



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Gènes, Cellules et Développement*

---

Présentée et soutenue par *Romain MADELAINE*  
Le 11 février 2011

**Titre :**

*Identification de nouveaux gènes cibles du facteur proneural Ngn1 et analyse de leurs fonctions dans la détermination et la spécification neuronale chez le poisson zèbre.*

---

**JURY**

*Pr. Cathy Soula, Présidente du jury*  
*Dr. Sylvie Schneider-Maunoury, Rapporteur*  
*Dr. François Guillemot, Rapporteur*  
*Dr. Alexandre Pattyn, Examineur*  
*Dr. Patrick Blader, Directeur de thèse*

---

**Ecole doctorale :** *Biologie, Santé et Biotechnologies (BSB).*  
**Unité de recherche :** *Centre de Biologie du Développement (UMR5547).*  
**Directeur(s) de Thèse :** *Dr. Patrick Blader*  
**Rapporteurs :** *Dr. Sylvie Schneider-Maunoury et Dr. François Guillemot*

## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	<b>3</b>
I. La régionalisation du système nerveux central chez les vertébrés.....	3
1. L'induction neurale chez les vertébrés.....	3
a) Le bouclier comme centre organisateur.....	3
b) Les signaux instructifs du <i>Yolk Syncytial Layer</i> (YSL).....	4
2. La régionalisation de la plaque neurale.....	6
a) La régionalisation antéro-postérieure et médio-latérale.....	6
b) La régionalisation et la segmentation du rhombencéphale.....	7
c) Les gènes de prépattern et la neurogenèse.....	9
II. Les gènes proneuraux et la détermination neurale.....	11
1. Les deux familles de gènes proneuraux : <i>atonal</i> et <i>achaete-scute</i> .....	12
2. La détermination neurale et l'inhibition latérale.....	14
a) Chez la drosophile.....	14
b) Chez les vertébrés.....	17
c) L'expression des gènes <i>hes</i> et <i>ngn</i> oscille dans les progéniteurs neuraux.....	18
III. La formation du neurone de Mauthner : un exemple de la régionalisation et de la neurogenèse dans le système nerveux central du poisson zèbre.....	20
IV. Les mécanismes de contrôle de l'identité neuronale chez les vertébrés.....	22
1. La spécification neuronale dans la moelle épinière par les morphogènes.....	23
a) La régionalisation ventrale par <i>Shh</i> .....	23
b) La régionalisation dorsale par <i>BMP</i> .....	26
2. La combinatoire des facteurs de transcription et la spécification des sous types neuronaux de la rétine.....	29
3. La spécification neuronale par les gènes proneuraux.....	31
a) Activités divergentes des facteurs proneuraux dans la spécification neuronale.....	31
b) Contrôle de l'activité spécifique des facteurs proneuraux.....	33
V. Identification de nouveaux gènes cibles des facteurs proneuraux impliqués de la spécification neuronale.....	36
1. <i>Ascl1</i> et <i>Insm1</i> contrôlent la spécification des neurones monoaminergiques et la synthèse de sérotonine.....	36
2. <i>Ngn2</i> contrôle de la migration neuronale.....	38
<b>Résultats et discussion</b> .....	<b>41</b>
I. Activités divergentes entre les gènes proneuraux de la famille <i>atonal</i> et <i>achaete-scute</i> chez le poisson zèbre.....	41
1. Etablissement et validation des lignées transgéniques inductibles par choc thermique pour <i>ngn1</i> et <i>ascl1a</i> .....	41
2. Activités redondantes et divergentes des gènes proneuraux <i>ngn1</i> et <i>ascl1a</i> chez le poisson zèbre.....	43
3. <i>Ngn1</i> et <i>Ascl1a</i> ont des activités spécifiques qui permettent de contrôler l'identité des neurones.....	46
4. <i>Ngn1</i> et <i>Ascl1a</i> ont des activités spécifiques pour la formation du neurone de Mauthner.....	48
5. Identification de gènes cibles spécifiques ou communs aux facteurs proneuraux...	49
6. Conclusion.....	51
II. A cluster of non-redundant <i>Ngn1</i> binding sites is required for specific deltaA expression in zebrafish.....	53
III. L'activation autonome cellulaire des gènes <i>her</i> par <i>Ngn1</i> bloque la différenciation neuronale.....	64

1.	L'activité de Ngn1 n'est pas suffisante pour induire un phénotype neurogénique..	64
2.	Ngn1 peut induire l'expression de <i>her4</i> de manière autonome cellulaire et indépendamment de l'activité de la voie Notch. ....	66
3.	L'activation de <i>her4</i> par Ngn1 est corrélée à une inhibition de la différenciation neuronale. ....	67
4.	L'activation de <i>her4</i> par Ngn1 conduit à une diminution de la transcription de <i>ngn1</i> . ....	68
5.	La perte d'activité des gènes <i>her</i> entraîne une différenciation neuronale massive..	69
6.	Conclusion.....	72
7.	Perspectives.....	72
IV.	Partially redundant proneural function reveals the importance of timing during zebrafish olfactory neurogenesis.....	75
V.	Neurogenin1 regulates the projection of axons of olfactory neurons via its target <i>cxcr4b</i> . ....	112
	<b>Discussion générale .....</b>	<b>133</b>
I.	Ngn1 régule l'expression d'un réseau de gènes impliqués dans le contrôle de la détermination neurale.....	133
1.	Les oscillations entre Ngn et Her sont régulées par un double rétrocontrôle négatif autonome et non autonome cellulaire.....	133
2.	Le différentiel d'activité entre Ngn et Her est régulé par de nombreux facteurs...	135
3.	L'intégration du niveau d'activité et des interactions entre tous les facteurs : une nécessité pour modéliser la différenciation neuronale ? .....	137
II.	Ngn1 contrôle la guidance axonale des neurones olfactifs par la régulation d'un ensemble de gènes.....	140
1.	Les activités redondantes de Ngn1 et NeuroD4 sont conservées pour la neurogenèse habenulaire. ....	140
2.	Assemblage de la placode olfactive dans le mutant <i>ngn1</i> .....	143
3.	<i>cxcr4b</i> et <i>robo2/olfm1b</i> sont exprimés à des étapes différentes de la neurogenèse. ....	143
4.	Distinction des fonctions de Ngn1 et Cxcr4b dans l'établissement de la guidance axonale des neurones de la placode olfactive.....	144
5.	Ngn1 et ses cibles transcriptionnelles comme gènes impliqués dans le syndrome multi-génétique de Kallmann ? .....	147
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>151</b>

# Introduction

## I. La régionalisation du système nerveux central chez les vertébrés.

Le système nerveux central des vertébrés est sans aucun doute le tissu le plus complexe du point de vue de la variété de cellules qui le composent. La mise en place d'un système nerveux fonctionnel nécessite que différents types cellulaires soient générés à un temps et à une place définie. La première étape conduisant à la formation du système est l'induction neurale qui permet de définir l'ectoderme neural ou plaque neurale. La plaque neurale sera ensuite régionalisée en différents domaines. Dans ce chapitre, je vais décrire les mécanismes d'induction neurale et de régionalisation du système nerveux puis leur importance dans le bon développement du système nerveux central.

### 1. L'induction neurale chez les vertébrés.

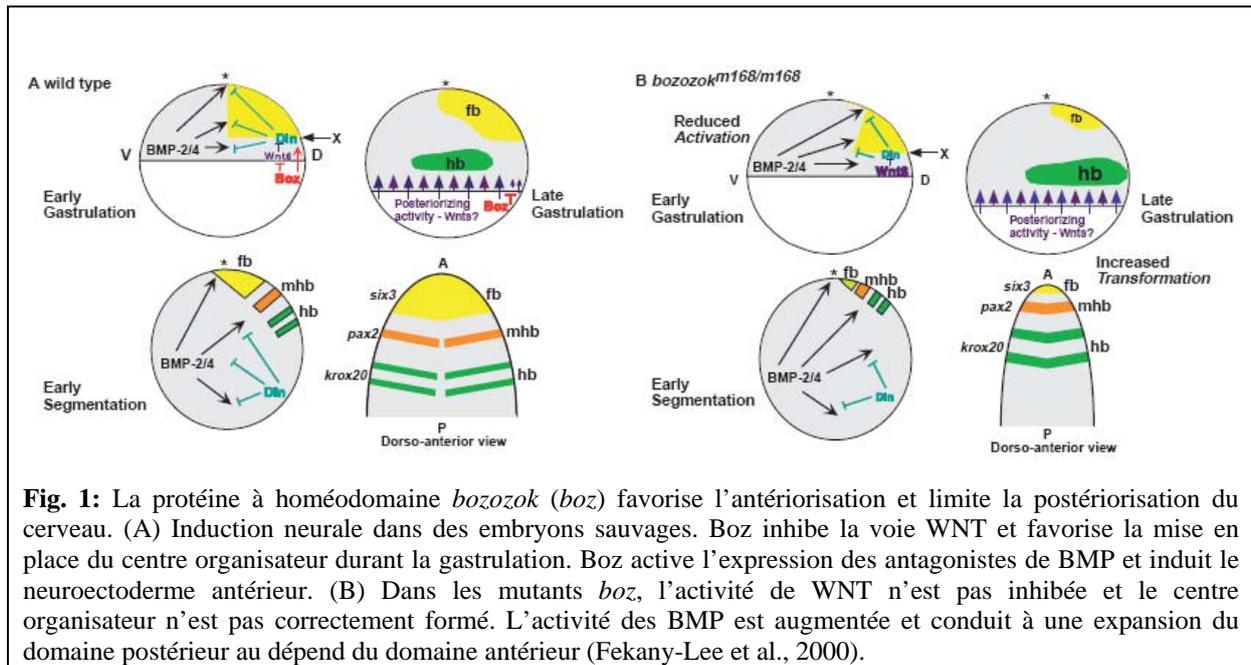
#### a) Le bouclier comme centre organisateur.

Chez les vertébrés, le système nerveux central émerge d'une région spécifique de l'ectoderme appelée plaque neurale qui va ensuite se transformer en tube neural durant la neurulation. La plaque neurale est spécifiée durant la gastrulation à partir de l'ectoderme dorsal. Par défaut, le destin de l'ectoderme est neural. En effet, chez le xénope, des expériences de dissociation de cellules ont mis en évidence que les cellules expriment des marqueurs du neuroectoderme (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1994; Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1997). L'addition de protéines BMP (Bone morphogenetic protein) de la famille des TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) dans les explants d'ectoderme a pour effet de promouvoir un destin épidermique au dépend de l'ectoderme neural (Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1997). Chez le poisson zèbre, *swirl* (*swr*), *snailhouse* (*snh*) et *somitabun* (*sbn*), trois mutants pour, respectivement, BMP2, BMP7 et Smad5 (qui est un effecteur de la voie BMP) ont mis en évidence que la perte d'activité de la voie BMP induit une expansion de l'ectoderme neural vis-à-vis de l'ectoderme non neural (Hild et al., 1999; Kishimoto et al., 1997; Nguyen et al., 1998). La formation de l'ectoderme neural nécessite donc l'inhibition de l'activité des protéines BMP.

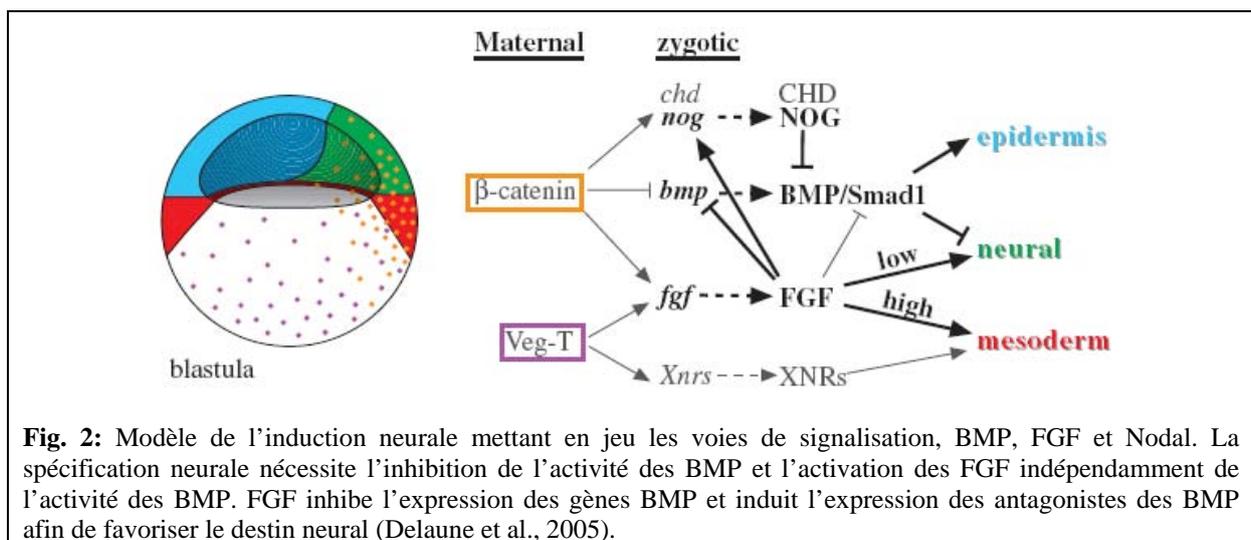
La régionalisation de la plaque neurale est liée à la mise en place de l'axe dorso-ventral au stade blastula. Lors de l'induction neurale, le mésoderme dorsal est la source d'expression de molécules inhibitrices de l'activité de BMP comme Chordin, Noggin et Follistatin (Smith and Harland, 1992; Smith et al., 1993; Zimmerman et al., 1996). Ces protéines se fixent au ligand BMP et empêchent la liaison des protéines BMP à leur récepteur. La surexpression de ces facteurs dans un embryon de xénope a pour effet de dorsaliser l'embryon et de favoriser la formation du neuroectoderme (Iemura et al., 1998; Piccolo et al., 1996). Chez le poisson zèbre, lors de la gastrulation, le centre organisateur responsable de l'expression des molécules inhibitrices de l'activité BMP est localisé au niveau du bouclier (le bouclier/shield est l'équivalent du centre organisateur de Spemann de xénope). De manière cohérente avec le rôle des antagonistes des BMP dans l'induction neurale, le mutant *dino* (*din*)/*chordino* (*chd*), qui est mutant pour *chordin*, présente une expansion de l'ectoderme non neural et une réduction de l'ectoderme neural (Bauer et al., 1998; Furthauer et al., 1999; Schulte-Merker et al., 1997). Néanmoins, les embryons mutants pour *chordin* ont toujours un système nerveux, suggérant que l'expression de Noggin et Follistatin par le bouclier compense la perte d'activité de Chordin.

#### **b) Les signaux instructifs du Yolk Syncitial Layer (YSL).**

Certaines études ont mis en évidence que l'inhibition des protéines BMP par le centre organisateur n'est pas suffisante pour l'induction neurale, suggérant alors que des signaux instructifs sont requis (Feldman et al., 1998; Gritsman et al., 1999; Shih and Fraser, 1996; Wilson and Edlund, 2001). En effet, les signaux de la voie WNT/ $\beta$ -Catenin sont nécessaires et suffisants à la répression des gènes *bmp* (Baker et al., 1999). Chez le poisson zèbre, les facteurs WNT sont exprimés à partir d'un centre organisateur appelé Yolk Syncitial Layer (YSL) situé à la limite du vitellus à mid-blastula (Ho et al., 1999). La sécrétion des signaux WNT par le YSL activent l'expression d'un facteur à homéodomaine répresseur, *bazozok* (Fekany et al., 1999; Koos and Ho, 1998; Yamanaka et al., 1998). Au stade gastrula, Bazozok est capable de réprimer l'expression des protéines BMP et WNT (WNT8 inhibe l'expression de *chordin* à ce stade) et ainsi de permettre l'induction neurale (Fekany-Lee et al., 2000) (*Figure 1*).



Le mutant *bazozok* présente une expression de BMP et WNT8 renforcée au dépend de Chordin qui a pour effet de réduire le territoire neural et la taille du cerveau antérieur (Fekany-Lee et al., 2000). D'autre part, Squint (Nodal/TGF- $\beta$ ) est également exprimé dans l'YSL au stade blastula. Son expression est nécessaire à l'expression des antagonistes de BMP en parallèle de l'activité de *Boz* au stade gastrula (Shimizu et al., 2000; Sirotkin et al., 2000). Finalement, certaines études ont montré que l'inhibition de la voie BMP par ses antagonistes nécessite l'activité de la voie FGF (Fibroblaste Growth Factor) qui a également un rôle instructif sur la détermination neurale (Delaune et al., 2005; Furthauer et al., 1997; Marchal et al., 2009; Wilson et al., 2000) (Figure 2).



En conclusion, on peut dire que le mécanisme principal lors de l'induction neurale chez les vertébrés est l'inhibition des protéines BMP par les antagonistes tels que Chordin. Néanmoins, d'autres signaux inducteurs comme WNT et FGF sont requis. De plus, chez le poisson zèbre la voie Nodal agit pour renforcer l'expression de Chordin et Noggin dans le bouclier. Ces résultats suggèrent que l'intégration des signaux d'au moins quatre voies de signalisation est nécessaire au mécanisme d'induction neural durant la gastrulation.

## **2. La régionalisation de la plaque neurale.**

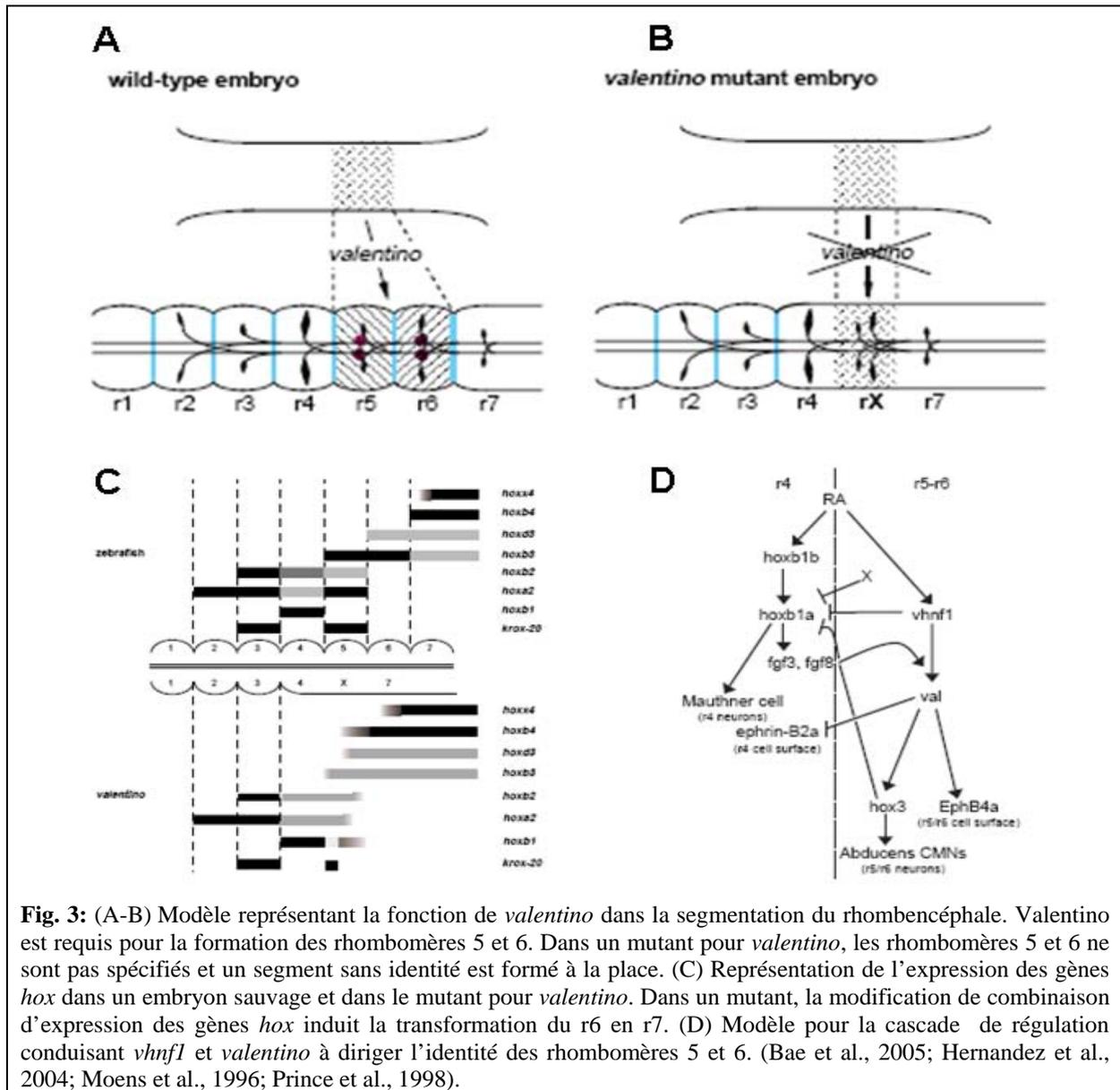
### **a) La régionalisation antéro-postérieure et médio-latérale.**

A la fin de la gastrulation, lorsque la plaque neurale est formée, celle-ci est régionalisée dans l'axe antéro-postérieur et médio-latéral. Dans un premier temps, la régionalisation de plaque neurale permet de définir de grands sous-domaines qui, par exemple, donneront plus tard le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombomcéphale. Dans un deuxième temps, ces sous-domaines sont encore restreints à des zones où la neurogenèse pourra ou non avoir lieu. La régionalisation médio-latérale de la plaque neurale s'effectue par l'expression des gènes BMP au niveau de l'ectoderme non-neural, flanquant la plaque neurale à son extrémité la plus latérale, et par Shh qui est exprimé par la notochorde au niveau médial (Chiang et al., 1996; Liem et al., 1995). L'axe antéro-postérieur est défini grâce à l'intégration de trois voies de signalisation qui sont les voies de l'AR (Acide Rétinoïque), des FGF et WNT (Gavalas and Krumlauf, 2000; Koshida et al., 1998; Yamaguchi, 2001). L'action de ces trois voies de signalisation (exprimées à partir du mésoderme caudal) a pour effet de postérioriser l'ectoderme neural. En addition, un effet antériorisant est induit par un groupe de cellules situées à l'extrémité antérieure de la plaque neurale appelée ANB (Appel, 2000; Houart et al., 2002; Houart et al., 1998). Chez le poisson zèbre, les cellules de l'ANB permettent d'antagoniser l'activité de la voie WNT afin de permettre le développement de la plaque neurale antérieure.

L'intégration des signaux mettant en place les axes médio-latéral et antéro-postérieur permettent de définir des territoires spécifiques dans la plaque neurale. Ces territoires sont caractérisés par l'expression d'une combinaison de facteurs de transcription qui relaient une information de position qui permettra de régionaliser correctement le cerveau et le tube neural.

## **b) La régionalisation et la segmentation du rhombencéphale.**

Les voies de signalisations FGF, WNT et AR permettent de définir les territoires présomptifs du télencéphale, diencéphale, mésencéphale et rhombencéphale. Ainsi, si la régionalisation de la plaque neurale est correcte (caractérisée par une combinaison de facteurs de transcription), le cerveau sera subdivisé en ces différentes structures. Chez le poisson zèbre, le gène *iro7* et le gène à homéodomaine *vhnf1* sont exprimés dans des domaines distincts mais complémentaires dans la plaque neurale (Lecaudey et al., 2004). Ces deux gènes peuvent s'inhiber mutuellement. En conséquence, l'expression postérieure d'*iro7* limite la progression vers la partie antérieure de *vhnf1* et l'expression antérieure de *vhnf1* limite l'expression de *iro7* vers la partie postérieure. De cette façon, ces deux gènes permettent de positionner la future limite entre les rhombomères 4 et 5 du rhombencéphale (Hernandez et al., 2004; Lecaudey et al., 2004; Wiellette and Sive, 2003). La perte de fonction de *iro7* conduit à une expansion du rhombomère 5 au dépend du rhombomère 4. Dans le mutant pour *vhnf1*, le rhombomère 5 acquiert une identité rhombomère 4. *vhnf1* est requis pour la régionalisation des rhombomères 5 et 6 par l'activation de *valentino/kreissler (val)* qui active l'expression de *hox3* qui est nécessaire à la formation des rhombomères 5 et 6. De plus, *vhnf1* inhibe l'expression de *hoxb1a* qui est nécessaire pour l'identité du rhombomère 4. Les embryons mutants pour *vhnf1* et *val* présentent une absence des rhombomères 5 et 6 qui sont remplacés par un rhombomère 4 ectopique dû à une mauvaise combinaison d'expression des gènes *hox* (absence de répression de *hoxb1a* et d'activation de *hox3*). (Hernandez et al., 2004; Moens et al., 1996; Prince et al., 1998; Wiellette and Sive, 2003) (*Figure 3*).



**Fig. 3:** (A-B) Modèle représentant la fonction de *valentino* dans la segmentation du rhombencéphale. Valentino est requis pour la formation des rhombomères 5 et 6. Dans un mutant pour *valentino*, les rhombomères 5 et 6 ne sont pas spécifiés et un segment sans identité est formé à la place. (C) Représentation de l'expression des gènes *hox* dans un embryon sauvage et dans le mutant pour *valentino*. Dans un mutant, la modification de combinaison d'expression des gènes *hox* induit la transformation du r6 en r7. (D) Modèle pour la cascade de régulation conduisant *vhnf1* et *valentino* à diriger l'identité des rhombomères 5 et 6. (Bae et al., 2005; Hernandez et al., 2004; Moens et al., 1996; Prince et al., 1998).

Le gène *spg*, facteur de transcription de la famille POU (*Oct4* chez la souris), joue également un rôle primordial dans la formation du rhombencéphale. Le mutant pour *spg* présente de graves défauts de segmentation du rhombencéphale qui ont pour conséquence de rendre impossible la distinction entre les différents rhombomères (Belting et al., 2001; Hauptmann et al., 2002). En effet, dans ce mutant les frontières entre les rhombomères sont mal positionnées ou absentes, ce qui affecte la variété et l'identité des neurones formés. Ce phénotype est corrélé à des défauts d'expression de gènes impliqués dans la régionalisation du rhombencéphale. En effet, l'expression de gènes comme *krox20*, *epha4*, *val*, *hoxa2*, *hoxb2*, *hoxb3* et *hoxb4*, qui sont nécessaires pour positionner correctement les frontières entre les différents rhombomères, est très fortement affectée (Hauptmann et al., 2002). Ce résultat

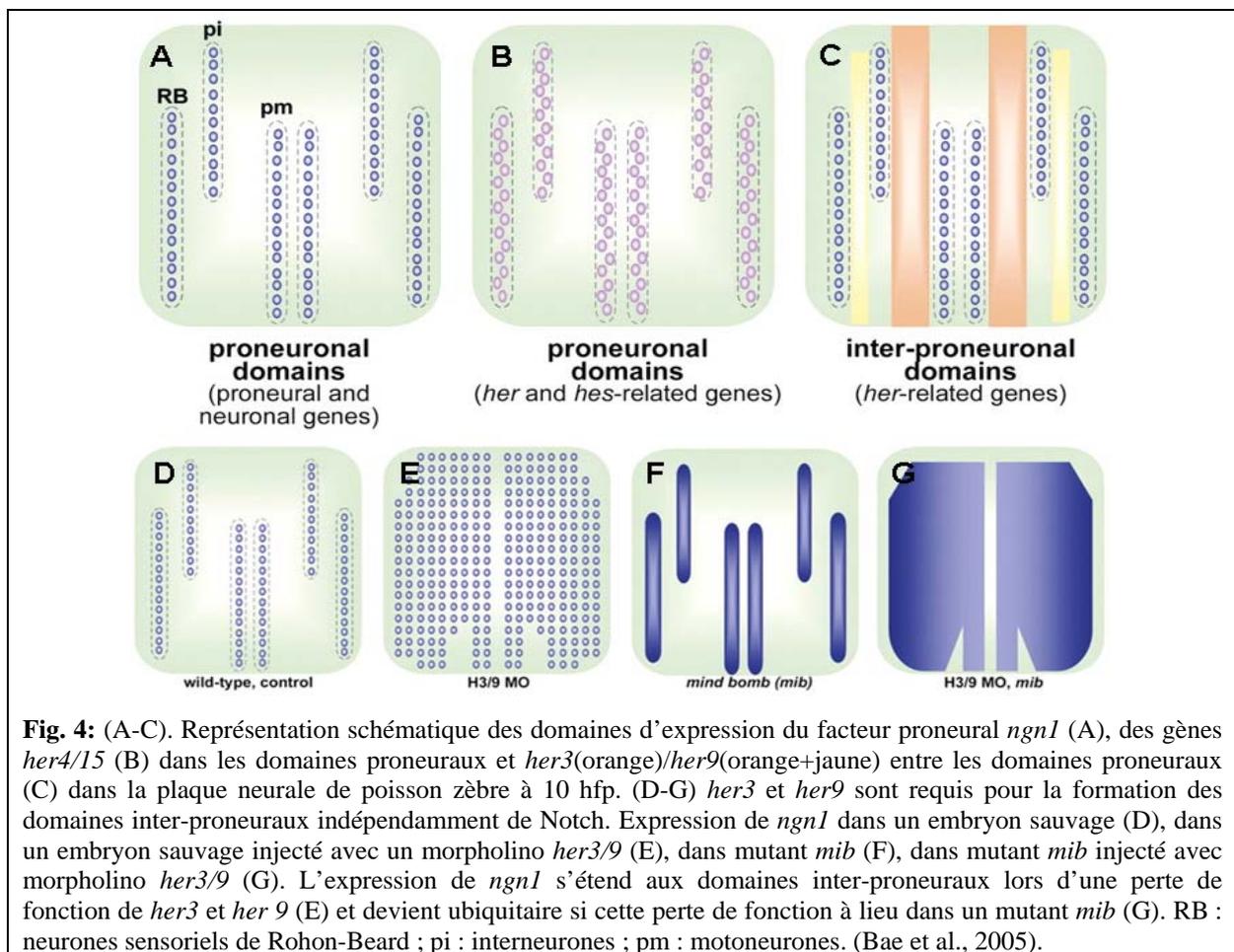
montre que *spg* contrôle la segmentation du rhombencéphale par la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la mise en place des frontières et notamment les gènes *hox*.

Un autre exemple met en évidence l'importance de la régionalisation de la plaque neurale dans la segmentation du rhombocéphale. Il a été montré que certains défauts de formation du rhombencéphale observés dans le mutant *spg* étaient corrélés à une absence de MHB (Midbrain Hindbrain Boundary) (Belting et al., 2001; Burgess et al., 2002). La MHB est une zone à la frontière entre le mésencéphale et le télencéphale où les cellules sont maintenues à l'état de progéniteurs neuraux et ne peuvent pas se différencier (Rhinn and Brand, 2001; Wurst and Bally-Cuif, 2001). Chez le poisson zèbre, ce centre organisateur exprime de nombreux facteurs de transcription de la famille de *otx*, *gbx*, *eng* et *pax* ainsi que des ligands comme *fgf8* et *wnt1* (Rhinn and Brand, 2001; Wurst and Bally-Cuif, 2001). L'absence de MHB dans les mutants *ace* (*fgf8*), *noi* (*pax2.1*) et *spg* (*pou5f1*) entraîne des défauts importants de régionalisation du cerveau. Il semblerait que *fgf8* régule l'expression de *pax2.1* par l'intermédiaire de *spg* ce qui rendrait les cellules de la MHB compétentes pour répondre à la voie de signalisation FGF. Ces observations peuvent expliquer pourquoi les mutants *ace*, *noi* et *spg* ont un phénotype similaire qui est caractérisé par l'absence de MHB et une désorganisation du cerveau. Ces exemples montrent de quelle manière les facteurs de prépattern influencent la régionalisation du système nerveux central.

### c) Les gènes de prépattern et la neurogenèse.

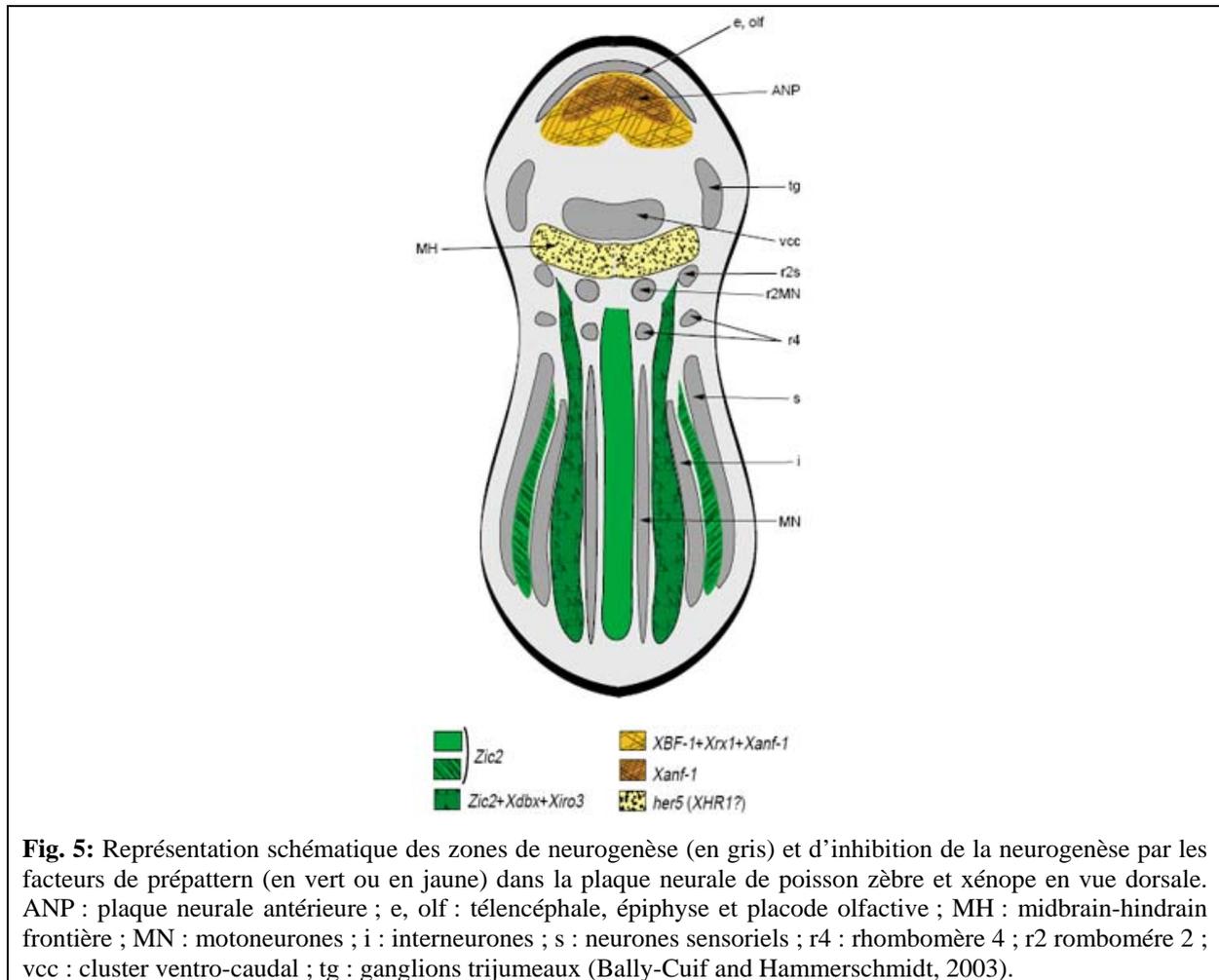
La régionalisation de la plaque neurale aboutit à l'expression de différentes combinaisons de facteurs de transcription qui permettent la formation de structures différentes. Ces facteurs de transcription ont également pour but de définir les zones compétentes pour former des neurones et sont aussi appelés gènes de prépattern. De nombreux facteurs de prépattern sont exprimés dans la plaque neurale et ont la capacité de promouvoir la neurogenèse ou bien de la réprimer dans l'ectoderme neural. Par exemple, il a été montré chez le poisson zèbre que l'un des mécanismes permettant d'inhiber la neurogenèse est contrôlé par l'activité des gènes de la famille *hairy and enhancer of split* (*her*). L'expression des gènes *her3* et *her9* est contrôlée par la voie de signalisation BMP. La perte d'expression de certaines protéines BMP, dans les mutants *snh* et *swr*, a pour effet d'étendre l'expression de *her3* et *her9* au dépend des zones de neurogenèse (Bae et al., 2005). De plus, le mutant *swr* présente des défauts de développement des neurones sensoriels (Barth

et al., 1999). Ce résultat indique que l'expression des BMP régule directement ou indirectement l'information de position contrôlant la mise en place des domaines de neurogenèse. Dans la plaque neurale, les gènes *her3* et *her9* sont exprimés entre les trois bandes longitudinales de neurogenèse et entre les domaines présomptifs des futurs mésencéphale et rhombencéphale (Bae et al., 2005) (Figure 4). La perte de fonction de *her3* et *her9* entraîne une neurogenèse massive dans toute la plaque neurale. Deux autres gènes de la famille *her*, *her5* et *her11*, sont exprimés dans un territoire où la neurogenèse est absente. Ces gènes sont exprimés au niveau de la MHB dans la plaque neurale. Comme pour *her3* et *her9*, la perte de fonction de *her5* et *her11* entraîne une neurogenèse ectopique dans la MHB (Geling et al., 2003; Geling et al., 2004; Ninkovic et al., 2005).



La plaque neurale antérieure exprime une combinaison de facteurs de transcription répresseurs (XBF1, Xrx1, Xanf1 et Zic2) qui empêche la neurogenèse dans ce domaine (Bally-Cuif and Hammerschmidt, 2003). De même dans la plaque neurale postérieure, entre les trois bandes longitudinales de neurogenèse, l'expression des facteurs Zic2, Iro3 ou Xdbx inhibe la différenciation neuronale. La perte d'expression d'un de ces facteurs entraîne un

élargissement des domaines de neurogenèse (Bellefroid et al., 1998; Brewster et al., 1998; Gershon et al., 2000) (*Figure 5*).



Certains autres gènes de prépattern sont nécessaires pour permettre la neurogenèse. Par exemple, chez le poisson zèbre, les gènes *iroquois1* (*iro1*), *iroquois7* (*iro7*) et *spiel-ohne-grenzen* (*spg/pou2/pou5f1*) sont nécessaires (et suffisants pour *iro1* et *iro7*) pour rendre les cellules compétentes à former des neurones (Itoh et al., 2002; Lecaudey et al., 2004; Reim and Brand, 2002).

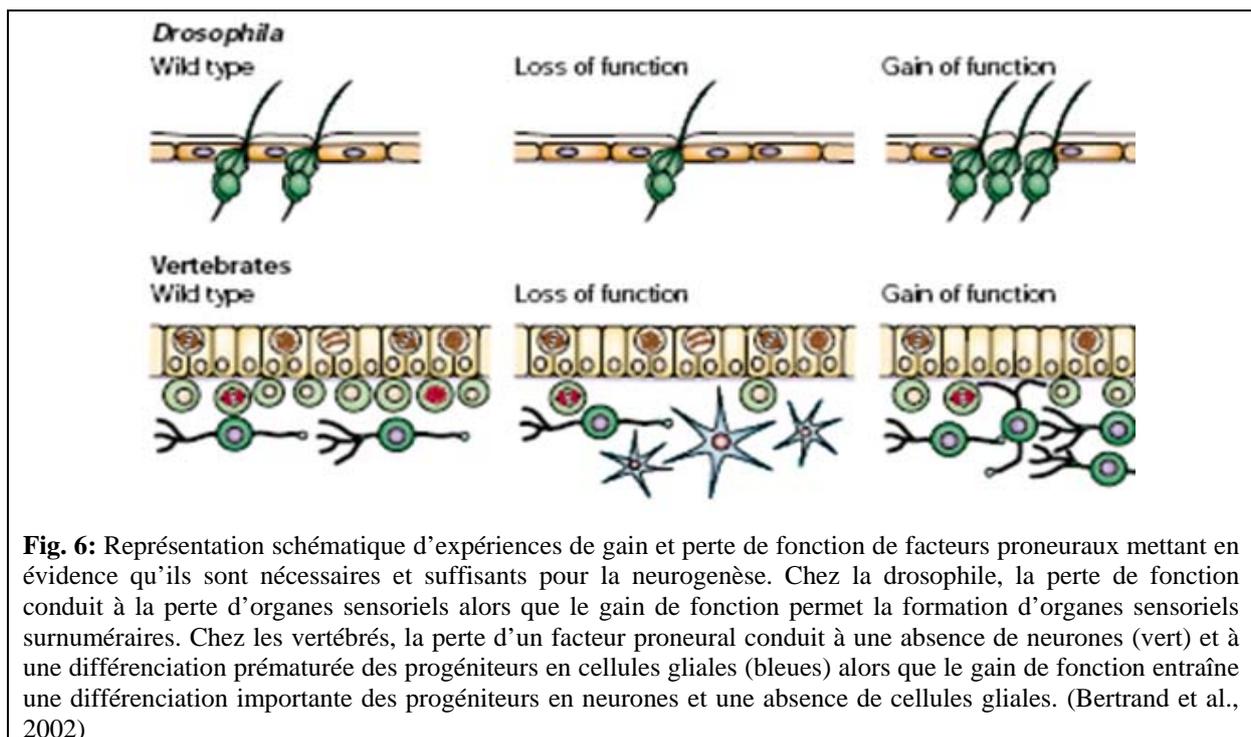
## II. Les gènes proneuraux et la détermination neurale.

Malgré une complexité du système nerveux central et une diversité neuronale plus importante, les vertébrés utilisent les mêmes mécanismes moléculaires que la drosophile lors de la neurogenèse. Une part importante des données que nous possédons actuellement sur la détermination et la spécification des neurones provient d'études basées sur des analyses

génétiques chez la drosophile. Ces expériences ont conduit à l'identification d'une catégorie particulière de gènes dont la perte de fonction entraîne une absence de certains types de neurones : ainsi, ces gènes ont été définis comme proneuraux.

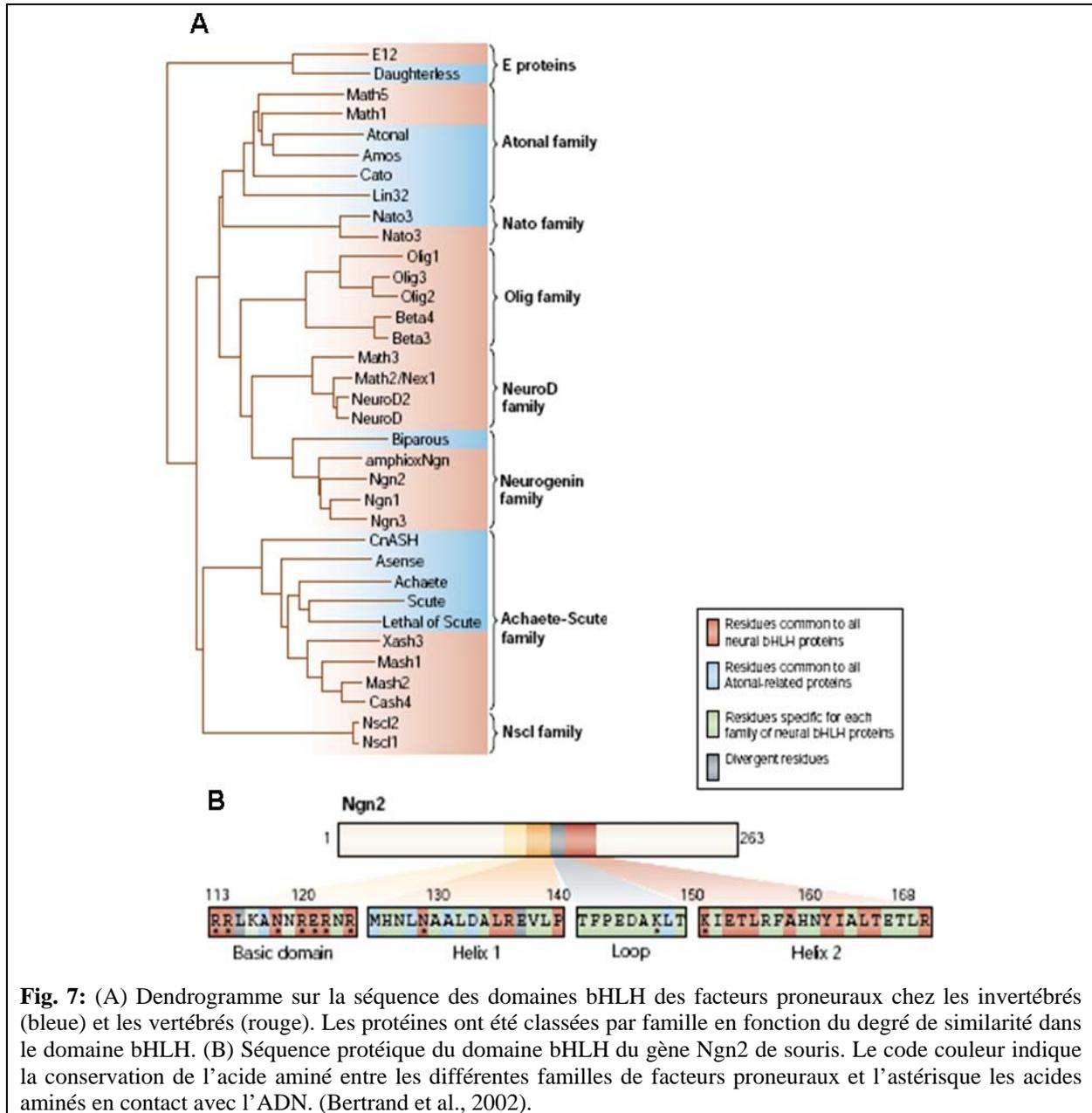
### 1. Les deux familles de gènes proneuraux : *atonal* et *achaete-scute*.

Les premiers gènes proneuraux ont été caractérisés en 1979 par analyse génétique d'une série de mutations réalisées chez la drosophile. Des souches de drosophiles mutantes présentaient une absence d'un type de neurones sensoriels, les organes sensoriels externes (Garcia-Bellido, 1979; Garcia-Bellido and Santamaria, 1978). Ce phénotype est dû à des mutations dans le locus *achaete-scute* (*ac-sc*). Les quatre gènes du complexe *ac-sc* ont été isolés en 1988 et codent pour des facteurs de transcription à domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix) (Ghysen and Dambly-Chaudiere, 1988). Par homologie de séquence avec le domaine bHLH des gènes du complexe *ac-sc*, un autre gène proneural de drosophile a été identifié en 1993, *atonal* (*ato*) (Jarman et al., 1993; Jarman et al., 1994). La perte de fonction de *ato* entraîne l'absence d'autres catégories de neurones sensoriels, les organes chordotonaux, dans le système nerveux périphérique et les photorécepteurs dans la rétine de drosophile (Jarman et al., 1995). Des expériences de gain de fonction ont mis en évidence que la surexpression d'un facteur proneural permet de former des neurones ectopiques. Ces expériences ont permis de définir les facteurs proneuraux comme nécessaires et suffisants à la formation des neurones (Bertrand et al., 2002; Rodriguez et al., 1990) (Figure 6).



**Fig. 6:** Représentation schématique d'expériences de gain et perte de fonction de facteurs proneuraux mettant en évidence qu'ils sont nécessaires et suffisants pour la neurogenèse. Chez la drosophile, la perte de fonction conduit à la perte d'organes sensoriels alors que le gain de fonction permet la formation d'organes sensoriels surnuméraires. Chez les vertébrés, la perte d'un facteur proneural conduit à une absence de neurones (vert) et à une différenciation prématurée des progéniteurs en cellules gliales (bleues) alors que le gain de fonction entraîne une différenciation importante des progéniteurs en neurones et une absence de cellules gliales. (Bertrand et al., 2002)

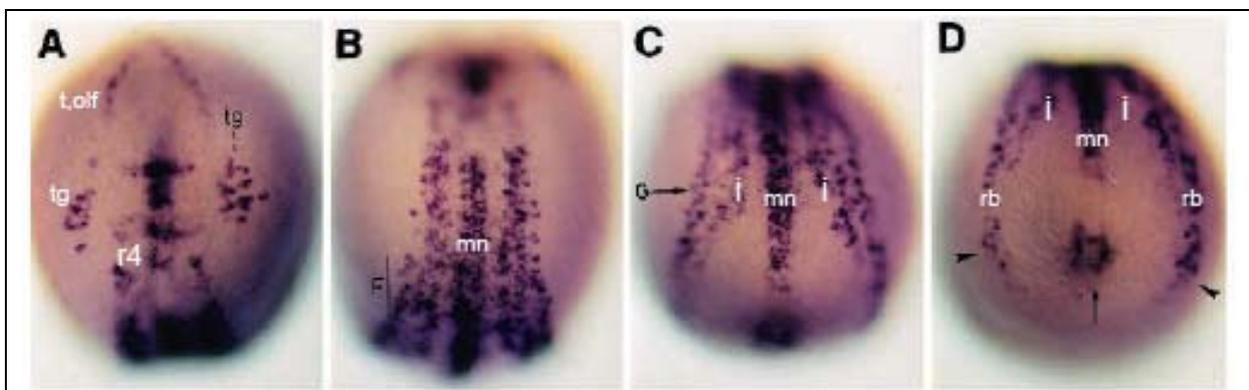
Pour activer la transcription, les facteurs proneuraux s'hétérodimérisent avec d'autres facteurs bHLH ubiquitaires appelés E-protéines. Les domaines bHLH de *ac-sc* et *ato* ont 70% d'homologie, cette légère différence de composition en acides aminés a permis de définir deux grandes familles de gènes proneuraux (*Figure 7*).



Ces deux familles sont conservées chez les vertébrés où tout comme chez la drosophile, la perte de fonction de certains homologues des gènes *ac-sc* ou *ato* entraîne la perte de différents sous-types neuronaux (Bertrand et al., 2002; Campos-Ortega, 1998). Chez le poisson zèbre, les homologues de *ac-sc* et *ato* sont respectivement *ascl1a/b* et *ngn1* (Allende and Weinberg, 1994; Blader et al., 1997). La perte de fonction de *ngn1* entraîne une perte des neurones

sensoriels de Rohon-Beard et des ganglions trijumeaux. Le mutant pour *ascl1a* est caractérisé par une absence des neurones de l'adénohypophyse (Andermann et al., 2002; Cornell and Eisen, 2002; Pogoda et al., 2006).

Après la régionalisation de la plaque neurale, les gènes de prépattern définissent les zones de neurogenèse primaire chez le poisson zèbre. Ces domaines de neurogenèse sont caractérisés par l'expression de *ngn1* (Blader et al., 1997). On peut observer dans la partie la plus antérieure de l'embryon, une population de cellules qui donneront naissance au télencéphale et aux placodes olfactives. Dans la partie postérieure, les trois bandes longitudinales correspondent aux neurones sensoriels, interneurons et motoneurons (Blader et al., 1997; Haddon et al., 1998) (*Figure 8*).

