| 1.5. Les facteurs de transcription Onecut                                                                                                                                                 | 51         |
| 1.5.1. Structure des facteurs OC                                                                                                                                                          | 52         |
| 1.5.2. Activité transcriptionnelle des facteurs OC                                                                                                                                        | 53         |
| 1.5.3. Expression et rôles des facteurs OC au cours du développement                                                                                                                      | 54         |
| <b>2. OBJECTIFS et STRATEGIE</b>                                                                                                                                                          | <b>59</b>  |
| <b>3. RESULTATS : Les facteurs OC maintiennent l'expression d'<i>Isl1</i> et régulent la diversification neuronale durant le développement des neurones moteurs de la moelle épinière</b> | <b>61</b>  |
| 3.1. Introduction                                                                                                                                                                         | 67         |
| 3.2. Results                                                                                                                                                                              | 71         |
| 3.2.1. <i>The OC factors are required to maintain Isl1 expression during MNsubtype diversification</i>                                                                                    | 71         |
| 3.2.2. <i>The OC factors control the ratio between somatic and visceral MN</i>                                                                                                            | 74         |
| 3.2.3. <i>Sip1 is required for proper differentiation of visceral MN</i>                                                                                                                  | 76         |
| 3.2.4. <i>The OC factors are dispensable for axonal projections of thoracic MN</i>                                                                                                        | 78         |
| 3.2.5. <i>The OC factors are required for LMC subdivisions</i>                                                                                                                            | 81         |
| 3.3. Discussion                                                                                                                                                                           | 83         |
| 3.3.1. <i>Context-dependent transcriptional regulation controls MN differentiation</i>                                                                                                    | 83         |
| 3.3.2. <i>OC-independent MN generation and consolidation of MN identity</i>                                                                                                               | 84         |
| 3.3.3. <i>Versatile genetic networks control MN subtype diversification in the thoracic spinal cord</i>                                                                                   | 86         |
| 3.3.4. <i>Sip1 supports the generation of visceral MN</i>                                                                                                                                 | 87         |
| 3.3.5. <i>OC factors control the identity of LMCm neurons</i>                                                                                                                             | 87         |
| 3.4. Experimental procedures                                                                                                                                                              | 89         |
| 3.5. Supplemental figures                                                                                                                                                                 | 93         |
| <b>4. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES: les facteurs OC contrôlent la migration des MN</b>                                                                                                       | <b>99</b>  |
| 4.1. Résultats                                                                                                                                                                            | 103        |
| 4.2. Discussion et perspectives                                                                                                                                                           | 104        |
| <b>5. DISCUSSION GENERALE</b>                                                                                                                                                             | <b>107</b> |
| 5.1. Les facteurs OC et la diversification neuronale                                                                                                                                      | 107        |
| 5.1.1. <i>Pléiotropie: Les facteurs OC contrôlent l'expression de plusieurs gènes cibles</i>                                                                                              | 109        |
| 5.1.2. <i>L'activité transcriptionnelle des facteurs OC est contexte-dépendante</i>                                                                                                       | 111        |
| 5.1.3. <i>Les facteurs OC sont impliqués dans de multiples réseaux géniques</i>                                                                                                           | 115        |
| 5.1.4. <i>L'activité transcriptionnelle des facteurs OC évolue au cours du temps</i>                                                                                                      | 116        |
| 5.2. Les facteurs OC et la migration neuronale                                                                                                                                            | 118        |
| 5.3. Anomalies locomotrices chez les individus adultes                                                                                                                                    | 120        |

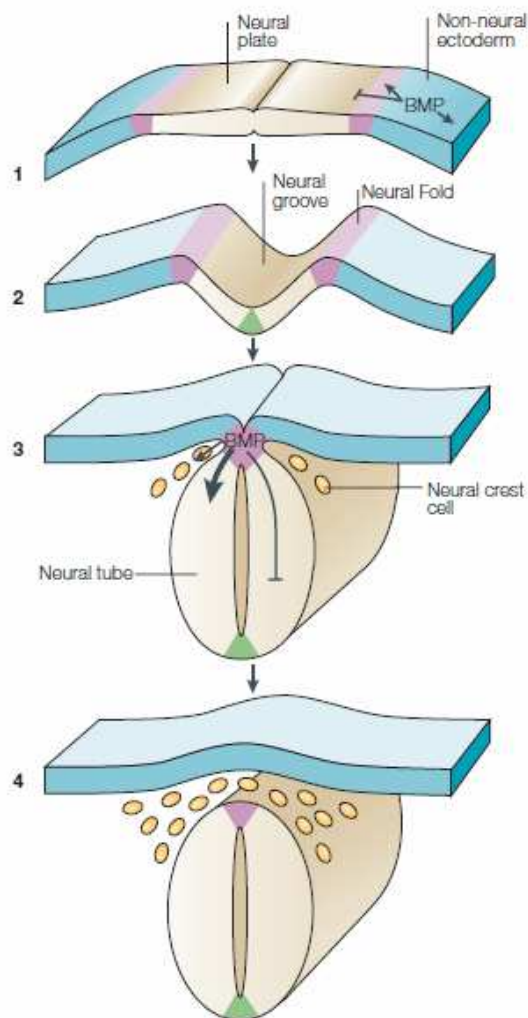
## BIBLIOGRAPHIE



## AVANT-PROPOS

Afin de développer des nouveaux traitements contre les lésions et les maladies dégénératives (Alzheimer, Parkinson, Sclérose amyotrophique latérale), les chercheurs tentent depuis de nombreuses années de mieux comprendre les mécanismes contrôlant la mise en place de la diversité neuronale au cours du développement du système nerveux central (SNC). Les neurones moteurs (MN) sont présents dans la région ventrale de la moelle épinière et contrôlent directement ou indirectement la contraction des muscles. Les MN somatiques sont responsables de la contraction des muscles squelettiques et sont typiquement impliqués dans la locomotion, tandis que les MN viscéraux assurent le contrôle des organes viscéraux. Pour exercer ces différentes fonctions, les MN se diversifient durant le développement en différentes sous-populations spécifiquement dédiées au contrôle d'un ensemble de muscles squelettiques ou d'organes viscéraux (Dasen and Jessell, 2009). Grâce à la disponibilité de nombreux marqueurs moléculaires, à la position stéréotypée des corps cellulaires dans la moelle épinière ventrale ainsi qu'à la corrélation étroite entre l'identité cellulaire et le choix des cibles innervées, la diversification des différents types de MN au cours du développement est devenue un excellent modèle pour identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires assurant la mise en place de la diversité neuronale, la migration des cellules, leur maturation, leur survie et leur intégration dans des circuits fonctionnels (Tsuchida et al., 1994; Jessell, 2000; Dasen and Jessell, 2009).

Cependant, malgré tous ces efforts, certains aspects de la diversification neuronale restent encore incompris et les régulateurs participant à ce processus sont pour la plupart encore inconnus. Identifier ces facteurs constituerait un progrès important dans la compréhension du développement du SNC à partir du tube neural mais également pour la génération de cellules neuronales utiles dans diverses applications allant des tests pharmacologiques à la thérapie cellulaire. Notamment, une famille de facteurs de transcription appelée Onecut (OC) est présente durant la différenciation des MN médullaires et pourrait jouer un rôle essentiel dans la mise en place de la diversité neuronale au cours du développement de la moelle épinière (Francius and Clotman, 2010).



**Figure 1: Neurulation.**

La plaque neurale (grise) est induite dans l'ectoderme (bleu) par inhibition de l'activité BMP. Durant la neurulation, les bords de la plaque neurale (mauve) s'élèvent afin de former une gouttière neurale, puis le tube neural. Les crêtes neurales sortent du tube neural dorsal. D'après Liu and Niswander, 2005.

## **1. INTRODUCTION**

Le système nerveux des vertébrés contient plus de 100 milliards de neurones présentant une énorme diversité morphologique et fonctionnelle. Ainsi, la moelle épinière, le cervelet ou le cortex cérébral contiennent plusieurs dizaines de types de neurones différents par leur morphologie, leur(s) neurotransmetteur(s), leurs molécules de surface ou leurs connexions axonales. Le système nerveux contient également un nombre élevé de cellules gliales qui seraient cinq à dix fois plus nombreuses que les neurones. Elles assurent, chacune à leur façon, le bon fonctionnement des neurones du SNC : les oligodendrocytes constituent la gaine de myéline entourant les axones de nombreux neurones afin d'accélérer la conduction nerveuse, tandis que les astrocytes apportent un support et une protection aux neurones, participent activement à la transmission synaptique et assurent le contrôle de la barrière hémato-encéphalique.

Au cours du développement embryonnaire, la plaque neurale est induite dans l'ectoderme situé dans la région dorsale de l'embryon grâce à la production, par les tissus adjacents<sup>1</sup>, de protéines inhibant l'activité BMP (Bone Morphogenic Proteins) telles que la chordine ou Noggin (Figure 1) (Munoz-Sanjuan and Brivanlou, 2002; Liu and Niswander, 2005; Gaspard and Vanderhaeghen, 2010). La plaque neurale s'invagine pour former le tube neural contenant toutes les cellules progénitrices neurales. Très rapidement, les cellules souches des crêtes neurales migrent hors du tube et donnent naissance au système nerveux périphérique, ainsi qu'à une grande diversité de types cellulaires tels que les mélanocytes responsables de la pigmentation de la peau. Les cellules progénitrices restant dans le tube neural vont produire les neurones et les cellules gliales qui participeront à la formation du SNC, constitué de l'encéphale et de la moelle épinière.

Comment une population relativement petite et homogène de cellules souches neurales est-elle capable de former ce qui est généralement admis comme le système le plus complexe et le plus avancé du corps des vertébrés? De nombreuses recherches ont été réalisées afin de mieux comprendre la diversification neuronale au cours du développement embryonnaire. Ces études démontrent que, malgré sa complexité, la mise en place du SNC

---

<sup>1</sup> Organisateur (ou région organisatrice) : centre inducteur qui dirige le développement de l'embryon ou de l'une de ses parties, tel un membre. Chez les amphibiens, ce terme fait généralement référence au centre de Spemann situé sur la face dorsale de l'embryon et qui émet des signaux permettant l'organisation des nouveaux axes A/P et D/V.

peut être globalement résumée en quatre mécanismes. Tout d'abord, le fonctionnement du SNC nécessite la production d'un type particulier de neurones à un endroit précis du tube neural et à un moment déterminé au cours du développement. Ensuite, les neurones post-mitotiques générés migrent vers leur destination finale. Durant cette migration, les cellules nerveuses étendent leurs prolongements vers des cibles précises afin d'assurer l'établissement de connexions et le transfert d'informations entre les différentes régions de l'organisme. Finalement, les axones forment des synapses avec leurs cibles qui peuvent être nerveuses, musculaires ou glandulaires.

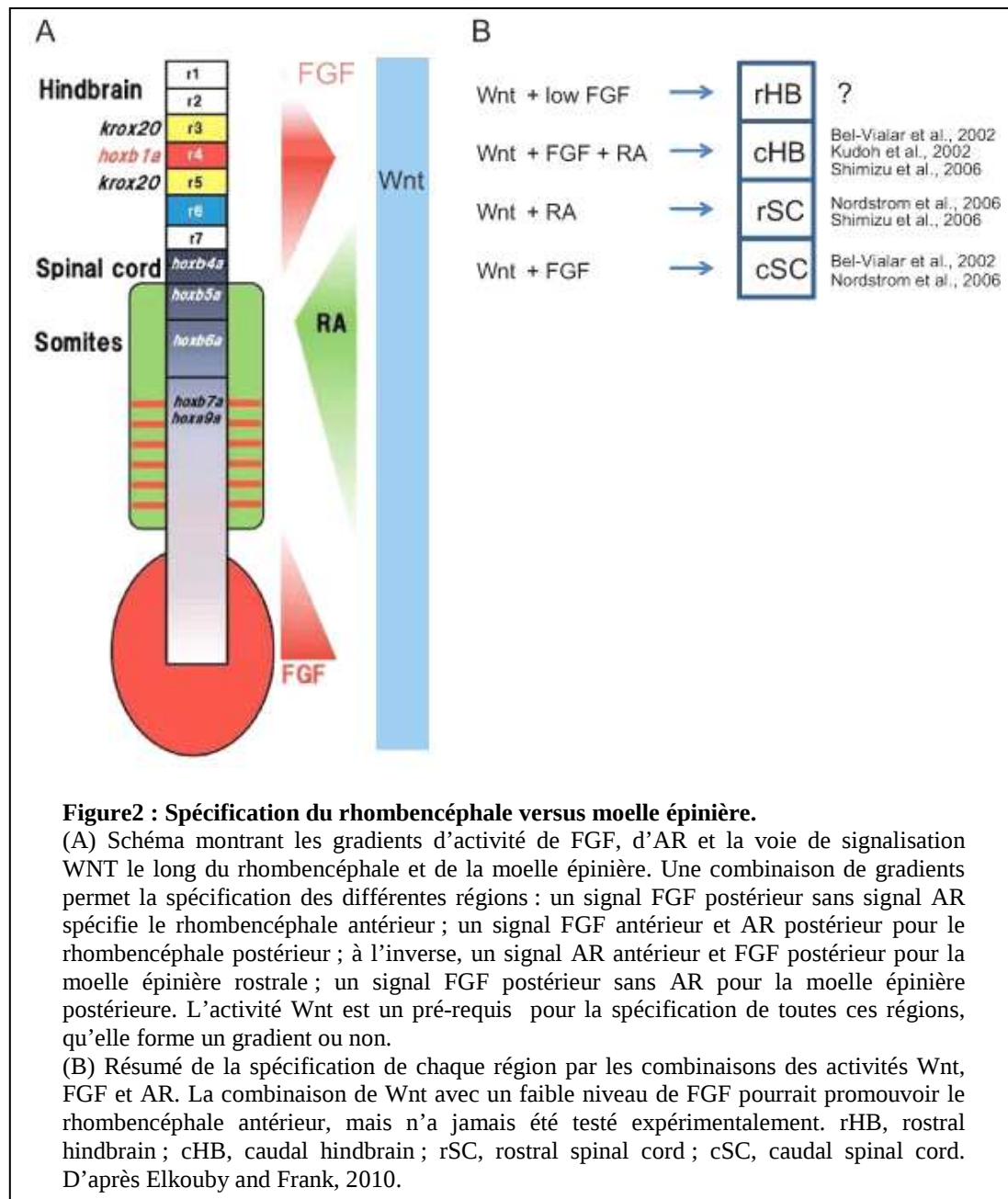
### **1.1. Polarité du tube neural et neurogenèse**

Le SNC adulte est constitué de plusieurs types de neurones présents à un endroit bien déterminé (neurones dopaminergiques, neurones GABAergiques, cellules de Purkinje, MN, interneurones,...). Au tout début du développement, cette organisation du SNC mature est anticipée par une régionalisation moléculaire du tube neural selon les axes antéro-postérieur (A/P) et dorso-ventral (D/V). Ainsi, le tube neural est sous-divisé en une grille complexe de domaines, chaque domaine exprimant une combinaison précise de facteurs de transcription qui déterminera le type de neurones produits dans cette région. Des gradients de signaux morphogènes, parcourant des distances variables à travers le tissu neural, vont induire et/ou inhiber l'expression de gènes codant notamment pour ces facteurs de transcription et ainsi spécifier le type cellulaire produit à un endroit donné du développement. Les cellules produites migreront ensuite selon l'axe médio-latéral du tube neural pour quitter la zone de prolifération et enrichir progressivement la zone du manteau contenant les corps cellulaires des neurones différenciés.

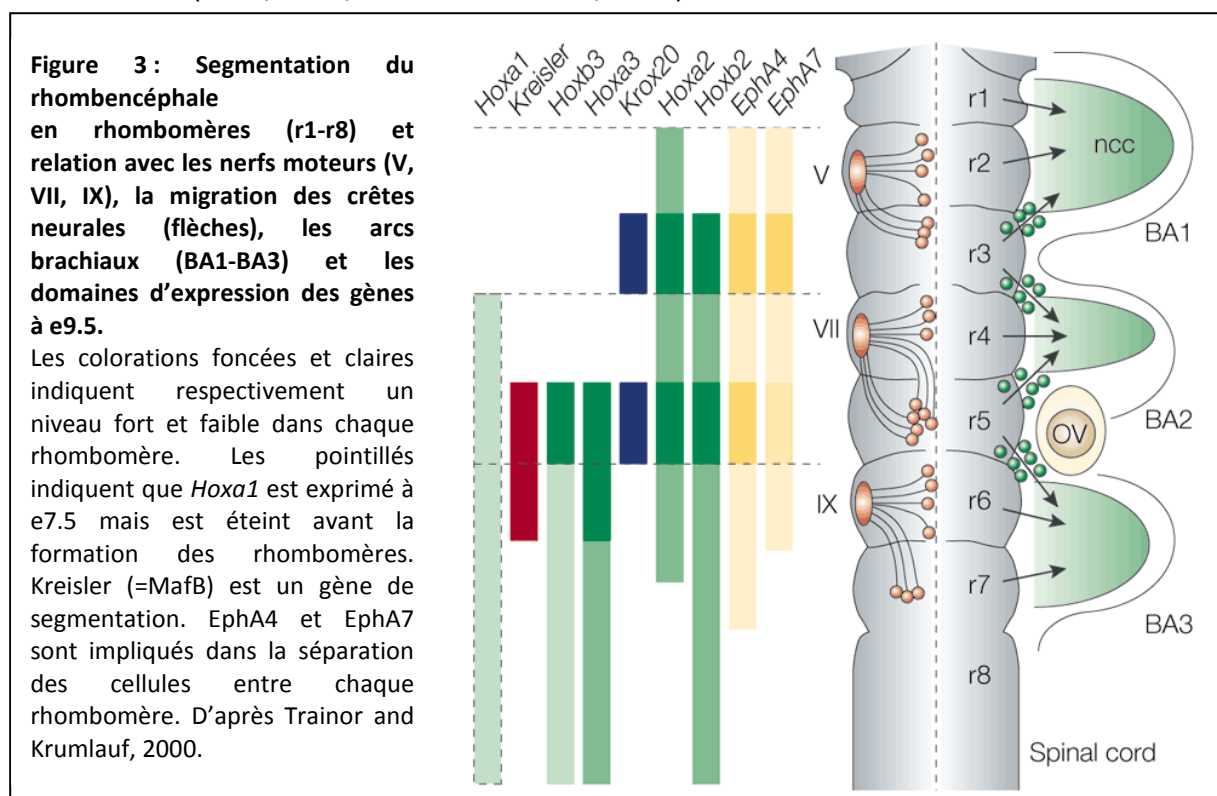
#### ***1.1.1. Polarité A/P du tube neural***

La régionalisation A/P du SNC est clairement évidente chez l'adulte au vu de la présence du cortex au niveau antérieur et de la moelle épinière au niveau postérieur. Au cours du développement embryonnaire, l'induction de la plaque neurale aboutit à la formation d'un neuroépithélium avec une spécification telle que, en absence d'autres signaux, elle formera les structures antérieures du tube neural (prosencéphale et mésencéphale) (Rallu et al., 2002). La détermination des structures plus postérieures

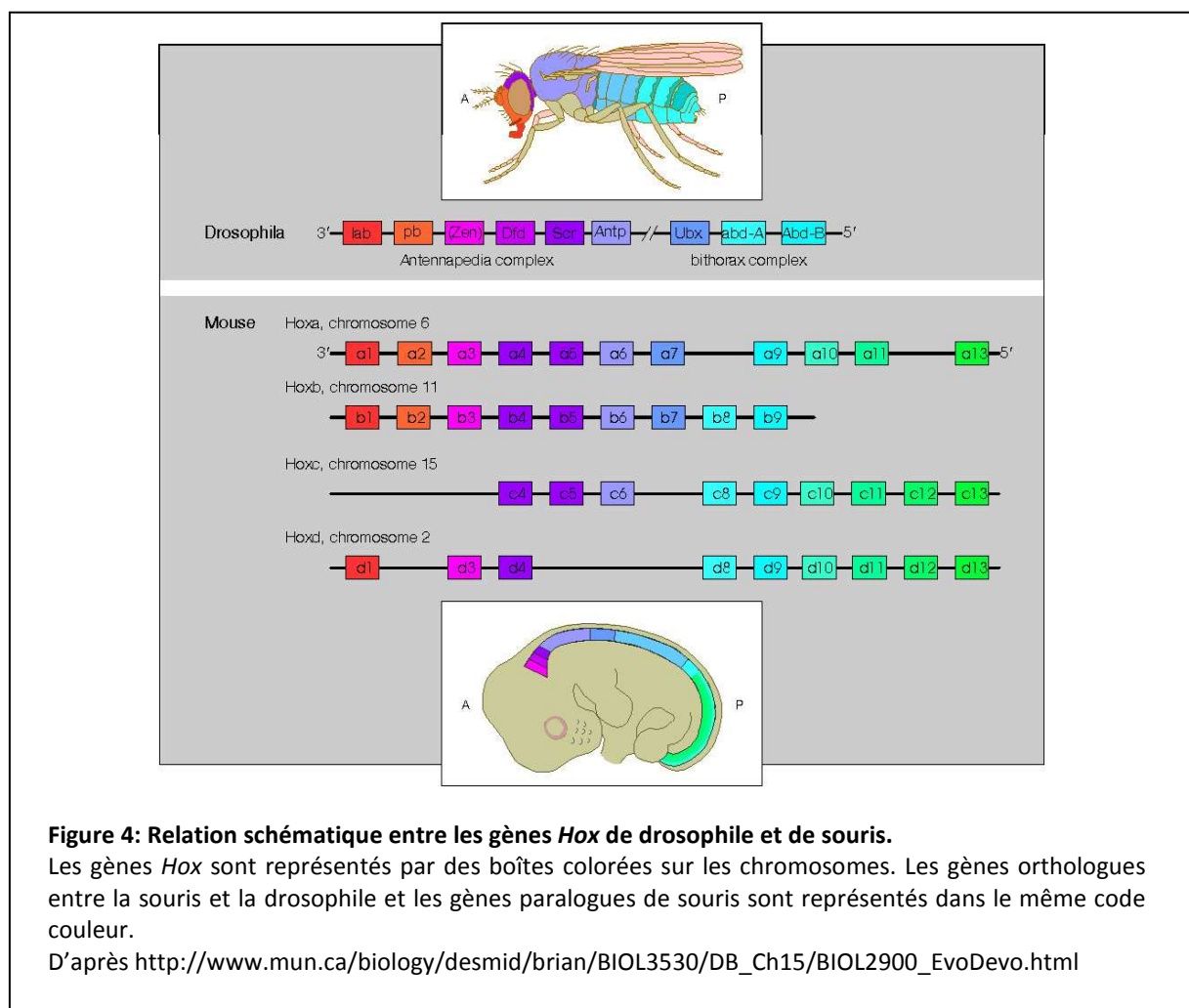
nécessite la présence de divers facteurs « postériorisants ». Parmi ceux-ci, les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF), l'acide rétinoïque (AR) et certains facteurs Wnt sont importants pour la mise en place de la polarité A/P du tube neural (Figure 2) (Maden, 2002; Ciani and Salinas, 2005; Nordstrom et al., 2006; Gaspard and Vanderhaeghen, 2010).



La régionalisation A/P du tube neural est particulièrement bien comprise dans la région postérieure de l'encéphale (Kiecker and Lumsden, 2005; Guthrie, 2007). Notamment, le rhombencéphale donne naissance au cervelet, au pont et au bulbe rachidien nécessaires pour la régulation des activités autonomes de l'organisme comme la respiration, la pression sanguine et les battements cardiaques. Au cours du développement, huit renflements transitoires, appelés rhombomères, se forment dans le rhombencéphale (Figure 3). Le rhombomère 1 donne naissance au cervelet et à la partie antérieure du pont, tandis que les rhombomères suivants contiennent des noyaux moteurs et fournissent des fibres à un nerf crânien. Ainsi le nerf trijumeau (V) est formé par les projections des neurones situés dans les rhombomères 2-3, le nerf facial (VII) par les projections des rhombomères 4-5 et le nerf glosso-pharyngien par les projections des rhombomères 6-7. Chaque rhombomère fournit également des cellules de crêtes neurales à un des arcs brachiaux (Lumsden, 2004). Les neurones présents dans chaque rhombomère sont incapables de se mélanger à ceux des rhombomères adjacents. En effet, les cellules présentes dans les rhombomères impairs ne partagent pas les mêmes propriétés d'adhésion que celles présentes dans les rhombomères pairs. La découverte que certaines protéines de surface, comme les éphrines et leurs récepteurs Eph, sont exprimées de manière alternée dans les rhombomères fournit un mécanisme potentiel pour expliquer la séparation des cellules à l'intérieur de chaque rhombomère (Klein, 1999; Cooke and Moens, 2002).



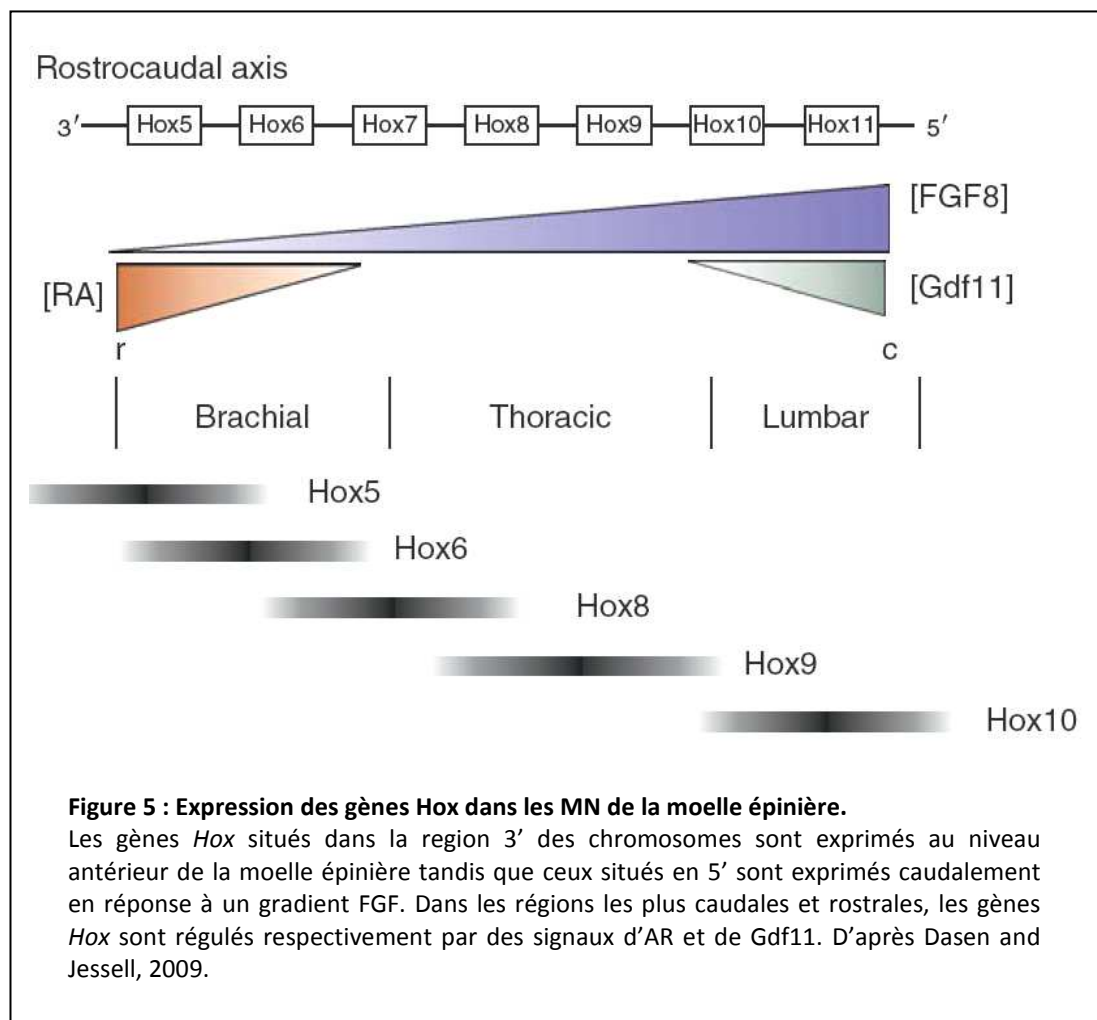
Le développement des rhombomères dépend de l'expression des gènes à homéoboite (*Hox*) (Figure 4) (Keynes and Krumlauf, 1994). Chez les vertébrés, il existe quatre complexes homologues de gènes *Hox*, situés sur des chromosomes différents, appelés *Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc* et *Hoxd*. Ces complexes sont issus de la double duplication d'un complexe ancestral unique, si bien que tous les gènes présentent entre eux une certaine ressemblance (surtout au niveau de l'homéoboite). Les gènes paralogues correspondants dans les différents complexes forment ce qu'on appelle généralement un sous-groupe paralogue (par exemple *HoxA4*, *HoxB4*, *HoxC4* et *HoxD4*). Chaque gène *Hox* est exprimé à un niveau A/P particulier, avec une limite franche au niveau antérieur, et s'étend postérieurement. De manière remarquable, l'ordre d'expression des gènes *Hox* selon l'axe A/P du tube neural est souvent le même que celui de la disposition de 3' en 5' des gènes sur le chromosome (colinéarité spatiale). De la même manière, les premiers gènes *Hox* à s'exprimer lors du développement neuronal sont situés en 3' sur les chromosomes (colinéarité temporelle).



Dans les rhombomères, l'expression des gènes *Hox* offre une base moléculaire pour expliquer l'identité de chaque rhombomère (Figure 3) (Hunt and Krumlauf, 1992). La limite antérieure d'expression de *Hoxa2* délimite la frontière entre les rhombomères 1-2, celle de *Hoxb2* la frontière entre les rhombomères 2-3, celle de *Hoxa1* la frontière entre les rhombomères 3-4... Chaque rhombomère est ainsi caractérisé par l'expression d'une combinaison unique de gènes *Hox* qui fournit une identité de position le long de l'axe A/P. L'expression de *Hoxb1* dans le rhombomère 4 permet la formation du nerf facial (VII) et son expression ectopique dans le rhombomère 2 transforme celui-ci en rhombomère 4 (Bell et al., 1999). Des études sur l'expression des gènes *Hox* au niveau moléculaire ont apporté quelques indications sur le mode de contrôle de ce profil d'expression. Dans certains cas, l'expression des gènes *Hox* dans le rhombencéphale dépendrait de l'activité d'autres facteurs de transcription. Par exemple, dans le rhombomère 3 et 5, *Hoxb2* est activé notamment par le facteur de transcription en doigt de zinc Krox20, qui n'est pas présent dans le rhombomère 4. Il existe des sites de fixation pour la protéine Krox20 sur l'élément activateur qui stimule l'expression de *Hoxb2* dans les rhombomères 3 et 5. Ainsi, l'inactivation de *Krox20* résulte en la perte de *Hoxb2* dans les rhombomères 3 et 5 et, par conséquent, en la fusion des rhombomères 2 à 6. L'expression organisée dans l'espace des facteurs de transcription tels que Krox20 dépendrait quant à elle des gradients de FGF et d'AR (Figure 2) (Keynes and Krumlauf, 1994; Nonchev et al., 1996; Trainor and Krumlauf, 2000; Maden, 2002; Lumsden, 2004; Guthrie, 2007). L'AR forme un gradient de concentration postéro-antérieur dans le rhombencéphale et l'absence de signalisation d'AR entraîne une perte des rhombomères.

Ce type de segmentation A/P ne s'applique pas à la moelle épinière où la position régulière, une paire en regard de chaque somite, des racines ganglionnaires dorsales et des racines motrices ventrales est imposée par les somites. Cependant, les MN générés à une position donnée le long de l'axe A/P de la moelle épinière possèdent des propriétés intrinsèques caractéristiques de cette position (Dasen et al., 2003; Dasen and Jessell, 2009). Le destin neuronal le long de l'axe A/P de la moelle épinière est déterminé par des signaux sécrétés dans le mésoderme adjacent. Ces signaux sont composés de gradients de FGF, d'AR, de Wnt et de GDF (Growth differentiation factor, membre de la famille TGF- $\beta$ ) qui activent un patron d'expression des gènes *Hox* dans les neurones post-mitotiques (Liu et al.,

2001; Dasen et al., 2003) (Figure 5). Ainsi, les MN exprimant les gènes *Hox* du groupe 6 (*Hox6*) innervent les muscles des membres et ne sont présents que dans la région brachiale de la moelle épinière; les MN viscéraux expriment les gènes du groupe 9 (*Hox9*) et sont confinés dans la région thoracique de la moelle épinière ; tandis que les MN exprimant les gènes du groupe 10 (*Hox10*) sont présents dans la région lombaire de la moelle épinière afin d'innervier les membres postérieurs (Landmesser, 1978; Dasen and Jessell, 2009). A l'inverse, les MN innervant les muscles du dos n'expriment pas de gènes *Hox* et, par conséquent, sont présents tout le long de l'axe A/P de la moelle épinière. De plus, la répression mutuelle entre les différents *Hox* permet de renforcer l'identité A/P des MN. Ainsi, des perturbations de l'expression de *Hoxc10* et de *Hoxd10* dans les MN entraînent des désordres locomoteurs importants suite au changement d'identité des MN innervant les membres postérieurs qui adoptent le phénotype des MN viscéraux (Wu et al., 2008). A l'inverse, en absence de *Hoxc9*, l'expression de *Hox6* est étendue anormalement dans la région thoracique et les MN viscéraux de cette région acquièrent l'identité des populations innervant les membres (Jung et al., 2010).



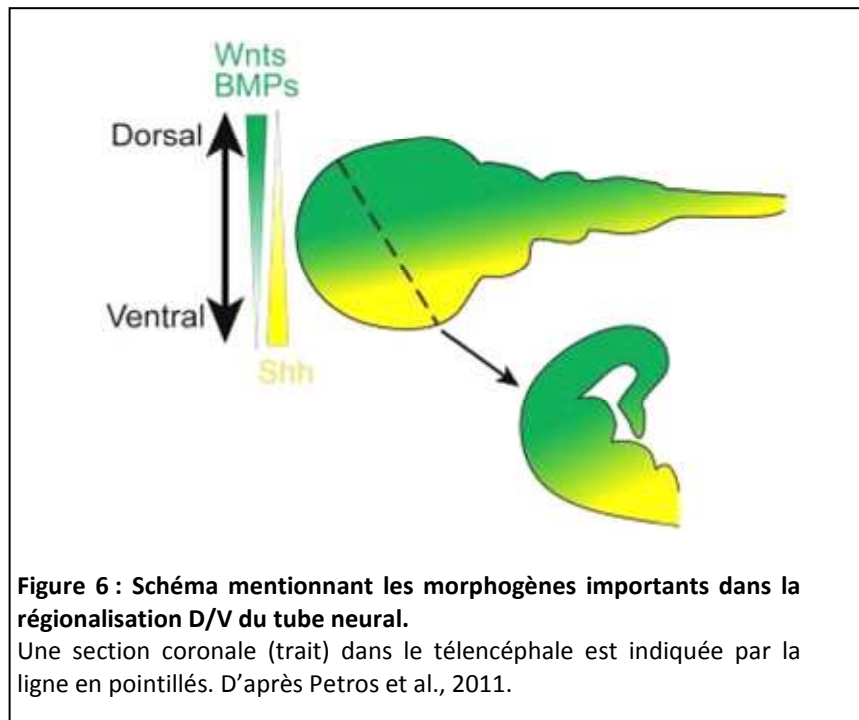
Par ailleurs, le gène *Foxp1* code pour un co-facteur des protéines Hox et est exprimé dans la moelle épinière ventrale. Ce co-facteur est induit par les protéines Hox et son expression dans les MN est dès lors restreinte aux MN des membres et aux MN viscéraux. Cependant, le niveau de *Foxp1* dans ces deux sous-populations de MN est différent: les neurones viscéraux expriment *Foxp1* à faible niveau tandis que les MN des membres sont caractérisés par une expression forte de *Foxp1* (Dasen et al., 2008; Rouso et al., 2008). Cette différence est le résultat du patron d'expression des *Hox* le long de l'axe A/P de la moelle épinière et est critique pour la spécification des sous-populations de MN. En effet, *Hox6* et *Hox10* induisent une expression forte de *Foxp1* nécessaire pour la spécification des MN innervant les membres, tandis que *Hox9* induit une expression faible de *Foxp1* afin de permettre la différenciation des MN viscéraux présents dans la région thoracique. *Foxp1* agit donc de manière conjointe avec les protéines Hox afin de restreindre leur action dans les MN.

### **1.1.2 Polarité D/V du tube neural**

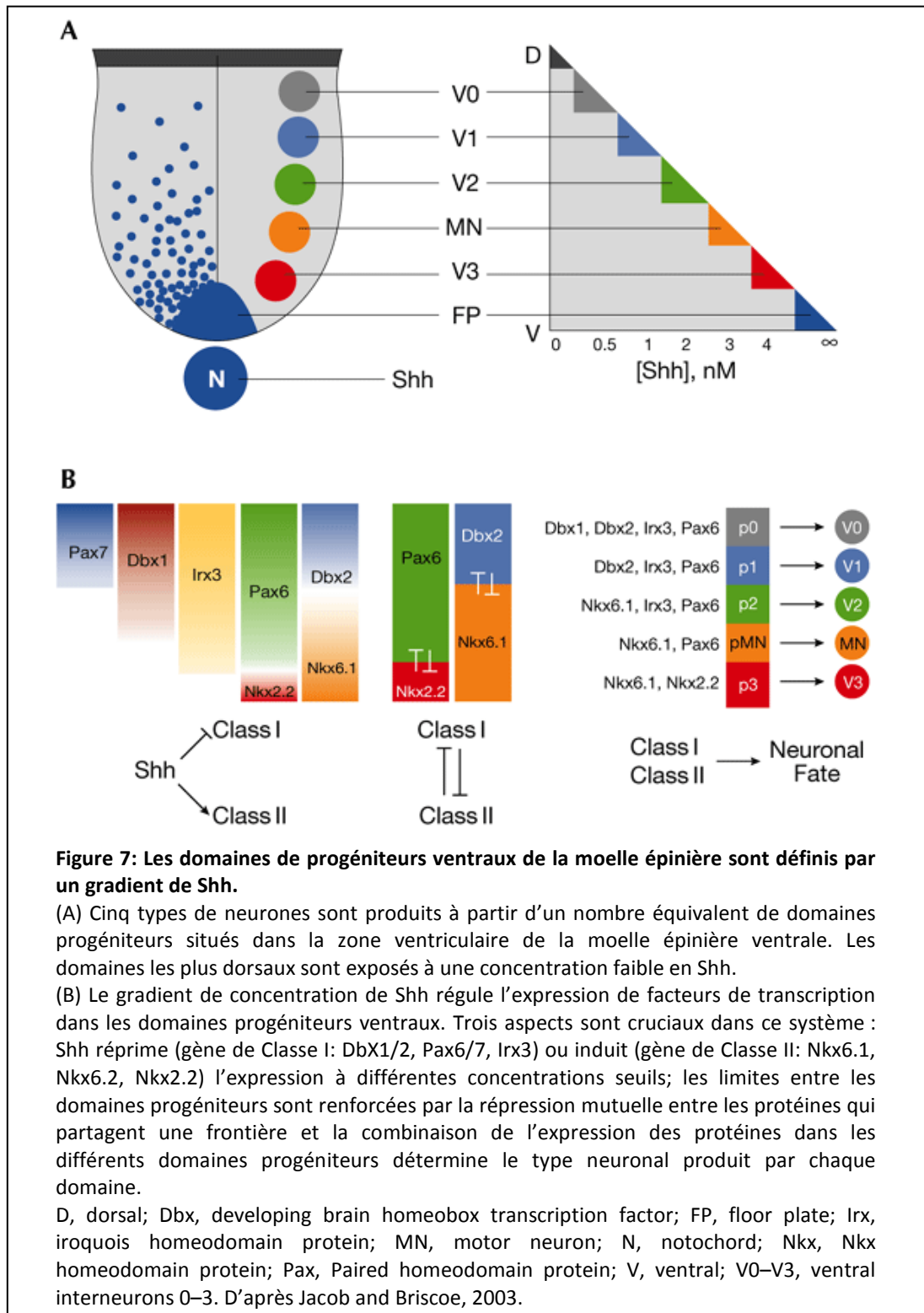
Durant le développement, des signaux morphogènes contribuent à la génération de populations de neurones spécifiques le long de l'axe D/V du tube neural. Dans la région dorsale, l'activation dans les cellules du toit d'une cascade de facteurs de croissance de la famille des TGF $\beta$  (dorsaline, activine, BMP) ainsi que de la famille Wnt est cruciale pour l'expression de gènes «dorsalisants» (*Pax3* et *Pax7* par exemple) dans les domaines progéniteurs (Figure 6) (Megason and McMahon, 2002; Liu and Niswander, 2005). A l'inverse, la régionalisation ventrale est contrôlée par la notochorde qui induit la différenciation des cellules du plancher<sup>2</sup> du tube neural. La protéine Sonic Hedgehog (Shh) est sécrétée par la notochorde puis par les cellules du plancher et dirige le développement du tube neural ventral (Fuccillo et al., 2006; Lupo et al., 2006; Dessaud et al., 2008).

---

<sup>2</sup> Région ventrale du tube neural constituée de cellules spécialisées, importantes notamment pour la production de substances dirigeant la croissance des axones commissuraux du côté contro-latéral.



Cette régionalisation ventrale est particulièrement évidente au niveau de la moelle épinière (Briscoe and Novitch, 2008). La protéine Shh, produite par la notochorde et le plancher, diffuse dans la moelle épinière ventrale et forme un gradient le long de l'axe D/V du tube neural (Figure 7A) (Stamatakis et al., 2005; Chamberlain et al., 2008). Ce gradient de concentration est suivi d'un changement d'activité des facteurs de transcription Gli dans les cellules progénitrices, transformant ainsi le signal morphogène en une activité intracellulaire (Stamatakis et al., 2005). Dès lors, une importante concentration de Shh est requise pour la production des domaines progéniteurs les plus ventraux tandis qu'une basse concentration est suffisante pour les domaines progéniteurs les plus dorsaux. Ce gradient d'activité permet d'induire des facteurs de transcription à Homéodomaine dits de classe II et de réprimer l'expression de facteurs de transcription dits de classe I dans les cellules progénitrices (Figure 7B). De plus, le gradient de signalisation Shh permet à chaque domaine progéniteur ventral d'exprimer une combinaison unique de ces facteurs de transcription. Ainsi, le domaine progéniteur de MN (pMN) est défini par l'expression de *Pax6*, *Nkx6.1*, *Nkx6.2* et *Olig2* tandis que le domaine progéniteur des interneurons V3 est caractérisé par l'expression de *Nkx6.1* et de *Nkx2.2* (Briscoe et al., 1999; Vallstedt et al., 2001).



De plus, la répression mutuelle entre les protéines de classe I et II renforce les limites entre deux domaines progéniteurs adjacents. Cinq domaines de progéniteurs ventraux sont ainsi générés : p0, p1, p2, pMN et p3. Ils sont constitués de cellules en prolifération qui, au cours de la neurogenèse, vont sortir du cycle cellulaire et se différencier en neurones. Cinq classes de neurones sont alors produites dans la moelle épinière ventrale : une classe de MN et quatre classes d'interneurones (V0, V1, V2 et V3). Ainsi, une concentration faible en *Shh* est nécessaire pour la production des populations les plus dorsales comme les interneurones V0, V1 et V2, une concentration moyenne pour la production des MN et une concentration forte pour les interneurones V3 et les cellules du plancher. A l'inverse, l'inactivation conditionnelle de *Shh* dans les cellules du plancher provoque la perte des domaines p3, pMN et p2 tandis que les cellules des domaines p0 et p1 s'étendent plus ventralement dans la moelle épinière.

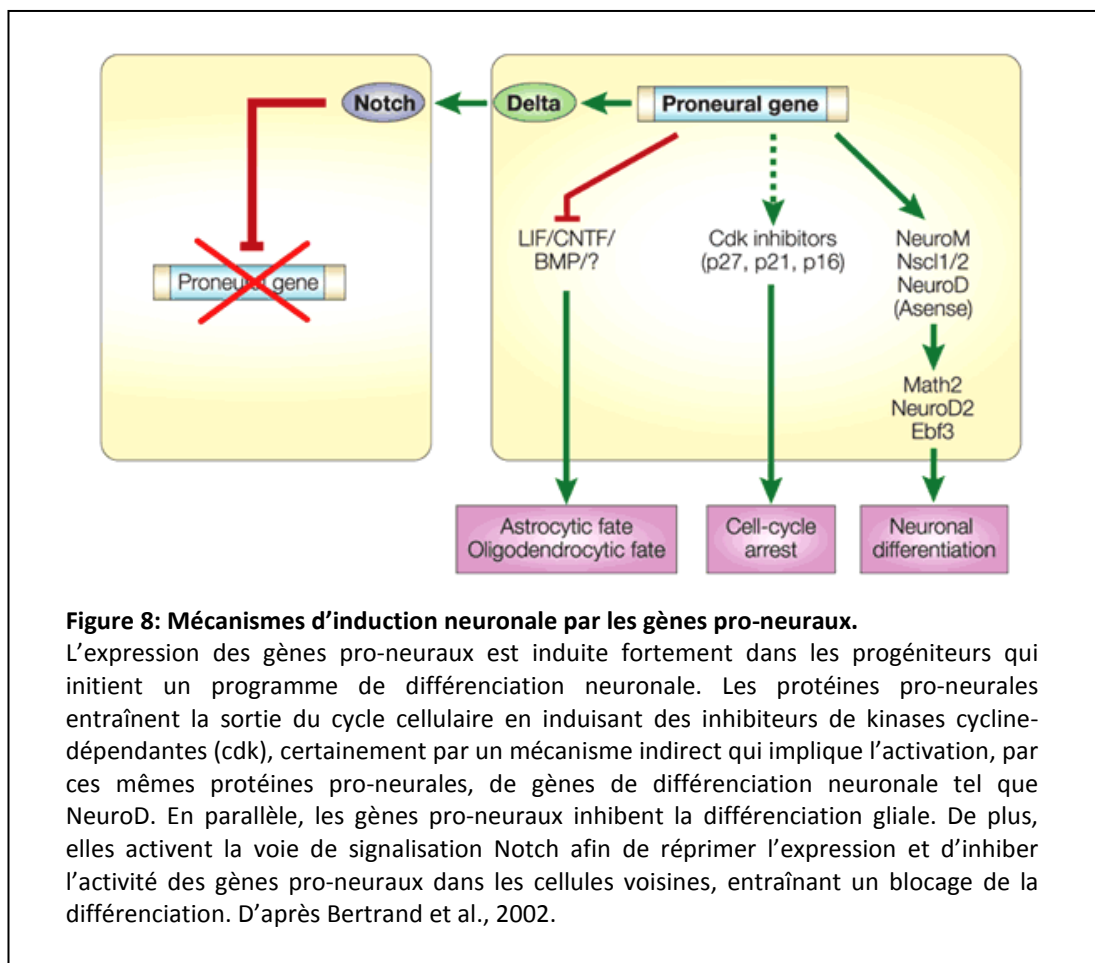
### ***1.1.3. Neurogenèse et spécification neuronale***

La différenciation de la plupart des types cellulaires présents dans le SNC se fait à partir de progéniteurs neuraux qui présentent initialement une intense activité mitotique. En se différenciant, ces cellules perdent leur capacité de division, expriment des marqueurs neuronaux ( $\beta$ 3-tubuline, NeuroD...) et acquièrent une identité spécifique. De plus, différents types de cellules neurales peuvent être produits dans une même région mais à des moments différents au cours du développement.

#### **a) Sortie du cycle cellulaire et expression de marqueurs neuronaux**

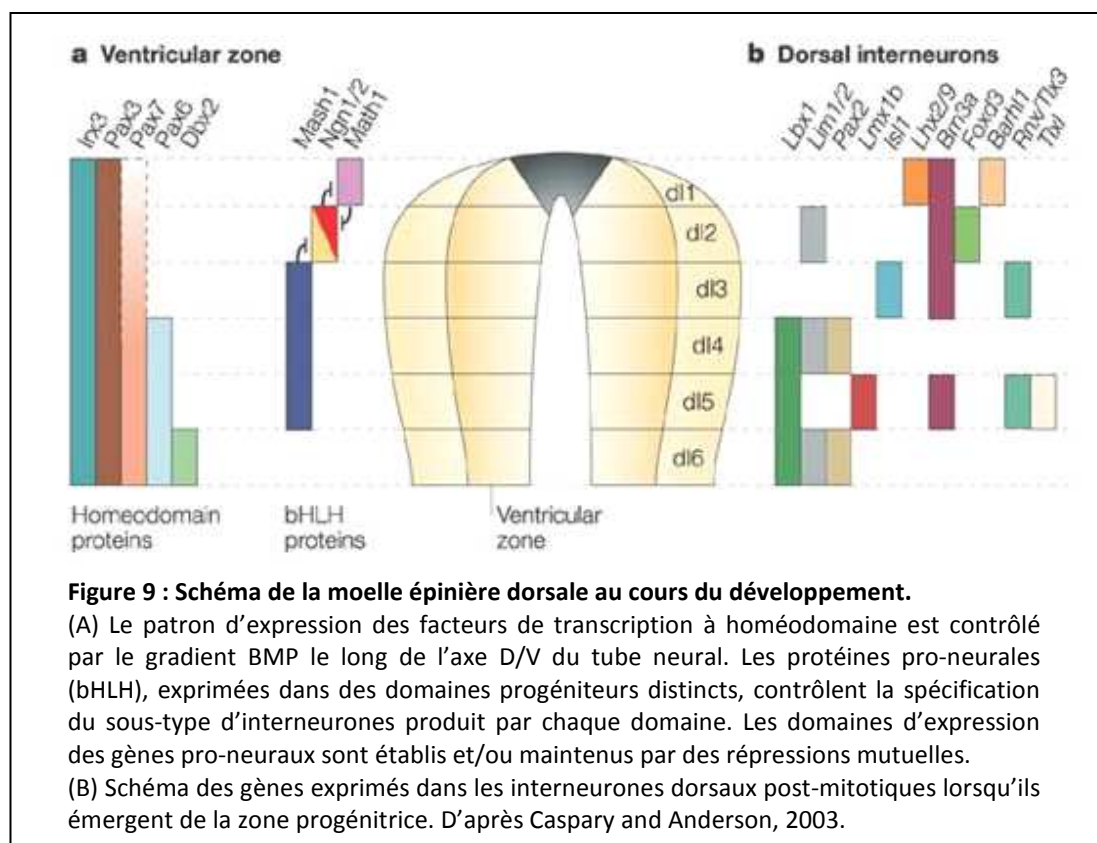
La neurogenèse correspond à la sortie du cycle cellulaire et à l'induction de l'expression de marqueurs spécifiques des cellules neuronales comme la  $\beta$ 3-tubuline ou NeuroD. Ces deux étapes sont contrôlées par les produits des gènes pro-neuraux exprimés dans les cellules progénitrices entamant leur différenciation (Lee, 1997; Bertrand et al., 2002). Plusieurs protéines pro-neurales ont été découvertes chez les mammifères : Hes1/5, Mash1/2, Math1/5, Ngn1-3, Olig... La plupart des gènes pro-neuraux sont exprimés exclusivement ou principalement dans le système nerveux au cours du développement et agissent comme des activateurs (Ngn2 et Mash1 par exemples) ou des répresseurs transcriptionnels (Olig2 et Hes1/5 notamment) (Kageyama et al., 2005).

Les produits des gènes pro-neuraux assurent la sortie du cycle cellulaire et l'induction de marqueurs neuronaux par quatre mécanismes (Figure 8) (Bertrand et al., 2002). Tout d'abord, les protéines pro-neurales participent à la sortie du cycle cellulaire en activant des inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (*Cdk*) comme p16, p21 ou p27. Ensuite, elles favorisent la différenciation neuronale en initiant l'expression de gènes spécifiques aux cellules neuronales (*B3-tubulin* ou *NeuroD*). Ainsi, l'expression ectopique de *Mash1* dans des cellules souches neurales induit la différenciation neuronale de ces cellules. En parallèle, elles inhibent la différenciation gliale. Notamment, le gène *GFAP* qui est spécifiquement exprimé dans les cellules gliales est induit par Stat1/3. Ngn1 est capable de séquestrer le co-activateur de Stat1/3 (p300/Smad) et donc d'empêcher l'expression de gènes spécifiques aux cellules gliales (Kageyama et al., 2005). Enfin, les protéines pro-neurales activent l'expression de ligand de la voie Notch qui inhibe la différenciation neuronale dans les cellules voisines afin que toutes les cellules progénitrices ne se différencient pas simultanément et que la différenciation neurale continue pendant une période relativement longue.



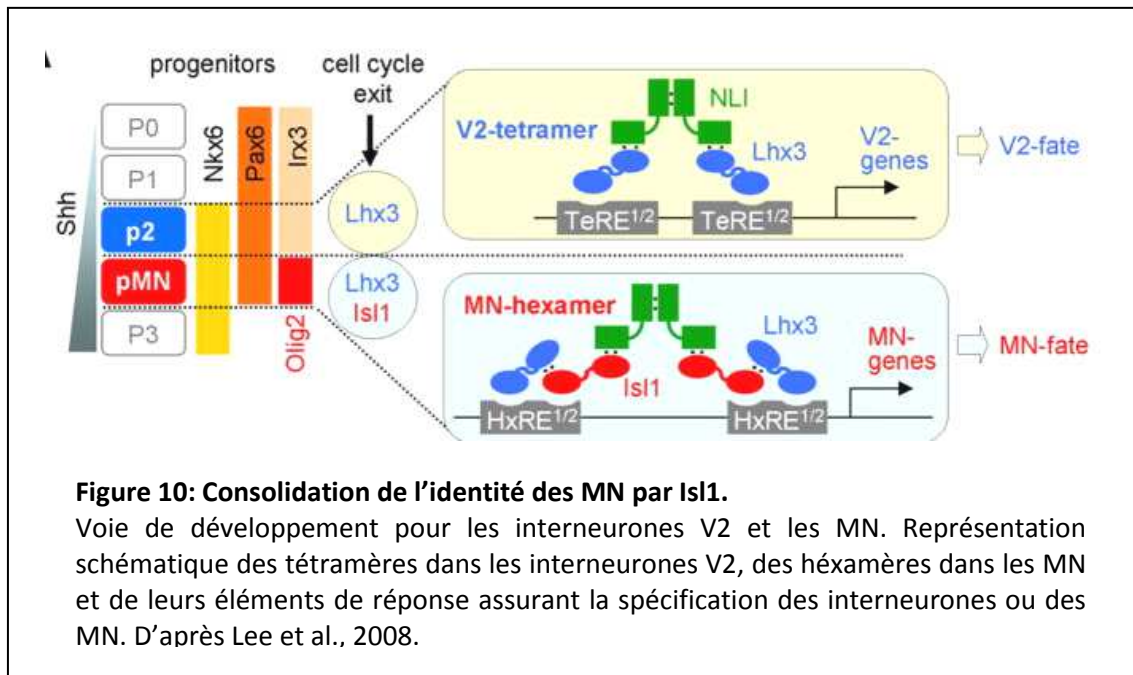
### b) Acquisition d'une identité spécifique

Des analyses génétiques ont révélé que les gènes pro-neuraux des vertébrés avaient des fonctions très hétérogènes. En effet, alors que certains sont impliqués uniquement dans la sortie du cycle cellulaire et la différenciation neuronale, d'autres participent également à la spécification des caractéristiques propres à chaque type de neurones (Bertrand et al., 2002; Guillemot, 2007). Certains gènes pro-neuraux peuvent en effet être exprimés dans des domaines progéniteurs restreints qui correspondent à la production d'un type particulier de neurones. Par exemple, *Mash1* est exprimé dans la région ventrale du prosencéphale et spécifie les neurones GABAergiques, tandis que *Ngn2* est exprimé dorsalement et spécifie les neurones glutamatergiques de cette région (Kageyama et al., 2005). Un autre exemple d'une telle corrélation est fourni dans la moelle épinière dorsale où *Math1*, *Ngn1* et *Mash1* sont exprimés de manière exclusive dans les domaines progéniteurs qui produisent les différents types d'interneurones dorsaux (Figure 9) (Caspary and Anderson, 2003).



Cette observation sous-entend qu'il est impossible de séparer la production de neurones à la spécification du type de neurones produits. Les protéines pro-neurales, en interagissant avec les autres facteurs de transcription exprimés de manière spécifique dans chaque domaine progéniteur, coordonnent ainsi la sortie du cycle cellulaire, la neurogenèse et la spécification du type de neurone produit. Un autre exemple est fourni lors de la différenciation du Locus Coeruleus, un noyau noradrénergique du SNC impliqué notamment dans la transition veille-sommeil. La co-expression du gène pro-neural *Mash1* avec le facteur de transcription *Phox2b* induit la différenciation neuronale et le caractère noradrénergique des cellules via l'induction de la Dopamine Beta-hydroxylase (Bertrand et al., 2002).

De manière similaire, le gène pro-neural *Olig2* est exprimé dans le domaine progéniteur des MN médullaires (pMN) et agit comme un répresseur transcriptionnel. Au stade embryonnaire (e) 9,5, la perte d'*Olig2* est nécessaire pour induire la différenciation neuronale et la spécification des MN dans le pMN (Mizuguchi et al., 2001; Novitsch et al., 2001; Lee and Pfaff, 2003). En effet, la diminution de l'expression d'*Olig2* autorise la production de la protéine pro-neurale Ngn2 qui coordonnera la sortie du cycle cellulaire, la neurogenèse et l'induction des premiers marqueurs de MN post-mitotiques: *Isl1*, *Hb9* et *Isl2* (Ericson et al., 1992; Tsuchida et al., 1994; Tanabe et al., 1998; Lee et al., 2005; Ma et al., 2008). Par la suite, l'identité des MN sera consolidée par la présence de ces marqueurs post-mitotiques. En effet, l'expression d'*Isl1* est nécessaire pour la survie des MN et la répression des gènes menant à la spécification d'autres destins cellulaires (Pfaff et al., 1996; Thaler et al., 2004; Song et al., 2009; Liang et al., 2011). Dans des embryons hypomorphes pour *Isl1*, la diminution de l'expression de ce gène provoque une diminution de la production de MN tandis que la population d'interneurones V2a est augmentée. Les MN médullaires et les interneurones V2 sont issus de deux domaines progéniteurs adjacents, pMN et p2 (Figure 10). Ils constituent deux types cellulaires distincts mais partagent l'expression de certains facteurs de transcription au cours de leur processus de spécification. En effet, lors de leur division finale, les interneurones V2 et les MN commencent à exprimer le facteur de transcription *Lhx3* ainsi que son cofacteur, *NLI* (nuclear LIM interactor). Les MN post-mitotiques expriment par ailleurs *Isl1*.

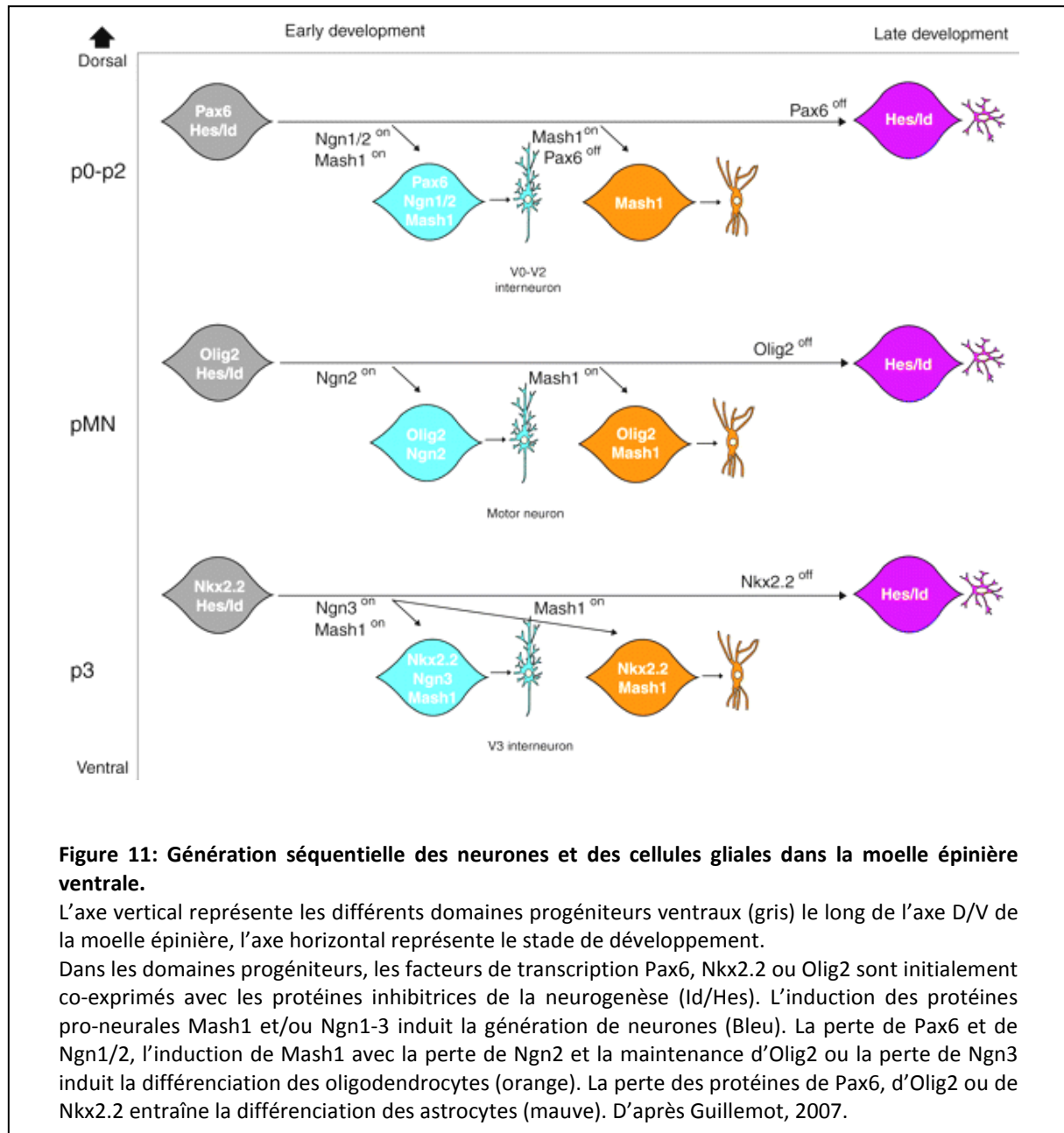


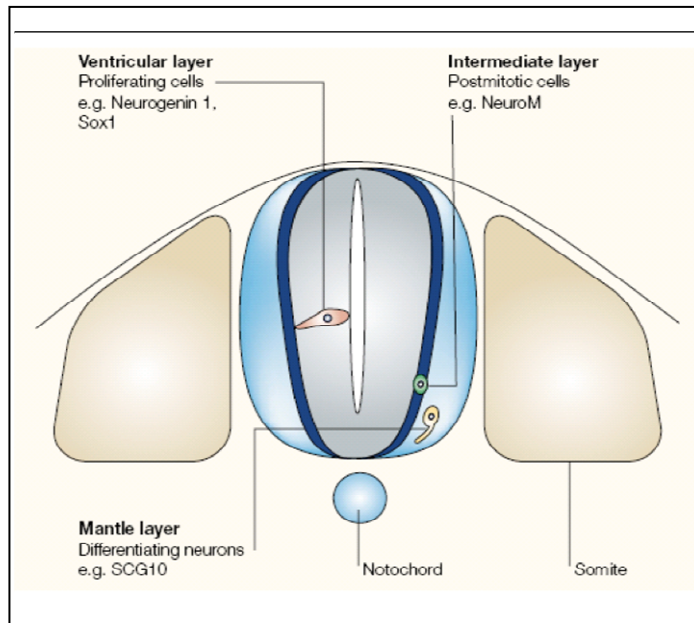
Dans les interneurons V2, deux protéines de Lhx3 se lient à un dimère de NLI pour former des complexes tétramériques 2Lhx3 :2NLI capables d'induire la différenciation des interneurons V2 (Thaler et al., 2002; Bhati et al., 2008). Dans les MN, la protéine Isl1 entre en compétition pour lier le cofacteur NLI et Lhx3 est déplacé sur la région C-terminale d'Isl1. Deux dimères d'Isl1 :Lhx3 se lient donc à un dimère de NLI pour former des complexes hexamériques 2Lhx3 :2NLI :2Isl1 responsables de l'induction des gènes spécifiques aux MN, notamment *Hb9* (Lee et al., 2008). Isl1 influence donc l'assemblage et la fonctionnalité des complexes protéiques impliqués dans la génération des MN afin de consolider leur identité. De plus, Isl2 semble exercer des fonctions similaires à celles d'Isl1 dans la consolidation de l'identité des MN. En effet, Isl2 est capable d'interagir avec le co-facteur NLI et cette interaction est nécessaire pour le développement des MN (Segawa et al., 2001). Dès lors, il a été proposé que le niveau global de protéines Isl, plutôt que la fonction spécifique attribuée à chaque facteur Isl, est critique pour la consolidation de l'identité des MN médullaires, ainsi que pour les autres processus dans lesquels les protéines Isl sont impliquées (Thaler et al., 2004; Hutchinson and Eisen, 2006). Finalement, *Hb9* participe également à la consolidation de l'identité des MN en réprimant directement l'expression de gène déterminant pour la différenciation des interneurons V2a, tel que *Chx10* (Arber et al., 1999; Thaler et al., 1999; Lee et al., 2008). Dès lors, dans les souris mutantes pour *Hb9* ou pour *Isl2*, la consolidation de l'identité des MN est altérée, ce qui provoque une

augmentation de l'expression de *Lhx3* et de *Chx10* et une expansion de la population d'interneurones V2a (Arber et al., 1999; Thaler et al., 1999; Thaler et al., 2004; Song et al., 2009; Liang et al., 2011).

### c) Spécification temporelle des destins neuraux

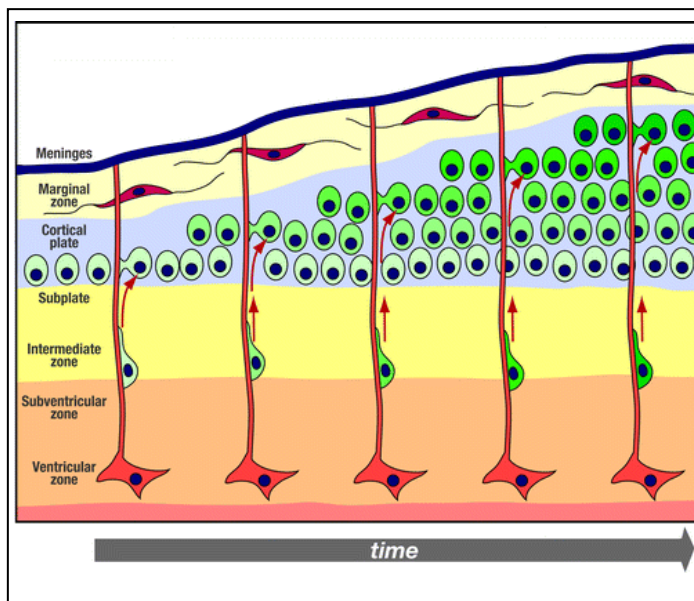
De manière générale, les cellules gliales sont produites après la neurogenèse : les domaines progéniteurs engendrent des neurones, ensuite des oligodendrocytes puis des astrocytes. Le choix alternatif entre une différenciation neuronale ou gliale est contrôlé, entre autres, par le maintien dans les domaines progéniteurs de l'expression des gènes pro-neuraux (Guillemot, 2007). La transition neurogenèse-gliogenèse a été particulièrement bien caractérisée dans la moelle épinière ventrale. Dans cette région, les MN et une partie des cellules gliales sont générés de manière séquentielle par le pMN (Figure 11). Les produits des gènes pro-neuraux *Olig2* et *Ngn2* constituent un code pour la spécification des neurones et des cellules gliales (Wu et al., 2006). En effet, l'expression d'*Olig2* et de *Ngn2* dans le pMN permet la différenciation neuronale et la spécification des MN médullaires (voir p.24). A un stade plus tardif du développement, l'activation de la voie Notch empêche l'expression de *Ngn2* dans les cellules progénitrices et la présence d'*Olig2* génère des oligodendrocytes, tout en continuant à inhiber la différenciation astrocytaire. Ainsi, la perte d'*Olig2* dans la moelle épinière de souris conduit à l'absence de MN et d'oligodendrocytes (Rowitch et al., 2002; Zhou and Anderson, 2002). Au contraire, des études de surexpression dans les embryons de poulet ou en culture cellulaire montrent que *Olig2* peut déclencher la neurogenèse ou la différenciation des oligodendrocytes, en fonction du stade de développement et de la présence d'autres facteurs de transcription dans les cellules (*Ngn2* notamment). Par la suite, l'inhibition d'*Olig2* par la protéine SCL (*Tal1*) et l'absence de *Ngn2* permettent l'expression de gènes spécifiques aux astrocytes.





**Figure 12: Organisation de la moelle épinière durant la neurogenèse.**

Durant la neurogenèse, le tube neural est divisé en trois zones distinctes : la zone ventriculaire contenant les corps cellulaires des cellules progénitrices en prolifération, la zone intermédiaire contenant des cellules post-mitotiques en voie de différenciation et, enfin, la zone du manteau constituée de neurones différenciés. D'après Diez del Corral and Storey, 2001.



**Figure 13: Formation du cortex cérébral.**

Les neurones corticaux sont guidés dans leur migration hors de la zone ventriculaire par les cellules de la glie radiaire. Les neurones les plus jeunes dépassent les neurones plus anciens afin de former les six couches cellulaires constituant le cortex cérébral. D'après Bielas et al., 2004.

## 1.2. Diversification neuronale et migration

Durant le développement embryonnaire, la zone ventriculaire est constituée des cellules progénitrices en prolifération qui vont produire les neurones et, plus tard, les cellules gliales (Figure 12). Les jeunes cellules post-mitotiques vont se libérer de la zone ventriculaire et migrer pour constituer une nouvelle couche de cellules en différenciation, appelée zone intermédiaire. Lorsque la différenciation cellulaire est très avancée, les jeunes neurones continuent leur migration au-delà de la zone intermédiaire pour former la zone du manteau (ou marginale).

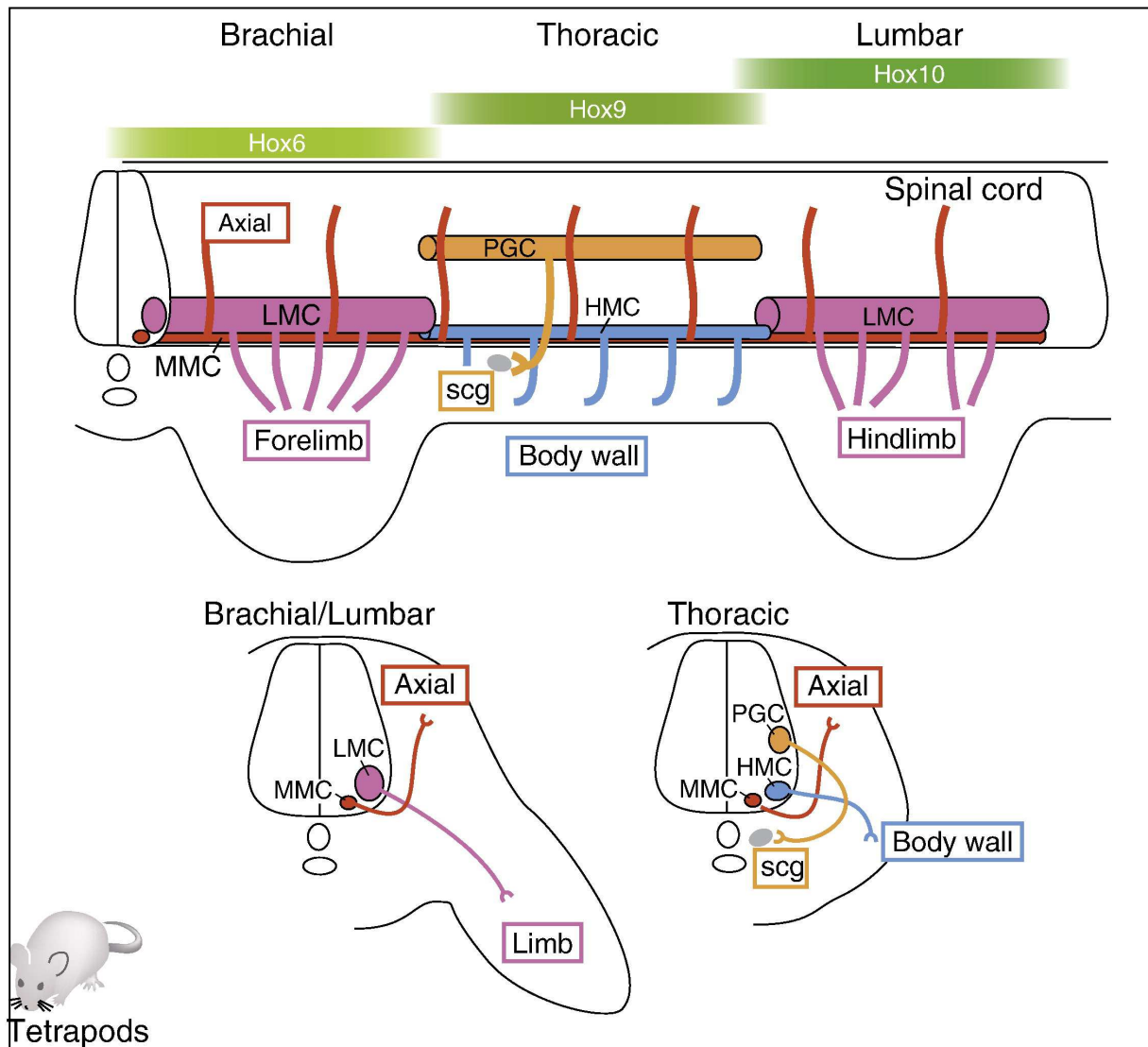
Dans certains cas, la position dans laquelle le neurone post-mitotique se fixera est en relation avec le moment de sa naissance. Par exemple, tous les neurones du cortex animal ont pour origine la zone de prolifération et migrent vers l'extérieur pour gagner leur position définitive en se liant à la glie radiaire (Figure 13). Le cortex cérébral est ainsi formé de six couches cellulaires numérotées de I à VI, de l'extérieur vers l'intérieur. Les neurones nés aux premiers stades du développement cortical migrent vers les régions les plus proches de leur lieu de naissance (couches les plus internes), alors que ceux qui apparaissent plus tard gagnent des zones plus éloignées, dans les couches les plus superficielles. Ainsi apparaît une vague de différenciation qui va de l'intérieur vers l'extérieur : les neurones plus jeunes dépassent les neurones plus anciens lors de leur migration vers leur position finale (Bielas et al., 2004).

### ***1.2.1 Migration et diversification neuronale***

La fonction neuronale requiert des connexions précises entre le neurone et leur cible. La formation de ces connexions nécessite que le corps cellulaire du neurone soit situé au bon endroit afin que ses projections puissent atteindre la cible en suivant les indices fournis par l'environnement extracellulaire (voir p.41). Peu de choses sont connues sur les messages spécifiques que les neurones reçoivent au cours de leur migration vers la zone marginale. Cependant, il est apparu que bouger à travers un environnement cellulaire différent est essentiel pour le développement du SNC car le cheminement des neurones au sein d'environnements extracellulaires variés contribue à la diversité neuronale. Par exemple, les couches du cortex cérébral sont constituées de neurones présentant des formes et des connexions différentes d'une couche à l'autre. La couche IV (couche

granulaire interne) contient des cellules étoilées de petites tailles, les cellules réceptrices, tandis que la couche V est essentiellement composée de grandes cellules pyramidales. Différents gènes sont donc exprimés dans les neurones corticaux en fonction de leur position, impliquant l'existence de différents signaux le long de leur chemin de migration. Excepté une étude démontrant que le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) agissait comme un signal extrinsèque important pour la détermination des couches corticales, peu de signaux ont été identifiés dans ce processus. Ainsi, la surexpression de BDNF dans le ventricule télencéphalique induit une modification de la position, de l'expression des gènes et des projections des neurones destinés à peupler la couche IV qui acquièrent l'identité des neurones des couches corticales profondes V et VI. A l'inverse, en présence d'anticorps anti-BDNF, les cellules destinées à la couche IV acquièrent l'identité des neurones des couches II et III (Fukumitsu et al., 2006). Ces observations démontrent que, bien que descendant d'un même domaine progéniteur, les cellules post-mitotiques divergent en suivant des chemins de migration spécifiques et se différencient en plusieurs sous-types neuronaux.

Cette diversification neuronale est également observée dans les MN de la moelle épinière. A e9.5, les MN post-mitotiques expriment les marqueurs précoces *Isl1*, *Isl2* et *Hb9* (voir p.24) et présentent la capacité d'acquérir les caractéristiques communes à tous les MN médullaires (Ericson et al., 1992; Tsuchida et al., 1994; Tanabe et al., 1998). Ces caractéristiques génériques incluront la projection d'un axone hors de la moelle épinière et l'utilisation de l'acétylcholine comme neurotransmetteur. Ces nouveaux MN vont rapidement se diversifier au cours de leur migration en différentes populations qui constitueront quatre types de colonnes motrices distinctes: trois colonnes somatiques et une colonne viscérale (Figure 14). A e12.5, chaque colonne est définie par sa position dans la moelle épinière, par l'expression d'une combinaison de facteurs de transcription et par la cible qu'elle innerve (Tsuchida et al., 1994; Jessell, 2000; Price and Briscoe, 2004; Dasen and Jessell, 2009). Les MN somatiques qui innervent les muscles du dos sont localisés dans les colonnes motrices médianes (MMC) qui s'étendent tout le long de l'axe A/P de la moelle épinière.



#### Tetrapods

**Figure 14: Organisation des colonnes motrices et distribution des protéines HOX dans la moelle épinière des tétrapodes.**

Les colonnes motrices sont générées dans des positions spécifiques le long de l'axe A/P de la moelle épinière. Les colonnes motrices latérales (LMC) sont générées au niveau brachial ou lombaire, et innervent les muscles des membres (Limb). Au niveau thoracique, les colonnes pré-ganglionnaires (PGC) innervent la chaîne ganglionnaire sympathique (scg), tandis que les colonnes motrices hypaxiales (HMC) innervent les muscles intercostaux ou de la paroi abdominale (body wall musculature). Les colonnes motrices médianes (MMC) sont présentes tout le long de l'axe A/P de la moelle épinière et innervent les muscles du dos (axial musculature). Les gènes *Hox6*, *Hox9* et *Hox10* sont exprimés dans les régions spécifiques de la moelle épinière selon l'axe A/P et dirigent l'identité des MN ainsi que la connectivité à leurs cibles périphériques. *Hox6* contrôle l'identité des LMC brachiales, *Hox9* contrôlent l'identité des HMC et PGC, et *Hox10* contrôlent l'identité des LMC lombaires. D'après (Murakami and Tanaka, 2011).

Les MN qui innervent les muscles intercostaux ou ceux de la paroi abdominale sont présents uniquement dans la région thoracique et sont regroupés dans les colonnes motrices hypaxiales (HMC), situés latéralement par rapport à la MMC. Les MN viscéraux innervent la chaîne sympathique ganglionnaire et se rassemblent dans les colonnes motrices pré-ganglionnaires (PGC), situées dorsalement par rapport aux MN somatiques et exclusivement présentes dans la région thoracique de la moelle épinière. De manière similaire, les MN somatiques innervant les membres sont regroupés dans les colonnes motrices latérales (LMC), présentes uniquement dans les régions adjacentes aux membres (niveau brachial ou lombaire) (Landmesser, 1978).

Tous les neurones présents dans les LMC projettent initialement leur axone selon une trajectoire commune mais, à la base du membre, les axones bifurquent pour innerver la partie dorsale (muscles extenseurs) ou ventrale (muscles fléchisseurs) du membre. La projection des axones suivant la branche ventrale ou dorsale est en corrélation avec la position des corps cellulaires dans la LMC. Les neurones situés latéralement dans la LMC (LMCl) envoient leur axone exclusivement dans la région dorsale du membre, tandis que ceux situés médialement dans la LMC (LMCm) forment la branche innervant la région ventrale des membres. Les neurones exprimant *Lhx1* se trouvent dans la LMCl, tandis que ceux qui expriment *Is1* sont situés dans la LMCm. Une répression mutuelle entre ces deux facteurs de transcription renforce l'identité des divisions de la LMC.

Les MN qui innervent les membres poursuivent encore leur diversification par la ségrégation des neurones en 'pools' de MN (Lin et al., 1998). Les neurones présents dans chaque pool dirigent leur axone vers un muscle cible particulier (voir p.45).

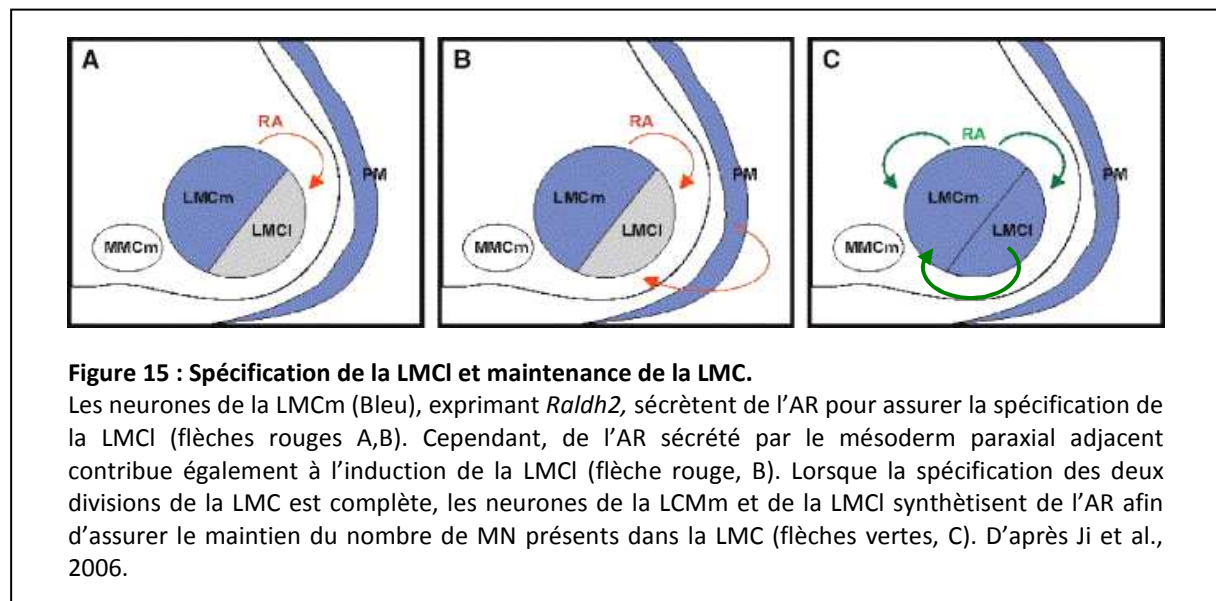
La diversification des MN médullaires et la combinaison des facteurs de transcription utilisée pour distinguer les différentes colonnes motrices sont résumées dans le tableau 1.

**Tableau 1: Marqueurs utilisés pour reconnaître les jeunes MN post-mitotiques et les différentes colonnes motrices.**

|                   |     | e9.5                | e10.5                                                                                                | e12.5                                                | Cibles                                                     |
|-------------------|-----|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>Viscéraux</b>  | PGC | Hb9<br>Isl1<br>Isl2 | Isl1<br>Foxp1 (faible)<br>Sip1                                                                       | nNos<br>pSMAD1/5/8<br>Sip1<br>Foxp1 (faible)<br>Isl1 | Chaîne sympathique<br>ganglionnaire                        |
| <b>Somatiques</b> | MMC |                     | Isl1<br>Isl2<br>Hb9                                                                                  | Isl1<br>Isl2<br>Hb9<br>Lhx3                          | Muscles du dos                                             |
|                   | HMC |                     |                                                                                                      | Isl1<br>Isl2<br>Hb9                                  | Muscles intercostaux<br>ou de la paroi<br>abdominale       |
|                   | LMC |                     | Foxp1 (fort)<br>Raldh2<br>Isl2<br><u>LMCm</u> : Isl1, Hb9 (Faible)<br><u>LMCI</u> : Lhx1, Hb9 (fort) |                                                      | Partie dorsale (LMCI)<br>ou ventrale (LMCm)<br>des membres |

A l'inverse de ce qui se passe dans les couches corticales, le lien entre la naissance, le chemin de migration et l'identité cellulaire n'a pas été démontré dans les colonnes motrices de la moelle épinière ventrale, à l'exception des divisions de la LMC (Figure 15). Les MN de la LMC sont caractérisés par l'expression de l'enzyme *Retinaldéhyde Deshydrogenase-2* (Raldh2) responsable de la synthèse d'AR (Vermot et al., 2005). Les MN qui forment la LMCm quittent le cycle cellulaire avant les neurones de la LMCI (Sockanathan and Jessell, 1998). Par conséquent, les MN de la LMCI doivent migrer à travers ceux de la LMCm pour atteindre leur destination latérale finale. Au cours de cette migration, l'AR sécrété par les neurones de la LMCm impose, de manière extrinsèque, le caractère latéral dans les neurones générés plus tardivement en inhibant l'expression d'*Isl1* et en induisant *Lhx1* (Figure 15A) (Ji et al., 2006). Ainsi, la culture d'explants de moelles embryonnaires brachiales en présence d'AR augmente le nombre de MN exprimant *Lhx1* et dépourvus d'*Isl1*, un phénotype correspondant à la LMCI (Sockanathan and Jessell, 1998). A l'inverse, l'inactivation conditionnelle du gène *Raldh2* dans les MN de la LMC brachiale résulte en une diminution du nombre de neurones de la LMCI (Vermot et al., 2005).

Durant la diversification de la LMC, de l'AR est également sécrété par le mésoderme adjacent qui constitue donc une seconde source d'AR importante pour l'induction de la LMCI au niveau brachial et lombaire de la moelle épinière (Figure 15B). Lorsque la spécification des deux divisions de la LMC est terminée, les neurones de la LMCm et de la LMCI synthétisent de l'AR afin d'assurer le maintien et la survie des neurones au sein de la LMC (Figure 15C) (Ji et al., 2006).