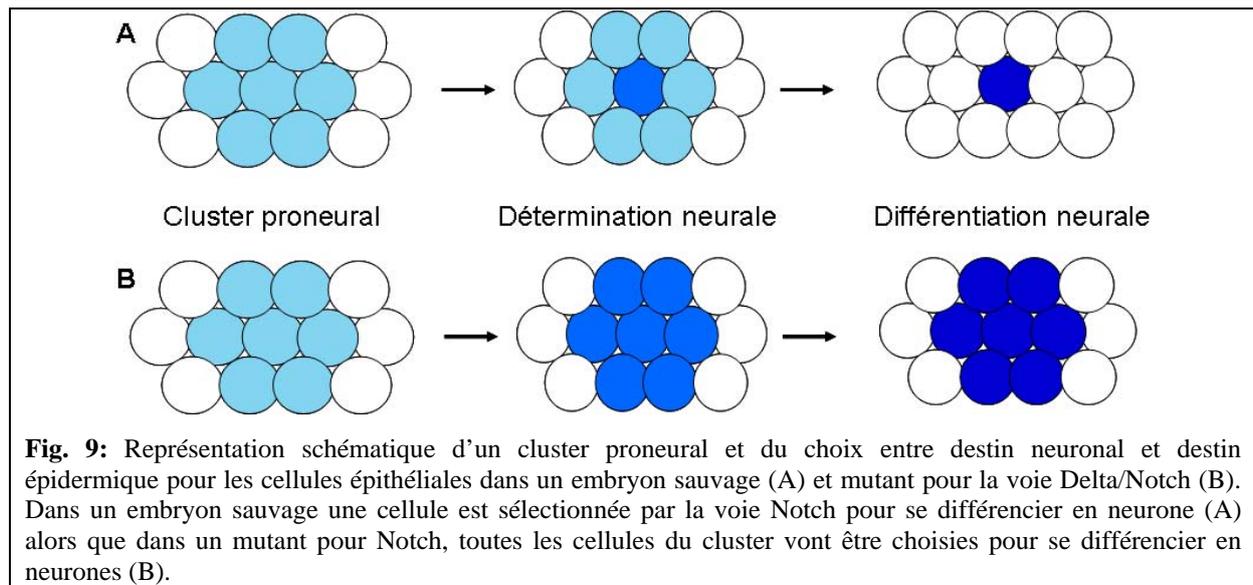


**Fig. 8:** (A-D) Expression de *ngn1* dans l'embryon de poisson zèbre à 12 hpf. Vue dorsale, partie antérieure en haut. (A) Vue de la plaque neurale antérieure. tg : ganglions trijumeaux ; r4 : rhombomère 4 ; t,olf : télencéphale, olfactory placode. (B) Vue de la partie intermédiaire de la plaque neurale. mn: motoneurons. (C) Vue de la partie postérieure de la plaque neurale. i : interneurons (D) Vue du bourgeon de queue. rb : neurones sensoriels de Rohon-Beard. (Blader et al., 1997). La tête de flèche noire représente les neurones sensoriels de rb et la flèche noire le bourgeon de queue.

## 2. La détermination neurale et l'inhibition latérale.

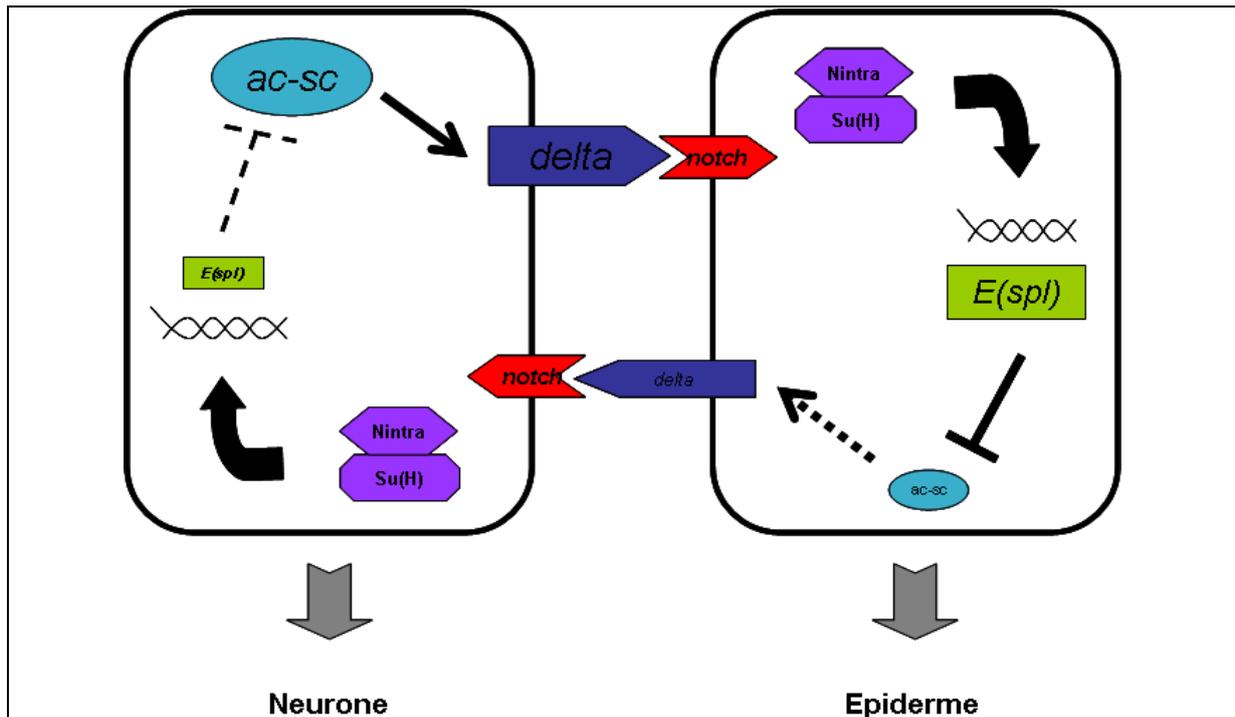
### a) Chez la drosophile.

Les progéniteurs neuraux sont organisés en groupe de cellules compétentes à se différencier en neurones sous l'activité des gènes proneuraux. Ce groupe de cellules est appelé cluster proneural (Romani et al., 1987; Simpson and Carteret, 1990). Dans un cluster proneural, une cellule de l'épithélium va être choisie pour se différencier en neurone alors que les autres cellules vont acquérir un destin épidermique (*Figure 9A*).



Alors que toutes les cellules du cluster proneural expriment les gènes proneuraux, une seule va se différencier en neurone (Cubas et al., 1991). Cette observation suggère qu'un mécanisme permet de limiter l'expression des gènes proneuraux dans les cellules qui ne sont pas choisies pour qu'elles ne se différencient pas en neurones.

Des cribles génétiques ont permis d'identifier des mutants pour certains gènes qui présentent un phénotype neurogénique ; à savoir que toutes les cellules du cluster proneural se différencient en neurones, et ce au dépens du destin épidermique (*Figure 9B*). Ceci a mis en évidence le rôle de ces gènes dans la sélection d'un seul progéniteur neural. Deux de ces gènes codent pour des protéines appelées Notch et Delta (Hartenstein and Posakony, 1990; Parks and Muskavitch, 1993). Ces deux protéines sont impliquées dans une même voie de signalisation (Heitzler and Simpson, 1993). En effet, Delta est le ligand du récepteur transmembranaire Notch (Fehon et al., 1990). Deux autres mutants, pour *Enhancer-of-split* (*E(spl)*) et *supressor of hairless* (*su(H)*), ont un phénotype identique aux mutants Notch et Delta suggérant qu'ils agissent dans la même voie de signalisation (Lecourtois and Schweisguth, 1995; Schweisguth, 1995). En effet, *E(spl)* et *su(H)* sont des effecteurs de l'activité de Notch. L'identification de la voie de signalisation Notch et les conséquences de sa perte d'activité a mis en évidence un mécanisme de sélection d'un progéniteur neural faisant intervenir une communication intercellulaire (*Figure 10*).



**Fig. 10:** Représentation schématique de la voie Delta/Notch qui est mise en jeu afin de sélectionner un progéniteur neural dans un cluster proneural lors de la détermination neurale. Les traits pleins représentent une forte activation alors que les pointillés représentent une faible activation. Les différences dans le niveau d'activation des différents acteurs de la voie Notch conduisent une cellule à se différencier en neurone tandis que les autres adoptent un destin épidermique.

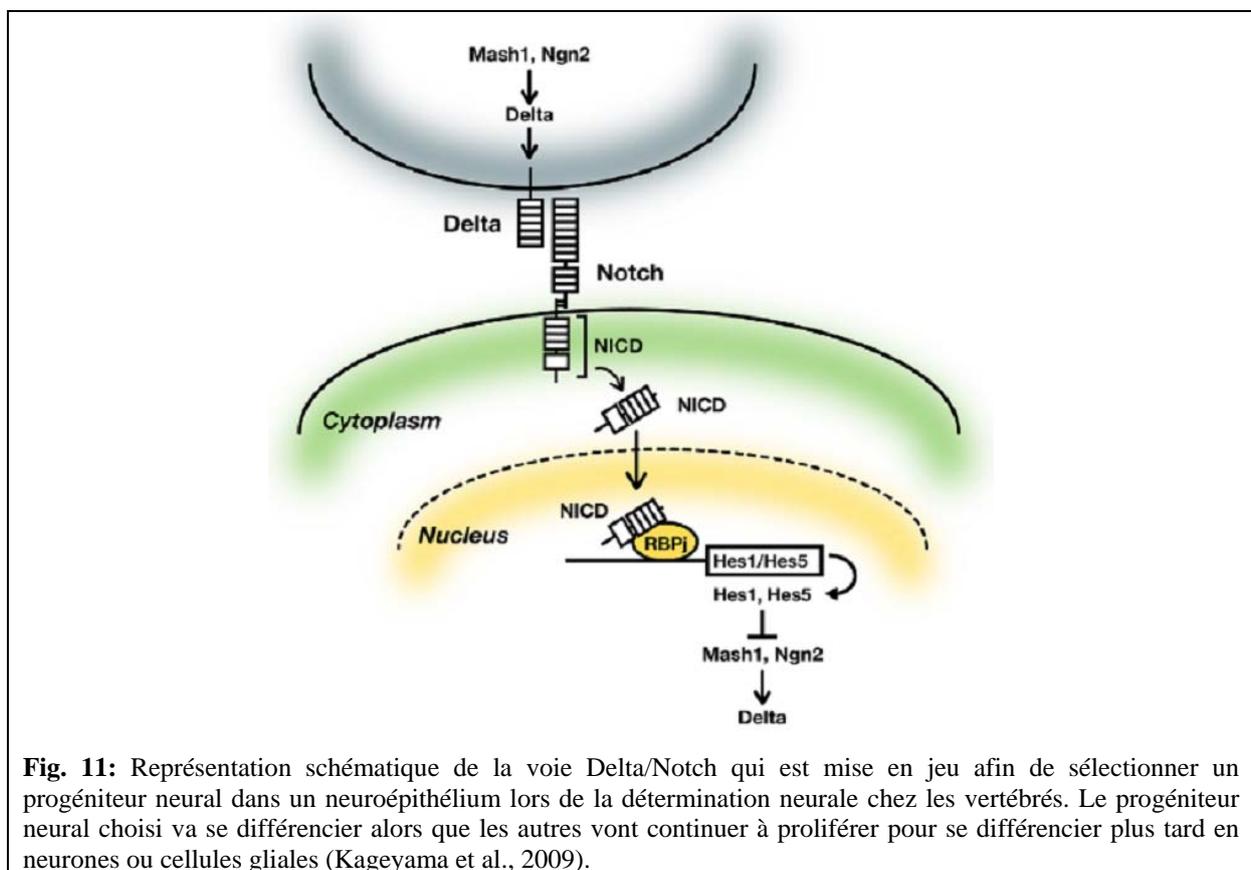
Dans un cluster proneural, toutes les cellules expriment un facteur proneural qui régule positivement l'expression du gène *delta* (Kunisch et al., 1994). Les progéniteurs neuraux qui expriment Delta vont activer la voie de signalisation Notch dans les cellules voisines. Cet événement va induire le clivage de Notch et la translocation de la partie intracellulaire de Notch (Notch<sup>intra</sup>) dans le noyau. Notch<sup>intra</sup> va permettre la transcription du gène *E(spl)* en coopération avec Su(H) (Heitzler et al., 1996). Ainsi, *E(spl)* va réguler négativement l'expression des facteurs proneuraux (Bailey and Posakony, 1995; Nakao and Campos-Ortega, 1996). L'intégration du niveau d'expression de tous ces facteurs (proneural, Delta, Notch<sup>intra</sup> et *E(spl)*) dans chaque cellule du cluster proneural va aboutir à la sélection d'un progéniteur qui va se différencier en neurone alors que les autres cellules vont se différencier en cellules épidermiques (Nakao and Campos-Ortega, 1996). Ce processus est contrôlé par l'expression des gènes proneuraux qui activent la voie Delta/Notch dans les cellules voisines. Pour cette raison ce mécanisme a été appelé inhibition latérale.

L'inhibition latérale est une boucle de rétrocontrôle négative initiée par l'expression des facteurs proneuraux dans une cellule A qui se termine par une répression de l'expression des gènes proneuraux dans une cellule B (Figure 10). Ce rétrocontrôle négatif permet

d'établir des différences dans l'expression des facteurs proneuraux et de Delta entre des cellules qui au départ font partie d'un groupe d'équivalence car la perte d'activité de Notch leur permet de toutes se différencier en neurones (*Figure 9*).

### b) Chez les vertébrés.

Chez les vertébrés le développement du système nerveux central est différent de celui de la drosophile où une cellule de l'épithélium choisit entre le destin neuronal ou épidermique. Dans un neuroépithélium, les progéniteurs neuraux se différencient précocement en neurones ou plus tardivement en neurones ou cellules gliales. Afin d'éviter une déplétion prématurée du stock de progéniteurs, un équilibre est établi entre la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuraux. Comme chez la drosophile, tous les progéniteurs qui expriment un facteur proneural ne se différencient pas immédiatement en neurones. Chez les vertébrés, les neurones en cours de différenciation maintiennent les progéniteurs neuraux en prolifération. Ce mécanisme est également contrôlé par la voie Delta/Notch (Bertrand et al., 2002) (*Figure 11*).



**Fig. 11:** Représentation schématique de la voie Delta/Notch qui est mise en jeu afin de sélectionner un progéniteur neural dans un neuroépithélium lors de la détermination neurale chez les vertébrés. Le progéniteur neural choisi va se différencier alors que les autres vont continuer à proliférer pour se différencier plus tard en neurones ou cellules gliales (Kageyama et al., 2009).

Chez le poisson zèbre, les mutants pour *deltaA*, *deltaC* (*beamter*), *deltaD* (*after eight*) et *notch1a* (*deadly seven*) présentent un phénotype neurogénique. Néanmoins, ce phénotype est modéré dû à une redondance fonctionnelle entre les différents facteurs (Appel et al., 2001; Gray et al., 2001; Holley et al., 2000; Julich et al., 2005). En revanche, le mutant *mind bomb* (*mib*) présente un phénotype neurogénique très important car l'activité de la voie Notch est totalement abolie dans ce contexte (Bingham et al., 2003; Itoh et al., 2003). L'observation du phénotype neurogénique de ces mutants indique que l'activité de la voie Notch dans le contrôle de la détermination neurale est conservée de la drosophile aux vertébrés.

L'activation de la voie Notch induit l'expression des gènes *hes-related protein* (*her*) (chez le poisson zèbre) ou des *hairy enhancer of split* (*hes*) (chez la souris) qui sont homologues de *E(spl)* de drosophile. Ces facteurs ont pour fonction de réprimer l'expression de facteurs proneuraux et du ligand *delta* dépendamment du co-facteur de liaison à l'ADN, CSL (CBF1/RBPJk/Su(H)/Lag1) qui interagit avec Notch<sup>intra</sup> (Ishibashi et al., 1995; Ishibashi et al., 1994; Takke and Campos-Ortega, 1999; Takke et al., 1999). Les vertébrés ont de nombreux homologues de *E(spl)*. C'est pourquoi, les souris knock-out (KO) qui sont inactivées pour *Hes1/5* ou *Hes1/3/5* ne présentent pas toujours de phénotype neurogénique dans l'ensemble du cerveau (Hatakeyama et al., 2004; Imayoshi et al., 2008). Par exemple, l'inactivation de *Hes1/3/5* entraîne une déplétion des progéniteurs neuraux et une différenciation neuronale massive dans une grande majorité du système nerveux central mais pas dans le télencéphale. Ce résultat suggère que soit l'activité de Notch n'est pas requise dans ce domaine pour maintenir les progéniteurs en prolifération, soit que l'activité redondante des gènes *Hes* protège le télencéphale d'un phénotype neurogénique. L'inactivation par KO conditionnel de RBPJk, l'homologue de souris de Su(H) de drosophile, a permis de démontrer que l'activité de Notch était bien requise pour contrôler l'équilibre entre prolifération et différenciation des progéniteurs neuraux dans le télencéphale (Imayoshi et al., 2010). Cette étude met en évidence la complexité du contrôle de la différenciation neuronale chez les vertébrés où le timing de différenciation est régulé de manière très stricte.

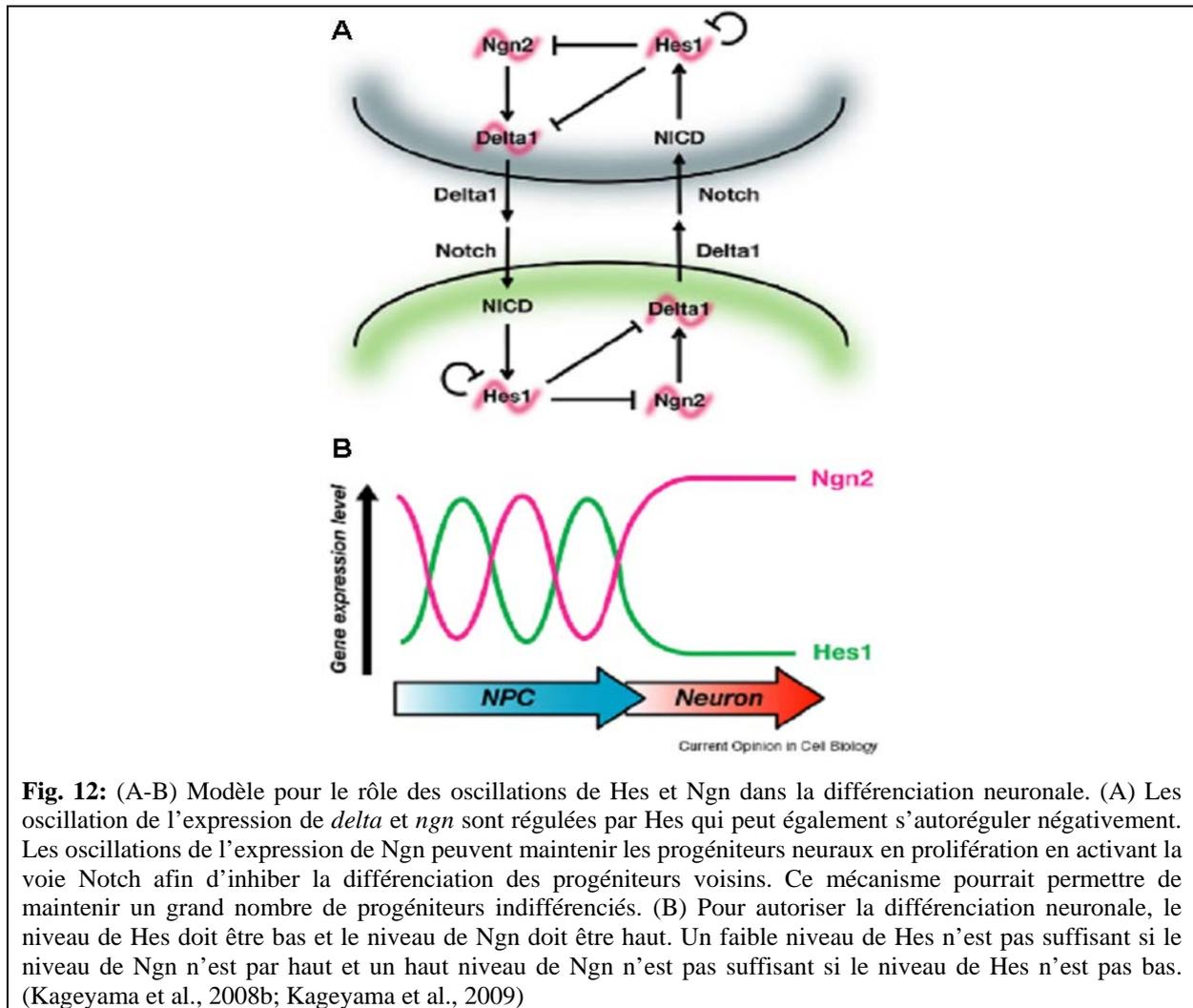
### **c) L'expression des gènes *hes* et *ngn* oscille dans les progéniteurs neuraux.**

Durant la différenciation neuronale, les facteurs proneuraux régulent directement l'expression des ligands transmembranaires Delta dans le neurone en cours de différenciation. La liaison entre Delta et Notch induit la transcription des gènes de la famille *her/hes* de

manière non autonome cellulaire. En retour, les protéines Hes/Her inhibent l'expression des gènes proneuraux dans les progéniteurs afin d'inhiber leur différenciation. La perte de fonction des gènes *her/hes* induit une différenciation neuronale prématurée car les progéniteurs neuraux ne peuvent plus proliférer et surexpriment les facteurs proneuraux. En revanche, la perte de fonction des facteurs proneuraux conduit à une absence de différenciation neuronale. En conséquence, l'équilibre entre les niveaux d'expression des facteurs proneuraux et des protéines Her/Hes régule la balance entre prolifération et différenciation des progéniteurs (Kageyama et al., 2005; Kageyama et al., 2008a).

Des études récentes d'imagerie *in vivo* en temps réel ont montré que l'expression de Hes1 oscille dans les progéniteurs neuraux avec une période de 2-3 h. De façon surprenante, l'expression de Ngn2 oscille aussi dans les progéniteurs neuraux mais en phase opposée aux oscillations de Hes1. L'expression oscillatoire de Ngn2 est corrélée à une expression oscillatoire de Delta1 dans le progéniteur neural (Kobayashi et al., 2009; Shimojo et al., 2008). Ces expériences ont été réalisées sur des cultures de progéniteurs neuraux dissociés inquiétant que ces oscillations peuvent être régulées de manière autonome cellulaire. De plus, ces résultats impliquent que contrairement au modèle classique d'inhibition latérale, atteindre un haut niveau de Ngn2 dans un progéniteur neural n'est pas suffisant pour conduire à la différenciation neuronale (Kageyama et al., 2008b; Kageyama et al., 2009). Cette dynamique d'expression oscillatoire est régulée en partie par Hes1 qui est capable de réguler négativement sa propre expression. Les oscillations de Ngn2 sont aussi régulées par Hes1. Il a déjà été montré que les protéines Hes/Her pouvaient lier directement les éléments régulateurs des gènes proneuraux pour inhiber leur expression (Chen et al., 1997; Hans et al., 2004). Finalement, le maintien d'un haut niveau d'expression de Hes1 dans les progéniteurs bloque la différenciation neuronale, ce qui suggère que ces oscillations sont importantes pour contrôler la balance entre prolifération et différenciation des neurones. Ce mécanisme empêche de maintenir durablement un haut niveau de Ngn2 et un faible niveau de Hes1 nécessaire à la différenciation (Shimojo et al., 2008).

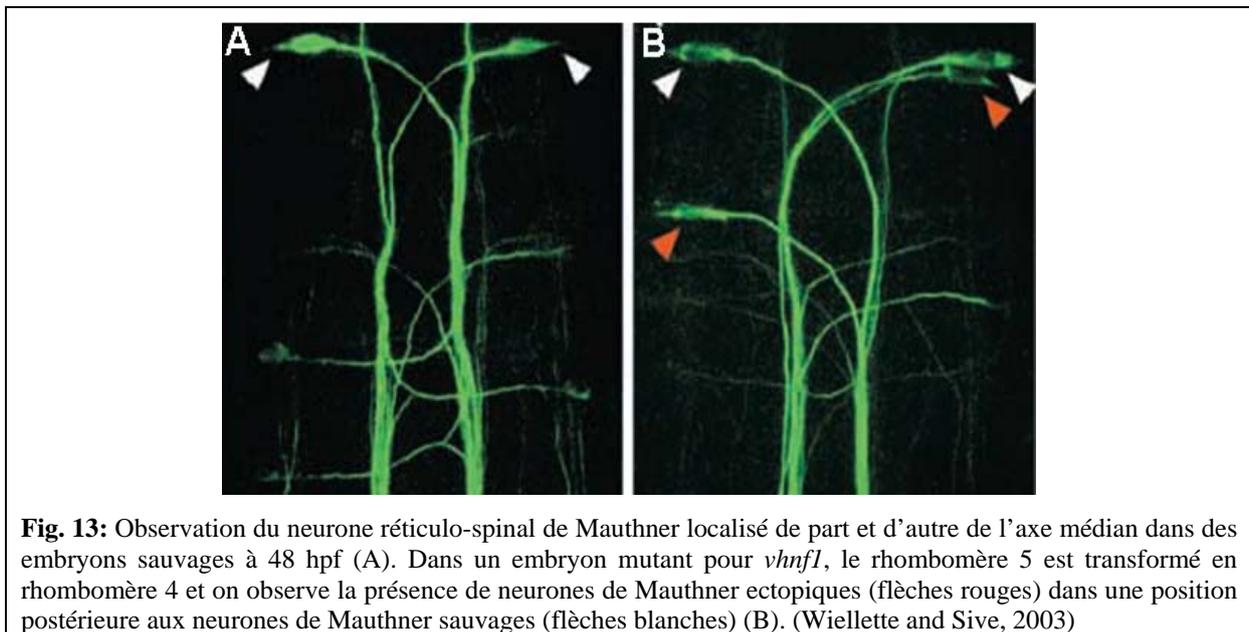
L'ensemble de ces données montre que les oscillations de Ngn2 et Hes1 participent à maintenir les progéniteurs neuraux en prolifération (*Figure 12*). Toutefois, les mécanismes qui permettent l'activation autonome cellulaire de Hes1 restent inconnus. En effet, l'activation de Hes1 indépendamment de l'activité de Notch est inattendue et anti-dogmatique mais nécessaire pour permettre les oscillations.



### III. La formation du neurone de Mauthner : un exemple de la régionalisation et de la neurogenèse dans le système nerveux central du poisson zèbre.

Le neurone de Mauthner est formé dans un cluster médian dans le domaine présomptif du futur rhombomère 4 (Kimmel et al., 1991). Ce neurone est le premier neurone à être post-mitotique dans l'embryon de poisson zèbre vers 7 hpf (heures post-fécondation) (Mendelson, 1986). De nombreux mutants sont connus pour présenter des défauts dans la formation du neurone de Mauthner. Le mutant *spg* est dépourvu de ce neurone car l'identité des rhombomères est compromise (Burgess et al., 2002; Hauptmann et al., 2002). Par conséquent, le rhombomère 4 n'est pas formé correctement et le neurone de Mauthner ne peut pas acquérir son identité. J'ai précédemment décrit que la perte de fonction d'*iro7* entraînait une perte du rhombomère 4 au profit du rhombomère 5, c'est pourquoi dans ce contexte, le neurone de Mauthner est également absent (Lecaudey et al., 2004). Finalement, le mutant qui présente

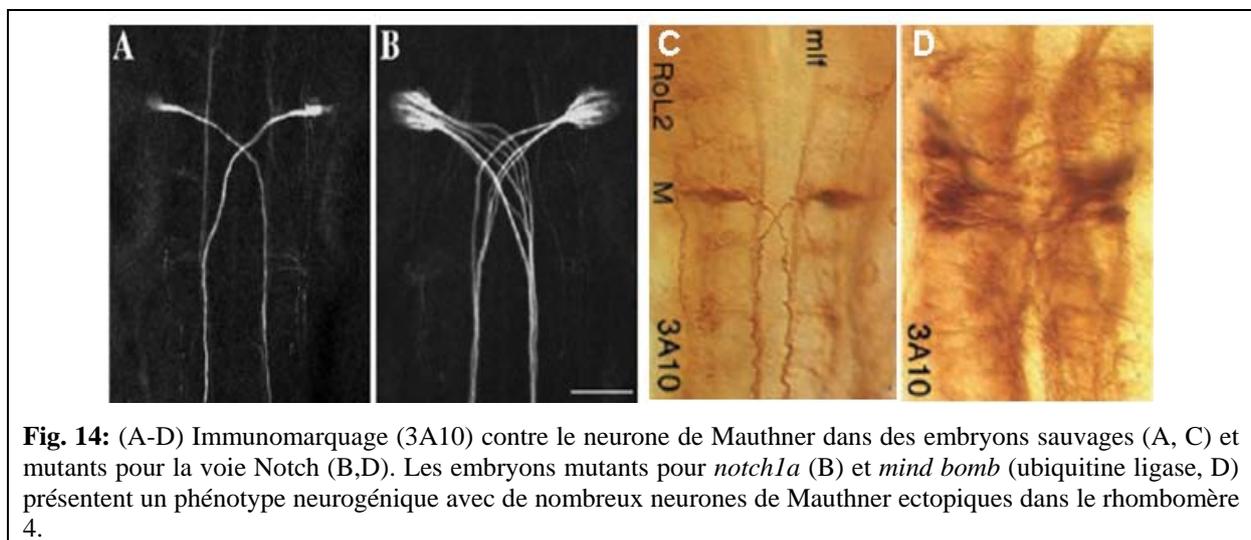
l'exemple le plus évident du lien entre identité du rhombomère 4 et formation du neurone de Mauthner est le mutant *vhnf1*. Dans ce mutant, où les rhombomères 5 et 6 sont remplacés par un rhombomère 4, on peut observer la formation d'un neurone de Mauthner ectopique dans le rhombomère 4 ectopique (Hernandez et al., 2004; Wiellette and Sive, 2003) (Figure 13). L'expression des gènes *hox* est également responsable de l'identité des rhombomères formés. Par exemple, la surexpression *hoxa1a*, *hoxb1a* ou *hoxb1b* induit la transformation du rhombomère 2 en rhombomère 4 et la formation de neurones de Mauthner ectopiques (Alexandre et al., 1996; McClintock et al., 2001). La formation du neurone de Mauthner est donc dépendante de la spécification correcte de l'identité rhombomère 4.



Les facteurs de transcription nécessaires à la régionalisation du rhombencéphale sont également directement impliqués dans la formation des neurones. La différenciation du neurone de Mauthner est dépendante de l'activité de *Ngn1* car le mutant *ngn1* est dépourvu de ce neurone (M.Gouzi and P.Blader, résultats non publiés). L'activité de *spg* est requise pour induire l'expression de *ngn1* (Reim and Brand, 2002). De même, *iro7* est nécessaire pour activer l'expression de *ngn1* dans le territoire présomptif du rhombomère 4 (Lecaudey et al., 2004). Par conséquent, la formation du neurone de Mauthner est aussi dépendante de l'induction de l'expression de *ngn1* par les facteurs de pré-pattern comme *spg* et *iro7*.

Ces exemples montrent que les gènes de prépattern contrôlent la régionalisation de la plaque neurale et l'expression des facteurs proneuraux, ce qui définit l'identité des neurones formés dans le cerveau.

La détermination du neurone de Mauthner est un exemple de détermination neurale, similaire à celle observée dans les clusters proneuraux de drosophile. Les mutants *deadly seven* (*notch1a*) et *mib* où la voie Notch est inactive présentent des neurones de Mauthner surnuméraires (jusqu'à 10 contre 1 seul dans un embryon sauvage) (Bingham et al., 2003; Jiang et al., 1996; Liu et al., 2003) (Figure 14). Ce résultat indique qu'un groupe de 10 progéniteurs neuraux (groupe de compétence) est capable de se différencier en neurones de Mauthner dans un embryon sauvage et que la voie Notch réduit cette capacité à une seule cellule. C'est pourquoi la détermination du neurone de Mauthner est un paradigme très intéressant pour analyser les conséquences des variations d'activités des différents acteurs de la voie Notch dans la différenciation neuronale chez les vertébrés.



**Fig. 14:** (A-D) Immunomarcage (3A10) contre le neurone de Mauthner dans des embryons sauvages (A, C) et mutants pour la voie Notch (B,D). Les embryons mutants pour *notch1a* (B) et *mind bomb* (ubiquitine ligase, D) présentent un phénotype neurogénique avec de nombreux neurones de Mauthner ectopiques dans le rhombomère 4.

#### IV. Les mécanismes de contrôle de l'identité neuronale chez les vertébrés.

Le système nerveux central est caractérisé par une incroyable diversité neuronale qui lui permet d'accomplir des fonctions nombreuses et complexes. L'un des événements les plus importants lors de la neurogenèse est de permettre à un neurone d'acquérir une identité qui lui est propre. Le processus à l'origine de la diversité des sous-types neuronaux dans le CNS est la spécification neuronale. Ce processus permet aux neurones d'acquérir une identité propre en activant un programme génétique spécifique qui régule l'expression d'un ensemble de gènes. Pour ce faire, plusieurs mécanismes peuvent être utilisés.

Un de ces mécanismes fait intervenir des voies de signalisation qui sont activées dans l'axe dorso-ventral du tube neural selon des gradients d'expression. Ces protéines de signalisation sont des morphogènes qui peuvent diffuser loin de la source d'origine. En conséquence, plus les cellules sont proches de la source plus la concentration en morphogènes

est forte et plus les cellules sont éloignées, plus la concentration est faible. Le gradient opposé de deux morphogènes permet de régionaliser le tube neural et ainsi de créer différentes combinaisons de facteurs de transcription. Ces combinaisons de facteurs correspondent comme dans la plaque neurale à une information de position et permettent aux neurones d'acquérir une identité donnée à une localisation précise du tube neural.

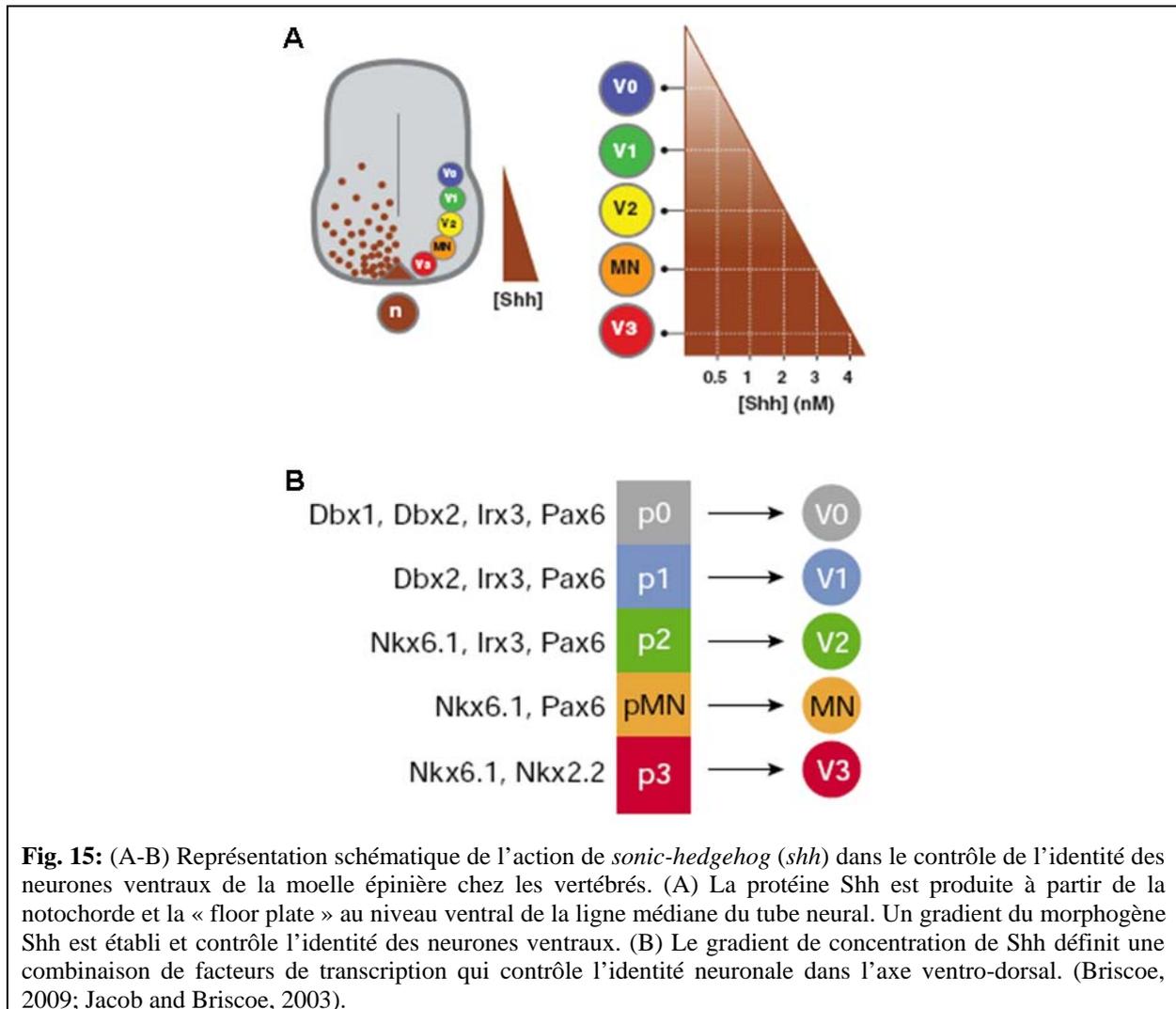
## **1. La spécification neuronale dans la moelle épinière par les morphogènes.**

Dans la plaque neurale postérieure, les neurones sensoriels sont localisés à l'extrémité la plus latérale alors que les interneurones sont en position médio-latérale et les motoneurones en partie médiane. Après la neurulation et la formation du tube neural, les neurones sensoriels sont localisés dorsalement alors que les motoneurones sont ventraux. A partir de cet instant dans le tube neural, les progéniteurs neuraux sont soumis à un contrôle de leur identité dépendant de leur position dans l'axe dorso-ventral.

Les deux principales voies de signalisation impliquées dans la mise en place de cet axe sont *sonic-hedgehog (shh)* et BMP. *Shh* a une activité ventralisante alors que BMP a une activité dorsalisante.

### **a) La régionalisation ventrale par Shh.**

*shh* est produit par des structures localisées ventralement par rapport au tube neural, la notochorde et la plaque du plancher. La voie de signalisation *shh* met en jeu : *shh* qui est le ligand, *patched (ptch)* qui est le récepteur et *smoothened (smo)* qui est une protéine transmembranaire. En l'absence de la liaison ligand/récepteur, Ptch inhibe l'activité de Smo qui ne peut pas activer les facteurs de transcription Gli qui permettent la transmission du signal. En revanche, lorsque Shh et Ptch interagissent, Smo induit l'activation et la relocalisation de Gli1 et Gli3 dans le noyau afin de transmettre le signal. La protéine *shh* est un morphogène qui va permettre de définir un gradient de concentration ventro-dorsal. En fonction de cette concentration différents types de progéniteurs neuraux vont être définis : les motoneurones aux concentrations les plus importantes et les interneurones ventraux à des concentrations plus faibles (Briscoe, 2009; Dessaud et al., 2008; Lupo et al., 2006) (*Figure 15A*).



Chez la souris, la perte de fonction de *shh* induit une perte des motoneurones MN et des interneurones V2 et V3 (Litingtung and Chiang, 2000). De plus, la surexpression de Smo constitutivement actif chez la souris entraîne l'apparition de marqueurs ventraux dans la partie dorsale de la moelle épinière (Hynes et al., 2000). Le gradient d'activation de *shh* est corrélé à l'expression de différents facteurs dans l'axe ventro-dorsal qui sont associés à différents sous-types de progéniteurs neuraux. Chaque type de progéniteur exprime une combinaison particulière de facteurs de transcription (*Figure 15B*). Par exemple, trois types de progéniteurs des interneurones expriment différents facteurs de transcription p0 (Dbx1, Dbx2, Irx3 et Pax6), p1 (Dbx2, Irx3 et Pax6), p2 (Nkx6.1, Irx3 et Pax6) alors que les progéniteurs des motoneurones pMN (Nkx6.1, Pax6 et Olig2) et interneurones p3 (Nkx6.1, Nkx2.2) expriment encore une autre combinatoire (Briscoe et al., 2000; Ericson et al., 1997a; Ericson et al., 1997b; Jacob and Briscoe, 2003).

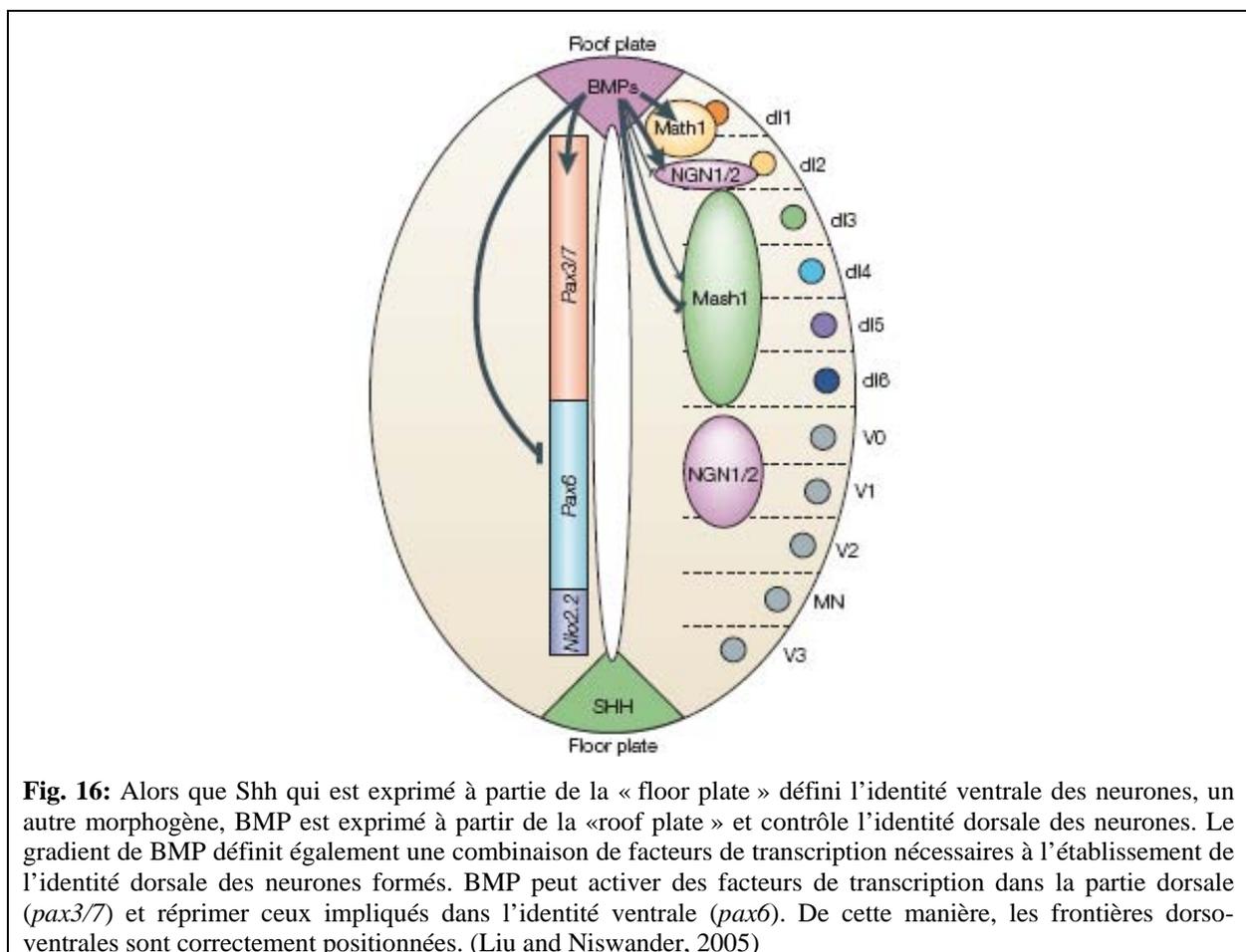
Chez le poisson zèbre, la perte d'activité de *shh* dans le mutant *smoothened (smu)* est aussi corrélée à une perte des motoneurons dans la moelle épinière ventrale (Varga et al., 2001). Ce phénotype est probablement dû au fait que Shh induit l'expression d'*olig2* dans les progéniteurs neuraux ventraux (Park et al., 2002). La surexpression de *shh* a pour effet d'étendre les domaines d'expression de *nkx2.9*, *nkx6.1* et *nkx6.2* dorsalement alors que la perte de fonction conduit à une absence d'expression de ces facteurs. De plus, la surexpression de *shh* réprime l'expression de *pax3*, *pax7* et *pax6a* dans la partie dorsale du tube neurale. Ces résultats indiquent que *shh* a la capacité d'activer l'expression des gènes *nkx* et de réprimer l'expression des gènes *pax* afin de définir les frontières entre les différents types de progéniteurs neuraux. (Guner and Karlstrom, 2007).

Les progéniteurs neuraux expriment une combinatoire différente de facteurs de transcription en fonction de leurs positions dans l'axe dorso-ventral de la moelle épinière. Cette combinatoire est une information de position pour le progéniteur neural (Briscoe, 2009; Liu and Niswander, 2005; Lupo et al., 2006). Au cours du temps, différents types de cellules sont produits dans la moelle épinière à partir des progéniteurs neuraux. Tout d'abord, les neurones puis les cellules gliales (oligodendrocytes puis astrocyte) (Jessell, 2000). Cette logique est contrôlée par l'expression différentielle au cours du temps de facteurs de transcription. Par exemple, dans la moelle épinière, l'expression du gène *nkx2.2* permet de définir le domaine le plus ventral où seront générés les interneurons V3. Plus en dorsal, l'expression de *pax6* définit un autre territoire où seront générés les autres interneurons V0, V1, V2 et les motoneurons MN alors qu'en ventral, l'expression d'*olig2* permet la spécification des motoneurons MN (*Figure 15, 16 et 17*). Ces facteurs sont impliqués dans la spécification du sous-type neuronal formé. La perte d'expression de *pax6* conduit à une perte des neurones dans le domaine d'expression de *pax6* et à une différenciation prématurée des oligodendrocytes et astrocytes. Cela indique que l'activité de *pax6* permet de favoriser la neurogenèse au dépend de la formation des cellules gliales. De la même manière, la perte d'expression d'*olig2* conduit à l'absence des motoneurons MN puis des oligodendrocytes dans la moelle épinière, spécifiquement dans le domaine où était exprimé *olig2*. Les motoneurons ne sont pas remplacés par un autre type neuronal suggérant que d'autres facteurs, nécessaires à l'acquisition d'une identité plus dorsale (V2) ou plus ventrale (V3), ne sont pas exprimés dans le domaine d'expression d'*olig2* (Guillemot, 2007; Novitch et al., 2001; Sugimori et al., 2007). Afin d'établir des frontières entre les différents sous-domaines de la moelle épinière, les facteurs de transcription peuvent se réprimer. Par exemple, *nkx2.2* et *olig2* qui sont spécifiques des domaines V3 et MN respectivement peuvent se réprimer l'un et

l'autre. Cela permet de créer une frontière uniforme entre les domaines V3 et MN et de ségréger les deux populations neuronales (Briscoe, 2009; Briscoe et al., 2000; Novitch et al., 2001) (*Figure 15, 16 et 17*). Cet exemple de régionalisation de la moelle épinière ventrale met en évidence l'importance de la combinatoire des facteurs de transcription dans la spécification neuronale.

### b) La régionalisation dorsale par BMP.

Alors que la spécification des neurones les plus ventraux nécessite l'activité de Shh qui est secrété par la plaque du plancher, la spécification des neurones les plus dorsaux requiert l'activité des protéines BMP qui sont secrétées par la plaque du toit (*Figure 16*).

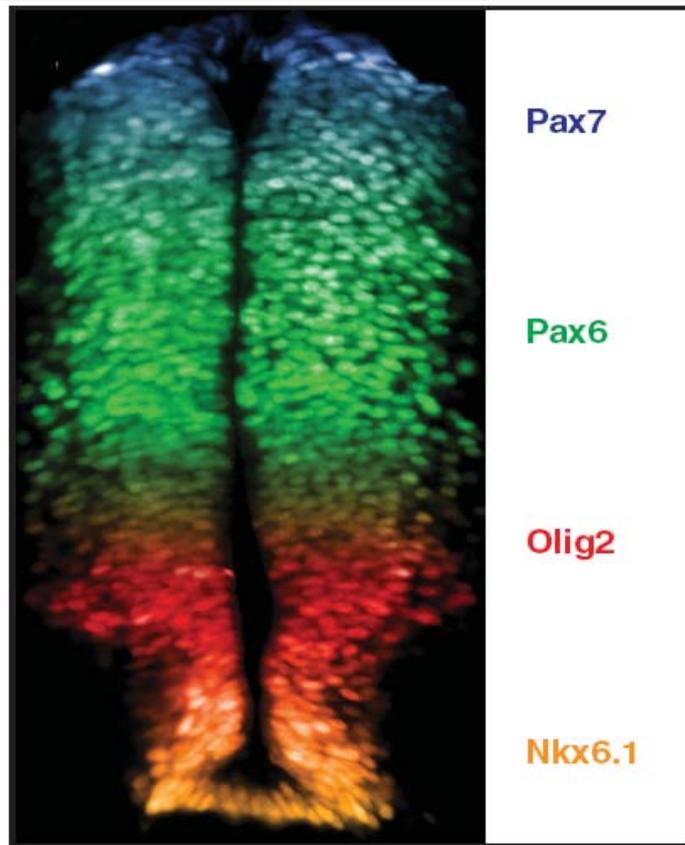


Le ligand BMP a besoin de se fixer aux récepteurs BMPR de type I et II. Le récepteur de type I possède une activité sérine-thréonine kinase qui va permettre sa phosphorylation. Le récepteur phosphorylé va entraîner, par phosphorylation, l'activation des effecteurs de la voie qui sont les facteurs de transcription Smad. Smad1, Smad5 ou Smad8 vont ainsi pouvoir

interagir avec le cofacteur Smad4 et être transporté dans le noyau pour transmettre le signal (Liu and Niswander, 2005). L'ablation de la plaque du toit qui est la source de sécrétion de BMP entraîne une perte des neurones les plus dorsaux et une expansion des neurones localisés plus ventralement (Lee et al., 2000). De même, l'ajout d'antagonistes de l'activité des BMP au niveau de la plaque du toit bloque la spécification des neurones localisés le plus dorsalement (Liem et al., 1997). En revanche, la surexpression d'un récepteur BMP (BMPR) constitutivement activé a montré qu'en fonction de l'activité de la voie, les neurones formés sont différents (Timmer et al., 2002). Par exemple, une activation importante de la voie induit la production des neurones les plus dorsaux dl1 (progéniteur Cath1+) alors qu'une activation modérée de la voie permet la formation des neurones dl2 (progéniteur Ngn1/2+). Ces expériences indiquent que l'activité de la voie BMP est nécessaire pour contrôler l'identité dorsale des progéniteurs neuraux dans la moelle épinière.