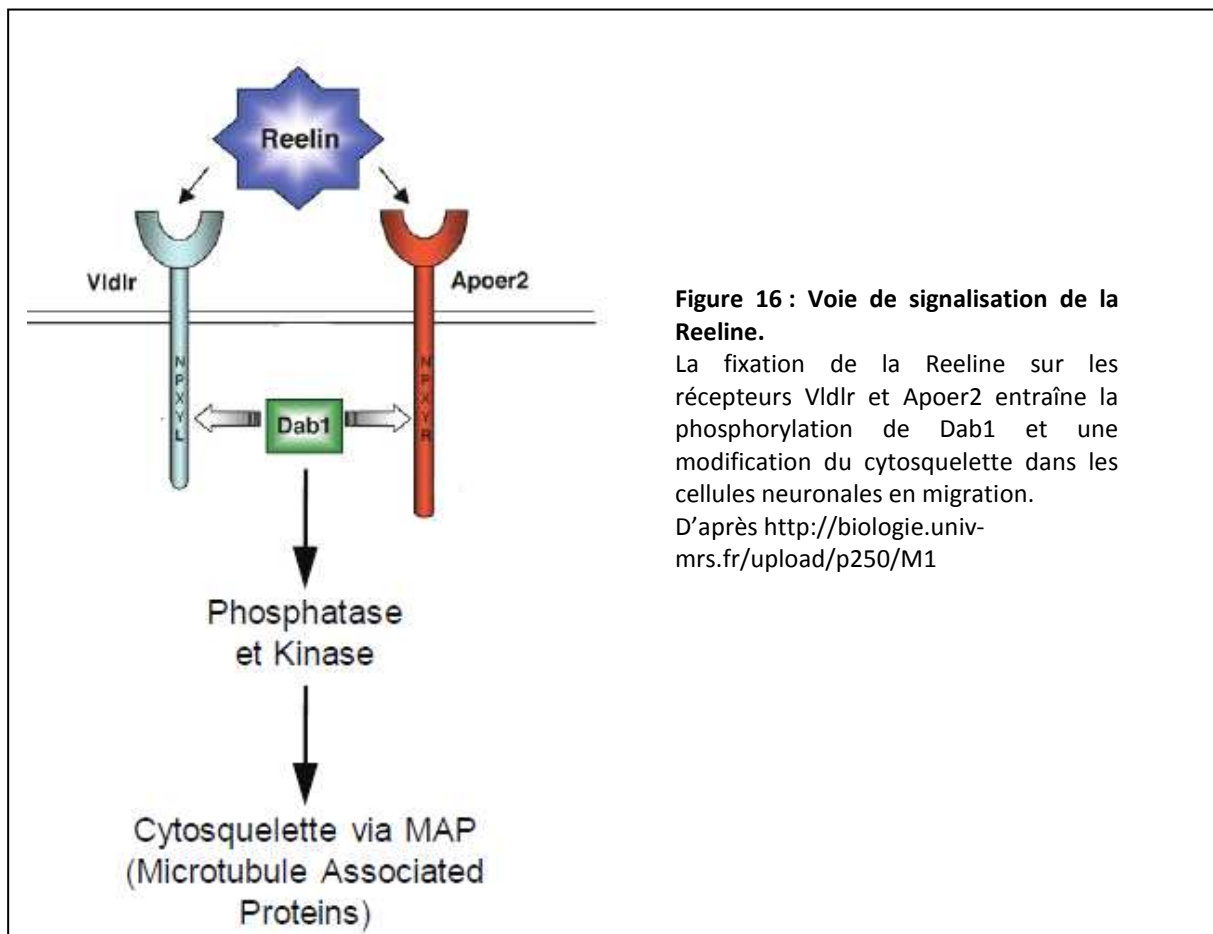


### 1.2.2 Contrôle de la migration neuronale

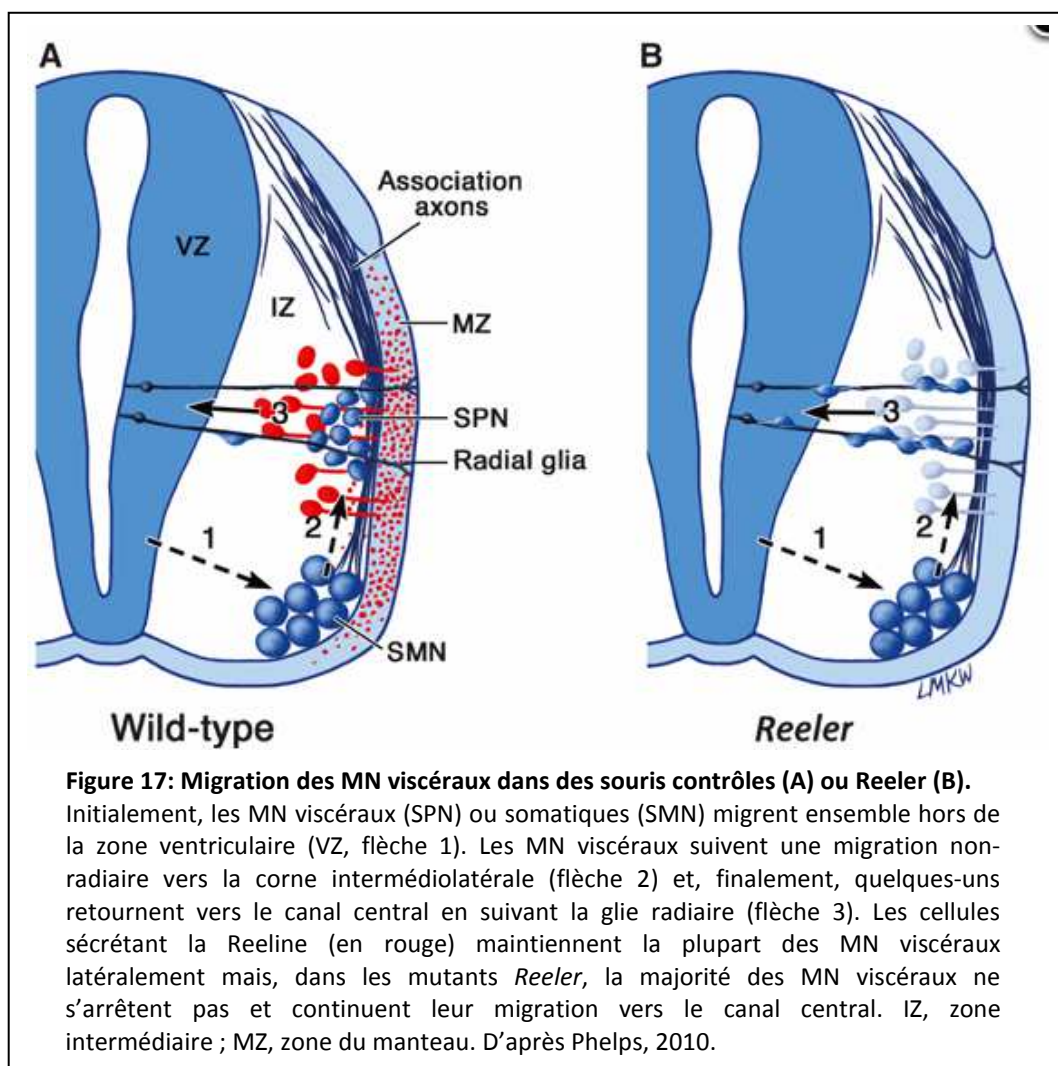
Au sein du SNC, on distingue deux modes de migration à partir de la région progénitrice : la migration radiaire et la migration tangentielle. La plupart des neurones post-mitotiques utilisent le premier mode de migration en suivant la glie radiaire, composée de progéniteurs dont le corps cellulaire est situé dans la zone ventriculaire et présente une extension liée à la surface piaie (externe) du tube neural. Par ce processus, les neurones vont peupler le manteau en regard de la zone progénitrice dans laquelle ils ont été générés. Plusieurs systèmes non spécifiques interviennent de façon combinatoire et séquentielle pour permettre aux neurones de reconnaître et d'adhérer aux cellules gliales le long desquelles ils doivent migrer : les molécules d'adhérence cellulaire (cadhérines, astrotactin...) et les composantes de la matrice extracellulaire (thrombospondine, métalloprotéinases matricielles ou MMP, laminine...) (Rakic, 1990; Hatten, 1999).

L'étude de souris mutantes a permis de nombreuses avancées dans la compréhension des mécanismes contrôlant la migration neuronale le long de la glie radiaire. Notamment, la

souris Reeler présente une organisation inversée des couches corticales due à l'inactivation du gène *Reelin* (Phelps, 2010). Ce dernier code pour une grande glycoprotéine, la Reeline, qui est sécrétée dans la matrice extracellulaire et qui interagit avec différentes molécules de surface, notamment VLDLR (very low density lipoprotein receptor) et ApoER2 (Apolipoprotein E receptor 2) (Figure 16). L'action de la Reeline est relayée dans les cellules par la phosphorylation de Dab1 (Disabled-1) par une kinase de la famille Src (SFK). Dab-1 est alors capable d'agir sur le cytosquelette et d'influencer la migration des cellules neuronales. Au cours du développement, la Reeline est fortement détectée quand les neurones corticaux commencent leur migration hors de la zone ventriculaire. Son absence, dans la souris Reeler, empêche les nouveaux neurones corticaux de passer à travers leurs prédécesseurs.

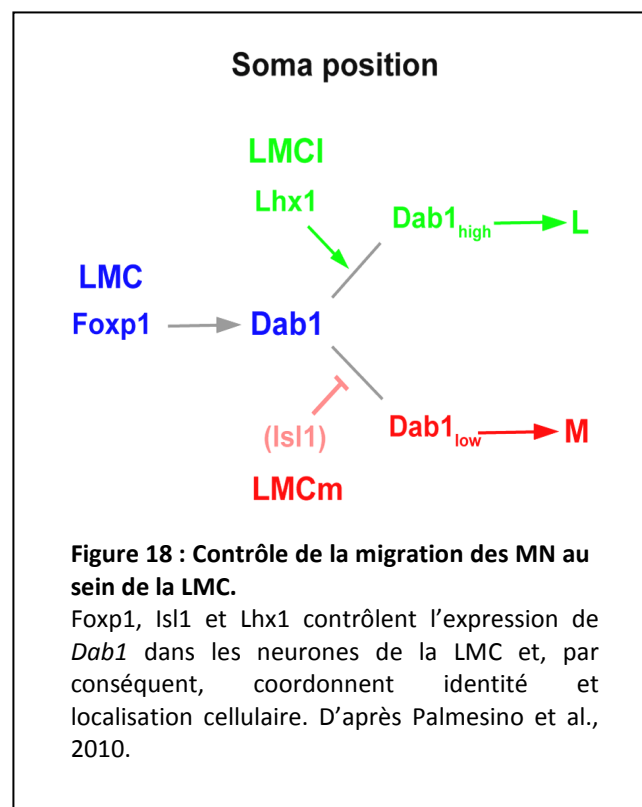


Dans la moelle épinière ventrale, la Reeline est produite par les interneurons V1 et V2 qui entourent le domaine des MN post-mitotiques (Carroll et al., 2001; Yip et al., 2004). Au niveau thoracique, les MN viscéraux et somatiques migrent ensemble hors de la zone ventriculaire (Figure 17). Les MN somatiques restent positionnés ventralement, tandis que les neurones viscéraux vont se déplacer dorsalement. Finalement, quelques neurones de la PGC vont migrer médialement le long de la glie radiaire vers le canal central. Dans les mutants *Reeler*, la plupart des neurones de la PGC ne s'arrêtent pas dans leur migration et continuent vers le canal central (Phelps et al., 2002). La Reeline et les composantes de sa voie de signalisation agissent donc sur les neurones viscéraux dans la moelle épinière ventrale afin d'arrêter leur migration (Yip et al., 2007; Yip et al., 2011). Des études biochimiques démontrent notamment que, après phosphorylation, Dab1 stabilise le cytosquelette des cellules en agissant sur la n-cofilin afin de réduire le mouvement de migration des MN viscéraux (Kruger et al., 2010).



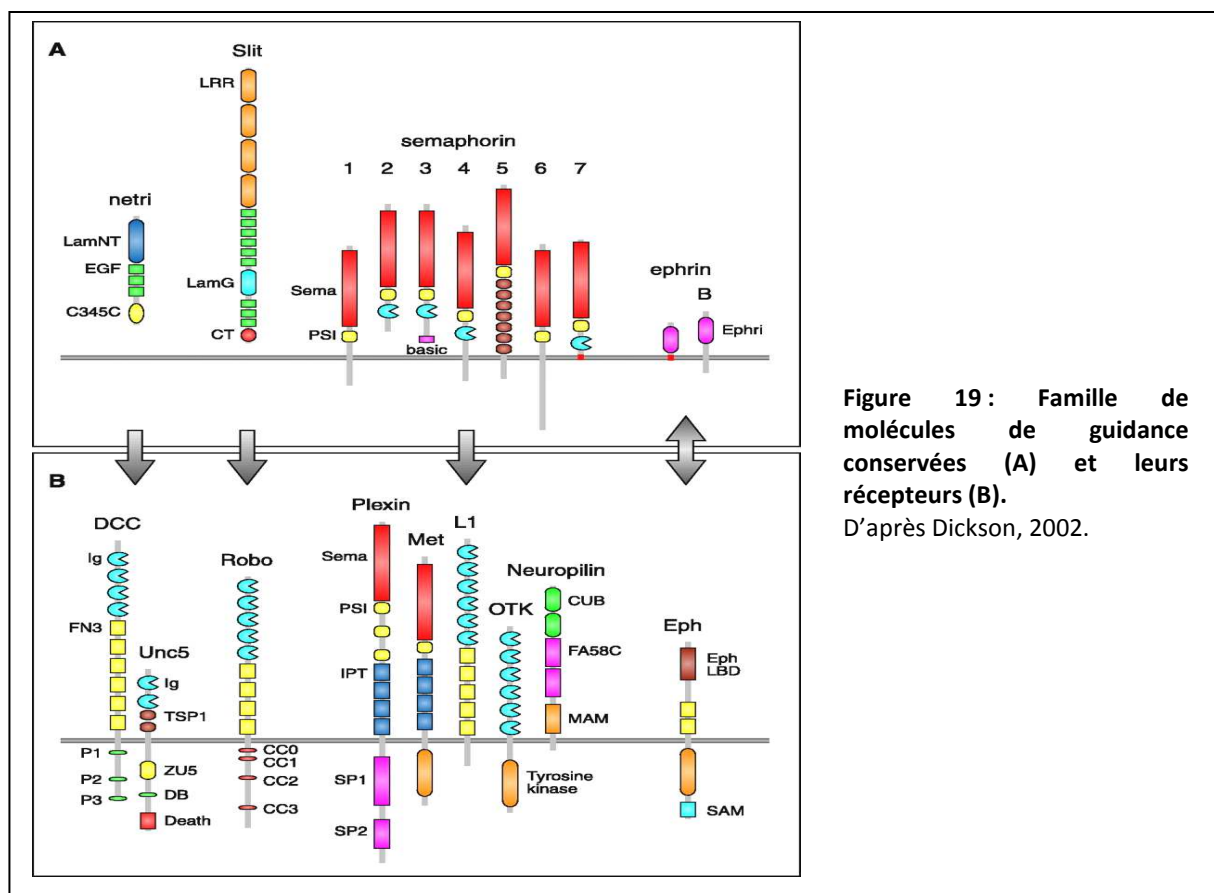
**Figure 17: Migration des MN viscéraux dans des souris contrôles (A) ou *Reeler* (B).** Initialement, les MN viscéraux (SPN) ou somatiques (SMN) migrent ensemble hors de la zone ventriculaire (VZ, flèche 1). Les MN viscéraux suivent une migration non-radiale vers la corne intermédiolatérale (flèche 2) et, finalement, quelques-uns retournent vers le canal central en suivant la glie radiaire (flèche 3). Les cellules sécrétant la Reeline (en rouge) maintiennent la plupart des MN viscéraux latéralement mais, dans les mutants *Reeler*, la majorité des MN viscéraux ne s'arrêtent pas et continuent leur migration vers le canal central. IZ, zone intermédiaire ; MZ, zone du manteau. D'après Phelps, 2010.

De la même manière, la position des cellules dans la LMC est dépendante de la voie de signalisation de la Reeline (Figure 18) (Palmesino et al., 2010). La présence de *Lhx1* dans la LMCI induit une expression plus forte de *Dab1* dans ces cellules, comparée à celle des neurones de la LMCm. Par conséquent, *Dab1* est exprimé à différentes concentrations dans les deux divisions de la LMC. La forte concentration de *Dab1* est nécessaire pour positionner latéralement les MN de la LMCI par rapport à ceux de la LMCm. Ainsi, les facteurs de transcription présents dans la LMC déterminent l'identité des deux divisions (voir p.32) mais également la position relative des MN qui les composent.



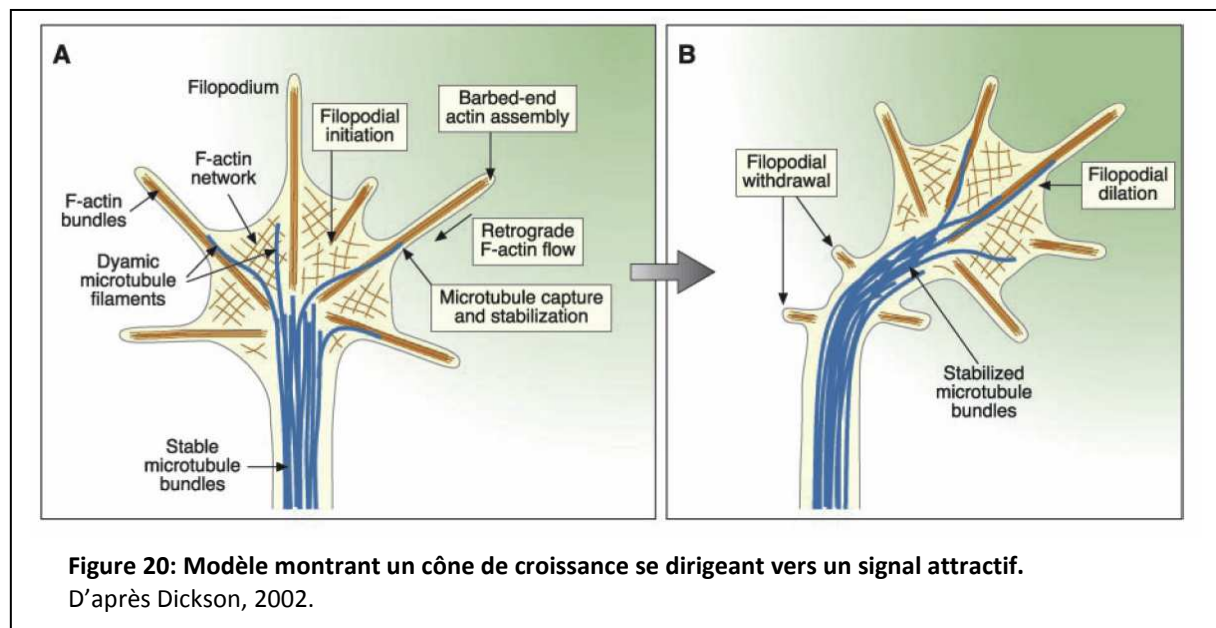
La migration radiaire n'est pas le seul mécanisme utilisé par les neurones pour envahir le système nerveux. Un nombre considérable de cellules, notamment les interneurones, migrent indépendamment de la glie radiaire, ce qui permet une migration dans des compartiments neuronaux adjacents, le long de l'axe A/P ou D/V du tube neural (Rakic, 1990). Cette migration tangentielle peut se produire sur de longues distances, permettant ainsi la redistribution de différents sous-types neuronaux. Ce processus migratoire est orienté par des signaux présents dans l'environnement dans lequel les cellules progressent. En effet, l'environnement contient de nombreux indices positionnels permettant de les guider : des cibles intermédiaires expriment des signaux moléculaires leur

permettant ainsi de parcourir une succession de petits trajets jusqu'à leur position finale (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Marin et al., 2010). Deux mécanismes contrôlant la migration cellulaire ont été identifiés : l'attraction et/ou la répulsion par contact et la chimio-attraction et/ou répulsion par des molécules diffusibles. Les chercheurs ont identifié les Ephrines, les Sémaphorines, les Nétrines, les protéines Slits comme signaux importants pour la migration cellulaire (Figure 19) (Rakic, 1990; Mueller, 1999; Dickson, 2002). La combinaison de ces molécules présentes dans l'environnement extracellulaire permet d'orienter des flux de migration importants dans le SNC. Notamment, il a été démontré que l'expression dans le striatum de *Sema3A* et de *Sema3E* agissent sélectivement sur la migration des interneurons corticaux et striataux. En effet, contrairement aux interneurons striataux, les interneurons corticaux expriment deux récepteurs aux sémaphorines (Neuropiline 1 et 2) qui vont agir de manière répulsive et maintenir ces neurones hors du striatum (Marin and Rubenstein, 2001). Une activité en Neurégulin 1 contribue à les attirer vers le cortex cérébral (Flames et al., 2004). Ces molécules chimiotropiques participent également au guidage axonal (voir p.39).



### 1.3. Le guidage axonal

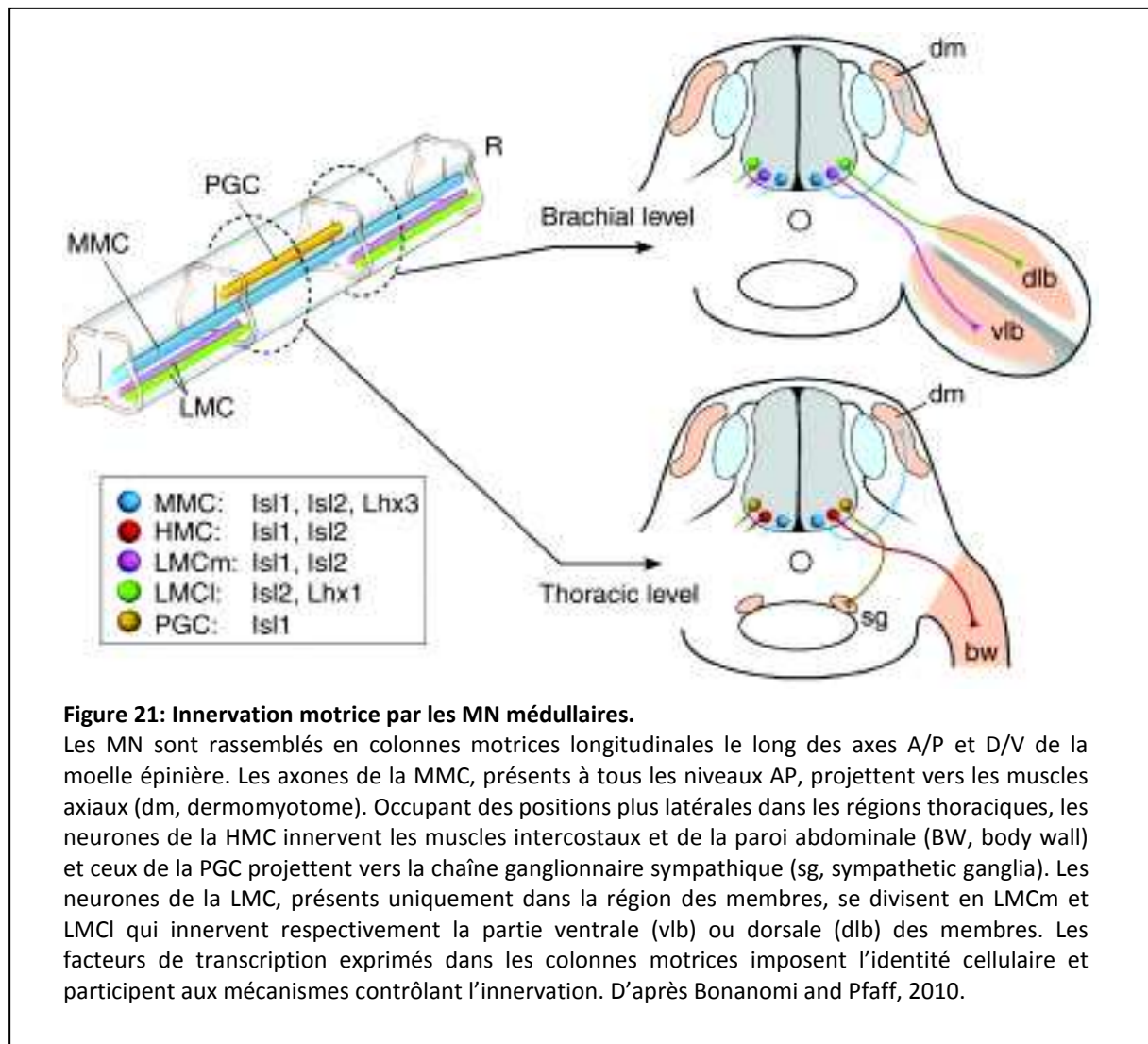
La constitution d'un réseau complexe de connexions neuronales est une des étapes cruciales au cours du développement du SNC. Le cône de croissance, situé à l'extrémité des axones et des dendrites, est composé de feuilletts membranaires aplatis (les lamellipodes) desquels partent de fines expansions appelées filopodes (Figure 20). Suite à une polymérisation de l'actine, ces filopodes s'étirent et se rétractent constamment pour explorer l'environnement afin de diriger la croissance de l'axone (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Mueller, 1999).



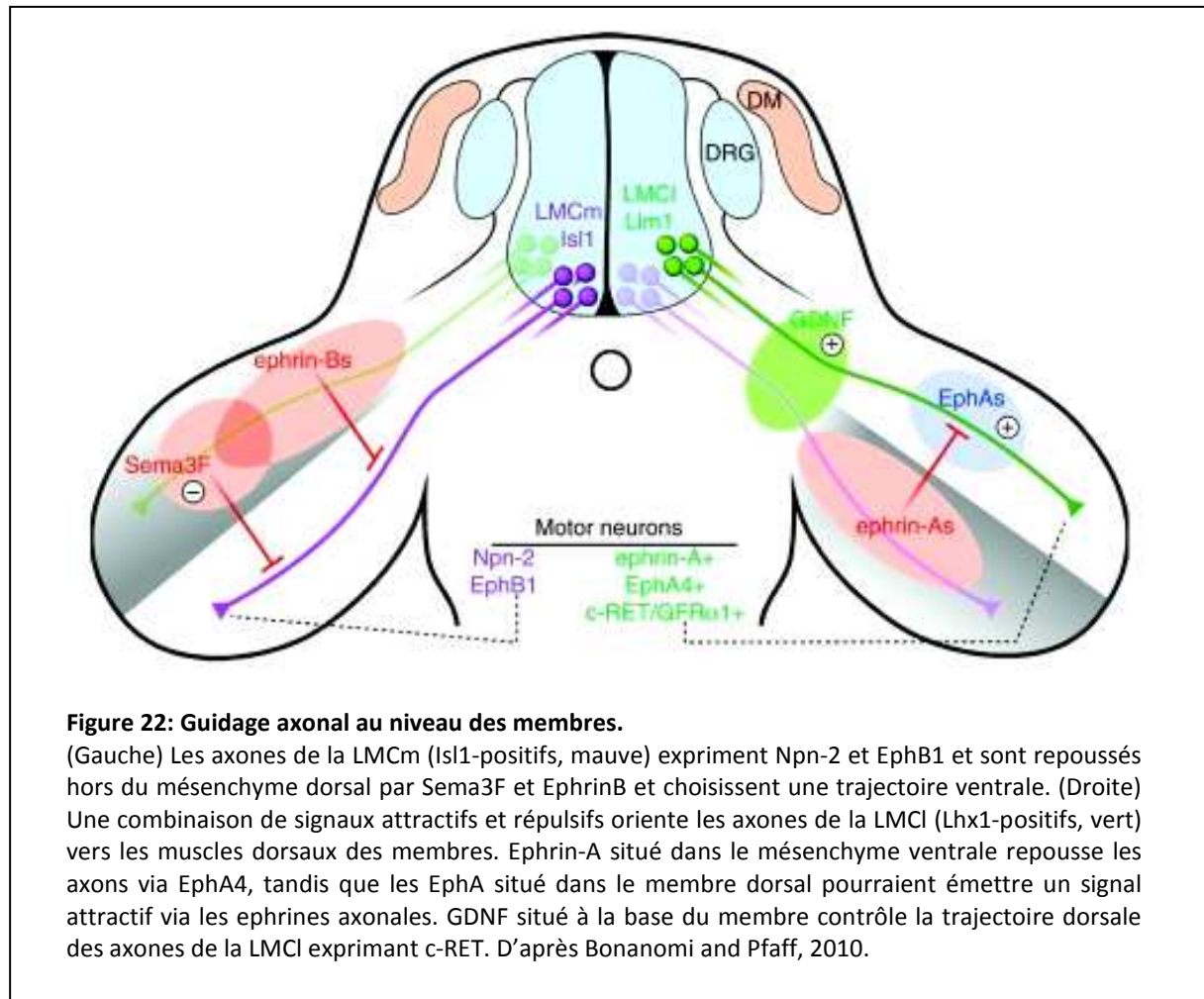
L'activité du cône de croissance est influencée par les contacts établis par les filopodes avec d'autres cellules et avec la matrice extracellulaire (Polleux et al., 2007). En général, le déplacement a lieu dans la direction où les contacts sont les plus solides. De plus, des substances diffusibles se lient aux récepteurs sur la surface du cône et influencent ainsi le sens de migration de l'axone. Notamment, des études génétiques et biochimiques ont permis d'impliquer les nétrines, les protéines slits, les sémaphorines et les éphrines, ainsi que leurs récepteurs dans le guidage axonal (voir p38, Figure 19) (Brose et al., 1999; Mueller, 1999; Patel et al., 2001; Dickson, 2002; Kullander et al., 2003; Long et al., 2004; Mambetisaeva et al., 2005; Gallarda et al., 2008). Certaines de ces molécules favorisent l'extension du cône, d'autres l'inhibent en provoquant son arrêt. En outre, les cônes de croissance offrent des réponses remarquablement variées et modulables en présence de

ces molécules sécrétées, expliquant la grande diversité de leurs réactions face à un même stimulus.

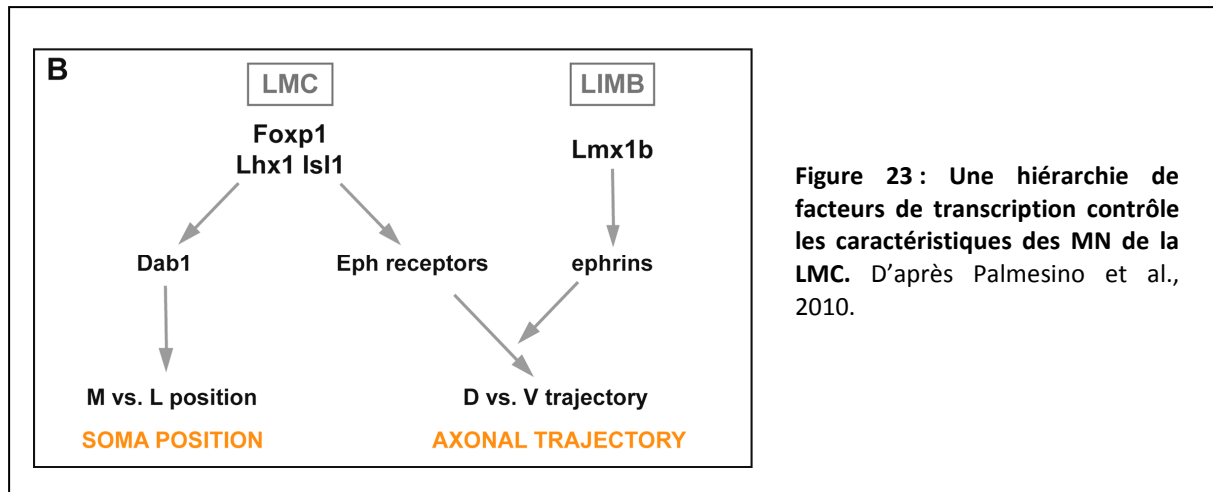
Au cours du développement, les projections axonales des MN médullaires s'étendent sur des distances considérables afin d'atteindre leurs cibles situées en dehors du SNC. Cependant, leurs axones suivent des trajectoires stéréotypées et, très vite, une relation émerge entre la position des corps cellulaires dans la moelle épinière et la localisation des cibles dans la périphérie. Pour toutes ces raisons, la mise en place de l'innervation motrice a été décortiquée au cours de ces dernières années et constitue l'exemple le mieux compris du guidage axonal (Figure 21) (Bonanomi and Pfaff, 2010). Chaque colonne motrice est caractérisée par l'expression d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription. Ceux-ci sont responsables de la position des corps cellulaires dans la moelle épinière ventrale (voir p.37) mais également du choix de la cible innervée. Tous les axones des MN médullaires projettent hors de la moelle épinière et forment la racine ventrale. Très rapidement après leur sortie, les axones rencontrent un point de bifurcation où les projections de la MMC bifurquent dorsalement vers les muscles axiaux tandis que les axones de la PGC tournent ventralement pour atteindre la chaîne sympathique ventrale. Des études par greffes tissulaires chez l'embryon de poulet ont démontré qu'un signal attractif guide les axones de la MMC dorsalement. Cette activité chimiotrope à longue distance est attribuée au FGF qui est produit par le dermomyotome et qui agit via les récepteurs Fgfr1 exprimés à la surface des cellules de la MMC, sous le contrôle de Lhx3 qui y est détecté (Sharma et al., 2000). Les axones de la HMC et de la LMC ignorent ce point de décision et continuent leur progression vers les membres ou vers les muscles intercostaux et ceux de la paroi abdominale.



A la base du bourgeon du membre, les axones de la LMC se séparent et choisissent une trajectoire dorsale vers les muscles extenseurs ou une trajectoire ventrale vers les muscles fléchisseurs. Ce choix D/V est effectué avec une grande précision : les MN de la LMCm innervent la partie ventrale du membre, tandis que ceux de la LMCI innervent la partie dorsale (Figure 22). La présence d'EphA4 dans les axones de la LMCI est un déterminant majeur pour le choix d'une trajectoire dorsale. Des études de surexpression ou de perte de fonction chez la souris indiquent qu'EphA4 repousse les axones de la LMCI hors du domaine ventral en interagissant avec son ligand ephrine-A dont l'expression est restreinte à la partie ventrale du mésenchyme (Helmbacher et al., 2000; Kania and Jessell, 2003). De manière complémentaire, la migration des axones de la LMCm dans la partie ventrale du membre est régulée par des récepteurs EphB1 qui répondent de manière répulsive à la présence d'ephrine-B dans le mésenchyme dorsal (Luria et al., 2008).



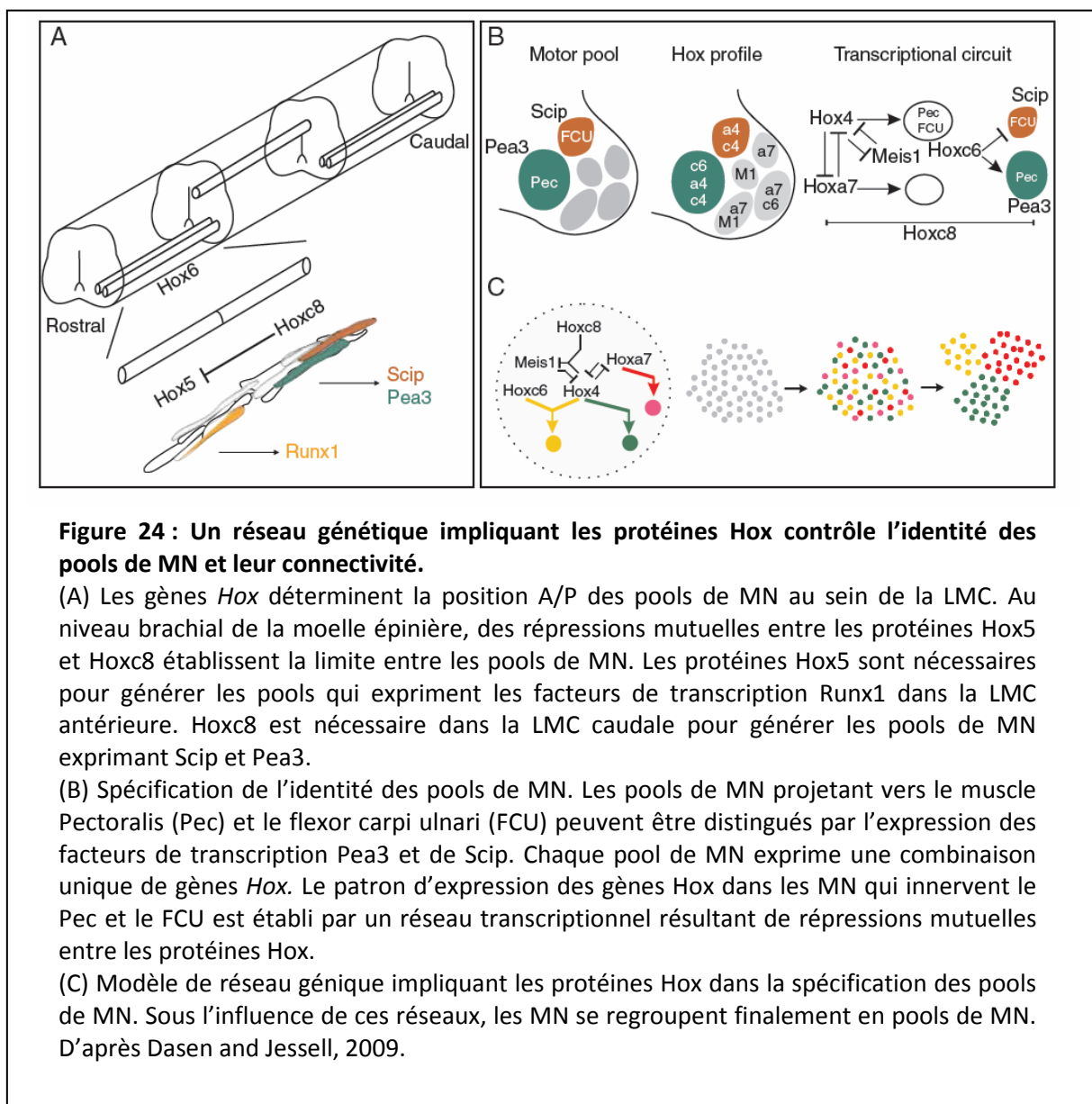
L'expression d'*EphB1* et d'*EphA4* est déterminée par les facteurs de transcription présents dans les divisions de la LMC: l'expression de *Lhx1* induit un niveau élevé de EphA4 dans les neurones de la LMCI, tandis que l'expression d'*Isl1* réduit le niveau d'EphA4 et induit *EphB1* dans ceux de la LMCm (Kania et al., 2000; Kania and Jessell, 2003; Luria et al., 2008). Les facteurs de transcription exprimés dans les divisions de la LMC coordonnent donc l'identité des cellules, la position des corps cellulaires au sein de la LMC et le guidage axonal (Figure 23).



D'autres molécules de guidance axonal agissent en parallèle ou en synergie avec la signalisation ephrine:Eph afin d'augmenter la fidélité des projections vers les membres. Notamment, le récepteur Npn-2 est exprimé dans les projections de la LMCm et, suite à des interactions répulsives avec Sema3F présent dans le mésenchyme dorsal, dirige les axones ventralement (Figure 22). De plus, une perturbation dans la voie de signalisation Npn1:Sema3A modifie différents aspects de l'innervation des membres : le moment d'invasion des axones dans les membres, la bifurcation des projections axones des deux divisions de la LMC et la fasciculation des axones dans le muscle (Huber et al., 2005; Haupt et al., 2010). Finalement, des facteurs de croissance exprimés dans les membres influencent également la navigation axonale. Par exemple, certains axones de la LMCI expriment *c-RET*, le récepteur à GDNF (glial-cell derived neurotrophic factor). GDNF est exprimé à la base des membres et est nécessaire pour la croissance axonale dans la partie dorsale (Figure 22). Dans les souris mutantes pour *GDNF* et *c-RET*, les axones des MN de la LMCI sont redirigés anormalement vers la partie ventrale des membres, un phénotype similaire à ce qui est observé chez le mutant *EphA4* (Helmbacher et al., 2000; Kramer et al., 2006).

Une fois dans le membre, les cônes de croissance semblent répondre à des indices spécifiques présents dans l'environnement et innervent un muscle spécifique. Les mécanismes contrôlant le choix de l'innervation d'un muscle particulier sont encore peu connus. Cependant, les corps cellulaires des MN innervant un muscle particulier sont regroupés dans la moelle épinière ventrale et forment un 'pool' de MN dont l'identité et la connectivité sont contrôlées par l'expression d'une combinaison de gènes *Hox* (Figure 24)

(Dasen et al., 2005; Song and Pfaff, 2005; Dasen and Jessell, 2009). Les gènes *Nkx6* sont exprimés dans certains pools de MN selon un patron d'expression contrôlé par les protéines Hox. Dans les mutants *Nkx6.1*, les axones de ces pools sont incapables d'innervier leur muscle cible mais envahissent d'autres muscles (De Marco Garcia and Jessell, 2008). Une autre cible des protéines Hox sont les gènes ETS (Pea3, Scip et Er81) qui assurent, d'une part, la ségrégation et le regroupement des pools de MN dans la moelle épinière en contrôlant l'expression de protéines de surface (les Cadherine de type II) et, d'autre part, l'arborisation terminale des projections axonales au contact des muscles cibles (Livet et al., 2002; Price et al., 2002).



Bien que les protéines Hox contrôlent de nombreux aspects de la ségrégation des pools de MN, l'expression de certains facteurs de transcription à l'intérieur de ces pools nécessite également la présence de signaux extrinsèques. Notamment, dans des explants de moelle épinière traités avec du GDNF, l'expression des gènes *ETS* (*Pea3*, *Er81*) est induite (Haase et al., 2002). Les récepteurs Met à l'HGF (Hepatocyte growth factor) pourraient également être impliqués dans l'induction de ces gènes *ETS* (Helmbacher et al., 2003). Une hypothèse est que les protéines Hox induiraient l'expression de récepteurs neurotrophiques nécessaires à l'activation des gènes *ETS* dans les pools de MN.

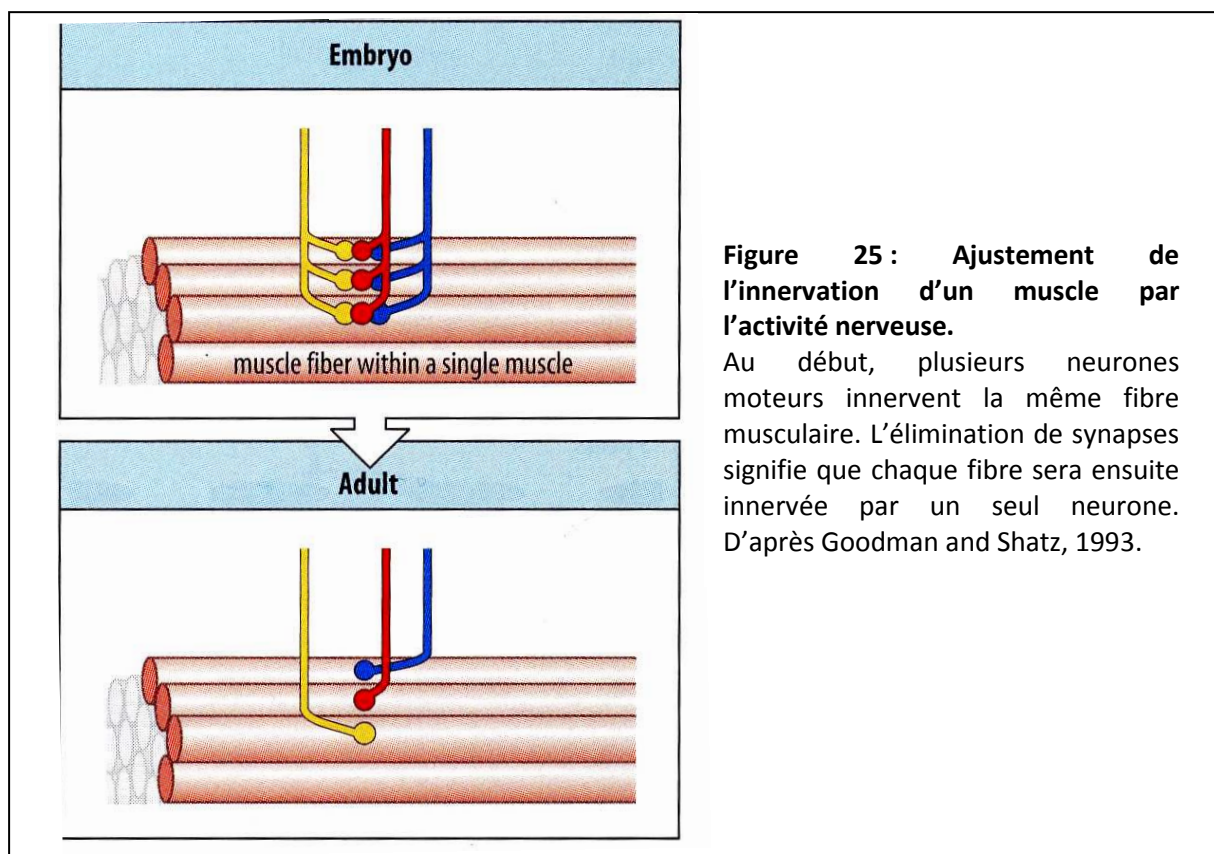
#### 1.4. Formation des synapses, mortalité cellulaire et affinage

La formation d'une synapse entre le cône de croissance et sa cible est essentielle à la transmission du signal nerveux. C'est à la jonction neuromusculaire que le mécanisme de formation des synapses est le mieux décrit. Brièvement, le cône de croissance des MN sécrète de l'agrine à l'endroit précis où il rentre en contact avec le muscle cible. Cette protéine se lie sur le complexe multi-protéique à tyrosine-kinase MusK (muscle specific kinase). Cette liaison induit le regroupement des récepteurs à l'acétylcholine sur la membrane post-synaptique du muscle cible. Parallèlement, des facteurs sécrétés par le muscle vont stimuler l'entrée de calcium dans le cône de croissance. Le calcium va modifier le cytosquelette pour donner sa forme aplatie au bouton synaptique et favoriser la libération des neurotransmetteurs. L'intégration de l'activité d'un ensemble de facteurs (Agrine, Neuréguline, TGB- $\beta$ ...) va finalement stabiliser, ou pas, la jonction neuromusculaire.

La survie d'un MN dépend de l'établissement d'une synapse fonctionnelle avec une cellule musculaire. Ainsi, environ 200 000 MN sont produits dans la région lombaire chez le poulet afin d'innervier les membres postérieurs, mais plus de la moitié d'entre eux meurent après leur différenciation. Les neurones sont donc programmés à mourir via l'activation de la voie apoptotique, sauf s'ils reçoivent des signaux de survie spécifiques. Le NGF (nerve growth factor) a été le premier facteur important pour la survie des MN à être identifié. Il fait partie de la famille des neurotrophines qui comprend également le BDNF, les neurotrophine-3, -4 et -5 (NT-3/5) et le HGF. Les récepteurs des neurotrophines sont des récepteurs à tyrosine-kinases (TrkA-C). Une production suffisante de NGF par le muscle permettrait notamment la survie de nombreux neurones quand il n'y a pas d'activité électrique. Après la mise en place des jonctions neuromusculaires, le NGF n'est plus nécessaire pour la croissance axonale et sa libération au niveau de la synapse est réduite. Les neurones qui ont déjà établi leurs connexions avec une fibre musculaire survivent, les autres non. La formation d'une synapse avec le muscle cible est donc déterminante pour la survie des MN. Un type de neurones nécessite des neurotrophines particulières pour assurer sa survie, et la nécessité de certaines neurotrophines peut changer au cours du développement. De plus, une neurotrophine particulière peut agir sur une variété de types cellulaires neuronaux (Novak et al., 2000). Par exemple, le GDNF assure la survie des

neurones moteurs faciaux et est également nécessaire dans le bourgeon des membres en développement pour la survie des MN de la LMC (Oppenheim et al., 2000).

Même après la mise en place des connexions neuromusculaires, certains MN sont encore éliminés. En effet, au premier stade du développement, une fibre musculaire peut être innervée par des terminaisons nerveuses issues de différents neurones (Figure 25). Avec le temps, la plupart de ces connexions sont éliminées jusqu'à ce que chaque fibre soit innervée par les terminaisons d'un seul MN. L'affinage de l'innervation du système nerveux dépend des interactions de l'organisme avec son environnement et par conséquent, de l'activité neuronale. Ainsi, la stimulation de l'activité électrique dans une cellule cible renforce les synapses actives et supprime celles qui ne sont pas actives au cours du temps. Cette élimination et maturation des jonctions neuromusculaires perdurent jusqu'à trois semaines après la naissance chez le rat. Un mécanisme possible de cet ajustement des connexions fait également intervenir la libération locale de neurotrophines. Un certain niveau d'activation, ou l'activation simultanée de deux neurones, peuvent provoquer la libération de neurotrophines par les cellules-cibles, et seuls les axones récemment excités sont capables d'y répondre.

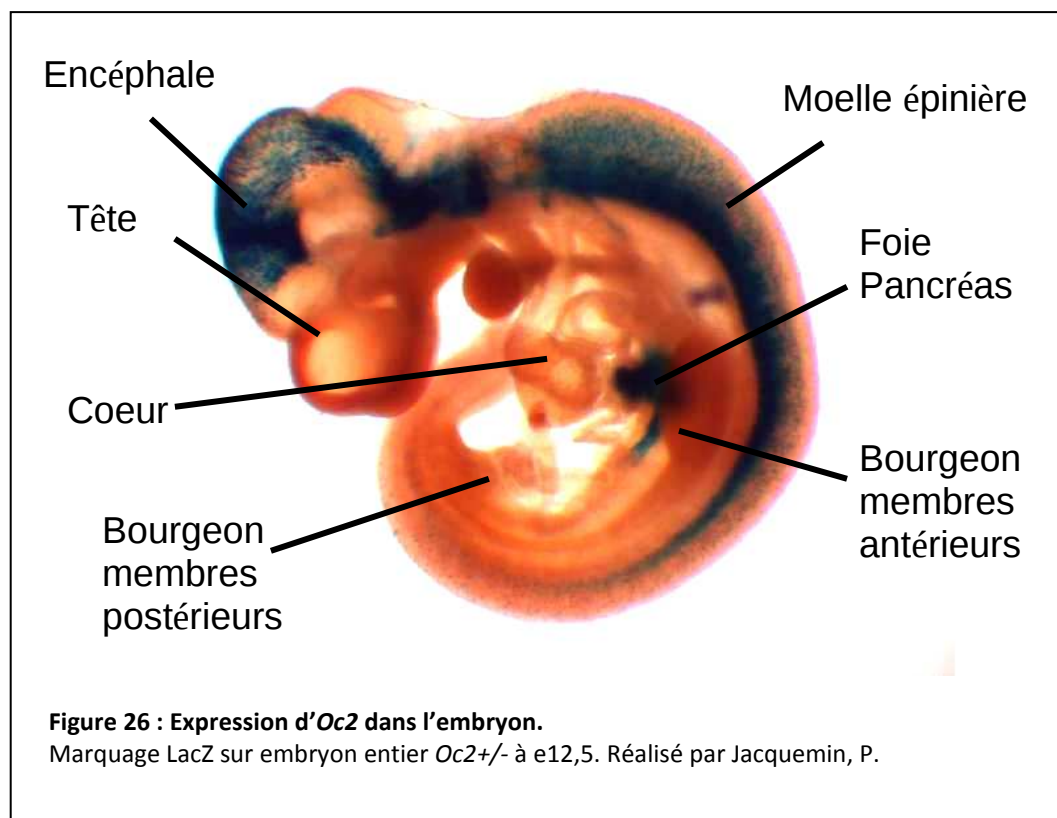


**Tableau 2: Mise en place de la diversité neuronale: résumé**

|                                               |                                                         | Mécanismes                                                                                                                          | Exemples                                                             |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>Polarité et Neurogenèse</b>                | Polarité A/P du tube neural                             | - Gradient de <b>morphogènes</b><br>- Expression d'une combinaison de gènes <b>Hox</b>                                              | Formation des rhombomères dans le rhombencéphale                     |
|                                               | Polarité D/V du tube neural                             | - <b>Gradient Shh</b> sécrété par la notochorde = signal ventral<br>- Voie de signalisation <b>TGF-β et Wnt</b> = signal dorsal     | Formation des domaines progéniteurs dans la moelle épinière ventrale |
|                                               | Sortie du cycle cellulaire et différenciation neuronale | Produits des <b>gènes pro-neuraux</b> (Mash, Ngn, Olig...)                                                                          |                                                                      |
|                                               | Spécification du type de neurones produits              | Produits des <b>gènes pro-neuraux</b> en combinaison avec les <b>facteurs de transcription</b> présents dans le domaine progéniteur | Spécification et consolidation des MN médullaires                    |
|                                               | Transition neurogenèse – gliogenèse                     | Combinaisons des <b>gènes pro-neuraux, voie Notch...</b>                                                                            | Génération de cellules gliales dans le pMN                           |
| <b>Diversification neuronale et migration</b> | Diversification                                         | <b>Facteurs de transcription, expression d'une combinaison de gènes Hox...</b>                                                      | Formation des colonnes motrices dans la moelle épinière              |
|                                               | Migration                                               | - <b>Glie Radiaire</b><br>- <b>Migration tangentielle</b>                                                                           | Reelin, molécules chimiotropes                                       |
| <b>Guidage axonal</b>                         | Cône de croissance                                      | Guidage axonal par des <b>molécules chimiotropes</b>                                                                                | Innervation des muscles par les MN                                   |
| <b>Formation des synapses</b>                 | Cône de croissance                                      |                                                                                                                                     | Jonction neuromusculaire                                             |
|                                               | Mortalité cellulaire                                    | - formation d'une <b>synapse</b> assurant la survie des neurones<br>- <b>Activité électrique</b>                                    | NGF, HGF, BDNF...                                                    |

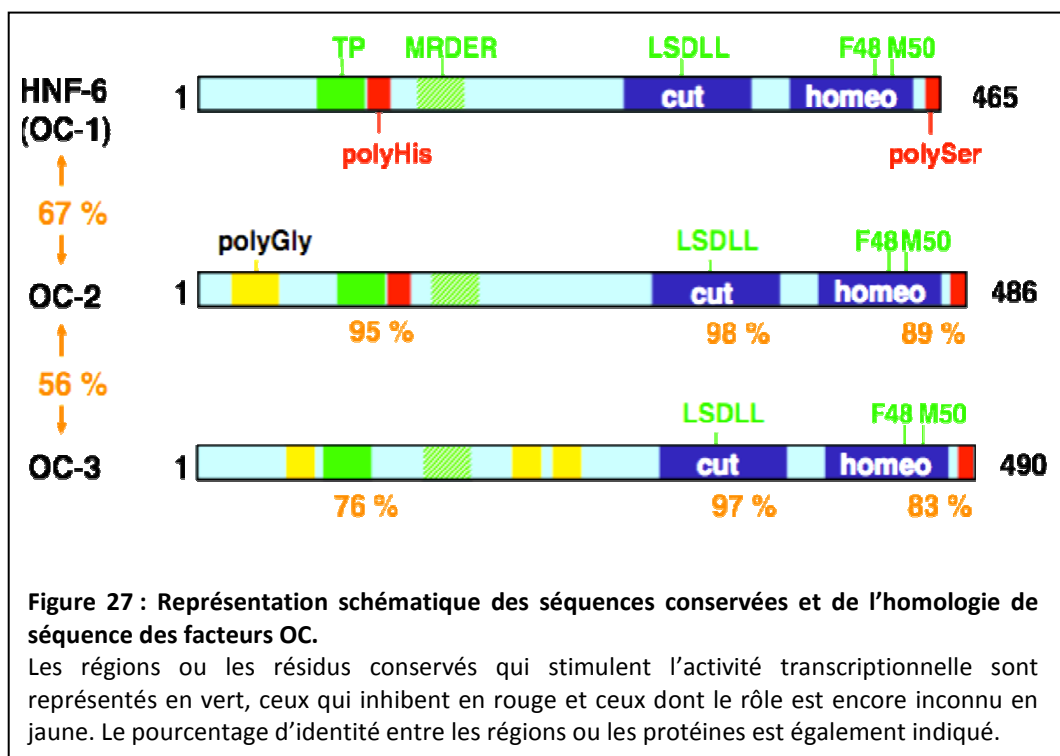
### 1.5. Les facteurs de transcription Onecut

Les facteurs de transcription sont impliqués dans des réseaux géniques complexes et dans des voies de signalisation qui assurent la diversification cellulaire au cours du développement. La famille des activateurs transcriptionnels Onecut (OC) est fortement exprimée durant l'embryogenèse du foie, du pancréas et du SNC (Figure 26). Leur fonction est étudiée depuis une dizaine d'années afin de mieux comprendre leur impact dans la diversification cellulaire. Les membres de cette famille sont au nombre de trois chez les mammifères: Hepatocyte nuclear factor 6 (HNF-6 ou OC-1), OC-2 et OC-3 (Lemaigre et al., 1996; Jacquemin et al., 1999; Vanhorenbeeck et al., 2002; Jacquemin et al., 2003b). D'autres espèces tels que l'oursin, la drosophile, l'ascidie, le poisson-zèbre et le Xénope possèdent également un gène codant pour un facteur OC (Nguyen et al., 2000; Sasakura and Makabe, 2001; Hong et al., 2002; Matthews et al., 2004; Poustka et al., 2004; Haworth and Latinkic, 2009; D'Aniello et al., 2011).



### 1.5.1 Structure des facteurs OC

La séquence des facteurs OC est caractérisée par plusieurs régions conservées d'une espèce à l'autre (Figure 27). Les protéines OC sont notamment caractérisées par la présence de deux domaines de liaison à l'ADN : un seul domaine CUT et un homéodomaine. L'unique domaine CUT consiste en une séquence bien conservée de 66 à 88 acides aminés (Iyaguchi et al., 2007). Il est composé de cinq hélices  $\alpha$  (hélices 1-3 et 5-6) et d'une petite hélice  $3_{10}$  (hélice 4). L'hélice 3, appelée 'hélice de reconnaissance', rentre en contact avec l'ADN et est cruciale pour la liaison à des séquences d'ADN spécifiques. Le domaine CUT des protéines OC contient également un motif LXXLL bien conservé, impliqué dans les interactions avec les co-facteurs. L'homéodomaine est composé de 60 acides aminés et est organisé en trois hélices  $\alpha$  (hélices 7-9). Le domaine homéo des facteurs OC se distingue des homéodomaines classiques par la présence, dans l'hélice de reconnaissance, d'une phénylalanine en position 48 et d'une méthionine en position 50 (dyade F48M50). D'autres régions sont également conservées dans les protéines OC : une région carboxy-terminale de 19 résidus enrichie en sérine (polySer), une séquence polyhistidine (polyHis) en amont du domaine Cut et enfin une boîte STP (séquence riche en sérine, thréonine et proline) de 24 résidus localisée juste en amont de la séquence polyhistidine. Le patron d'expression chevauchant des gènes *Oc* et la conservation des différents domaines dans les protéines OC suggèrent que ces facteurs de transcription exercent des fonctions similaires et/ou redondantes.



### 1.5.2. Activité transcriptionnelle des facteurs OC

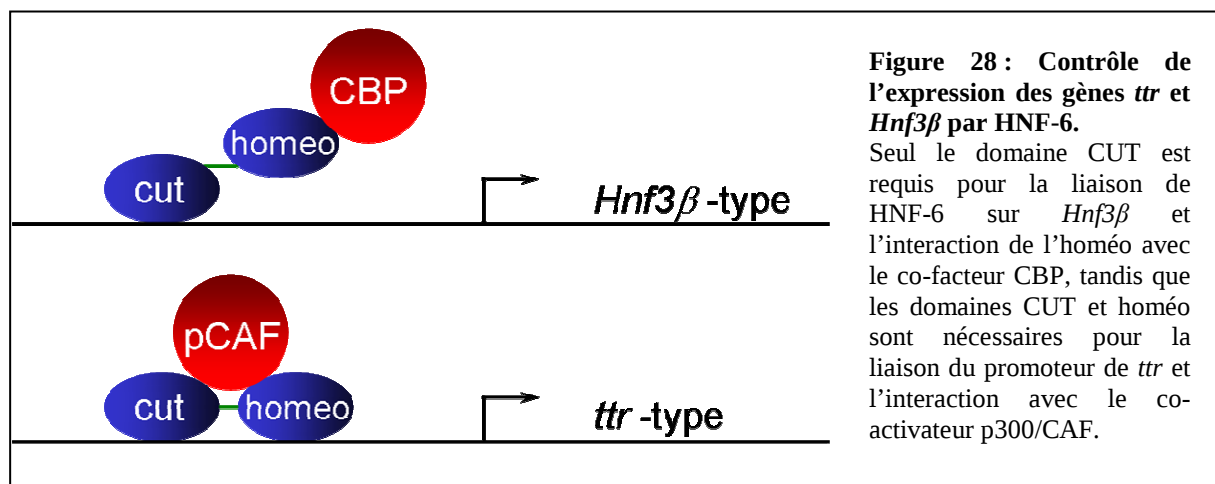
Des études de co-transfection *in vitro* avec un plasmide d'expression codant pour les facteurs OC et un gène rapporteur à la luciférase indiquent que les facteurs OC sont des activateurs transcriptionnels (Lemaigre et al., 1996; Samadani and Costa, 1996). Par mutagenèse dirigée, le rôle des régions conservées a pu être déterminé. Le domaine CUT et l'homéodomaine sont responsables de la fixation de l'ADN. Le domaine CUT est essentiel pour la fixation sur des séquences spécifiques, tandis que la participation de l'homéodomaine dans la liaison à l'ADN n'est pas requise pour toutes les cibles (voir p.52). Le motif LSDLL du domaine CUT participe à l'interaction avec les co-facteurs. La boîte STP, la séquence LSDLL et la dyade F48M50 de l'homéodomaine stimulent l'activité transcriptionnelle des protéines OC. A l'inverse, les régions polySer et polyHis inhibent l'expression des cibles (Lannoy et al., 2000). La comparaison des sites de fixation de HNF-6 sur ses différentes cibles a permis d'établir une séquence consensus de liaison à l'ADN qui s'est révélée par la suite commune à tous les facteurs OC (Tableau 3).

**Tableau 3: Séquences de reconnaissance des facteurs OC sur des gènes cibles.**

Les séquences de reconnaissance sur sept gènes cibles (*Hnf3b*, *ttr*, *Hnf4*, *glucokinase*, *Mitf*, *pdx1*, *pdx1* muté) sont représentées dans la deuxième colonne. Les + et les - représentent l'affinité de chaque facteur OC pour les séquences de reconnaissance. D'après (Vanhorenbeeck et al., 2002)

| Gènes cibles               | Séquences de reconnaissance                                     | HNF-6 | OC-2 | OC-3 |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------|------|------|
| <i>Hnf3b</i>               | AAATCAATAT                                                      | +++   | ++   | +++  |
| <i>Transthyretin (ttr)</i> | AAGTCAATAA                                                      | +++   | +    | +    |
| <i>Hnf-4</i>               | AAGTCAATGA                                                      | +     | —    | ++   |
| <i>Glucokinase (gk)</i>    | TGATCAATCG                                                      | +++   | ++   | +    |
| <i>mitf</i>                | AAATCAACAT                                                      | +++   | ++   | +    |
| <i>Pdx1 (distal site)</i>  | TAATCAATAA                                                      | ++    | ++   | +    |
| <i>Pdx1 mutated</i>        | TAACAAATAA                                                      | —     | —    | —    |
| Consensus                  | (A/T/G)-(A/T)-(A/G)- <u>T-C-</u><br><u>(A/C)-A-T-N</u> -(A/T/G) |       |      |      |

Les gènes *ttr* et *Hn-3β* sont des exemples représentatifs de la manière dont les protéines OC contrôlent leur cible (Figure 28) (Lannoy et al., 1998; Iyaguchi et al., 2007). Malgré des séquences de reconnaissance très similaires, HNF-6 se lie à ces promoteurs de deux manières différentes : les domaines CUT et l'homéodomaine sont nécessaires pour la liaison à l'ADN sur le promoteur de *ttr*, tandis que seul le domaine CUT est requis pour qu'HNF-6 se lie au promoteur de *Hnf3β*. Ces liaisons différentes sur les séquences cibles entraînent une modification dans la conformation du domaine CUT et un changement dans l'accessibilité de son motif LSDLL. En fonction de la cible et de la participation de l'homéodomaine à la liaison de l'ADN, HNF-6 est ainsi capable d'interagir avec différents co-activateurs: p300/CBP-associated factor (CAF) pour l'activation transcriptionnelle du promoteur de *ttr* et CREB-binding protein (CBP) pour l'induction de *Hnf3β*. Un autre co-facteur des protéines OC a également été identifié, il s'agit de PGC-1 (Beaudry et al., 2006).



### 1.5.3. Expression et rôles des facteurs OC au cours du développement

Au cours du développement, les protéines OC sont détectées dans l'endoderme et les dérivés de l'endoderme, notamment le foie et le pancréas (Figure 26) (Landry et al., 1997). L'expression d'*Hnf6* et d'*Oc2* dans ces deux organes est régulée par des micro-ARNs appelés miR-122, miR-495 et miR-218 (Simion et al., 2010; Laudadio et al., 2011). Dans le foie et le pancréas, les protéines OC contrôlent de manière redondante différents aspects de la différenciation cellulaire et de la morphogenèse (Pierreux et al., 2004; Wang and Holterman, 2012). Durant le développement du foie, HNF-6 contrôle la différenciation et la morphogenèse du tractus biliaire en stimulant l'expression du gène *Hnf1β* et en interagissant avec la voie Notch (Clotman et al., 2002; Clotman et al., 2003; Vanderpool et

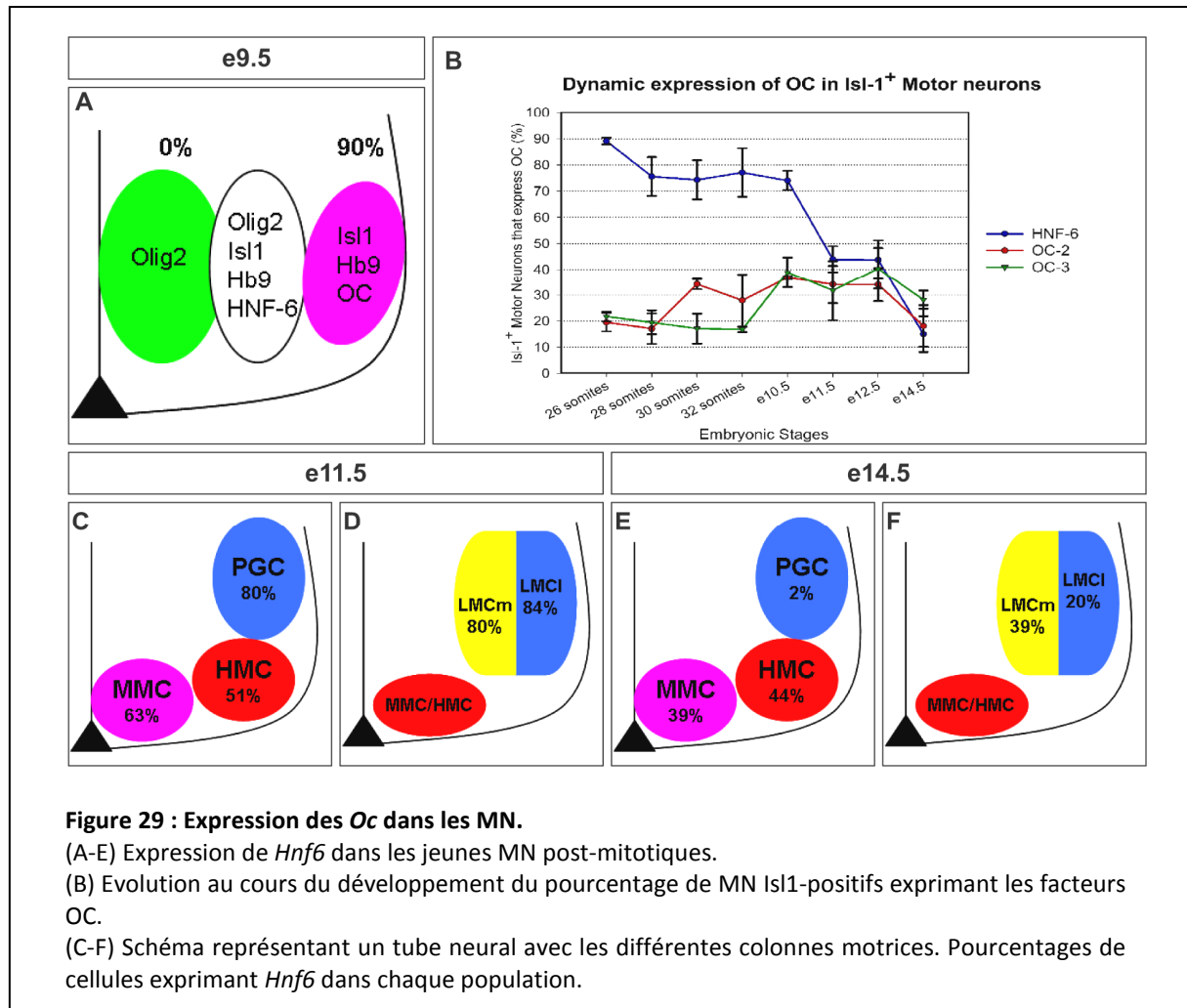
al., 2011). Chez les souris knock-out *pour Hnf6*, la vésicule biliaire est absente et le développement des canaux biliaires est anormal. HNF-6 et OC-2 sont également impliqués dans la migration des hépatoblastes. En effet, les protéines OC stimulent de manière redondante la dégradation de la lame basale entourant le bourgeon hépatique afin de permettre la migration des hépatoblastes. Des études d'expression montrent que HNF-6 et OC-2 sont impliqués dans un réseau génique comprenant l'E-cadherine, la thrombospondine-4 et l'ostéopontin qui, en contrôlant la migration des hépatoblastes et l'adhérence cellulaire, régulent l'expansion du bourgeon hépatique (Margagliotti et al., 2007). HNF-6 et OC-2 sont également nécessaires pour la différenciation adéquate des hépatoblastes en hépatocytes et en cellules biliaires (cholangiocytes): un gradient activine/TGF $\beta$ , modulé par les facteurs OC, est nécessaire pour séparer les lignées biliaires et hépatocytaires (Clotman et al., 2005). Enfin, HNF-6 est également impliqué dans le métabolisme du glucose dans le foie en stimulant l'expression de la 6-phosphofructo-2-kinase, de la glucokinase et de la glucose-6-phosphatase (Lannoy et al., 2002). Les souris *Hnf6*<sup>-/-</sup> sont d'ailleurs diabétiques.

Dans le pancréas, les protéines OC régulent le début de la spécification du pancréas à partir de l'endoderme via le contrôle de *Pdx1* (Jacquemin et al., 2003a). En contrôlant l'expression de *Hnf1b*, HNF-6 est également impliqué dans la morphogenèse des canaux pancréatiques. Son absence provoque l'apparition de kystes résultant d'un développement anormal des cils primaires au pôle apical des cellules canalaire (Pierreux et al., 2006). Les protéines OC interviennent dans la différenciation des cellules endocrines (îlots de Langerhans) en activant l'expression de *Ngn3*, un facteur de transcription essentiel pour la détermination des précurseurs des cellules endocrines (Jacquemin et al., 2000). Dans les souris *Hnf6*<sup>-/-</sup>, la taille du pancréas est réduite, le pancréas exocrine est normal mais la différenciation des cellules endocrines est perturbée suite à la perte totale d'expression de *Ngn3*. A la naissance, peu de cellules endocrines sont présentes et aucun îlots de Langerhans n'est formé. Plus tard, le nombre de cellules endocrines augmente mais l'architecture des îlots est anormale.

Finalement, OC-2 stimule l'expression d'un gène, essentiel pour la différenciation des mélanocytes, appelé Microphthalmia-associated transcription factor (*Mitf*) (Jacquemin et al., 2001). A l'heure actuelle, aucun rôle n'a pu être attribué à OC-3 (Vanhorenbeeck et al., 2007).

Les facteurs OC sont également présents durant le développement du système nerveux. Le patron d'expression de chaque facteur OC est généralement partiellement superposé à celui des autres. Dans l'encéphale, toutes les populations où les gènes *Oc* sont exprimés n'ont pas encore été identifiées. Cependant, les protéines OC sont produites dans un noyau dopaminergique (noyau A13) qui est situé entre le thalamus et l'hypothalamus et qui est impliqué dans l'attention et dans les transitions veille-sommeil. Les protéines OC sont également détectées dans les toutes premières étapes du développement du principal centre noradrénergique de l'encéphale, le Locus Coeruleus, situé dans le pont et participant à l'alternance veille-sommeil et aux troubles de panique (peur et anxiété). Ils sont également exprimés dans le seul noyau sensoriel présent au sein du SNC, le noyau mésencéphalique du ganglion trijumeau, responsable du traitement des informations proprioceptives de la mâchoire inférieure. Des analyses sur des embryons doubles knock-out *Hnf6/Oc2* démontrent que les facteurs OC sont impliqués dans la migration et la maintenance de ces différents noyaux du SNC (Espana and Clotman, 2011). De plus, la protéine OC-2 est détectée dans les neurones du ganglion trijumeau et, en réponse à la voie de signalisation BMP, contrôle les projections de ces neurones vers les centres somatosensoriels du SNC (Hodge et al., 2007). Les protéines OC sont également présentes durant le développement des cellules photoréceptrices de la rétine (Wu et al., 2011).

Durant le développement de la moelle épinière, les gènes *Oc* sont exprimés dans les ganglions rachidiens, les interneurones et les MN. Dans ces derniers, les protéines OC sont initialement détectées vers e9,5, lorsque les progéniteurs de MN (Olig2-positifs) sortent du cycle cellulaire et commencent à produire les premiers marqueurs de MN, *Isl1* et *Hb9* (Figure S1) (Francius and Clotman, 2010). HNF-6 est le premier facteur OC détecté dans des cellules faiblement Olig2-positives et  $\beta$ 3-tubuline-positives, indiquant qu'il s'agit de MN post-mitotiques en voie de différenciation. L'expression d'*Oc2* commence quelques heures plus tard dans des MN dépourvus d'Olig2, suivie de près par celle d'*Oc3*. L'initiation de l'expression des gènes *Oc* dans le tube neural ventral se fait donc selon une séquence temporelle HNF-6>OC-2>OC-3, comme observé dans l'endoderme, le foie et le pancréas. A ce stade, HNF-6 est exprimé dans plus de 90% des nouveaux MN post-mitotiques (Figure 29A). Au contraire, les protéines OC-2 et OC-3 sont détectées dans une minorité de MN (environ 25%, Figure 29B) et leur patron d'expression est recouvert par celui de *Hnf6*.



Entre e10,5 et e14,5, l'expression des *Oc* diminue globalement dans les MN, indiquant que l'expression des *Oc* est transitoire (Figure 29B). *HNF-6* n'est ainsi détecté que dans 15% des MN à 14,5. Cependant, l'expression des protéines OC est dynamique dans les différentes colonnes motrices. Par exemple, le nombre de cellules de la HMC exprimant *Oc3* augmente de 48% à 80% entre e11,5 et e12,5 mais diminue à e14,5 jusqu'à 15%.

Les protéines OC sont donc présentes, de manière redondante, dans une vaste majorité de jeunes MN post-mitotiques, jusqu'à ce que ces derniers se rassemblent en colonnes motrices. Ce patron d'expression suggère que les protéines OC interviennent dans la mise en place de la diversité neuronale au sein de la moelle épinière ventrale. De plus, à des stades plus tardifs de la différenciation, le maintien des facteurs OC dans certains MN suggère que ces différentes sous-populations de MN correspondraient à des pools de MN.



## **2. OBJECTIFS et STRATEGIE**

Les facteurs OC sont exprimés dans la moelle épinière ventrale et leur patron d'expression suggère qu'ils pourraient être impliqués dans la diversification des MN médullaires (Francius and Clotman, 2010).

Les objectifs de mon projet de thèse ont été, dans un premier temps, de caractériser les rôles des facteurs OC dans les MN de la moelle épinière au cours du développement. Dans un deuxième temps, d'identifier les mécanismes contrôlés par les protéines OC afin d'assurer la diversification des MN de la moelle épinière. Troisièmement, d'étudier les rôles des protéines OC dans la mise en place des projections axonales issues des différentes colonnes motrices. Enfin, nous avons identifié au laboratoire un nouveau marqueur de la population viscérale des MN : Smad-interacting-protein (SIP)-1. Dans le cadre de ma thèse, j'identifierai les rôles joués par ce facteur de transcription au cours de la différenciation des MN viscéraux.

Afin d'étudier les rôles des facteurs OC dans les MN médullaires, nous avons croisé des souris *Hnf6*<sup>+/-</sup>*Oc2*<sup>+/-</sup> pour obtenir des embryons contrôles, simples ou doubles mutants pour les facteurs *Hnf6* et/ou *Oc2*. Dans ces embryons mutants, l'exon 1 de la séquence codante de *Hnf6* a été remplacé par recombinaison homologue par une cassette néomycine et/ou l'exon 1 de *Oc2* a été remplacé par une cassette LacZ-puromycine (Jacquemin et al., 2000; Clotman et al., 2005). A l'état homozygote, les embryons mutants sont déficients en HNF-6 et/ou en OC-2 dû à l'absence du domaine de liaison à l'ADN CUT codé par l'exon1. Chez les doubles mutants *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup>, l'expression d'*Oc3* est également perdue dans les MN médullaires. Cette perte d'expression d'*Oc3* pourrait être due à l'absence de l'activité transcriptionnelle des autres protéines OC. Des sites de liaison potentiels des OC ont d'ailleurs été identifiés dans la région promotrice d'*Oc3* et, après transfection, HNF-6 est capable de se lier et de stimuler l'expression d'*Oc3* (Pierreux et al., 2004). Ces doubles mutants *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> constituent donc un bon modèle afin d'étudier les rôles des facteurs OC dans la moelle épinière ventrale.

Nous avons également utilisé des embryons knock-out pour le facteur de transcription Foxp1. Ces embryons sont obtenus par croisement entre souris *Foxp1*<sup>+/-</sup> dans lesquelles les

trois exons codant pour le domaine de liaison à l'ADN Forkhead ont été remplacés par recombinaison homologue par une cassette néomycine (Wang et al., 2004).

Afin d'identifier les fonctions possibles de Sip1 durant la différenciation des MN viscéraux, nous avons étudié le développement des MN en absence de Sip1. Cependant, l'inactivation de *Sip1* provoque la mort des embryons à e9,5 suite à des problèmes de fermeture du tube neural (Bassez et al., 2004), de migration des crêtes neurales (Van de Putte et al., 2003) et de segmentation du mésoderme (Maruhashi et al., 2005). Dès lors, le développement des MN a été étudié grâce à des embryons mutants conditionnels *Brn4/Cre::Sip1<sup>flox</sup>* (Higashi et al., 2002). Dans ces embryons, l'expression de *Sip1* est maintenue dans les progéniteurs neuraux mais est inactivée dans les neurones différenciés, y compris les MN viscéraux.

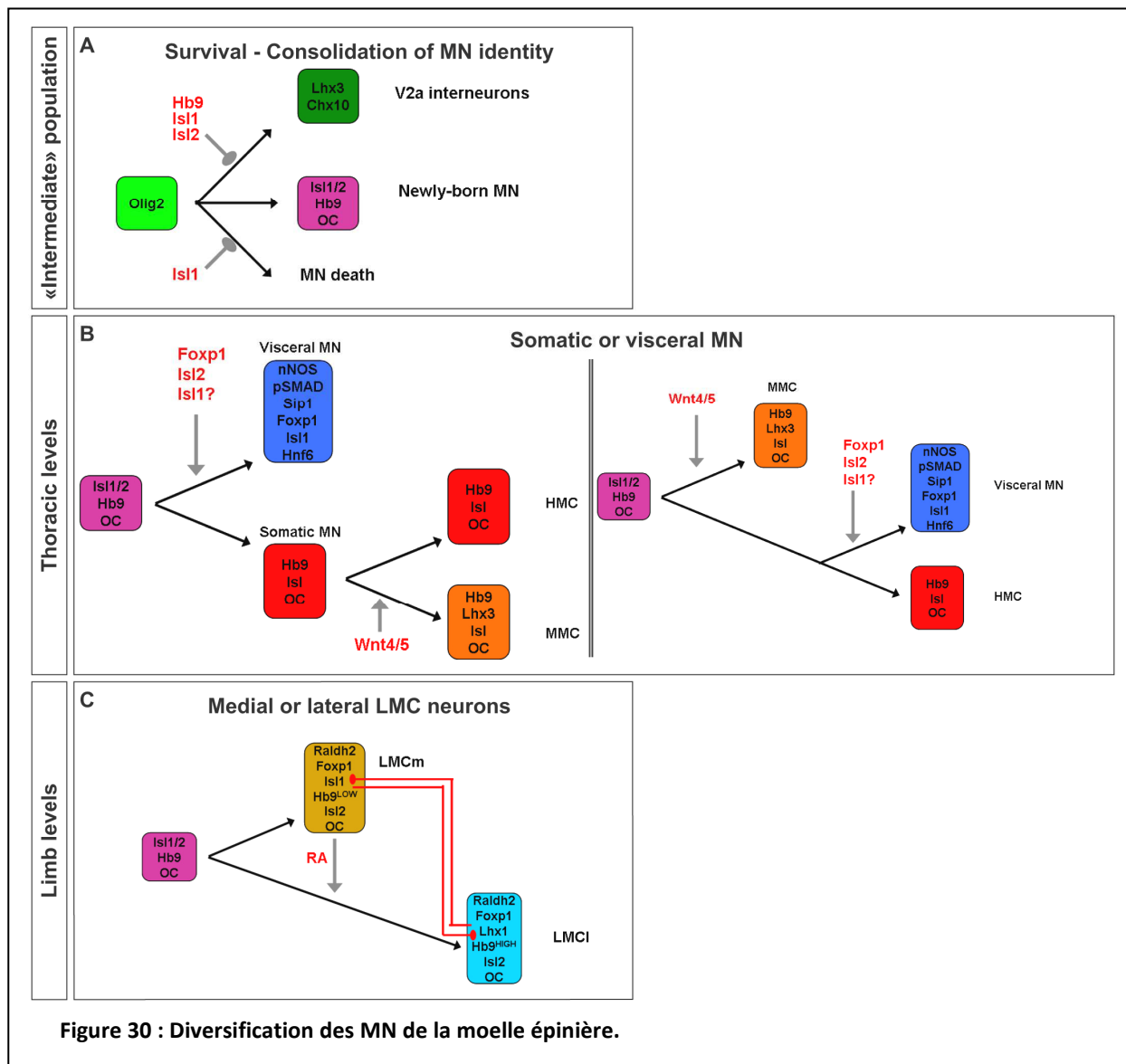
Afin d'atteindre nos principaux objectifs, nous avons effectué, à différents stades embryonnaires, des marquages en immunofluorescence sur des coupes d'embryons issus de ces trois lignées transgéniques. Des marquages *in toto* sur moelle ouverte (disposition en livre ouvert) ont également été effectués afin de visualiser les différentes colonnes motrices le long de l'axe A/P de la moelle épinière.

De plus, nous avons réalisé des marquages en immunofluorescence sur des embryons entiers en utilisant un anticorps dirigé contre les neurofilaments afin d'étudier les projections axonales dans les embryons mutants pour les facteurs OC. Afin d'approfondir cette étude, nous avons utilisé la technique de marquage rétrograde. Cette méthode consiste à injecter de la dextran-rhodamine dans une région cible (la chaîne ganglionnaire ou les muscles situés dans la partie dorsale des membres dans notre cas). Le dextran-rhodamine est un marqueur fluorescent qui est endocyté par l'extrémité des axones et qui est transporté de manière active vers le corps cellulaire des MN situé dans la moelle épinière. Ce marquage rétrograde permet d'identifier les populations de MN responsables de l'innervation de la région injectée.

En complément des études en perte de fonction, nous avons utilisé la technique d'électroporation de moelles d'embryons de poulet. Cette technique en gain de fonction a permis de surexprimer les gènes *Oc* dans la moelle épinière. Ce modèle est utile pour confirmer les résultats obtenus en perte de fonction mais également pour répondre à des questions mécanistiques concernant le rôle des facteurs de transcription *Onecut* durant le développement de la moelle épinière.

### **3. RESULTATS:**

**Les facteurs OC maintiennent l'expression d'*Isl1* et régulent la diversification neuronale durant le développement des neurones moteurs de la moelle épinière**



## RAPPEL: Diversification des MN médullaires

Suite à la présence d'un gradient de Shh, la moelle épinière ventrale est divisée très rapidement en cinq domaines progéniteurs. Les MN médullaires sont issus du domaine pMN exprimant notamment *Olig2* (Figure 30A). A e9,5, la perte d'*Olig2* permet la sortie du cycle cellulaire, la différenciation neuronale et la spécification des MN médullaires (Mizuguchi et al., 2001; Novitch et al., 2001; Lee and Pfaff, 2003; Lee et al., 2005). Tous les MN post-mitotiques expriment *Isl1*, *Isl2* et *Hb9* (Tsuchida et al., 1994). L'expression d'*Isl1* est nécessaire pour la survie des MN (Pfaff et al., 1996). En effet, l'inactivation d'*Isl1* provoque la perte totale des MN dans la partie ventrale de la moelle épinière et entraîne la mortalité des embryons entre e9 et e9,5. Les protéines Isl1, Isl2 et Hb9 sont également nécessaires pour consolider l'identité des MN post-mitotiques produits (voir p.24). Dans les embryons hypomorphes pour *Isl1* ou mutants pour *Isl2* et/ou *Hb9*, le nombre de MN produit est diminué suite à une augmentation de l'expression de *Lhx3* et de *Chx10* qui favorisent la différenciation des interneurons V2a (Arber et al., 1999; Thaler et al., 1999; Thaler et al., 2004; Song et al., 2009). Dans les mutants *Isl1* et *Hb9*, ce problème de consolidation provoque une diminution du nombre de MN viscéraux (PGC) produits au niveau thoracique de la moelle épinière, suite probablement à l'inhibition de l'expression de *Foxp1* (voir ci-dessous) par Lhx3 (Dasen et al., 2008; Rouso et al., 2008).

Au niveau thoracique de la moelle épinière, les nouveaux MN peuvent se diviser en deux classes: les MN viscéraux et les MN somatiques (Figure 30B). Les MN viscéraux se regrouperont dans la PGC, tandis que les MN somatiques formeront deux colonnes motrices : la MMC et la HMC (voir p.30) (Jessell, 2000; Dasen and Jessell, 2009). La distinction entre les MN viscéraux et somatiques apparaît dès e10.5 avec le début de l'expression de *Foxp1* dans la population viscérale. Dans les embryons knock-out pour *Foxp1*, la population viscérale est diminuée au dépend de la HMC, suggérant ainsi que l'expression de *Foxp1* est nécessaire pour la différenciation des MN viscéraux (Dasen et al., 2008; Rouso et al., 2008). Le maintien de l'expression de Lhx3 dans les MN de la MMC est sous le contrôle d'un gradient D/V Wnt4/5 et permet la ségrégation de la MMC par rapport aux autres colonnes motrices présentes dans la moelle épinière ventrale (Agalliu et al., 2009).

Dans la région des membres, *Foxp1* est nécessaire pour la différenciation des neurones de la LMC (Figure 30C). En effet, une diminution de l'expression de *Foxp1* résulte en la présence de MN viscéraux dans la région des membres, à la place des MN de la LMC (Dasen et al., 2008; Roussio et al., 2008). Les MN innervant les membres expriment également *Raldh2*. L'expression de cette enzyme dans les premiers MN de la LMCm engendre un signal d'AR qui, en inhibant l'expression d'*Isl1* et en induisant *Lhx1*, va permettre la formation de la LMCI (voir p.33) (Sockanathan and Jessell, 1998). La répression mutuelle entre ces deux facteurs de transcription consolide l'identité de ces deux divisions au sein des MN de la LMC. De plus, *Lhx1* dirige la projection des axones de la LMCI vers le membre dorsal en régulant l'expression d'*EphA4*. Au contraire, *Isl1* induit l'expression d'*EphB1* et la projection ventrale des axones de la LMCm (voir p.42) (Bonanomi and Pfaff, 2010). Les facteurs *Isl1* et *Lhx1* participent également au contrôle de la position des cellules au sein de la LMC en interagissant avec les composantes de la voie de signalisation de la Reeline (voir p.37) (Palmesino et al., 2010).

Malgré de nombreuses études en perte et gain de fonction, certains aspects de la diversification des MN restent encore incompris. Notamment, les régulateurs transcriptionnels qui activent de manière directe l'expression du gène *Isl1* dans les MN médullaires n'ont pas encore été identifiés. De plus, l'importance d'*Isl1* dans la survie et la consolidation de l'identité des MN empêche l'étude des rôles que pourrait avoir ce facteur de transcription dans les étapes tardives de la différenciation des MN médullaires. Des données obtenues chez des embryons knock-out pour *Hb9*, dans lesquels l'expression d'*Isl1* disparaît également, suggèrent cependant qu'*Isl1* est nécessaire pour la production des MN viscéraux. Ensuite, le moment où se produit la ségrégation entre les MN somatiques et viscéraux est encore controversé (Figure 30B). En effet, certaines études suggèrent que les MN somatiques et viscéraux se séparent avant la formation des colonnes motrices (Arber et al., 1999; Jessell, 2000). A l'inverse, une autre théorie avance que, dans un premier temps, la MMC s'isole des autres MN en maintenant l'expression de *Lhx3* et que, dans un second temps, les colonnes motrices de la PGC et de la HMC se forment (Sockanathan et al., 2003; Dasen and Jessell, 2009; Ji et al., 2009). Finalement, la diversification des MN dépend de l'activité de nombreux facteurs transcriptionnels. Cependant, la manière dont ces différents régulateurs coopèrent pour établir l'identité des sous-populations de MN reste peu connue.

## The Onecut Transcription Factors maintain *Isl1* Expression and Regulate Cell Fate Decision during Spinal Motor Neuron Development

Agnès Roy<sup>1,6</sup>, Cédric Francius<sup>1,6</sup>, David L. Rousso<sup>2,7</sup>, Eve Seuntjens<sup>3,4</sup>, Joke Debruyne<sup>3,4</sup>, Georg Luxenhofer<sup>5</sup>, Andrea B. Huber<sup>5</sup>, Danny Huylebroeck<sup>3,4</sup>, Bennett G. Novitch<sup>2</sup>, and Frédéric Clotman<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Université catholique de Louvain, Institute of Neuroscience, Laboratory of Neural Differentiation, 1200 Brussels, Belgium, <sup>2</sup>Department of Neurobiology, Eli and Edythe Broad Center of Regenerative Medicine and Stem Cell Research, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA 90095, USA, <sup>3</sup>Laboratory of Molecular Biology (Celgen) of the Center for Human Genetics and of the <sup>4</sup>Department of Molecular and Developmental Genetics (VIB11), KULeuven, 3000 Leuven, Belgium, <sup>5</sup>Institute of Developmental Genetics, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, 85764 Neuherberg, Germany

<sup>6</sup>these authors contributed equally to this work

<sup>7</sup>present address: Harvard University, Department of Molecular and Cellular Biology, Cambridge, MA 02138, USA

\*Correspondence: [frederic.clotman@uclouvain.be](mailto:frederic.clotman@uclouvain.be)

**Corresponding author:** Frédéric Clotman, Laboratory of Neural Differentiation, Institute of Neuroscience, Université catholique de Louvain

Avenue Hippocrate 55, box B1.55.11, B-1200, Brussels, Belgium

Phone: +32.2.764.55.71, Fax: +32.2.764.55.72, Email: [frederic.clotman@uclouvain.be](mailto:frederic.clotman@uclouvain.be)

**Running head:** OC control motor neuron diversification

Keywords: development, neuronal diversification, spinal motor neurons, Onecut factors, Isl1, Sip1

## ABSTRACT

During development, spinal motor neurons (MN) diversify into a variety of subtypes specifically dedicated to the control of particular sets of skeletal muscles or visceral organs. MN diversification depends on the coordinated action of several transcriptional regulators including *Isl1*, which is critical for MN survival and fate determination. However, how these regulators cooperate to establish each MN subtype remains poorly understood. Here, using phenotypic analyses of single or compound mutant mouse embryos combined to gain-of-function experiments in chick embryonic spinal cord, we demonstrate that the transcriptional activators of the *Onecut* family critically regulate MN subtype diversification at thoracic and limb levels of the spinal cord. Furthermore, we show that *Isl1* is a direct target of the *Onecut* factors, which are therefore required to maintain *Isl1* expression at the time of MN diversification. Finally, we identified other MN developmental regulators that cooperate with *Onecut* factors in this process. These data elucidate a comprehensive model wherein *Onecut* factors control multiple aspects of MN subtype specification. They also shed light on the late roles of *Isl1* in MN fate decision.