J'ai mentionné précédemment que la perte d'activité de BMP dans le mutant *swr* chez le poisson zèbre entraînait des défauts de formation des neurones sensoriels de Rohon-Beard. Dans ce cas, les interneurones ont une expansion dorsale de leur domaine au dépend des neurones sensoriels de Rohon-Beard. De plus, l'injection d'un antagoniste des BMP comme Chordin entraîne une perte d'activité de la voie qui est plus importante que dans le mutant *swr*, ce qui a pour conséquence de conduire à une disparition totale des neurones sensoriels de Rohon-Beard mais également à une diminution des interneurones (Barth et al., 1999; Nguyen et al., 2000). Ces résultats suggèrent que les neurones sensoriels et les interneurones n'ont pas besoin de recevoir la même concentration de morphogènes BMP afin d'être spécifiés. Une concentration forte est nécessaire pour la spécification des neurones sensoriels de Rohon-Beard alors qu'une concentration plus faible permet la spécification des interneurones.

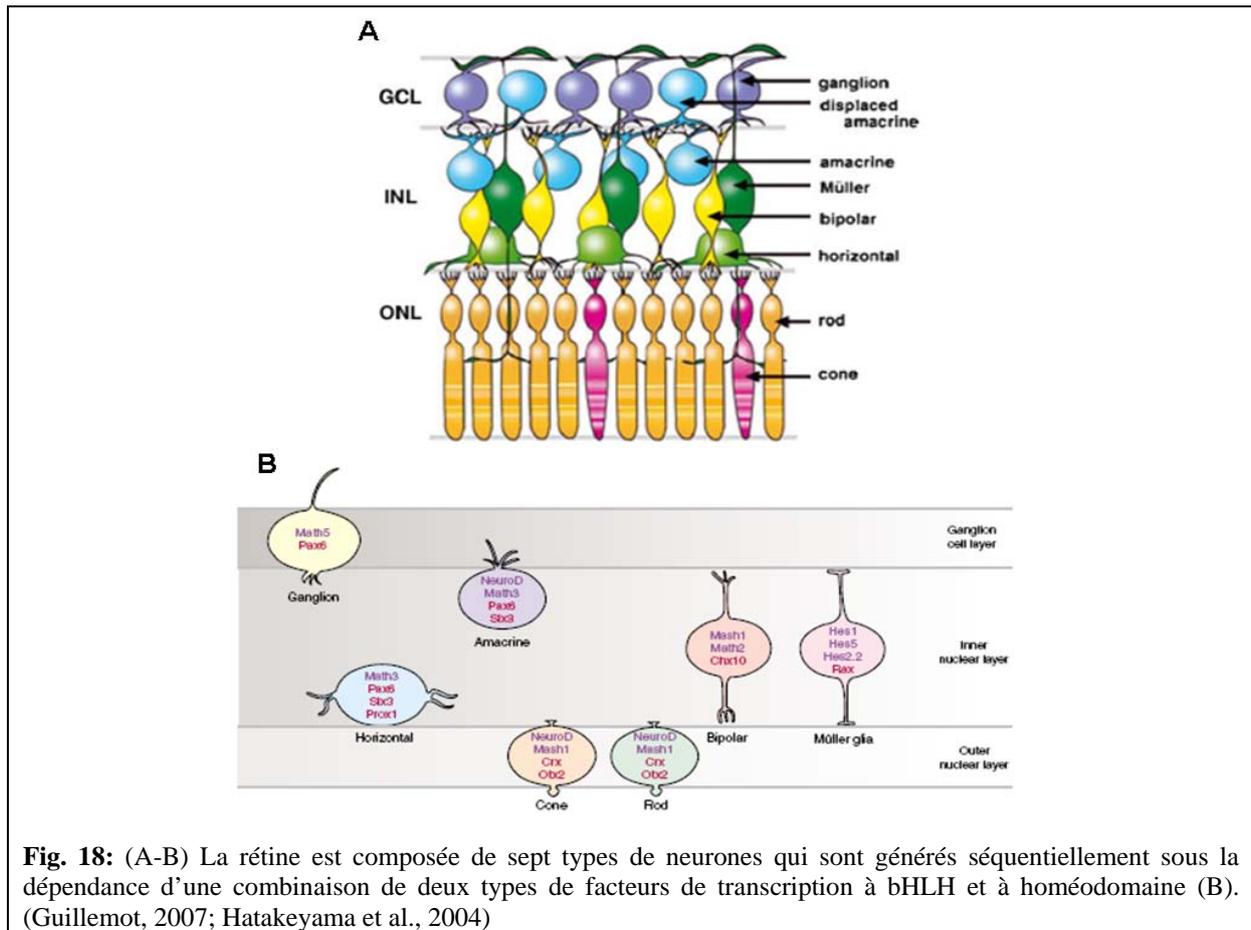
En conclusion, il semble que la régionalisation du tube neural et la spécification des neurones qui le composent nécessitent une activation dorsale de la voie BMP et une activation ventrale de la voie Shh. De cette façon, un gradient inverse d'activités des voies Shh et BMP peut être établi dans l'axe dorso-ventral de la moelle épinière. Selon, sa position dans cet axe, chaque cellule reçoit une concentration différente de Shh et de BMP, ce qui entraîne l'expression d'une combinatoire différente de facteurs de transcription pour chaque progéniteur neural (*Figure 17*). Cette combinatoire va être responsable de l'identité que va acquérir le progéniteur lors de sa différenciation.



**Fig. 17:** Les gradients de Shh et BMP permettent de définir précisément des territoires dans l'axe dorso-ventral de la moelle épinière chez les vertébrés. Ces domaines sont caractérisés par le profil d'expression spécifique d'une combinaison de facteurs de transcription. (Briscoe, 2009)

## 2. La combinatoire des facteurs de transcription et la spécification des sous types neuronaux de la rétine.

La rétine est composée de six types neuronaux et un type de cellule gliale. Chacun des sous-types cellulaires de la rétine exprime une combinatoire différente de facteurs bHLH et à homéodomaine (*Figure 18*). Dans ce système, les facteurs de transcription à homéodomaine et bHLH coopèrent pour contrôler l'identité neuronale (Hatakeyama and Kageyama, 2004; Ohsawa and Kageyama, 2008).



En plus de leurs activités proneurales dans les progéniteurs neuronaux, certains facteurs bHLH sont également exprimés dans les neurones différenciés. Ceci suggère qu'ils peuvent être impliqués dans le contrôle de l'identité neuronale. Par exemple, *Ath5* est exprimé spécifiquement dans les cellules ganglionnaires. Des expériences de gain et perte de fonction de *Ath5* ont montré qu'il est nécessaire et suffisant pour la formation des cellules ganglionnaires (Kanekar et al., 1997; Kay et al., 2001; Wang et al., 2001). Cela indique que l'activité spécifique de ce facteur est requise pour la différenciation de ces neurones. Il semblerait que cette activité spécifique soit au moins en partie médiée par *Brn3* qui est un

facteur de transcription à homéodomaine de la famille POU et qui est une cible directe de Ath5 (Liu et al., 2001).

Un autre exemple, Mash1 (famille *achaete-scute*) et Math3 (famille *atonal*) sont exprimés dans les cellules bipolaires différenciées, suggérant que ces facteurs sont impliqués dans la spécification de ces neurones. De fait, les embryons mutants pour Mash1 ont un nombre réduit de cellules bipolaires alors que les doubles mutants pour Mash1 et Math3 présentent une absence presque totale de ces neurones (Tomita et al., 2000). De manière surprenante, la surexpression de Mash1 ou Math3 dans les progéniteurs neuronaux de la rétine induit une surproduction de photorécepteurs (cônes et bâtonnets) et non pas de cellules bipolaires (Hatakeyama et al., 2001). Ce résultat suggère que l'expression de Mash1 ou Math3 n'est pas suffisante pour induire le destin cellule bipolaire mais l'est pour le destin photorécepteur. Ce résultat indique aussi que l'activité intrinsèque de ces deux facteurs ne contrôle pas l'identité neuronale dans la rétine. Math3 peut induire le destin photorécepteur alors qu'il n'est pas exprimé dans ces neurones de manière endogène (*Figure 18*). De plus, cela suggère que l'activité requise pour le destin photorécepteur est une activité générale partagée par Mash1 et Math3. De manière intéressante, le facteur de transcription à homéodomaine Chx10 est également exprimé dans les cellules bipolaires suggérant là encore que ce facteur est impliqué dans la différenciation de ces neurones. Effectivement, les embryons mutants pour Chx10 présentent une absence totale de cellules bipolaires. Mais là encore, la surexpression de Chx10 ne permet pas d'induire le destin cellule bipolaire, indiquant une nouvelle fois que l'activité intrinsèque de ce facteur n'est pas suffisante. En revanche, la surexpression combinée de Mash1 ou Math3 avec Chx10 est capable d'induire la formation de cellules bipolaires (Hatakeyama et al., 2001). Ce résultat suggère que Mash1 et Math3 ont une activité redondante dans la promotion du destin cellule bipolaire car la surexpression de l'un ou l'autre en compagnie de Chx10 est suffisante pour la spécification neuronale. Il est possible que l'activité de Mash1 et Math3 soit une activité proneurale qui conduit à la différenciation et que l'activité de Chx10 soit responsable de la spécificité du sous type neuronal qui est induit par l'expression de ces facteurs. Finalement, des expériences de gain et perte de fonctions réalisées avec d'autres facteurs bHLH et à homéodomaine ont permis de mettre en évidence que la combinatoire entre ces facteurs de transcription est un mécanisme général de contrôle de l'identité neuronale dans la rétine.

Une étude réalisée chez la souris à l'aide de triple mutants pour différents facteurs bHLH exprimés dans les progéniteurs rétiniens a mis en évidence les activités qu'exercent ces facteurs entre eux (Akagi et al., 2004). La génération de triple mutants était importante car

dans les simples ou doubles mutants, la formation de certains sous types neuronaux comme les photorécepteurs ou les cellules horizontales est peu ou pas affectée. Dans le cas d'un triple mutant pour Mash1/Math3/NeuroD ou Ngn2/Math3/NeuroD, la formation des photorécepteurs est très affectée alors que leur nombre est comparable à un embryon sauvage dans un triple mutant pour Mash1/Math3/Ngn2. Cela met en évidence le rôle de NeuroD dans la spécification des photorécepteurs de la rétine. Cela indique aussi que dans ce contexte génétique, Mash1 et Ngn2 n'ont pas d'activités redondantes avec NeuroD pour la spécification des photorécepteurs. En ce qui concerne la formation des cellules horizontales, leur formation est très affectée dans les triples mutants pour Ngn2/Math3/Mash1 et Ngn2/Math3/NeuroD alors qu'elle est normale dans un embryon mutant Mash1/Math3/NeuroD. Ce résultat montre que Ngn2 est très important pour la spécification des cellules horizontales et que NeuroD et Mash1 n'ont pas d'activités redondantes avec Ngn2 pour la formation de ces neurones (Akagi et al., 2004). Cette étude montre que la spécification des sous-types neuronaux de la rétine est contrôlée par les activités redondantes des facteurs bHLH. De plus, en fonction du type neuronal la redondance est différente car certains facteurs proneuraux spécifiques sont nécessaires pour contrôler l'identité neuronale dans la rétine.

### **3. La spécification neuronale par les gènes proneuraux.**

Une autre façon qui permet de créer de la diversité neuronale est de réguler l'expression des gènes proneuraux. En effet, dans certaines régions du système nerveux, les gènes proneuraux de la famille *atonal* et *achaete-scute* ont des activités différentes qui permettent d'induire des neurones ayant une identité particulière. De plus, la perte de fonction de ces facteurs entraîne l'absence de sous-types neuronaux différents (Bertrand et al., 2002). Cependant, les différences de phénotypes peuvent être dues aux domaines d'expression des gènes qui sont différents.

#### **a) Activités divergentes des facteurs proneuraux dans la spécification neuronale.**

Des expériences de gain de fonction ont apporté de précieuses informations concernant les divergences d'activités des gènes proneuraux de la famille *ac-sc* et *ato* chez la drosophile.

En effet, l'expression ectopique des facteurs proneuraux Scute et Atonal dans l'aile de drosophile induit la formation de sous-types neuronaux différents, respectivement des organes sensoriels externes et des organes chordotonaux. En remplaçant le domaine bHLH de Scute par celui d'Atonal et vice-versa, les auteurs ont montré que le domaine bHLH était responsable de la capacité du facteur de transcription à induire la génèse d'un type neuronal particulier. En effet, la chimère portant le domaine bHLH de Atonal induit des organes chordotonaux ectopiques et celle portant le domaine bHLH de Scute induit des organes sensoriels externes ectopiques (Chien et al., 1996). Ce résultat met en évidence le fait que le domaine bHLH est responsable de l'activité spécifique des facteurs de transcription Ac-sc ou Ato. Le domaine bHLH possède deux sous-domaines : un domaine HLH qui permet la dimérisation avec d'autres facteurs de type bHLH et un domaine basique (b) qui permet au dimère de lier les « E-Box » présentes sur l'ADN (Bertrand et al., 2002). Afin de découpler le rôle du domaine basique et du domaine HLH dans la spécification neuronale, les auteurs ont réalisé des protéines chimères avec le domaine basique de Atonal et le domaine HLH de Scute et vice-versa. Ces expériences indiquent que chez la drosophile, le domaine basique est responsable de l'activité spécifique des gènes proneuraux et donc de la spécification d'organes sensoriels différents (Chien et al., 1996).

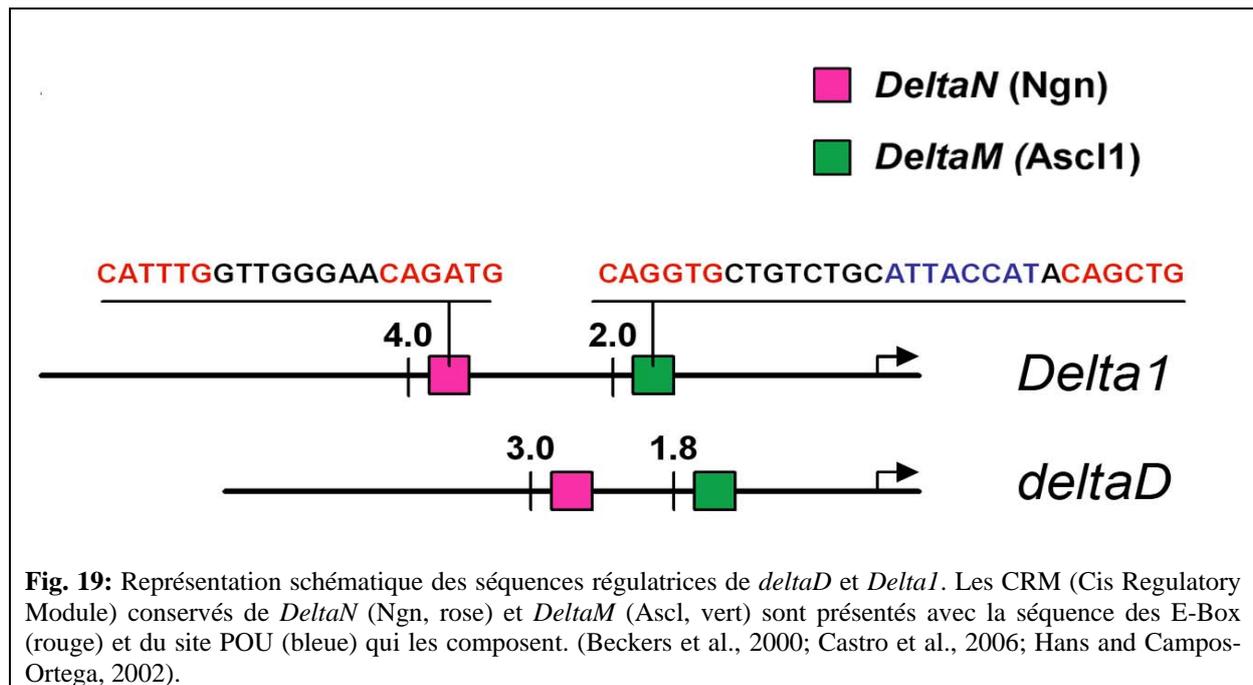
Les gènes de souris, *Mash1* (*Mouse achaete-scute homolog1*) et *Ngn2* (*Neurogenin2*) sont respectivement des homologues des gènes du complexe *ac-sc* et *ato* de drosophile (Bertrand et al., 2002). Ces deux gènes sont exprimés dans le système nerveux central et périphérique dans des domaines complémentaires et leurs activités proneurales sont nécessaires à la formation de progéniteurs neuronaux distincts (Guillemot, 1999). L'activité de ces deux gènes a été comparée par des expériences de « Knock-In » (remplacement génique) (Parras et al., 2002). Le remplacement de la séquence codante de *Mash1* par celle de *Ngn2* et vice-versa a révélé que comme chez la drosophile, les activités des protéines de la famille *ac-sc* et *ato* de souris sont différentes. Par exemple, dans les ganglions rachidiens, les neurones sensoriels générés normalement par l'activité de *Ngn2* ne sont pas sauvés par l'expression de *Mash1*. De même, dans le locus-coeruleus, en l'absence de *Mash1* les neurones noradrénergiques de type *Dbh* ne sont pas sauvés par l'expression de *Ngn2*.

Les expériences d'expression ectopique chez la drosophile et de « Knock-In » chez la souris indiquent que les gènes de la famille *ac-sc* et *ato* ont une activité spécifique lors de la spécification neuronale.

## b) Contrôle de l'activité spécifique des facteurs proneuraux.

Les facteurs proneuraux régulent la transcription de gènes cibles en liant l'ADN au niveau d'un motif conservé appelé « E-Box » qui a pour séquence consensus CANNTG. Les protéines proneurales des familles *ac-sc* et *ato* présentent une conservation de leur structure (domaine bHLH) ainsi que de leur liaison à l'ADN (« E-Box »). Les expériences précédentes suggèrent que les facteurs de transcription de la famille *ac-sc* et *ato* régulent des cibles spécifiques qui sont responsables de leur différence d'activité lors de la spécification neuronale. Comment des facteurs dont la séquence de liaison à l'ADN est conservée (« E-Box ») peuvent activer l'expression de gènes cibles spécifiques ? Une hypothèse est qu'un cofacteur pourrait interagir avec la protéine proneurale pour créer une spécificité de liaison à l'ADN (Bertrand et al., 2002; Powell and Jarman, 2008). L'analyse des séquences régulatrices des gènes cibles des facteurs proneuraux pourrait permettre d'identifier à proximité des « E-Box », des sites de fixation pour des cofacteurs. Une autre hypothèse, qui n'exclut pas la première, est que les séquences des E-Box sont divergentes pour la fixation des membres de la famille *ato* et *ac-sc*. Certaines études indiquent que la séquence de l'« E-Box » permet de créer une spécificité de liaison à l'ADN (variation du N dans la séquence CANNTG) en fonction du facteur proneural (Bertrand et al., 2002; Castro et al., 2006; Hans and Campos-Ortega, 2002; Powell et al., 2008; Powell and Jarman, 2008).

Chez la drosophile, le gène *delta*, qui est le ligand du récepteur Notch, est une cible directe des gènes du complexe *ac-sc* (Haenlin et al., 1994; Hinz et al., 1994; Kunisch et al., 1994). Chez les vertébrés, des études indiquent aussi que les gènes *delta* sont des cibles directes des facteurs proneuraux (Castro et al., 2006; Hans and Campos-Ortega, 2002; Henke et al., 2009). En effet, le gène *Delta1* de souris et son homologue *deltaD* de poisson zèbre possèdent deux séquences régulatrices HI (270pb) et HII (165pb) conservées respectivement à 80% et 84% (Beckers et al., 2000). Il a été montré que ces séquences conservées contiennent toutes deux un couple de « E-Box ». Le couple de « E-Box » présent dans HI (*DeltaN*) et celui présent dans HII (*DeltaM*) permettent respectivement une régulation spécifique et directe par *Ngn2* et *Mash1* du gène *Delta1* de souris ou par leurs homologues *Ngn1* (Neurogenin1) et *Ascl1a* (Achaete-Scute complex like1a) du gène *deltaD* de poisson zèbre (Beckers et al., 2000; Castro et al., 2006; Hans and Campos-Ortega, 2002) (Figure 19).



La régulation de *Delta1* par les gènes proneuraux de la famille *ac-sc* et *ato* a amené à étudier son promoteur pour rechercher comment ces facteurs régulent son expression de manière spécifique (Castro et al., 2006). Les auteurs ont identifié un site de fixation pour un facteur de type POU (octamère) entre les deux « E-Box » permettant une régulation par Mash1 (Figure 20). En réalisant des mutations ponctuelles dans les « E-Box » ou l'octamère, les auteurs ont montré que ces trois sites sont nécessaires pour réguler *Delta1* par Mash1. Ces données ont tout d'abord permis de définir un module de régulation consensus composé de deux « E-Box » et un site POU puis de rechercher d'autres gènes possédant ce module de régulation. Ainsi, ils ont identifié 21 gènes impliqués dans différents processus tel que la différenciation, le cycle cellulaire et la voie Delta/Notch (Castro et al., 2006). Ces résultats suggèrent que Mash1 interagit avec un cofacteur de type POU pour activer un ensemble de gènes impliqués dans la neurogenèse. Un autre exemple de coopération entre un facteur proneural et un cofacteur est la spécification des motoneurones. Dans ce processus, Ngn2 peut interagir avec un facteur à homéodomaine, LIM pour réguler l'expression de HB9 qui est exprimé durant la spécification des motoneurones (Lee and Pfaff, 2003). Néanmoins, le cofacteur n'est pas forcément responsable de la régulation spécifique par les proneuraux. Dans le cas de la régulation de *Delta1* par Mash1, le facteur POU n'est pas responsable de la spécificité de régulation par Mash1. En effet, avec la mutation des deux nucléotides centraux de l'E-Box qui permet de passer d'une E-Box de type Mash1 à une E-Box de type Ngn2 (GC->GA), Ngn2 est capable d'induire l'expression de *Delta1* en coopération avec le facteur POU (Castro

et al., 2006). Ce résultat suggère que la séquence de l'E-Box est primordiale dans la régulation spécifique par les gènes proneuraux de la famille *ato* et *ac-sc*. Toutefois, cela n'est pas suffisant car la présence d'E-Box isolées dans le génome est très fréquente et toutes ne sont pas fonctionnelles, d'où l'importance des cofacteurs qui peuvent permettre de contrôler la fixation des bHLH et l'activation de la transcription.

Récemment, des études ont cherché à identifier l'ensemble des cibles des facteurs proneuraux par des approches génomiques globales (Gohlke et al., 2008; Mattar et al., 2004; Seo et al., 2007). Une analyse du transcriptome de souris mutante pour *Ngn2* et *Mash1* dans le télencéphale a permis d'identifier un ensemble de gènes régulés spécifiquement par *Ngn2* et un ensemble régulé spécifiquement par *Mash1* (Gohlke et al., 2008). L'analyse des séquences régulatrices de certains de ces gènes pourrait permettre de comprendre comment ils sont régulés spécifiquement par l'une ou l'autre des deux familles de facteurs proneuraux. De même, l'identification de nombreuses cibles potentiellement directes de *Ngn1* chez le xénope a permis de définir que *Ngn1* régule préférentiellement ses gènes cibles par l'intermédiaire de « clusters » d'E-Box qui ont une séquence préférentielle (CAGATG). De plus, les auteurs ont identifié à proximité de ces « clusters » d'E-Box des sites potentiels de fixation pour des cofacteurs de la famille POU (Seo et al., 2007). Finalement, après avoir testé la fonctionnalité de ces séquences régulatrices par transgénèse, ils ont pu mettre en évidence que ces séquences étaient suffisantes pour diriger l'expression d'un gène rapporteur dans le système nerveux central du xénope. Néanmoins, lors de ces expériences, les auteurs n'ont pas formellement montré la nécessité des E-Box ou des cofacteurs pour la régulation transcriptionnelle par *Ngn1*. Cette étude suggère tout de même que la présence de clusters d'E-Box consensus pour *Ngn1* pourrait être un moyen de créer une spécificité de régulation par *Ngn1*.

La recherche de nouveaux gènes cibles des facteurs proneuraux *Ngn1* et *Ascl1a* chez le poisson zèbre pourront permettre de comprendre leurs activités spécifiques. De plus, l'identification de gènes régulés spécifiquement par l'un ou l'autre des deux facteurs mettrait en évidence leurs implications dans des processus biologiques différents et l'analyse des séquences régulatrices pourrait permettre de comprendre les divergences d'activités entre les facteurs proneuraux.

## **V. Identification de nouveaux gènes cibles des facteurs proneuraux impliqués de la spécification neuronale.**

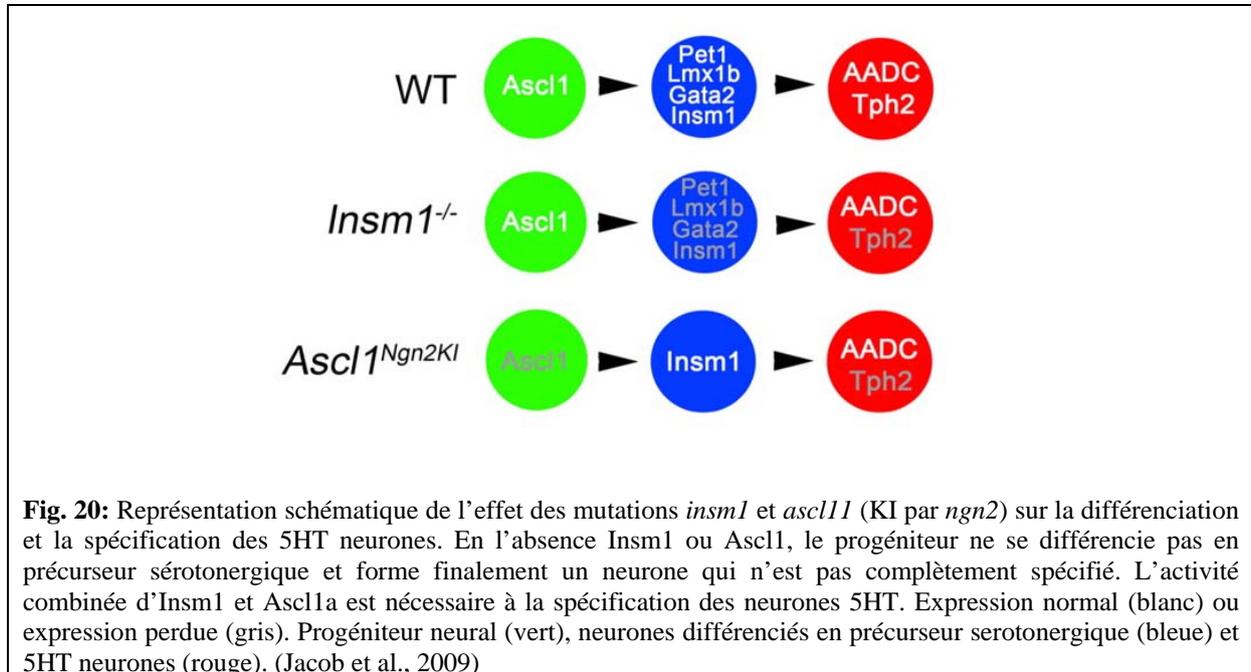
Une des problématiques essentielles lors de la neurogenèse est de comprendre comment des processus de spécification cellulaire sont coordonnés avec le processus de différenciation neuronale. Une des hypothèses avancée est que ces deux processus sont régulés par les facteurs proneuraux. Ces 15 dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence un rôle pour les facteurs proneuraux dans la spécification neuronale. Malgré ces évidences qui suggéraient que les proneuraux pouvaient contrôler de nombreux aspects de la formation d'un neurone autre que la détermination neurale, aucun gène cible impliqué dans un processus cellulaire tel que la migration, la guidance axonale ou bien la synthèse de neurotransmetteur n'avait été identifié jusqu'à récemment.

### **1. *Ascl1* et *Insm1* contrôlent la spécification des neurones monoaminergiques et la synthèse de sérotonine.**

Le facteur de transcription à doigt de zinc *insm1* a été décrit comme un gène cible des facteurs proneuraux dans différents systèmes (Breslin et al., 2007; Castro et al., 2006). Ce facteur est exprimé dans les progéniteurs neuraux et a tout d'abord était impliqué dans le contrôle de la prolifération/différenciation car il peut recruter des facteurs tels que CyclinD1 et les histones déacétylases (HDACs) et réprimer l'expression de facteurs de différenciation comme *neuroD* (Liu et al., 2006; Zhang et al., 2009). Ainsi, il peut contrôler la sortie du cycle cellulaire et la différenciation. Chez la souris, la perte de fonction d'*insm1* par KO conduit à une diminution du nombre de neurones différenciés dans le néocortex, probablement du à des défauts de prolifération des progéniteurs. En revanche, sa surexpression entraîne une augmentation des divisions neurogéniques et du nombre de progéniteurs neuraux en prolifération mais pas du nombre de neurones différenciés. De manière intéressante, la fonction d'*insm1* est particulière car ni son gain, ni sa perte de fonction n'entraîne de phénotype neurogénique (Farkas et al., 2008). Cette observation est cohérente avec le rôle précédemment décrit de *insm1* dans le contrôle du cycle cellulaire où *Insm1* est requis pour maintenir les cellules en prolifération afin d'amplifier le stock de progéniteurs neuraux et inhiber la différenciation neuronale.

En addition à son rôle générique dans la différenciation neuronale et à son rôle dans le contrôle de la prolifération, *Insm1* à récemment été impliqué dans la spécification neuronale

des neurones monoaminergiques chez la souris (Jacob et al., 2009). Les neurones monoaminergiques sont de deux types, sérotonergiques (sécrétant de la sérotonine) ou noradrenergiques (sécrétant de la noradrénaline). Les neurones sérotonergiques sont localisés dans le rhombencéphale ventral. L'expression d'*insm1* est régulée directement par Mash1/Ascl1 dans les progéniteurs des neurones monoaminergiques et est maintenue alors qu'ils sont post-mitotiques. La perte de fonction d'*insm1* dans les embryons KO est responsable d'un défaut de spécification des neurones sérotonergiques. De manière intéressante, *Insm1* est donc impliqué dans la spécification de ces neurones et plus particulièrement dans la synthèse des neurotransmetteurs. Dans ce contexte, les progéniteurs neuronaux peuvent se différencier (expression d'*Aadc*) mais ne peuvent pas se spécifier et exprimer la sérotonine comme l'indique l'absence d'expression de *Pet1* qui est un marqueur spécifique des neurones sérotonergiques. Effectivement, ces neurones sont incapables de produire la sérotonine comme le montre l'absence d'expression de Tph2 (Tryptophan hydroxylase 2) qui est une enzyme clé de la biosynthèse de sérotonine. Ces défauts de production de sérotonine mettent en évidence la fonction d'*Insm1* dans la spécification neuronale et l'expression d'un neurotransmetteur par la régulation de l'expression d'une enzyme nécessaire à sa synthèse (Jacob et al., 2009) (Figure 20).



L'expression d'*Insm1* est régulée par *Ascl1* et est nécessaire pour contrôler l'identité des neurones sérotonergiques. Afin de déterminer si cette capacité est spécifique à *Ascl1* ou bien si elle est partagée avec *Ngn2*, les auteurs ont utilisé une souris Knock-In (KI) (Parras et

al., 2002). Dans ce KI, la séquence codante d'*Ascl1* a été remplacée par celle de *Ngn2*. Ainsi, *Ngn2* est exprimé dans le territoire d'expression endogène d'*Ascl1* et la capacité de *Ngn2* à former des neurones sérotonergiques pourra être testée. Dans ce KI, *Ngn2* est capable de sauver la neurogenèse et l'expression d'*Insm1* dans le rhombencéphale ventral où sont normalement formés les neurones sérotonergiques. Néanmoins, ces neurones qui sont différenciés (expression d'*Aadc*), n'expriment pas de marqueurs de neurones sérotonergiques (*Tph2*) suggérant qu'*Ascl1* et *Ngn2* ont des capacités différentes dans la formation de ces neurones qui sont indépendantes de l'activité de *Insm1* (Figure 24). Ce résultat indique que l'activité spécifique d'*Ascl1* est nécessaire pour conduire les neurones sérotonergiques au bout de leur spécification neuronale (Jacob et al., 2009).

Cette étude montre que les facteurs proneuraux de la famille *ac-sc* et *ato* ont des activités divergentes dans la spécification neuronale. Dans le cas des neurones sérotonergiques, il est clair que *Ascl1* régule l'expression de gènes cibles qui ne peuvent pas être activés par *Ngn2* afin de permettre la production de sérotonine. Bien qu'étant nécessaire à la production de sérotonine, *Insm1* n'est pas le reflet de l'activité spécifique d'*Ascl1*. Comme le montre les expériences de KI, ce gène est une cible commune à *Ascl1* et *Ngn2*. Chez le poisson zèbre, ce module de régulation par *Ascl1a* est également conservé dans le promoteur d'*insmla* et *insmlb* et la perte de fonction de *ngn1* entraîne une perte de l'expression d'*insmla* et *insmlb* dans la plaque neurale (RM and PB données non publiées).

## **2. Ngn2 contrôle de la migration neuronale.**

Les neurones migrent énormément à travers le système nerveux central mais les facteurs qui permettent de coordonner la différenciation neuronale et la migration cellulaire restent méconnus. Plusieurs études ont mis en évidence que les facteurs proneuraux peuvent réguler la migration neuronale. *Ngn2* a la capacité d'activer l'expression de *Dcx* (*Doublecortin* est nécessaire à la polymérisation des microtubules) par l'intermédiaire d' « E-Box » alors qu'il inhibe l'activité d'une petite GTPase, RhoA (modulateur de l'activité du cytosquelette d'actine) indépendamment de la liaison à l'ADN (Ge et al., 2006; Hand et al., 2005). Ces études ont mis en évidence que *Ngn2* peut réguler certains aspects de la migration neuronale indépendamment et indépendamment de son activité transcriptionnelle. Plus récemment, des expériences de gain et perte de fonction de *Ngn2* ont permis l'identification de *Rnd2* comme gène cible dans le cortex de la souris. *Rnd2* est exprimé dans les neurones

corticaux en migration et code pour une GTPase de la famille Rho qui peut réguler l'activité du cytosquelette (Heng et al., 2008). *Ngn2* est nécessaire et suffisant pour l'expression de *Rnd2* dans le cortex.

La perte de fonction de *Rnd2* conduit à des défauts de migration radiale des neurones corticaux mais également de morphologie. En effet, les neurones où *Rnd2* est inactivé présentent fréquemment une morphologie multipolaire au dépend d'une morphologie uni/bipolaire au niveau des neurites. Ces résultats sont cohérents avec un rôle de *Rnd2* dans la régulation du cytosquelette qui contrôle les capacités migratoires d'un neurone. Finalement, l'inactivation spécifique de *Ngn2* dans les neurones corticaux entraîne une absence de l'expression de *Rnd2* et des défauts de migration. Lorsque cette inactivation spécifique de *Ngn2* est associée à une ré-expression exogène de *Rnd2*, spécifiquement dans les neurones corticaux, cela est suffisant pour restaurer les capacités migratoires de ces neurones (Heng et al., 2008). Ces données indiquent que l'effecteur principal de *Ngn2*, dans le contrôle de la migration neuronale, est *Rnd2*.

Les expériences décrites précédemment ont montré que *Ngn2* contrôle la migration neuronale par l'intermédiaire de *Rnd2*. De plus, cette régulation est directe car *Ngn2* peut lier directement deux E-Box localisées en 3' de la séquence codante de *Rnd2*. De manière intéressante, ces deux E-Box sont nécessaires et possèdent le consensus précédemment décrit pour *Ngn2* (CAGATG) (Heng et al., 2008). Cela suggère que *Rnd2* pourrait être une cible spécifique de *Ngn2*. Effectivement, la surexpression d'*Ascl1* n'induit pas la surexpression de *Rnd2*.

Cette étude a permis d'identifier un gène cible régulé spécifiquement par une seule famille de facteurs proneuraux et a mis en évidence qu'un facteur proneural pouvait réguler des processus complexes (la morphologie et la migration cellulaire) par la régulation d'un seul gène. Dans le futur l'identification de nouveaux gènes spécifiquement régulés par les gènes proneuraux de la famille *ato* ou *ac-sc* devrait permettre de mieux comprendre leurs différences d'activités dans la spécification neuronale. De plus, l'identification de ces gènes devrait mettre en évidence de nouveaux aspects de la spécification neuronale contrôlés par les facteurs proneuraux.

C'est avec l'objectif d'identifier des gènes cibles spécifiques des facteurs proneuraux et plus particulièrement de *Ngn1* chez le poisson zèbre que j'ai débuté ma thèse. L'identification de tels gènes devrait me permettre d'une part de mieux comprendre la logique

de régulation transcriptionnelle par Ngn1 et d'autre part d'appréhender les divergences d'activité de Ngn1 et Ascl1a/b lors de la spécification neuronale.

## Résultats et discussion

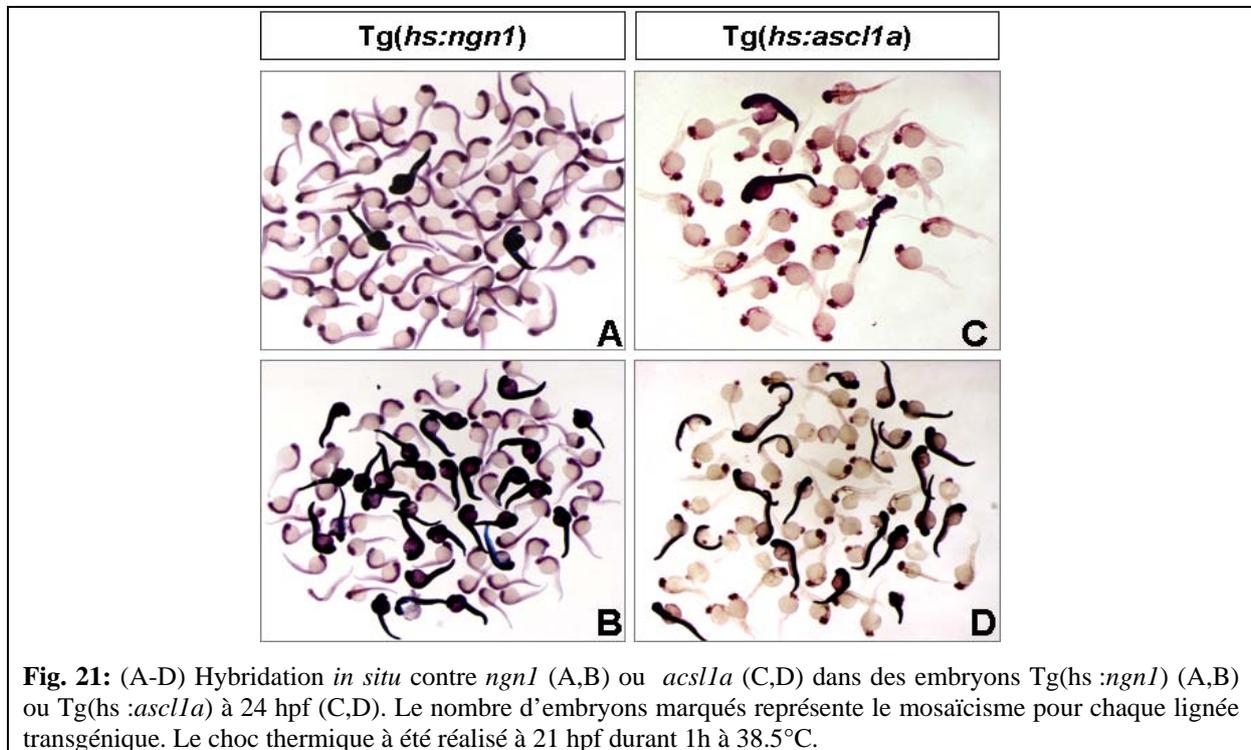
### I. Activités divergentes entre les gènes proneuraux de la famille *atonal* et *achaete-scute* chez le poisson zèbre.

Les expériences de gain de fonction chez la drosophile et de « Knock-In » chez la souris ont montré que les gènes proneuraux de la famille *ac-sc* et *ato* possèdent des activités divergentes (Chien et al., 1996; Parras et al., 2002). Comme chez la drosophile et la souris, chez le poisson zèbre il existe des différences entre les phénotypes mutants pour *ngn1* et *ascl1a* (également appelé *pia*) (Golling et al., 2002; Pogoda et al., 2006). Les embryons mutants pour *ngn1* présentent une absence des neurones sensoriels de Rohon-Beard dans la moelle épinière et des ganglions trijumeaux alors que les embryons mutants pour *ascl1a* perdent les neurones de l'adénohypophyse (Andermann et al., 2002; Cornell and Eisen, 2002; Pogoda et al., 2006). Ces résultats suggèrent que les protéines proneurales Ngn1 et Ascl1a ont des activités divergentes dans la formation des sous-types neuronaux. Néanmoins, il est toujours possible que ces différences de phénotype soient dues à des différences dans les domaines d'expression des deux gènes. Dans le but de mettre en évidence des divergences d'activité entre *ngn1* et *ascl1a* chez le poisson zèbre, j'ai adopté une stratégie de surexpression.

#### 1. Etablissement et validation des lignées transgéniques inductibles par choc thermique pour *ngn1* et *ascl1a*.

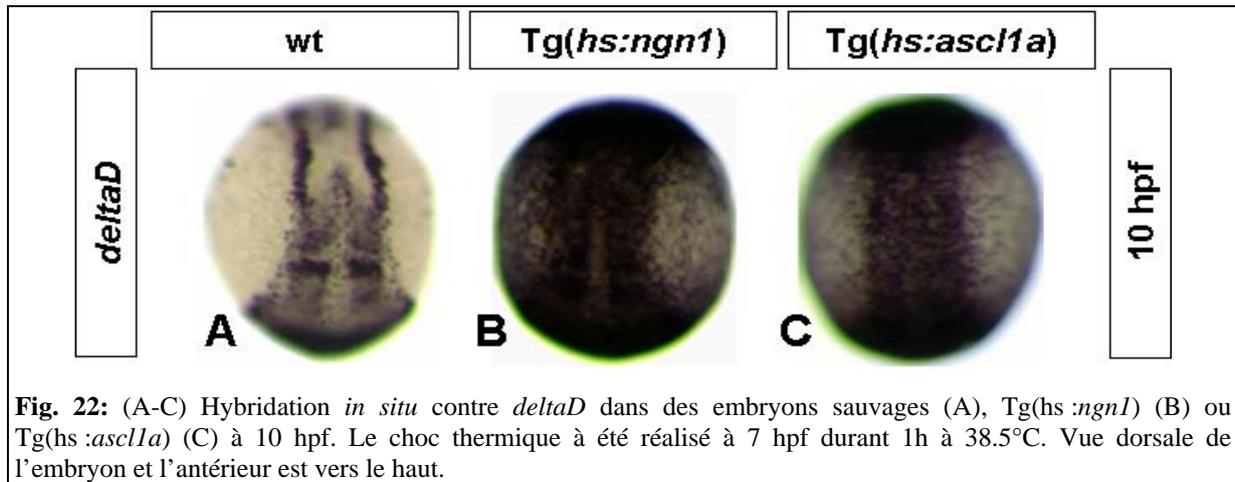
Afin de réaliser des expériences de surexpression, j'ai établi deux lignées transgéniques qui permettent d'induire l'expression de *ngn1* ou *ascl1a* par choc thermique. Pour établir ces lignées transgéniques, deux plasmides ont été construits : *hsp70-4:ngn1* et *hsp70-4:ascl1a*. Ils possèdent le promoteur inductible par choc thermique de *hsp70* en amont de la séquence codante de *ngn1* ou *ascl1a*. Ces constructions plasmidiques ont été injectées dans des embryons sauvages. Après trois mois, les embryons issus des pontes des poissons injectés ont été analysés par PCR pour la présence du transgène. Ainsi, j'ai pu identifier des couples positifs pour la présence du transgène dans la lignée germinale : quatre couples positifs pour le transgène *hsp70-4:ngn1* et deux couples positifs pour le transgène *hsp70-4:ascl1a*. Par la suite, j'ai vérifié l'induction de *ngn1* et *ascl1a* après choc thermique. Pour ce faire, les couples porteurs du transgène ont été croisés puis un choc thermique d'une heure a été réalisé

à 21 heures-post-fécondation (hpf) avant de fixer les embryons à 24 hpf. Les embryons fixés ont été analysés par hybridation *in situ* afin de détecter l'expression du gène proneural d'intérêt. Deux couples sur les quatre positifs pour le transgène *hsp70-4:ngn1* et les deux couples positifs pour le transgène *hsp70-4:ascl1a* présentent une expression ubiquitaire du transgène après choc thermique. Ce résultat a également permis de déterminer le mosaïcisme d'insertion du transgène dans la lignée germinale pour les différents couples. Le mosaïcisme varie selon le stade d'intégration du transgène dans le génome. Le mosaïcisme est de 3 et 40% pour les couples Tg(*hsp70-4:ngn1*) et de 10 et 52% pour les couples Tg(*hsp70-4:ascl1a*). Les deux couples présentant le plus fort taux d'embryons transgéniques ont été utilisés afin d'établir des lignées transgéniques stables hétérozygotes permettant de contrôler l'expression de *ngn1* et *ascl1a* par choc thermique (Figure 21A-D).



Afin de tester les lignées transgéniques pour déterminer si l'ARN transcrit est traduit en protéines fonctionnelles, j'ai étudié l'expression du gène *deltaD* après choc thermique. Il a déjà été montré que le gène *deltaD* de poisson zèbre est une cible directe de Ngn1 et Ascl1a (Hans and Campos-Ortega, 2002). Une hybridation *in situ* contre *deltaD* a été réalisée sur des embryons Tg(*hsp70-4:ngn1*) et Tg(*hsp70-4:ascl1a*) après choc thermique à 7 hpf et fixation des embryons à 10 hpf. De manière attendue, la surexpression de *ngn1* ou *ascl1a* après choc thermique entraîne l'activation de l'expression de *deltaD* dans tout l'embryon (Figure 22A-C). Ce résultat signifie que l'effet d'une surexpression de *ngn1* ou *ascl1a* sur l'expression de

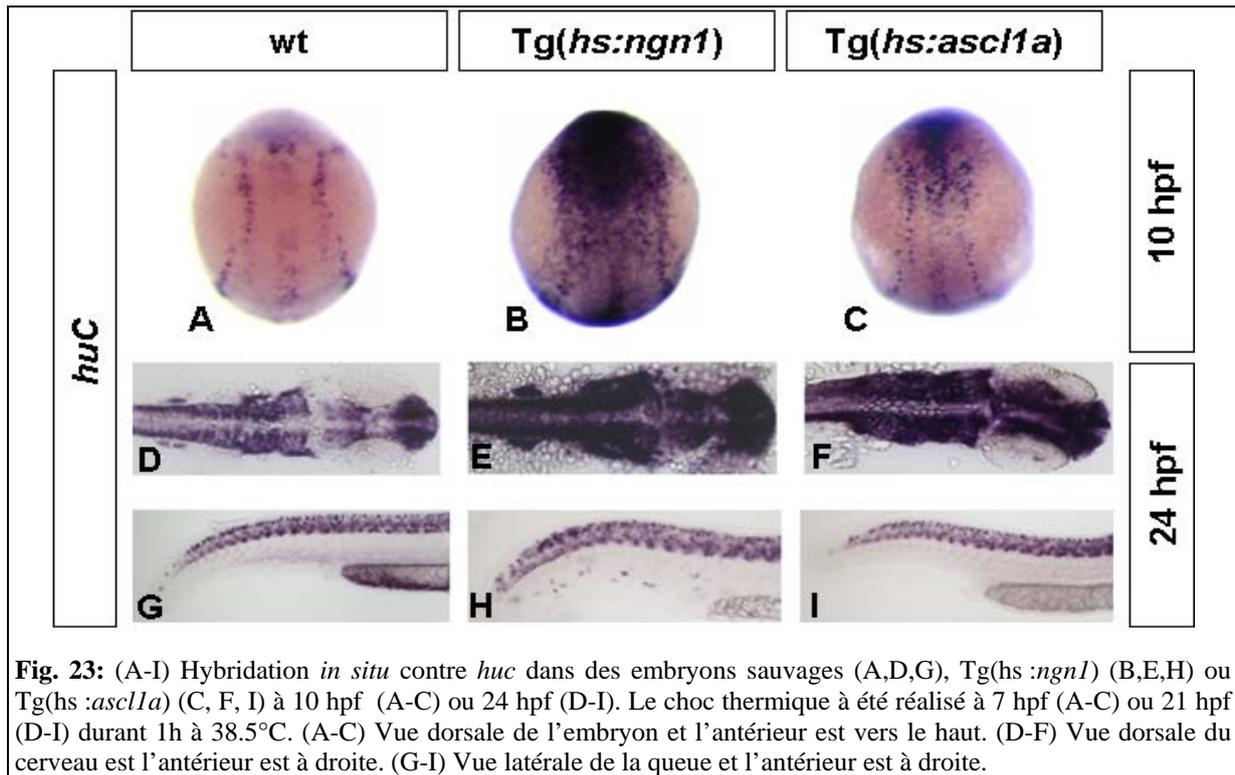
*deltaD* est identique, mais surtout que les lignées transgéniques établies permettent après choc thermique, l'expression de protéines Ngn1 et Ascl1a fonctionnelles.



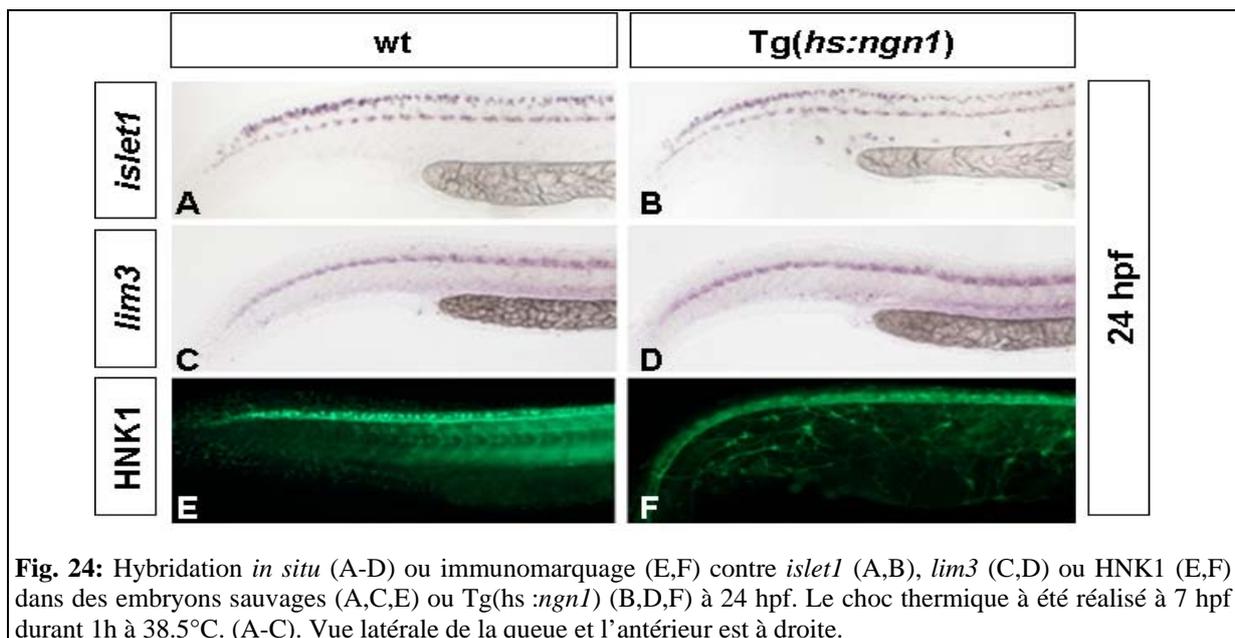
**Fig. 22:** (A-C) Hybridation *in situ* contre *deltaD* dans des embryons sauvages (A), Tg(*hs:ngn1*) (B) ou Tg(*hs:ascl1a*) (C) à 10 hpf. Le choc thermique à été réalisé à 7 hpf durant 1h à 38.5°C. Vue dorsale de l'embryon et l'antérieur est vers le haut.

## 2. Activités redondantes et divergentes des gènes proneuraux *ngn1* et *ascl1a* chez le poisson zèbre.

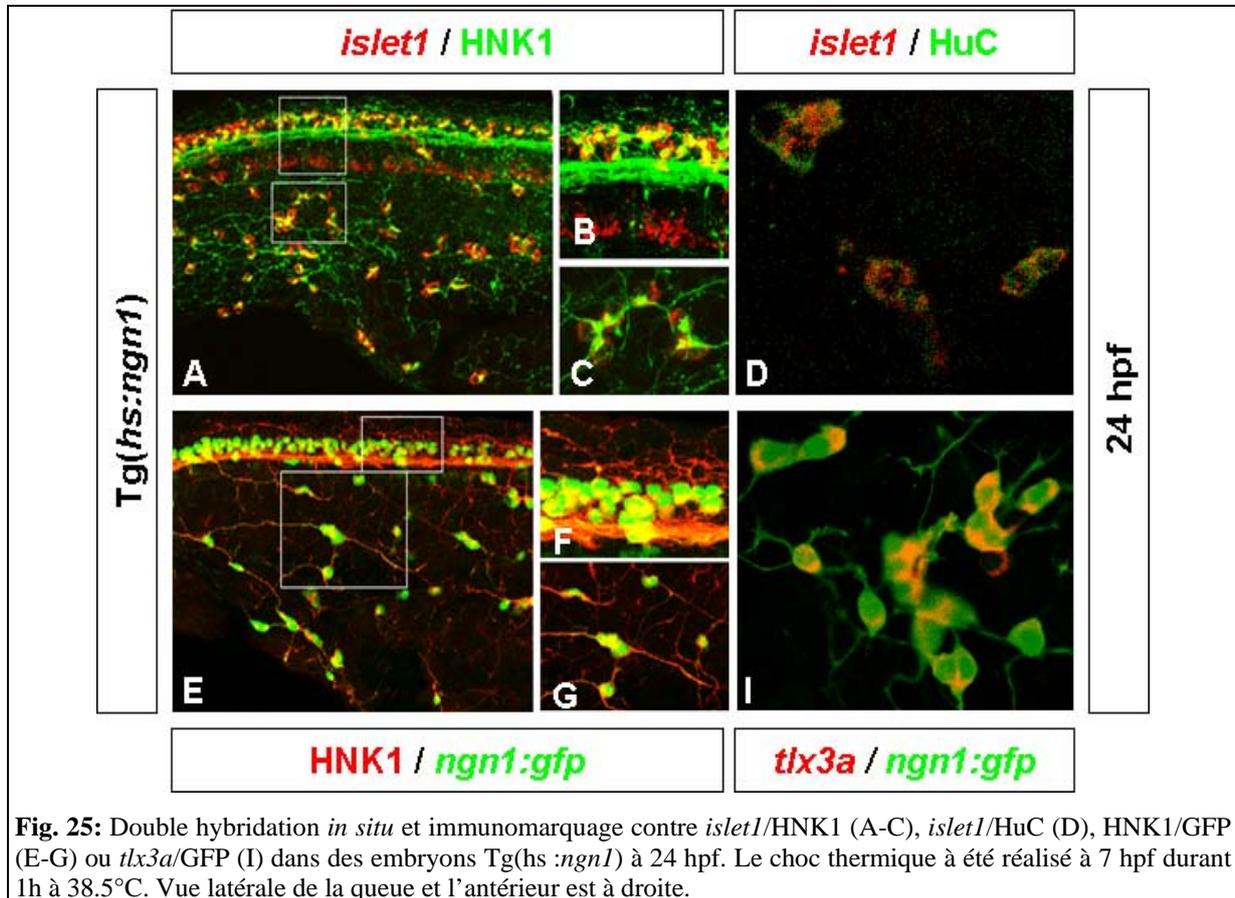
Les lignées transgéniques établies permettent de définir si les gènes proneuraux de poisson zèbre présentent des divergences d'activité lors d'un gain de fonction comme cela est le cas chez la drosophile et la souris (KI) (Chien et al., 1996; Parras et al., 2002). Pour comparer l'activité de Ngn1 et Ascl1a, un choc thermique a été réalisé à 7 hpf puis les embryons ont été fixés à 10 et 24 hpf. Ensuite, une hybridation *in situ* avec la sonde *huC* qui est un marqueur pan neural a été faite sur les embryons fixés. La surexpression de *ngn1* et *ascl1a*, induit l'expression de *HuC* dans la plaque neurale à 10 hpf et dans le cerveau à 24hpf (Figure 23A-F). De manière intéressante, après la surexpression de Ngn1, j'ai observé la présence ectopique de neurones *huC* positifs dans l'ectoderme non neural à 24 hpf (Figure 23G-H). En revanche, après surexpression de *ascl1a*, la présence de neurones ectopiques *huC* positifs n'est pas détectée (Figure 23I). Il a déjà été décrit que la surexpression de *ngn1* induit la formation ectopique de neurones sensoriels après injection de l'ARN codant pour Ngn1 (Blader et al., 1997).



Afin de déterminer l'identité précise de ces neurones, j'ai utilisé une combinaison de différents marqueurs neuronaux. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence que ces neurones ectopiques expriment *islet1* qui est un marqueur de neurones sensoriels et de motoneurones (Figure 24A-B). Afin de discriminer ces deux types neuronaux, j'ai utilisé *lim3* qui est un marqueur de motoneurones et l'anticorps anti-HNK1 (zn-12) qui est un marqueur de neurones sensoriels. Le résultat indique que les neurones ectopiques dans l'ectoderme non neural sont des neurones sensoriels (Figure 24C-F).



De plus, les marqueurs *islet1*/HNK1 et *islet1*/*huC* colocalisent toujours parfaitement indiquant que la surexpression de *Ngn1* n'induit la formation que d'un seul type de neurone ectopique (Figure 25A-D). La comparaison de l'expression endogène dans la moelle épinière d'*islet1* et HNK1 avec celle des neurones ectopiques suggère que ces neurones sont des neurones sensoriels de Rohon-Beard (Figure 25A-C).



**Fig. 25:** Double hybridation *in situ* et immunomarquage contre *islet1*/HNK1 (A-C), *islet1*/HuC (D), HNK1/GFP (E-G) ou *tlx3a*/GFP (I) dans des embryons Tg(*hs:ngn1*) à 24 hpf. Le choc thermique à été réalisé à 7 hpf durant 1h à 38.5°C. Vue latérale de la queue et l'antérieur est à droite.

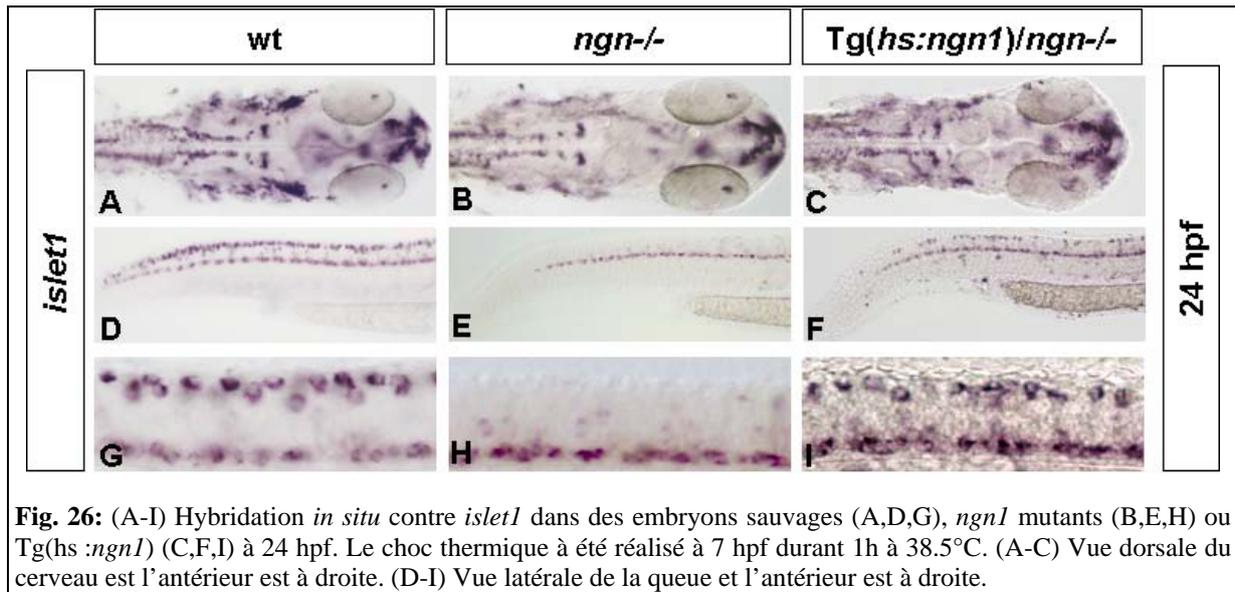
Afin de tester, cette hypothèse, nous avons utilisé une lignée transgénique (Tg(8.4*ngn1:gfp*)) qui exprime la *gfp* sous la dépendance du promoteur de *ngn1* (Blader et al., 2003). A 24hpf, dans la moelle épinière, cette lignée transgénique permet une très forte expression de la *gfp* dans les neurones sensoriels de Rohon-Beard. Les neurones ectopiques induits par *Ngn1* expriment également la *gfp* et présentent une morphologie bi-polaire au niveau de leurs projections axonales soutenant l'hypothèse qu'ils sont des Rohon-Beard (Figure 25E-G). Finalement, l'utilisation d'un marqueur spécifique des neurones de Rohon-Beard, *tlx3a* (Langenau et al., 2002), qui colocalise avec la GFP dans la lignée Tg(8.4*ngn1:gfp*) montre que les neurones ectopiques spécifiquement induits par *Ngn1* dans l'ectoderme non neural sont des neurones sensoriels de Rohon-Beard (Figure 25I).

L'ensemble de ces résultats indique que chez le poisson zèbre les gènes proneuraux de la famille *ac-sc* et *ato* ont des activités communes et des activités différentes. Les deux familles de facteurs proneuraux ont la capacité d'induire la surexpression de *deltaD* ou *huC* qui sont des marqueurs généraux pour les progéniteurs neuraux ou les neurones différenciés respectivement. En revanche, seul *Ngn1* peut induire la formation de neurones sensoriels de Rohon-Beard ectopiques dans l'ectoderme non neural. Ce résultat est intéressant car ces neurones sensoriels sont spécifiquement perdus dans le mutant pour *ngn1*. Ces données indiquent que ce n'est pas uniquement les différences dans le patron d'expression des facteurs proneuraux qui sont responsables de leurs activités spécifiques dans la différenciation neuronale. Ces divergences d'activité passe probablement par la régulation de cibles différentes entre *Ngn1* et *Ascl1a* bien que certaines cibles comme *deltaD* et *huC* soit communes aux deux familles.

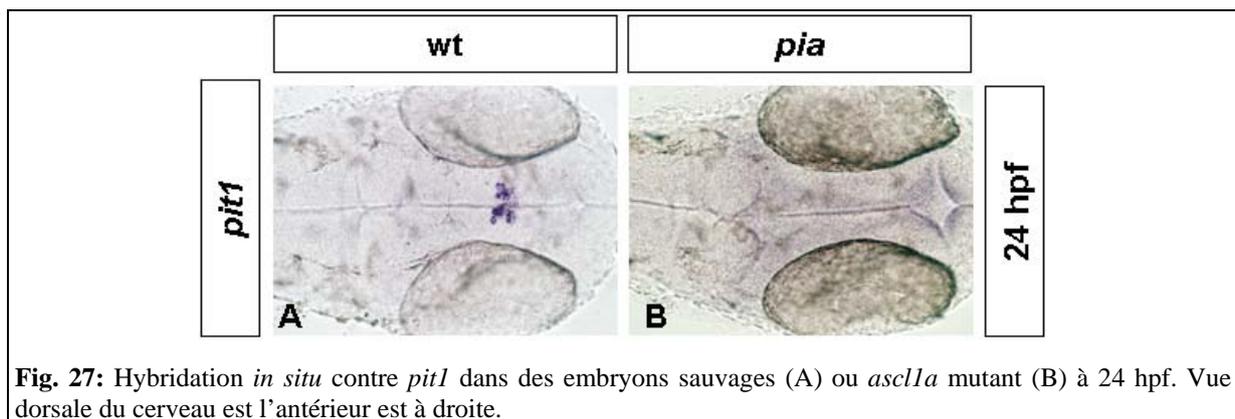
### **3. *Ngn1* et *Ascl1a* ont des activités spécifiques qui permettent de contrôler l'identité des neurones.**

Les expériences précédentes ont montré que *Ngn1* et *Ascl1a* ont des activités différentes pour la formation de neurones sensoriels ectopiques. Néanmoins, il est possible que pour d'autres types de neurones, leurs activités soit identiques. Nous avons donc testé la capacité de *Ngn1* et *Ascl1a* à sauver les phénotypes mutants *ngn1* et *ascl1a* (Golling et al., 2002; Pogoda et al., 2006).

Le phénotype qui caractérise le mutant pour *ngn1* est l'absence de Rohon-Beard dans la moelle épinière et de ganglions trijumeaux dans le cerveau (*Figure 26A-B* et *26D-E*). Ces deux types neuronaux sont différenciés à 10hpf car ils expriment des marqueurs de différenciation neuronale comme *HuC/D* ou *Islet1*. Une surexpression de *ngn1* ou *ascl1a* à 7hpf pourrait permettre de sauver la formation de ces neurones. Comme attendu, la surexpression de *Ngn1* à 7hpf permet à la fois de sauver la formation des neurones sensoriels de Rohon-Beard et des ganglions trijumeaux (*Figure 26A-I*). En revanche, la surexpression d'*ascl1a* n'a aucun effet sur la formation de ces deux structures.



En ce qui concerne le phénotype caractéristique du mutant *pia/ascl1a*, c'est une absence d'adénohypophyse qui est révélée par un marqueur spécifique des neurones adénohypophysaires, *pit1* (Figure 27A-B et (Golling et al., 2002; Pogoda et al., 2006)). La surexpression d'Ascl1a ou Ngn1 à 16 hpf pourrait permettre de sauver sa formation car à ce stade les progéniteurs de l'adénohypophyse expriment *ascl1a* (collaboration with HM.Pogoda, Cologne). En effet, la surexpression d'Ascl1a permet de sauver la formation de l'adénohypophyse. Dans ce cas, 84% des embryons mutants *Tg(hs:ascl1a)/pia* possèdent une adénohypophyse (n=199). En revanche, lors d'une surexpression de Ngn1, les embryons ne présentent pas de marquage *pit1*, ce qui signifie que Ngn1 ne peut pas sauver le phénotype mutant *pia*.

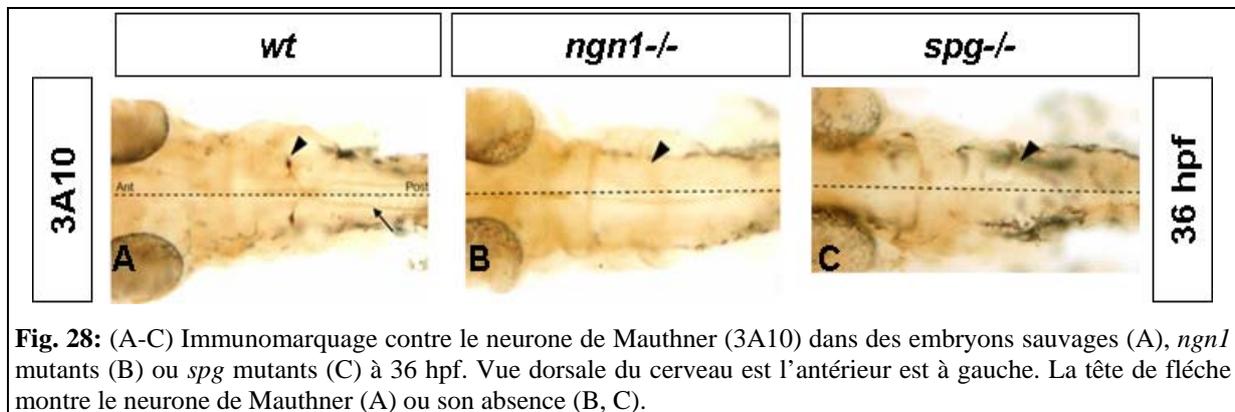


Ces expériences de sauvetage de phénotypes mutants pour *ngn1* et *ascl1a* montrent que la surexpression ubiquitaire de Ngn1 ou Ascl1a au moment adéquat permet de sauver la formation des neurones de Rohon-Beard/ganglions trijumeaux ou de l'adénohypophyse

respectivement. En revanche, *Ngn1* ne peut pas sauver le phénotype du mutant *ascl1a* et vice-versa. Les structures neuronales ainsi formées ont un positionnement identique à celui observé dans des embryons sauvages. Cette observation implique que d'autres facteurs nécessaires à leurs formations sont exprimés indépendamment de *Ngn1* ou *Ascl1a* et sont impliqués dans le positionnement du territoire présomptif de ces structures. Il est envisageable que ces facteurs puissent agir sur la compétence à répondre aux différents gènes proneuraux ou soit des cofacteurs responsables de l'activité spécifique de *Ngn1* et *Ascl1a*.

#### 4. *Ngn1* et *Ascl1a* ont des activités spécifiques pour la formation du neurone de Mauthner.

Le neurone réticulo-spinal de Mauthner est le premier neurone à être post-mitotique chez le poisson zèbre à 7hpf (Mendelson, 1986). Il est facilement identifiable à 36hpf dans le rhombomère 4 par immunomarquage grâce à l'anticorps 3A10. Il a été décrit précédemment dans l'équipe que le mutant pour *ngn1* présente, tout comme le mutant *spiel-ohne-grenzen* (*spg*), une absence de neurones de Mauthner dans le rhombomère 4 (Figure 28A-C, (Burgess et al., 2002), M.Gouzi and P.Blader, données non publiées).



**Fig. 28:** (A-C) Immunomarkage contre le neurone de Mauthner (3A10) dans des embryons sauvages (A), *ngn1* mutants (B) ou *spg* mutants (C) à 36 hpf. Vue dorsale du cerveau est l'antérieur est à gauche. La tête de flèche montre le neurone de Mauthner (A) ou son absence (B, C).

La mutation pour *spg* phénocopie le mutant *ngn1* car *spg* est un facteur de pré-pattern qui est nécessaire pour l'expression précoce de *ngn1* (Reim and Brand, 2002). Nous avons utilisé ces deux fonds génétiques mutants afin de comparer la capacité de *Ngn1* et *Ascl1a* à sauver le neurone de Mauthner. La surexpression de *Ngn1* à 6hpf dans le mutant *ngn1* permet de sauver le neurone de Mauthner dans 72% des cas (n=7) alors que la surexpression d'*Ascl1a* ne le permet jamais (n=7). De même, dans le mutant *spg*, *Ngn1* peut également sauver efficacement le neurone de Mauthner dans 84% des cas (n=6). Malgré le fait qu'*Ascl1a* ne puisse pas sauver le neurone de Mauthner dans le mutant *ngn1*, il a la capacité de sauver le neurone de

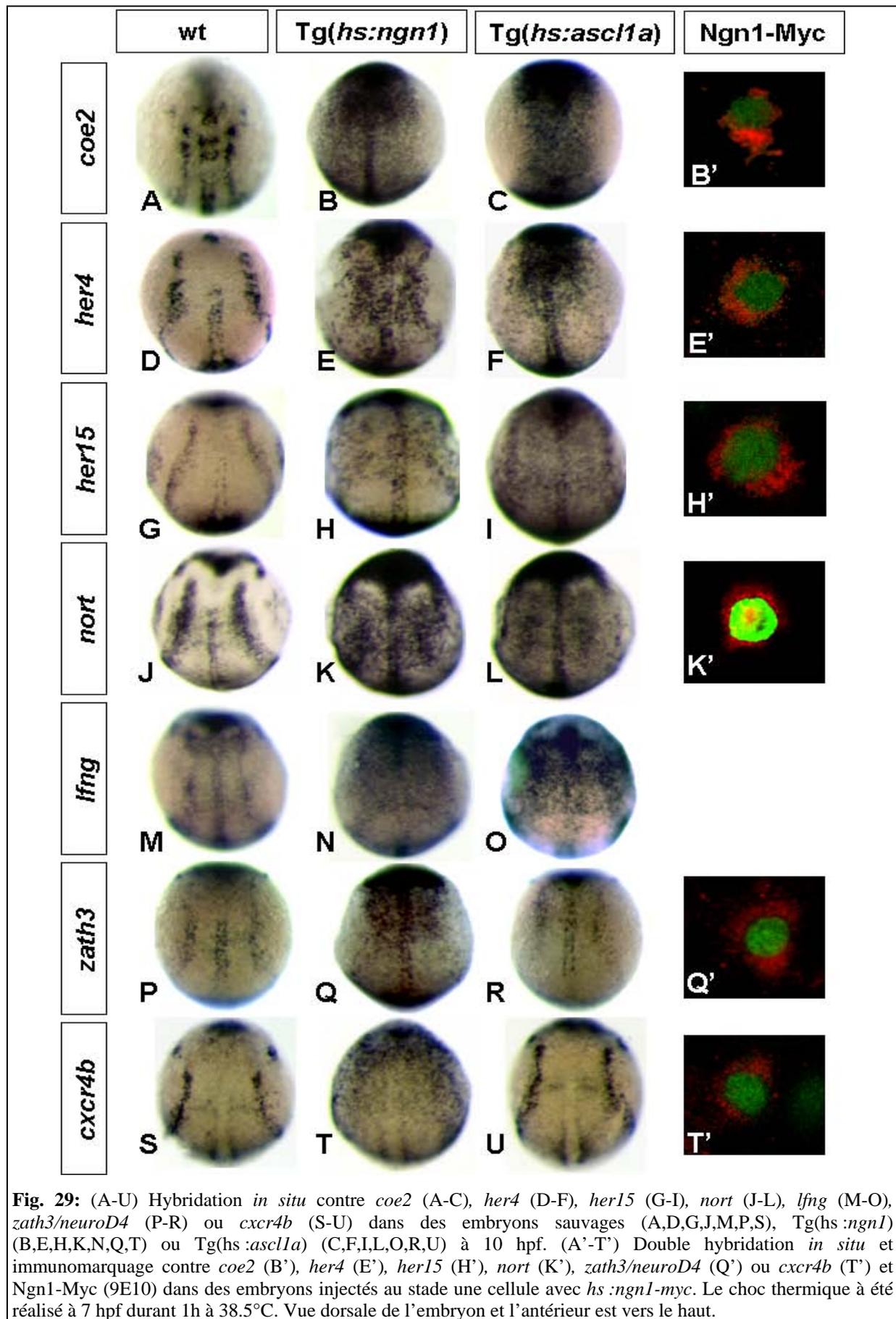
Mauthner dans le mutant *spg*. En effet, 27% des embryons *Tg(hs:ascl1a)/spg* possèdent un neurone de Mauthner dans le rhombomère 4 (n=15).

La comparaison de la capacité de *Ngn1* et *Ascl1a* à sauver le neurone de Mauthner dans deux fonds génétiques mutants montre que leurs activités peuvent être divergentes ou redondantes en fonction du contexte. Dans ce cas, une hypothèse envisageable est que dans le mutant *spg*, contrairement au mutant *ngn1*, *Ascl1a* peut induire l'expression de *ngn1* et conduire à la différenciation et la spécification du neurone de Mauthner. Dans ce cas, cela signifie que la formation du neurone de Mauthner est finalement induite par *Ngn1*. Une expérience soutient cette hypothèse car dans un contexte sauvage, la surexpression de *Ngn1* ou *Ascl1a* à 6 hpf peut dans certains cas induire la formation d'un neurone de Mauthner ectopique dans le rhombomère 2. Cette observation est intéressante car elle montre qu'en fonction du domaine où est exprimé *ascl1a*, sa capacité à induire l'expression de *Ngn1* et à conduire la différenciation neuronale est différente. Il peut le faire dans le rhombomère 2 et 4 du cerveau mais en est incapable dans l'ectoderme non neural.

L'ensemble des expériences de surexpression et de sauvetage de différents sous-types neuronaux par *Ngn1* et *Ascl1a* indique clairement que chez le poisson zèbre comme chez la souris ou la drosophile, les gènes proneuraux de la famille *atonal* et *achaete-scute* ont des activités divergentes.

## **5. Identification de gènes cibles spécifiques ou communs aux facteurs proneuraux.**

Les différences d'activités des gènes proneuraux peuvent être liées soit aux capacités intrinsèques des facteurs de transcription à induire un groupe de gènes cibles différents, soit aux facteurs régulant la compétence à répondre à un facteur proneural en particulier ou aux cofacteurs nécessaires à l'expression de leurs gènes cibles. Dans le but de comprendre l'activité spécifique de *Ngn1* dans la formation des neurones, nous avons cherché des gènes cibles potentiels de *Ngn1* par comparaison de patrons d'expression à 10hpf. Nous avons ainsi identifié 7 gènes qui ont d'une part un patron d'expression similaire à *Ngn1* et d'autres part sont exprimés ubiquitairement après surexpression de *Ngn1* à 7 hpf (*Figure 29A,D,G,J,M,P,S-B,E,H,K,N,Q,T*).



Il se trouve que 5 de ces gènes sont aussi des cibles de *Ascl1a* (*Figure 29C,F,I,L,O,R,U*). De manière intéressante, ces 5 gènes sont connus pour être impliqués dans la régulation de l'activité de la voie Notch (*coe2, her4, her15, nort et lfng*) (Dubois et al., 1998; Nikolaou et al., 2009; Takke et al., 1999; Tsutsumi and Itoh, 2007) (*Figure29C,F,I,L,O*). Il est donc possible que la surexpression de ces gènes soit due au fait que *Ngn1* et *Ascl1a* induisent l'expression de *deltaA* et *deltaD*. L'expression des ligands Delta pourrait induire l'activation de la voie Notch et l'expression de *her4* dans les cellules voisines. Néanmoins, alors que certains de ces gènes sont des cibles directes de la voie Notch (*her4, her15 et nort*), ils peuvent aussi tous être régulés de manière autonome cellulaire par *Ngn1* (*Figure 29B'-T'*). Finalement, nous avons également identifié 2 gènes cibles qui sont régulés spécifiquement par *Ngn1* (*Figure 29P-U*). Ceci montre que les différences d'activité entre les deux familles de facteurs proneuraux peuvent être dues à des différences dans leurs capacités à réguler la transcription de différents gènes cibles.

## 6. Conclusion.

Le but de ce travail était de mettre en évidence des différences d'activité des gènes proneuraux de la famille *Ngn1* et *Ascl1a* dans la formation des neurones chez le poisson zèbre. Ainsi, nous avons pu montrer que les différences entre le patron d'expression de *Ngn1* et *Ascl1a* n'étaient pas les seules responsables des différents sous-types neuronaux formés par ces deux facteurs. En effet, *Ngn1* et *Ascl1a* possèdent une activité spécifique qui est responsable de la formation de neurones avec une identité précise dans un territoire défini. Il est envisageable que ces activités spécifiques soient le reflet d'une activité transcriptionnelle spécifique pour chaque facteur proneural. Nous supposons qu'un ensemble de gènes cibles serait commun aux deux familles et serait responsable de l'établissement de caractéristiques communes à tous les neurones. Actuellement, la plupart des gènes cibles des facteurs proneuraux sont des cibles communes qui contrôlent, pour leur grande majorité, l'activité de la voie Notch. Un deuxième groupe de gènes cibles serait spécifique à chaque famille et serait responsable des caractères spécifiques du neurone tel que la migration cellulaire, les projections axonales, l'interaction avec d'autres types cellulaires (peau, muscle...) et la production de neurotransmetteurs. C'est pourquoi comprendre comment un neurone acquiert une identité particulière nécessite non seulement de comprendre comment les facteurs proneuraux régulent l'expression de gènes cibles différents mais aussi d'étudier la fonction des ces gènes cibles dans la spécification neuronale.

Dans un premier temps, nous avons étudié la régulation d'un gène cible commun à Ngn1 et Ascl1a, *deltaA*. Ceci dans le but de comprendre comment un gène cible des deux familles de gènes proneuraux peut être régulé spécifiquement par l'une ou l'autre famille par l'intermédiaire d'éléments de régulation différents (cf, II). De plus, une étude de la fonction de la régulation autonome cellulaire de *her4/15* par Ngn1 dans la différenciation neuronale a également été entreprise (cf, III). Bien que cette régulation autonome cellulaire de *her4/15* par Ngn1 soit surprenante, l'étude de la fonction de gènes cibles communs à Ngn1 et Ascl1 ne permettra pas de comprendre leurs différences d'activités dans la spécification neuronale. C'est pourquoi dans un deuxième temps, nous avons porté notre attention sur l'étude de deux gènes qui sont régulés de manière autonome cellulaire et qui sont des cibles spécifiques de Ngn1, *neurod4* et *cxcr4b*. Nous avons étudié l'expression et la fonction de ces gènes dans la neurogenèse de la placode olfactive chez le poisson zèbre (cf, IV et V). Neurod4 est un membre de la famille *atonal* qui a une activité redondante avec Ngn1 pour la neurogenèse olfactive alors que Cxcr4b est un récepteur aux chemokines qui est impliqué dans la migration neuronale et la projection axonale.

**II. A cluster of non-redundant Ngn1 binding sites is required for specific *deltaA* expression in zebrafish.**



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/developmentalbiology](http://www.elsevier.com/developmentalbiology)

Evolution of Developmental Control Mechanisms

## A cluster of non-redundant Ngn1 binding sites is required for regulation of *deltaA* expression in zebrafish

Romain Madelaine, Patrick Blader\*

Université de Toulouse, UPS, Centre de Biologie du Développement (CBD), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France  
 CNRS, CBD UMR 5547, F-31062 Toulouse, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received for publication 8 July 2010  
 Revised 16 September 2010  
 Accepted 19 October 2010  
 Available online xxx

## Keywords:

Ngn1  
 Ascl1  
 deltaA  
 Transcriptional regulation  
 Cis-regulatory module (CRM)  
 E-box

## ABSTRACT

Proneural genes encode bHLH transcription factors that are key regulator of neurogenesis in both vertebrates and invertebrates. How these transcription factors regulate targets required for neural determination and/or specification is beginning to be understood. In this study, we show that zebrafish *deltaA* is a transcriptional target of proneural factors. Using a combination of transient and stable transgenic reporters, we show that regulation of *deltaA* by one such proneural factor, Ngn1, requires three clustered E-box binding sites that act in a non-redundant manner. Furthermore, we show that as for other proneural targets, members of the different proneural families regulate *deltaA* expression via distinct cis-regulatory modules (CRMs). Interestingly, however, while the *deltaA* CRM regulated by a second proneural factor, Ascl1, has been conserved between *delta* genes of different species, we show that the Ngn1 CRM has not. These results suggest that evolutionary constraints on the mechanism by which Ngn1 regulates gene expression appear less strict than for Ascl1.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

The central nervous system of both vertebrates and invertebrates is capable of highly complex functions. This is achieved thanks to the staggering variety of neurons that compose it and the circuitry into which these neurons are integrated. The development of the CNS requires that the appropriate neurons be born at the correct times and places and in the correct numbers. A key molecular step in this process is the expression of so-called proneural genes, which are both necessary and sufficient for the formation of neurons, and are highly conserved from invertebrates to humans (Powell and Jarman, 2008).

Proneural genes encode basic-Helix–Loop–Helix (bHLH) transcription factors. In the developing nervous system, two large families of proneural genes have been identified on the basis of sequence homology in the bHLH domain with either *Drosophila* Atonal (Ato) or members of the Achaete–Scute family (Asc); the so-called Ato family can be further subdivided based on more subtle differences in the bHLH sequences (Bertrand et al., 2002). Interestingly, despite comparable molecular structures and roles during neurogenesis, Asc and Ato-like proteins display functional specificity with respect to the type of neurons they are involved in generating. For instance, while misexpression of Atonal in *Drosophila* predominantly induces the generation of ectopic chordotonal organs, Scute misexpression induces the formation of ectopic external sense organs (Chien et al.,

1996). Similarly, reciprocal knock-in experiments in mice have shown that Mammalian achaete–scute Homolog 1 (Mash1 or Ascl1) and Neurogenin 2 (Ngn2), respectively homologues of the *Drosophila* *achaete–scute* and *atonal* genes, also have divergent functions (Parras et al., 2002). Moreover, in zebrafish overexpression of Ngn1 but not Ascl1a leads to formation of ectopic Rohon–Beard sensory neurons in the non-neural ectoderm (RM and PB, unpublished observations; (Blader et al., 1997). These results argue that while members of the Ascl and Ngn families share common transcriptional targets implicated in the generation of generic or immature neurons, in parallel they also direct the expression of distinct, non-overlapping sets of targets that impose aspects of specific neural identity on these neurons (Bertrand et al., 2002; Guillemot, 2007). Understanding how different bHLH proneural proteins regulate their targets is beginning to shed light on the molecular mechanisms that underlie the different activities of these factors (Powell and Jarman, 2008).

For the most part, proneural factors regulate transcription as heterodimers with ubiquitously expressed partners, or E proteins. Such heterodimers bind to the general consensus CANNTG, known as E-boxes, in the genomic sequence flanking target genes. Accumulated evidence suggests that different proneural/E-protein dimers display preferences for the two variable nucleotides in the E-box sequence (Bertrand et al., 2002; Powell et al., 2004). Nevertheless, this alone is unlikely to explain the divergent functions of the Ato and Asc families as, given their small size, even specific E-boxes are overrepresented in the genome relative to the number of proneural targets. Insights into the mechanisms underlying the distinct regulatory activities of different proneural factors have been provided by studies of the

\* Corresponding author. Fax: +33 5 61 55 65 07.  
 E-mail address: [blader@cict.fr](mailto:blader@cict.fr) (P. Blader).

*cis*-regulatory modules (CRMs) that these factors activate at target loci. Both invertebrate and vertebrate proneural factors regulate the expression of genes of the Delta family of transmembrane Notch ligands (Castro et al., 2006; Haenlin et al., 1994; Henke et al., 2009; Kunisch et al., 1994). Dissection of the regulatory DNA upstream of the mouse *Delta1* gene, a common target of both *Ascl1* and *Ngn2*, identified two elements, HI and HII, that are capable of driving reporter gene expression in a subset of the pattern of expression of the endogenous *Delta1* gene, and that display high sequence identity to regions located upstream of the zebrafish *deltaD* gene (Beckers et al., 2000). Functional analysis in zebrafish has shown that, while HI is a CRM specifically responsive to *Ngn1*, HII is only regulated by *Ascl1a/b* (Hans and Campos-Ortega, 2002).

More recently, *Delta1* regulation in the mouse has been shown to involve synergistic interaction between *Ascl/E12* heterodimers and a POU-domain transcriptional co-factor via a conserved octamer binding site located between the E-boxes in HII (Castro et al., 2006). The presence of an *Ascl/POU* consensus sequence in the regulatory regions of other *Ascl* targets suggests that there is a conserved logic for *Ascl* regulatory activity. For *Ngn*, however, things are less clear. It has been shown that *Ngn2* and *NeuroM* synergise with LIM homeodomain containing transcription factors for the regulation of HB9 expression during specification of motoneurons (Lee and Pfaff, 2003). In addition, sequence analysis of the genomic DNA flanking genes identified by transcriptome analysis to be up-regulated by *Ngn* has highlighted potential *Ngn*-regulated CRMs containing E-boxes and potential transcriptional cofactor binding sites, including those for POU-domain transcription factors (Gohlke et al., 2008; Mattar et al., 2004; Seo et al., 2007). However, mutating these potential cofactor sites has no effect on the *Ngn*-responsiveness of these predicted CRMs (Seo et al., 2007).

In the hope of identifying an underlying code to *Ngn* regulation of its targets, as has been shown for at least 21 genes by *Ascl1* in the mouse, we have dissected the upstream regulatory regions of the zebrafish *deltaA* gene; such a code can be thought of as a minimum combination of *Ngn* binding sites and associated co-factors that comprise a “generic” *Ngn*-responsive CRM. Here, we show that *deltaA* is a *bona fide* proneural target and provide evidence that, as for *deltaD*, members of the *Ngn* and *Ascl* families regulate *deltaA* via distinct CRMs. However, while the *Ascl* responsive CRM is conserved between *deltaA*, *deltaD* and *Delta1* conservation of a minimum CRM regulated by *Ngn1* could not be found for the three genes. Finally, we have identified an *Ngn*-responsive CRM for *deltaA*, and show that it functions via the non-redundant activity of three clustered E-boxes.

## Materials and methods

### Fish lines and developmental conditions

Embryos were raised and staged according to standard protocols (Kimmel et al., 1995). Embryos homozygous for *ngn1*<sup>hi1059</sup> mutations were obtained by intercrossing heterozygous carriers (Golling et al., 2002); adults heterozygous for the *ngn1*<sup>hi1059</sup> allele were identified by PCR genotyping of tail-clip genomic DNA. Heat-shocks were performed in a water bath at 38.5 °C. Embryos were fixed overnight at 4 °C in 4% paraformaldehyde/1× PBS, after which they were dehydrated through an ethanol series and stored at –20 °C until use.

### In situ hybridization and immunostaining

*In situ* hybridizations were performed as previously described (Oxtoby and Jowett, 1993). Antisense DIG labelled probes for *ngn1* (Blader et al., 1997), *gfp* (Blader et al., 2003), *deltaA* and *deltaD* (Haddon et al., 1998) were generated using standard procedures. *In situ* were revealed using either BCIP and NBT (Roche) or Fast Red (Roche) as substrate. Immunohistochemical stainings were performed as

previously described (Masai et al., 1997), using either anti-GFP (1/1000 Torrey Pines Biolabs) or anti-Myc (1/10, “9E10”) (Evan et al., 1985) as primary antibodies and Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (1/1000) as secondary antibodies (Molecular Probes).

### Plasmid construction

*Tg(hs:ngn1)* or *Tg(hs:myc-ngn1)* transgenes: In a first step, the previously reported zebrafish *hsp70* promoter (Halloran et al., 2000) was amplified by PCR and used to replace the CMV enhancer promoter of pCS2:CFP (a gift from Dr. U. Strähle). Subsequently, the coding region of CFP was replaced by a fragment containing the *ngn1* or *myc-ngn1* open reading frame (Blader et al., 1997). The resulting *hs:ngn1* or *myc-ngn1* cassettes were then transferred into *pI-SceI*, which has been described to enhance the frequency of stable transgenesis and minimise the mosaicism in transient transgenesis (Thermes et al., 2002).

*deltaA* promoter:reporter plasmids: A previously described genomic phage library was screened using a PCR fragment corresponding to the 5'UTR of *deltaA* (Appel and Eisen, 1998; Stachel et al., 1993). From a positive clone, a 10 kilobases BamHI genomic fragment extending 5' from 75 basepairs upstream of the *deltaA* ATG was subcloned into pBluescript. Upstream deletions were made in this fragment by replacing restriction fragments with oligonucleotide linkers containing a NotI restriction site; the resulting plasmids are *pBL:7.1delA*, *pBL:4.5delA*, *pBL:2.9delA* and *pBL:1.6delA*. In parallel, a 75 basepair PCR fragment corresponding to the genomic DNA between the BamHI restriction site and the *deltaA* ATG was subcloned upstream of Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT), β-Galactosidase (βGal) and GFP:SV40pA cassettes; while CAT and βGal cassettes were in pBluescript, the corresponding GFP cassette was in *pI-SceI*. Finally, the 7.1, 4.5, 2.9 and 1.6 kilobase *delA* fragments were subcloned NotI/BamHI into the various *0.75delA:reporter* vectors. Further 5' deletions of the *4.5delA:reporter* fragments and mutations in the various E-boxes were made by replacing a NotI/SphI fragment in the original *4.5delA:reporter* clone, corresponding to the genomic DNA from 4.5 to 2.9 kilobases upstream of the *deltaA* ATG, with an appropriately modified PCR fragment. The amplified DNA fragments were subsequently sequenced.

### Plasmid Injection and establishment of transgenic lines

To establish stable transgenic lines, *pI-SceI-hs:ngn1* and the various *pI-SceI-deltaA:gfp* plasmids were injected into 1-cell stage embryos with I-SceI meganuclease to maximize the number of integration events (0.5× I-SceI Buffer, 10% I-SceI enzyme). Similarly, for transient expression of *Myc-Ngn1*, *pI-SceI-hs:myc-ngn1* was injected with I-SceI meganuclease. Stable transmission of the *Tg(hs:ngn1)* transgene was detected by PCR genotyping using genomic DNA extracting from at least 50 F1 embryos. In subsequent generations, PCR genotyping of adult carriers was performed on tail-clip genomic DNA; Transgenic lines for the various *delA* promoter:reporter constructs were identified by GFP fluorescence. At least two independent insertions were analysed for each transgenic construct.

### CAT and βGal ELISA assay

The various *pBLdelA:CAT* plasmids were co-injected with *pBL7.1deltaA:lacZ* (20 ng/μl) and synthetic mRNA encoding either *ngn1* or *ascl1a* (500 ng/μl). The number of copies of the different CAT plasmids injected was normalised as a function of the length of the various constructs. mRNAs were produced using a mMessage Machine SP6 kit following the manufacturer's instructions (Ambion, Inc). Injected embryos were allowed to develop to 10 hpf at which stage total proteins were extracted and the relative levels of CAT and βGal expression were determined as previously described using a commercially available ELISA kit (Hans and Campos-Ortega, 2002;

Vize, 1996); raw data generated in this manner are absorbance levels and not absolute protein levels. Each construct was tested three times and for each test the complete series of constructs to be compared was injected. In order to render the different CAT levels comparable,  $\beta$ Gal levels from the *pBL7.1deltaA:lacZ* internal standard for all the injected construct in one replicate series were first set to a fixed value and the factor required for this adjustment was applied to the corresponding CAT levels. Subsequently, the ratios of the CAT levels within each replicate were calculated relative to the *pBL7.1deltaA:CAT* of the replicate. Statistical analysis of the CAT ratios was performed after all values had been normalised in this manner.

#### Electrophoretic mobility shift assays

Oligonucleotide probes were labelled with T4 polynucleotide kinase and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (New England Biolabs). Ngn1, Ascl1a and E12 proteins were produced by coupled *in vitro* transcription and translation in wheat germ lysates (TNT, Promega). Proteins were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) to ensure synthesis and equal loading. For electrophoretic mobility shift assays (EMSA), proteins were incubated at room temperature for 30 min with 20 ng of labelled probe and 1  $\mu$ g poly dI–dC in 20  $\mu$ l binding reactions (5% glycerol, 5 mM HEPES buffer[pH 7.9], 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 5 mM NaCl, 2.5 mM DTT, and 1 mg/ml BSA). The mixtures were then loaded onto 4% non-denaturing polyacrylamide gels in 0.25 $\times$  TBE running buffer. Competition experiments were performed in a 100 $\times$  excess of unlabeled probes. Limiting probe concentrations were used in order to avoid super-shifting, thus allowing easy comparison between the effects of different mutations.

Oligonucleotide probes for EMSA analysis are listed below. The E-boxes are underlined and the mutated nucleotides are indicated in lowercase (only sense oligos are listed):

#### *delA*

CTGGGTTGCAGATGGAAGGGCATCTGCTGTGTAAACATATG  
CTGGATAA

#### *delAm3–5*

CTGGGTTGtGATGGAAGGGtTCTGCTGTGTAAAtgTATG  
CTGGATAA

#### *delAm3*

CTGGGTTGtGATGGAAGGGCATCTGCTGTGTAAACATATG  
CTGGATAA

#### *delAm4*

CTGGGTTGCAGATGGAAGGGtTCTGCTGTGTAAACATATG  
CTGGATAA

#### *delAm5*

CTGGGTTGCAGATGGAAGGGCATCTGCTGTGTAAAtgTATG  
CTGGATAA

#### *delAm3/4*

CTGGGTTGtGATGGAAGGGtTCTGCTGTGTAAACATATG  
CTGGATAA

#### *delAm3/5*

CTGGGTTGtGATGGAAGGGCATCTGCTGTGTAAAtgTATG  
CTGGATAA

#### *delAm4/5*

CTGGGTTGCAGATGGAAGGGtTCTGCTGTGTAAAtgTATG  
CTGGATAA

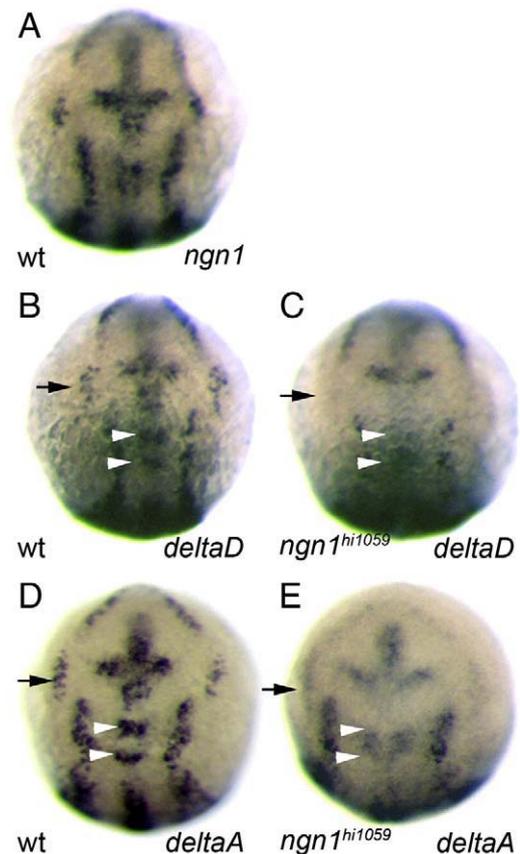
## Results

### *deltaA* behaves like a transcriptional target of Ngn1

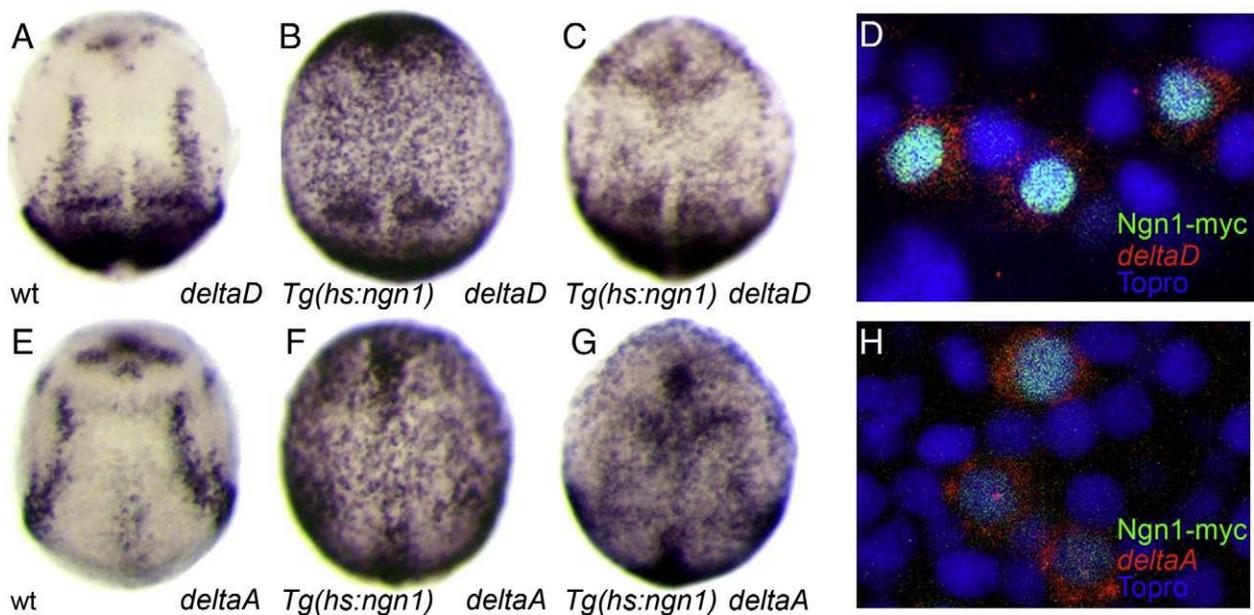
At 11 h post-fertilisation (hpf), the expression of *neurogenin1* (*ngn1*) prefigures the site of formation of primary neurons in the zebrafish

neural plate (Fig. 1A and (Blader et al., 1997; Korzh et al., 1998)). The Ngn1 target gene *deltaD* is expressed in an analogous pattern in the neural plate at this stage (Fig. 1B and (Haddon et al., 1998)); unlike *ngn1* expression, which is restricted to the nervous system, *deltaD* expression is also detected in the pre-somitic mesoderm (Haddon et al., 1998; Hans and Campos-Ortega, 2002). A second zebrafish *delta* gene, *deltaA*, also displays a pattern of expression highly reminiscent of *ngn1* in the neural plate at this stage of development suggesting it is a Ngn1 target (Fig. 1D and (Appel and Eisen, 1998; Haddon et al., 1998)). Consistent with this idea, and in a manner similar to *deltaD*, the expression of *deltaA* is down-regulated in the anterior and lateral neural plate of *ngn1* mutant embryos at 11 hpf (Fig. 1C, E and (Cornell and Eisen, 2002)).