**Competing interest:** No competing interest.

### 3.1. Introduction

Body movements and locomotion as well as visceral activity rely on the ability of spinal motor neurons (MN) to activate a diversity of distinct targets. To achieve this, MN diversify during development into distinct subtypes specifically dedicated to the control of particular sets of skeletal muscles or visceral organs. Owing to the availability of numerous markers for these different MN subtypes, to their stereotyped positioning along the anteroposterior and dorsoventral axes of the spinal cord and to the easy correlation between cellular identity and target innervation, MN subtype specification became a useful model to better understand principles that drive neuronal diversity in the CNS (Jessell, 2000; Dasen and Jessell, 2009). However, certain aspects of MN diversification, including the segregation of somatic and visceral MN at thoracic levels of the spinal cord, remain poorly understood and the contribution of certain developmental regulators to this process remains obscure.

Several key steps can be identified during diversification of spinal MN. These neurons arise from a ventral progenitor domain (pMN) characterized by the expression of *Olig2*. Upon activation of several extrinsic and intrinsic signals, newly-born MN rapidly diversify into different subtypes that constitute five columnar groups, each occupying a defined position within the spinal cord and innervating a unique set of targets (Dasen and Jessell, 2009). Briefly, somatic MN of the medial motor column (MMC) innervate the dorsal axial musculature. At thoracic levels, somatic MN of the hypaxial motor column (HMC) ensure the innervation of the intercostal or abdominal wall muscles, while visceral MN of the preganglionic column (PGC) innervate sympathetic neurons of the paravertebral ganglia. At limb levels, medial or lateral columnar subdivision of the lateral motor column (LMC) ensures innervation of the ventral (flexor muscles) or dorsal (extensor muscles) part of the limbs, respectively. MN further diversify through the segregation of specific neurons into motor pools that innervate a dedicated target muscle.

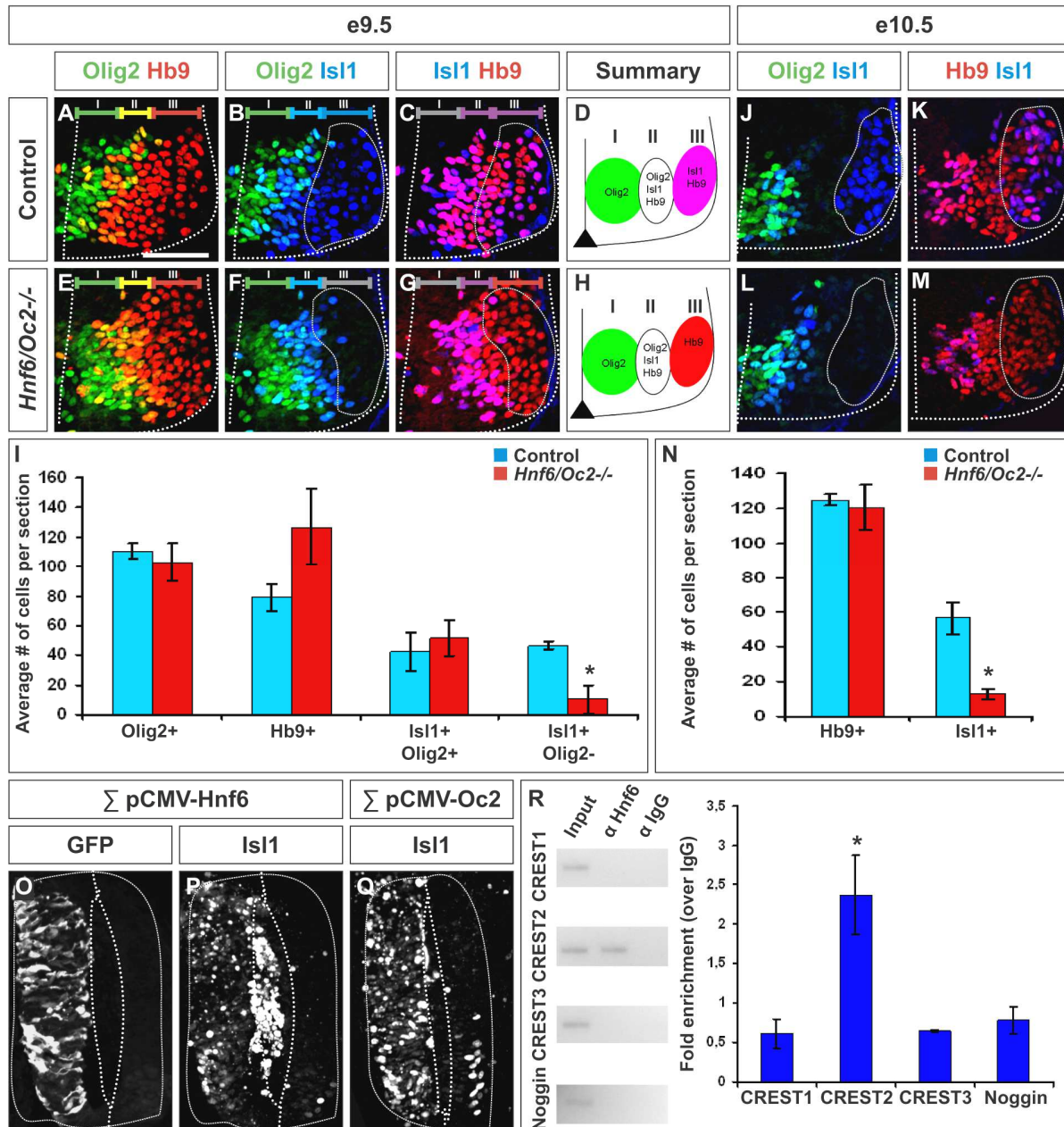
*Isl1* is of paramount importance for MN development. Indeed, it is required for survival of newly-born MN (Pfaff et al., 1996). In addition, it contributes with *Hb9* and *Isl2* to consolidate MN identity and to suppress the V2 interneuron differentiation program (Arber et al., 1999; Thaler et al., 1999; Thaler et al., 2004; Song et al., 2009). Furthermore, observations performed in genetic models wherein the expression of *Isl1* was partly altered indicated that *Isl1* also defines the identity and the axonal projections of medial LMC

(LMCm) neurons (Kania et al., 2000) and may contribute to the generation of PGC neurons (Thaler et al., 2004). However, detailed analysis of the roles of *Isl1* in MN subtype specification was partly hindered by its early requirement in MN survival and identity consolidation. Beside *Isl1*, others transcriptional regulators have been identified to control MN subtype diversification. *Isl2* and *Foxp1* have been proposed to promote visceral MN differentiation (Thaler et al., 2004; Dasen et al., 2008; Rousso et al., 2008). Upon activation by Wnt signaling, *Lhx3* promotes MMC identity (Agalliu et al., 2009). At limb levels, *Foxp1* is required for the production of LMC neurons (Dasen et al., 2008; Rousso et al., 2008) while *Lhx1* defines, in opposition to *Isl1*, the identity and the axonal projections of lateral LMC (LMCl) neurons (Bonanomi and Pfaff, 2010). Thus, MN diversification depends on the coordinated action of multiple transcriptional regulators. However, how these different regulators cooperate to establish MN subtype identity remains poorly understood.

We recently discovered that the transcriptional activators of the Onecut (OC) family are also present in differentiating spinal MN (Francius and Clotman, 2010). In mammals, the OC class contains 3 members, namely Hepatocyte Nuclear Factor-6 (HNF-6, also called OC-1), Onecut-2 (OC-2) and Onecut-3 (OC-3) (Lemaigre et al., 1996; Vanhorenbeeck et al., 2002; Jacquemin et al., 2003b). These proteins are detected during embryonic development in endoderm and in several endodermal derivatives including liver and pancreas wherein they redundantly control different aspects of cell fate decision and morphogenetic processes (Rousseau, 2003; Wang and Holterman, 2012). They are also present in the embryonic CNS, wherein they display a partly overlapping distribution (Landry et al., 1997). HNF-6 and OC-2 promote the maintenance of the A13 dopaminergic nucleus in the medial hypothalamus (Espana and Clotman, 2011). In response to BMP signaling, OC-2 regulates the fidelity of central projections of the trigeminal ganglion neurons (Hodge et al., 2007). In the ventral spinal cord, the three *Oc* genes are differentially and dynamically expressed during the early steps of MN differentiation (Francius and Clotman, 2010), suggesting that OC factors may contribute to spinal MN development.

Here, combining loss-of-function experiments in mouse embryos and gain-of-function experiments in chick embryos, we provide evidence that OC proteins directly stimulate *Isl1* expression and are required to maintain *Isl1* in newly-born MN and in specific columnar groups. We show that OC factors control MN subtype segregation among different columnar groups. We identify *Sip1* as a novel regulator of visceral MN differentiation that

acts oppositely to the OC proteins. Taken together, these observations elucidate a comprehensive model wherein OC factors cooperate with multiple regulators to control different aspects of MN subtype diversification in the developing spinal cord.



**Figure 31. OC factors are required to maintain *Isl1* expression during MN subtype diversification.**

(A-H) Triple label immunofluorescence analysis of Olig2, Hb9 and *Isl1* on a single spinal cord section of control or *Hnf6/Oc2* null embryos at e9.5. In the absence of OC factors, *Isl1* is present in the “intermediate” population (II) but is almost completely absent in newly-born MN (III). (I) Quantification of Olig2+ progenitors and of Hb9+ or *Isl1*+ newly-born MN in e9.5 *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> mutant embryos and control littermates (\* = p<0.05). (J-M) In *Hnf6/Oc2* null embryos at e10.5, the number of Hb9+ MN is normal but *Isl1* is lost in the newly-born MN. (N) Quantification of *Isl1*+ or Hb9+ MN in control or *Hnf6/Oc2* null spinal cord at e10.5 (\* = p<0.05). (O-Q) Overexpression of *Hnf6* or *Oc2* in chick embryonic spinal cord at HH14 results in ectopic *Isl1* expression 6h after electroporation. (R) Binding of endogenous OC factors to potential binding sites located in *Isl1* enhancers was assessed by chromatin immunoprecipitation on chick embryonic spinal cord extracts with an anti HNF-6 antibody or species-matched IgG. Right panel show gel images and left panel displays quantitative real-time PCR analysis. The Noggin promoter, which contains no potential OC binding site, served as negative control. OC proteins are bound to sites located in the CREST2 enhancer, but neither to the CREST1 nor to the CREST3 region (\* = p<0.05). I: pMN domain. Scale bar=100µm.

## 3.2. Results

### 3.2.1. The OC factors are required to maintain *Isl1* expression during MN subtype diversification

OC proteins are initially detected in MN around e9.0, as soon as neural progenitors exit the cell cycle and start producing the earliest MN markers *Isl1* and *Hb9* (Fig. S1A-I). They are present in an overlapping pattern in a vast majority of newly-born MN until e11.5, when their distribution becomes restricted to subsets of differentiating MN (Francius and Clotman, 2010). Therefore, we first assessed whether the early steps of MN differentiation were affected by the absence of OC factors. We started our analyses with embryos double mutant for *Hnf6* and *Oc2* (*Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup>). Indeed, the expression of *Oc3* was completely abrogated in the spinal cord of these embryos (Fig. S1J-M and data not shown), enabling us to study the consequences of the loss of the three OC proteins on MN development.

In control embryos, *Olig2* was present in MN progenitors located in the ventral portion of the spinal cord (population I in Fig. 31A-B). As these cells exited the cell cycle and emerged from the ventricular zone, they transiently contained *Olig2*, *Isl1* and *Hb9* ("intermediate" population II in Fig. 31A-B). Then, the production of *Olig2* was downregulated while the newly-born MN maintained *Hb9* and *Isl1* (population III in Fig. 31A-D). In *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> embryos, the MN progenitor domain seemed to be unaffected (Fig. 31E-F,I,L). In addition, the number and the distribution of newly-born MN in mutant embryos were identical to those in control embryos (Figs. 31A-M, S1O-T). Thus, OC factors are not required for the generation of MN. However, although *Isl1* was present in the *Olig2*-positive "intermediate" population, it was absent from a majority of newly-born MN (Fig. 31A-N). This loss of *Isl1* was not due to MN cell death, as no increase in apoptosis was detected in the ventral spinal cord of *Oc* mutant embryos (Fig. S1S-T). Moreover, the number of *Lhx3*-positive V2a interneurons was also normal (Fig. S1Q,T), arguing against a fate conversion of MN into V2 interneurons. Taken together, these observations confirm that OC factors are required to maintain *Isl1* expression in newly-born MN and that neither MN generic differentiation nor MN identity consolidation was altered by the lack of OC proteins.

The co-detection of *Isl1* and of OC factors in newly-born MN and the precocious loss of *Isl1* in *Oc* mutant MN suggested that OC factors might directly stimulate *Isl1* expression. Accordingly, ectopic expression of *Hnf6* or *Oc2* alone was sufficient to induce *Isl1* expression as early as 6h after electroporation (Fig. 31O-Q). *Isl1* production in differentiating MN is under the control of three conserved enhancer elements named CREST1 to 3 (Uemura et al., 2005). We found one potential OC binding site corresponding to the 5'-(A/T/G) (A/T) (A/G) TC(A/C)AT N (A/T/G) -3' consensus (Lannoy et al., 1998; Jacquemin et al., 2000) in CREST1 and two potential binding sites in CREST2, while CREST3 was devoid of such sequence (Fig. S1U-W). Chromatin immunoprecipitation assay indicated that endogenous OC proteins were bound to CREST2 but neither to CREST1 nor to CREST3 (Fig. 31R). Taken together, these observations are consistent with a direct regulation of *Isl1* expression by the OC factors in spinal MN.

**Figure 32. The OC factors control the ratio between somatic and visceral MN.**

(A-F) Distribution of visceral MN markers at thoracic levels in control or *Hnf6/Oc2* null embryos at e10.5 unveils a loss of *Foxp1* and *Sip1* in the absence of OC factors. (G) Quantitative analysis of prospective visceral MN markers at e10.5 on thoracic spinal cord sections of control or *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> embryos (\*=p<0.05 and \*\*\* = p<0.001). (H) Comparison of *Isl1* protein levels in prospective somatic or visceral MN in wild-type embryos at e10.5 demonstrates that *Isl1* content is two-fold lower in the prospective visceral MN (\* = p<0.05). (I-T) Distribution of MN columnar subtype markers at thoracic levels in control or *Hnf6/Oc2* mutant spinal cord at e12.5 shows an expansion of visceral MN at the expense of somatic MN. (U) Quantitative analysis of MN columnar subtype markers on thoracic spinal cord sections of control or *Hnf6/Oc2* mutant embryos at e12.5 (\* = p<0.05 and \*\* = p<0.01). (V) Quantitative analysis of *Isl1* and *Foxp1* in visceral MN on thoracic sections of control or *Hnf6/Oc2* mutant spinal cord at e12.5 (\* = p<0.05 and \*\* = p<0.01). (W) Although the somatic MN population is reduced in *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> spinal cord at e12.5, the ratio between MMC and HMC neurons is not modified. (X) In *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> embryos, the total number of MN at e12.5 is normal but the ratio between somatic and visceral MN is modified (\*=p<0.05 and \*\*=p<0.01). (Y-Z) Open-book view of control or *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> spinal cord summarizes the observations obtained at thoracic levels of spinal cord, i.e. modification of the ratio between somatic and visceral MN, absence of *Isl1* and *Foxp1* in PGC neurons and context-dependent regulation of *Isl1* by the OC factors. (AA-AC) Overexpression of *Hnf6* in chick embryonic spinal cord at HH14 results, 96 hours after electroporation, in a reduction in visceral MN of the Column of Terni and in an expansion of the somatic MN (\* = p<0.05). PGC: preganglionic column; MMC: median motor column; HMC: hypaxial motor column V2: V2a interneurons. Scale bars=100µm (A-F), 125µm (I-L and O-R), 170µm (M, S) or 200µm (AA-AC).



### 3.2.2. The OC factors control the ratio between somatic and visceral MN

As MN survival and identity were not affected in *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> embryos, these mutants constitute an opportunity to address later roles of *Isl1* in MN subtype specification. Therefore, we analyzed the consequences of the loss of OC factors and of *Isl1* in each portion of the spinal cord. At e10.5, thoracic MN initiate the expression of columnar markers, including *Foxp1* in the prospective visceral MN (Dasen et al., 2008; Roussio et al., 2008). In control embryos, *Foxp1* was indeed detected in a lateral MN population containing *Isl1* and low levels of *Hb9* (Fig. 32A-B). In addition, our marker analysis indicated that, beyond its presence in spinal neural progenitors (Bassez et al., 2004; Miyoshi et al., 2006), *Sip1* (Smad-Interacting Protein 1; also called *Zfhx1b* or *Zeb2*) is detected in visceral MN. *Sip1* is a member of the *Zfhx1* family of two-handed zinc finger/homeodomain proteins and displays a dual activator or repressor activity according to the context (van Grunsven et al., 2001; Bassez et al., 2004; Seuntjens et al., 2009). *Sip1* was detected in prospective visceral MN containing *Foxp1* (Fig. 32C). The absence of OC factors resulted in a strong decrease in the amount of *Foxp1*- and of *Sip1*-positive MN (Fig. 32D-G). These observations suggested that, in addition to their role in the maintenance of *Isl1* expression, OC factors control visceral MN differentiation and act upstream of *Foxp1* and of *Sip1* in this process. Accordingly, OC proteins are produced earlier than *Foxp1* and *Sip1* in MN (Francius and Clotman, 2010) and were normally distributed in *Foxp1*- or *Sip1*-deficient embryos (Figs. S2F-I and S3J-L,N). Moreover, HNF-6 and OC-2 induced ectopic expression of *Foxp1* and of *Sip1* when overexpressed in chick embryonic spinal cord (Fig. S2J-N and S3O-S). *Isl1* and *Foxp1* promote visceral MN differentiation (Thaler et al., 2004; Dasen et al., 2008; Roussio et al., 2008). Therefore, we expected that their downregulation in the absence of OC factors would result in a decrease in visceral MN. Surprisingly, an expansion of the PGC was instead observed. Indeed, the amount of nNOS-positive MN and of phospho-SMAD1/5/8 (pSMAD)-positive cells was increased in mutant embryos (Fig. 32O-P,U,Z). Moreover, *Sip1* was present and was detected in an increased number of visceral MN (Fig. 32Q,U), confirming the production of supernumerary PGC neurons. In contrast, *Isl1* and *Foxp1* were absent from a vast majority of these visceral MN (Fig. 32O-Q,V,Z). Thus, OC factors restrict the production of visceral MN and modulate expression of regulators of this process.

As the total amount of MN initially produced in OC mutant embryos was normal, we wondered whether the production of supernumerary visceral MN observed at e12.5 correlated with a decrease in somatic MN. Somatic MN and their columnar subdivision were detected in the thoracic spinal cord of *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* embryos, as evidenced by the presence of Hb9 in the HMC and of Lhx3 and Hb9 in the MMC (Fig. 32R). Other somatic MN markers including *Pea3* and *Scip* were also present (data not shown). Surprisingly, *Isl1* could also be detected in all the somatic MN of the MMC/HMC (Fig. 32S,Z), suggesting that the requirement for OC factors in *Isl1* expression depends on MN subtype. However, the amount of somatic MN was reduced in the absence of OC factors (Fig. 32R,U,Z). This reduction was similar for MMC and for HMC neurons, preserving a normal MMC/HMC ratio (Fig. 32W). Loss of somatic MN was not due to cell death, as apoptosis was neither increased at e10.5 nor at e12.5 (Figs. S1S-T and S4D-E), nor to a fate conversion of MN into V2a interneurons, as the amount of Chx10<sup>+</sup> V2a cells was normal and no Hb9+Chx10<sup>+</sup> hybrid cells could be detected (Fig. S4B,E). Thus, the absence of OC factors most likely modifies the differentiation balance between somatic and visceral MN, leading to the production of supernumerary visceral MN at the expense of somatic MN (Fig. 32X,Z). To assess the respective contribution of HNF-6 and of OC-2 to this process, similar analyzes were performed in *Hnf6* or *Oc2* single mutant embryos (wherein *Oc3* expression was preserved, Fig. S1J-M and data not shown). Imbalance in somatic versus visceral MN differentiation was observed in *Hnf6* but not in *Oc2* mutant embryos, suggesting that, among the OC factors, HNF-6 is the major contributor to this process (Fig. S4F-N).

In reverse, to determine whether increased *Oc* expression would be sufficient to shift the somatic vs visceral MN ratio in the opposite direction, *Hnf6* was overexpressed in chick embryonic spinal cord at the time of MN specification (HH14) and embryos were analyzed 96 hours later (HH29-30). Despite a partial loss of MN due to the overexpression of *Hnf6* in newly-born MN (data not shown), the analysis of MN columnar markers indicated that the proportion of somatic MN was increased at the expense of visceral MN (Fig. 32AA-AC). These observations confirm that OC factors control the differentiation balance between somatic and visceral MN.

The absence of OC factors resulted in a loss of *Isl1* in newly-born MN and an increase in PGC neurons. Conversely, *Oc* overexpression stimulated *Isl1* expression and increased the somatic MN population. This suggested that low levels of *Isl1* in newly-born MN promote

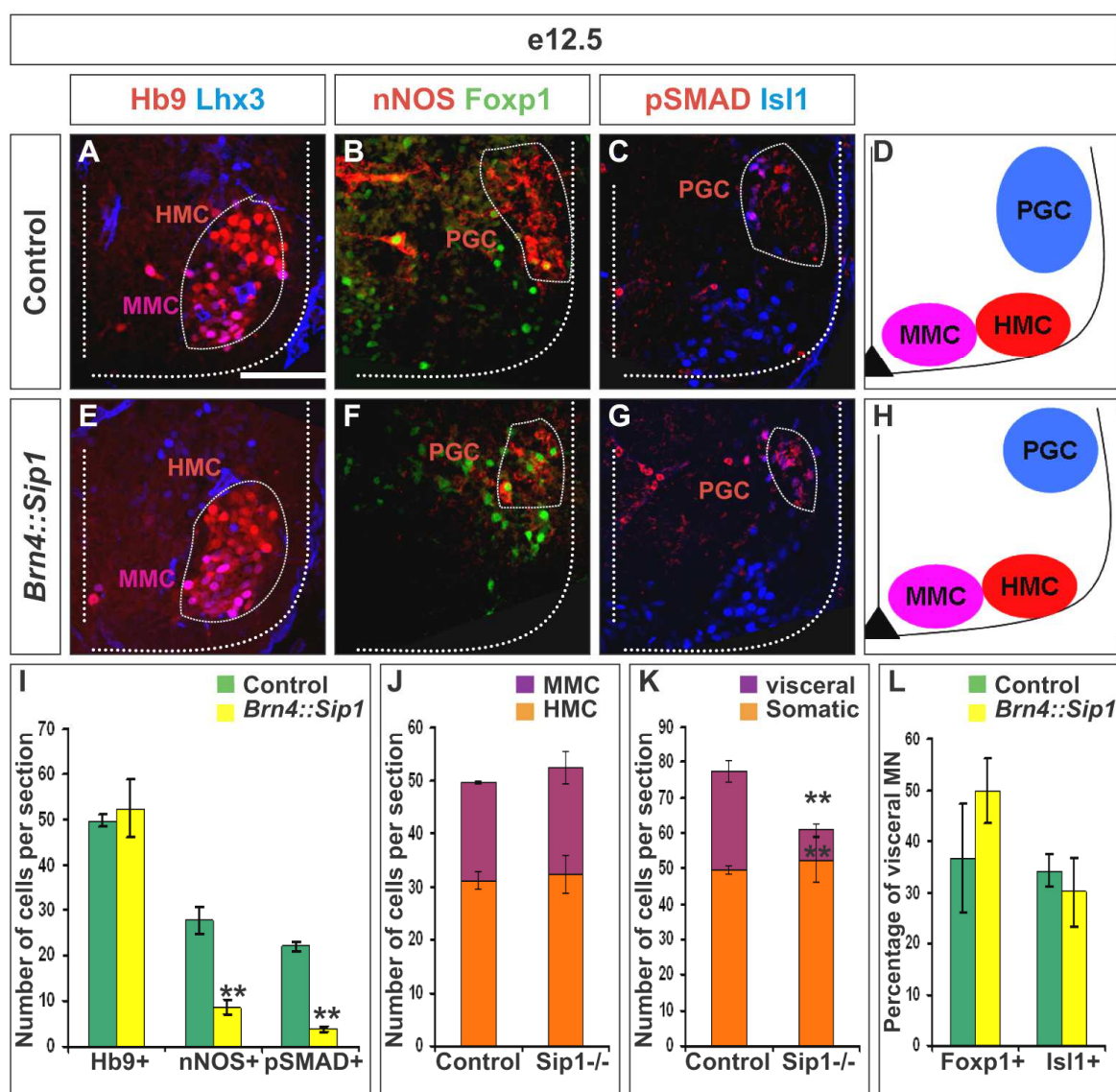
visceral MN differentiation, whereas high *Isl1* levels would favor somatic MN differentiation. Therefore, we compared *Isl1* levels in prospective PGC neurons characterized by the presence of *Foxp1* and in prospective MMC/HMC neurons devoid of *Foxp1* in wild-type embryos at e10.5. *Isl1* levels in prospective visceral MN were two-fold lower than that in prospective somatic MN (Fig. 32B,H), consistent with the hypothesis that differential amounts of *Isl1* may contribute to MN subtype specification at thoracic levels of the spinal cord. However, misexpression of *Isl1* alone was not sufficient to modify the somatic to visceral MN ratio in chick embryonic spinal cord (data not shown), suggesting that additional OC targets may cooperate with *Isl1* in this process.

### **3.2.3. *Sip1* is required for proper differentiation of visceral MN**

The absence of *Sip1* in prospective visceral MN at e10.5 in *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> embryos suggests that OC factors control the onset of *Sip1* reactivation in differentiating MN. However the requirement for OC factors in *Sip1* expression seems to be transient, as *Sip1* was present in *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> visceral MN at e12.5. To gain more insight into the possible function of *Sip1* during visceral MN differentiation and to assess whether delayed *Sip1* reactivation may contribute to the visceral MN phenotype in *Oc* mutant embryos, we studied MN development in *Brn4/Cre::Sip1flox* (*Brn4::Sip1*) embryos (Higashi et al., 2002), wherein *Sip1* was deleted in the differentiating neurons but not in neural progenitors (Fig. S3G,M). At e10.5, the MN progenitor domain was not altered in the absence of *Sip1*, as demonstrated by a normal number and distribution of *Olig2*-positive cells (Fig. S3H,M). Newly-born MN were generated in normal amount and properly distributed as evidenced by quantification of *Isl1* or *Hb9*-positive cells (Fig. S3H,J,M). In addition, the expression of the visceral MN marker *Foxp1* was not modified (Fig. S3I,M). Thus, *Sip1* is not required for MN generation and identity consolidation.

At e12.5, the somatic MN were present in normal amount and displayed proper columnar organization (Fig. 33E,I-J). In contrast, a strong reduction in the number of PGC MN was observed although expression of visceral MN markers, including *Isl1*, was preserved (Fig. 33F-H,I,L). This reduction of visceral MN was neither due to cell death, as no increase in apoptosis was detected in the spinal cord of *Brn4::Sip1* embryos at e12.5, nor to fate conversion of visceral MN into V2a interneurons, as the amount of *Chx10*-positive V2a cells

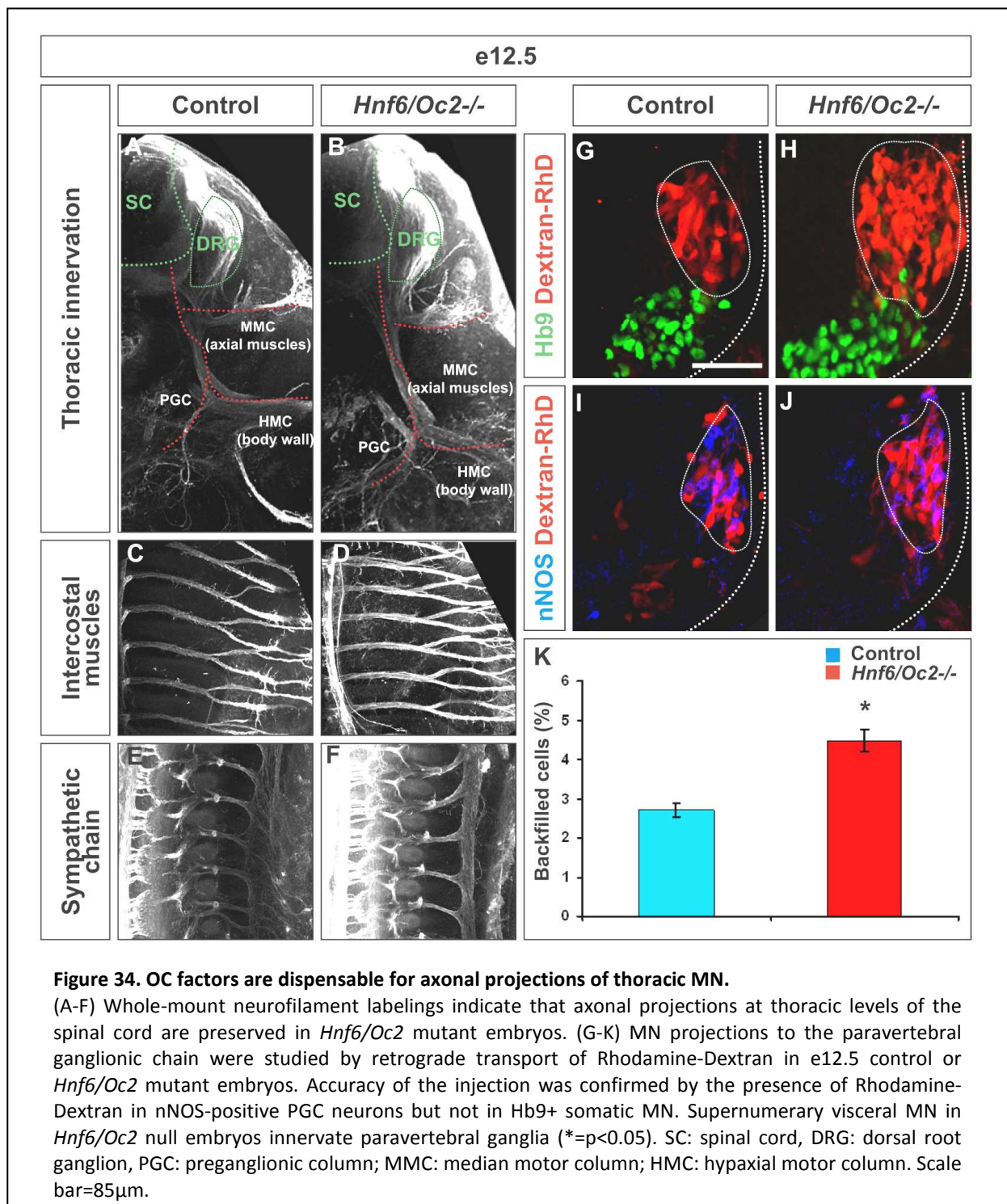
was normal (data not shown). Taken together, these observations demonstrate that the presence of *Sip1* between e10.5 and e12.5 is required for the production of proper amounts of visceral MN and seems to have effects opposite to OC factors in this process. Therefore, the stimulation of *Sip1* expression by OC factors in newly-born MN might provide an additional feedback mechanism to adjust visceral MN production.

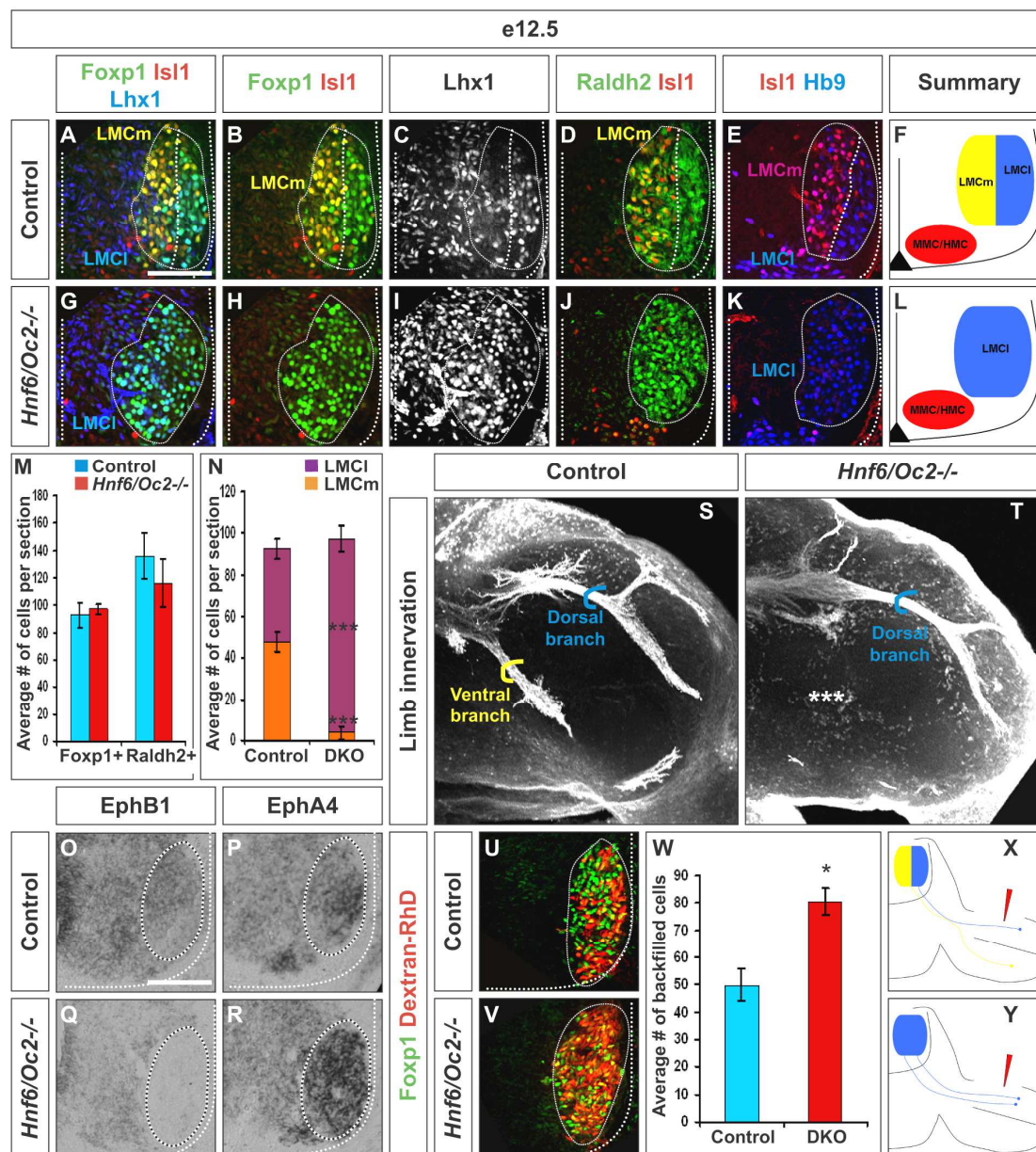


### **3.2.4. The OC factors are dispensable for axonal projections of thoracic MN**

As OC factors control MN cell fate decision at thoracic levels of the spinal cord, we examined whether the absence of OC proteins influences thoracic MN axonal projections. Axon trajectories were analyzed by whole-mount immunofluorescence labeling for neurofilament at e12.5. Like in control embryos, axons extended into the periphery in *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* mutants, confirming that these neurons retained fundamental aspects of MN character. The major peripheral thoracic nerve pathways were preserved. Indeed, MMC axons grew dorsally toward the axial muscles of the back and HMC axons progressed ventrally toward the body wall musculature (Fig. 34B). Furthermore, the thoracic axons from the HMC population respect the strict segmental boundaries without forming any axonal bridges between segmentally arrayed motor nerves (Fig. 34D). Finally, despite the loss of *Isl1* and *Foxp1*, the PGC neurons were able to project their axons toward the sympathetic chain (Fig. 34F). These observations indicated that the OC factors are dispensable for MN axonal projections at thoracic levels of the spinal cord.

As shown above, supernumerary visceral MN were produced in *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* embryos. We assessed whether all these MN acquired target specificity of the PGC cells, namely innervation of the paravertebral ganglia. After injection of the retrograde tracer Rhodamine-dextran (Dextran-RhD) into the sympathetic chain, the backfilled PGC population was indeed expanded in *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* embryos and corresponded to visceral MN as evidenced by the presence of nNOS (Fig. 34G-K). This suggests that, in the absence of OC factors, supernumerary visceral MN consistently innervate the paravertebral ganglia.





**Figure 35. The OC factors are required for LMC subdivisions.**

(A-L) Colabeling analyses of LMC markers unveil production of supernumerary LMCI neurons at the expense of the LMCm population at e12.5 in the brachial spinal cord of *Hnf6/Oc2* mutant embryos. (M) Quantification of LMC neurons at e12.5 demonstrates that total MN numbers at brachial levels are not significantly changed in *Hnf6/Oc2* null embryos. (N) Quantitative analysis of LMC subtype markers indicates a conversion of LMCm to LMCI identity in e12.5 *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* embryos (\*\*\* =  $p < 0.001$ ). (O-R) In control embryos at e12.5, *EphB1* mRNA is enriched in the LMCm whereas high *EphA4* mRNA levels are detected in the LMCI. In *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* embryos, *EphB1* mRNA in the LMC is lost whereas *EphA4* expression is high throughout the LMC. (S-T) Axonal projections of LMC neurons in the limbs of control or *Hnf6/Oc2* mutant embryos at e12.5. In *Hnf6/Oc2* mutants, the motor nerve branch that innervates the ventral mesenchyme of the limb is absent. (U-V) LMC neuron projections were studied by retrograde transport of Rhodamine-Dextran injected into the dorsal part of the limbs in control or *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* embryos at e12.5. Foxp1 was used to identify LMC neurons. In the absence of OC factors, most of the LMC neurons innervates dorsal limb mesenchyme. (W-Y) Quantification of LMC neurons labeled after retrograde Rhodamine-Dextran transport in control or *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* embryos demonstrates that a vast majority of LMC axons are redirected towards the dorsal part of the limbs in the absence of OC factors (\* =  $p < 0.05$ ). LMCm: medial portion of the lateral motor column, LMCI: lateral portion of the lateral motor column. Scale bars=150 $\mu$ m (A-L), 170 $\mu$ m (O-R, U-V).

### 3.2.5. The OC factors are required for LMC subdivisions

Foxp1 is required for differentiation of LMC neurons (Dasen et al., 2008; Roussio et al., 2008). As the production of Foxp1 was strongly downregulated at thoracic levels of *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> embryos, we first wondered whether LMC neurons were normally produced in the absence of OC factors. Surprisingly, we first observed that Foxp1 was present and was normally distributed in the brachial spinal cord of *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> embryos (Figs. 35G-H,M, S5E-F,I). Similarly, the distribution of retinaldehyde dehydrogenase-2 (*Raldh2*), which is restricted to LMC neurons, was normal (Figs. 35J,M, S5H,I). Therefore, the generation of LMC neurons was not affected by the absence of OC factors. In contrast, *Isl1* was severely depleted throughout LMC formation (Figs. 35G-H,J-K, S5E-F,H). Concomitantly, the distribution of *Lhx1* (Figs. 34G,I, S5E,G) and the expression of high levels of *Hb9* (Fig. 35K) expanded throughout the LMC. This suggested that, in the absence of OC factors, the molecular identity of LMCm neurons was converted into that of LMCI neurons (Figs. 35N, S5J). Similar investigations in single *Hnf6*<sup>-/-</sup> or *Oc2*<sup>-/-</sup> embryos indicated that HNF-6 plays here also a prominent role in this process and that the OC factors act redundantly to control the LMCm/LMCI ratio (Fig. S5K-S).

As *Lhx1* and *Isl1* coordinate LMC neuron identity with the dorsoventral selection of axon pathways, we assessed whether this change of identity observed in *Oc* mutants resulted in a modification of limb innervation. In wild-type embryos, *Lhx1* directs the dorsal projection of LMCI axons in the developing limb through its ability to regulate *EphA4* expression, a guidance receptor required for axons to avoid the ventral limb mesenchyme. In contrast, *Isl1* promotes *EphB1* expression, which ensures ventral projection of LMCm axons (Bonanomi and Pfaff, 2010). In *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> embryos, severe downregulation of *Isl1* in the LMCm resulted in a loss of *EphB1* expression, whereas the increase in the number of *Lhx1*-positive cells was accompanied by increased *EphA4* expression levels (Fig. 35Q-R). Consistently, the segregation of LMC axons at the base of the limb was altered, and the ventral branch was completely absent (Fig. 35T). This suggested that a vast majority of LMC neurons projected dorsally in the absence of OC factors. To confirm this, the retrograde marker Rhodamin-dextran was injected into the dorsal part of the limbs and retrogradely-labeled LMC neurons were quantified (Fig. 35V-W). In control embryos, neurons that innervated the dorsal portion of the limbs accounted for 50±6% of total LMC neurons. At variance, in *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> littermates, 81±5% of LMC neurons invaded the dorsal part of the

limb ( $n=3$ ,  $p<0.05$ ). Together, these results indicate that the absence of OC factors results in a switch from LMCm to LMCI molecular identity and subsequent redirection of the corresponding axons toward the dorsal mesenchyme of the limbs (Fig. 35Y).

### 3.3. Discussion

Despite tremendous progresses made during the last 20 years in the understanding of the molecular mechanisms that control MN diversification, several questions remain, noteworthy the fine-tuned control of the expression of key developmental regulators, their exact contribution to some aspects of this process and how they cooperate to exert their role. Here, we show that members of the OC transcription factor family regulate the expression of *Isl1* and control different aspects of MN subtypes diversification. Interestingly, whereas most of the previously identified MN developmental regulators were transcriptional repressors and therefore have been proposed to direct the segregation of distinct neuronal subsets through exclusion of antagonistic differentiation programs, the OC factors are known to act as transcriptional activators and may therefore enable to identify components of genetic programs that exert congruent efforts toward a specific neuronal fate.