We reasoned that if *deltaA*, like *deltaD*, is a transcriptional target of Ngn1, ectopic expression of Ngn1 should lead to the induction of *deltaA* transcription. In order to address this further, we established a stable transgenic line in which the *ngn1* coding region is placed under the control of the *hsp70* promoter, *Tg(hs:ngn1)*. Transgenic embryos rapidly and ubiquitously express *ngn1* transcripts shortly after heat-shock (data not shown). As expected for a validated Ngn1 target, heat-shock at 7 hpf induces the ubiquitous expression of *deltaD* at 10 hpf (Fig. 2A, B). Similarly, widespread expression of *deltaA* is detected under the same heat-shock conditions (Fig. 2E, F). Furthermore, both *deltaD* and *deltaA* expression can be induced in as little as 15 min after 15 min of heat-shock (Fig. 2C, G). Finally, transient, mosaic expression of a similar *hsp70*-driven transgene in which Ngn1 has been epitope-tagged shows that the induction of both *deltaD* and *deltaA* is cell autonomous (Fig. 2D, H). Taken together, the similarity of expression



**Fig. 1.** Loss of Ngn1 function leads to loss of *deltaA* and *deltaD* expression. Whole-mount *in situ* hybridization against *ngn1* (A), *deltaD* (B, C) or *deltaA* (D, E) in zebrafish embryos at 11 hpf. Expression in wild type embryos show that *ngn1*, *deltaD* and *deltaA* share similar expression patterns (A, B, D). In *ngn1* mutant embryos (C, E), *deltaD* and *deltaA* expression is strongly reduced in the anterior neural plate; this is most notable for the trigeminal ganglia (black arrows in B–E) and the medial clusters in rhombomeres 2 and 4 (white arrowheads in B–E). Embryos are viewed dorsally with anterior up.



**Fig. 2.** Activation of *deltaA* and *deltaD* by Ngn1 is rapid and cell autonomous. Whole-mount *in situ* hybridization against *deltaD* (A–D) and *deltaA* (E–H) in embryos at 9 hpf (C, G) or 10 hpf (A, B, D, E, F, H). *Tg(hs:ngn1)* embryos heat-shocked at 7 hpf display ectopic expression of *deltaD* and *deltaA* 2 h after treatment (B, F). Similarly, mis-expression of Ngn1 at 8.5 hpf induces *deltaD* and *deltaA* expression in as little as 30 min (C, G). Single confocal sections of the neural plate at 10 hpf show that mosaic mis-expression of a Myc-tagged form of Ngn1 (in green) induces *deltaD* and *deltaA* (in red) in an apparently cell autonomous manner (D, H); nuclei are labelled with Topro (blue) to show that there are cells in the field of view that do not express Ngn1-myc or *delta* and that induced *delta* transcripts form a halo around the Ngn1-myc positive nucleus. Embryos are viewed dorsally with anterior up.

patterns and our loss and gain of function data strongly suggest that *deltaA*, like *deltaD*, is a direct transcriptional target of Ngn1.

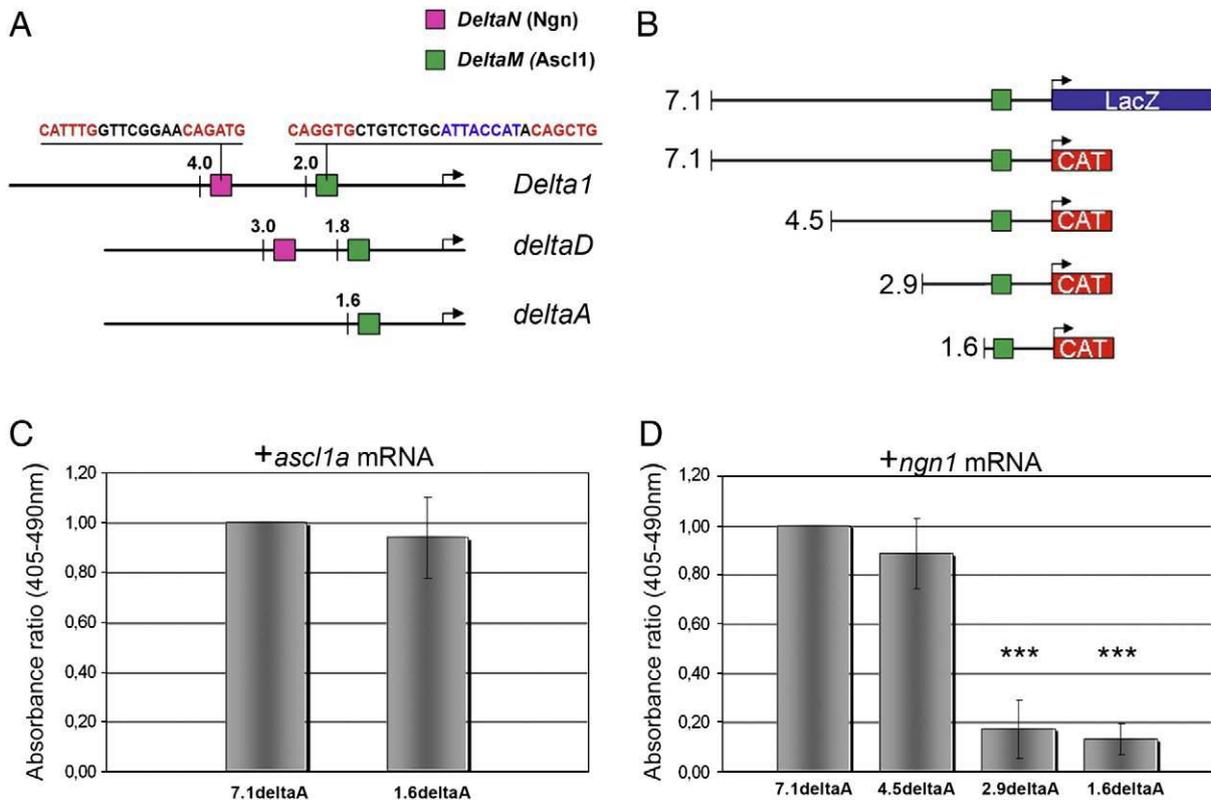
#### Genomic region upstream of *deltaA* responds to Ngn1

Comparison of the upstream genomic sequences of the zebrafish *deltaD* gene and mouse *Delta1* genes revealed two distinct blocks of conserved sequence, HI and HII, containing couplets of E-boxes that are directly regulated by members of the Ngn (referred to as DeltaN in Castro et al., 2006) and Ascl (referred to as DeltaM in Castro et al., 2006) families of proneural factors, respectively (Beckers et al., 2000; Castro et al., 2006; Hans and Campos-Ortega, 2002). Surprisingly, while sequence comparison between the zebrafish *deltaA* and *deltaD* genomic loci and the mouse *Delta1* locus reveals conservation of the two E-boxes and intervening sequence activated by members of the Ascl family (from 86% to 93% conserved depending on the gene pairs being compared), conservation of the corresponding CRM regulated by Ngn1 is only observed between *deltaD* and *Delta1* (95% conserved, Fig. 3A).

Lack of DeltaN conservation at the *deltaA* locus suggests that the molecular logic of Ngn1 transcriptional regulation of *deltaA* is different from that of *deltaD* and *Delta1*. In order to gain insights into how Ngn1 regulates *deltaA*, we used a previously described transient mis-expression system to identify *deltaA* CRMs regulated by Ngn1 (Hans and Campos-Ortega, 2002; Vize, 1996). First, we generated reporter constructs containing a series of 5'-deletions in a 7.1 kb genomic DNA located immediately upstream of the translational start-site of *deltaA* fused to the coding region of the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene (Fig. 3B). These *delA*:CAT reporters were co-injected into fertilised zebrafish embryos with synthetic mRNAs encoding proneural factors and the level of CAT expression was determined at 10 hpf; levels of CAT expression were normalised against a co-injected *lacZ* reporter construct containing the full-length genomic fragment (*7.1delA*:*lacZ*; Fig. 3B). As an initial control for the approach, both the *7.1delA* and *1.6delA*:CAT reporter constructs were tested in co-injection with mRNA coding for zebrafish achaete-scute-like 1a (*Ascl1a*). Significant reporter expression was detected from both constructs after co-injection presumably as both

constructs contain the conserved Ascl CRM (Fig. 3C); in the absence of *ascl1a* RNA, no CAT or  $\beta$ Gal expression was detected (data not shown). Furthermore, when normalised against  $\beta$ Gal the level of induced CAT expression was highly reproducible for both constructs indicating that this assay is robust and suggesting that the DeltaM-like sequence upstream of *deltaA* behaves as a *bona fide* Ascl-regulated CRM (Fig. 3C). We next co-injected the various *deltaA*:CAT reporters with the *7.1delA*:*lacZ* and Ngn1 encoding mRNAs. As can be seen in Fig. 3D, while the *4.5delA*:CAT reporter displays activity similar to the full length fragment, CAT expression was significantly reduced when driven off the *2.9delA* and *1.6delA* genomic fragments. These results suggest that an Ngn1-responsive CRM is located between  $-2.9$  and  $-4.5$  kb upstream of the *deltaA* coding region. Furthermore, we conclude that members of the Ngn and Ascl families of proneural factors regulate *deltaA* via distinct CRMs as Ascl1a but not Ngn1 was able to induce CAT expression from the *1.6delA* genomic fragment.

To confirm the Ngn1-responsive CRM activity identified using the mis-expression approach and analyze the spatio-temporal expression drive by this element, we generated stable transgenic lines carrying Green Fluorescent Protein (GFP) under the control of the *4.5delA* genomic fragment, *Tg(4.5delA:gfp)*. The pattern of GFP driven by the transgene was highly reminiscent of the pattern of endogenous *deltaA* transcription throughout the central nervous system at 24 hpf (Fig. 4A–C and data not shown); a notable exception is the dorsal limit of the hindbrain that expresses *deltaA* but where GFP was not detected. In parallel, we compared the pattern of *gfp* transcripts driven by the *Tg(4.5delA:gfp)* transgene with endogenous *deltaA*. Here again, with the exception of the dorsal hindbrain, the expression patterns were remarkable similar (Fig. 4D vs. Fig. 4E). We also generated a transgenic line in which GFP activity is driven by the *2.9delA* fragment, *Tg(2.9delA:gfp)*. The expression of *gfp* transcripts from the shorter transgene is less robust than from *Tg(4.5delA:gfp)* (Fig. 4E vs. Fig. 4F). While this difference is suggestive of a ngn1-responsive CRM being located in the genomic interval between 4.5 and 2.9 kb upstream of *deltaA*, it is possible that the  $-4.5$  to  $-2.9$  kb fragment is only required to amplify the activity of the Ascl-responsive CRM in an Ascl1a/b-dependent manner. To address this possibility, we compared the expression of the two transgenes with the endogenous *deltaA*



**Fig. 3.** Ngn1 and Ascl1a regulate *deltaA* expression via distinct *cis*-regulatory modules. (A) Schematic representation of *deltaA*, *deltaD* and *Delta1* loci highlighting conservation of *DeltaN* (pink) and *DeltaM* (green) sequences, which are regulated by Ngn and Ascl, respectively; the E-boxes (red) and POU binding sites (blue) are highlighted in the respective sequences. (B) Schematic representation of the *deltaA* reporter gene constructs. (C, D) Histograms showing the ratio of CAT levels after the mis-expression various promoter:reporter constructs. Assays of CAT expression are normalized against the 7.1*deltaA*::LacZ; the ratio of activated 7.1*deltaA*::CAT:7.1*deltaA*::LacZ was arbitrarily set to one. Embryos were injected at the one-cell stage with 7.1*deltaA*::LacZ, a CAT reporter gene construct and synthetic mRNA for either *asc1a* (C) or *ngn1* (D). Error bars represent s.d. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$ ; \*\*\* $P < 0.0005$  using a *t*-test.

gene at 10hfp, a stage where neither of the two identified zebrafish achaete–scute genes is active but *ngn1* is already expressed (Allende and Weinberg, 1994; Blader et al., 1997; Korzh et al., 1998). While the *Tg(4.5delA:gfp)* transgene is expressed in a pattern virtually identical to *deltaA*, no expression from the *Tg(2.9delA:gfp)* transgene is detected at this stage (Fig. 4G, H, J). Finally, we analysed the responsiveness of the two transgenes to mis-expression of Ngn1. While heat-shock induced expression of *gfp* was not detected in *Tg(2.9delA:gfp)/Tg(hs:ngn1)* embryos (Fig. 4K), ubiquitous *gfp* expression was detected in double *Tg(4.5delA:gfp)/Tg(hs:ngn1)* transgenic embryos after heat-shock (Fig. 4I). Altogether, results from our transient mis-expression analysis and stable transgenic lines strongly suggest that a CRM is located between  $-4.5$  and  $-2.9$  kb upstream of *deltaA* that responds to Ngn1.

#### *Ngn1* regulates *deltaA* expression via the activity of at least 3 E-boxes

To refine the Ngn1 CRM within the genomic region between 4.5 and 2.9 kb upstream of *deltaA*, we generated three 5' deletions of the 4.5*delA* fragment, fused them to the CAT reporter and tested their activity in the mis-expression system (4.2*delA*, 3.8*delA* and 3.4*delA*). None of these deletions affected the capacity of the resultant fragment to respond to Ngn1 suggesting that the Ngn1 CRM is located in 475 bps between  $-3.4$  and  $-2.9$  kb upstream of *deltaA* (data not shown).

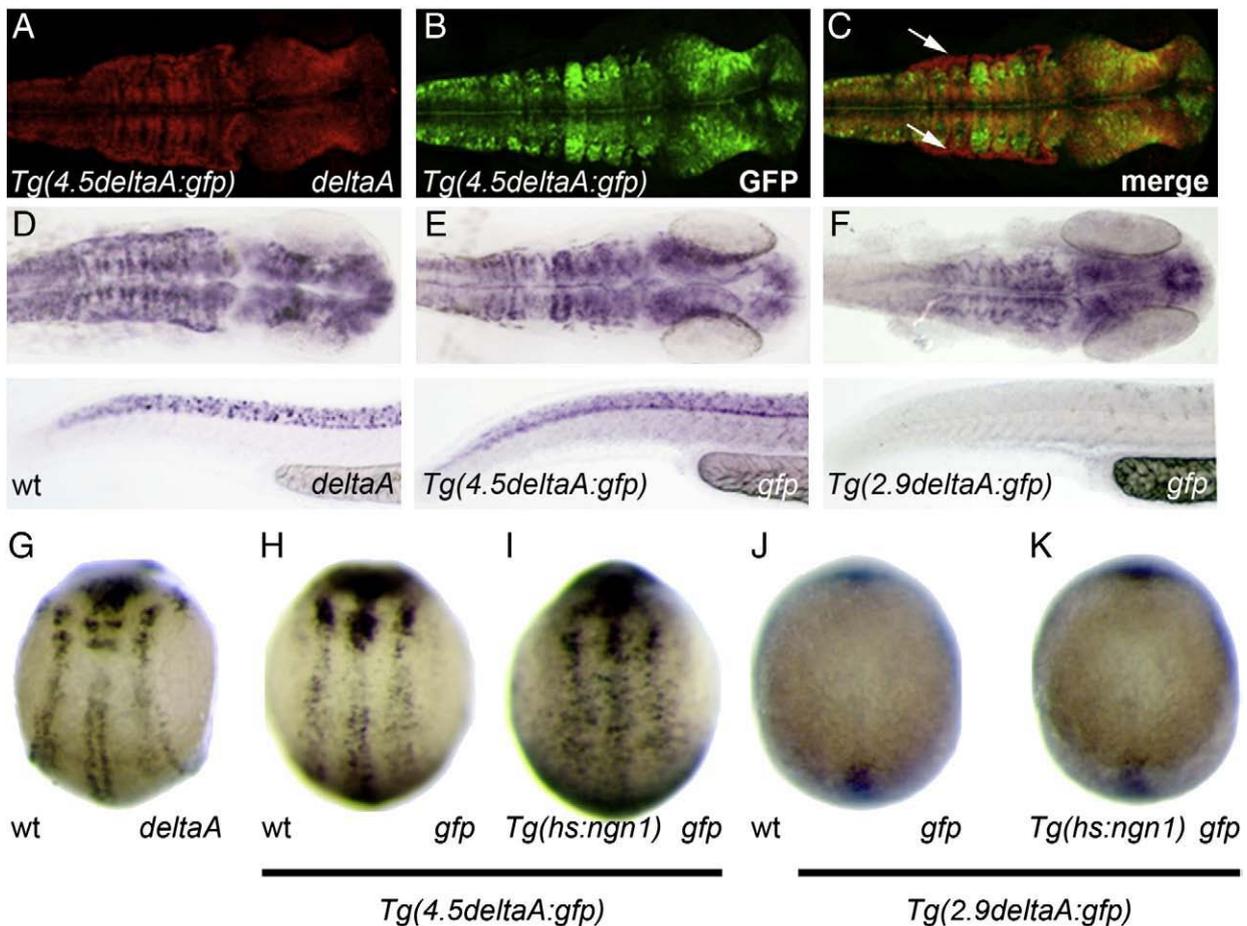
Proneural genes encode bHLH transcription factors that regulate gene expression via 6 base-pair (bps) sequences known as E-boxes (CANNTG) in the genomic DNA flanking of their targets. We identified 5 E-box sequences in the genomic fragment that is responsive to Ngn1 mis-expression (Fig. 5A); two E-boxes are relatively isolated (E1 and E2) whereas the remaining three E-boxes are found clustered in 34 bp

(E3, E4 and E5). To address the relative function of these E-boxes, we generated a series of 3.4*delA* fragments harbouring mutations in individual E-boxes (Fig. 5B). Mutation of either E-box E1 or E2 had little effect on the responsiveness of the 3.4*delA* fragment to Ngn1 mis-expression (3.4*mE1* and 3.4*mE2*; Fig. 5B). Strikingly, however, mutations in any one of the clustered E-boxes reduced the activity of the fragment to levels similar to those detected with the 2.9*delA* fragment (3.4*mE3*, *mE4* or *mE5*; Fig. 5B). Finally, we generated a 3.4*delA* fragment carrying mutations in either the three clustered E-boxes (3.4*mE3–5*) or in all five E-boxes (3.4*mE1–5*). No significant reduction in the activity of these two mutated fragments was detected relative to the single E-box mutations or the 2.9*delA* fragment (Fig. 5B).

As before, we confirmed our results from transient mis-expression by generating stable transgenic line for each of the three individual E-box mutations, *Tg(4.5delAmE3:gfp)*, *Tg(4.5delAmE4:gfp)*, *Tg(4.5delAmE5:gfp)*, as well as the triple mutation, *Tg(4.5delAmE3–5:gfp)*. As can be seen in Fig. 5, expression of GFP in these E-box mutated transgenic lines was indistinguishable from the *Tg(2.9delA:gfp)* (Fig. 5C–H). Thus, from our transient mis-expression analysis and stable transgenesis data, we conclude that the activity of three clustered E-boxes is required for transcriptional regulation of *deltaA* by Ngn1.

#### Differential E-boxes affinities suggest that cooperative Ngn1 binding is required for *deltaA* expression

Three explanations can be envisaged for the all-or-nothing activity of the clustered E-boxes in the Ngn1-regulated CRM; the three E-boxes need to be occupied for CRM activity (threshold), each E-box is required for correct loading of the Ngn1 onto the remaining E-boxes in the CRM (loading) or a combination of these two possibilities. To



**Fig. 4.** A *ngn*-regulated *cis*-regulatory module is located between  $-2.9$  and  $-4.5$  kb upstream of *deltaA*. (A–C) Confocal projections of double in situ/immunolabelling showing extensive overlap in the expression of endogenous *deltaA* mRNA and GFP protein expression in *Tg(4.5deltaA:GFP)* embryos at 24 hpf; a notable exception is the dorsal limit of the hindbrain that expresses *deltaA* but where GFP is not detected (white arrows in C). (D–F) Whole-mount *in situ* hybridization against *deltaA* (D) or *gfp* in *Tg(4.5deltaA:GFP)* (E) versus *Tg(2.9deltaA:GFP)* (F) transgenic embryos at 24 hpf. The shorter transgene drives *gfp* expression in a significantly more restricted pattern. (G, H) The expression of endogenous *deltaA* and GFP expression in *Tg(4.5deltaA:GFP)* embryos at 10 hpf are highly similar. (I–K) Mis-expression of *Ngn1* induces ectopic expression of *gfp* in 10 hpf *Tg(4.5deltaA:GFP)* embryos but not in stage-matched *Tg(2.9deltaA:GFP)* embryos. Embryos at 24 hpf are mounted with anterior to the right; the brain is viewed dorsally and the trunk and tail are viewed laterally with dorsal part up; at 10 hpf, embryos are viewed dorsally with anterior up.

address the mechanistic importance of individual E-boxes in the *Ngn1* CRM, we analysed the binding of *Ngn1* to the three clustered E-boxes using a gel mobility shift assay. As can be seen in Fig. 6, *in vitro* translated *Ngn1* and its partner *E12* bind to a probe containing the three intact E-boxes (*delA*; Fig. 6A). Furthermore, binding can be efficiently competed with an excess of unlabelled wildtype probe but not probe containing mutations in the three E-boxes (Fig. 6A). Similarly, *Ngn1/E12* binding is eliminated if the three E-boxes are mutated (*delAmE3–5*; Fig. 6C). Finally, *Ascl1a/E12* heterodimers bind very weakly to the wild type probe attesting to the specificity of this element for *Ngn1* (Fig. 6C).

Next, using probes carrying mutations in couplets of E-boxes we addressed the intrinsic binding affinity of *Ngn1/E12* heterodimers to individual E-boxes. Interestingly, while our transgenesis experiments suggest that each of the three E-boxes is required in a similar manner for transgene activity *in vivo*, there are significant differences in the specific capacity of each E-box to bind *Ngn1/E12 in vitro*. Thus, while *Ngn1/E12* heterodimers bind strongly to E4 (*delAmE3/5*), they bind less well to E5 (*delAmE3/4*) and virtually no binding is detected to E3 (*delAmE4/5*; Fig. 6B). In parallel, we addressed the effect of mutating single E-boxes on the overall binding to the two remaining E-boxes. Mutations in distinct E-boxes also have differential effects on *Ngn1/E12* binding *in vitro*. For instance, while mutating either E3 or E5 has little effect (*delAmE3* and *delAmE5*), mutating E4 significantly reduces *Ngn1/E12* binding to the probe (Fig. 6C). As the binding seen in the

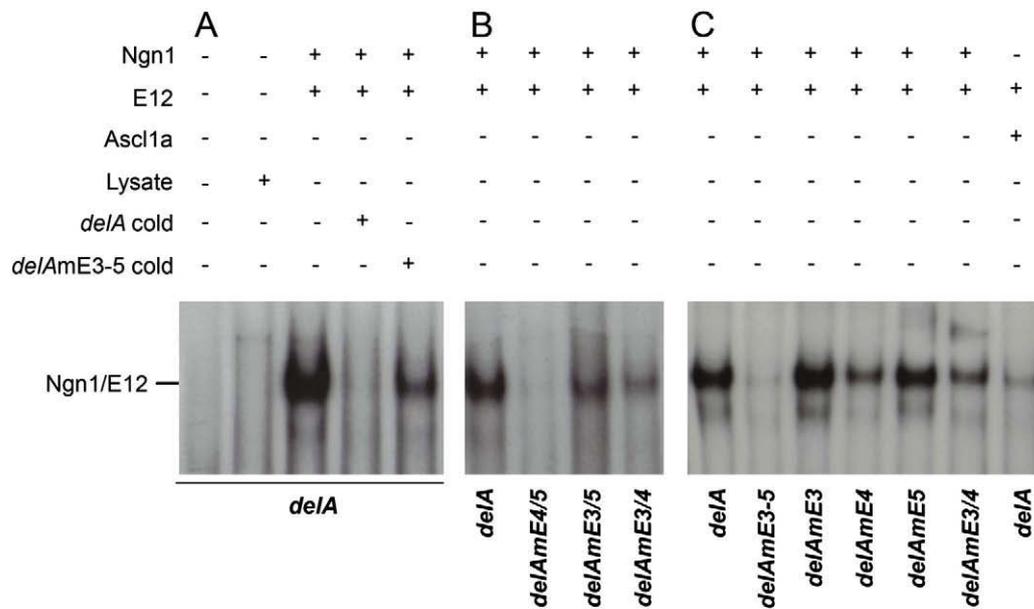
single E4 mutation is similar to that of the double E3/4 mutation, this confirms that binding to E3 is weak. Interestingly, however, the E4 site alone (*delAmE3/5*) binds less well than the E3 and E4 sites together (*delAmE5*) suggesting that E4 cooperates in the loading of E3. Finally, binding to E5 alone (*delAmE3/4*) is similar to binding to E3 and E5 together (*delAmE4*) suggesting that these sites do not cooperate during the loading of *Ngn1/E12* (Fig. 6B, C).

In conclusion, our *in vitro* results suggest that there are distinct intrinsic capacities for each E-box. Furthermore, E4 appears to be required for strong *Ngn1/E12* binding on E3 and E5; in the absence of E4, E3 and E5 are not able to cooperate for loading. Finally, the absolute requirement for E3 *in vivo* and the weak binding of *Ngn1/E12* heterodimers to this site *in vitro* suggests that activity of the *deltaA* *Ngn1* CRM requires interaction between the E-boxes. Thus, both loading and threshold factors appear to be important for *deltaA* *Ngn1* CRM activity.

## Discussion

Proneural transcription factors regulate generic neurogenesis as well as the specification of specific subtypes of neurons (Bertrand et al., 2002; Chien et al., 1996; Guillemot, 2007; Parras et al., 2002). It has become clear that the functional differences between proneural genes relative to the subtypes of neurons they specify reflect that these transcription factors regulate overlapping but distinct groups of





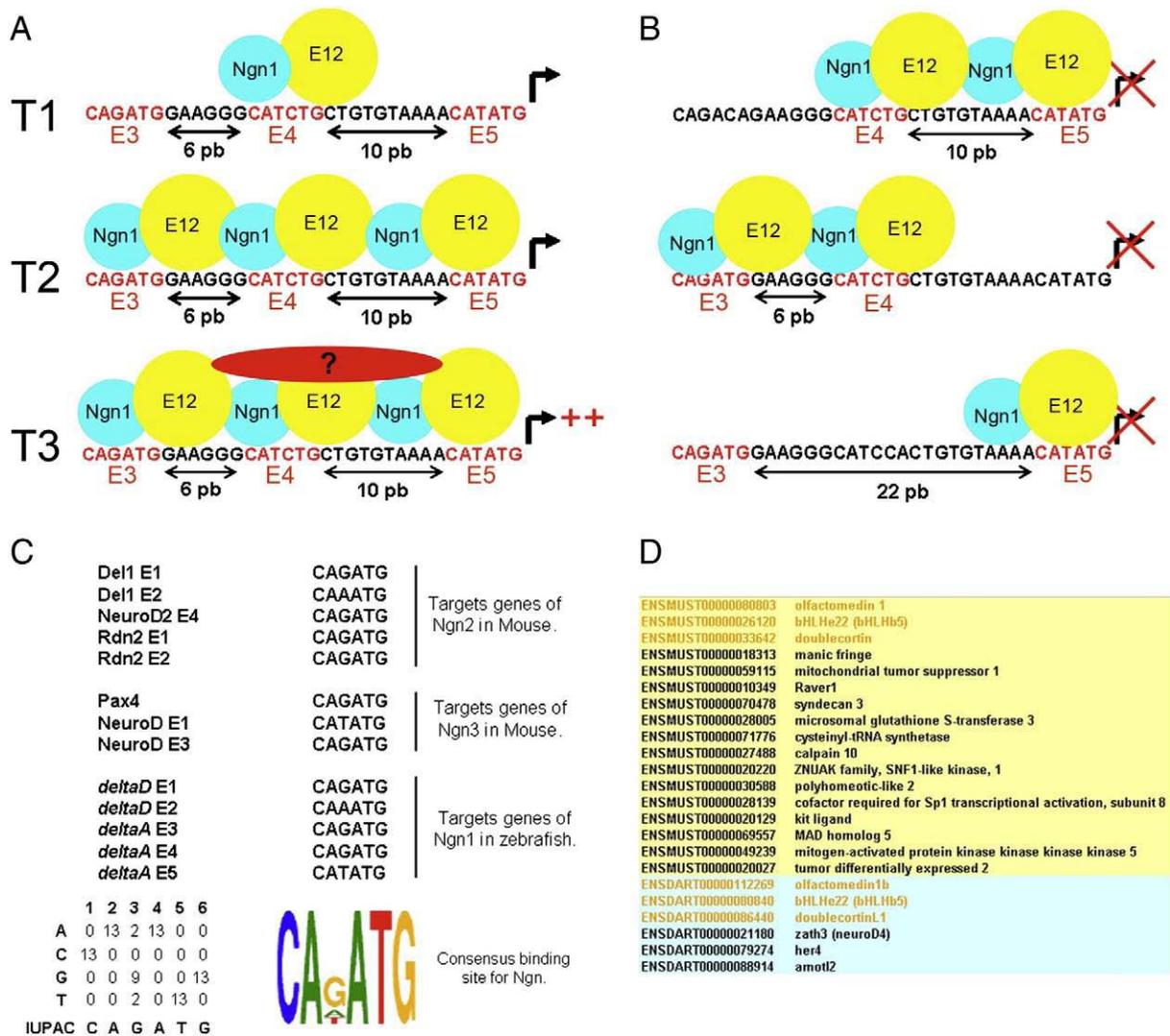
**Fig. 6.** Specific DNA binding of Ngn1/E12 to the *deltaA* CRM. *In vitro* transcribed/translated Ngn1, Ascl1a and E12 were assayed by gel mobility shift assay (EMSA) for binding to a *delA* probe or similar probes containing mutations in specific E-boxes. (A) Ngn1/E12 heterodimers bind to *delA* and an excess of cold probe efficiently competes this binding. Little competition is detected with cold probes carrying mutations in the three E-boxes. (B) Different affinities of Ngn1/E12 heterodimer binding for individual E-boxes are highlighted by EMSA using *delA* probes carrying mutations in different pairs of E-boxes; while binding is strong to E4 (*delAmE3/5*), binding is poor to E5 (*delAmE3/4*) and virtually undetectable to E3 (*delAmE4/5*). (C) Different affinities of Ngn1/E12 heterodimer binding to couplets of E-boxes are highlighted by EMSA using *delA* probes carrying mutations in individual E-boxes. While Ngn1/E12 binding is strong to E4/E5 (*delAmE3*) and E3/E4 (*delAmE5*), binding is strongly decreased when E4 is mutated (*delAmE4*); binding is lost when the three E-boxes are mutated (*delAmE3-5*) and the wildtype *delA* probe is bound more specifically by Ngn1/E12 than Ascl1a/E12.

E4, and its upstream partner, E3, have the same sequence, our binding studies indicate that E4 interacts strongly with Ngn1/E12 heterodimers while E3 interacts very weakly, if at all; the downstream E-box (E5) binds with an intermediate affinity. Based on our *in vitro* and *in vivo* data, we propose a model for how Ngn1 regulates the *deltaA* CRM (Fig. 7A, B). While the validity of this model could be addressed using a Chromatin Immunoprecipitation based strategy combined with the transgenic lines that we have established carrying E-box mutations, such an approach will require the generation of suitable antibodies against zebrafish Ngn1.

Regulation of *Delta1* in the mouse and *deltaD* in the zebrafish is achieved via distinct Ascl and Ngn CRMs (Beckers et al., 2000; Castro et al., 2006; Hans and Campos-Ortega, 2002). The activation of these CRMs by specific bHLH factors appears to be regulated at the level of E-box preference. Indeed, a number of studies have highlighted preferred E-box sequences for Ascl (CAGSTG) and Ngn (CANATG) (Bertrand et al., 2002; Castro et al., 2006; Gohlke et al., 2008; Hans and Campos-Ortega, 2002; Powell and Jarman, 2008; Powell et al., 2004; Seo et al., 2007). In the case of *Delta1/deltaD*, interaction with a POU-domain transcriptional co-factor is also required for activity of the Ascl-responsive CRM. Nonetheless, consensus E-box sequences remain primordial for specificity as this Ascl CRM can be rendered Ngn-responsive by mutating the E-boxes to the Ngn consensus (Castro et al., 2006). In our study, we show that *deltaA* is regulated via two distinct E-box-containing CRMs in a manner similar to zebrafish *deltaD* and mouse *Delta1*. Furthermore, we show that the activity of three clustered E-boxes is necessary for the Ngn1-responsive CRM to function. While to our knowledge this represents a novel logic/architecture for an Ngn CRM, the three E-boxes respect the emerging consensus (two CAGATG and one CATATG E-boxes). Adding the three *deltaA* E-boxes described in this study and the recently described E-boxes regulated by Ngn2 at the mouse *Rnd2* locus to the matrix of confirmed Ngn-responsive E-boxes allows the consensus to be further refined to CA(a/t/g)ATG (Fig. 7C; (Castro et al., 2006; Hans and Campos-Ortega, 2002; Heng et al., 2008; Huang et al., 2000; Lin et al., 2004; Oda et al., 2000; Smith et al., 2003). The two E-boxes in the -3.4

to -2.9 kb fragment that are not responsive to Ngn1 mis-expression (E1 CAATG and E2 CACATG) do not conform to this refined Ngn consensus, coherent with the idea that responsiveness is in part controlled by E-box preference.

Evidence from other proneural targets also indicates that modules only containing multiple consensus-respecting E-boxes are not sufficient to provide complete transcriptional activity to proneural responsive CRMs. Indeed, recent reports have highlighted the requirement of non-bHLH cofactors for transcriptional regulation by members of both the Ato and Ascl families of proneural factors (Powell and Jarman, 2008). Thus, while respecting the E-box consensus provides specificity to the CRM, complete activity requires other factors such as members of the POU domain proteins in the case of Ascl1 or LIM-homeodomain proteins in the case of Ngn2 and NeuroM (Castro et al., 2006; Lee and Pfaff, 2003). Sequence analysis approaches have revealed binding sites for potential co-factors that are statistically over represented in the genomic DNA flanking the E-boxes in proneural responsive CRMs but the functional relevance of these findings has yet to be exhaustively explored (Gohlke et al., 2008; Seo et al., 2007). Similarly, we have identified binding sites for POU-domain and Sox family members in the immediate vicinity of the 3 E-box CRM of *deltaA*. While the impact of these sites on Ngn1 regulation of *deltaA* remains to be explored, we have evidence that a genomic fragment upstream of *deltaA* containing the three E-box motif and POU/Sox binding sites is not sufficient to drive faithful reporter expression from a heterologous minimal promoter (RM and PB, unpublished observations). A simple explanation would be that the fragment tested is missing other closely linked cofactor binding sites. Alternatively, the activity of this fragment could require a longer-range interaction with the endogenous *deltaA* promoter. This idea is supported by a recent study showing that in the zebrafish there are significant differences in specificity of reporter expression driven by CRMs when coupled with the different promoters (Gehrig et al., 2009). In this regard, it would be interesting to assay the activity of the *deltaA* CRM in mouse embryos when coupled with a minimal promoter as proneural CRMs clearly drive specific expression of reporters under these conditions (Castro et al., 2006).



**Fig. 7.** A proposed Model for Ngn1 regulation of the *deltaA* CRM and other potential Ngn targets with a similar CRM. (A) In the first instance, Ngn1/E12 heterodimers bind the E4 E-box of the *deltaA* CRM (T1). Subsequently, E3 and E5 are bound but the orders remain unclear (T2). Finally, cofactors (in red) or the generic transcriptional machinery contact the Ngn1/E12 bound CRM and activate transcription of *deltaA* (T3). (B) *in vitro* binding studies suggest that when either E3 or E5 are mutated, the remaining E-boxes are filled. However, when E4 is mutated we predict that only E5 is bound. (C) Compiling Ngn-responsive E-box sequences from the literature and this study allows a CA(a/t/g)ATG consensus to be predicted as a Ngn preferred E-box. (D) While a *deltaA*-like CRM architecture can be found flanking 17 of 140 murine genes (highlighted in yellow) previously identified as potential Ngn targets by transcriptome analysis, 6 zebrafish orthologues (highlighted in blue) of these 140 genes also contain a *deltaA*-like CRM; 3 genes are found common to both mouse and zebrafish (red text).

To determine if a *deltaA*-like CRM architecture is associated with other potential Ngn targets, we asked if the genomic DNA flanking potential Ngn target previously highlighted by transcriptome analysis in the mouse contains a similar CRM sequence (Gohlke et al., 2008; Mattar et al., 2004). Of the 140 murine genes analysed, and where possible their zebrafish orthologues, we identified 23 loci (17 mouse and 6 zebrafish, with 3 common to both species) with a three Ngn-type E-box CRM located within 20 kb upstream of the gene (Fig. 7D). While further study will be necessary to address if these potential CRMs are functional, the expression pattern of several of the zebrafish genes linked to these conserved motifs is down-regulated in *ngn1* mutant embryos and ubiquitously expressed in our *Tg(hs:ngn1)* line after heat shock suggesting that they are *bona fide* Ngn target genes (RM and PB, unpublished observations).

Finally, while the relative position of the proneural-responsive CRMs identified in this study, Ngn1 CRM distal and *Ascl1a/b* CRM proximal, is conserved at the zebrafish *deltaD* and mouse *Delta1* loci and the *deltaA* *Ascl* CRM displays high sequence identity with the corresponding CRMs of *deltaD* and *Delta1*, no sequence similarity for the *deltaA* Ngn CRM is detected at either the zebrafish *deltaD* or mouse *Delta1* loci (Beckers

et al., 2000). The conservation of the *Ascl* CRM but not the Ngn1 CRM between the two zebrafish genes suggests that there is more flexibility with respect to how Ngn's regulate gene expression than is the case for *Ascl* family members. This increased flexibility might underlie some of the difficulties that have been encountered in predicting Ngn targets based on conserved CRM/E-box criteria. On the other hand, the conservation of the Ngn CRM between zebrafish *deltaD* and mouse *Delta1* clearly indicates that there are constraints that have limited sequence divergence of this CRM. While expression of *deltaA* is restricted to the nervous system, *deltaD* and *Delta1* are also expressed in developing somites. It is possible that the overall regulatory network necessary for expression in both neural and somitic domains of *deltaD* and *Delta1* has limited the sequence divergence at their corresponding Ngn CRMs, a situation that does not exist at the *deltaA* locus. To test this hypothesis, it would be interesting to see if the Ngn CRM of *deltaD* or *Delta1* can be functionally replaced with that of *deltaA*.

In conclusion, we have identified an Ngn1-responsive CRM at the zebrafish *deltaA* locus that functions via the non-redundant interaction of three consensus Ngn E-boxes. To our knowledge, this represents a novel mechanism of action for a proneural CRM and

further studies will be required to see if this novel architecture is functionally conserved at other Ngn targets. Furthermore, our results indicate that there is more flexibility in the manner by which Ngn regulated target gene expression than for other proneural factors, such as *Ascl1*. The significance of this apparent flexibility is unclear and, thus, will also require further investigation.

## Acknowledgments

We are grateful to Laure Bally-Cuif, Julie Batut, Serge Plaza, Alain Vincent and members of the Blader lab for critical reading of the manuscript. We thank Bruce Appel, Catherine Haddon and Julian Lewis for the gift of reagents. We would also like to thank the Toulouse RIO Imaging platform. The CNRS, Université Paul Sabatier, HFSP, FRM, FRC and the Ministère de la Recherche provided financial support. R.M. was financed by the Ministère de la Recherche.

## References

- Allende, M.L., Weinberg, E.S., 1994. The expression pattern of two zebrafish achaete-scute homolog (ash) genes is altered in the embryonic brain of the cyclops mutant. *Dev. Biol.* 166, 509–530.
- Aman, A., Piotrowski, T., 2008. Wnt/beta-catenin and Fgf signaling control collective cell migration by restricting chemokine receptor expression. *Dev. Cell* 15, 749–761.
- Appel, B., Eisen, J.S., 1998. Regulation of neuronal specification in the zebrafish spinal cord by Delta function. *Dev. Camb. Engl.* 125, 371–380.
- Beckers, J., Caron, A., Hrabe de Angelis, M., Hans, S., Campos-Ortega, J.A., Gossler, A., 2000. Distinct regulatory elements direct *delta1* expression in the nervous system and paraxial mesoderm of transgenic mice. *Mech. Dev.* 95, 23–34.
- Bertrand, N., Castro, D.S., Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517–530.
- Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemot, F., Strahle, U., 1997. The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Dev. Camb. Engl.* 124, 4557–4569.
- Blader, P., Plessy, C., Strahle, U., 2003. Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mech. Dev.* 120, 211–218.
- Castro, D.S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I.J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J.A., Nguyen, L., Gossler, A., Gottgens, B., Matter, J.M., Guillemot, F., 2006. Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev. Cell* 11, 831–844.
- Chien, C.T., Hsiao, C.D., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1996. Neuronal type information encoded in the basic-helix-loop-helix domain of proneural genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 13239–13244.
- Cornell, R.A., Eisen, J.S., 2002. Delta/Notch signaling promotes formation of zebrafish neural crest by repressing Neurogenin 1 function. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2639–2648.
- Elsen, G.E., Choi, L.Y., Millen, K.J., Grinblat, Y., Prince, V.E., 2008. *Zic1* and *Zic4* regulate zebrafish roof plate specification and hindbrain ventricle morphogenesis. *Dev. Biol.* 314, 376–392.
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., Bishop, J.M., 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3610–3616.
- Flora, A., Garcia, J.J., Thaller, C., Zoghbi, H.Y., 2007. The E-protein Tcf4 interacts with Math1 to regulate differentiation of a specific subset of neuronal progenitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 15382–15387.
- Gehrig, J., Reischl, M., Kalmar, E., Ferg, M., Hadzhiev, Y., Zaucker, A., Song, C., Schindler, S., Liebel, U., Muller, F., 2009. Automated high-throughput mapping of promoter-enhancer interactions in zebrafish embryos. *Nat. Meth.* 6, 911–916.
- Gohlke, J.M., Armant, O., Parham, F.M., Smith, M.V., Zimmer, C., Castro, D.S., Nguyen, L., Parker, J.S., Gradwohl, G., Portier, C.J., Guillemot, F., 2008. Characterization of the proneural gene regulatory network during mouse telencephalon development. *BMC Biol.* 6, 15.
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., Lin, S.Y., Nissen, R.M., Hopkins, N., 2002. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat. Genet.* 31, 135–140.
- Guillemot, F., 2007. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Dev. Camb. Engl.* 134, 3771–3780.
- Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D., Lewis, J., 1998. Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 125, 359–370.
- Haenlin, M., Kunisch, M., Kramatschek, B., Campos-Ortega, J.A., 1994. Genomic regions regulating early embryonic expression of the Drosophila neurogenic gene Delta. *Mech. Dev.* 47, 99–110.
- Halloran, M.C., Sato-Maeda, M., Warren, J.T., Su, F., Lele, Z., Krone, P.H., Kuwada, J.Y., Shoji, W., 2000. Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* 127, 1953–1960.
- Hans, S., Campos-Ortega, J.A., 2002. On the organisation of the regulatory region of the zebrafish *deltaD* gene. *Dev. Camb. Engl.* 129, 4773–4784.
- Heng, J.I., Nguyen, L., Castro, D.S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J.M., Hevner, R., Guillemot, F., 2008. Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of *Rnd2*. *Nature* 455, 114–118.
- Henke, R.M., Meredith, D.M., Borromeo, M.D., Savage, T.K., Johnson, J.E., 2009. *Ascl1* and *Neurog2* form novel complexes and regulate Delta-like3 (*Dll3*) expression in the neural tube. *Dev. Biol.* 328, 529–540.
- Huang, H.P., Liu, M., El-Hodiri, H.M., Chu, K., Jamrich, M., Tsai, M.J., 2000. Regulation of the pancreatic islet-specific gene *BETA2* (*neuroD*) by neurogenin 3. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3292–3307.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
- Korz, V., Sleptsova, I., Liao, J., He, J., Gong, Z., 1998. Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nrd* defines distinct stages of neural differentiation. *Dev. Dyn.* 213, 92–104.
- Kunisch, M., Haenlin, M., Campos-Ortega, J.A., 1994. Lateral inhibition mediated by the Drosophila neurogenic gene delta is enhanced by proneural proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 10139–10143.
- Lecaudey, V., Cakan-Akdogan, G., Norton, W.H., Gilmour, D., 2008. Dynamic Fgf signaling couples morphogenesis and migration in the zebrafish lateral line primordium. *Dev. Camb. Engl.* 135, 2695–2705.
- Lee, S.K., Pfaff, S.L., 2003. Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* 38, 731–745.
- Lin, C.H., Stoeck, J., Ravanpay, A.C., Guillemot, F., Tapscott, S.J., Olson, J.M., 2004. Regulation of *neuroD2* expression in mouse brain. *Dev. Biol.* 265, 234–245.
- Masai, I., Heisenberg, C.P., Barth, K.A., Macdonald, R., Adamek, S., Wilson, S.W., 1997. Floating head and masterblind regulate neuronal patterning in the roof of the forebrain. *Neuron* 18, 43–57.
- Mattar, P., Britz, O., Johannes, C., Nieto, M., Ma, L., Rebeyka, A., Klenin, N., Polleux, F., Guillemot, F., Schuurmans, C., 2004. A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex. *Dev. Biol.* 273, 373–389.
- Millimaki, B.B., Sweet, E.M., Dhason, M.S., Riley, B.B., 2007. Zebrafish *ato1* genes: classic proneural activity in the inner ear and regulation by Fgf and Notch. *Dev. Camb. Engl.* 134, 295–305.
- Oda, H., Iwata, I., Yasunami, M., Ohkubo, H., 2000. Structure of the mouse NDRF gene and its regulation during neuronal differentiation of P19 cells. *Brain Res.* 77, 37–46.
- Oxtoby, E., Jowett, T., 1993. Cloning of the zebrafish *krox-20* gene (*krx-20*) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res.* 21, 1087–1095.
- Parras, C.M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D.J., Guillemot, F., 2002. Divergent functions of the proneural genes *Mash1* and *Ngn2* in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev.* 16, 324–338.
- Powell, L.M., Jarman, A.P., 2008. Context dependence of proneural bHLH proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 411–417.
- Powell, L.M., Zur Lage, P.I., Prentice, D.R., Senthinathan, B., Jarman, A.P., 2004. The proneural proteins *Atonal* and *Scute* regulate neural target genes through different E-box binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9517–9526.
- Seo, S., Lim, J.W., Yellajoshiyula, D., Chang, L.W., Kroll, K.L., 2007. Neurogenin and *NeuroD* direct transcriptional targets and their regulatory enhancers. *EMBO J.* 26, 5093–5105.
- Smith, S.B., Gasa, R., Watada, H., Wang, J., Griffen, S.C., German, M.S., 2003. Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of *Pax4*. *J. Biol. Chem.* 278, 38254–38259.
- Stachel, S.E., Grunwald, D.J., Myers, P.Z., 1993. Lithium perturbation and gooseoid expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* 117, 1261–1274.
- Thermes, V., Grabher, C., Ristoratore, F., Bourrat, F., Choulika, A., Wittbrodt, J., Joly, J.S., 2002. *I-SceI* meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech. Dev.* 118, 91–98.
- Vize, P.D., 1996. DNA sequences mediating the transcriptional response of the *Mix.2* homeobox gene to mesoderm induction. *Dev. Biol.* 177, 226–231.
- Volkmann, K., Rieger, S., Babaryka, A., Koster, R.W., 2008. The zebrafish cerebellar rhombic lip is spatially patterned in producing granule cell populations of different functional compartments. *Dev. Biol.* 313, 167–180.
- Wang, V.Y., Rose, M.F., Zoghbi, H.Y., 2005. *Math1* expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron* 48, 31–43.

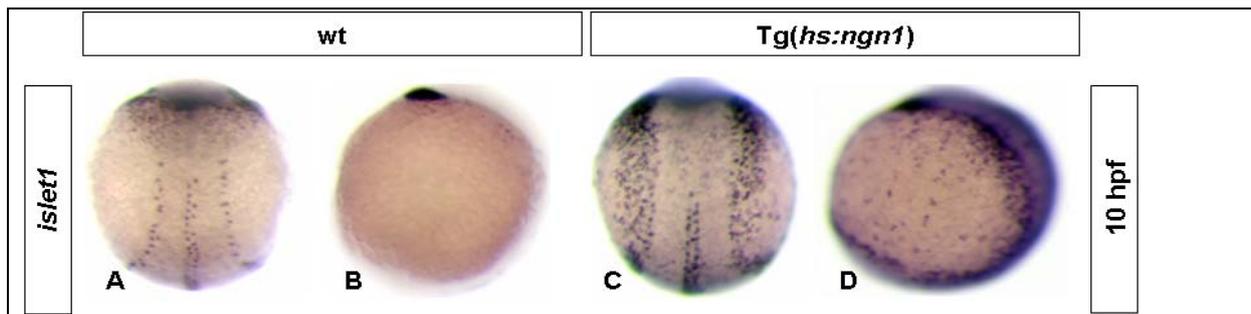
### III. L'activation autonome cellulaire des gènes *her* par Ngn1 bloque la différenciation neuronale.