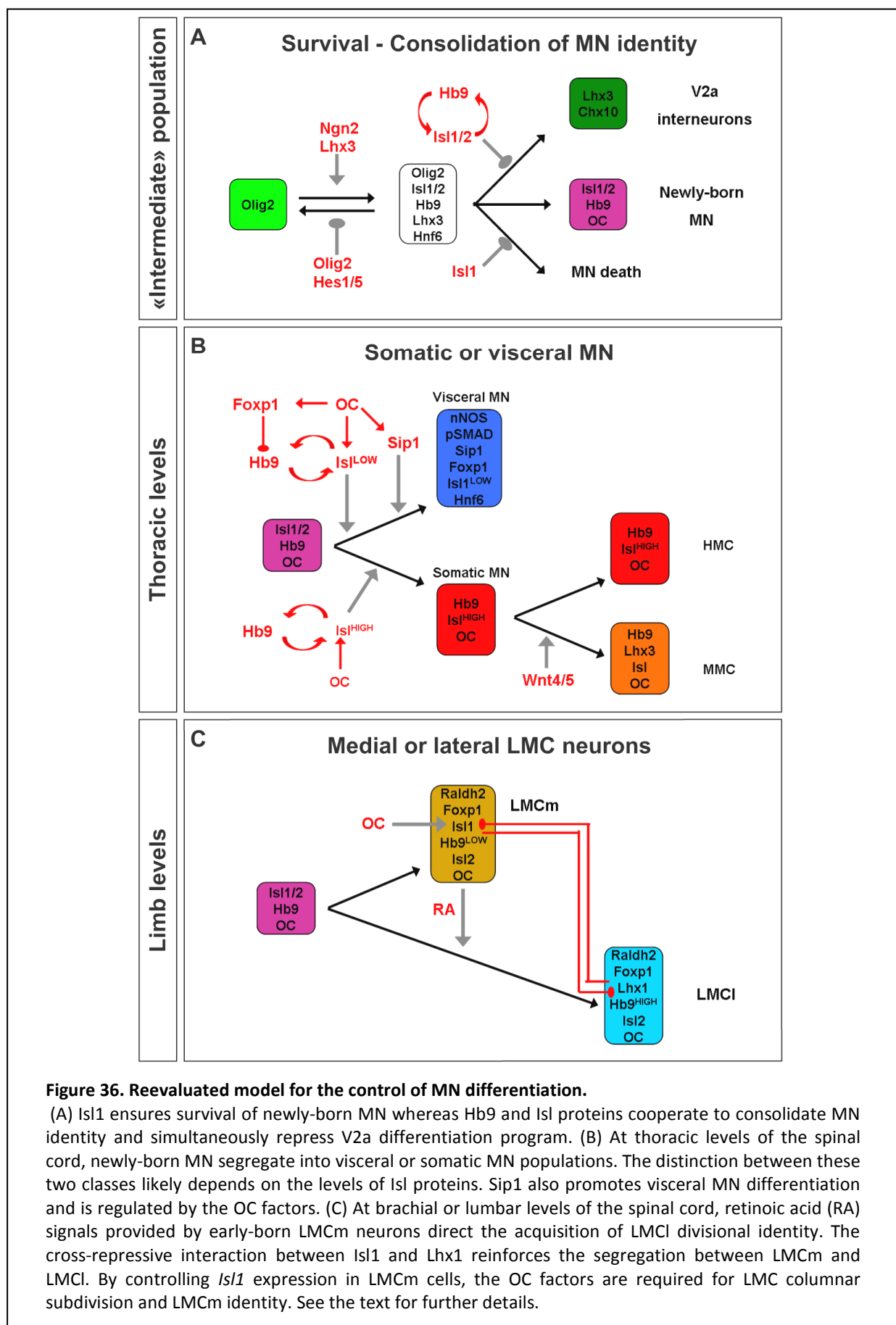
#### **3.3.1. Context-dependent transcriptional regulation controls MN differentiation**

*Isl1* plays prominent roles during spinal MN development (Pfaff et al., 1996; Thaler et al., 2004; Luria et al., 2008; Song et al., 2009). During early phases of MN differentiation, *Hb9* indirectly stimulates *Isl1* expression (Tanabe et al., 1998; Arber et al., 1999; Thaler et al., 1999; William et al., 2003). Conversely, *Isl1* stimulates *Hb9* transcription through its participation in the formation of *Isl1*:*Lhx3*:*NLI* complexes that consolidate MN identity (Lee et al., 2008). This establishes a regulatory loop wherein *Isl1* and *Hb9* mutually support their expression. At variance, factors that directly activate *Isl1* transcription in MN remain unknown. Here, we show that OC factors stimulate, probably directly, the expression of *Isl1* in spinal MN. However, this regulation is strongly context-dependent. Indeed, in *Oc* mutant embryos, *Isl1* was almost completely lost in newly-born MN, in PGC and in LMC neurons but was preserved in MMC and in HMC cells, although OC factors are present in all MN subtypes in control embryos (Francius and Clotman, 2010). Similarly, the absence of OC factors resulted in a loss of *Foxp1* in PGC neurons, but not in LMC cells. This suggests that subtype-specific cofactors that modulate either OC binding to their target sequences or OC transcriptional activity may promote regulation of *Isl1* or *Foxp1* in specific MN subtypes. The binding of OC factors to the *Isl1* enhancer CREST2 but not to CREST1, which also contains a potential OC binding site, supports the first hypothesis. CBP, p300 and PGC-1 are known to

behave as cofactors for OC proteins in hepatic cells (Lannoy et al., 1998; Beaudry et al., 2006). CBP and p300 are widely expressed in the developing spinal cord. They coordinately cooperate there with retinoic acid signaling and Ngn2 to promote MN differentiation (Lee et al., 2009). Whether they also contribute to later steps of MN development and interact with OC factors in these processes remains to be investigated. PGC-1 is also present in the spinal cord (Diez-Roux et al., 2011) but its role during MN development remains to be investigated. Similarly, the Hb9-Isl1 regulatory loop is strongly context-dependent, as it seems to operate in newly-born and in MMC/HMC MN but not in LMC neurons (Tanabe et al., 1998; Arber et al., 1999; Thaler et al., 1999; William et al., 2003). Furthermore, Foxp1 controls MN subtype specification through interactions with different Hox proteins at different levels of the spinal cord (Dasen and Jessell, 2009). Thus context-dependent transcriptional regulation likely contributes to multiple aspects of spinal MN diversification.

### **3.3.2. OC-independent MN generation and consolidation of MN identity**

Isl1 is necessary for spinal MN survival (Pfaff et al., 1996). In addition, it plays a prominent role in the consolidation of MN identity (Thaler et al., 2004; Song et al., 2009). Furthermore, Isl2 seems to exert functions similar to that of Isl1 in the consolidation of MN identity (Segawa et al., 2001; Thaler et al., 2004; Hutchinson and Eisen, 2006). Therefore, it has been proposed that the global level of Isl proteins, rather than a specific function attributed to each Isl factor, is critical for the consolidation of MN identity as well as for other Isl-dependent processes involved in MN development (Thaler et al., 2004). In the absence of OC factors, although *Isl1* expression in newly-born MN was severely downregulated, MN were generated in normal amount and MN identity was maintained. This indicates that OC factors are neither required for MN generation nor for MN identity consolidation. It also suggests that the requirement for Isl1 in these two processes is restricted to very early steps of MN development, likely at the stage when Olig2 and Isl1 are jointly detected in the "intermediate" population (Fig. 36A), as previously proposed (Song et al., 2009). Hb9 also participates in the consolidation of MN identity by repressing V2a determinants including *Chx10* (Arber et al., 1999; Thaler et al., 1999; Song et al., 2009). Therefore, in mouse mutants for *Hb9* or *Isl2*, increased expression of *Lhx3* and *Chx10* led to fate conversion of newly-born MN into V2a interneurons (Arber et al., 1999; Thaler et al., 1999; Thaler et al., 2004). As *Lhx3* inhibits expression of the visceral MN determinant *Foxp1*



(Dasen et al., 2008; Rouso et al., 2008) and visceral MN differentiation (William et al., 2003; Thaler et al., 2004), *Lhx3* expansion likely underlies the loss of PGC neurons observed in these mutant animals, as proposed (Rouso et al., 2008).

### **3.3.3. Versatile genetic networks control MN subtype diversification in the thoracic spinal cord**

Although newly-born MN were properly generated in the absence of OC factors, further diversification of MN was altered. At thoracic levels, a supernumerary number of PGC neurons was produced at the expense of MMC/HMC neurons. This suggests that OC factors participate in the differentiation balance between somatic and visceral MN. Surprisingly, the expression of regulators previously proposed to promote PGC neuron differentiation, including *Isl1* and *Foxp1* (Thaler et al., 2004; Dasen et al., 2008; Rouso et al., 2008), was severely downregulated. This led us to build a re-evaluated model for thoracic MN diversification (Fig. 36B). As the absence of OC factors did not alter MN consolidation, expression of the V2a interneuron determinants *Lhx3* and *Chx10* did not increase and visceral MN differentiation could occur free of expanded *Lhx3* constraints (William et al., 2003; Thaler et al., 2004). *Isl1* expression was lost from newly-born MN in *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* embryos. Subsequently, less somatic MN were produced at thoracic levels of the spinal cord. This suggests that high levels of *Isl* proteins are required in newly-born MN to generate somatic MN. In contrast, supernumerary PGC neurons were produced, suggesting that low levels of *Isl* proteins would be permissive for the generation of visceral MN (Fig. 6B). Consistently, *Hb9* overexpression stimulates both *Isl1* expression and somatic MN differentiation, while it inhibits visceral MN production (Tanabe et al., 1998; William et al., 2003). Furthermore, we measured two-fold more *Isl1* protein in prospective somatic MN than in their visceral counterparts. Thus, we propose that differential levels of *Isl* proteins contribute to somatic vs visceral MN subtype specification in the thoracic spinal cord. Differential content in *Isl1* could result from the presence of *Foxp1* in the prospective visceral MN. Indeed, *Foxp1* inhibits *Hb9* expression (Dasen et al., 2008; Rouso et al., 2008), which could weaken the mutual stimulatory loop between *Hb9* and *Isl1* and reduce *Isl1* expression levels in prospective visceral MN. Accordingly, the expression of *Hb9* and of *Isl1* is progressively downregulated during visceral MN differentiation and this is required for visceral MN production (William et al., 2003). Thus, in newly-born MN, OC factors

participate in genetic networks that, likely depending on the involvement of *Foxp1*, promote either somatic or visceral MN differentiation (Fig. 36B).

#### **3.3.4. *Sip1* supports the generation of visceral MN**

*Sip1* was initially discovered using yeast two-hybrid screening as a binding partner of activated SMAD (Verschuere et al., 1999). During development, *Sip1* is involved in neural tube closure and in cranial neural crest migration (Van de Putte et al., 2003). It is required for development of the hippocampus through regulation of Wnt signaling (Miquelajauregui et al., 2007). *Sip1* also restrains, in a cell non-autonomous fashion, a feedback mechanism between postmitotic cortical neurons and progenitors that regulates the timing of neurogenesis and gliogenesis in the embryonic brain cortex (Seuntjens et al., 2009). *Sip1* is able to inhibit transcriptional activity of activated Smad proteins but also to cooperate with the BMP-activated Smad8 to stimulate the transcription of target genes (Postigo, 2003; Yoshimoto et al., 2005). Noteworthy, pSMAD, which transduces BMP signaling, are restricted to PGC neurons in the developing spinal cord (Dasen et al., 2008). Whether *Sip1* is required to modulate BMP signaling in PGC neurons, and how any of these processes may support visceral MN differentiation, remain to be investigated.

In the spinal cord, *Sip1* is initially present in neural progenitors (Bassez et al., 2004; Miyoshi et al., 2006). After downregulation once the differentiating neurons exit the cell cycle, *Sip1* expression is reactivated exclusively in visceral MN. OC factors seem to be required for timely reactivation of *Sip1* in prospective PGC neurons. However, as for *Isl1* and *Foxp1*, this requirement must be transient as expression of these three genes persists in PGC cells whereas the expression of OC factors is almost completely downregulated from e12.5 on (Francius and Clotman, 2010).

#### **3.3.5. OC factors control the identity of LMCm neurons**

Absence of OC factors does not alter the generation of MN dedicated to the limb innervation, as evidenced by proper amount and distribution of Raldh2- and *Foxp1*-positive MN at brachial or lumbar levels of the spinal cord. In contrast, it results in an expansion of LMCI at the expense of LMCm, as shown by the conversion of the combination of molecular markers (Tsuchida et al., 1994), by the switch in the expression of guidance molecules and by the consequent redirection of the axonal projections toward the dorsal portion of the

limbs (Kania et al., 2000; Kania and Jessell, 2003; Luria et al., 2008). Progenitors destined to form the LMCm leave the cell cycle before those that contribute to the LMCI. All these MN initially express *Isl1* (Sockanathan and Jessell, 1998). However, *Raldh2* expression in early-born LMCm neurons generates a retinoic acid signal that imposes a lateral phenotype to later-born neurons through initiation of *Lhx1* and repression of *Isl1* expression (Sockanathan and Jessell, 1998). The distinct identities of these LMC divisions are further reinforced by crossrepressive interactions between these two transcription factors (Kania et al., 2000). In the absence of OC factors, *Isl1* expression in newly-born LMC neurons was strongly altered. However, our observations indicate that *Isl1* is dispensable for *Raldh2* expression and for normal production of LMCI neurons. In contrast, the absence of *Isl1* released the repression on *Lhx1* expression, which resulted in a complete switch from LMCm to LMCI identity (Fig. 36C). The crossrepressive interaction between *Lhx1* and *Isl1* also determines respective position of LMCm or LMCI cell bodies within the LMC by gating reelin signaling (Palmesino et al., 2010). However, despite the absence of *Isl1* and the expansion of *Lhx1* in OC mutant embryos, the LMC cells were normally positioned and ectopic LMCI neurons did not tend to occupy a lateral position. This suggests that OC factors may cooperate with Reelin signaling to control LMC cell body position.

In conclusion, we have shown that OC factors control different aspects of MN fate decision during spinal cord development. The OC proteins act in this process in a redundant manner, with HNF-6 ensuring a large portion of the OC activity. Part of this activity likely relies on the direct stimulation of *Isl1* expression by the OC factors, although we provided evidence that other OC targets that remain to be identified also contribute to define MN subtype identity. Identification of additional OC target genes and OC cofactors would enable to further dissect the genetic networks that regulate spinal MN diversification.

### 3.4. Experimental procedures

#### ***Animals and genotyping procedures***

The mice were raised in our animal facilities and treated according to the principles of laboratory animal care of the University Animal Welfare Committee. *Hnf6*, *Oc2*, *Foxp1* and *Brn4::Sip1* mutant mice have been previously described (Jacquemin et al., 1999; Higashi et al., 2002; Clotman et al., 2005; Roussio et al., 2008). Control or OC mutant embryos were obtained by crossbreeding *Hnf6*<sup>+/-</sup>*Oc2*<sup>+/-</sup> mice. To ensure accurate comparison, the developmental stage of e9.5 or e10.5 embryos was assessed by counting the number of pairs of somites. Embryos collected at various developmental stages were genotyped by PCR (primers available upon request).

#### ***Immunofluorescence labelings and in situ hybridization***

Whole mount antibody stainings were performed as described (Huettl et al., 2011) using anti-neurofilament antibody at 1/50 (DSHB #2H3). Z-stack images were generated using a LSM 510 confocal scanning microscope. For immunofluorescence labelings and *in situ* hybridization on sections, embryos were fixed in phosphate buffered-saline (PBS)/4% paraformaldehyde (PFA) before cryosections (12-20µm). Immunofluorescence labelings were performed as described (Francius and Clotman, 2010). Antibodies were rabbit anti Capsase3 at 1:1000 (Cell signalling #9661S), rabbit anti cHb9 at 1:4000 (kindly provided by T. Jessell), sheep anti Chx10 at 1:500 (Exalpha #X1190P), goat anti Foxp1 at 1:1000 (R&D #AF4534), chick anti GFP at 1:1000 (Aves Lab #GFP-1020), rabbit anti Hb9 at 1:5000 (Abcam #ab26128), rabbit anti Hnf6 at 1:50 (Santa Cruz #sc-13050), mouse anti Isl1 1:1000 (DSHB #39.3F7), rabbit anti Isl1 at 1:2000 (Abcam #ab26122-100), mouse anti Isl1/2 at 1:6000 (DSHB #39.4D5), mouse anti Lhx3 (DSHB #67.4E12), mouse anti Lhx1/5 at 1:1000 (DSHB #4F2), mouse anti MNR2/Hb9 at 1:1000 (DSHB #81.5C10), rabbit anti nNOS at 1:4000 (Immunostar #24287), rabbit anti pSMAD1/5/8 at 1:2000 (kindly provided by T. Jessell), rat anti Oc2 at 1:400 (Clotman et al., 2005), guinea-pig anti Oc3 at 1:6000 (Pierreux et al., 2004), guinea-pig anti Olig2 at 1:4000 (Novitch et al., 2001), rabbit anti Raldh2 at 1:10 000 (kindly provided by Mc Caffery) and rabbit anti Sip1 at 1:500 (Van de Putte et al., 2003). *In situ* hybridizations were performed as described (Ravassard et al., 1997) using digoxigenin-labeled probes against *EphB1* or *EphA4* (kindly provided by C. Pierreux).

Immunofluorescence and *in situ* hybridization images were acquired on a Zeiss Axio Observer.Z1 confocal microscope.

### ***Neuron number quantification***

Cell counts were performed unilaterally on three sections at three levels of brachial, thoracic or lumbar regions in embryonic ventral spinal cord (three levels along the rostrocaudal axis for embryos at e9.5). Neurons were counted in at least three independent embryos to summarize the number of neurons per section. Raw data of quantifications were exported to SigmaPlot v11 software for statistical analysis.

### ***Isl1 level quantification***

Nuclear Isl1 levels were determined at sub-saturating antibody concentrations and analyses were performed on three sections (>90 nuclei) of three independent e10.5 wild-type embryos. Mean nuclear pixel intensity was determined using ImageJ.

### ***In Ovo electroporation***

In ovo electroporation was performed at stage HH12-14. The *pCMV-Hnf6-flag* or the *pCMV-Oc2-myc* (0.5µg/µl) (Pierreux et al., 2004) was co-electroporated with a *pCMV-eGFP* plasmid to visualize electroporated cells. Six hours (HH16-18), 24 hours (HH22-23) or 4 days (HH28-29) after electroporation, embryos were fixed in PBS/4%PFA for 20min, 30min or 1h, respectively.

### ***Retrograde labeling of spinal MN***

Retrograde labelings of MN were performed using 3,000 molecular mass rhodamine-dextran (Invitrogen #D3308). Rhodamine-dextran was injected at e12.5 into the dorsal part of the limbs or into the paravertebral ganglionic chain of 600µm-thick vibratome slices of e12.5 embryos. Tissues were maintained in oxygenated DMEM/F12 medium (Invitrogen #11039) for 6 hr at room temperature. The embryos or the slices were then processed for immunofluorescence analyses. Amount of PGC neurons labeled by rhodamine-dextran was estimated as the area ratio occupied by retrograde labeling in a half spinal cord.

***Chromatin immunoprecipitation assay***

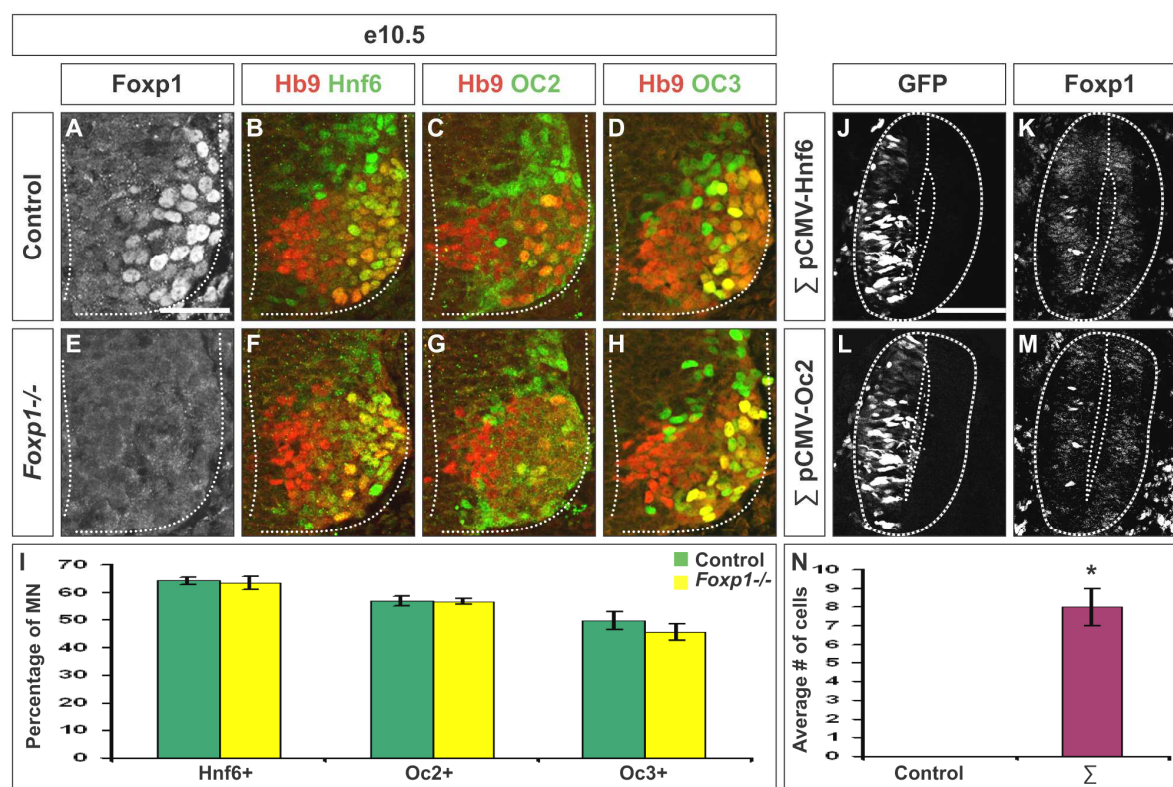
Neural tubes were dissected from HH17-18 chick embryos. Cells were homogenized in DMEM/F12 (Invitrogen) using a Dounce homogenizer and treated with 1% formaldehyde at room temperature for 10 minutes. Immunoprecipitation was performed using the Chromatin immunoprecipitation kit from Millipore (#17-371) according to manufacturer's instructions. Chromatin was fragmented to 200-1000bp by sonication (high power, 30 cycles of 30sec with 1min between pulses) and incubated overnight at 4°C with antibody against HNF-6 (Santa Cruz #sc-13050) at 1/50 or species-matched IgG. Primers are available upon request. Fold enrichment were calculated over IgG using  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ , where  $\Delta\Delta CT = (Ct_{ip} - Ct_{Input}) - (Ct_{IgG} - Ct_{Input})$ .

---

**Figure S1. MN generation and survival are not perturbed in the absence of OC factors.**

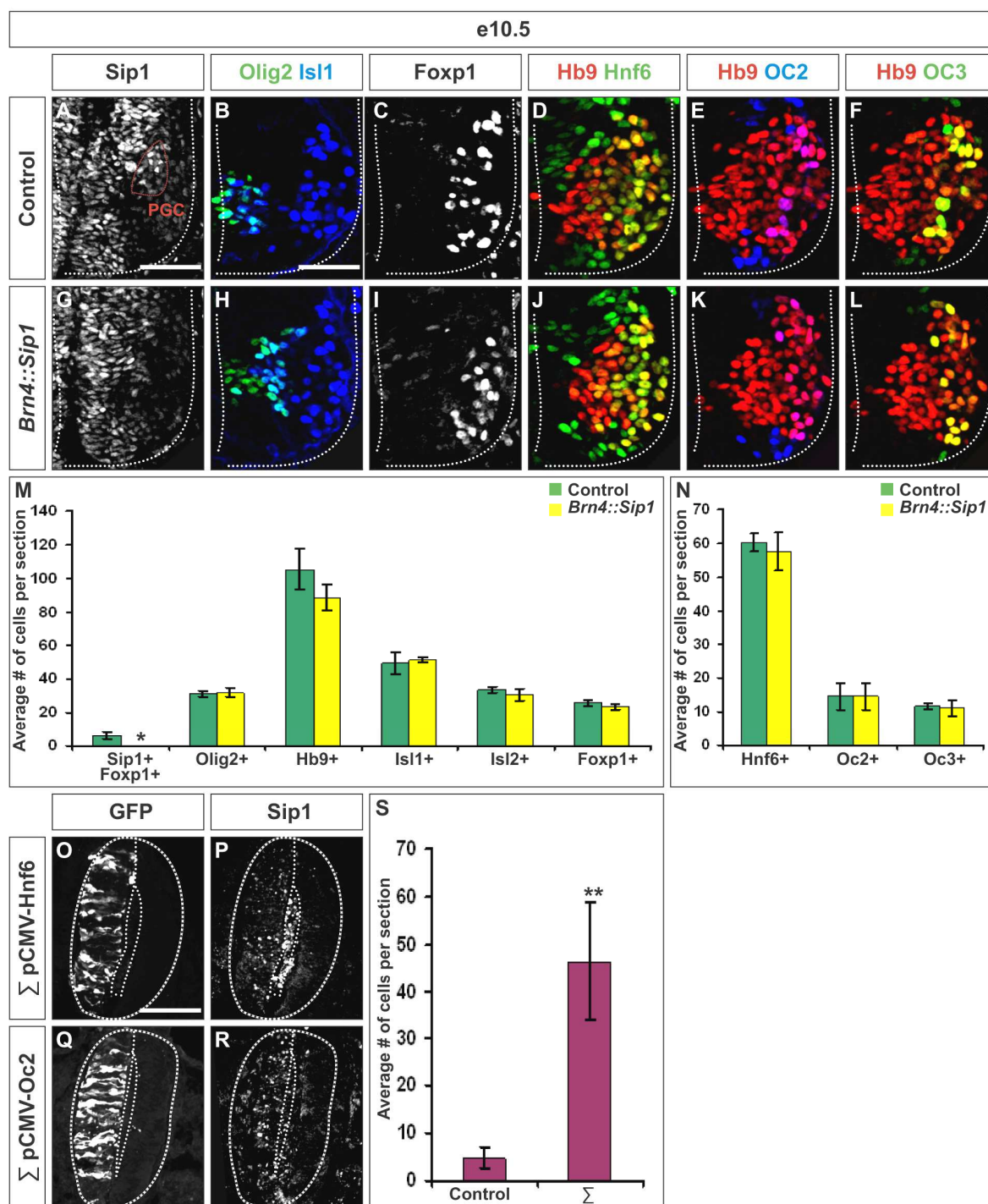
(A-I) Co-labeling for OC factors, Olig2 and Isl1 in control spinal cord at e9.5 indicates that the production of HNF-6 starts in the "intermediate" MN population wherein Olig2 and the earliest MN markers Isl1 and Hb9 are coexpressed. In contrast, OC-2 and OC-3 production starts in newly-born MN. (J-M) OC-3 is present in the spinal cord of *Hnf6*<sup>-/-</sup> or *Oc2*<sup>-/-</sup> single mutant embryos but is absent in *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> null embryos. (N-Q) Labelings of Isl2 or Lhx3 indicates that the loss of OC factors does not alter MN production at e10.5. (R-S) Colabeling of MN marker MNR2/Hb9 and activated-Caspase3 in the ventral spinal cord indicates that the loss of Isl1 in *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> embryos at e10.5 does not result from increased apoptosis. (T) Quantification of the MN markers Lhx3 and Isl2 and of apoptosis in e10.5 control or *Hnf6/Oc2* null spinal cord. (U-W) Alignment of chick and murine sequences of the 3 enhancer regions, named CREST 1 to 3, described for the *Isl1* gene (Uemura et al., 2005). Putative OC binding sites are delineated in red. The primer sequences used for the ChIP assay are underlined by green arrows. A single potential OC binding site is present in CREST1 and two sites are detected in CREST2. No putative OC binding site is present in CREST3. Scale bars= 55µm (A-I) or 80µm (J-S).





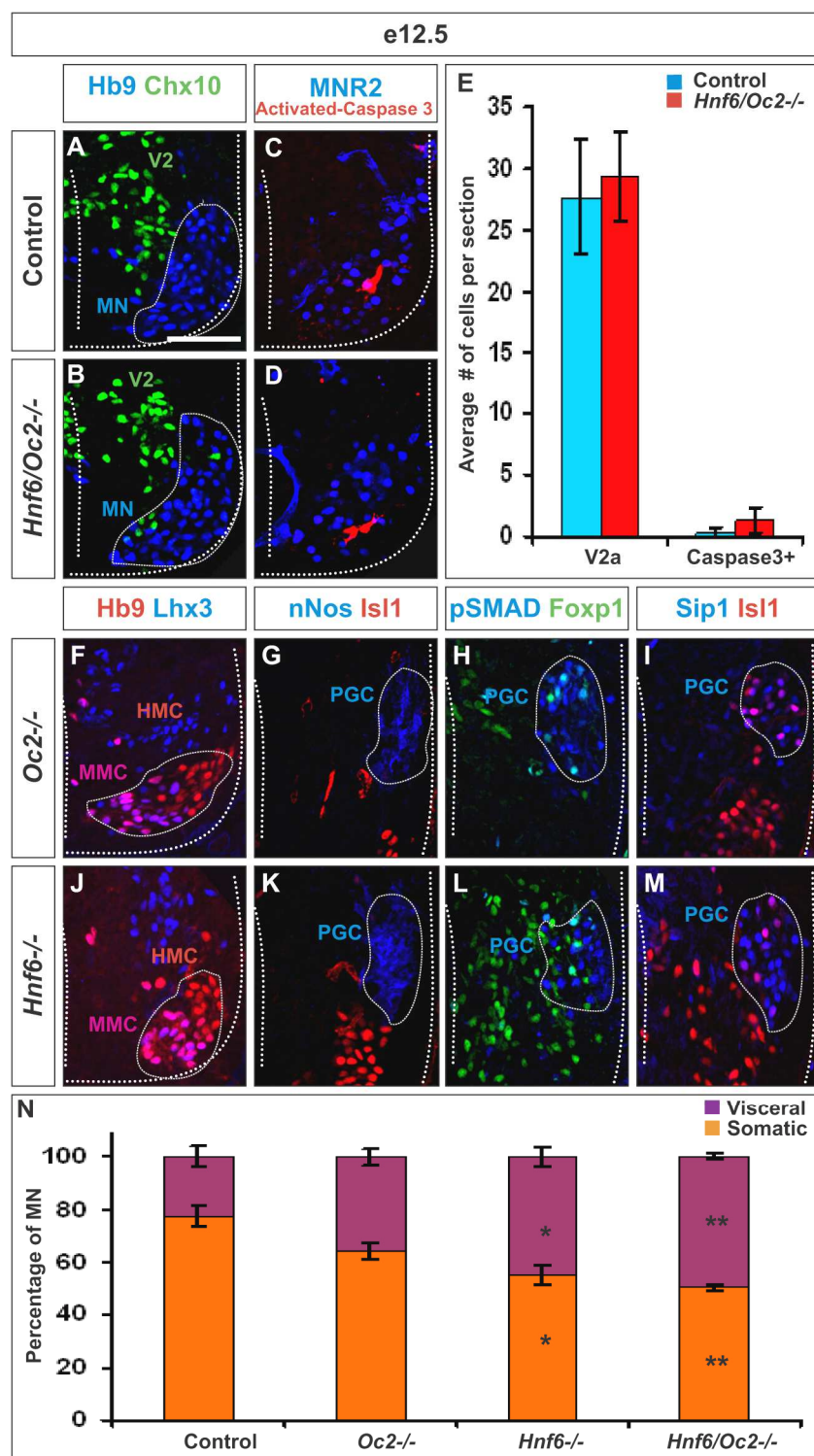
**Figure S2. OC factors act upstream of Foxp1.**

(A-H) Colabelings for OC factors and Hb9 in *Foxp1* mutant embryos at e10.5 show that *Oc* expression in MN is normal in the absence of *Foxp1*. (I) Quantification of the percentage of OC positive MN at e10.5 indicates that the amount of MN containing OC factors is not modified in the absence of *Foxp1*. (J-M) Overexpression of *Hnf6* or *Oc2* in chick embryonic spinal cord at HH14 results in induction of *Foxp1* expression 24 hours after electroporation. (N) Quantification of *Foxp1*<sup>+</sup> cells on the control or electroporated side of chick spinal cord 24 hours after *Oc* factors misexpression. Scale bars=80μm (A-H) or 250μm (J-M).

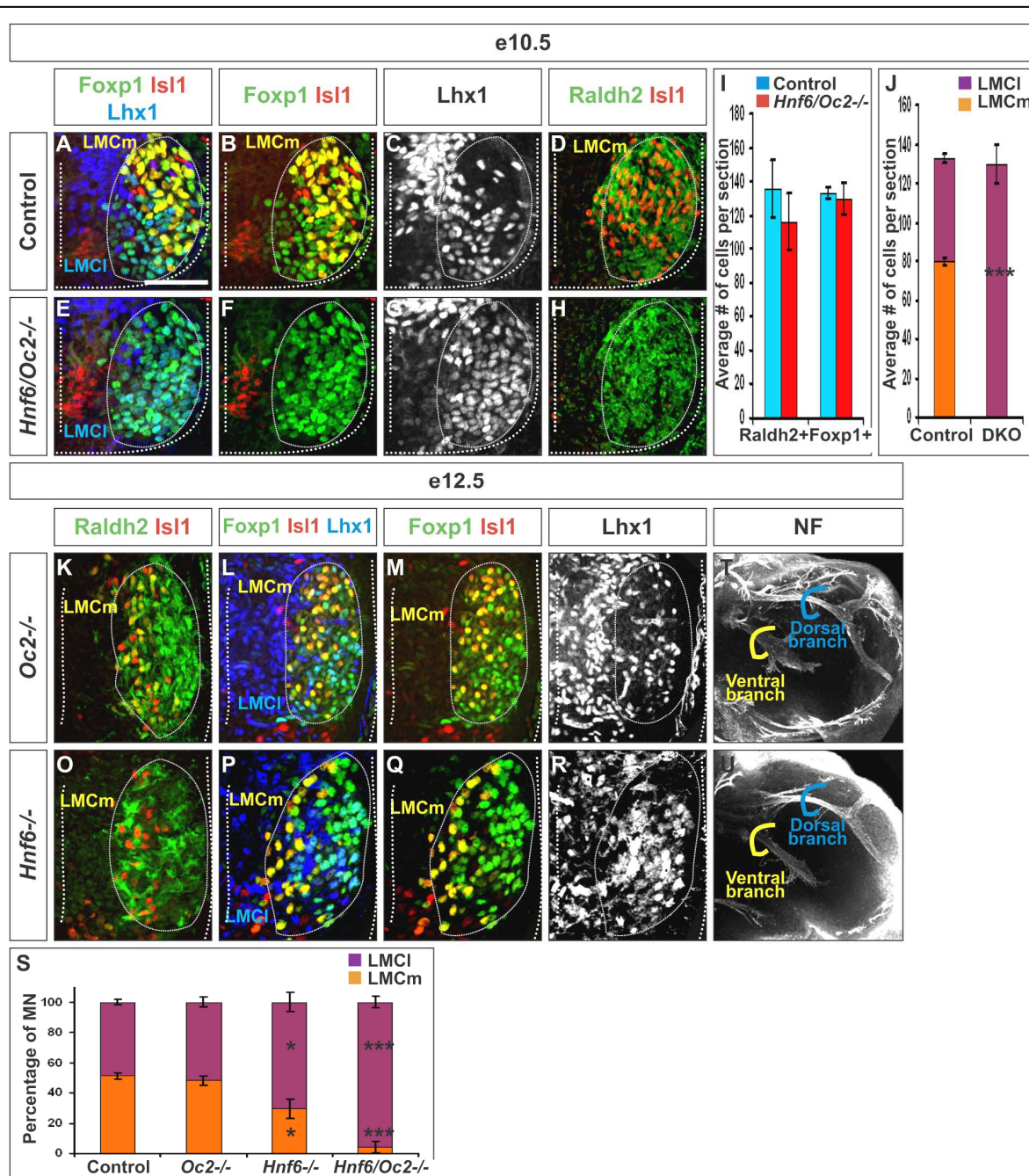


**Figure S3. OC factors act upstream of Sip1, which is dispensable for MN differentiation at e10.5.**

(A-L) Labeling for Sip1 indicates that Sip1 is not altered in spinal progenitors but is absent from prospective visceral MN from e10.5 onward. Labeling for OC factors and MN markers demonstrate that MN differentiation and OC distribution in MN is normal in *Brn4::Sip1* conditional mutant embryos at e10.5. (M) Quantification of Olig2+ progenitors and MN markers in control or *Brn4::Sip1* mutant spinal cord at e10.5 indicates that MN differentiation is unaffected by the absence of Sip1. (N) Quantification of OC+ cells shows that the number of MN containing OC factors is not modified in the absence of Sip1. (O-R) Overexpression of *Hnf6* or *Oc2* in chick embryonic spinal cord at HH14 results in the induction of Sip1 expression 6 hours after electroporation. (N) Quantification of Sip1+ cells on the control or electroporated side of chick spinal cord 24 hours after OC factors misexpression. PGC: preganglionic column. Scale bars= 100μm (A, G), 70μm (B-F, H-L) or 150μm (O-R).



**Figure S4. Modification of the ratio between somatic and visceral MN in the absence of OC factors.** (A-D) Colabeling for the MN marker MNR2/Hb9 and the V2 interneuron marker Chx10 or the apoptosis marker activated-Caspase3 in the ventral spinal cord at e12.5 indicates that the loss of somatic MN in *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* embryos neither result from fate conversion into V2 interneurons nor from increased apoptosis. (E) Quantification of Chx10+ or activated-Caspase3+ cells in control or *Hnf6/Oc2* null embryos. (F-N) Distribution of MN columnar subtype markers at thoracic levels of the spinal cord in *Hnf6* or *Oc2* single mutant embryos at e12.5 shows production of supernumerary visceral MN at the expense of somatic MN in *Hnf6<sup>-/-</sup>* embryos (\* =  $p < 0.05$  and \*\* =  $p < 0.01$ ). No significant difference was detected in *Oc2<sup>-/-</sup>* spinal cord. PGC: preganglionic column; MMC: median motor column; HMC: hypaxial motor column, V2= V2 interneurons. Scale bar= 100 $\mu$ m.



**Figure S5. OC factors control the identity of brachial LMCm neurons.**

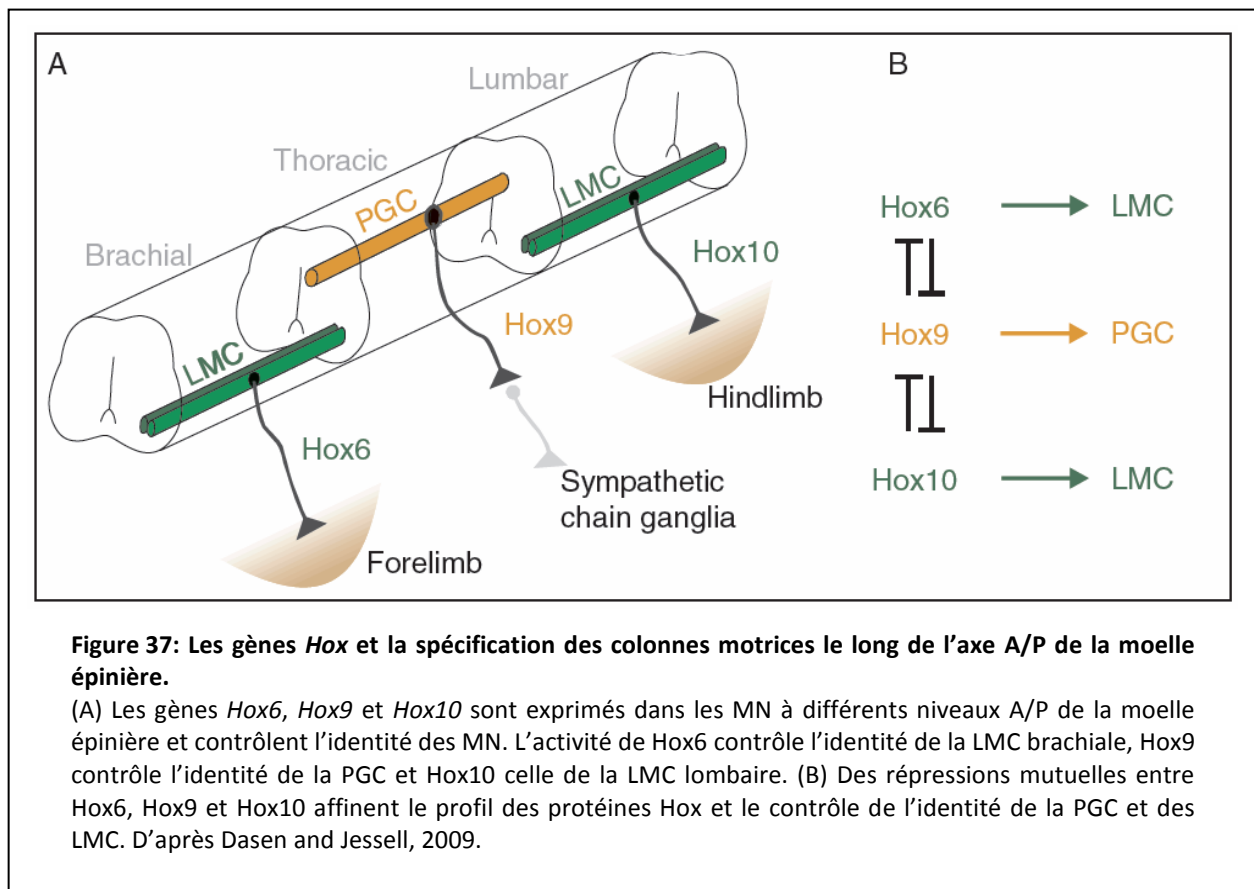
(A-H) Distribution of LMC columnar subtype markers in control or *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* embryos at e10.5 shows a significant increase in LMCI neurons at the expense of LMCm neurons. (I-J) Quantitative analysis of LMC markers at brachial levels of the spinal cord at e10.5 indicates that LMC neurons are properly produced in the absence of OC factors but that all the LMC cells display the molecular identity of LMCI neurons (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ). (K-S) Distribution and quantification of columnar LMC markers at e12.5 in *Hnf6* or *Oc2* single mutant embryos shows a significant increase in the generation of LMCI neurons at the expense of LMCm neurons in *Hnf6<sup>-/-</sup>* embryos. No significant difference was detected in *Oc2<sup>-/-</sup>* embryos (\* =  $p < 0.05$  and \*\*\* =  $p < 0.001$ ). (T-U) However, whole-mount neurofilament immunofluorescence labeling shows that the motor nerve branch that innervates the ventral mesenchyme of the limb is present in both mutants. LMCm: medial portion of the lateral motor column, LMCI: lateral portion of the lateral motor column. Scale bar= 100 $\mu$ m.

## Acknowledgements

The authors are indebted to people of the NEDI laboratory for technical support, material and discussions, to F. Lemaigre and P. Jacquemin from the LPAD laboratory of the de Duve Institute (UCL) for *Oc* knockout mice, reagents and support, to C. Desmet for advices on chromatin immunoprecipitation, to T. Jessell and P. Mc Caffery for antibodies, to C. Pierreux and A. Kania for plasmid constructions and *in situ* hybridization probes. The mouse monoclonal antibodies anti Isl1/2 (#39.4D5), anti Lhx1/5 (#4F2), anti Isl1 (#39.3F7), anti Lhx3 (#67.4E12), anti MNR2/Hb9 (#81.5C10) developed by T. Jessell and S. Brenner-Morton and anti-NF (#2H3) developed by T. Jessell and J. Dodd were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. This work was supported by grants from the Fonds Spéciaux de Recherche of the UCL and of the F.R.S.-FNRS to F.C., from the Research Council of KULeuven (OT-09/053 and GOA-11/012), FWO-V (G.0954.11N to D.H. and E.S.), the Queen Elisabeth Medical Foundation (GSKE 1113), and the type 3 large-infrastructure support InfraMouse by the Hercules Foundation to D.H., and from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, to A.B.H.). A.R. holds a specialization grant from the F.R.I.A. (Belgium). F.C. is a Research Associate of the F.R.S.-FNRS.