#### 1. L'activité de Ngn1 n'est pas suffisante pour induire un phénotype neurogénique.

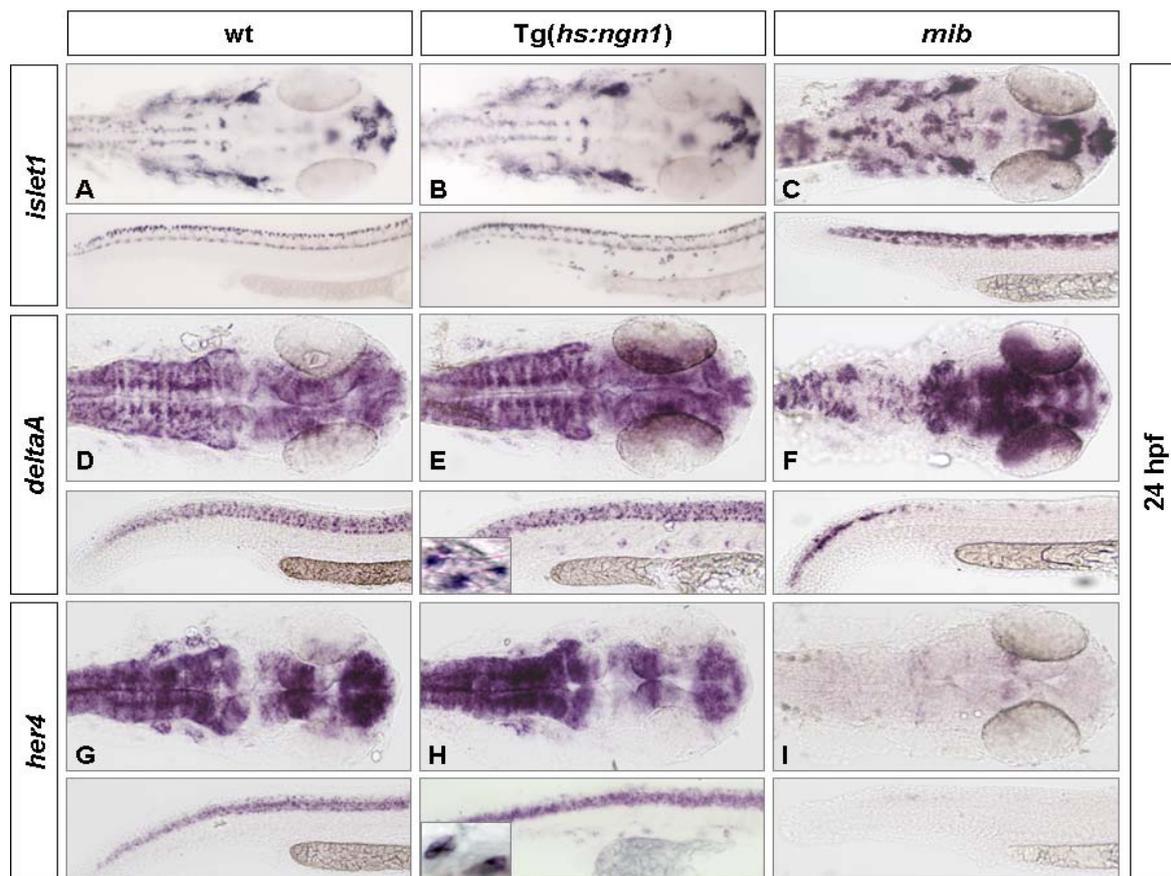
Chez les vertébrés, le processus d'inhibition latérale contrôlé par la voie Delta/Notch a pour but de restreindre l'expression des gènes proneuraux à un seul progéniteur neural afin qu'il se différencie tandis que les autres sont maintenus en prolifération. Comme la fonction de l'inhibition latérale est de limiter la neurogenèse, la surexpression d'un facteur proneural doit conduire à une différenciation neuronale massive. Notre hypothèse est donc que la surexpression ubiquitaire de Ngn1 doit phénotypier le mutant neurogénique *mib* dans lequel l'expression de Ngn1 est étendue et renforcée (Bingham et al., 2003; Itoh et al., 2003). La surexpression de Ngn1 n'induit pas de phénotype neurogénique, que ce soit précocement dans la plaque neurale ou plus tardivement dans la moelle épinière ou le cerveau (*Figure 30A-D et Figure 31A-C*). De plus, contrairement au mutant *mib*, l'expression des gènes *deltaA* et *her4* n'est pas affectée après surexpression de Ngn1, suggérant que le stock de progéniteurs neuraux n'est pas déplété à 24 hpf (*Figure 31D-I*). Finalement, la surexpression de Ngn1 induit des neurones sensoriels de Rohon-Beard ectopiques dans l'ectoderme non neural mais n'est pas capable de conduire à la formation d'un « tapis » de neurones ectopiques (*Figure 30A-D et Figure 31A-B*).

Il a précédemment été décrit que, dans un mutant *mib*, un immunomarquage avec l'anticorps 3A10 pouvait révéler jusqu'à 10 neurones de Mauthner par cluster (Bingham et al., 2003). Après une surexpression de *ngn1*, seulement 34% des embryons ont 2 neurones de Mauthner par cluster alors que 58% des embryons présentent un phénotype sauvage (n=150) (*Figure 32A-B*). De manière intéressante, 8% des embryons présentent une absence du neurone de Mauthner, suggérant que l'expression de Ngn1 peut inhiber la différenciation neuronale, probablement par le même mécanisme que celui impliqué dans le blocage de la différenciation dans la plaque neurale (*Figure 32C*).

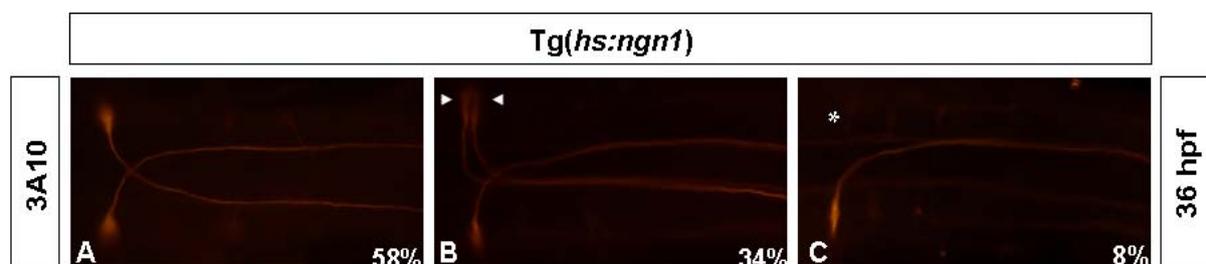
L'ensemble de ces résultats suggère que la surexpression d'un facteur proneural n'est pas suffisante pour permettre une différenciation neuronale massive et induire un phénotype neurogénique.



**Fig. 30:** (A-D) Hybridation *in situ* contre *islet1* (A-D) dans des embryons sauvages (A,B) ou Tg(*hs:ngn1*) (C,D) à 10 hpf. Le choc thermique à été réalisé à 7 hpf durant 1h à 38.5°C. Vue dorsale (A,C) ou latérale (B,D) de l'embryon et l'antérieur est vers le haut.



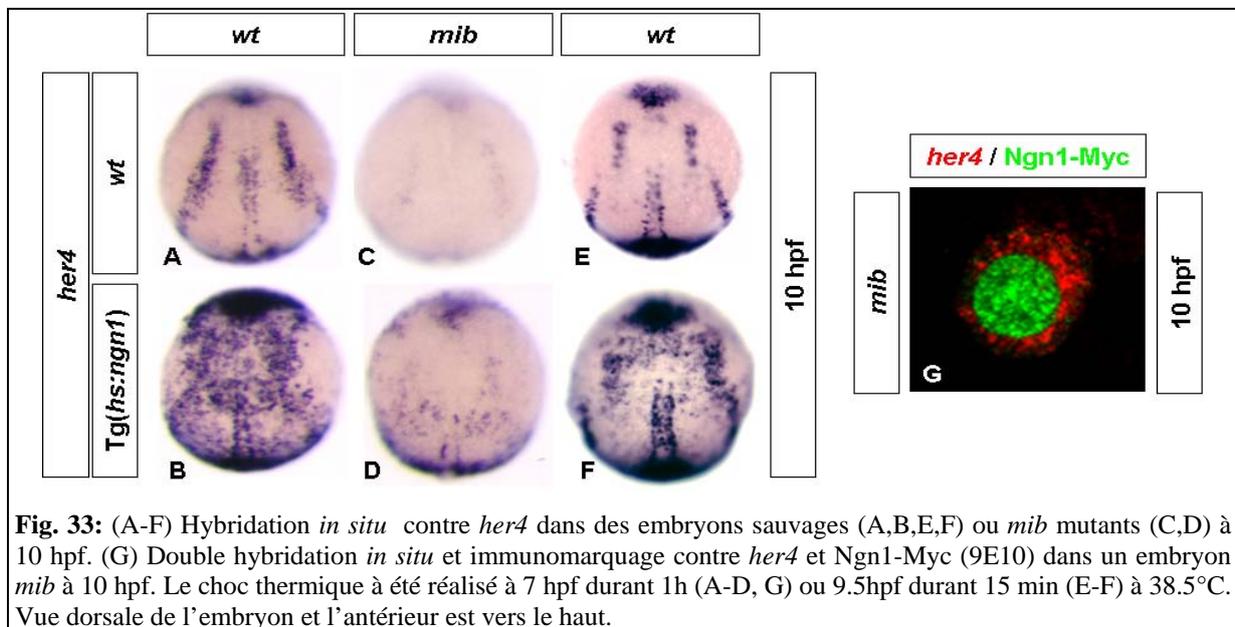
**Fig. 31:** (A-I) Hybridation *in situ* contre *islet1* (A-C), *deltaA* (D-E), *her4* (G-I) dans des embryons sauvages (A,D,G), Tg(*hs:ngn1*) (B,E,H) ou mutants *mib* (G,H,I) à 24 hpf. Le choc thermique à été réalisé à 7 hpf durant 1h à 38.5°C. Pour chaque condition le cerveau et (haut) et la moelle épinière (bas) sont présentés.



**Fig. 32:** (A-C) Immunomarquage contre le neurone de Mauthner (3A10) dans des embryons Tg(*hs:ngn1*) à 36 hpf. Le choc thermique a été réalisé à 7 hpf durant 1h à 38.5°C. (A-C) Vue dorsale du cerveau est l'antérieur est à droite.

## 2. Ngn1 peut induire l'expression de *her4* de manière autonome cellulaire et indépendamment de l'activité de la voie Notch.

La surexpression de Ngn1 n'induit pas de phénotype neurogénique suggérant qu'un mécanisme permet de limiter la différenciation neuronale. Un des mécanismes pouvant être impliqué dans ce contrôle est l'inhibition latérale. En effet, la surexpression de Ngn1 induit la surexpression de *deltaA* qui, en conséquence, active l'expression de *her4/15* dans les cellules voisines (Figure 29D-I). Afin de tester cette hypothèse, nous avons analysé l'expression de *her4* dans un mutant *mib* où l'activité de la voie Notch est abolie (Bingham et al., 2003; Itoh et al., 2003). Dans ce contexte, la surexpression de Ngn1 induit toujours une expression ectopique de *her4* (Figure 33A-D). Ce résultat indique que l'activation de *her4* par Ngn1 peut être indépendante de l'inhibition latérale. De plus, la surexpression de Ngn1-Myc à 7 hpf dans des embryons *mib* montre que Ngn1 peut induire l'expression autonome cellulaire de *her4* indépendamment de l'activité de la voie Notch (Figure 33G). Nous avons également mis en évidence que Ngn1 peut induire l'expression de *her4* en 30 min, suggérant fortement que la régulation de Ngn1 sur *her4* est directe (Figure 33E-F). Bien que l'expression de *her4* dépendante de Notch soit plus forte quantitativement que son expression indépendante de Notch (Figure 33B-D), il est possible que cette régulation autonome cellulaire soit importante dans le contrôle de la différenciation neuronale.

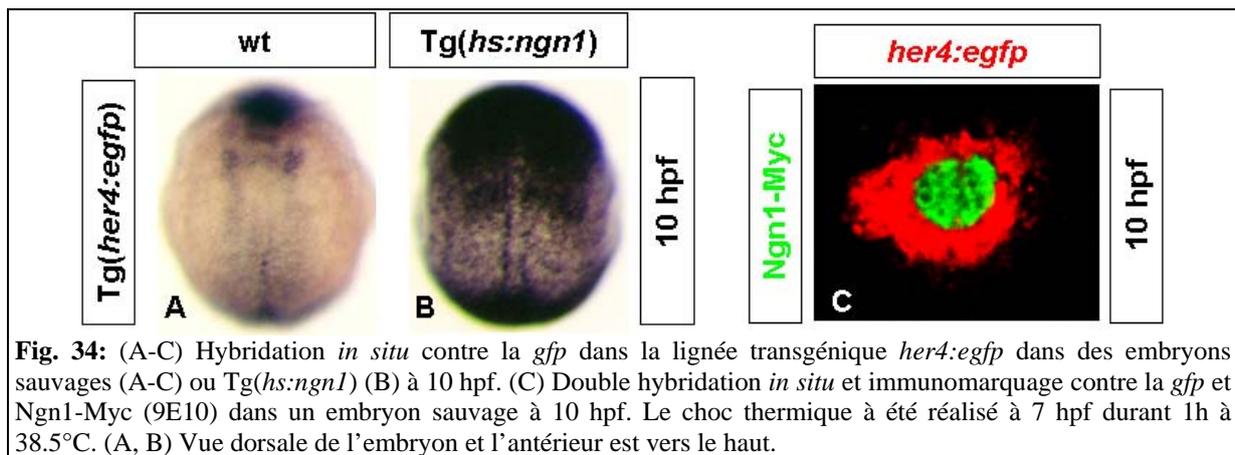


**Fig. 33:** (A-F) Hybridation *in situ* contre *her4* dans des embryons sauvages (A,B,E,F) ou *mib* mutants (C,D) à 10 hpf. (G) Double hybridation *in situ* et immunomarquage contre *her4* et Ngn1-Myc (9E10) dans un embryon *mib* à 10 hpf. Le choc thermique a été réalisé à 7 hpf durant 1h (A-D, G) ou 9.5hpf durant 15 min (E-F) à 38.5°C. Vue dorsale de l'embryon et l'antérieur est vers le haut.

Afin de déterminer quels sont les éléments régulateurs nécessaire à l'expression de *her4* indépendante de Notch, nous avons utilisé une lignée transgénique qui reproduit l'expression endogène de *her4* (Yeo et al., 2007). Cette lignée transgénique dirige l'expression de la

protéine *egfp* sous le contrôle de 3.4kb du promoteur de *her4*. Nous avons réalisé une surexpression de Ngn1 dans la lignée Tg(*her4:egfp*). Dans ces conditions, Ngn1 induit l'expression ubiquitaire de l'*egfp* et peut l'induire de manière autonome cellulaire (Figure 34A-C). Ce résultat indique que si la régulation de *her4* par Ngn1 est directe, le CRM (Cis-Regulatory-Module) pour Ngn1 est localisé dans les 3.4kb du promoteur de *her4*.

L'induction de l'expression de *her4* par Ngn1 de manière autonome cellulaire peut être un mécanisme permettant de limiter la différenciation neuronale dans un progéniteur qui exprime un facteur proneural.

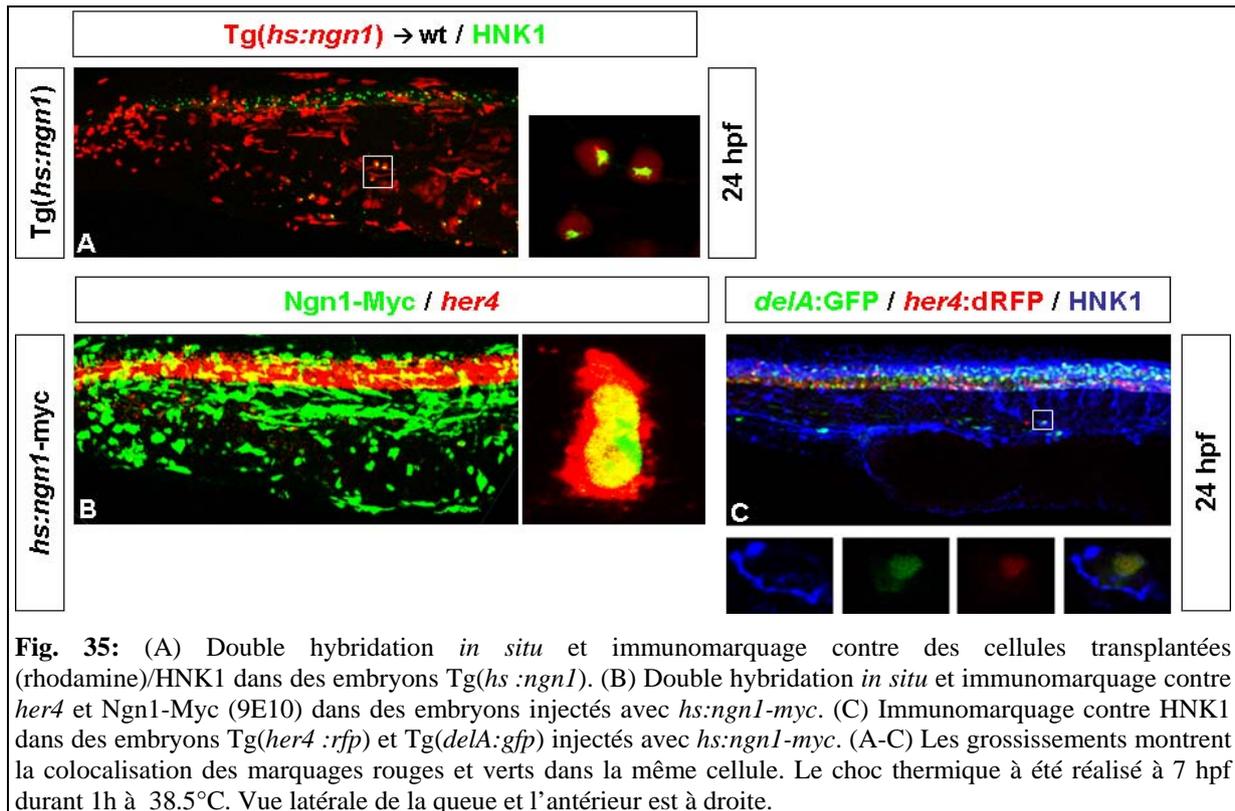


**Fig. 34:** (A-C) Hybridation *in situ* contre la *gfp* dans la lignée transgénique *her4:egfp* dans des embryons sauvages (A-C) ou Tg(*hs:ngn1*) (B) à 10 hpf. (C) Double hybridation *in situ* et immunomarquage contre la *gfp* et Ngn1-Myc (9E10) dans un embryon sauvage à 10 hpf. Le choc thermique à été réalisé à 7 hpf durant 1h à 38.5°C. (A, B) Vue dorsale de l'embryon et l'antérieur est vers le haut.

### 3. L'activation de *her4* par Ngn1 est corrélée à une inhibition de la différenciation neuronale.

Ngn1 peut induire l'expression ectopique de *her4* dans l'ectoderme non neural (Figure 30H) et il est possible que l'expression de *her4* dans l'ectoderme non neural bloque la différenciation neuronale en empêchant que toutes les cellules qui ont reçu Ngn1 se différencient en neurones. Nous avons montré précédemment que la surexpression de Ngn1 à 7hpf pouvait induire la formation de neurones sensoriels de Rohon-Beard ectopiques dans l'ectoderme non neural (Figure 31B). Afin de déterminer si cet événement est contrôlé de manière autonome cellulaire par Ngn1, nous avons réalisé des expériences de transplantation de cellules, d'embryons donneurs Tg(*hs:ngn1*) à des embryons receveurs sauvages. Ce résultat indique que Ngn1 induit la différenciation neuronale de manière autonome cellulaire dans l'ectoderme non neural (Figure 35A). Il est possible que Ngn1 induise également l'expression ectopique de *her4* dans l'ectoderme non neural de manière autonome cellulaire. Si cela est le cas, certaines cellules ont peut être reçu Ngn1 mais n'ont pas pu aller au terme de la différenciation neuronale. Pour tester cette hypothèse, nous avons exprimé Ngn1 de

façon mosaïque après injection d'ADN. Cette expérience montre que Ngn1 peut activer l'expression de *her4* de manière autonome cellulaire dans l'ectoderme non neural (Figure 35B). De plus, un triple marquage entre *deltaA*, *her4* et les neurones de Rohon-Beard montre clairement que *deltaA* et *her4* peuvent être exprimés dans une même cellule qui n'est pas différenciée en neurone (Figure 35C). Ces résultats mettent en évidence que toutes les cellules qui ont reçu Ngn1 (expression de *deltaA*) ne se différencient pas en neurones et suggèrent donc que les gènes *her* peuvent limiter la différenciation neuronale.

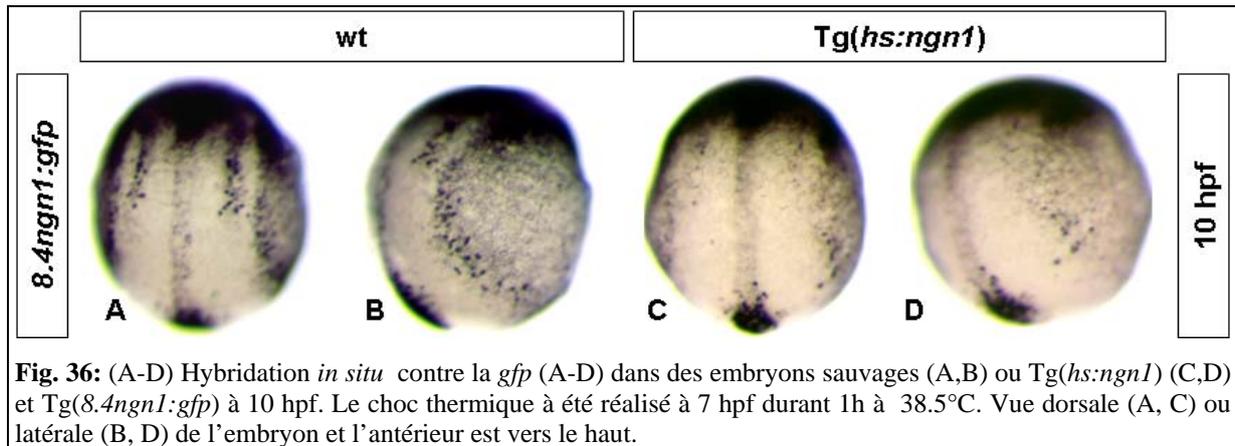


**Fig. 35:** (A) Double hybridisation *in situ* et immunomarquage contre des cellules transplantées (rhodamine)/HNK1 dans des embryons Tg(*hs:ngn1*). (B) Double hybridisation *in situ* et immunomarquage contre *her4* et Ngn1-Myc (9E10) dans des embryons injectés avec *hs:ngn1-myc*. (C) Immunomarquage contre HNK1 dans des embryons Tg(*her4:rfp*) et Tg(*deltaA:gfp*) injectés avec *hs:ngn1-myc*. (A-C) Les grossissements montrent la colocalisation des marquages rouges et verts dans la même cellule. Le choc thermique à été réalisé à 7 hpf durant 1h à 38.5°C. Vue latérale de la queue et l'antérieur est à droite.

#### 4. L'activation de *her4* par Ngn1 conduit à une diminution de la transcription de *ngn1*.

La surexpression de Ngn1 induit une expression ubiquitaire de *her4* dans la plaque neurale (Figure 29E). De plus, la surexpression de Ngn1 induit également des neurones ectopiques *islet+* à l'extérieur de la plaque neurale mais n'en a pas la capacité dans la plaque neurale (Figure 30A-C). Cette absence de neurogenèse dans la plaque neurale peut être corrélée à l'expression ubiquitaire de *her4* après surexpression de Ngn1. Afin de tester cette hypothèse, j'ai réalisé une expérience qui consiste à surexprimer Ngn1 dans la lignée Tg(8.4*ngn1:gfp*) puis à observer l'expression de la *gfp*. De manière intéressante, l'expression de la *gfp* est fortement réduite après surexpression de Ngn1 (Figure 36A-D). Ce résultat

suggère que l'expression de Ngn1 peut induire l'expression de *her4* qui en retour va réprimer l'expression de Ngn1 au niveau de sa transcription dans une boucle de rétrocontrôle négatif.



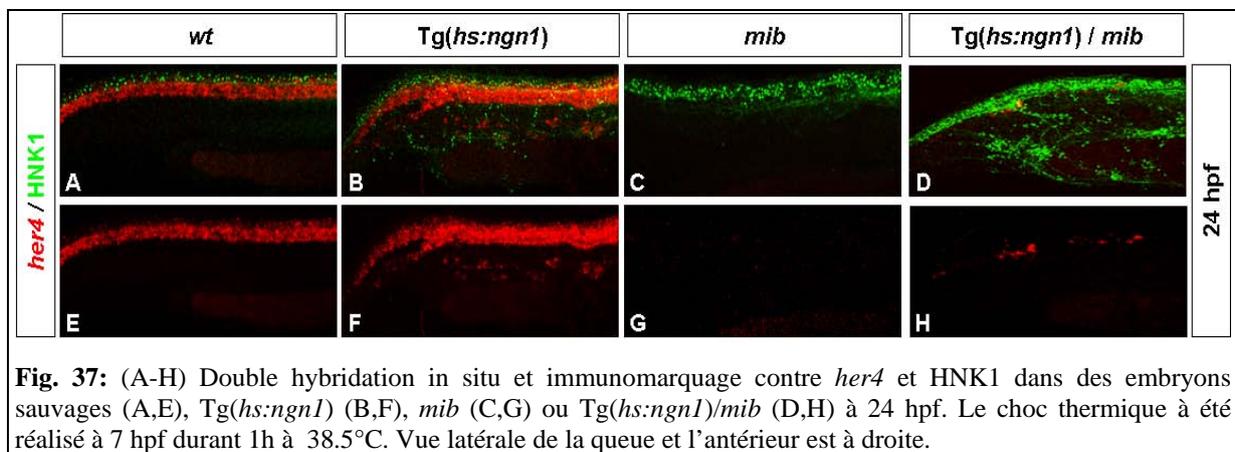
**Fig. 36:** (A-D) Hybridation *in situ* contre la *gfp* (A-D) dans des embryons sauvages (A,B) ou Tg(*hs:ngn1*) (C,D) et Tg(*8.4ngn1:gfp*) à 10 hpf. Le choc thermique à été réalisé à 7 hpf durant 1h à 38.5°C. Vue dorsale (A, C) ou latérale (B, D) de l'embryon et l'antérieur est vers le haut.

Ce mécanisme d'auto-régulation de *ngn1* par Ngn1 ne se limite pas à un contrôle transcriptionnel. En effet, la surexpression de Ngn1 à l'aide d'un promoteur inducible par choc thermique n'est pas soumis à la même régulation transcriptionnelle que le promoteur endogène de *ngn1* et de la lignée Tg(*8.4ngn1:gfp*). Pourtant, la surexpression de Ngn1 par choc thermique n'induit pas de neurones ectopiques dans la plaque neurale suggérant qu'un mécanisme de régulation peut réduire l'activité de Ngn1 en ajout de la régulation transcriptionnelle. J'ai défini l'ensemble des mécanismes possibles comme post-transcriptionnels car ils agissent après la transcription de *ngn1*. Deux hypothèses principales sont envisageables. Premièrement, ces facteurs réguleraient négativement l'expression des gènes cibles de Ngn1 nécessaires à la différenciation neuronale. Deuxièmement, ils pourraient réguler l'activité de Ngn1 soit en l'empêchant de réguler l'expression de ses gènes cibles, soit en étant en compétition avec lui pour les mêmes sites de liaison à l'ADN. En conclusion, il semblerait que l'activité de Ngn1 puisse être régulée au niveau de sa transcription mais aussi après sa transcription afin de prévenir la différenciation neuronale.

## 5. La perte d'activité des gènes *her* entraîne une différenciation neuronale massive.

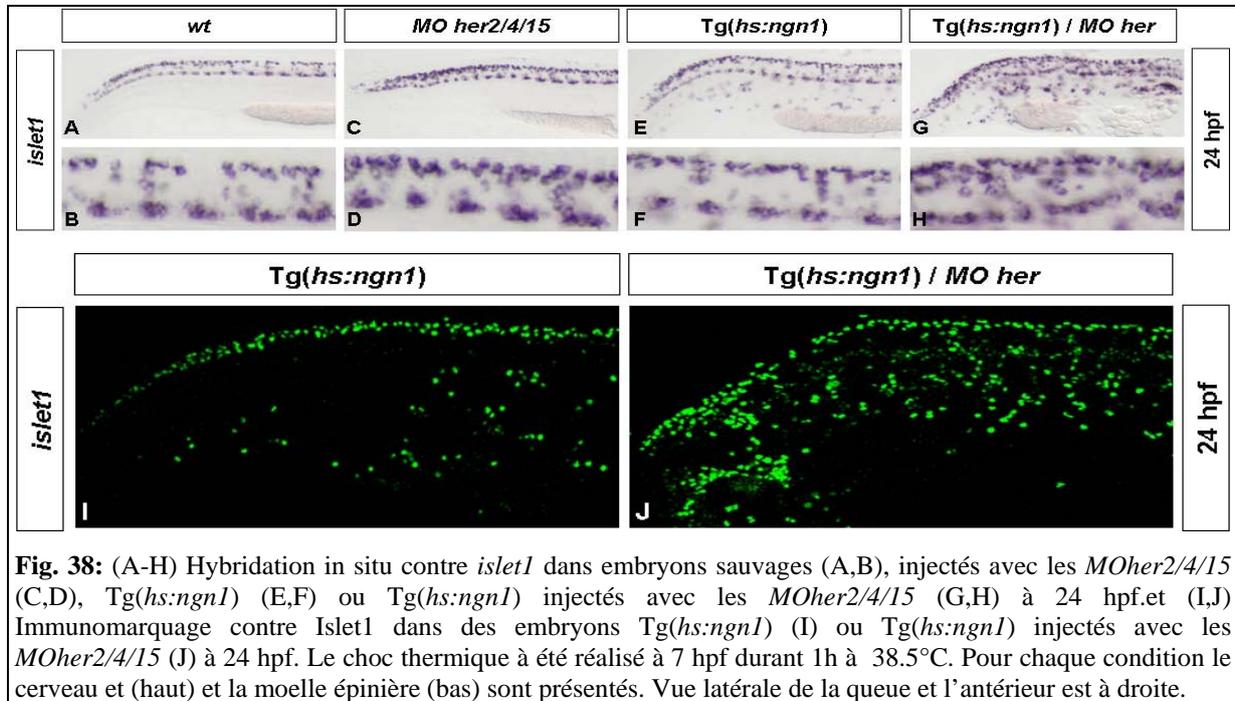
La mise en évidence d'une double boucle de régulation de Ngn1 sur *her4*, autonome et non autonome cellulaire, met en lumière la complexité de la régulation de la différenciation neuronale. Dans le but de déterminer la fonction de ces régulations, nous avons étudié la neurogenèse en utilisant comme paradigme de différenciation neuronale la formation des

neurones sensoriels de Rohon-Beard car *Ngn1* est nécessaire et suffisant à la formation de ces neurones dans la moelle épinière (Blader et al., 1997; Cornell and Eisen, 2002). Notre hypothèse étant que l'activité des gènes *her* limite la capacité de *Ngn1* à conduire à la différenciation neuronale, nous avons testé l'effet d'une surexpression de *Ngn1* dans un contexte où l'activité des gènes *her* est réduite. Dans un mutant *mib*, l'activité des gènes *her* dépendante de Notch est abolie. Dans ces conditions, l'équilibre entre *Ngn* et *Her* doit être en faveur de *Ngn1* et la surexpression de *Ngn1* doit induire une différenciation neuronale massive. En effet, dans ces conditions, la surexpression de *Ngn1* conduit à une différenciation neuronale beaucoup plus importante que dans les embryons contrôles (*Figure 37A-H*).



Afin de déterminer si l'effet observé dans les embryons *mib* est dû à la réduction de l'expression et de l'activité des gènes *her*, j'ai réalisé une expérience de perte de fonction de trois gènes *her* (*her2*, *her4*, *her15*) exprimés dans la moelle épinière et impliqués dans la formation des neurones de Rohon-Beard à 24 hpf (E.Cau, résultats non publiées). Dans ce contexte, l'activité des gènes *her* est réduite, ce qui doit entraîner une différenciation neuronale importante. Effectivement, la perte de fonction des gènes *her2/4/15* entraîne une différenciation neuronale plus importante dans la moelle épinière (*Figure 38A-D* et E.Cau, résultats non publiées). De plus, la perte de fonction des gènes *her* associée à une surexpression de *Ngn1* induit la différenciation d'un nombre très important de neurones de Rohon-Beard dans la moelle épinière et l'ectoderme non neural comparé aux embryons *Tg(hs:ngn1)* control (*Figure 38A-J*). Contrairement aux embryons *Tg(hs:ngn1)*, les embryons *Tg(hs:ngn1)/MO her2/4/15* présentent des neurones ectopiques regroupés en gros clusters de manière comparable à ceux observés dans un embryon *mib* (*Figure 38E-J* et 37D). Ces résultats indiquent que les gènes *her2/4/15* sont impliqués dans la différenciation des neurones de Rohon-Beard et que bloquer leur activité induit une différenciation neuronale

plus importante. Cette expérience suggère que l'induction de l'expression des gènes *her* par Ngn1 a pour effet de limiter la différenciation neuronale. Finalement, il semble que les effets de différenciation massive des neurones de Rohon-Beard observés dans le mutant *mib* soient associés à une réduction de l'activité des protéines Her.



**Fig. 38:** (A-H) Hybridation in situ contre *islet1* dans embryons sauvages (A,B), injectés avec les *MOher2/4/15* (C,D), *Tg(hs:ngn1)* (E,F) ou *Tg(hs:ngn1)* injectés avec les *MOher2/4/15* (G,H) à 24 hpf. et (I,J) Immunomarquage contre Islet1 dans des embryons *Tg(hs:ngn1)* (I) ou *Tg(hs:ngn1)* injectés avec les *MOher2/4/15* (J) à 24 hpf. Le choc thermique a été réalisé à 7 hpf durant 1h à 38.5°C. Pour chaque condition le cerveau et (haut) et la moelle épinière (bas) sont présentés. Vue latérale de la queue et l'antérieur est à droite.

La perte de fonction des gènes *her* dans un contexte sauvage, entraîne une différenciation neuronale importante dans la moelle épinière et le cerveau qui peut être corrélée à une absence de régulation négative de la transcription et de l'activité de *ngn1* comme dans le mutant *mib*. Lors d'une surexpression de Ngn1, la perte de fonction des gènes *her* ne limite plus la capacité de Ngn1 à induire la différenciation neuronale. De plus, cette triple perte de fonction des gènes de la famille *her* associée à une surexpression de Ngn1 met en évidence que les protéines Her peuvent réguler négativement l'activité de Ngn1 à un niveau différent que la transcription. En effet, les protéines Her sont capables d'inhiber l'activité de Ngn1, qui a été activée par choc thermique. Ce résultat révèle que le contrôle négatif de l'activité de Ngn1 par les protéines Her peut avoir lieu à plusieurs niveaux après la transcription de *ngn1* de manière autonome et non autonome cellulaire. Il est envisageable que les protéines Her puissent réguler l'activité de Ngn1 en s'hétérodimérisant avec ou en étant en compétition pour les mêmes sites de fixation au niveau de l'ADN des ses gènes cibles.

Il est possible que l'activité de Ngn1 puisse à la fois être requise pour la différenciation neuronale mais également pour la limiter et ainsi prévenir l'épuisement du stock de progéniteurs neuraux. Dans ce cas, l'équilibre entre maintien de l'état progéniteur neural et neurone différencié pourrait être comparé à un équilibre entre l'activité de Ngn1 et celle des protéines Her comme suggéré par les oscillations inverses observées entre Ngn1 et Her dans les progéniteurs neuraux.

## **6. Conclusion.**

L'ensemble de ces résultats suggère que l'activité de Ngn1 à induire des neurones est limitée par l'expression des gènes *her*. Donc, la capacité de Ngn1 à induire de manière non autonome et autonome cellulaire l'expression de *her4* et *her15* a pour effet de restreindre sa propre activité dans le but de réguler la différenciation neuronale. Ce mécanisme est indirect pour réduire l'expression de Ngn1 dans les progéniteurs neuraux voisins, et directs pour restreindre l'expression de manière autonome cellulaire. Comme les protéines Her peuvent réguler l'expression de *ngn1* à un niveau transcriptionnel et « post-transcriptionnel », ces mécanismes peuvent permettre une diminution rapide de l'expression et de l'activité de *ngn1*. L'intégration des niveaux de protéines Ngn1 et Her à un moment donné peut être la clé de l'équilibre entre prolifération et différenciation des progéniteurs neuraux et du contrôle de la différenciation neuronale. Cette double boucle de rétrocontrôle autonome et non autonome cellulaire, positif de Ngn1 sur *her* puis négatif de Her sur *ngn1*, est peut être à la base des oscillations inverses observées entre Ngn et Her dans les progéniteurs neuraux (Kageyama et al., 2008b; Shimojo et al., 2008). Ces oscillations ont pour but de maintenir les progéniteurs en prolifération afin de prévenir une différenciation massive et une déplétion du stock de progéniteurs. Finalement, il est envisageable que cette complexité d'autorégulation entre les protéines Ngn et Her ait pour but de maintenir en l'état un stock de progéniteurs neuraux nécessaires à la formation d'une énorme variété de neurones tout au long du développement et aboutir à un système nerveux fonctionnel.

## **7. Perspectives.**

Dans le futur, afin de mieux appréhender la fonction de la régulation autonome cellulaire de *her4* par Ngn1 dans la différenciation neuronale, deux questions primordiales doivent être abordées : quelle est la fonction de la régulation de *her4* et est-il effectivement

une cible directe de Ngn1 ? Dans ce paragraphe, je vais envisager des expériences qui pourraient permettre de répondre à ces questions.

### **1) Her4 réduit l'activité de Ngn1 et bloque la différenciation ?**

La surexpression ubiquitaire de Ngn1 conduit à la formation de neurones ectopiques dans l'épiderme des embryons de poisson zèbre. Néanmoins, toutes les cellules qui reçoivent Ngn1 ne se différencient pas en neurones. Notre hypothèse est que l'induction autonome cellulaire des gènes *her* par Ngn1 limite la capacité de différenciation car la surexpression de Ngn1 lors d'une perte de fonction des gènes *her* (*herMo*) induit une différenciation neuronale massive.

Dans un premier temps, il sera nécessaire de confirmer les résultats obtenus lors de l'injection de *herMo* (Figure 38). En effet, les résultats sont préliminaires et il est nécessaire de quantifier précisément la différenciation neuronale dans les différents contextes. Dans ce but, il sera important d'utiliser un marqueur d'une sous population neuronale spécifique (par exemple, *tlx3a* qui marque spécifiquement les neurones sensoriels de Rohon-Beard). Ainsi, il sera plus facile de quantifier la différenciation neuronale dans l'ectoderme non neural et la moelle épinière en présence de *herMo* et/ou surexpression de Ngn1.

Dans un deuxième temps, je propose d'étudier la fonction de la régulation autonome cellulaire des gènes *her* par Ngn1 par des expériences de transplantation de cellules. Pour ce faire il est possible de réduire l'expression des gènes *her* dans un embryon donneur *Tg(hs:ngn1)* dont les cellules seront transplantées dans un embryon receveur sauvage afin d'étudier uniquement la fonction autonome cellulaire de l'activation des gènes *her* par Ngn1. L'expression de Ngn1 dans ces cellules transplantées sera induite par choc thermique. La capacité des cellules transplantées à se différencier en neurones sera analysée et comparée entre les embryons donneurs *Tg(hs:ngn1)* et *Tg(hs:ngn1)/herMo*. Si les facteurs Her limitent la capacité des cellules qui expriment Ngn1 à se différencier, les cellules *herMo* se différencieront plus fréquemment.

### **2) Ngn1 régule directement l'expression de *her4*?**

Afin de valider *her4* comme une cible directe de Ngn1, il faudrait identifier le CRM de Ngn1 dans le promoteur de *her4*. Dans ce but, j'envisage une analyse par expression transitoire que j'ai déjà utilisée avec succès pour identifier le CRM de Ngn1 sur *deltaA*. Différentes constructions rapportrices *her4:CAT* seront générées à partir de délétions

successives et injectées dans des embryons de poisson zèbre au stade une cellule avec l'ARN codant pour Ngn1 et un rapporteur *lacZ* (contenant 3.4kb du promoteur *her4*). Les embryons se développeront dans du DAPT (agent pharmacologique bloquant l'activité de Notch) jusqu'à 10 hpf. Le DAPT permettra d'étudier uniquement l'induction autonome cellulaire de *her4* par Ngn1. Après un dosage ELISA, le ratio entre l'expression de CAT et  $\beta$ Gal indique si la délétion a éliminé un potentiel CRM pour Ngn1. Finalement, des constructions rapportrices fusionnées à la GFP seront établies avec le fragment de 3.4kb du promoteur de *her4* où les E-Box (CANATG) localisées dans le CRM précédemment identifié seront mutées. L'analyse de l'expression de la GFP dirigée par ces promoteurs permettra de valider *in vivo* les résultats obtenus *in vitro* et d'identifier quelles sont les E-Box nécessaires à l'activation de *her4* par Ngn1.

Dans un deuxième temps, les interactions moléculaires entre Ngn1 et les E-Box localisées dans le CRM précédemment identifié seront étudiées par gel retard (EMSA) et immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Ces expériences permettront de définir si les E-Box identifiées par l'approche d'analyse fonctionnelle du promoteur de *her4* sont capables de fixer Ngn1 et donc si *her4* est une cible directe de Ngn1.

#### **IV. Partially redundant proneural function reveals the importance of timing during zebrafish olfactory neurogenesis.**

Le système olfactif du poisson zèbre se développe à partir d'une placode olfactive qui donnera l'épithélium olfactif plus tard durant le développement (Whitlock and Westerfield, 2000). Le futur domaine olfactif est localisé dans la partie la plus antérieure de la plaque neurale et est situé à la frontière entre l'ectoderme neural et non neural. Ce domaine est une population cellulaire mixte de progéniteurs du futur télencéphale et de la future placode olfactive. Ces deux populations de progéniteurs ségrégent et deviennent distinctes à 19 hpf. Le système olfactif est composé de deux sous-types neuronaux majeurs, les neurones pionniers et les neurones olfactifs.

Actuellement, peu de données sont connues sur les facteurs contrôlant la formation et la spécification de ces neurones chez le poisson zèbre. Le patron d'expression du facteur proneural *Ngn1* suggère qu'il peut avoir une fonction dans le développement du système olfactif (Blader et al., 1997; Blader et al., 2003). Nous avons utilisé un mutant pour *ngn1* et montré que dans ce contexte, la formation des neurones pionniers est affectée et la formation des neurones olfactifs retardée. De plus nous avons identifié le facteur neurogénique *NeuroD4* comme régulé de manière dépendante et indépendante de *Ngn1* en fonction du stade. La double perte de fonction de *ngn1* et *neuroD4* conduit à une dramatique réduction des neurones pionniers et à une absence de neurones olfactifs. Cette étude met en évidence que les facteurs proneuraux de la famille *atonal* sont les facteurs clé dans le contrôle du développement du système olfactif chez le poisson zèbre.

Partially redundant proneural function reveals the importance of timing during zebrafish olfactory neurogenesis.

Romain Madelaine and Patrick Blader\*

Université de Toulouse, UPS, Centre de Biologie du Développement (CBD), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France  
CNRS, CBD UMR 5547, F-31062 Toulouse, France

\*Author for correspondence: [blader@cict.fr](mailto:blader@cict.fr)

tel: (0033) 5 61 55 67 34

fax: (0033) 5 61 55 65 07

#### Summary:

Neurogenesis in the mouse olfactory epithelium relies on sequential activity of members of the Acheate-scute and Atonal families of bHLH proneural factors. Little is known, however, concerning proneural gene function during olfactory neurogenesis in the zebrafish. Here, we show that abrogation of the function of two zebrafish Atonal family genes, *neurogenin1* (*ngn1*) and *neurod4*, results in the loss of both early-born olfactory neurons (EON) and later olfactory sensory neurons (OSN). We show that *neurod4* expression is initially absent in *ngn1* mutant embryos. However, its expression recovers and is sufficient for the correct development of OSN, albeit with a delay. On the contrary, the number of EON in *ngn1* mutant embryos is significantly reduced despite the recovery of *neurod4* expression. Our results suggest that a shortened time window for EON development causes this reduction; EON leave the cell cycle later in *ngn1* mutants than in their wild type siblings but in both cases EON are post-mitotic at 24 hours post-fertilisation. Finally, we show that not all aspects of EON character recover in the *ngn1* mutant. We conclude that the time of exposure of EON progenitors to Ngn1 activity is a critical parameter for the correct development of the zebrafish olfactory system.

## Introduction

The nervous system is established via a tightly controlled series of events, generically known as neurogenesis, which assures that the appropriate subtypes of neurons are born in the correct places and numbers, and at the correct times during embryogenesis. Many of the molecular mechanisms that regulate neurogenesis have been unravelled in the fruit fly (Gomez-Skarmeta et al., 2003). A key step during the initial phase of this process is the establishment of so-called proneural clusters in the *Drosophila* neuroectoderm, which are characterised by expression of proneural genes that belong to the basic helix-loop-helix (bHLH) family of transcriptional activators (Dambly-Chaudiere and Vervoort, 1998). The conservation of genes homologous to *Drosophila* proneural genes, such as members of the *neurogenin* (*ngn*) and *acheate-scute like* (*ascl*) families, indicates that similar mechanisms are also at work in vertebrates (Bertrand et al., 2002).

The olfactory system has proven to be an attractive model for studying the role of proneural genes during vertebrate neurogenesis. In the mouse embryo, olfactory sensory neurons (OSN) are born in the sensory epithelium that is itself derived from a pair of epidermal thickenings, or placodes, located on either side of the anterior neural plate (Cuschieri and Bannister, 1975a; Cuschieri and Bannister, 1975b; Smart, 1971). Loss-of-function studies in mice have shown that the sequential activity of members of the *Ascl* and *Ngn* families of proneural genes are required for the majority of OSN that develop. Indeed, the current model suggests that progenitor cells expressing *Ascl1* gives rise to intermediate precursors which require *Ngn1* for differentiation (Cau et al., 2002; Cau et al., 1997; Guillemot et al., 1993; Nicolay et al., 2006). More recently, it has been shown that the winged-helix transcription factor FoxG1 acts upstream of *Ascl1* for correct olfactory neurogenesis (Duggan et al., 2008). Similarly, microRNAs of the miR-200 family have been implicated in the maintenance of olfactory neurogenesis (Choi et al., 2008).

As in the mouse, olfactory neurogenesis in the zebrafish embryo occurs in placodes flanking the anterior neural plate. It has been shown that olfactory placodes themselves fate-map to a horseshoe shaped population of cells at the frontier between the anterior neural plate and the adjacent non-neural ectoderm (Whitlock and Westerfield, 2000). While this region gives rise both to the olfactory placodes and the telencephalon, progenitors of olfactory neurons are generally located more laterally and telencephalic progenitors more medially (Whitlock and Westerfield,

2000). Progenitors of olfactory neurons coalesce to form the olfactory placodes in a process that requires the chemokine receptor *Cxcr4b* and its ligand *Cxcl12a* (previously known as *Sdf1a*) (Miyasaka et al., 2007). Subsequently, neurons are born in two waves with the development of a population of so-called pioneer neurons preceding the birth of mature OSN (Whitlock and Westerfield, 1998). Pioneer neurons are required for the correct projection of OSN axons to the olfactory bulb and undergo apoptosis once the first OSN axons have correctly reached their targets (Whitlock and Westerfield, 1998). As for correct placode formation at earlier stages, the *Cxcl12a/Cxcr4b* couple is required for the proper guidance of pioneer axons (Miyasaka et al., 2007; Yoshihara, 2009); the *Robo-2* receptor and *Slit* ligands have also been implicated in fasciculation/guidance of axons of olfactory neurons (Miyasaka et al., 2005; Yoshihara, 2009). Surprisingly, however, while a requirement for *FoxG1* and microRNAs has apparently been conserved between zebrafish and mouse during the early steps of olfactory neurogenesis, nothing is known concerning proneural gene function during the development of either early or late-born olfactory neurons in zebrafish (Choi et al., 2008; Duggan et al., 2008).

Here, we describe the role of *neurogenin1* (*ngn1*) and a second proneural gene of the *Atonal* family, *neurod4*, during olfactory neurogenesis in the zebrafish embryo. Our results indicate that these genes are redundantly required for the development of early-born olfactory neurons and later olfactory sensory neurons. We also show that while the initial phase of *neurod4* expression requires *Ngn1*, *neurod4* expression recovers in the *ngn1* mutant; the late recovery of *neurod4* expression is sufficient for a reduced number of early-born neurons to develop. Finally, we show that there is a significant delay in the formation of mature OSN in *ngn1* mutants despite the recovery of *Neurod4* activity. Taken together, these results show that zebrafish uses a distinct strategy for olfactory neurogenesis than the mouse.

## Materials and Methods

### Fish lines and developmental conditions

Embryos were raised and staged according to standard protocols (Kimmel et al., 1995). Embryos homozygous for the *ngn1*<sup>hi1059</sup> mutation (Golling et al., 2002) were obtained by intercrossing heterozygous carriers; adults heterozygous for the *ngn1*<sup>hi1059</sup> allele were identified by PCR genotyping of tail-clip genomic DNA. The previously described *Tg(8.4ngn1:gfp)* transgenic line was used to visualize early-born olfactory neurons (Blader et al., 2003). Embryos were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde/1xPBS, after which they were dehydrated through an ethanol series and stored at -20°C until use.

### In situ hybridization and immunostaining

In situ hybridizations were performed as previously described (Oxtoby and Jowett, 1993). Antisense DIG labelled probes for *ngn1* (Blader et al., 1997), *gfp* (Blader et al., 2003), *neurod4* (Park et al., 2003), *deltaA* (Haddon et al., 1998), *olfactory marker protein* (Celik et al., 2002), *robo2* (Lee et al., 2001), *gefiltin* (Asch et al., 1998), *olfactomedin1b* (Nakaya and Tomarev, 2007) and *insulinoma associated-1b* (Lukowski et al., 2006) were generated using standard procedures. In situ hybridizations were revealed using either BCIP and NBT (Roche) or Fast Red (Roche) as substrate. Immunohistochemical stainings were performed as previously described (Masai et al., 1997), using either anti-GFP (1/1000, Torrey Pines Biolabs), zns-2 (1/250, (Trevarrow et al., 1990)) or anti-HuC/D (1/500, Molecular Probes); secondary antibodies used were Alexa 488 or Alexa 555-conjugated goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (1/1000, Molecular Probes).

### Antisense morpholino injection

For morpholino knock-downs, embryos were injected at the one cell stage with either of two morpholinos specific for *neurod4*, neurod4-MO1 and neurod4-MO2 using the previously described concentrations (Park et al., 2003).

### BrdU birthdating, image acquisition and cell counting

For birthdating, embryos were incubated in embryo medium supplemented with 10 mM 5-bromo-2-deoxyuridine and 8% DMSO for 20 minutes on ice followed by incubation at 28.5°C until the desired stage was reached; while embryos incubated

beginning at stages up to 20 hpf were fixed at 24 hpf, embryos incubated at 24 hpf were fixed at 28 hpf. BrdU incorporation was detected by immunohistochemistry using an anti-BrdU antibody (G3G4, 1/500, Developmental Studies Hybridoma Bank). Confocal acquisitions were achieved using a Leica (SP5). Images were subsequently manipulated using Photoshop (Adobe) software. For cell counting, confocal stacks were analysed using ImageJ software.

## Results

### ***Tg(8.4ngn1:gfp)* is a marker of early-born olfactory neurons in the zebrafish olfactory placode**

The expression of the proneural gene *neurogenin1* (*ngn1*) at the border between the neural and non-neural ectoderm in the anterior part of the neural plate suggests that this basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor is involved in the development of early-born olfactory neurons and/or olfactory sensory neurons (Fig. S1A; (Blader et al., 1997). To address this possibility, we mapped the expression of *ngn1* relative to these two neural populations using a previously described transgenic strain in which GFP expression is driven by regulatory elements located immediately upstream of the *ngn1* coding sequence, *Tg(8.4ngn1:gfp)* (Blader et al., 2003). At 24 hours post-fertilisation (hpf), all GFP positive cells driven by the *ngn1* transgene in the olfactory placode express the early marker of post-mitotic neurons HuC/D (Fig. 1A-C,M). Similarly, all transgene positive cells are recognised by the monoclonal antibody zns-2, previously described as a marker of pioneer neurons in the zebrafish olfactory placode (Fig. 1D-F,M; (Trevarrow et al., 1990; Whitlock and Westerfield, 1998)). Thus, at 24 hpf *Tg(8.4ngn1:gfp)*-positive neurons are the only post-mitotic cells in the olfactory placode and all appear to be pioneer neurons. By 48 hpf, the size of the developing olfactory placode has increased. Nonetheless, the number of *Tg(8.4ngn1:gfp)* expressing cells remains unchanged after the first day of development; 95.15 $\pm$ 11.77 *Tg(8.4ngn1:gfp)* positive cells at 24 hpf versus 94.40 $\pm$ 13.32 at 36 hpf. Also, while at 24 hpf all HuC/D-positive cells are GFP positive, at 48 hpf a significant proportion of the HuC/D-positive cells is negative for transgene expression (Fig. 1G-I). In contrast to *Tg(8.4ngn1:gfp)*<sup>+</sup> neurons, which are located superficially in the olfactory placode at 48 hpf, the HuC/D<sup>+</sup>; *Tg(8.4ngn1:gfp)*<sup>-</sup> cells are located deeper in the placode, closer to the telencephalon. Olfactory sensory neurons can be visualised at 48 hpf by the expression of the *olfactory marker protein* (*omp*) gene, (Sato et al., 2005). Similar to the HuC/D<sup>+</sup>; *Tg(8.4ngn1:gfp)*<sup>-</sup> cells, cells expressing *omp* are located more deeply in the olfactory placode at this stage (Fig. 1J-L). Thus, using the markers described here, at 48 hpf the olfactory placode can be schematically represented as an inner HuC/D<sup>+</sup>; *Tg(8.4ngn1:gfp)*<sup>+</sup> population of early-born olfactory neurons (EON) surrounded by an outer cup of *omp*<sup>+</sup>; *Tg(8.4ngn1:gfp)*<sup>-</sup> olfactory sensory neurons (OSN; Fig. 1N).

### **The development of early-born olfactory neurons is affected but not eliminated in *ngn1* mutant embryos**

The restricted expression of the *Tg(8.4ngn1:gfp)* reporter line suggests a role for *ngn1* in the generation of EON. To examine this possibility, we assessed the development of these neurons in a *ngn1* mutant background at 24 hpf by following the expression of the *Tg(8.4ngn1:gfp)* transgene and/or HuC/D (Golling et al., 2002); expression of the transgene does not appear to be directly regulated by *ngn1* itself and, thus, can be used to count the number of EON in the mutant context (Fig. S1A-C). We found that the development of early-born olfactory neurons is affected in *ngn1* mutant embryos with mutant embryos displaying approximately half the numbers as their wild-type siblings at 24 hpf (Fig. 2A,C and 5A,B,E). The deficit in neurons is quite variable with embryos displaying greater than (15%) or less than (15%) one standard deviation of EON relative to the average number in the mutant (Fig. 2B-D).

The reduction in the number of early-born olfactory neurons in *ngn1* mutant embryos at 24 hpf could reflect either a general reduction in neurogenesis (neurons are born at the correct time but at a reduced rate) or a delay in their development (neurons are born later). To distinguish between these possibilities, we assessed the deficit at earlier stages in the *ngn1* mutant. At 22 hpf a clear reduction in the number of HuC/D+ cells is already apparent in the *ngn1* mutant relative wild-type siblings (Fig. 2E,F). More strikingly, at 19 hpf when the dorsal telencephalic and olfactory lineages have become visibly segregated, a complete absence of HuC/D neurons is apparent in the olfactory anlagen in *ngn1* mutant embryos (Fig. 2G,H). These results suggest that the genesis of early-born olfactory neurons is delayed in the absence of *ngn1* function.

### **Cell cycle exit of early-born olfactory neurons is delayed in *ngn1* mutant embryos**

The delay in the generation of HuC/D+ neurons in the developing olfactory anlage of *ngn1* mutant embryos suggests either that neural progenitors leave the cell cycle later or that the time between cell cycle exit and differentiation is longer in the mutant. To address these two possibilities, we performed birthdating experiments using Bromodeoxyuridine (BrdU) in *Tg(8.4ngn1:gfp)* transgenic embryos. When BrdU was applied from 8 or 12 hpf, at 24 hpf virtually all GFP+ cells are also BrdU+ indicating

that EON progenitors have yet to leave the cell cycle at these stages in either wild type or mutant embryos (Fig. 3G). In contrast, while approximately 90% of *Tg(8.4ngn1:gfp)*<sup>+</sup> are BrdU<sup>+</sup> when mutant embryos are labelled from 16 hpf, only 56% of EON precursors remain in the cell cycle in wild type embryos at the same stage (Fig. 3A,D,G). Labelling from 20 hpf leads to an overall reduction in the number of *Tg(8.4ngn1:gfp)*<sup>+</sup> that are BrdU<sup>+</sup> in either mutant or wild type embryos. Nonetheless, over twice as many EON progenitors still incorporate BrdU in the mutant relative to wild type (75 $\pm$ 14% in mutants versus 35 $\pm$ 15% in wt siblings; Fig. 3B,E,G). Finally, very few early-born olfactory neurons cycle at 24 hpf in either mutant or wild type embryos (Fig. 3C,F,G). Thus, the differences between the incorporation curves obtained for mutant and wild type embryos indicate that cell cycle exit of early-born olfactory neurons is delayed in the absence of Ngn1 function. Interestingly, however, our BrdU experiments confirm our counts of *Tg(8.4ngn1:gfp)*<sup>+</sup> neurons at 24 and 36 hpf that suggested that few if any of these neurons are born after 24 hpf in either genetic context.

### **Neurod4 acts redundantly with Ngn1 during development of early-born olfactory neurons**

While *ngn1* plays an apparently important role for the development of early-born olfactory neurons in the zebrafish, the incomplete penetrance of the EON deficit in the *ngn1* mutant suggests that there are other proneural factors with at least partially overlapping function relative to Ngn1. The *neurod4* gene (previously known as *zath3*) encodes a proneural transcription factor with a bHLH domain highly similar to that of Ngn1 (Park et al., 2003; Wang et al., 2003). Furthermore, Ngn1 and Neurod4 have redundant functions during the development of some cranial ganglia in zebrafish (Park et al., 2003). With this in mind, we analysed the expression of *neurod4* to address the possibility of redundancy between these two proneural genes during early neurogenesis in the olfactory placode.

As previously described, the expression pattern of *neurod4* resembles that of *ngn1* (Blader et al., 1997; Korzh et al., 1998; Park et al., 2003; Wang et al., 2003). In the developing olfactory system, *neurod4* expression is first detected at 11 hpf in cells at the boundary of the anterior neural plate, a stage shortly after the onset of expression of *ngn1* (Fig. 4A and data not shown; (Blader et al., 1997; Korzh et al.,

1998)). Increasing levels of *neurod4* expression in this region accompany the convergence of the anterior neural plate such that by 17 hpf strong expression can be detected in the mixed telencephalo-olfactory lineage (Fig. 4B-D). At 19 hpf, when the telencephalic and olfactory lineages have segregated, robust *neurod4* expression can be detected in both territories (Fig. 4E). Expression of *neurod4* continues in the developing olfactory placode at 22 hpf but at this stage it is largely excluded from the population of neurons expressing *Tg(8.4ngn1:gfp)* (Fig. 4F). Finally, at 24 hpf the expression of *neurod4* is detected as an outer cup of cells surrounding the population of *Tg(8.4ngn1:gfp)+* neurons (Fig. 4G). Taken together, the pattern of expression of *neurod4* is coherent with a role for this proneural factor during neurogenesis in the developing olfactory system.

To address whether *neurod4* might play a role in the development early-born olfactory neurons in the absence of Ngn1 function, we next analysed the pattern of *neurod4* expression in the *ngn1* mutant. Somewhat surprisingly, the expression of *neurod4* is completely absent in *ngn1* mutant embryos up to 17 hpf (Fig. 4A-C versus 4H-J). At later stages, however, the expression of *neurod4* in the olfactory placode is practically identical to that in wild type embryos (Fig. 4D-G versus 4K-N). This said, while *neurod4* expression is largely unaffected after 17 hpf in terms of the number of expressing cells and the domain of expression, in contrast to the wild type situation co-labelling between cells expressing *Tg(8.4ngn1:gfp)* and *neurod4* is apparent in the mutant at 22 hpf (Fig. 4F versus M). Nonetheless, the recovery of *neurod4* expression at 17 hpf in the *ngn1* mutant is coherent with the possibility that the generation of residual EON in the *ngn1* mutant is under the control of Neurod4.

Finally, we used a morpholino knock-down approach, either alone or in the *ngn1* mutant background, to confirm a role for *neurod4* in the development of early-born olfactory neurons. As described above, there is a 2-fold reduction in the number of *Tg(8.4ngn1:gfp)+* neurons in the *ngn1* mutant (Fig. 5A,B,E). There is also a significant, although less pronounced, reduction in the number of EON in *neurod4* morphants (Fig. 5C,E). Simultaneous abrogation of both *neurod4* and *ngn1* function, however, reduces the number of EON by 80 percent relative to wild type levels (Fig. 5D,E); the reduction in the double loss-of-function situation is also significantly increased when compared to counts in the *ngn1* mutant alone (Fig. 5E). Taken together, our expression studies and functional analysis indicate that the generation

of early-born olfactory neurons in the developing zebrafish olfactory system is controlled by the redundant activities of *Ngn1* and *Neurod4*.

### ***Ngn1* and *Neurod4* redundantly control olfactory sensory neurons development**

We have shown that the expression of *neurod4* at 24 hpf is restricted to cells of the olfactory placode immediately adjacent to the telencephalon and excluded from *Tg(8.4ngn1:gfp)*-positive neurons (Fig. 4G). Furthermore, our birthdating studies indicate that the cells at this position incorporate BrdU at this stage (Fig. 3C). Taken together, these results suggest that *neurod4* expressing cells at 24 hpf are cycling neural progenitor. As few, if any, early-born neurons remain in the cell cycle at this stage, we conclude that these *neurod4* expressing cells are progenitors of olfactory sensory neurons (OSN).

To address a possible role for *neurod4* in the development of OSN, we first analysed the expression of markers of neural progenitors in *neurod4* morphant embryos. The transcription of *deltaA* is directly regulated by proneural genes in neural progenitors (Madelaine and Blader, 2010). Likewise, a second target of proneural genes, *insulinoma associated-1b* (*insm1b*) is expressed in the olfactory placode during development (Fig. S2A-C; (Castro et al., 2006; Lukowski et al., 2006)). Accordingly, *deltaA* and *insm1b* expression are comparable to that of *neurod4* at 24 hpf (Fig. 6A,A' and Fig. S2G). A similar pattern of *deltaA* or *insm1b* expression is detected in embryos injected with the *neurod4* morpholino (Fig. 6B,B' and Fig. S2H). These results suggest that, as for EON, redundancy between proneural factors exists during the development of OSN. While *ngn1* is no longer expressed in the olfactory placode at 22 hpf, residual expression can be detected up to 20 hpf leaving open the possibility that *ngn1* also acts together with *neurod4* during at least the early phase of OSN development (Fig. S1D-G). Consistent with this idea, while *deltaA* and *insm1b* expression are unaffected in *ngn1* mutant embryos at 24 hpf (Fig. 6C,C' and Fig. S2D-F,I), no *deltaA* or *insm1b* expression is detected in embryos lacking both *neurod4* and *ngn1* function (Fig. 6D,D' and Fig. S2J).

Next, we analysed the effect of abrogating *neurod4* and/or *ngn1* function on the expression of the marker of specified olfactory sensory neurons, *omp* (Sato et al.,

2005). As for *deltaA*, *omp* expression in *neurod4* morphants is indistinguishable from wild type at all stages analysed (Fig. 6E,I,M versus Fig. 6F,J,N). On the contrary, while *omp* expression in *ngn1* mutant embryos resembles that in wild type siblings at 48 hpf, expression is severely reduced in the mutant at 36 hpf and cannot be detected at 24 hpf (Fig. 6G,K,O); in the absence of both *neurod4* and *ngn1* activity the expression of *omp* is missing at all stages up to 48 hpf (Fig. 6H,L,P). We conclude that the redundant function of *neurod4* and *ngn1* is necessary for the formation of OSN. Moreover, our results show that the activity of Ngn1 prior to the stage when *neurod4* expression becomes independent of Ngn1 (approx. 17 hpf) is necessary for OSN specification to be correctly initiated at 24 hpf.

### **Ngn1 prefigures aspects of early-born olfactory neurons identity**

Our BrdU experiments suggest that whereas early-born olfactory neurons leave the cell cycle starting at 12 hpf in wild type embryos, residual neurons present in the *ngn1* mutant only begin leaving the cell cycle around 18 hpf, when the expression of *neurod4* become independent of Ngn1. On the other hand, relatively few EON appear to become post-mitotic after 24 hpf in either wild type or mutant embryos. Thus, we asked whether the shortened time window of EON development in the *ngn1* mutant is nonetheless sufficient for the reduced number of neurons that are born to activate all aspects of the EON genetic programme.

The zebrafish *robo2* gene encodes an evolutionarily conserved transmembrane receptor protein of the immunoglobulin superfamily that is required for fasciculation of axons during their projection from the olfactory placode to the olfactory bulb (Miyasaka et al., 2005). The expression of *robo2* during development of the olfactory placode begins at 20 hpf, is robust between 24 and 36 hpf after which its expression quickly diminishes (Miyasaka et al., 2005). We find that *robo2* expression overlaps completely with the *Tg(8.4ngn1:gfp)* transgene at 24 and 36 hpf in wild type embryos suggesting that it is specific to EON (Fig. 7A-C and Fig. 7G-I). In contrast to the wild type situation, *robo2* expression is not detected in *Tg(8.4ngn1:gfp)+* cells in *ngn1* mutant siblings at 24 hpf (Fig. 7D-F); the expression of *robo2* never significantly recovers in the mutants (Fig.7 J-L and data not show). Similarly, the expression of *olfactomedin 1b (olfm1b)* and *gefiltin (gef)* is restricted to EON at 24 hpf in wild type embryos and absent from *ngn1* mutant olfactory placodes

(Fig. S3A-L; (Asch et al., 1998; Nakaya and Tomarev, 2007)). Unlike *robo2*, expression of *olfm1b* and *gef* is not specific to EON and can be detected in OSN at later stages in wild type embryos. Accordingly, the expression of these two genes recovers in the OSN of *ngn1* mutant embryos but with a delay similar to that of *omp* suggesting that NeuroD4 has the ability to drive *olfm1b* and *gef* expression (data not shown). Nonetheless, their expression never recovers in residual EON in the mutant even at later stages. Thus, while neurons with certain facets of EON character can develop in the absence of Ngn1 function, the reduced time window available for the development of these neurons in the *ngn1* mutant is apparently not sufficient for all aspect of their specification to be realised.

## Discussion

In the present study, we describe the role of two Atonal family proneural genes, *neurogenin1* (*ngn1*) and *neurod4*, during olfactory neurogenesis in the early zebrafish embryo. Our results suggest that these genes have largely redundant functions during the development of olfactory neurons. Interestingly, however, the early phase of *neurod4* expression requires Ngn1. As a consequence, there is a delay in the development of olfactory neurons in the *ngn1* mutant (schematically represented in Fig. 8). Here, we discuss these results relative to previous studies in the zebrafish and mouse.

Our interest in identifying proneural genes required for the development of olfactory neurons in the zebrafish led us to characterize the expression of the *Tg(8.4ngn1:gfp)* transgene in the olfactory system (Blader et al., 2003). We found that at 24 hours post-fertilisation (hpf), GFP expression driven by the transgene is restricted to post-mitotic neurons in the olfactory placode. As all GFP+ cells are also recognised by the antibody zns-2, we initially concluded that *Tg(8.4ngn1:gfp)* transgene is a novel marker of pioneer neurons; zns-2 was originally described as a marker of pioneer neurons (Whitlock and Westerfield, 1998). However, while our counts suggest that there are approximately 95 GFP+/zns-2+ cells per placode, only 11 zns-2+ neurons/placode were reported in the initial characterisation of zns-2 expression at the same stages (Whitlock and Westerfield, 1998). We subsequently performed birthdating studies on *Tg(8.4ngn1:gfp)*+ cells. Here again differences exist with earlier work; based on single cell fate mapping and morphological criteria it was previously shown that pioneer neurons are post-mitotic by 12 hpf (Whitlock and Westerfield, 1998; Whitlock and Westerfield, 2000), while our results indicate that *Tg(8.4ngn1:gfp)*+ cells can incorporate BrdU up to 20-24 hpf. A simple explanation for these discrepancies would be that only a subset of transgene expressing cells are in fact pioneer neurons; the corollary being that zns-2 is not a specific marker of pioneer neurons, an idea supported by the reported co-expression of the olfactory sensory neuron marker *Tg(omp:YFP)* and zns-2 (Miyasaka et al., 2007). However, it does not appear that the majority of *Tg(8.4ngn1:gfp)*+ cells are olfactory sensory neurons either as we show here that only a few cells co-express *omp* and the *Tg(8.4ngn1:gfp)* transgene. It is apparent, therefore, that there is more heterogeneity in olfactory neurons subtypes than previously appreciated. As such, and to avoid confusion with the previous “pioneer/OSN” nomenclature, we have chosen to refer to

the *Tg(8.4ngn1;gfp)*+ neurons described in our study as early-born olfactory neurons (EON) rather than pioneer neurons. The characterisation of novel molecular markers will help refine our understanding of the complexity of early neural subtypes in this system.

The conserved role of *Foxg1* and members of the miR200 microRNA family during early olfactory development in mice and zebrafish suggests an overall conservation of developmental strategy for the olfactory system in these two species (Choi et al., 2008; Duggan et al., 2008); the conserved role of *Robo-2* in the guidance of OSN axons later in development would seem to confirm this idea (Cho et al., 2007). Our study, however, shows that this is not completely the case as while in the mouse olfactory sensory epithelium *Ascl1* acts as the dominant proneural factor, we show here that in the zebrafish a redundant pair of Atonal family members, *ngn1* and *neurod4*, play this role (this study and (Cau et al., 2002; Cau et al., 1997; Guillemot et al., 1993)). The significance of this difference is not clear. Knock-in experiments in the mouse have shown that *Ngn2* can effectively replace *Ascl1a* in the development of the mouse olfactory epithelium suggesting that there is no apparent “specification role” for the proneural gene used after olfactory neurons are determined (Parras et al., 2002). On the other hand, the deficit in early-born olfactory neurons in the *ngn1* mutant in zebrafish can be rescued by the mis-expression of *ngn1* but not *ascl1a* (R.M. and P.B., unpublished observations). We conclude from this that the choice of proneural gene is, at least in the case of early-born neurons in the zebrafish, crucial for correct specification of neural sub-type identity in the zebrafish olfactory system. It is possible that there is no equivalent to zebrafish early-born olfactory neurons in the mouse. Furthermore, *ascl1a* is expressed in a restricted domain of OSN progenitors in the zebrafish olfactory placode at 24 hpf suggesting it might have a role to play in the development of OSN in the zebrafish, as it does in the mouse (R.M. and P.B., unpublished observations). However, in the *ascl1a* mutation, *pituitary absent (pia)*, we have not detected any defect in olfactory neurogenesis or in *ngn1/neurod4* expression (R.M. and P.B., unpublished observations (Pogoda et al., 2006)). Moreover, the abrogation of both *ngn1* and *neurod4* activity is sufficient to eliminate OSN development up to 48 hpf indicating that at best *ascl1a* acts downstream of the combined activity of these two genes. If there is a later role for *Ascl1a* during olfactory neurogenesis in the zebrafish remains an open question.

The correct development of early-born and mature olfactory sensory neurons in the zebrafish olfactory placode apparently requires the redundant activity of Ngn1 and Neurod4. Our data also suggest that while *neurod4* is a transcriptional target of Ngn1 up to 17 hpf, its expression becomes independent of Ngn1 activity after this stage. The timing of the recovery of cell-cycle exit of early-born olfactory neurons in the olfactory placode of *ngn1* mutant zebrafish embryos coincides well with the recovery of *neurod4* expression in the mutant. From this we conclude that the expression of either gene is sufficient to drive the progenitors of early-born olfactory neurons out of the cell cycle. In the mouse, it has been suggested that Neurod4 (also known as Math3) synergises with Ngn2 during the establishment of certain aspects cortical identity (Mattar et al., 2008); physical interaction between these bHLH proteins has been shown to lead to an increased efficiency in target gene induction. Furthermore, Neurod4 behaves as an Ngn2 target gene in the mouse cortex highlighting similarities between the two systems. However, it is not clear if Ngn2 and Neurod4 have truly redundant functions in the mouse, as to our knowledge double Ngn2/Neurod4 loss-of-function studies have not been reported for the cortex. It is also not clear if Ngn1 and Neurod4 synergise to regulate the transcription of targets in the zebrafish olfactory system. A slight reduction in the number of early-born olfactory neurons is detected in *neurod4* morphant embryos. However, it remains unclear whether this reflects that Ngn1 functions less well in the absence of Neurod4 (synergy) or that the last early-born neurons cannot develop in the *neurod4* morphant once *ngn1* expression stops in the olfactory placode at 20 hpf (redundancy). Finally, it remains to be determined what advantage exists in having redundant bHLH factors if one of the factors initially regulates the other, thereby apparently eliminating any possible advantage that might be gained.

Our BrdU experiments indicate that early-born olfactory neurons begin to exit the cell cycle between 10-12 hpf in wild type embryos, shortly after the expression of *ngn1* is initiated in the anlage of the zebrafish olfactory placodes. Furthermore, we show that early-born olfactory neurons in *ngn1* mutant embryos initiate their last S-phase after 16 hpf, concomitant with the recovery of expression of *neurod4*. However, virtually all early-born olfactory neurons in both wild type and *ngn1* mutant embryos are post-mitotic at 24 hpf; the stable number of *Tg(8.4ngn1:gfp)*<sup>+</sup> neurons in both wild type or mutants after 24 hpf is coherent with this idea. Thus, while the development of these neurons is apparently initiated by the expression of *ngn1* or

*neurod4*, even with the sustained expression of *neurod4* in cycling progenitors after 24 hpf early-born olfactory neurons can no longer be generated. The mechanism that controls the end of the determination phase of early-born olfactory neurons development is not known. One possibility is that from the earliest stages of olfactory neurogenesis there are separate progenitor lineages for early and late neuronal subtypes and the progenitor pool for the early-born neurons is exhausted at 24 hpf. A previous study has shown that distinct progenitors exist for pioneer neurons and olfactory sensory neurons (Whitlock and Westerfield, 2000). However, it is not clear if this is also the case for the *Tg(8.4ngn1:gfp)*+ neurons described in our study and OSN; the overlap of *zns-2* and *Tg(omp:YFP)* argues against this idea (Miyasaka et al., 2005). Furthermore, even though the development of early-born neurons is delayed in *ngn1* mutants, these neurons also stop being generated at 24 hpf in the mutant suggesting either that the pool of progenitors is smaller to start with in the absence of Ngn1 function or that parallel mechanisms actively repress the birth of the early-born population after 24 hpf.

A “delayed neurogenesis” phenotype similar to that highlighted in our study has previously been reported during the development of the nucleus of the solitary tract (nTS) and sympathetic ganglia in the *Mash1* knock-out in mouse (Pattyn et al., 2006); in these structures, neurons appear with a 24 hour delay in the mutant and accumulate at a slower pace. Here, the authors argue that this delay reflects one of two possibilities. First, a threshold of proneural activity might be required for the initiation of neurogenesis and in the absence of *Mash1* this threshold is not achieved at the appropriate time. Our results argue against a threshold model for early-born olfactory neurons in the zebrafish as there is very little delay between the expression of either *ngn1* or *neurod4*, in the *ngn1* mutant context, and cell-cycle exit of *Tg(8.4ngn1:gfp)*+ neurons. Alternatively, Pattyn and colleagues suggest that the sequential expression of two proneural factors would regulate development of the nTS and sympathetic ganglia; the second proneural factor in this system is unknown (Pattyn et al., 2006). This appears to be true in the case of *Tg(8.4ngn1:gfp)*+ neurons in the zebrafish olfactory placode with the added complication of regulation of the second proneural gene, *neurod4*, by the first, *ngn1*, during the initial phase of early-born olfactory neuron development. Interestingly, however, while there is a delay in the development of the sympathetic ganglia in the *Mash1* knockout, although neurons are born later in this structure they eventually express the full signature of a

sympathoadrenergic phenotype, at least caudally (Pattyn et al., 2006). While this also appears to be the case for the development of *omp+* OSN in the zebrafish, in the absence of Ngn1 function, residual neurons that become post-mitotic before 24 hpf in the *ngn1* mutant present some but not all aspects of early-born olfactory neuron character; *robo-2*, *olfm1b* and *gefilitin* expression never robustly recover despite the expression of *neurod4* from 17 hpf. This suggests that the mechanisms that block early-born neurons from leaving the cell-cycle after 24 hpf also affect aspects of subtype specification. As such, we conclude that the length of time after proneural gene expression is crucial for correct development in the zebrafish olfactory system.

## Acknowledgements

We are grateful to Elise Cau, Alice Davy, Carol Schuurmans and members of the Blader lab for critical reading of the manuscript. We thank Y. Yoshihara, C-H. Kim, C-B. Chien, S. Tomarev and A. J. Waskiewicz for the gift of reagents. We would also like to thank the Toulouse RIO Imaging platform. The CNRS, INSERM, Université Paul Sabatier, FRM, FRC and the Ministère de la Recherche provided financial support. R.M. was financed by the Ministère de la Recherche.

## References

- Asch, W. S., Leake, D., Canger, A. K., Passini, M. A., Argenton, F. and Schechter, N.** (1998). Cloning of zebrafish neurofilament cDNAs for plasticin and gefiltin: increased mRNA expression in ganglion cells after optic nerve injury. *J Neurochem* **71**, 20-32.
- Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**, 517-30.
- Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemot, F. and Strahle, U.** (1997). The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development* **124**, 4557-69.
- Blader, P., Plessy, C. and Strahle, U.** (2003). Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mech Dev* **120**, 211-8.
- Castro, D. S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I. J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J. A., Nguyen, L., Gossler, A., Gottgens, B. et al.** (2006). Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev Cell* **11**, 831-44.
- Cau, E., Casarosa, S. and Guillemot, F.** (2002). Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* **129**, 1871-80.
- Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C. and Guillemot, F.** (1997). Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* **124**, 1611-21.
- Celik, A., Fuss, S. H. and Korsching, S. I.** (2002). Selective targeting of zebrafish olfactory receptor neurons by the endogenous OMP promoter. *Eur J Neurosci* **15**, 798-806.
- Cho, J. H., Lepine, M., Andrews, W., Parnavelas, J. and Cloutier, J. F.** (2007). Requirement for Slit-1 and Robo-2 in zonal segregation of olfactory sensory neuron axons in the main olfactory bulb. *J Neurosci* **27**, 9094-104.
- Choi, P. S., Zakhary, L., Choi, W. Y., Caron, S., Alvarez-Saavedra, E., Miska, E. A., McManus, M., Harfe, B., Giraldez, A. J., Horvitz, H. R. et al.** (2008). Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis. *Neuron* **57**, 41-55.
- Cuschieri, A. and Bannister, L. H.** (1975a). The development of the olfactory mucosa in the mouse: electron microscopy. *J Anat* **119**, 471-98.
- Cuschieri, A. and Bannister, L. H.** (1975b). The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy. *J Anat* **119**, 277-86.
- Dambly-Chaudiere, C. and Vervoort, M.** (1998). The bHLH genes in neural development. *Int J Dev Biol* **42**, 269-73.
- Duggan, C. D., DeMaria, S., Baudhuin, A., Stafford, D. and Ngai, J.** (2008). Foxg1 is required for development of the vertebrate olfactory system. *J Neurosci* **28**, 5229-39.
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S. et al.** (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet* **31**, 135-40.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Campuzano, S. and Modolell, J.** (2003). Half a century of neural pre-patterning: the story of a few bristles and many genes. *Nat Rev Neurosci* **4**, 587-98.
- Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J. and Joyner, A. L.** (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* **75**, 463-76.
- Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D. and Lewis, J.** (1998). Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development* **125**, 359-70.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310.
- Korzh, V., Sleptsova, I., Liao, J., He, J. and Gong, Z.** (1998). Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nrd* defines distinct stages of neural differentiation. *Dev Dyn* **213**, 92-104.
- Lee, J. S., Ray, R. and Chien, C. B.** (2001). Cloning and expression of three zebrafish roundabout homologs suggest roles in axon guidance and cell migration. *Dev Dyn* **221**, 216-30.
- Lukowski, C. M., Ritzel, R. G. and Waskiewicz, A. J.** (2006). Expression of two *insm1*-like genes in the developing zebrafish nervous system. *Gene Expr Patterns* **6**, 711-8.
- Madelaine, R. and Blader, P.** (2010). A cluster of non-redundant Ngn1 binding sites is required for regulation of *deltaA* expression in zebrafish. *Dev Biol*.
- Masai, I., Heisenberg, C. P., Barth, K. A., Macdonald, R., Adamek, S. and Wilson, S. W.** (1997). *floating head* and *masterblind* regulate neuronal patterning in the roof of the forebrain. *Neuron* **18**, 43-57.

**Mattar, P., Langevin, L. M., Markham, K., Klenin, N., Shivji, S., Zinyk, D. and Schuurmans, C.** (2008). Basic helix-loop-helix transcription factors cooperate to specify a cortical projection neuron identity. *Mol Cell Biol* **28**, 1456-69.

**Miyasaka, N., Knaut, H. and Yoshihara, Y.** (2007). Cxcl12/Cxcr4 chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system. *Development* **134**, 2459-68.

**Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S. Y., Hutson, L. D., Chien, C. B., Okamoto, H. and Yoshihara, Y.** (2005). Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development* **132**, 1283-93.

**Nakaya, N. and Tomarev, S.** (2007). Expression patterns of alternative transcripts of the zebrafish olfactomedin 1 genes. *Gene Expr Patterns* **7**, 723-9.

**Nicolay, D. J., Doucette, J. R. and Nazarali, A. J.** (2006). Transcriptional regulation of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Cell Mol Neurobiol* **26**, 803-21.

**Oxtoby, E. and Jowett, T.** (1993). Cloning of the zebrafish krox-20 gene (krx-20) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res* **21**, 1087-95.

**Park, S. H., Yeo, S. Y., Yoo, K. W., Hong, S. K., Lee, S., Rhee, M., Chitnis, A. B. and Kim, C. H.** (2003). Zath3, a neural basic helix-loop-helix gene, regulates early neurogenesis in the zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 184-90.

**Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J. and Guillemot, F.** (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* **16**, 324-38.

**Pattyn, A., Guillemot, F. and Brunet, J. F.** (2006). Delays in neuronal differentiation in Mash1/Ascl1 mutants. *Dev Biol* **295**, 67-75.

**Pogoda, H. M., von der Hardt, S., Herzog, W., Kramer, C., Schwarz, H. and Hammerschmidt, M.** (2006). The proneural gene ascl1a is required for endocrine differentiation and cell survival in the zebrafish adenohypophysis. *Development* **133**, 1079-89.

**Sato, Y., Miyasaka, N. and Yoshihara, Y.** (2005). Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish. *J Neurosci* **25**, 4889-97.

**Smart, I. H.** (1971). Location and orientation of mitotic figures in the developing mouse olfactory epithelium. *J Anat* **109**, 243-51.

**Trevarrow, B., Marks, D. L. and Kimmel, C. B.** (1990). Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron* **4**, 669-79.

**Wang, X., Emelyanov, A., Korzh, V. and Gong, Z.** (2003). Zebrafish atonal homologue zath3 is expressed during neurogenesis in embryonic development. *Dev Dyn* **227**, 587-92.

**Whitlock, K. E. and Westerfield, M.** (1998). A transient population of neurons pioneers the olfactory pathway in the zebrafish. *J Neurosci* **18**, 8919-27.

**Whitlock, K. E. and Westerfield, M.** (2000). The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development* **127**, 3645-53.

**Yoshihara, Y.** (2009). Molecular genetic dissection of the zebrafish olfactory system. *Results Probl Cell Differ* **47**, 97-120.

## Figure Legends

### **Figure 1. *Tg(8.4ngn1:gfp)* is a marker of early-born olfactory neurons.**

(A-F) Single confocal sections of double immunolabelled olfactory placodes showing co-expression of HuC/D (A-C) or the previously described pioneer neuron marker *zns-2* (D-E) with GFP driven from the *Tg(8.4ngn1:GFP)* transgene at 24 hpf.

(G-L) Single confocal sections of olfactory placodes showing double immunolabellings of HuC/D (G-I) or in situ/immunolabellings of *omp* (J-L) and GFP driven from the *Tg(8.4ngn1:GFP)* transgene at 48 hpf (J-L). Whereas all GFP-positive cells in the placode are HuC/D and *zns-2*-positive at 24 hpf, at 48 hpf HuC/D+/GFP- cells are present; little if any overlap is detected between the expression of *omp* transcripts and GFP at 48 hpf.

(M,N) Schematic representation of olfactory placodes at 24 hpf (M) or 48 hpf (N). Early-born olfactory neurons are shown in green and olfactory sensory neurons in red. At 48 hpf, pioneer and olfactory sensory neurons are localized in specific and complementary domains with olfactory sensory neurons forming a cup around early-born olfactory neurons.

T indicates the telencephalon and placodes are oriented with anterior up and lateral to the right.

### **Figure 2. Early-born olfactory neurons development is delayed in the absence of *ngn1* function.**

(A-D) Confocal projections of wild type (A) or *ngn1* mutant (B-D) olfactory placodes at 24 hpf double immunolabeled for HuC/D and GFP driven from the *Tg(8.4ngn1:GFP)* transgene; mutant embryos show a variable but reduced number of early-born olfactory neurons.

(E, F) Confocal projections of wild type (E) or *ngn1* mutant (F) olfactory placodes at 22 hpf immunolabeled for HuC/D; a reduced number of HuC/D-positive neurons can be detected in the olfactory placode of mutant embryos at this stage.

(G, H) Confocal projections of wild type (G) or *ngn1* mutant (H) olfactory placodes at 19 hpf immunolabeled for HuC/D; a complete absence of HuC/D neurons is apparent in the olfactory anlagen in *ngn1* mutant embryos. A dotted white line indicates the boundary between the telencephalon and the olfactory placode and arrowheads shows HuC/D expression in olfactory placode.

**Figure 3. Cell cycle exit of early-born olfactory neurons is delayed in the *ngn1* mutant.**

(A-F) Confocal sections of olfactory placodes double immunolabellings for incorporated BrdU (red) and GFP (green) driven from the *Tg(8.4ngn1:GFP)* transgene in wild type (A-C) or *ngn1* mutant (D-F) embryos at 24 hpf (A,B,D,E) or 28 hpf (C, F). The stage at which BrdU incubation were started is indicated. Fewer BrdU+/GFP+ are detected in wild type embryos than in *ngn1* mutant embryos when embryos are incubated in BrdU at later stages.

(G) The proportion BrdU+;GFP+ cells over total number of GFP+ cells in the olfactory placode after BrdU treatment in wild type (green line) or *ngn1* mutant (red line) embryos. While GFP+ early-born olfactory neurons generally leave the cell cycle later in mutant than in wild type embryos, at 24 hpf few if any early-born olfactory neurons are still cycling in either genetic context.

**Figure 4. Expression of *neurod4* in the olfactory anlage is dependent on *ngn1* at early but not late stages.**

(A-D and H-K) Whole-mount in situ hybridization against *neurod4* in wild type (A-D) and *ngn1* mutant (H-K) embryos at 11 hpf (A, H), 13 hpf (B, I), 15 hpf (C, J) and 17 hpf (D, K). While *neurod4* expression is absent in mutant embryos up to 15 hpf; expression recovers to wild type levels at 17 hpf. Embryos are viewed dorsally with anterior down and arrowhead indicated the mixed telencephalo-olfactory expression domain.

(E-G and L-N) Single confocal sections of *neurod4* in situ labelling (E, L) or double in situ/immunolabellings against *neurod4* and GFP (F, G, M, N) driven from the *Tg(8.4ngn1:GFP)* transgene in the olfactory placode of wild type (E-G) or *ngn1* mutants (L-N) embryos at 19 hpf (E, L), 22 hpf (F, M) and 24 hpf (G, N). While the expression pattern of *neurod4* is virtually indistinguishable between mutant and wild type siblings, *neurod4*+/GFP+ cells are more evident in the olfactory placode of *ngn1* mutant than wild type sibs at 22 hpf (arrowhead in M). At 24 hpf, *neurod4* is restricted to cells of the olfactory placode immediately adjacent to the telencephalon and excluded from *Tg(8.4ngn1:gfp)*-positive early-born olfactory neurons. A dotted white line indicates the boundary between the telencephalon and the olfactory placode.

**Figure 5. Ngn1 and Neurod4 act redundantly during development of early-born olfactory neurons.**

(A-D) Confocal projections of double immunolabellings against HuC/D and GFP driven from the *Tg(8.4ngn1:GFP)* transgene in the olfactory placode of wild type (A), *ngn1* mutant (C) *neurod4* morphant (D) and *ngn1/neurod4* double loss-of-function embryos at 24 hpf. Abrogation of both Neurod4 and Ngn1 function leads to a severe deficit in the differentiation of early-born olfactory neurons. Placodes are oriented with anterior up.

(E) Counts of early-born olfactory neurons per placode in wild type, *ngn1* mutant, *neurod4* morphant and *ngn1/neurod4* double loss-of-function embryos at 24 hpf. A minimum of twelve olfactory placode were analyzed for each genetic context. Error bars represent s.d. \*P<0.05; \*\*P<0.001; \*\*\*P<0.0005 using a t-test.

**Figure 6. Neurod4 and Ngn1 act redundantly during OSN development.**

(A-D') Confocal projections of double in situ/immunolabellings against *deltaA* and GFP in wild type (A,A'), *ngn1* mutant (B,B'), *neurod4* morphant (C,C') and *ngn1/neurod4* double loss-of-function (D,D') olfactory placodes of *Tg(8.4ngn1:GFP)* embryos at 24 hpf. While no difference is apparent in the expression of *deltaA* in single loss-of-function embryos relative to wild type siblings, *deltaA* expression is absent when both *ngn1* and *neurod4* function is abolished.

(E-P) Confocal sections of in situ labelling against *olfactory marker protein (omp)* in wild type (E,I,M), *ngn1* mutant (F,J,N), *neurod4* morphant (G,K,O) and *ngn1/neurod4* double loss-of-function (H,L,P) olfactory placodes at 24 hpf (E-H), 36 hpf (I-L) and 48 hpf (M-P). While *omp* expression resembles the wild type pattern in the single loss-of-function context at 48 hpf, there is a delay in the initiation of *omp* expression in the absence of Ngn1 function. The expression of *omp* is never detected when both *ngn1* and *neurod4* function is abolished.

**Figure 7. In *ngn1* mutant embryos, neurons lack certain markers of early-born olfactory neurons differentiation.**

(A-F) Confocal sections of double in situ/immunolabellings against *robo2* and GFP driven from the *Tg(8.4ngn1:GFP)* transgene in the olfactory placode of wild type (A-C) and *ngn1* mutants (D-F) at 24 hpf. Whereas early-born olfactory neurons in wild type embryos robustly express *robo2*, expression is absent in *ngn1* mutant embryos.

(G-L) Confocal sections of double in situ/immunolabellings against *robo2* and GFP driven from the *Tg(8.4ngn1:GFP)* transgene in the olfactory placode of wild type (G-I) and *ngn1* mutants (J-L) at 36 hpf. The expression of *robo2* never recovers in the few early-born olfactory neurons that develop in *ngn1* mutant embryos.

**Figure 8. Schematic representation of neurogenesis in the zebrafish olfactory placode.**

(A-D) A schematic recapitulation of olfactory neurogenesis in wt (A), *ngn1* mutant (B), *neurod4* morphant (C) and *ngn1/neurod4* double loss of function embryos (D). The period of expression of *ngn1* and *neurod4* are shown in thick green and red bars, respectively, and the birth of the different types of olfactory neurons is shown in thin bars. Ngn1 and Neurod4 share redundant activity during the development of early-born olfactory neurons (EON) and olfactory sensory neurons (OSN). Furthermore, in the absence of Ngn1 the complete specification of early-born olfactory neurons is never achieved and the early phase of OSN differentiation is delayed. In double loss of function of *ngn1* and *neurod4*, virtually all early-born olfactory neurons and olfactory sensory neurons are lost in the developing olfactory placode.

Figure S1.

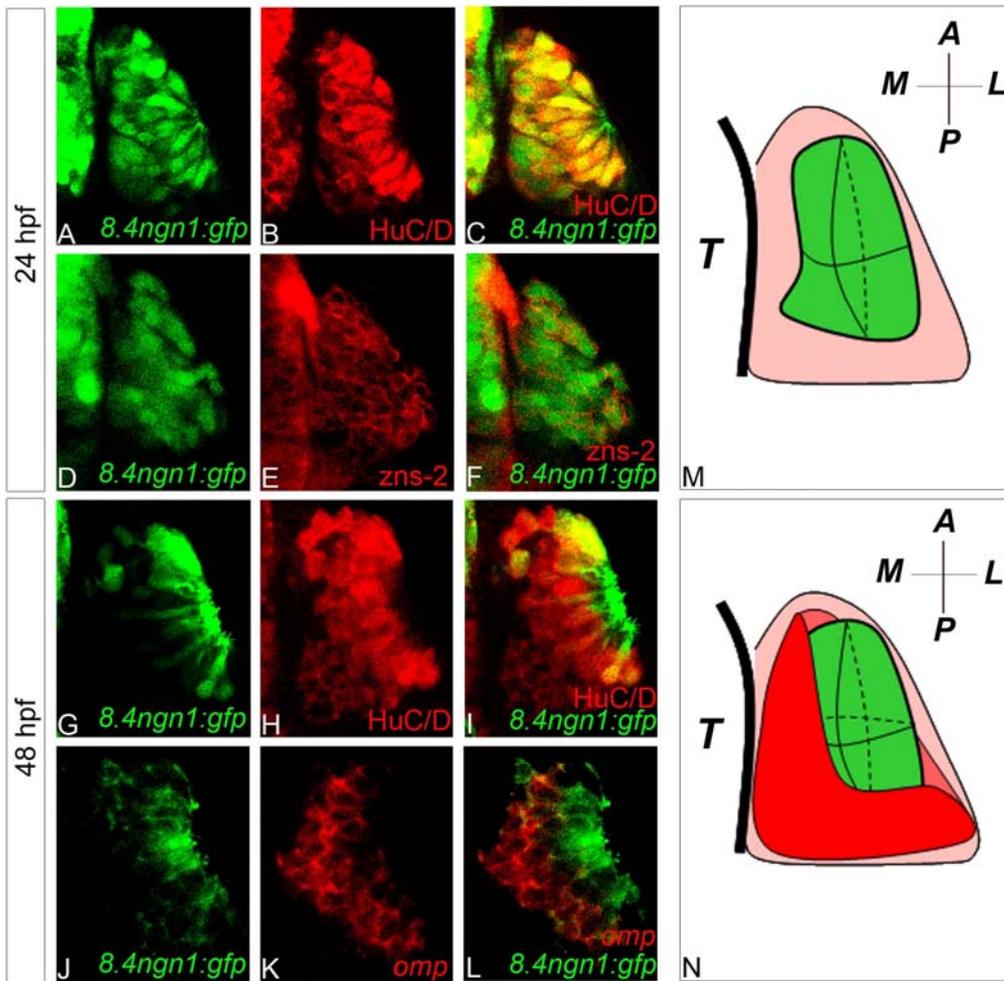
(A-C) Whole-mount in situ hybridization against *ngn1* in wt (A) or *gfp* driven by the *Tg(8.4ngn1:GFP)* transgene in wild type (B) and *ngn1* mutant embryos (C) at 10 hpf. Embryos are viewed dorsally with anterior down. At 10 hpf, *ngn1* is expressed at the anterior border of the neural plate (A). In *ngn1* mutant embryos, *gfp*<sup>+</sup> cells are not lost in this territory (B versus C). (D-G) Confocal projections of double in situ/immunolabellings against *ngn1* and GFP in wild type olfactory placodes in *Tg(8.4ngn1:GFP)* embryos at 20 hpf (D, E) and 22 hpf (F, G). In olfactory placode *ngn1* expression disappears between 20 and 22 hpf. Placodes are oriented with anterior up and lateral to the right.

Figure S2.

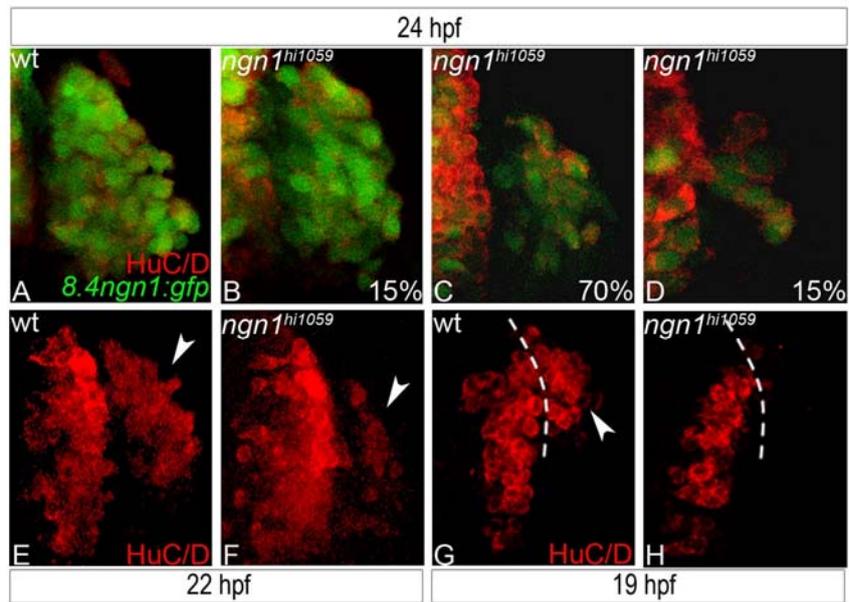
(A-F) Whole-mount in situ hybridization against *insm1b* in wild type (A-C) and *ngn1* mutants (D-F) zebrafish embryos at 13 hpf (A,D), 15 hpf (B,E) or 17 hpf (C,F). As for *neurod4*, while *insm1b* expression is absent in embryos up to 15 hpf in the mutant, its expression recovers at 17 hpf. Embryos are viewed dorsally with anterior down (D-F).

(G-J) Confocal projections of double in situ/immunolabellings against *insm1b* and GFP in the olfactory placodes of wild type (G), *ngn1* mutant (H), *neurod4* morphant (I) and *ngn1/neurod4* double loss of function embryos (J) in *Tg(8.4ngn1:GFP)* embryos at 24 hpf. At this stage, *insm1b*<sup>+</sup> cells are lost only in the *ngn1/neurod4* double loss of function situation (J), suggesting that these two proneural factors are redundantly required for olfactory sensory neurons development. Placodes are oriented with anterior up and lateral to the right.

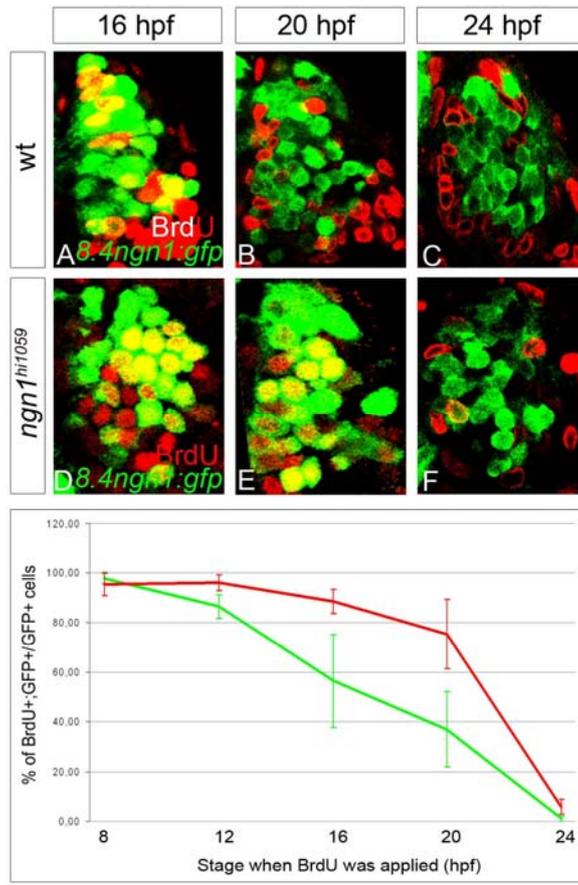
Fig.S3. (A-L) Confocal sections of double in situ/immunolabellings against *olfactomedin1b* (*olfm1b*, A-F) or *gefilin* (*gef*, G-L) and GFP in wild type (A-C, G-I) and *ngn1* mutant embryos (D-F, J-L) in the *Tg(8.4ngn1:GFP)* background at 24 hpf. Whereas early-born olfactory neurons differentiate in *ngn1* mutant embryos, they do not express these markers of specification. Placodes are oriented with anterior up and lateral to the right.