#### **4. RESULTATS SUPPLEMENTAIRES:**

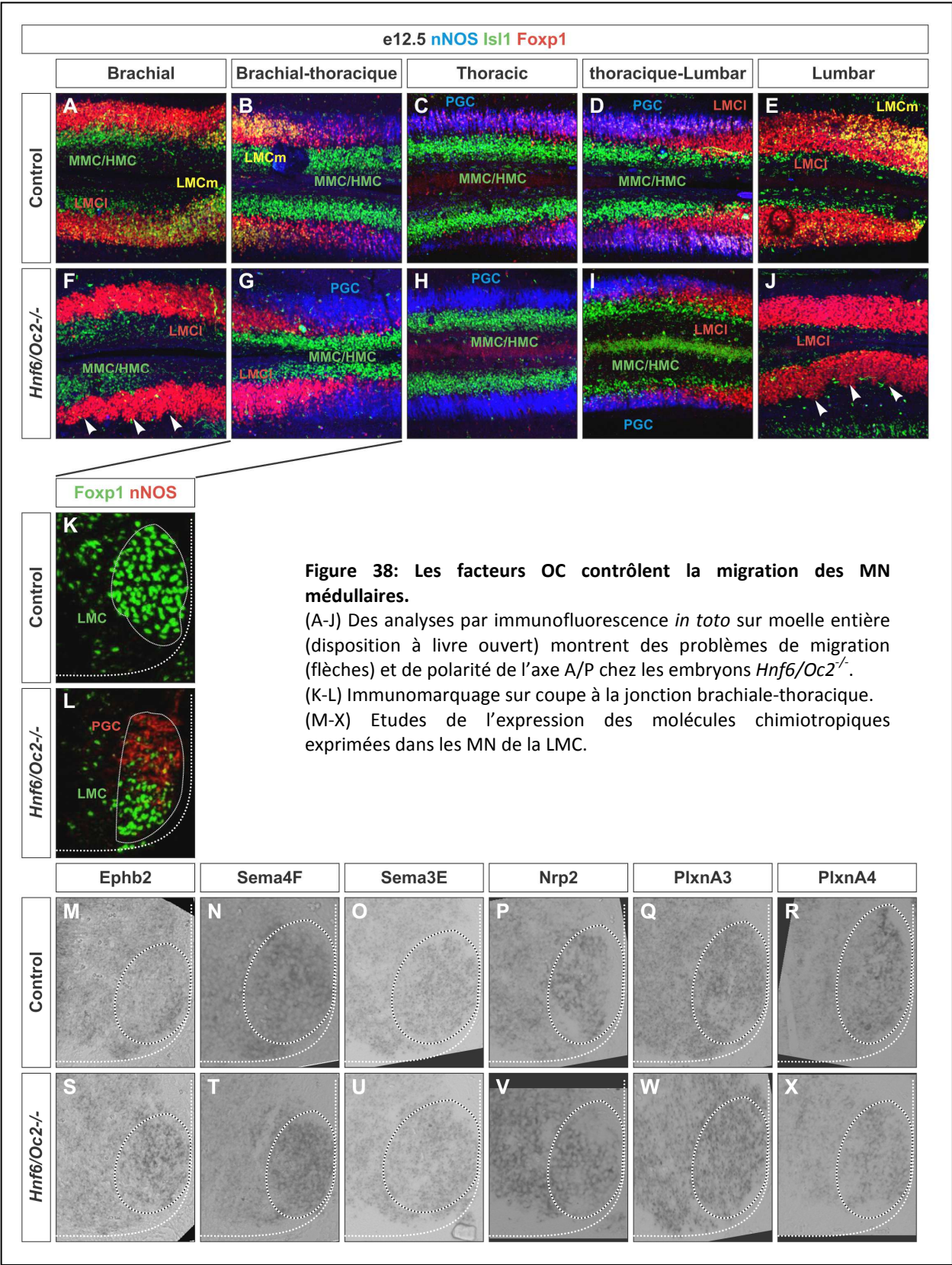
**Les facteurs OC contrôlent la migration des MN médullaires**



**RAPPEL: Polarité A/P de la moelle épinière et migration des MN médullaires**

La polarité A/P de la moelle épinière est due à l'expression des gènes *Hox*. *Hox6* et *Hox10* sont présents dans la région des membres (respectivement en région brachiale et en région lombaire), tandis que *Hox9* délimite la région thoracique (Figure 37) (Dasen and Jessell, 2009). Les MN somatiques de la LMC sont présents uniquement dans la région brachiale ou lombaire de la moelle épinière. La restriction de cette colonne dans la région des membres se fait grâce à l'expression de *Hox6* et de *Hox10* dans les MN post-mitotiques de la LMC. *Hox6* et *Hox10* induisent une expression forte *Foxp1* qui est nécessaire pour la différenciation de la LMC. Dans la région thoracique, *Hox9* induit une expression modérée de *Foxp1* dans les MN viscéraux afin de produire la PGC. Les colonnes HMC et MMC n'expriment pas de gènes *Hox* et, par conséquent, sont présentes tout le long de la moelle épinière. Des répressions mutuelles entre les protéines *Hox* renforcent la régionalisation A/P du tube neural.

La glycoprotéine Reeline est impliquée dans l'arrêt de la migration de la PGC et le contrôle de la position relative des deux divisions de la LMC. Cependant, la migration des MN dans la moelle épinière ventrale est un mécanisme encore mal compris. En effet, bien que les MN migrent selon l'axe médio-latéral de la moelle épinière grâce à la glie radiaire, d'autres mécanismes doivent être impliqués dans la migration des MN pour expliquer la position stéréotypée des colonnes motrices. Notamment, des molécules chimiotropiques (Sémaphorines, Nétrines, protéines Slits, Ephrines) ont été détectées dans la moelle épinière ventrale et pourraient contrôler la migration des MN médullaires.



#### 4.1. Résultats

En absence des facteurs OC, nos analyses par immunofluorescence *in toto* sur moelle entière (disposition à livre ouvert) montrent que la LMC adopte une conformation en « zigzag » anormale au stade embryonnaire e12,5 (Figure 38F,J). Cette forme particulière pourrait être due à un problème de migration des cellules de la LMC. Pour tester cette hypothèse, nous avons d'abord effectué des immunomarquages sur coupes afin de vérifier l'expression de *Reelin* dans la moelle ventrale d'embryons *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>*. Cette analyse n'a rien démontré d'anormal: la Reeline est toujours présente dans la moelle épinière ventrale et entoure le domaine des MN (résultats non présentés).

Parmi les nombreuses molécules chimiotropes qui ont été décrites comme participant à la migration cellulaire dans le SNC, nous avons sélectionné, après analyse *in situ* sur coupes d'embryons contrôles, une partie de celles exprimées dans les MN de la LMC. Huit candidats potentiels ont été retenus : EphA4, EphB1, EphB2, Sema4F, Sema3E, Nrp2, PlxnA3 et PlxnA4. Par la suite, nous avons vérifié l'expression de ces différents candidats par analyse *in situ* sur coupes d'embryons *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>*. L'expression d'*EphA4* et d'*EphB1* joue un rôle primordial dans le contrôle de l'innervation des membres et est modifiée dans la LMC en absence des facteurs OC, suite au changement d'identité des neurones de LMCm observé chez ces embryons (voir p.79). De la même manière, *EphB2* est exprimée plus fortement dans les cellules de la LMCI, tandis que l'expression de *PlxnA4* est fortement détectée dans la LMCm. Les modifications observées dans l'expression de ces molécules chimiotropiques pourraient résulter du changement d'identité au sein de la LMC (Figure 38S,X). En absence des facteurs OC, l'expression dans la LMC des autres candidats potentiels (Sema4F, Sema3E, Nrp2 et PlxnA3) est toujours détectée et le niveau d'expression ne semble pas altéré (Figure 38T-W). Ainsi, aucune modification significative dans l'expression de ces facteurs ne permet d'expliquer la conformation particulière de la LMC en absence des OC.

Les analyses *in toto* sur moelle entière démontrent également que les facteurs OC sont importants pour la restriction des colonnes dans les différentes régions de l'axe A/P de la moelle épinière. En effet, en absence des facteurs OC, la LMC s'étend anormalement dans la région thoracique et on observe la coexistence, à un même niveau, de la LMC et de la PGC (Figure 38G,I). Cette dernière information a, par ailleurs, été confirmée par coupes transversales (Figure 38L). La polarité A/P de la moelle épinière étant déterminée par

l'expression des gènes *Hox*, nous avons vérifié, par immunofluorescence sur coupes transversales, la présence de *Hox6*, *Hox9* et *Hox10* dans les MN médullaires. En absence des facteurs OC, *Hox6* est toujours détectée dans les neurones de la LMC brachiale, *Hox9* dans les neurones de la PGC et *Hox10* dans ceux de la LMC lombaire (résultats non présentés). Cependant, la présence de neurones de la LMC dans la région thoracique pourrait résulter de l'extension du patron d'expression de *Hox6* et de *Hox10* dans cette région. Pour vérifier cette hypothèse, des analyses par immunofluorescence *in toto* sur moelle entière (disposition à livre ouvert) avec des anticorps dirigés contre *Hox6*, *Hox9* et *Hox10* est nécessaire. Cependant, cette expérience n'a pu être réalisée suite à l'incompatibilité des anticorps avec notre protocole d'immunofluorescence *in toto*.

## 4.2. Discussion et perspectives

La migration cellulaire au sein de la moelle épinière ventrale est un processus encore mal compris. Des études récentes ont démontré que la Reeline jouait un rôle important dans le contrôle de la migration des MN médullaires en modifiant le cytosquelette de ces cellules (Palmesino et al., 2010). Notamment, la répression mutuelle entre *Lhx1* et *Isl1* au sein des deux divisions de la LMC détermine la position relative de la LMCm ou de la LMCI grâce à la voie de signalisation de la Reeline (voir p.37). Le facteur *Lhx1*, en induisant un niveau fort d'expression de *Dab1*, positionne les cellules de la LMCI. Dans les embryons mutants conditionnels pour *Lhx1*, de nombreux neurones de la LMCI sont situés dans une position médiane anormale. Au contraire, la surexpression d'*Isl1* dans la moelle d'embryons de poulet réduit significativement l'expression de *Dab1*. De manière étonnante, malgré l'absence d'*Isl1* et l'expansion de *Lhx1* dans la LMC des embryons mutants *Hnf6/Oc2*, les MN de la LMC sont positionnés normalement (voir p. 79). Cette observation suggère que les protéines OC pourraient coopérer avec la voie de signalisation de la Reeline pour contrôler la migration des neurones de la moelle épinière. Cependant, la Reeline est présente dans la moelle épinière ventrale chez les embryons *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup>, démontrant que l'expression de son gène n'est pas sous le contrôle des protéines OC. Ces dernières pourraient cependant contrôler les autres composantes de la voie de signalisation de la Reeline, notamment *Dab1*.

Les facteurs OC ont été impliqués dans la migration des hépatoblastes au cours du développement du foie. Nos données suggèrent que les facteurs OC interviennent

également dans la migration neuronale. Cependant, aucun mécanisme impliquant les facteurs OC dans la migration des MN au sein de la moelle épinière ventrale n'a été découvert. Afin d'identifier les cibles potentielles directes ou indirectes des facteurs OC dans le contrôle de la migration des cellules ventrales, un criblage par PCR quantitative ou micro-arrays sur des moelles d'embryons *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>* pourrait être judicieux. Des analyses par RT-qPCR et *in situ* permettraient de vérifier les résultats obtenus par criblage génétique et de poursuivre l'étude des mécanismes contrôlant la migration des populations ventrales de la moelle épinière.



## **5. DISCUSSION GENERALE**

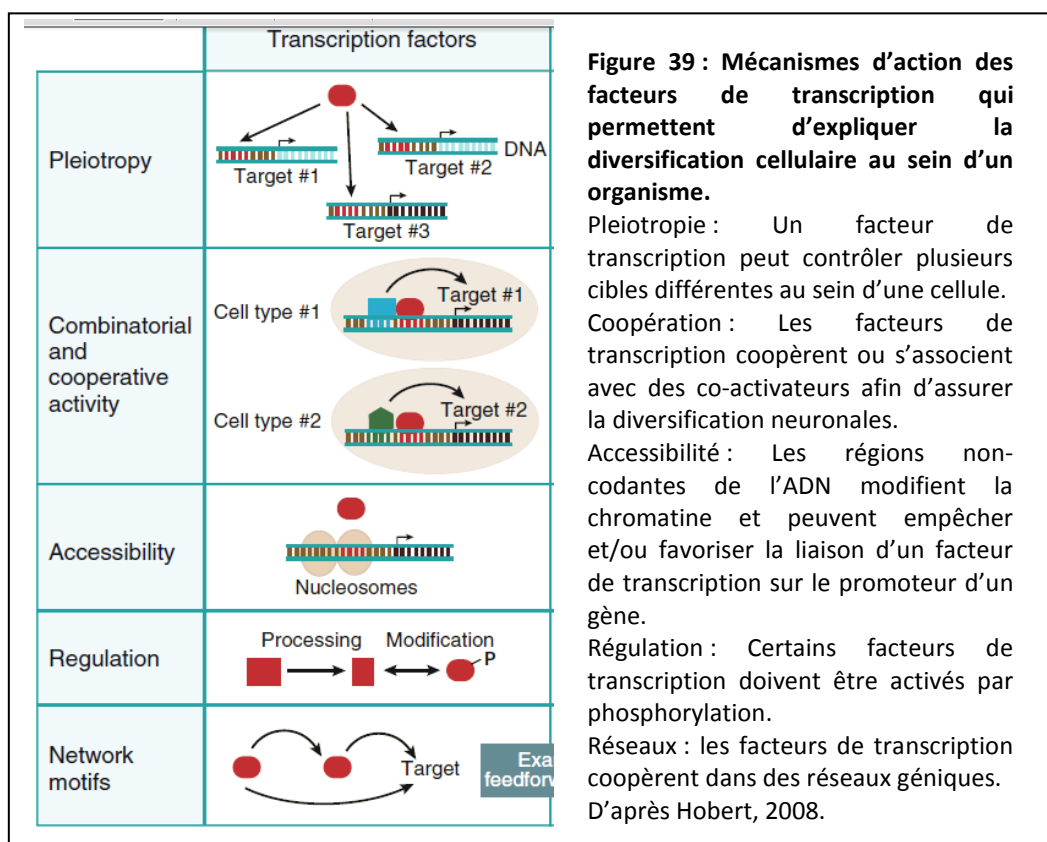
### **5.1. Les facteurs OC et la diversification neuronale**

La comparaison du génome de plusieurs organismes révèle une surprise au niveau du contenu génétique : les cellules des vertébrés contiennent seulement deux fois plus de gènes que celles des invertébrés, et cette augmentation résulte surtout de la duplication des gènes existants plutôt que de l'apparition de nouveaux gènes (Levine and Tjian, 2003; Tam and Lim, 2008). Si le nombre de gènes n'a pas été modifié de manière significative au cours de l'évolution, quels mécanismes sont responsables de l'incroyable diversité cellulaire observée chez les vertébrés ?

Ces dernières années, de nombreuses publications suggèrent que cette diversification cellulaire résulte d'une régulation de plus en plus complexe de l'expression des gènes (Fry and Farnham, 1999; Alvarez et al., 2003; Hobert, 2008; Tam and Lim, 2008). En effet, l'identité cellulaire est déterminée par les protéines présentes dans le cytoplasme et le noyau, et donc par le patron d'activité des gènes. Les cellules eucaryotes contiennent environ 25 000 gènes (Levine and Tjian, 2003; Tam and Lim, 2008). Certains sont exprimés en permanence dans toutes les cellules et sont responsables des fonctions métaboliques comme la respiration cellulaire (gènes constitutifs) ; d'autres sont exprimés lorsque la cellule entre en différenciation ou lorsqu'elle a atteint un niveau de différenciation particulier (le gène *Isl1* dans les MN post-mitotiques ou celui codant pour la kératine dans les cellules de l'épiderme par exemple) ; et, enfin, certains gènes sont exprimés lorsque l'environnement cellulaire extracellulaire se modifie (Levine and Tjian, 2003). L'expression d'un gène peut être contrôlée par différents mécanismes. Dans un premier temps, l'activation transcriptionnelle résulte de la liaison de facteurs de transcription sur le promoteur ou sur les éléments cis-régulateurs d'un gène (enhancers). Ensuite, l'épissage alternatif est un processus post-transcriptionnel permettant la production de plusieurs protéines isoformes à partir d'un gène unique. Ce phénomène initialement décrit pour un nombre restreint de gènes semble commun à l'ensemble du génome. Aujourd'hui, on estime qu'un gène donne naissance en moyenne à trois ARNm différents, ce qui résulte à la production de plus de 75 000 protéines à partir des 25 000 gènes. Enfin, une bonne partie de l'ADN n'est pas codante et exerce des fonctions encore mal décrites. Cet ADN non-codant pourrait jouer un rôle

crucial dans la régulation de l'expression des gènes en modifiant l'état de la chromatine (de Laat and Grosveld, 2003; Levine and Tjian, 2003; Tam and Lim, 2008; Ho and Crabtree, 2010). De plus, des ARN non-codant, les micro-ARN, inhibent l'expression d'un gène en se liant à son ARNm afin de provoquer sa dégradation et/ou réprimer sa traduction en protéine. Finalement, les mécanismes épigénétiques jouent un rôle important dans la stabilité des profils d'expression des gènes au cours du développement et de la différenciation cellulaire.

Nous nous concentrerons ici sur le premier mécanisme de régulation de l'expression d'un gène, la transcription. En effet, notre étude portant sur les rôles des régulateurs OC au cours du développement des MN médullaires montre que les protéines OC interviennent dans la diversification neuronale en contrôlant l'activité de certains gènes au sein de la moelle épinière ventrale. De plus, le mécanisme d'action des protéines OC au sein des MN médullaires permet d'illustrer comment une seule famille de facteurs de transcription est capable de générer une telle complexité cellulaire au sein des organismes supérieurs (Figure 39) (Fry and Farnham, 1999; Alvarez et al., 2003; Hobert, 2008; Tam and Lim, 2008).



### 5.1.1. Pléiotropie: Les facteurs OC contrôlent l'expression de plusieurs gènes cibles

« Afin d'assurer la différenciation cellulaire, un facteur de transcription peut contrôler l'expression de plusieurs gènes cibles au sein d'une même cellule »

Au cours de la différenciation des tissus dérivés de l'endoderme, les facteurs OC contrôlent la morphogenèse et la différenciation cellulaire en contrôlant l'expression de plusieurs gènes (voir p.53). Lors de la différenciation pancréatique, les protéines OC sont notamment importantes pour l'activation transcriptionnelle de *Pdx1* et de *Ngn3* (Jacquemin et al., 2000; Jacquemin et al., 2003a). Nos observations en gain et perte de fonction démontrent que les protéines OC contrôlent la diversification des MN dans toutes les régions A/P de la moelle épinière. L'importance de ces régulateurs transcriptionnels résulte, en partie, de l'interaction directe entre les protéines OC et les éléments *cis*-régulateurs situés en amont du gène *Is1*. La liaison des facteurs de transcription sur les régions « enhancers » provoquerait un changement de conformation de l'ADN afin de permettre l'interaction entre les protéines régulatrices et le promoteur, induisant ainsi la transcription. Dans les MN médullaires, le gène *Is1* est donc une cible directe de l'activité transcriptionnelle des facteurs OC. Cependant, la surexpression d'*Is1* dans la moelle d'embryons de poulet n'est pas suffisante pour induire un phénotype inverse à celui observé chez les embryons doubles mutants pour les facteurs OC. Ces données indiquent que, outre le gène *Is1*, les facteurs OC pourraient contrôler l'expression d'autres cibles afin de définir l'identité des sous-types de MN.

Nos données en perte de fonction montrent également que, en absence des facteurs OC, l'expression de *Foxp1* est perdue dans les MN viscéraux et l'activation de *Sip1* est retardée. A l'inverse, la surexpression des facteurs OC dans la moelle épinière d'embryons de poulet induit l'expression de ces deux facteurs de transcription. Cependant, les facteurs OC sont exprimés au tout début de la différenciation des MN, lorsque les cellules deviennent post-mitotiques (e9,5). L'expression de *Foxp1* et de *Sip1* apparaît plus tardivement dans les MN viscéraux, vers e10-e10,5. De plus, l'induction de *Foxp1* dans la moelle d'embryons de poulet est détectée seulement 24h après l'électroporation (3h pour l'induction d'*Is1* par les protéines OC). Ces données laissent supposer que, bien que les facteurs OC soient toujours présents dans les MN à e10.5, l'activation transcriptionnelle de *Foxp1* et de *Sip1* est

contrôlée de manière indirecte par les protéines OC. Les séquences *cis*-régulatrices responsables de l'expression de *Foxp1* et de *Sip1* dans les MN viscéraux sont inconnues et, par conséquent, la présence ou non de sites de liaisons potentiels des protéines OC dans ces régions n'a pu être vérifiée. Cependant, des études d'homologie chez différentes espèces permettraient peut-être d'identifier les séquences *cis*-régulatrices des gènes *Foxp1* et *Sip1*.

Dans le passé, les études génétiques se concentraient surtout, pour des raisons techniques et conceptuelles, sur des gènes constitutifs et/ou exprimés dans un seul type cellulaire. Cependant, depuis plusieurs années, les chercheurs se penchent sur des problèmes présentant une complexité croissante : l'utilisation d'organisme ayant plusieurs milliers de gènes et des centaines de types cellulaires, études de gènes exprimés dans plusieurs types cellulaires... La plupart des facteurs de transcription qui interviennent dans ces études sont pléiotropes. Dès lors, l'inactivation d'un facteur de transcription n'influence pas une seule cible ou un nombre limité de cibles mais a des effets sur l'expression d'un grand nombre de gènes qui sont sous le contrôle de ce régulateur transcriptionnel. A l'inverse des méthodes d'étude classique, l'utilisation d'analyse globale à « haut débit » (micro-arrays) permet d'identifier de façon détaillée l'ensemble des cibles directes et/ou indirectes de ces facteurs de transcription pléiotropes. La découverte de l'ensemble des cibles potentielles amène progressivement à une vision fine des mécanismes à la base de la fabuleuse diversité neuronale observée dans le SNC. Dans le cadre de notre étude, des analyses par micro-arrays sur moelle d'embryons contrôles et mutants *Hnf6/Oc2*<sup>-/-</sup> permettraient d'identifier d'autres cibles potentielles (directes et indirectes) des facteurs OC durant le développement de la moelle épinière. De la même manière, l'insertion de la lignée *HB9-GFP* dans la colonie *Hnf6/Oc2* permettrait d'isoler les MN médullaires par FACS et, après analyse micro-arrays, d'identifier les cibles potentielles des facteurs OC exclusivement dans les MN médullaires. Des expériences *in situ* et de RT-qPCR permettraient de valider les candidats potentiels identifiés.

Au cours de l'évolution, des mutations dans la séquence codante d'un gène pleiotrope auraient des effets importants sur tous les caractères qui sont sous le contrôle de ce gène. Il est donc peu probable que la sélection naturelle tolère beaucoup de

modifications de la sorte et la région codante pour des protéines pléiotropes est d'ailleurs extrêmement bien conservée au sein des différentes espèces (Carroll et al., 2008). Les répertoires de gènes sont donc très similaires entre des organismes morphologiquement très différents. A l'inverse, l'évolution des différences entre espèces a été favorisée par le fait que la plupart des gènes eucaryotes ont des séquences cis-régulatrices distinctes. Chacune de ces séquences régule l'expression de son gène dans différentes parties et à des moments différents du cycle de vie de l'organisme. Des preuves directes ont montré que les mutations dans les séquences cis-régulatrices permettent de changer sélectivement des caractères importants d'un organisme sans que les gènes eux-mêmes ou les protéines correspondantes soient concernées (Levine and Tjian, 2003; Hobert, 2008). Dès lors, des mutations dans les séquences cis-régulatrices ont permis au cours de l'évolution de modifier spécifiquement l'expression du gène correspondant dans un organe, un tissu ou un type cellulaire particulier, tout en évitant les effets pléiotropes qu'auraient pu avoir des mutations dans les séquences des gènes eux-mêmes (Carroll et al., 2008).

### **5.1.2. L'activité transcriptionnelle des facteurs OC est contexte-dépendante**

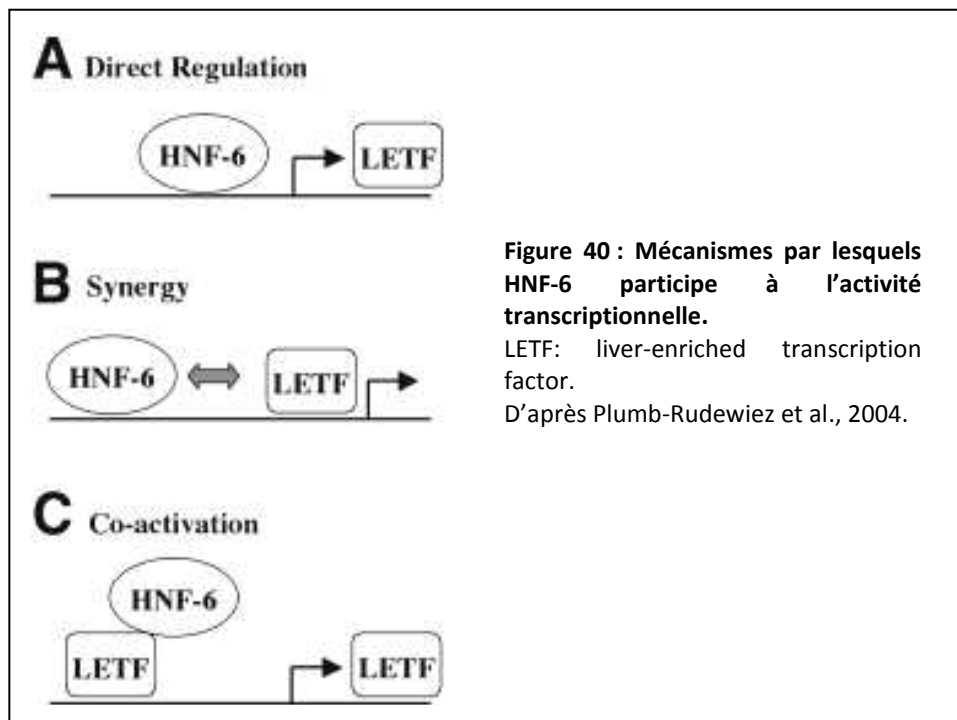
*« La coopération entre des régulateurs transcriptionnels et/ou des co-activateurs augmente la complexité des mécanismes de régulation des gènes »*

Des travaux précédents sur HNF-6 ont démontré qu'il contrôle la transcription de gènes cibles de trois manières différentes (Figure 40) (Plumb-Rudewiez et al., 2004) :

(A) HNF-6 peut se lier et stimuler directement le promoteur d'un gène cible. L'activation de l'expression de *Hnf1b* dans les hépatoblastes résulte ainsi de la liaison directe des protéines OC sur le promoteur (Clotman et al., 2002).

(B) La synergie transcriptionnelle permet la coopération de HNF-6 avec un autre facteur de transcription déjà présent sur le promoteur afin d'activer la polymérase sur le gène cible. Par exemple, la liaison de HNF-6 et de HNF-1 $\alpha$  est nécessaire pour l'activation du gène codant pour HNF4- $\alpha$  (Hatzis and Talianidis, 2002). Sur le promoteur de la glucose-6-phosphatase, HNF-6 interagit avec HNF-4 et recrute le co-facteur PGC-1 $\alpha$  (Beaudry et al., 2006).

(C) HNF-6 peut ne pas se lier directement avec l'ADN mais interagir avec un facteur de transcription déjà présent sur le promoteur et recruter un co-facteur afin de stimuler l'activité transcriptionnelle du gène cible. Les co-activateurs de HNF-6 interagissent avec le motif LSDLL du domaine CUT et peuvent moduler la fixation de la protéine sur les sites de liaison potentiels. Deux co-facteurs pour les protéines OC ont été identifiés : p300/CAF et CBP (Lannoy et al., 1998). Par exemple, HNF-6 interagit avec le facteur de transcription FoxA2, lui-même lié au gène *Foxa2*, afin de recruter les co-activateurs p300/CBP (Rausa et al., 2003).



Dans la moelle épinière ventrale, en absence des facteurs OC, l'expression d'*Isl1* est perdue dans les MN viscéraux et dans la LMC, mais est maintenue dans les neurones somatiques de la MMC/HMC. De plus, l'absence des facteurs OC résulte en une perte de *Foxp1* dans les MN viscéraux mais pas dans les cellules de la LMC. De la même manière, *Isl1* est exprimé au cours du développement dans les cellules endocrines du pancréas. Cependant, son expression n'est pas perturbée chez les embryons mutants OC, indiquant que les facteurs OC ne contrôlent pas l'expression de ce gène dans les cellules pancréatiques (Jacquemin et al., 2000). L'activité transcriptionnelle des protéines OC est donc contexte-dépendante au cours du développement. Ces données suggèrent que des co-facteurs spécifiques modulent soit la liaison des facteurs OC sur les gènes cibles, soit l'activité

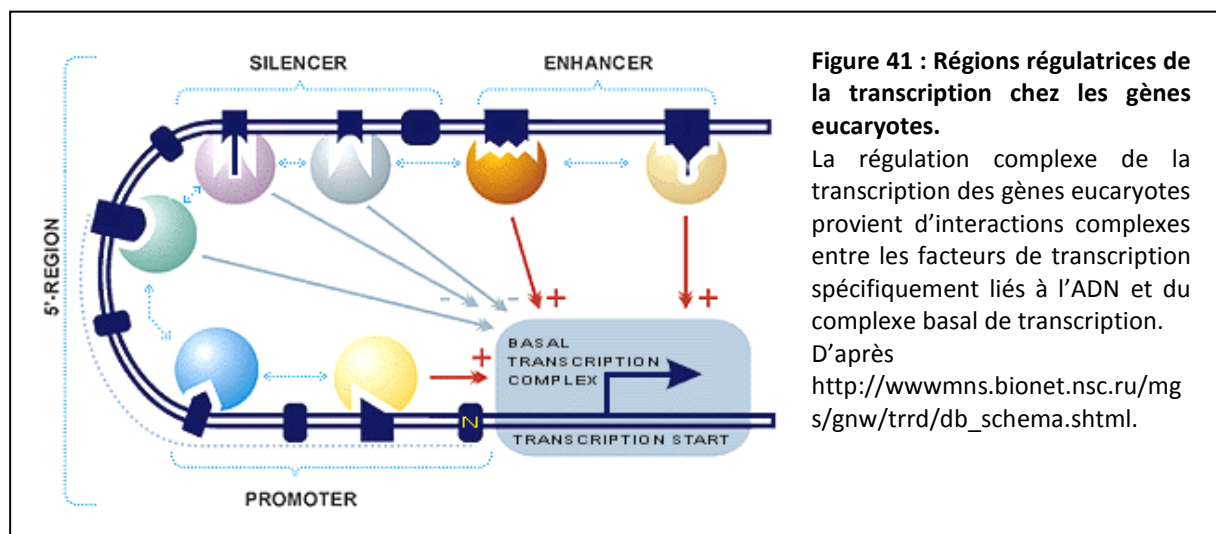
transcriptionnelle des facteurs OC. Les facteurs OC sont capables de se lier sur l'enhancer CREST2 du gène *Isl1* mais pas sur CREST1, qui pourtant contient également un site de liaison potentiel. Ces données d'immunoprécipitation supportent l'hypothèse que des cofacteurs, présents dans les neurones de la LMC et de la PGC, assurent la liaison des protéines OC sur CREST2 afin d'activer l'expression d'*Isl1* dans ces cellules. Les co-activateurs p300/CAF et CBP sont présents dans la moelle épinière ventrale (Lee et al., 2009). La compréhension de leur rôle et l'identification des co-facteurs des protéines OC dans les MN médullaires permettront une meilleure analyse des mécanismes transcriptionnels régulant la diversification neuronale.

Chez un organisme supérieur, il existe moins de facteurs de transcription que de types cellulaires. Dès lors, la diversification cellulaire repose sur la liaison d'une combinaison de facteurs de transcription sur les séquences cis-régulatrices d'un gène à un moment donné (Mannervik et al., 1999; de Laat and Grosveld, 2003; Levine and Tjian, 2003). Un gène est typiquement régulé par son promoteur adjacent mais également par plusieurs régions cis-régulatrices (Figure 41). Ces séquences régulatrices contiennent, en moyenne, dix sites de liaisons pour des facteurs de transcription. De multiples régulateurs transcriptionnels peuvent donc s'accumuler sur les séquences cis-régulatrices.

Les facteurs de transcription possèdent, en plus de leur domaine de liaison à l'ADN, plusieurs autres domaines fonctionnels importants pour leur interaction avec leurs co-facteurs ou avec les autres régulateurs transcriptionnels présents sur les enhancers (Fry and Farnham, 1999; Hobert, 2008; Tam and Lim, 2008). Des changements dans la conformation des domaines fonctionnels des facteurs de transcription et/ou des interactions covalentes avec d'autres facteurs régulent la transcription, selon qu'ils permettent le recrutement ou non de l'ARN polymérase. L'expression d'un gène au sein d'une cellule repose donc sur la formation, au niveau de ses enhancers, d'un complexe de facteurs de transcription et de leurs co-facteurs. Ce mécanisme de régulation transcriptionnelle permet de renforcer la complexité des organismes, sans pour autant augmenter le nombre d'acteurs. Un exemple typique est fourni dans la moelle épinière ventrale où la présence de Lhx3 et du co-facteur NLI induit les gènes nécessaires pour la différenciation des interneurones V2a (*Chx10* par exemple) en formant des complexes tétramériques 2NLI :2Lhx3 tandis que la présence d'*Isl1* dans les MN entraîne la formation de complexes hexamériques 2Isl1 :2NLI :2Lhx3 qui induiront

l'expression des gènes de différenciation motoneuronale (*Hb9* par exemple) (Lee and Pfaff, 2001; Thaler et al., 2002; Lee et al., 2004; Lee et al., 2008; Song et al., 2009).

Au sein des protéines OC, la fonction de la plupart des domaines conservés a pu être identifiée par mutagenèse dirigée. Cependant, aucun rôle n'a pu être, à ce jour, attribué au reste de la séquence codante. Ces régions pourraient intervenir dans l'interaction avec d'autres facteurs de transcription et/ou avec des co-facteurs, mais également être nécessaires pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.



Des études des séquences montrent que les régions codantes pour les facteurs de transcription sont fortement conservées au cours de l'évolution (voir p108). Cependant, le nombre de régions cis-régulatrices augmente au fur et à mesure de l'évolution. Typiquement, les gènes des organismes supérieurs possèdent plusieurs régions enhancers tandis que le génome des levures n'en contient aucune (Levine and Tjian, 2003). L'augmentation du nombre de régions régulatrices est donc impliquée dans l'évolution de la complexité au cours du développement. De plus, le génome des levures contient environ 300 facteurs de transcription (un tous les 20 gènes), tandis que celui des humains en exprime plus de 3000 (1 tous les 10 gènes). Ce nombre accru de facteurs de transcription par gène se traduit par une augmentation du nombre de combinaisons possibles d'interactions entre les différents régulateurs présents au niveau des enhancers. L'ensemble de ces processus, plus que l'augmentation du nombre de gènes, distingue les organismes simples et complexes (de Laat and Grosveld, 2003; Levine and Tjian, 2003).

### 5.1.3. Les facteurs OC sont impliqués dans de multiples réseaux géniques

« La formation de deux sous-populations de neurones à partir d'un même domaine progéniteur fait intervenir une combinaison de facteurs de transcription »

En plus de leurs interactions au niveau des séquences cis-régulatrices, la présence de plusieurs facteurs de transcription au sein d'une cellule permet la formation de réseaux géniques. La formation de boucles d'auto-régulation, de rétro-contrôle ou des mécanismes d'induction et/ou de répression entre ces régulateurs transcriptionnels permet d'amplifier ou de diminuer un signal, d'assurer la persistance ou l'oscillation de l'expression d'un gène. Notre étude a permis de proposer un réseau moléculaire présent dans les MN médullaires et impliquant les facteurs transcriptionnels *Foxp1*, *Isl1*, *Hb9* et la famille OC. Ce réseau aboutit à la diminution de l'expression d'*Isl1* dans certains MN et à la différenciation viscérale. D'autres publications récentes démontrent que des réseaux génétiques contrôlent la différenciation cellulaire de deux sous-populations formées à partir d'un même domaine progéniteur (Hobert, 2008; Tam and Lim, 2008). Notamment, la moelle épinière est divisée en plusieurs domaines progéniteurs le long de l'axe D/V. Les cellules progénitrices exprimant *Mash1* donnent naissance à deux populations d'interneurones dorsaux : les dILA et les dILB. Ces deux sous-populations sont distinctes par le maintien de l'expression de *Mash1* dans les dILA. Des études en perte et gain de fonction assignent à *Mash1* une fonction dans la division asymétrique des cellules et indiquent que ce facteur de transcription coordonne la sortie du cycle cellulaire et la spécification de la cellule-fille qui donnera naissance aux interneurones dILA (Wildner et al., 2006). Dans les embryons mutants pour *Mash1*, le développement des dILA est perturbé, mais pas celui des dILB (Wildner et al., 2006). De la même manière, le domaine progéniteur p2 est caractérisé par l'expression de *Foxn4*, *Mash1*, *Dll4*, *Lhx3* et *Gata2*. Suite à l'activation de la voie Notch, cette population homogène de progéniteurs donnera naissance à deux sous-populations, chacune exprimant une combinaison de facteurs de transcription : les V2a sont caractérisés par la présence de *Chx10*, *Dll4* et *Lhx3* tandis que les V2b expriment *Foxn4*, *Mash1* et *Gata2/3* (Del Barrio et al., 2007). Nos études démontrent l'existence d'un tel mécanisme au sein des MN médullaires. En effet, les MN viscéraux et somatiques sont générés à partir d'une population homogène de cellules progénitrices. Cependant, le mécanisme permettant la formation de ces deux

sous-populations n'a pas encore été complètement découvert. En effet, l'implication de la voie Notch dans la ségrégation des MN viscéraux et somatiques, comme dans le cas des interneurons V2a, devrait être vérifiée.

#### **5.1.4. L'activité transcriptionnelle des facteurs OC évolue au cours du temps**

« Les rôles des facteurs de transcription évoluent au cours de la différenciation d'une cellule ».

De nombreux facteurs de transcription sont exprimés tout au long du processus de différenciation des MN médullaires (Ericson et al., 1992; Tsuchida et al., 1994; Tanabe et al., 1998; Arber et al., 1999; Thaler et al., 1999). Ces régulateurs peuvent acquérir plusieurs fonctions au cours du temps. L'expression du gène *Isl1* est observée dès la sortie du cycle cellulaire et est maintenue dans certaines colonnes motrices. Dans un premier temps, *Isl1* intervient dans la survie et dans la consolidation de l'identité des MN (Pfaff et al., 1996; Thaler et al., 2004; Song et al., 2009). Nos études démontrent qu'*Isl1* est ensuite un élément majeur dans le contrôle de la ségrégation entre les MN viscéraux et somatiques. A un stade plus tardif, l'expression d'*Isl1* est nécessaire dans les neurones de la LMCm afin de contrôler la position relative des corps cellulaires au sein de la LMC et la projection des axones de la LMCm vers la partie ventrale des membres (Kania et al., 2000; Luria et al., 2008; Bonanomi and Pfaff, 2010; Palmesino et al., 2010).

L'expression des facteurs OC est transitoire au cours de la différenciation des MN médullaires (Francius and Clotman, 2010). Cependant, bien que la distribution des OC soit progressivement restreinte à une fraction de MN durant le développement, une grande majorité des nouveaux MN post-mitotiques, des neurones de la PGC ou de la LMCm sont affectés par l'absence des protéines OC. Cette observation suggère que les facteurs OC exercent leur fonction aux premiers stades de la différenciation des MN, lorsqu'ils sont présents dans une vaste majorité de nouveaux MN post-mitotiques. Une autre explication possible viendrait de l'utilisation de co-facteurs par les protéines OC. En effet, les co-activateurs des facteurs OC (CBP et p300/CAF) sont capables de réguler la transcription par modification de la chromatine grâce à leur activité acétyltransférase (Chakravarti et al.,

1996; Kamei et al., 1996; Mannervik et al., 1999; Glass and Rosenfeld, 2000). Les modifications de la chromatine suite au recrutement de CBP ou de p300/CAF aux premiers stades de la différenciation des MN médullaires pourraient influencer les étapes ultérieures du développement des MN (Cheung et al., 2000).

Le maintien de l'expression des gènes *Oc* dans certaines fractions de MN pourrait correspondre à l'existence de pools de MN dans les diverses colonnes motrices. Ce maintien d'expression suggère que les protéines OC pourraient avoir des fonctions plus tardives. Des problèmes dans la formation des jonctions neuromusculaires ont d'ailleurs été observés chez les souris *Hnf6*<sup>-/-</sup> (travail effectué au laboratoire par E. Audouard). Cependant, lorsqu'un facteur de transcription est présent à différentes étapes du développement neuronal, l'inactivation précoce du gène correspondant par recombinaison homologue (knock-out) ne permet pas l'étude des rôles tardifs au sein des différentes populations. L'utilisation de mutants conditionnels permet, dans certains cas, de contourner ce problème.

## 5.2. Les facteurs OC et la migration neuronale

Au sein de l'endoderme ventral, le développement du foie chez les mammifères est initié par la formation d'un bourgeon hépatique. Les cellules hépatiques prolifèrent et envahissent le mésenchyme adjacent, avant de se différencier en hépatocytes et en cellules biliaires. Des études d'expression montrent que les protéines OC sont impliquées dans un réseau génique comprenant l'E-cadhérine, la thrombospondine-4 et l'ostéopontine qui, en contrôlant la migration des hépatoblastes et l'adhérence cellulaire, régulent l'expansion du bourgeon hépatique (Margagliotti et al., 2007).

Dans le SNC, les protéines OC sont également impliquées dans le contrôle du processus migratoire des neurones. En particulier, les facteurs OC sont exprimés dans le noyau dopaminergique A13 situé dans le diencephale (Espana and Clotman, 2011). A la fin de son développement, ce noyau est situé à proximité de la lumière du troisième ventricule. Dans les mutants *Hnf6/Oc2<sup>-/-</sup>*, les neurones du noyau A13 se différencient normalement mais se dispersent dans le diencephale et ne se rassemblent pas près du ventricule, provoquant la perte de leur phénotype dopaminergique et l'absence du noyau. Les facteurs OC pourraient donc intervenir dans la cohésion et/ou la migration de ce noyau. Cependant, les mécanismes contrôlés par les facteurs OC dans ce processus migratoire n'ont pas encore été étudiés.

De plus, un autre projet de recherche au sein du laboratoire suggère que les facteurs de transcription OC sont impliqués dans la migration des interneurones ventraux de la moelle épinière (C. Francius, A. Harris et F. Clotman, travail en cours). Quatre classes d'interneurones ventraux (V0-V3) sont générées au cours du développement. Ces neurones post-mitotiques migrent hors de la zone ventriculaire selon une trajectoire stéréotypée afin d'atteindre leur destination finale et de se regrouper en plusieurs sous-populations qui contrôlent différents aspects de la locomotion. Les programmes génétiques et des voies de signalisation qui contrôlent la diversification et le processus de migration de ces interneurones ventraux ne sont pas encore complètement élucidés. Les facteurs de transcription OC sont exprimés dans les interneurones ventraux post-mitotiques. En absence des facteurs OC, la différenciation de certaines sous-populations d'interneurones ventraux est fortement altérée. De plus, la migration des interneurones V0v, V1, V2a, V2b et V3 est anormale. En effet, les interneurones V2 migrent anormalement vers la région dorsale de la moelle tandis que les V1 se dirigent ventralement et dans une région proche du canal central. Les V0v se concentrent anormalement ventralement et les V3 migrent latéralement

plutôt que dorsalement. Des analyses *in situ* effectuées sur des coupes d'embryons mutants *Hnf6/Oc2* montrent que l'expression de certaines molécules chimiotropiques est perturbée dans les interneurons ventraux en absence des protéines OC. Notamment, on observe une diminution de l'expression d'*ErbB4*, de *Nrp2* et de *Sema5A* dans certaines populations d'interneurones. Ces observations, ajoutées à celles obtenues avec les immunomarquages *in toto* des MN médullaires, suggèrent que les protéines OC pourraient contrôler certaines caractéristiques générales de la migration neuronale dans le SNC. Cependant, les mécanismes contrôlés par les protéines OC dans ce processus n'ont pas encore été identifiés et pourraient faire intervenir des régulateurs propres à chaque population cellulaire. Comme suggéré précédemment, des criblages à haut débit (microarrays) permettraient peut-être d'identifier les cibles potentielles des protéines OC au cours de la migration neuronale.

### 5.3 Anomalies locomotrices chez les individus adultes

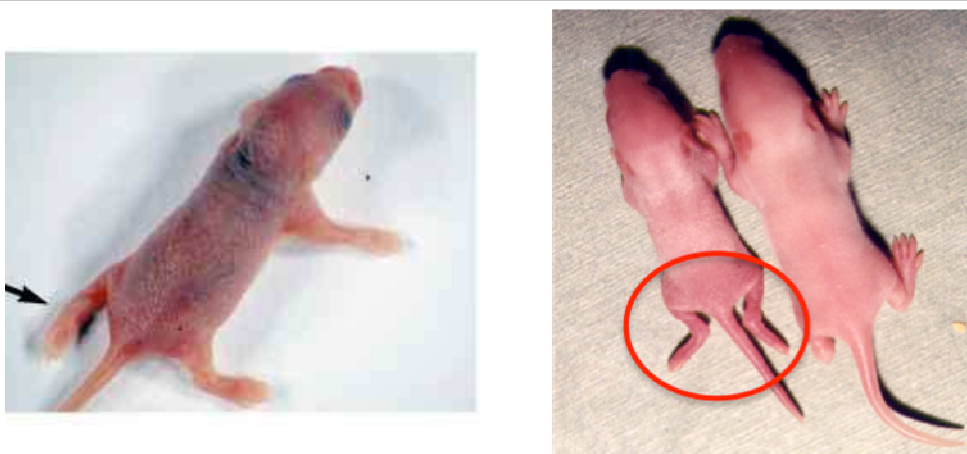
Au cours du développement embryonnaire, notre étude montre que la différenciation et la diversification des MN sont altérées chez les souris mutantes pour les facteurs de transcription OC. Dès lors, l'absence des protéines OC pourrait engendrer des désordres locomoteurs importants chez ces souris knock-out à l'âge adulte.

Les protéines OC sont détectées dans les dérivés de l'endoderme, notamment le foie et le pancréas. Dans ces derniers, les facteurs OC contrôlent de manière redondante différents aspects de la différenciation cellulaire et de la morphogenèse au cours du développement. Par conséquent, l'absence des protéines OC engendre des anomalies de taille et de différenciation du foie (absence de la vésicule biliaire, canaux biliaires anormaux...) ainsi que des anomalies de différenciation et de morphogenèse du pancréas (apparition de kystes, absence de cellules endocrines à la naissance...). Les souris *Hnf6*<sup>-/-</sup> sont également diabétiques.

L'observation des souris doubles knock-out pour *Hnf6* et *Oc2* montre que ces souris meurent dès la naissance. La cause de cette mortalité n'a pas encore été complètement élucidée. Cependant, on peut émettre l'hypothèse que l'ensemble des anomalies observées au niveau des dérivés de l'endoderme provoque la mort des nouveaux-nés. De plus, nos études sur le développement des MN nous laissent supposer que ces souris souffriraient également de désordres locomoteurs les empêchant de se mouvoir. Les fœtus doubles knock-out *Hnf6/Oc2* semblent d'ailleurs paralysés à e18.5 (absence de réaction motrice à la stimulation). L'hypothèse que les centres respiratoires se développent anormalement chez ces embryons est également envisagée.

Parmi les protéines OC, HNF-6 joue un rôle prépondérant dans la différenciation et la diversification des MN de la moelle épinière. Des anomalies de différenciation des MN, bien que moins marquées que chez les doubles mutants, sont d'ailleurs observées chez les embryons simples mutants *Hnf6*. Ces souris survivent à la naissance mais le taux de mortalité demeure élevé (seul 25% des nouveaux-nés survivent après 10 jours). Le nombre de MN somatiques est normal à la naissance en absence de *Hnf6* tandis que la population viscérale semble augmentée. Cette observation laisse supposer qu'une élimination moindre des MN somatiques se déroule au cours de la phase d'apoptose (e14.5).

Au cours du développement, les embryons *EphA4*<sup>-/-</sup> montrent un phénotype inverse à celui observé chez les mutants pour les protéines OC : les axones issus de la LMCI sont dirigés anormalement vers la partie ventrale, provoquant une hypotrophie des muscles situés dans la partie dorsale. Par conséquent, les nouveaux-nés *EphA4* montrent une position anormale des membres postérieurs (Figure 42a) (Helmbacher et al., 2000). En absence de *Hnf6*, une partie des cellules de la LMCm perdent leur identité au profit de celle de la LMCI. Une hypotrophie des muscles situés dans la partie ventrale des membres est dès lors attendue chez ces souris mutantes à l'âge adulte. Cependant, l'analyse des muscles issus du bourgeon ventral des membres chez les nouveaux-nés *Hnf6*<sup>-/-</sup> montrent que certains d'entre eux sont hypotrophiés (muscle gastrocnémien) tandis que d'autres sont hypertrophiés (muscle solaire). De plus, le muscle « tibialis antérieur », pourtant issu du bourgeon dorsal des membres, est également hypotrophié. L'hypothèse que, chez les nouveaux-nés *Hnf6*<sup>-/-</sup>, l'hypotrophie du gastrocnémien est compensée par une hypertrophie du muscle solaire est envisagée. Toutes ces observations expliqueraient la position anormale des pattes postérieures chez les souris *Hnf6*<sup>-/-</sup> à la naissance (Figure 42b). Cependant, conclure que ces anomalies résultent uniquement des problèmes de différenciation des MN au cours du développement est spéculatif. En effet, les souris *Hnf6*<sup>-/-</sup> présentent également des anomalies de formation (absence de synaptophysine) et du retard de développement des jonctions neuro-musculaires (E. Audouard, travail en cours). De plus, les souris *Hnf6*<sup>-/-</sup> développent le diabète à la naissance et il a déjà été prouvé que le diabète contribue dans certaines situations à l'hypotrophie des muscles.



**Figure 42 : A) Les nouveaux-nés *EphA4* montrent une position anormale (flèche) des membres postérieurs à P5. D'après Helmbacher et al., 2000. B) Les nouveaux-nés *Hnf6*<sup>-/-</sup> (à gauche) présentent une position anormale des membres postérieurs à P7 par rapport aux souris contrôle (à droite). Réalisé par F. Lemaigre**

Des tests comportementaux effectués sur les souris *Hnf6*<sup>-/-</sup> sont actuellement en cours au sein de notre laboratoire (travaux effectués par E. Audouard). Des analyses en open-field, de rotarod ou de grip-strength démontrent que ces souris souffrent de désordres locomoteurs (réduction de la force musculaire, phénomène de circling, problème de coordination lors de la marche, hyperactivité, problème d'équilibre...). De nombreuses expériences démontrent que les interneurons ventraux participent au contrôle de la marche en constituant des circuits locomoteurs. Ainsi, les souris mutantes pour *EphA4* souffrent de problème de rythmicité et d'alternance gauche/droite au cours de la marche. Ces désordres locomoteurs résulteraient, non pas de l'absence d'innervation dans la partie dorsale des membres, mais bien d'une projection anormale de certains axones d'interneurones ventraux du côté contro-latérale de la moelle épinière (Kullander et al., 2003). Dès lors, l'expression des facteurs OC dans certaines populations d'interneurones, ainsi que les anomalies de différenciation de ces populations observées en absence des facteurs OC (C. Francius, travail en cours) pourraient contribuer au phénotype observé chez les souris mutantes *Hnf6*<sup>-/-</sup>. La perte d'équilibre et les anomalies de coordination pourraient également provenir d'une différenciation anormale de certains lobes du cervelet au cours du développement embryonnaire (E. Audouard, travail en cours). Finalement, des anomalies de différenciation de certains centres moteurs situés dans l'encéphale pourraient contribuer aux désordres locomoteurs observés. Les facteurs OC ont d'ailleurs été impliqués dans la différenciation et le maintien du Locus Coeruleus et du noyau A13, deux noyaux catécholaminergiques impliqués dans l'hyperactivité (Espana and Clotman, 2011). L'expression et l'importance des facteurs OC dans d'autres noyaux de l'encéphale restent à étudier.

En conclusion, toutes nos données montrent que les facteurs OC sont importants pour la différenciation et la diversification des MN de la moelle épinière au cours du développement. Cependant, le large patron d'expression des gènes *Oc* dans le système nerveux central rend tout lien avec les désordres locomoteurs observés chez les individus mutants adultes délicat et nécessite une analyse multi-factorielle.

## **BIBLIOGRAPHIE**

**Agalliu, D., Takada, S., Agalliu, I., McMahon, A. P. and Jessell, T. M.** (2009). Motor neurons with axial muscle projections specified by Wnt4/5 signaling. *Neuron* **61**, 708-720.

**Alvarez, M., Rhodes, S. J. and Bidwell, J. P.** (2003). Context-dependent transcription: all politics is local. *Gene* **313**, 43-57.

**Arber, S., Han, B., Mendelsohn, M., Smith, M., Jessell, T. M. and Sockanathan, S.** (1999). Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* **23**, 659-674.

**Bassez, G., Camand, O. J., Cacheux, V., Kobetz, A., Dastot-Le Moal, F., Marchant, D., Catala, M., Abitbol, M. and Goossens, M.** (2004). Pleiotropic and diverse expression of ZFHX1B gene transcripts during mouse and human development supports the various clinical manifestations of the "Mowat-Wilson" syndrome. *Neurobiol Dis* **15**, 240-250.

**Beaudry, J. B., Pierreux, C. E., Hayhurst, G. P., Plumb-Rudewiez, N., Weiss, M. C., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P.** (2006). Threshold levels of hepatocyte nuclear factor 6 (HNF-6) acting in synergy with HNF-4 and PGC-1alpha are required for time-specific gene expression during liver development. *Mol Cell Biol* **26**, 6037-6046.

**Bell, E., Wingate, R. J. and Lumsden, A.** (1999). Homeotic transformation of rhombomere identity after localized Hoxb1 misexpression. *Science* **284**, 2168-2171.

**Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**, 517-530.

**Bhati, M., Lee, C., Nancarrow, A. L., Lee, M., Craig, V. J., Bach, I., Guss, J. M., Mackay, J. P. and Matthews, J. M.** (2008). Implementing the LIM code: the structural basis for cell type-specific assembly of LIM-homeodomain complexes. *Embo J* **27**, 2018-2029.

**Bielas, S., Higginbotham, H., Koizumi, H., Tanaka, T. and Gleeson, J. G.** (2004). Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 593-618.

**Bonanomi, D. and Pfaff, S. L.** (2010). Motor axon pathfinding. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001735.

**Briscoe, J. and Novitch, B. G.** (2008). Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**, 57-70.

**Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L. and Ericson, J.** (1999). Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* **398**, 622-627.

**Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M. and Kidd, T. (1999).** Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96**, 795-806.

**Carroll, P., Gayet, O., Feuillet, C., Kallenbach, S., de Bovis, B., Dudley, K. and Alonso, S. (2001).** Juxtaposition of CNR protocadherins and reelin expression in the developing spinal cord. *Mol Cell Neurosci* **17**, 611-623.

**Carroll, S. B., Prud'homme, B. and Gompel, N. (2008).** Regulating evolution. *Sci Am* **298**, 60-67.

**Caspary, T. and Anderson, K. V. (2003).** Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci* **4**, 289-297.

**Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M. and Evans, R. M. (1996).** Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**, 99-103.

**Chamberlain, C. E., Jeong, J., Guo, C., Allen, B. L. and McMahon, A. P. (2008).** Notochord-derived Shh concentrates in close association with the apically positioned basal body in neural target cells and forms a dynamic gradient during neural patterning. *Development* **135**, 1097-1106.

**Cheung, W. L., Briggs, S. D. and Allis, C. D. (2000).** Acetylation and chromosomal functions. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 326-333.

**Ciani, L. and Salinas, P. C. (2005).** WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* **6**, 351-362.

**Clotman, F., Libbrecht, L., Gresh, L., Yaniv, M., Roskams, T., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P. (2003).** Hepatic artery malformations associated with a primary defect in intrahepatic bile duct development. *J Hepatol* **39**, 686-692.

**Clotman, F., Lannoy, V. J., Reber, M., Cereghini, S., Cassiman, D., Jacquemin, P., Roskams, T., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P. (2002).** The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development* **129**, 1819-1828.

**Clotman, F., Jacquemin, P., Plumb-Rudewiez, N., Pierreux, C. E., Van der Smissen, P., Dietz, H. C., Courtoy, P. J., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P. (2005).** Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev* **19**, 1849-1854.

**Cooke, J. E. and Moens, C. B. (2002).** Boundary formation in the hindbrain: Eph only it were simple. *Trends Neurosci* **25**, 260-267.

**D'Aniello, E., Pezzotti, M. R., Locascio, A. and Branno, M. (2011).** Onecut is a direct neural-specific transcriptional activator of Rx in *Ciona intestinalis*. *Dev Biol* **355**, 358-371.

- Dasen, J. S. and Jessell, T. M.** (2009). Hox networks and the origins of motor neuron diversity. *Curr Top Dev Biol* **88**, 169-200.
- Dasen, J. S., Liu, J. P. and Jessell, T. M.** (2003). Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature* **425**, 926-933.
- Dasen, J. S., Tice, B. C., Brenner-Morton, S. and Jessell, T. M.** (2005). A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity. *Cell* **123**, 477-491.
- Dasen, J. S., De Camilli, A., Wang, B., Tucker, P. W. and Jessell, T. M.** (2008). Hox repertoires for motor neuron diversity and connectivity gated by a single accessory factor, FoxP1. *Cell* **134**, 304-316.
- de Laat, W. and Grosveld, F.** (2003). Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. *Chromosome Res* **11**, 447-459.
- De Marco Garcia, N. V. and Jessell, T. M.** (2008). Early motor neuron pool identity and muscle nerve trajectory defined by postmitotic restrictions in Nkx6.1 activity. *Neuron* **57**, 217-231.
- Del Barrio, M. G., Taveira-Marques, R., Muroyama, Y., Yuk, D. I., Li, S., Wines-Samuelson, M., Shen, J., Smith, H. K., Xiang, M., Rowitch, D. et al.** (2007). A regulatory network involving Foxn4, Mash1 and delta-like 4/Notch1 generates V2a and V2b spinal interneurons from a common progenitor pool. *Development* **134**, 3427-3436.
- Dessaud, E., McMahon, A. P. and Briscoe, J.** (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**, 2489-2503.
- Dickson, B. J.** (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* **298**, 1959-1964.
- Diez-Roux, G., Banfi, S., Sultan, M., Geffers, L., Anand, S., Rozado, D., Magen, A., Canidio, E., Pagani, M., Peluso, I. et al.** (2011). A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol* **9**, e1000582.
- Diez del Corral, R. and Storey, K. G.** (2001). Markers in vertebrate neurogenesis. *Nat Rev Neurosci* **2**, 835-839.
- Elkouby, Y. M. and Frank, D.** (2010). In *Wnt/beta-Catenin Signaling in Vertebrate Posterior Neural Development*. San Rafael (CA).
- Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M. and Yamada, T.** (1992). Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene Islet-1. *Science* **256**, 1555-1560.

- Espana, A. and Clotman, F.** (2011). The Onecut transcription factors are required for the second phase of development of the A13 dopaminergic nucleus in the mouse. *J Comp Neurol*.
- Flames, N., Long, J. E., Garratt, A. N., Fischer, T. M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J. L. and Marin, O.** (2004). Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* **44**, 251-261.
- Francius, C. and Clotman, F.** (2010). Dynamic expression of the Onecut transcription factors HNF-6, OC-2 and OC-3 during spinal motor neuron development. *Neuroscience* **165**, 116-129.
- Fry, C. J. and Farnham, P. J.** (1999). Context-dependent transcriptional regulation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 29583-29586.
- Fuccillo, M., Joyner, A. L. and Fishell, G.** (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* **7**, 772-783.
- Fukumitsu, H., Ohtsuka, M., Murai, R., Nakamura, H., Itoh, K. and Furukawa, S.** (2006). Brain-derived neurotrophic factor participates in determination of neuronal laminar fate in the developing mouse cerebral cortex. *J Neurosci* **26**, 13218-13230.
- Gallarda, B. W., Bonanomi, D., Muller, D., Brown, A., Alaynick, W. A., Andrews, S. E., Lemke, G., Pfaff, S. L. and Marquardt, T.** (2008). Segregation of axial motor and sensory pathways via heterotypic trans-axonal signaling. *Science* **320**, 233-236.
- Gaspard, N. and Vanderhaeghen, P.** (2010). Mechanisms of neural specification from embryonic stem cells. *Curr Opin Neurobiol* **20**, 37-43.
- Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G.** (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & development* **14**, 121-141.
- Goodman, C. S. and Shatz, C. J.** (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* **72 Suppl**, 77-98.
- Guillemot, F.** (2007). Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* **134**, 3771-3780.
- Guthrie, S.** (2007). Patterning and axon guidance of cranial motor neurons. *Nat Rev Neurosci* **8**, 859-871.
- Haase, G., Dessaud, E., Garces, A., de Bovis, B., Birling, M., Filippi, P., Schmalbruch, H., Arber, S. and deLapeyriere, O.** (2002). GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron* **35**, 893-905.
- Hatten, M. E.** (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* **22**, 511-539.

- Hatzis, P. and Talianidis, I.** (2002). Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol Cell* **10**, 1467-1477.
- Haupt, C., Kloos, K., Faus-Kessler, T. and Huber, A. B.** (2010). Semaphorin 3A-Neuropilin-1 signaling regulates peripheral axon fasciculation and pathfinding but not developmental cell death patterns. *Eur J Neurosci* **31**, 1164-1172.
- Haworth, K. E. and Latinkic, B.** (2009). Expression of *Xenopus tropicalis* HNF6/Onecut-1. *Int J Dev Biol* **53**, 159-162.
- Helmbacher, F., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Tiret, L. and Charnay, P.** (2000). Targeting of the EphA4 tyrosine kinase receptor affects dorsal/ventral pathfinding of limb motor axons. *Development* **127**, 3313-3324.
- Helmbacher, F., Dessaud, E., Arber, S., deLapeyriere, O., Henderson, C. E., Klein, R. and Maina, F.** (2003). Met signaling is required for recruitment of motor neurons to PEA3-positive motor pools. *Neuron* **39**, 767-777.
- Higashi, Y., Maruhashi, M., Nelles, L., Van de Putte, T., Verschueren, K., Miyoshi, T., Yoshimoto, A., Kondoh, H. and Huylebroeck, D.** (2002). Generation of the floxed allele of the SIP1 (Smad-interacting protein 1) gene for Cre-mediated conditional knockout in the mouse. *Genesis* **32**, 82-84.
- Ho, L. and Crabtree, G. R.** (2010). Chromatin remodelling during development. *Nature* **463**, 474-484.
- Hobert, O.** (2008). Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science* **319**, 1785-1786.
- Hodge, L. K., Klassen, M. P., Han, B. X., Yiu, G., Hurrell, J., Howell, A., Rousseau, G., Lemaigre, F., Tessier-Lavigne, M. and Wang, F.** (2007). Retrograde BMP signaling regulates trigeminal sensory neuron identities and the formation of precise face maps. *Neuron* **55**, 572-586.
- Hong, S. K., Kim, C. H., Yoo, K. W., Kim, H. S., Kudoh, T., Dawid, I. B. and Huh, T. L.** (2002). Isolation and expression of a novel neuron-specific onecut homeobox gene in zebrafish. *Mech Dev* **112**, 199-202.
- Huber, A. B., Kania, A., Tran, T. S., Gu, C., De Marco Garcia, N., Lieberam, I., Johnson, D., Jessell, T. M., Ginty, D. D. and Kolodkin, A. L.** (2005). Distinct roles for secreted semaphorin signaling in spinal motor axon guidance. *Neuron* **48**, 949-964.
- Huettl, R. E., Soellner, H., Bianchi, E., Novitsch, B. G. and Huber, A. B.** (2011). Npn-1 contributes to axon-axon interactions that differentially control sensory and motor innervation of the limb. *PLoS Biol* **9**, e1001020.

- Hunt, P. and Krumlauf, R.** (1992). Hox codes and positional specification in vertebrate embryonic axes. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 227-256.
- Hutchinson, S. A. and Eisen, J. S.** (2006). Islet1 and Islet2 have equivalent abilities to promote motoneuron formation and to specify motoneuron subtype identity. *Development* **133**, 2137-2147.
- Iyaguchi, D., Yao, M., Watanabe, N., Nishihira, J. and Tanaka, I.** (2007). DNA recognition mechanism of the ONECUT homeodomain of transcription factor HNF-6. *Structure* **15**, 75-83.
- Jacob, J. and Briscoe, J.** (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep* **4**, 761-765.
- Jacquemin, P., Lemaigre, F. P. and Rousseau, G. G.** (2003a). The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade. *Dev Biol* **258**, 105-116.
- Jacquemin, P., Lannoy, V. J., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P.** (1999). OC-2, a novel mammalian member of the ONECUT class of homeodomain transcription factors whose function in liver partially overlaps with that of hepatocyte nuclear factor-6. *J Biol Chem* **274**, 2665-2671.
- Jacquemin, P., Lannoy, V. J., O'Sullivan, J., Read, A., Lemaigre, F. P. and Rousseau, G. G.** (2001). The transcription factor onecut-2 controls the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 1200-1205.
- Jacquemin, P., Pierreux, C. E., Fierens, S., van Eyll, J. M., Lemaigre, F. P. and Rousseau, G. G.** (2003b). Cloning and embryonic expression pattern of the mouse Onecut transcription factor OC-2. *Gene Expr Patterns* **3**, 639-644.
- Jacquemin, P., Durviaux, S. M., Jensen, J., Godfraind, C., Gradwohl, G., Guillemot, F., Madsen, O. D., Carmeliet, P., Dewerchin, M., Collen, D. et al.** (2000). Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Mol Cell Biol* **20**, 4445-4454.
- Jessell, T. M.** (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-29.
- Ji, S. J., Periz, G. and Sockanathan, S.** (2009). Nolz1 is induced by retinoid signals and controls motoneuron subtype identity through distinct repressor activities. *Development* **136**, 231-240.
- Ji, S. J., Zhuang, B., Falco, C., Schneider, A., Schuster-Gossler, K., Gossler, A. and Sockanathan, S.** (2006). Mesodermal and neuronal retinoids regulate the induction and maintenance of limb innervating spinal motor neurons. *Developmental biology* **297**, 249-261.

**Jung, H., Lacombe, J., Mazzoni, E. O., Liem, K. F., Jr., Grinstein, J., Mahony, S., Mukhopadhyay, D., Gifford, D. K., Young, R. A., Anderson, K. V. et al.** (2010). Global control of motor neuron topography mediated by the repressive actions of a single hox gene. *Neuron* **67**, 781-796.

**Kageyama, R., Ohtsuka, T., Hatakeyama, J. and Ohsawa, R.** (2005). Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* **306**, 343-348.

**Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K. et al.** (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**, 403-414.

**Kania, A. and Jessell, T. M.** (2003). Topographic motor projections in the limb imposed by LIM homeodomain protein regulation of ephrin-A:EphA interactions. *Neuron* **38**, 581-596.

**Kania, A., Johnson, R. L. and Jessell, T. M.** (2000). Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell* **102**, 161-173.

**Keynes, R. and Krumlauf, R.** (1994). Hox genes and regionalization of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **17**, 109-132.

**Kiecker, C. and Lumsden, A.** (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci* **6**, 553-564.

**Klein, R.** (1999). Bidirectional signals establish boundaries. *Curr Biol* **9**, R691-694.

**Kramer, E. R., Knott, L., Su, F., Dessaud, E., Krull, C. E., Helmbacher, F. and Klein, R.** (2006). Cooperation between GDNF/Ret and ephrinA/EphA4 signals for motor-axon pathway selection in the limb. *Neuron* **50**, 35-47.

**Kruger, M. T., Zhao, S., Chai, X., Brunne, B., Bouche, E., Bock, H. H. and Frotscher, M.** (2010). Role for Reelin-induced cofilin phosphorylation in the assembly of sympathetic preganglionic neurons in the murine intermediolateral column. *Eur J Neurosci* **32**, 1611-1617.

**Kullander, K., Butt, S. J., Lebre, J. M., Lundfald, L., Restrepo, C. E., Rydstrom, A., Klein, R. and Kiehn, O.** (2003). Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking. *Science* **299**, 1889-1892.

**Landmesser, L.** (1978). The distribution of motoneurons supplying chick hind limb muscles. *J Physiol* **284**, 371-389.

**Landry, C., Clotman, F., Hioki, T., Oda, H., Picard, J. J., Lemaigre, F. P. and Rousseau, G. G.** (1997). HNF-6 is expressed in endoderm derivatives and nervous system of the mouse embryo and participates to the cross-regulatory network of liver-enriched transcription factors. *Developmental biology* **192**, 247-257.

- Lannoy, V. J., Burglin, T. R., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P. (1998).** Isoforms of hepatocyte nuclear factor-6 differ in DNA-binding properties, contain a bifunctional homeodomain, and define the new ONECUT class of homeodomain proteins. *J Biol Chem* **273**, 13552-13562.
- Lannoy, V. J., Rodolosse, A., Pierreux, C. E., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P. (2000).** Transcriptional stimulation by hepatocyte nuclear factor-6. Target-specific recruitment of either CREB-binding protein (CBP) or p300/CBP-associated factor (p/CAF). *The Journal of biological chemistry* **275**, 22098-22103.
- Lannoy, V. J., Decaux, J. F., Pierreux, C. E., Lemaigre, F. P. and Rousseau, G. G. (2002).** Liver glucokinase gene expression is controlled by the onecut transcription factor hepatocyte nuclear factor-6. *Diabetologia* **45**, 1136-1141.
- Laudadio, I., Manfroid, I., Achouri, Y., Schmidt, D., Wilson, M. D., Cordi, S., Thorrez, L., Knoops, L., Jacquemin, P., Schuit, F. et al. (2011).** A Feedback Loop Between the Liver-Enriched Transcription Factor Network and Mir-122 Controls Hepatocyte Differentiation. *Gastroenterology*.
- Lee, J. E. (1997).** Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 13-20.
- Lee, S., Lee, B., Lee, J. W. and Lee, S. K. (2009).** Retinoid signaling and neurogenin2 function are coupled for the specification of spinal motor neurons through a chromatin modifier CBP. *Neuron* **62**, 641-654.
- Lee, S., Lee, B., Joshi, K., Pfaff, S. L., Lee, J. W. and Lee, S. K. (2008).** A regulatory network to segregate the identity of neuronal subtypes. *Dev Cell* **14**, 877-889.
- Lee, S. K. and Pfaff, S. L. (2001).** Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1183-1191.
- Lee, S. K. and Pfaff, S. L. (2003).** Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* **38**, 731-745.
- Lee, S. K., Lee, B., Ruiz, E. C. and Pfaff, S. L. (2005).** Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes & development* **19**, 282-294.
- Lee, S. K., Jurata, L. W., Funahashi, J., Ruiz, E. C. and Pfaff, S. L. (2004).** Analysis of embryonic motoneuron gene regulation: derepression of general activators function in concert with enhancer factors. *Development* **131**, 3295-3306.
- Lemaigre, F. P., Durviaux, S. M., Truong, O., Lannoy, V. J., Hsuan, J. J. and Rousseau, G. G. (1996).** Hepatocyte nuclear factor 6, a transcription factor that contains a novel type of homeodomain and a single cut domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9460-9464.

- Levine, M. and Tjian, R.** (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* **424**, 147-151.
- Liang, X., Song, M. R., Xu, Z., Lanuza, G. M., Liu, Y., Zhuang, T., Chen, Y., Pfaff, S. L., Evans, S. M. and Sun, Y.** (2011). Isl1 is required for multiple aspects of motor neuron development. *Mol Cell Neurosci* **47**, 215-222.
- Lin, J. H., Saito, T., Anderson, D. J., Lance-Jones, C., Jessell, T. M. and Arber, S.** (1998). Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression. *Cell* **95**, 393-407.
- Liu, A. and Niswander, L. A.** (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* **6**, 945-954.
- Liu, J. P., Laufer, E. and Jessell, T. M.** (2001). Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* **32**, 997-1012.
- Livet, J., Sigrist, M., Stroebel, S., De Paola, V., Price, S. R., Henderson, C. E., Jessell, T. M. and Arber, S.** (2002). ETS gene *Pea3* controls the central position and terminal arborization of specific motor neuron pools. *Neuron* **35**, 877-892.
- Long, H., Sabatier, C., Ma, L., Plump, A., Yuan, W., Ornitz, D. M., Tamada, A., Murakami, F., Goodman, C. S. and Tessier-Lavigne, M.** (2004). Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* **42**, 213-223.
- Lumsden, A.** (2004). Segmentation and compartment in the early avian hindbrain. *Mechanisms of development* **121**, 1081-1088.
- Lupo, G., Harris, W. A. and Lewis, K. E.** (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**, 103-114.
- Luria, V., Krawchuk, D., Jessell, T. M., Laufer, E. and Kania, A.** (2008). Specification of motor axon trajectory by ephrin-B:EphB signaling: symmetrical control of axonal patterning in the developing limb. *Neuron* **60**, 1039-1053.
- Ma, Y. C., Song, M. R., Park, J. P., Henry Ho, H. Y., Hu, L., Kurtev, M. V., Zieg, J., Ma, Q., Pfaff, S. L. and Greenberg, M. E.** (2008). Regulation of motor neuron specification by phosphorylation of neurogenin 2. *Neuron* **58**, 65-77.
- Maden, M.** (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* **3**, 843-853.
- Mambetisaeva, E. T., Andrews, W., Camurri, L., Annan, A. and Sundaresan, V.** (2005). Robo family of proteins exhibit differential expression in mouse spinal cord and Robo-Slit interaction is required for midline crossing in vertebrate spinal cord. *Dev Dyn* **233**, 41-51.

**Mannervik, M., Nibu, Y., Zhang, H. and Levine, M.** (1999). Transcriptional coregulators in development. *Science* **284**, 606-609.

**Margagliotti, S., Clotman, F., Pierreux, C. E., Beaudry, J. B., Jacquemin, P., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P.** (2007). The Onecut transcription factors HNF-6/OC-1 and OC-2 regulate early liver expansion by controlling hepatoblast migration. *Dev Biol* **311**, 579-589.

**Marin, O. and Rubenstein, J. L.** (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* **2**, 780-790.

**Marin, O., Valiente, M., Ge, X. and Tsai, L. H.** (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001834.

**Maruhashi, M., Van De Putte, T., Huylebroeck, D., Kondoh, H. and Higashi, Y.** (2005). Involvement of SIP1 in positioning of somite boundaries in the mouse embryo. *Dev Dyn* **234**, 332-338.

**Matthews, R. P., Lorent, K., Russo, P. and Pack, M.** (2004). The zebrafish onecut gene *hnf-6* functions in an evolutionarily conserved genetic pathway that regulates vertebrate biliary development. *Dev Biol* **274**, 245-259.

**Megason, S. G. and McMahon, A. P.** (2002). A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* **129**, 2087-2098.

**Miquelajauregui, A., Van de Putte, T., Polyakov, A., Nityanandam, A., Boppana, S., Seuntjens, E., Karabinos, A., Higashi, Y., Huylebroeck, D. and Tarabykin, V.** (2007). Smad-interacting protein-1 (*Zfhx1b*) acts upstream of Wnt signaling in the mouse hippocampus and controls its formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12919-12924.

**Miyoshi, T., Maruhashi, M., Van De Putte, T., Kondoh, H., Huylebroeck, D. and Higashi, Y.** (2006). Complementary expression pattern of *Zfhx1* genes *Sip1* and *deltaEF1* in the mouse embryo and their genetic interaction revealed by compound mutants. *Dev Dyn* **235**, 1941-1952.

**Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y., Shimamura, K. and Nakafuku, M.** (2001). Combinatorial roles of *olig2* and *neurogenin2* in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* **31**, 757-771.

**Mueller, B. K.** (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* **22**, 351-388.

**Munoz-Sanjuan, I. and Brivanlou, A. H.** (2002). Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci* **3**, 271-280.

**Murakami, Y. and Tanaka, M.** (2011). Evolution of motor innervation to vertebrate fins and limbs. *Developmental biology* **355**, 164-172.

- Nguyen, D. N., Rohrbaugh, M. and Lai, Z.** (2000). The Drosophila homolog of Onecut homeodomain proteins is a neural-specific transcriptional activator with a potential role in regulating neural differentiation. *Mech Dev* **97**, 57-72.
- Nonchev, S., Maconochie, M., Vesque, C., Aparicio, S., Ariza-McNaughton, L., Manzanares, M., Maruthainar, K., Kuroiwa, A., Brenner, S., Charnay, P. et al.** (1996). The conserved role of Krox-20 in directing Hox gene expression during vertebrate hindbrain segmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9339-9345.
- Nordstrom, U., Maier, E., Jessell, T. M. and Edlund, T.** (2006). An early role for WNT signaling in specifying neural patterns of Cdx and Hox gene expression and motor neuron subtype identity. *PLoS Biol* **4**, e252.
- Novak, K. D., Prevet, D., Wang, S., Gould, T. W. and Oppenheim, R. W.** (2000). Hepatocyte growth factor/scatter factor is a neurotrophic survival factor for lumbar but not for other somatic motoneurons in the chick embryo. *J Neurosci* **20**, 326-337.
- Novitsch, B. G., Chen, A. I. and Jessell, T. M.** (2001). Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* **31**, 773-789.
- Oppenheim, R. W., Houenou, L. J., Parsadanian, A. S., Prevet, D., Snider, W. D. and Shen, L.** (2000). Glial cell line-derived neurotrophic factor and developing mammalian motoneurons: regulation of programmed cell death among motoneuron subtypes. *J Neurosci* **20**, 5001-5011.
- Palmesino, E., Rousso, D. L., Kao, T. J., Klar, A., Laufer, E., Uemura, O., Okamoto, H., Novitsch, B. G. and Kania, A.** (2010). Foxp1 and Ihx1 coordinate motor neuron migration with axon trajectory choice by gating Reelin signalling. *PLoS Biol* **8**, e1000446.
- Patel, K., Nash, J. A., Itoh, A., Liu, Z., Sundaresan, V. and Pini, A.** (2001). Slit proteins are not dominant chemorepellents for olfactory tract and spinal motor axons. *Development* **128**, 5031-5037.
- Petros, T. J., Tyson, J. A. and Anderson, S. A.** (2011). Pluripotent stem cells for the study of CNS development. *Front Mol Neurosci* **4**, 30.
- Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T. and Jessell, T. M.** (1996). Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**, 309-320.
- Phelps, P. E.** (2010). Reelin induces a common signal for spinal cord and cerebral cortical migration (commentary on Kruger et al.). *Eur J Neurosci* **32**, 1609-1610.
- Phelps, P. E., Rich, R., Dupuy-Davies, S., Rios, Y. and Wong, T.** (2002). Evidence for a cell-specific action of Reelin in the spinal cord. *Developmental biology* **244**, 180-198.

- Pierreux, C. E., Vanhorenbeeck, V., Jacquemin, P., Lemaigre, F. P. and Rousseau, G. G.** (2004). The transcription factor hepatocyte nuclear factor-6/Onecut-1 controls the expression of its paralog Onecut-3 in developing mouse endoderm. *J Biol Chem* **279**, 51298-51304.
- Pierreux, C. E., Poll, A. V., Kemp, C. R., Clotman, F., Maestro, M. A., Cordi, S., Ferrer, J., Leyns, L., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P.** (2006). The transcription factor hepatocyte nuclear factor-6 controls the development of pancreatic ducts in the mouse. *Gastroenterology* **130**, 532-541.
- Plumb-Rudewiez, N., Clotman, F., Strick-Marchand, H., Pierreux, C. E., Weiss, M. C., Rousseau, G. G. and Lemaigre, F. P.** (2004). Transcription factor HNF-6/OC-1 inhibits the stimulation of the HNF-3alpha/Foxa1 gene by TGF-beta in mouse liver. *Hepatology* **40**, 1266-1274.
- Polleux, F., Ince-Dunn, G. and Ghosh, A.** (2007). Transcriptional regulation of vertebrate axon guidance and synapse formation. *Nat Rev Neurosci* **8**, 331-340.
- Postigo, A. A.** (2003). Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *Embo J* **22**, 2443-2452.
- Poustka, A. J., Kuhn, A., Radosavljevic, V., Wellenreuther, R., Lehrach, H. and Panopoulou, G.** (2004). On the origin of the chordate central nervous system: expression of onecut in the sea urchin embryo. *Evol Dev* **6**, 227-236.
- Price, S. R. and Briscoe, J.** (2004). The generation and diversification of spinal motor neurons: signals and responses. *Mechanisms of development* **121**, 1103-1115.
- Price, S. R., De Marco Garcia, N. V., Ranscht, B. and Jessell, T. M.** (2002). Regulation of motor neuron pool sorting by differential expression of type II cadherins. *Cell* **109**, 205-216.
- Rakic, P.** (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia* **46**, 882-891.
- Rallu, M., Corbin, J. G. and Fishell, G.** (2002). Parsing the prosencephalon. *Nat Rev Neurosci* **3**, 943-951.
- Rausa, F. M., Tan, Y. and Costa, R. H.** (2003). Association between hepatocyte nuclear factor 6 (HNF-6) and FoxA2 DNA binding domains stimulates FoxA2 transcriptional activity but inhibits HNF-6 DNA binding. *Mol Cell Biol* **23**, 437-449.
- Ravassard, P., Chatail, F., Mallet, J. and Icard-Liepkalns, C.** (1997). Relax, a novel rat bHLH transcriptional regulator transiently expressed in the ventricular proliferating zone of the developing central nervous system. *J Neurosci Res* **48**, 146-158.
- Rousseau, G. G.** (2003). [Onecut transcription factors: role in the development of the pancreas and the liver]. *Bull Mem Acad R Med Belg* **158**, 207-212; discussion 212-204.

**Rousso, D. L., Gaber, Z. B., Wellik, D., Morrisey, E. E. and Novitch, B. G.** (2008). Coordinated actions of the forkhead protein Foxp1 and Hox proteins in the columnar organization of spinal motor neurons. *Neuron* **59**, 226-240.

**Rowitch, D. H., Lu, Q. R., Kessar, N. and Richardson, W. D.** (2002). An 'oligarchy' rules neural development. *Trends Neurosci* **25**, 417-422.

**Samadani, U. and Costa, R. H.** (1996). The transcriptional activator hepatocyte nuclear factor 6 regulates liver gene expression. *Mol Cell Biol* **16**, 6273-6284.

**Sasakura, Y. and Makabe, K. W.** (2001). A gene encoding a new ONECUT class homeodomain protein in the ascidian *Halocynthia roretzi* functions in the differentiation and specification of neural cells in ascidian embryogenesis. *Mech Dev* **104**, 37-48.

**Segawa, H., Miyashita, T., Hirate, Y., Higashijima, S., Chino, N., Uyemura, K., Kikuchi, Y. and Okamoto, H.** (2001). Functional repression of Islet-2 by disruption of complex with Ldb impairs peripheral axonal outgrowth in embryonic zebrafish. *Neuron* **30**, 423-436.

**Seuntjens, E., Nityanandam, A., Miquelajauregui, A., Debruyne, J., Stryjewska, A., Goebbels, S., Nave, K. A., Huylebroeck, D. and Tarabykin, V.** (2009). Sip1 regulates sequential fate decisions by feedback signaling from postmitotic neurons to progenitors. *Nat Neurosci* **12**, 1373-1380.

**Sharma, K., Leonard, A. E., Lettieri, K. and Pfaff, S. L.** (2000). Genetic and epigenetic mechanisms contribute to motor neuron pathfinding. *Nature* **406**, 515-519.

**Simion, A., Laudadio, I., Prevot, P. P., Raynaud, P., Lemaigre, F. P. and Jacquemin, P.** (2010). MiR-495 and miR-218 regulate the expression of the Onecut transcription factors HNF-6 and OC-2. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 293-298.

**Sockanathan, S. and Jessell, T. M.** (1998). Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons. *Cell* **94**, 503-514.

**Sockanathan, S., Perlmann, T. and Jessell, T. M.** (2003). Retinoid receptor signaling in postmitotic motor neurons regulates rostrocaudal positional identity and axonal projection pattern. *Neuron* **40**, 97-111.

**Song, M. R. and Pfaff, S. L.** (2005). Hox genes: the instructors working at motor pools. *Cell* **123**, 363-365.

**Song, M. R., Sun, Y., Bryson, A., Gill, G. N., Evans, S. M. and Pfaff, S. L.** (2009). Islet-to-LMO stoichiometries control the function of transcription complexes that specify motor neuron and V2a interneuron identity. *Development* **136**, 2923-2932.

**Stamatakis, D., Ulloa, F., Tsoni, S. V., Mynett, A. and Briscoe, J.** (2005). A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes & development* **19**, 626-641.

- Tam, W. L. and Lim, B.** (2008). Genome-wide transcription factor localization and function in stem cells. In *StemBook*. Cambridge (MA).
- Tanabe, Y., William, C. and Jessell, T. M.** (1998). Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* **95**, 67-80.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133.
- Thaler, J., Harrison, K., Sharma, K., Lettieri, K., Kehrl, J. and Pfaff, S. L.** (1999). Active suppression of interneuron programs within developing motor neurons revealed by analysis of homeodomain factor HB9. *Neuron* **23**, 675-687.
- Thaler, J. P., Lee, S. K., Jurata, L. W., Gill, G. N. and Pfaff, S. L.** (2002). LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions. *Cell* **110**, 237-249.
- Thaler, J. P., Koo, S. J., Kania, A., Lettieri, K., Andrews, S., Cox, C., Jessell, T. M. and Pfaff, S. L.** (2004). A postmitotic role for Isl-class LIM homeodomain proteins in the assignment of visceral spinal motor neuron identity. *Neuron* **41**, 337-350.
- Trainor, P. A. and Krumlauf, R.** (2000). Patterning the cranial neural crest: hindbrain segmentation and Hox gene plasticity. *Nat Rev Neurosci* **1**, 116-124.
- Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S. B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T. M. and Pfaff, S. L.** (1994). Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell* **79**, 957-970.
- Uemura, O., Okada, Y., Ando, H., Guedj, M., Higashijima, S., Shimazaki, T., Chino, N., Okano, H. and Okamoto, H.** (2005). Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Developmental biology* **278**, 587-606.
- Vallstedt, A., Muhr, J., Pattyn, A., Pierani, A., Mendelsohn, M., Sander, M., Jessell, T. M. and Ericson, J.** (2001). Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motor neuron and interneuron specification. *Neuron* **31**, 743-755.
- Van de Putte, T., Maruhashi, M., Francis, A., Nelles, L., Kondoh, H., Huylebroeck, D. and Higashi, Y.** (2003). Mice lacking ZFH1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* **72**, 465-470.
- van Grunsven, L. A., Schellens, A., Huylebroeck, D. and Verschueren, K.** (2001). SIP1 (Smad interacting protein 1) and deltaEF1 (delta-crystallin enhancer binding factor) are structurally similar transcriptional repressors. *J Bone Joint Surg Am* **83-A Suppl 1**, S40-47.

- Vanderpool, C., Sparks, E. E., Huppert, K. A., Gannon, M., Means, A. L. and Huppert, S. S.** (2011). Genetic interactions between hepatocyte nuclear factor-6 and notch signaling regulate mouse intrahepatic bile duct development in vivo. *Hepatology*.
- Vanhorenbeeck, V., Jacquemin, P., Lemaigre, F. P. and Rousseau, G. G.** (2002). OC-3, a novel mammalian member of the ONECUT class of transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 848-854.
- Vanhorenbeeck, V., Jenny, M., Cornut, J. F., Gradwohl, G., Lemaigre, F. P., Rousseau, G. G. and Jacquemin, P.** (2007). Role of the Onecut transcription factors in pancreas morphogenesis and in pancreatic and enteric endocrine differentiation. *Dev Biol* **305**, 685-694.
- Vermot, J., Schuhbaur, B., Le Mouellic, H., McCaffery, P., Garnier, J. M., Hentsch, D., Brulet, P., Niederreither, K., Chambon, P., Dolle, P. et al.** (2005). Retinaldehyde dehydrogenase 2 and Hoxc8 are required in the murine brachial spinal cord for the specification of Lim1+ motoneurons and the correct distribution of Islet1+ motoneurons. *Development* **132**, 1611-1621.
- Verschueren, K., Remacle, J. E., Collart, C., Kraft, H., Baker, B. S., Tylzanowski, P., Nelles, L., Wuytens, G., Su, M. T., Bodmer, R. et al.** (1999). SIP1, a novel zinc finger homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 20489-20498.
- Wang, B., Weidenfeld, J., Lu, M. M., Maika, S., Kuziel, W. A., Morrissey, E. E. and Tucker, P. W.** (2004). Foxp1 regulates cardiac outflow tract, endocardial cushion morphogenesis and myocyte proliferation and maturation. *Development* **131**, 4477-4487.
- Wang, K. and Holterman, A. X.** (2012). Pathophysiologic role of hepatocyte nuclear factor 6. *Cell Signal* **24**, 9-16.
- Wildner, H., Muller, T., Cho, S. H., Brohl, D., Cepko, C. L., Guillemot, F. and Birchmeier, C.** (2006). dILA neurons in the dorsal spinal cord are the product of terminal and non-terminal asymmetric progenitor cell divisions, and require Mash1 for their development. *Development* **133**, 2105-2113.
- William, C. M., Tanabe, Y. and Jessell, T. M.** (2003). Regulation of motor neuron subtype identity by repressor activity of Mnx class homeodomain proteins. *Development* **130**, 1523-1536.
- Wu, F., Sapkota, D., Li, R. and Mu, X.** (2011). Onecut 1 and onecut 2 are potential regulators of mouse retinal development. *J Comp Neurol*.
- Wu, S., Wu, Y. and Capecchi, M. R.** (2006). Motoneurons and oligodendrocytes are sequentially generated from neural stem cells but do not appear to share common lineage-restricted progenitors in vivo. *Development* **133**, 581-590.

**Wu, Y., Wang, G., Scott, S. A. and Capecchi, M. R.** (2008). Hoxc10 and Hoxd10 regulate mouse columnar, divisional and motor pool identity of lumbar motoneurons. *Development* **135**, 171-182.

**Yip, Y. P., Zhou, G., Capriotti, C. and Yip, J. W.** (2004). Location of preganglionic neurons is independent of birthdate but is correlated to reelin-producing cells in the spinal cord. *J Comp Neurol* **475**, 564-574.

**Yip, Y. P., Kronstadt-O'Brien, P., Capriotti, C., Cooper, J. A. and Yip, J. W.** (2007). Migration of sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord is regulated by Reelin-dependent Dab1 tyrosine phosphorylation and CrkL. *J Comp Neurol* **502**, 635-643.

**Yip, Y. P., Zhou, G., Kubo, K., Nakajima, K. and Yip, J. W.** (2011). Reelin inhibits migration of sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord of the chick. *J Comp Neurol* **519**, 1970-1978.

**Yoshimoto, A., Saigou, Y., Higashi, Y. and Kondoh, H.** (2005). Regulation of ocular lens development by Smad-interacting protein 1 involving Foxe3 activation. *Development* **132**, 4437-4448.

**Zhou, Q. and Anderson, D. J.** (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* **109**, 61-73.