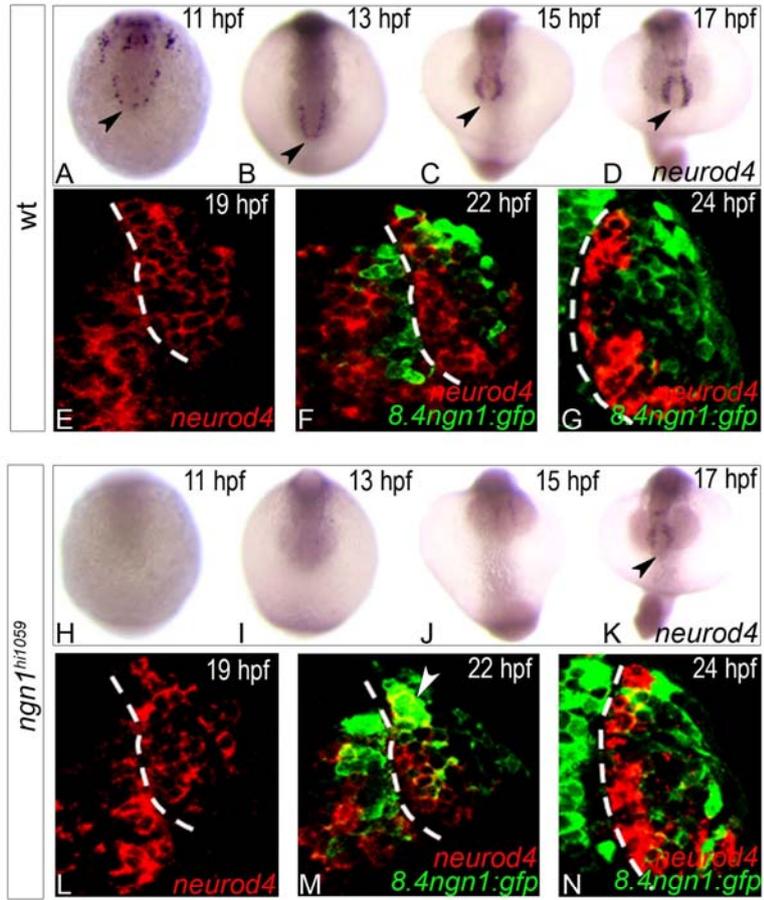
Madelaine and Blader Fig.1



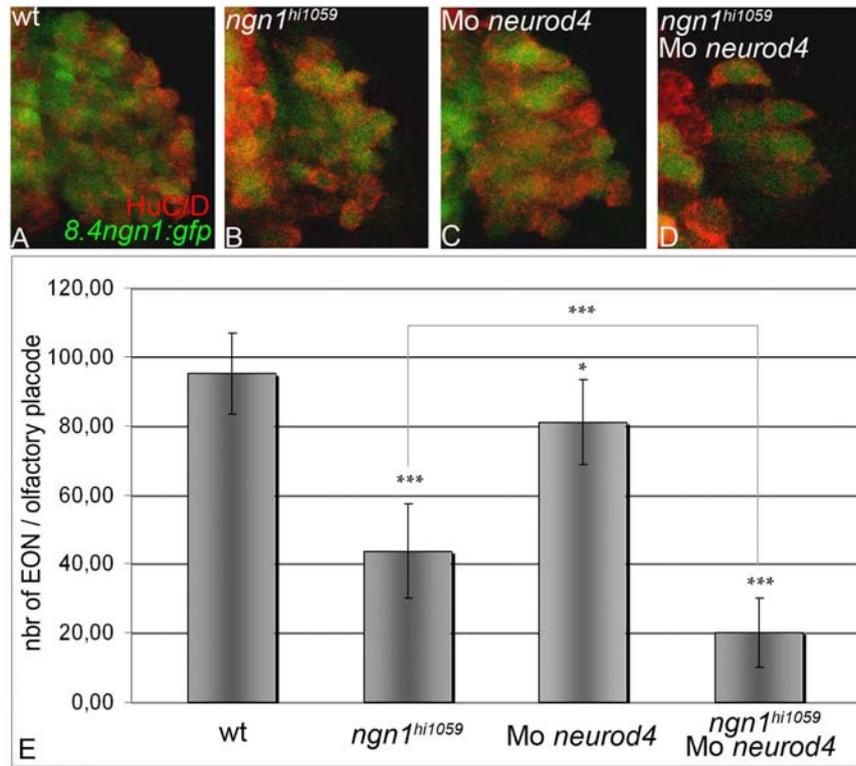
**Madelaine and Blader Fig.2**



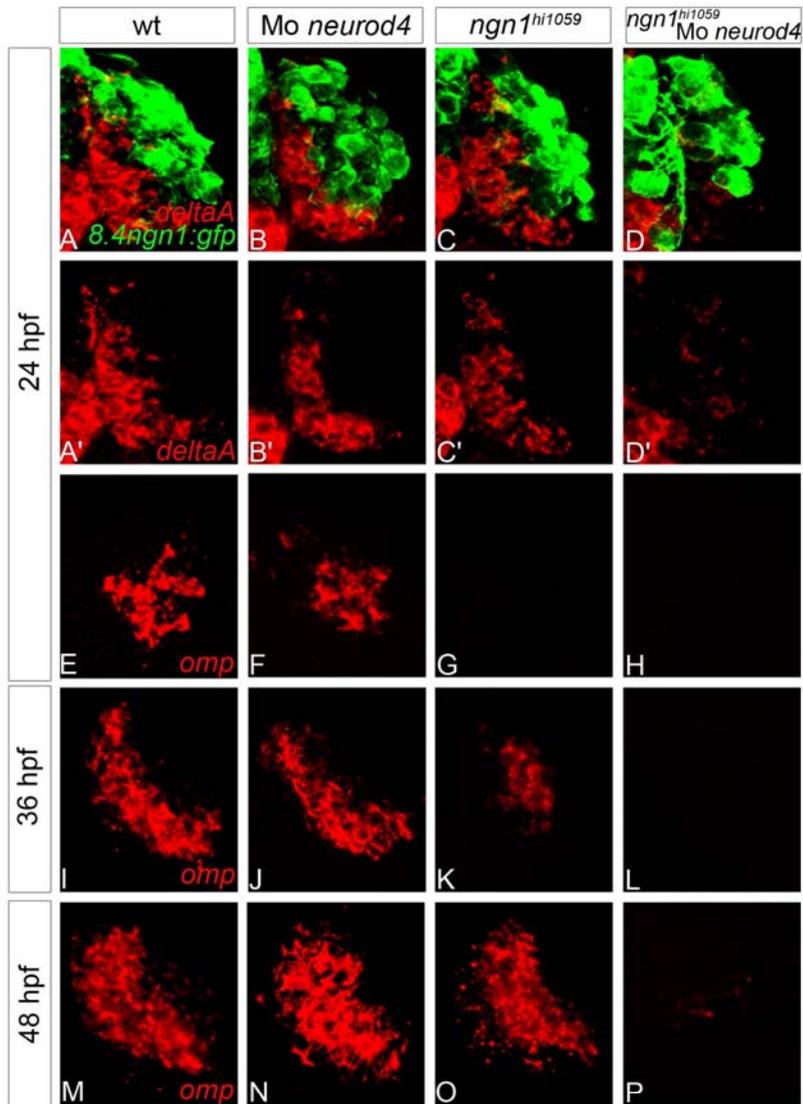
**Madelaine and Blader Fig.3**



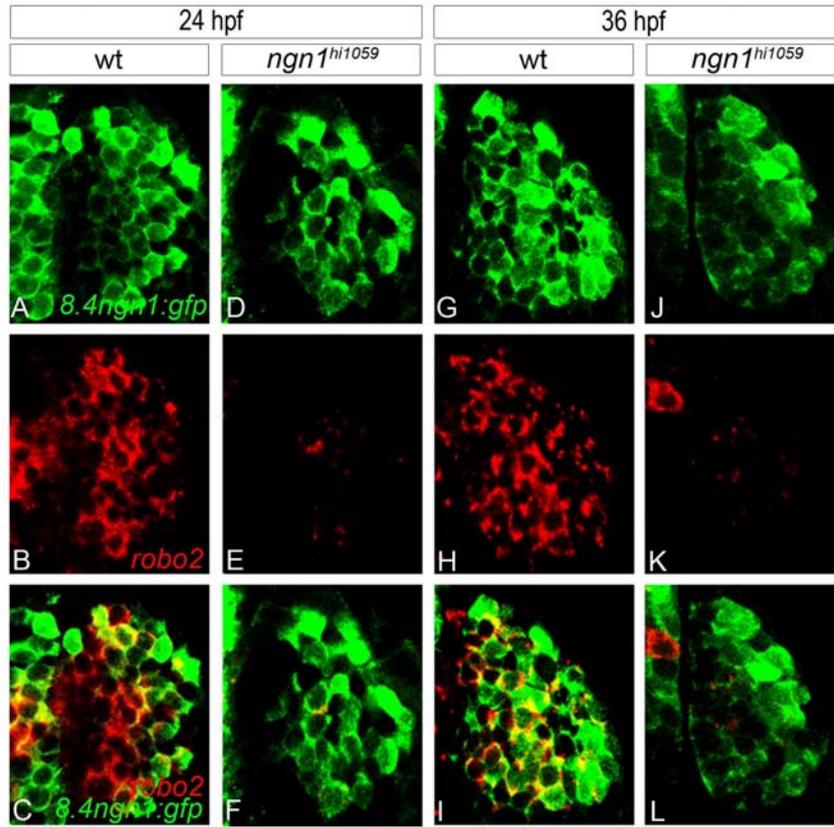
**Madelaine and Blader Fig.4**



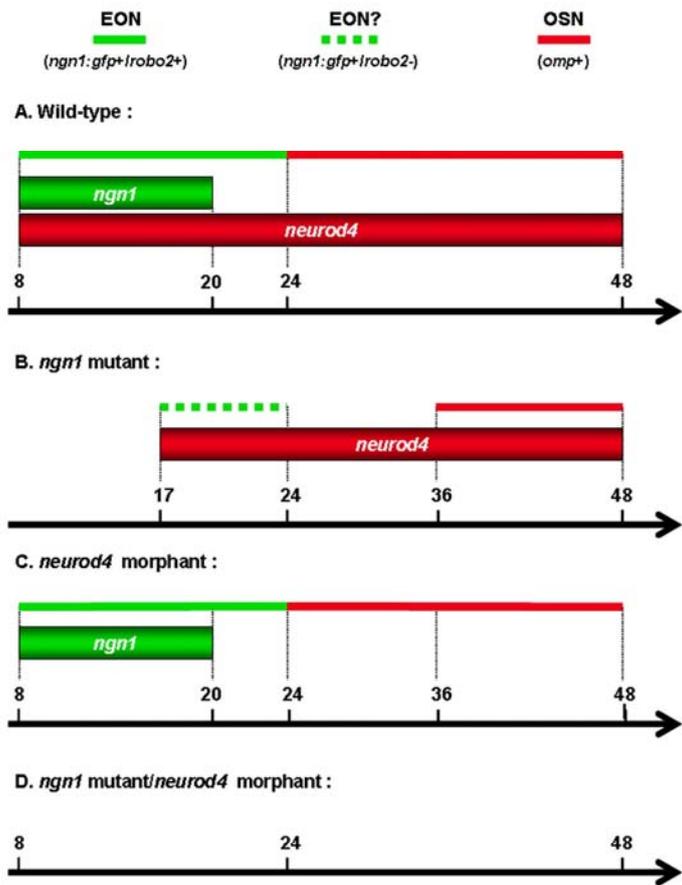
**Madelaine and Blader Fig.5**



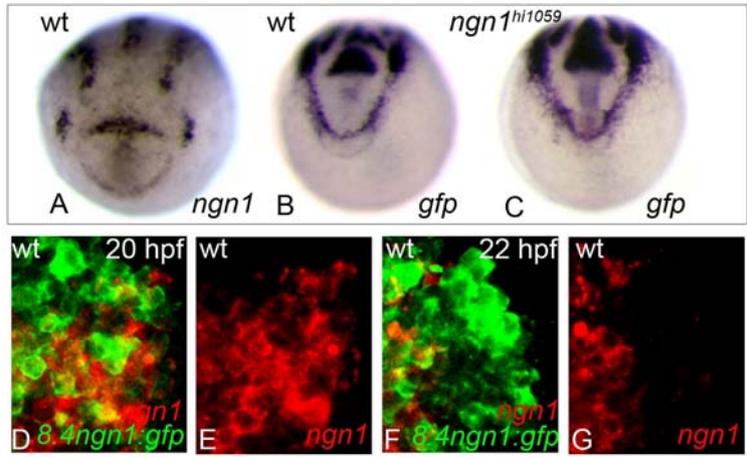
**Madelaine and Blader Fig.6**



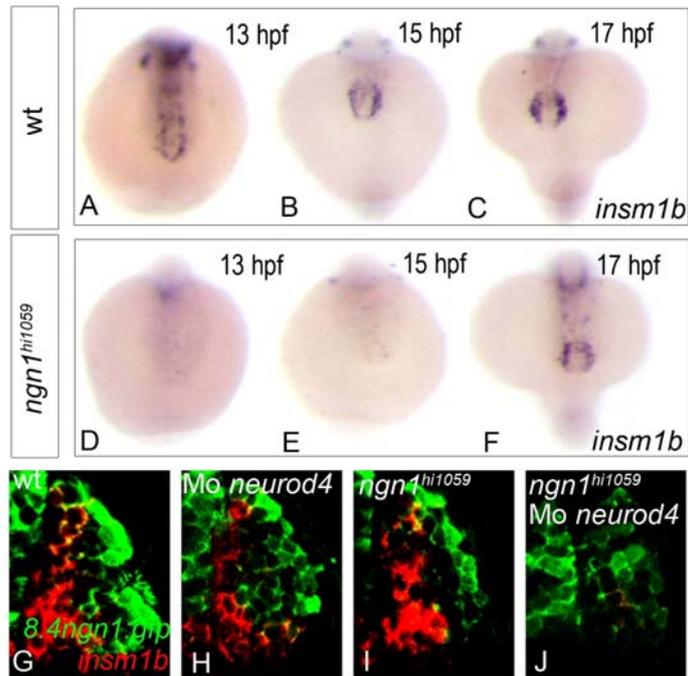
**Madelaine and Blader Fig.7**



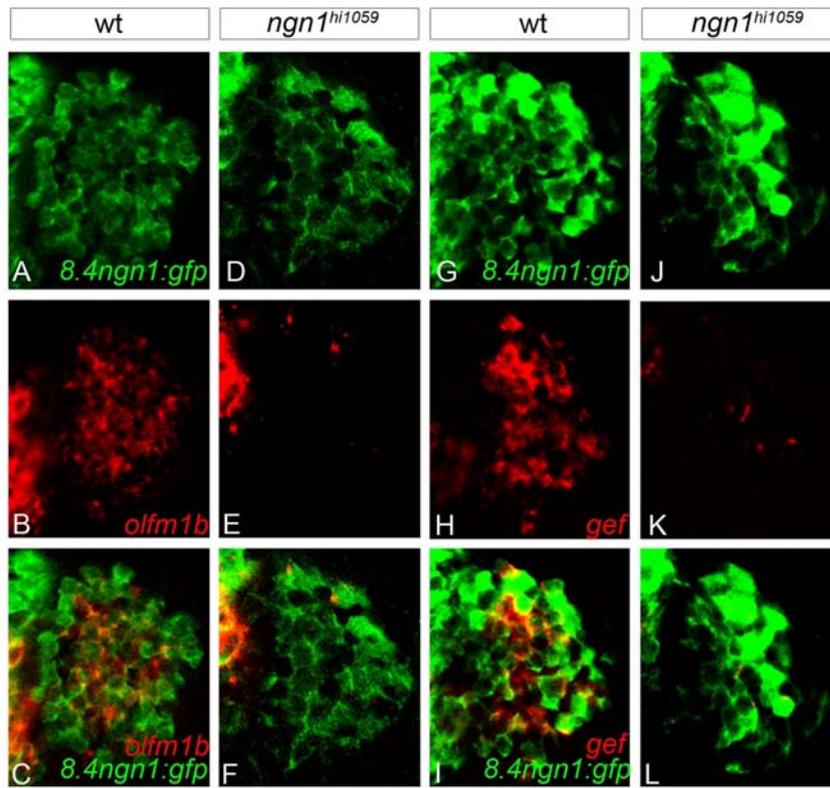
**Madelaine and Blader Fig.8**



Madelaine and Blader Fig.S1



Madelaine and Blader Fig.S2



**Madelaine and Blader Fig.S3**

## V. Neurogenin1 regulates the projection of axons of olfactory neurons via its target *cxcr4b*.

Le control de la guidance axonale est une étape critique dans l'assemblage et la formation d'un système nerveux fonctionnel. De nombreux désordres neurologiques sont associés à des défauts de projection ou fasciculation axonale comme le syndrome de Kallmann (Dode and Hardelin, 2009). Comment ce processus de comportement cellulaire est coordonné avec la différenciation neuronale est à l'heure actuelle encore mal compris. Les facteurs proneuraux qui codent pour des facteurs de transcription à domaine bHLH sont nécessaires et suffisants pour la neurogenèse (Bertrand et al., 2002). Ces facteurs sont de bons candidats pour coordonner la différenciation neuronale et la guidance axonale. Il a précédemment été mis en évidence que le facteur proneural Ngn2 était impliqué dans le contrôle de la migration des neurones corticaux chez la souris au travers de la régulation transcriptionnelle d'une petite Rho GTPase, Rnd2 (Heng et al., 2008). Il est donc possible que Ngn puisse également contrôler un comportement cellulaire complexe comme la guidance axonale.

Chez le poisson zèbre, deux facteurs proneuraux de la famille *atonal*, Ngn1 et NeuroD4 ont des activités partiellement redondantes pour la neurogenèse olfactive (cf. IV, Madelaine and Blader). Dans un mutant pour *ngn1*, le nombre de neurones olfactifs précoces est diminué de moitié alors que la formation des neurones olfactifs sensoriels est retardée de 12h. De plus, dans ce mutant, la spécification des neurones olfactifs précoces est affectée. Ils n'expriment pas certains gènes impliqués dans la croissance ou la fasciculation axonale comme *robo2*. Le mutant pour *robo2* appelé *astray* présente des défauts de fasciculation et de formation des glomérules avec le bulbe olfactif. Il apparaît donc que le développement du système olfactif peut être un bon modèle pour étudier comment un facteur proneural, comme Ngn1, peut coordonner la différenciation et spécification neuronale.

Durant le développement précoce de la placode olfactive, les progéniteurs neuraux migrent jusqu'à leur localisation finale avant de se différencier et d'étendre leur axones (Whitlock and Westerfield, 1998; Whitlock and Westerfield, 2000). Les axones de neurones précoces appelés pionniers sont responsables de la projection des neurones olfactifs sensoriels. L'ablation laser des neurones pionniers conduit à une absence de projection des neurones olfactifs vers le bulbe olfactif (Whitlock and Westerfield, 1998). De manière intéressante, les mêmes acteurs sont impliqués dans le contrôle de la migration cellulaire et de la projection axonale. Le bon développement de l'organe olfactif est contrôlé par la signalisation chemokine impliquant Cxcl12a/Cxcr4b (Miyasaka et al., 2007). Cette

signalisation est requise durant deux étapes du développement de la placode olfactive (Miyasaka et al., 2007). D'abord, son expression permet l'assemblage de la placode olfactive. Ensuite, la signalisation *Cxcl12a/Cxcr4b* est requise pour la guidance axonale des neurones olfactifs qui projettent leurs axones pour cibler le bulbe olfactif. Le mutant pour *cxcr4b* appelé *odysseus* présente des défauts de projection axonale de la placode olfactive vers le bulbe olfactif. Dans ce mutant, les axones des neurones olfactifs précoces et sensoriels restent bloqués à l'intérieur de la placode olfactive.

L'ensemble de ces données, ajouté au fait que dans le mutant *ngn1* des neurones précoces sont formés, nous a conduit à étudier la fonction de *ngn1* dans la guidance axonale des neurones olfactifs. Dans cette étude nous avons montré que l'activité de Ngn1 était requise pour la projection des neurones pionniers et olfactifs. Nous montrons également que, dans le mutant *ngn1*, ces défauts de projection axonale sont dus à une perte d'expression de *cxcr4b* dans les progéniteurs neuraux. Finalement, nos résultats montrent que Ngn1 peut réguler un processus cellulaire complexe comme la guidance axonale par la régulation spécifique de gènes cibles.

Neurogenin1 regulates the projection of axons of olfactory neurons via its target *cxcr4b*

Romain Madelaine, Laurence Garric, Caroline Halluin, Pascale Dufourcq and Patrick Blader\*

Université de Toulouse, UPS, Centre de Biologie du Développement (CBD), 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

CNRS, CBD UMR 5547, F-31062 Toulouse, France

\* Author for correspondence: [blader@cict.fr](mailto:blader@cict.fr)

tel: (0033) 5 61 55 67 34

fax: (0033) 5 61 55 65 07

Running title: Ngn1 target controls axon guidance

### Summary:

It is well established that bHLH proneural transcription factors control the expression of targets that are required for neural determination. It has also been suggested that proneural factors regulate sets of genes involved in various aspects of neural specification and cell behaviour (Chien et al., 1996; Parras et al., 2002). Indeed, the Atonal family member Neurogenin 2 (Neurog2) has recently been shown to control radial migration of newly formed cortical neurons via direct transcriptional regulation of the small GTP-binding protein Rnd2 (Heng et al., 2008). We have shown that neurogenesis in the zebrafish olfactory placode is delayed in *neurogenin 1* (*ngn1*) mutants (Madelaine and Blader, submitted). While neurogenesis partially recovers in the absence of Ngn1, we show here that residual olfactory neurons that form in the mutant fail to project correctly. We show that a known regulator of olfactory neuron projections in the zebrafish, *cxcr4b*, is a transcriptional target of Ngn1. Furthermore, reintroduction of *cxcr4b* expression in olfactory neuron progenitors in the *ngn1* mutant efficiently rescues the projection phenotype. We conclude that the projection phenotype in the *ngn1* mutant is caused by the delayed expression of *cxcr4b* in early-born olfactory neurons.

## Results and Discussion:

We have recently described the role of two zebrafish Atonal family members, *neurogenin1* (*ngn1*) and *neurod4*, during olfactory neurogenesis in the zebrafish (Madelaine and Blader, submitted). Our results indicate that these genes are redundantly required for the development of both early-born olfactory neurons and olfactory sensory neurons. Interestingly, however, the initial phase of *neurod4* expression requires Ngn1 function. Furthermore, even though *neurod4* expression recovers at later stages in *ngn1* mutant embryos and is sufficient for a reduced number of early-born neurons to develop, the expression of various markers of the specification of these neurons is never detected. The failure of the expression of these genes to recover in the mutant suggests that certain cell behaviours might be compromised in the olfactory neurons that eventually develop in the absence of Ngn1 function. One such gene, *robo2*, encodes a transmembrane receptor protein required for fasciculation of axons projecting from the olfactory placode and for the correct organisation of proto-glomerulii when they arrive at the olfactory bulb (Miyasaka et al., 2005). As predicted, the fasciculation of olfactory axons at 48 hours post-fertilisation is disrupted in the residual *ngn1*<sup>-/-</sup> olfactory neurons (hpf; Fig. 1A-C). Likewise, the organisation of proto-glomerulii appears to be disturbed at this stage in the mutant (Fig. 1D-I). The expression of a two other genes implicated in various aspects of neural specification and cell behaviour, *olfactomedin 1b* (*olfm1b*) and *gefiltin* (*gef*), also fails to recover in early-born olfactory neurons in the *ngn1* mutant suggesting that the fasciculation/glomerulii phenotype displayed by the projection of olfactory neurons might be multi-factorial (Madelaine and Blader, submitted; data not shown).

Intriguingly, unlike embryos mutant for *robo2*, where the axons of olfactory neurons project but fasciculate poorly, despite early-born olfactory neurons being present in *ngn1* mutants they display defects in their ability to project to the olfactory bulb (Fig. 2). In wild type embryos, the earliest projections to leave the olfactory placode occur at 24 hpf and correspond to the axons of a group of *zns-2*<sup>+</sup> unipolar neurons (Whitlock and Westerfield, 1998). The ablation of these neurons leads to severe misrouting of olfactory sensory neurons; as such, these neurons are referred to as pioneer neurons (Whitlock and Westerfield, 1998). At 24 hpf, no *zns-2*<sup>+</sup> projections can be detected in *ngn1* mutants (Fig. 2A-D, I). While there is some recovery of the phenotype at 48 hpf, nonetheless nearly half of the olfactory placodes

in *ngn1* mutants fail to project *zns-2+* axons (Fig. 2E-H, I). Furthermore, mature *Tg(omp:yfp)+* olfactory sensory neurons also fail to project correctly (Fig. 2J-O). This phenotype suggests that factors controlling the projection or guidance of the axons of pioneer neurons might be absent in the *ngn1* mutant; when early born *zns-2+* neurons show defective projections, olfactory sensory neurons (GFP) systematically display projection defects and vice versa. While no projections leave *ngn1* mutant olfactory placodes at 24 hpf, *zns-2+* pioneer axons can be detected within mutant placodes where they appear to accumulate near the boundary between the placode and the adjacent telencephalon (Fig. 2I). This phenotype is strikingly similar to that reported for mutants in the chemokine receptor *cxcr4b*, known as *odysseus* (*ody*) ((Miyasaka et al., 2007) and data not shown). Thus, one simple explanation for the phenotype of olfactory projections in *ngn1* mutants would be that, like *robo2*, *cxcr4b* expression is affected in the absence of Ngn1 function. With this in mind, we analysed the expression of *cxcr4b* in the developing olfactory system in wild type and *ngn1* mutant embryos.

The expression pattern of *cxcr4b* globally resembles that of *ngn1* (Blader et al., 1997; Chong et al., 2001; Korzh et al., 1998; Miyasaka et al., 2007). In the olfactory system, *cxcr4b* expression is detected in cells at the boundary of the anterior neural plate starting at 11 hpf (Fig. 3A). Expression continues in the mixed telencephalo-olfactory lineage until 17 hpf (Fig. 3B-D). From 19 hpf, when the segregation of the telencephalic and olfactory lineages is first detected, robust *cxcr4b* expression can be detected in both territories (Fig. 3E-G). At 24 hpf, however, *cxcr4b* expression is confined to neural progenitors and/or recently born olfactory sensory neurons (Madelaine and Blader, submitted; Fig. 3G). On the contrary, the expression of *cxcr4b* is completely absent in *ngn1* mutant embryos up to 17 hpf (Fig. 3H-K); after this stage *cxcr4b* expression is virtually identical to that in stage matched wild type siblings (Fig. 3L-N). The absence of *cxcr4b* expression in the *ngn1* mutant is coherent with the projection phenotype of olfactory neurons displayed by the *ngn1* mutant.

Cxcr4 has been predicted to be a target of Ngn2 in the mouse cortex based on microarray data from gain and loss-of-function studies (Gohlke et al., 2008). The similarities between the patterns of expression of *ngn1* and *cxcr4b* in the zebrafish, and the loss of the expression of *cxcr4b* in *ngn1* mutant embryos suggest that *cxcr4b* is also a transcriptional target of Ngn1 in zebrafish. To test this possibility further, we

ectopically expressed Ngn1 in stable transgenic lines carrying the *ngn1* coding region under the control of the *hsp70* promoter and assayed the effect on the expression of *cxcr4b*; transgenic embryos rapidly and ubiquitously express *ngn1* transcripts shortly after heat-shock and previously described targets of Ngn1 are rapidly and uniformly mis-expressed under these conditions ((Madelaine and Blader, 2010) and data not shown). As expected for an Ngn1 target, heat-shock for 1 hour at 7 hpf induces the ubiquitous expression of *cxcr4b* (Fig. 4A,B); induction of an equivalent transgene coding for the zebrafish *achaete-scute* homologue *Ascl1a* has no effect on *cxcr4b* expression under similar conditions (Fig. 4C). In addition, *cxcr4b* expression can be induced in as little as 15 minutes after 15 minutes of heat-shock (Fig. 4D). Finally, transient, mosaic expression of a tagged, *hsp70*-driven Ngn1 transgene shows that the induction of *cxcr4b* is both rapid and cell autonomous (Fig. 4E). Taken together, our data strongly suggest that *cxcr4b* is a direct and specific transcriptional target of Ngn1.

In *ngn1* mutants, *cxcr4b* expression recovers at 17 hpf, coincidentally with the recovery of *neurod4* expression and the delayed cell cycle exit of early born neurons (Madelaine and Blader, submitted). Nonetheless, early-born neurons that develop in *ngn1* mutant placodes fail to project at 24 hpf (Fig. 2I). The failure of these residual neurons to project out of mutant olfactory placodes at this stage might reflect that the recovery of *cxcr4b* expression occurs too late; as about half of *ngn1*<sup>-/-</sup> placodes project at 48 hpf apparently this delay can be partially overcome (Fig. 2I). Alternatively, the projection phenotype of *ngn1* mutant embryos might reflect that other aspects of the development of pioneer neurons or the targets of their projections are affected in the *ngn1* mutant. To discriminate between these two possibilities, we asked whether reintroduction of *cxcr4b* expression in the developing olfactory system before 17 hpf could rescue the projection defect of *ngn1* mutant neurons. Over-expression of *cxcr4b* at high levels can have a dominant negative effect on the activity of Cxcr4/Cxcl12 signalling in certain cellular contexts, ruling out using the *hsp70-4* promoter to reintroduce *cxcr4* expression (H. Knaut, personal communication). Thus, we chose to use previously described regulatory elements of the *ngn1* gene to drive *cxcr4b* expression in these experiments (Blader et al., 2003); expression driven by these elements does not appear to be regulated by *ngn1* itself and, thus, can be used drive the expression of *cxcr4b* in the mutant context (Madelaine and Blader, submitted). Finally, as at 24 hpf wild type projections are

somewhat diffuse we chose to assess the rescue of the projection phenotype at 48 hpf. About a third of placodes in *ody* mutants fail to project at this stage (Fig. 5; (Miyasaka et al., 2007)). Mosaic expression of wild type *cxcr4b* driven by *ngn1* regulatory element appreciably increases the projections in *ody* embryos suggesting that our reintroduction strategy functions (Fig. 5). Strikingly, while expression of wild type *cxcr4b* in the *ngn1* mutant background significantly rescues the olfactory projection phenotype, rescue cannot be achieved if *cxcr4b* transcripts carrying the *ody* mutation are reintroduced (Fig. 5; (Knaut et al., 2003)).

Altogether, our results indicate *cxcr4b* is an Ngn1 target gene and that the projection phenotype in the *ngn1* mutant is caused by the delayed expression of *cxcr4b* in early-born olfactory neurons.

Experimental Procedures:

### **Fish lines and developmental conditions**

Embryos were raised and staged according to standard protocols (Kimmel et al., 1995). Embryos homozygous for *ngn1*<sup>hi1059</sup> (Golling et al., 2002) or *odysseus* (*ody*; (Knaut et al., 2003)) mutations were obtained by intercrossing heterozygous carriers; adults heterozygous for the *ngn1*<sup>hi1059</sup> allele were identified by PCR genotyping of tail-clip genomic DNA. The transgenic lines *Tg(8.4ngn1:gfp)* and *Tg(omp:gap-yfp)* were used to visualize early born olfactory neurons (Blader et al., 2003) or olfactory sensory neurons (Miyasaka et al., 2005; Sato et al., 2005), respectively. *Tg(hs:ngn1)* (Madelaine and Blader, 2010) or *Tg(hs:ascl1a)* allow ubiquitous misexpression of Ngn1 or Ascl1a after heat-shocks at 38.5°C. Embryos were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde/1xPBS, after which they were dehydrated through an ethanol series and stored at -20°C until use.

### **In situ hybridization and Immunostaining**

*In situ* hybridizations were performed as previously described (Oxtoby and Jowett, 1993). Antisense DIG labelled probes for *cxcr4b* (Knaut et al., 2003) were generated using standard procedures. *In situ*s were revealed using either BCIP and NBT (Roche) or Fast Red (Roche) as substrate. Immunohistochemical stainings were performed as previously described (Masai et al., 1997), using either anti-GFP (1/1000 Torrey Pines Biolabs), anti-Myc (1/10, "9E10") (Evan et al., 1985), or zns-2 (1/250) (Trevarrow et al., 1990) as primary antibodies and Alexa 488 or Alexa 555-conjugated goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (1/1000) as secondary antibodies (Molecular Probes).

### **Plasmid construction**

For the *Tg(hs:ascl1a)* transgene: In a first step, the previously reported zebrafish *hsp70* promoter (Halloran et al., 2000) was amplified by PCR and used to replace the CMV enhancer promoter of pCS2:CFP (a gift from Dr. U. Strähle). Subsequently, a fragment containing the *ascl1a* open reading frame was used to replace the coding region of CFP. The resulting *hs:ascl1a* cassette was then transferred into *pI-Scel*, which has been described to enhance the frequency of

stable transgenesis and minimise the mosaicism in transient transgenesis (Thermes et al., 2002). To establish stable transgenic lines, *pI-SceI-hs:ascl1a*, plasmids were injected into 1-cell stage embryos with I-SceI meganuclease to maximize the number of integration events (0.5 x I-SceI Buffer, 10% I-SceI enzyme). Stable transmission of the *Tg(hs:ascl1a)* transgene was detected by PCR genotyping using genomic DNA extracting from at least 50 F1 embryos. In subsequent generations, PCR genotyping of adult carriers was performed on tail-clip genomic DNA.

The *Tg(8.4ngn1-cxcr4b-IRES-egfpCAAXpA)* or *Tg(8.4ngn1-ody-IRES-egfpCAAXpA)* transgenes were generated using the Tol2kit (Kwan et al., 2007). First, the 8.4 kb *ngn1* promoter (Blader et al., 2003) was inserted in the p5E 5' entry vector and the coding sequences of *cxcr4b* or *ody* (Knaut et al., 2003) were PCR amplified and inserted in the pME middle entry vector. The appropriate 5' and middle entry constructs were subsequently mixed with the *IRES-egfp-CAAXpA* and recombined into the Tol2 transposon destination vector as previously described (Kwan et al., 2007).

### **Plasmid and antisense morpholino injection**

For transient expression of Myc-Ngn1 (Madelaine and Blader, 2010), *pI-SceI-hs:myc-ngn1* was injected with I-SceI meganuclease (0.5 x I-SceI Buffer, 10% I-SceI enzyme) into 1-cell stage embryos. For transient expression of wild type and mutated *Cxcr4b*, the appropriate Tol2 based construct was co-injected with synthetic mRNA encoding the Tol2 transposase (25ng/ul) into 1-cell stage embryos from crosses between identified heterozygote carriers of the *ngn1<sup>hi1059</sup>* mutation.

**Acknowledgements:**

We are grateful to XXX, YYY, ZZZ and members of the Blader lab for critical reading of the manuscript. We thank H. Knaut, Y. Yoshihara, and C-B. Chien for the gift of reagents. We would also like to thank the Toulouse RIO Imaging platform. The CNRS, INSERM, Université Paul Sabatier, FRM, FRC, ARC and the Ministère de la Recherche provided financial support. R.M. was financed by the Ministère de la Recherche and ARC.

## References:

- Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemot, F. and Strahle, U.** (1997). The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development* **124**, 4557-69.
- Blader, P., Plessy, C. and Strahle, U.** (2003). Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mech Dev* **120**, 211-8.
- Chien, C. T., Hsiao, C. D., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). Neuronal type information encoded in the basic-helix-loop-helix domain of proneural genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13239-44.
- Chong, S. W., Emelyanov, A., Gong, Z. and Korzh, V.** (2001). Expression pattern of two zebrafish genes, *cxcr4a* and *cxcr4b*. *Mech Dev* **109**, 347-54.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, J. M.** (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**, 3610-6.
- Gohlke, J. M., Armant, O., Parham, F. M., Smith, M. V., Zimmer, C., Castro, D. S., Nguyen, L., Parker, J. S., Gradwohl, G., Portier, C. J. et al.** (2008). Characterization of the proneural gene regulatory network during mouse telencephalon development. *BMC Biol* **6**, 15.
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S. et al.** (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet* **31**, 135-40.
- Halloran, M. C., Sato-Maeda, M., Warren, J. T., Su, F., Lele, Z., Krone, P. H., Kuwada, J. Y. and Shoji, W.** (2000). Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development* **127**, 1953-60.
- Heng, J. I., Nguyen, L., Castro, D. S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J. M., Hevner, R. et al.** (2008). Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of *Rnd2*. *Nature* **455**, 114-8.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310.
- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R. and Nusslein-Volhard, C.** (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor *Cxcr4* is a germ-cell guidance receptor. *Nature* **421**, 279-82.
- Korzh, V., Sleptsova, I., Liao, J., He, J. and Gong, Z.** (1998). Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nrd* defines distinct stages of neural differentiation. *Dev Dyn* **213**, 92-104.
- Kwan, K. M., Fujimoto, E., Grabher, C., Mangum, B. D., Hardy, M. E., Campbell, D. S., Parant, J. M., Yost, H. J., Kanki, J. P. and Chien, C. B.** (2007). The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev Dyn* **236**, 3088-99.
- Madelaine, R. and Blader, P.** (2010). A cluster of non-redundant *Ngn1* binding sites is required for regulation of *deltaA* expression in zebrafish. *Dev Biol*.
- Masai, I., Heisenberg, C. P., Barth, K. A., Macdonald, R., Adamek, S. and Wilson, S. W.** (1997). *floating head* and *masterblind* regulate neuronal patterning in the roof of the forebrain. *Neuron* **18**, 43-57.
- Miyasaka, N., Knaut, H. and Yoshihara, Y.** (2007). *Cxcl12/Cxcr4* chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system. *Development* **134**, 2459-68.
- Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S. Y., Hutson, L. D., Chien, C. B., Okamoto, H. and Yoshihara, Y.** (2005). *Robo2* is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development* **132**, 1283-93.

- Oxtoby, E. and Jowett, T.** (1993). Cloning of the zebrafish krox-20 gene (krx-20) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res* **21**, 1087-95.
- Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J. and Guillemot, F.** (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* **16**, 324-38.
- Sato, Y., Miyasaka, N. and Yoshihara, Y.** (2005). Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish. *J Neurosci* **25**, 4889-97.
- Thermes, V., Grabher, C., Ristoratore, F., Bourrat, F., Choulika, A., Wittbrodt, J. and Joly, J. S.** (2002). I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech Dev* **118**, 91-8.
- Trevarrow, B., Marks, D. L. and Kimmel, C. B.** (1990). Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron* **4**, 669-79.
- Whitlock, K. E. and Westerfield, M.** (1998). A transient population of neurons pioneers the olfactory pathway in the zebrafish. *J Neurosci* **18**, 8919-27.

Figure Legends:

**Figure 1: Residual olfactory neurons in *ngn1* mutant display fasciculation defects and in the organisation of proto-glomerulii in the olfactory bulb.**

(A-C) Single confocal sections of immunolabelled olfactory placodes showing GFP driven from *Tg(omp:yfp)* transgene in axonal projection at 48 hpf in wild type (A) or *ngn1* mutant (B,C) embryos.

(D-I) Confocal projections of wild type (D-F) or *ngn1* mutant (G-I) olfactory placodes at 48 hpf double immunolabelled for *zns-2* and YFP driven from the *Tg(omp:yfp)* transgene.

In *ngn1* mutants, axonal projections show fasciculation defects (arrowheads in B-C).

Glomeruli formation (arrowheads in G-I) are defective in *ngn1* mutant.

Placodes and projections are seen dorsally and oriented with anterior up.

**Figure 2: Residual olfactory neurons in *ngn1* mutant display defects in their projections to the olfactory bulb.**

(A-H) Confocal projections of wild type (A,B,E,F) or *ngn1* mutant (C,D,G,H) olfactory placodes and axonal projections at 24 hpf (A-D) or 48 hpf (E-H) double immunolabelled for *zns-2* and GFP driven from the *Tg(8.4ngn1:gfp)* transgene.

In *ngn1* mutants, axonal projections show projection defects and stay in olfactory placode (arrowheads in D, H, M).

(I) Histogram shows percentage of olfactory axonal projection that project correctly to the telencephalon at 24 hpf or 48 hpf in wild type or *ngn1* mutant embryos.

(J-O) Confocal projections of wild type (J-L) or *ngn1* mutant (M-O) olfactory placodes and axonal projection at 48 hpf double immunolabelled for *zns-2* and YFP driven from the *Tg(omp:yfp)* transgene. When early born *zns-2+* neurons show defective projections, *Tg(omp:yfp)+* olfactory sensory neurons (GFP) systematically display projection defects.

Placodes and projections are seen dorsally and oriented with anterior up.

\*P<0.05; \*\*P<0.001; \*\*\*P<0.0005 using a *ki2* test.

**Figure 3: The expression of *cxcr4b* in olfactory neurons is absent from *ngn1* mutant embryos during early developmental stages.**

(A-D and H-K) Whole-mount in situ hybridization against *cxcr4b* in wild type (A-D) and *ngn1* mutant (H-K) embryos at 11 hpf (A, H), 13 hpf (B, I), 15 hpf (C, J) and 17

hpf (D, K). While *cxcr4b* expression is absent in mutant embryos up to 15 hpf; expression recovers to wild type levels at 17 hpf. Embryos are viewed dorsally with anterior down and arrowhead indicated the mixed telencephalo-olfactory expression domain.

(E-G and L-N) Single confocal sections of double in situ/immunolabellings against *cxcr4b* and GFP (E, F, G, L, M, N) driven from the *Tg(8.4ngn1:gfp)* transgene in the olfactory placode of wild type (E-G) or *ngn1* mutant (L-N) embryos at 19 hpf (E, L), 22 hpf (F, M) and 24 hpf (G, N). While the expression pattern of *cxcr4b* is virtually indistinguishable between mutant and wild type siblings, *cxcr4b*<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> cells are more evident in the olfactory placode of *ngn1* mutant than wild type sibs at 22 hpf (arrowhead in M). At 24 hpf, *cxcr4b* is restricted to cells of the olfactory placode immediately adjacent to the telencephalon and excluded from *Tg(8.4ngn1:gfp)*-positive early-born olfactory neurons. A dotted white line indicates the boundary between the telencephalon and the olfactory placode.

Embryos are displayed dorsally with anterior down (A-D and H-K) or up (E-G and L-N).

**Figure 4: *cxcr4b* behaves like a direct transcriptional target of Ngn1.**

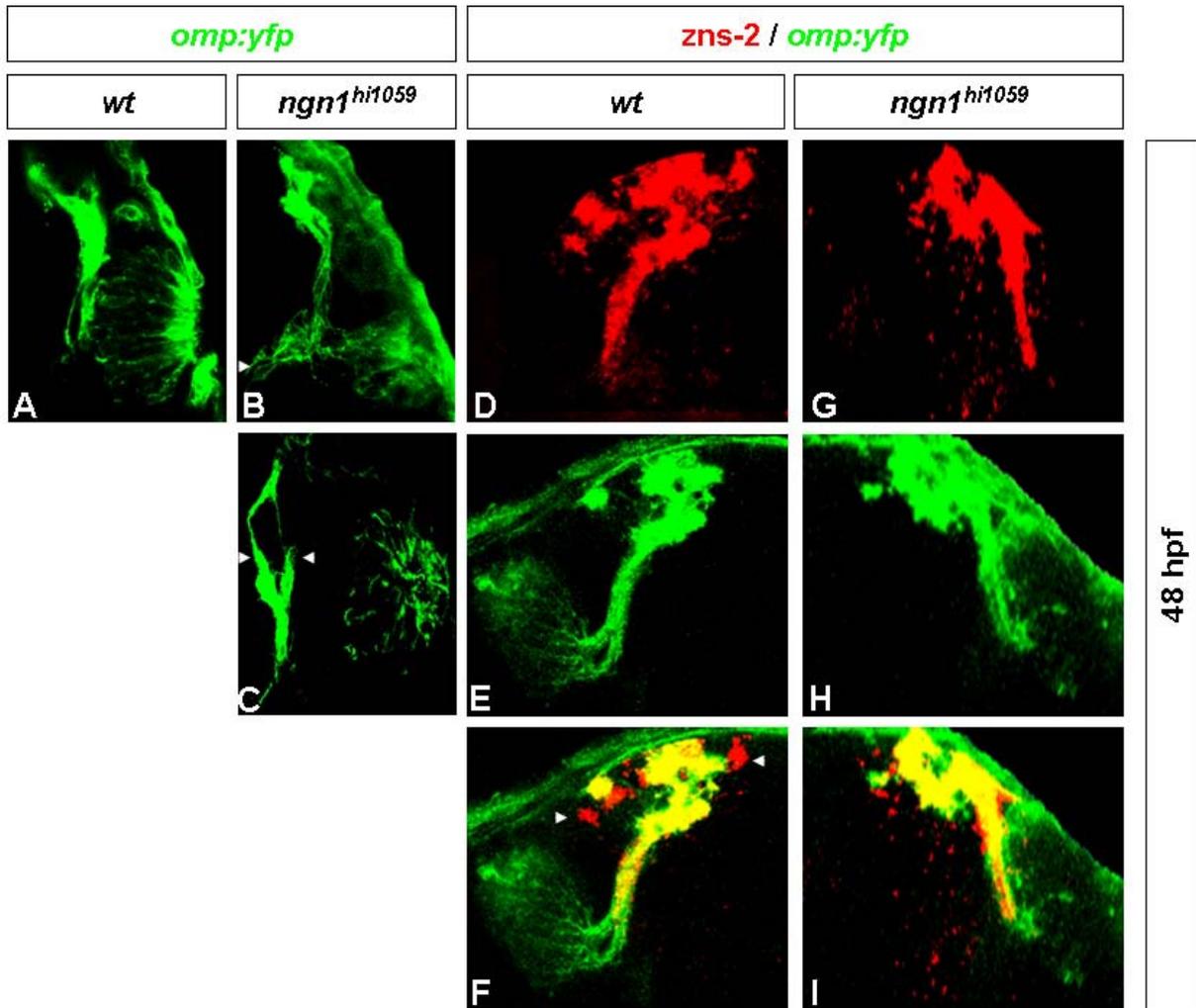
Whole-mount *in situ* hybridization against *cxcr4b* at 10hpf in wild type embryos (A), *Tg(hs:ngn1)* embryos heat-shocked at 7hpf and analysed at 10 hpf (B) and *Tg(hs:ascl1a)* embryos heat-shocked at 7hpf and analysed at 10 hpf (C). Whereas, embryos mis-expressing Ngn1 display ubiquitous expression of *cxcr4b* two hours after heat-shock, mis-expressing Ascl1a has no effect on *cxcr4b* expression under the same conditions. *Tg(hs:ngn1)* embryos heat-shocked at 9.5 hpf and analysed at 10 hpf (D). Mis-expression of Ngn1 induces *cxcr4b* expression in as little as 30 minutes. Confocal sections of the neural plate at 10 hpf show that mosaic mis-expression of a Myc-tagged form of Ngn1 (in green) induces *cxcr4b* (in red) in a cell autonomous manner (E).

Embryos are viewed dorsally with anterior up.

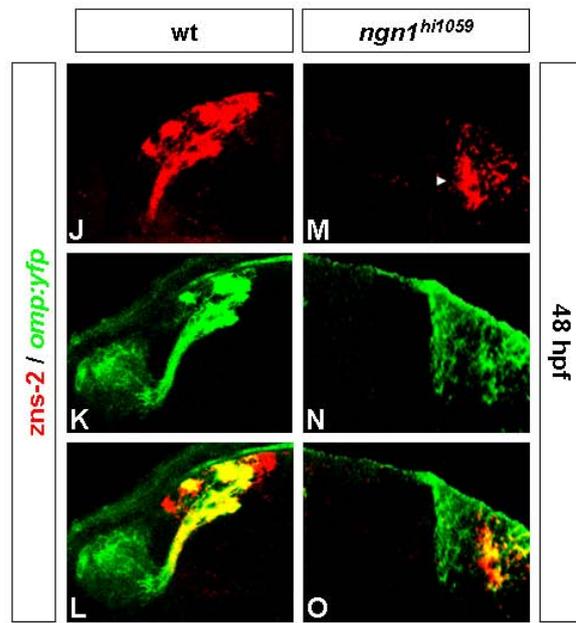
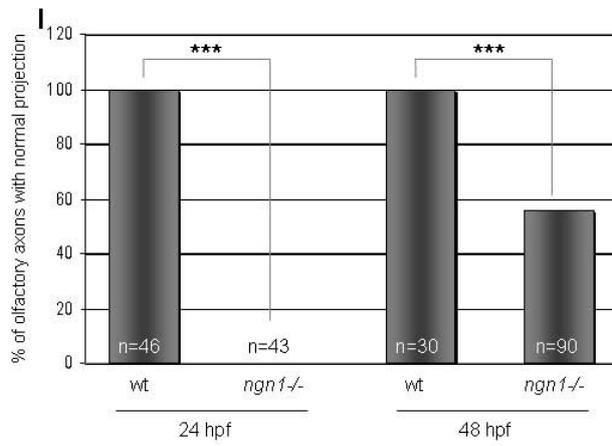
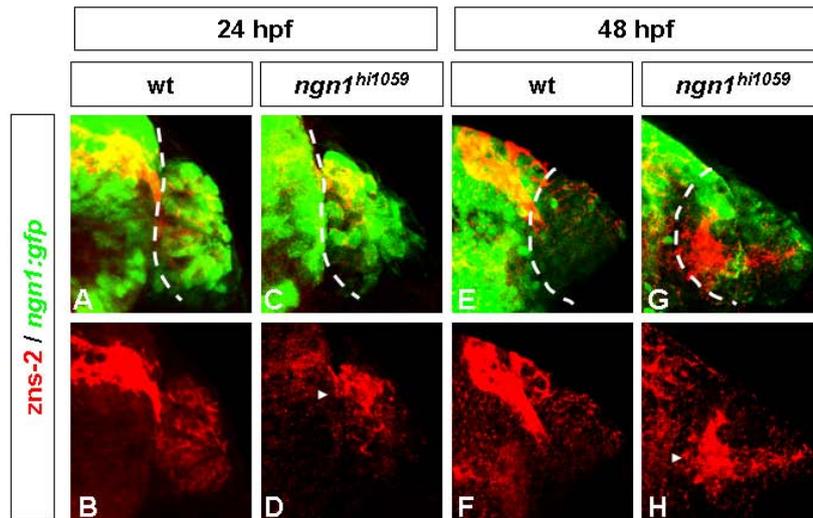
**Figure 5: Reintroduction of *cxcr4b* expression efficiently rescues the projection phenotype of olfactory neurons in the *ngn1* mutant.**

(A) Histogram shows percentage of olfactory placodes that project correctly to the telencephalon at 48 hpf in wild type, *odysseus* (*ody*) mutant and *ngn1* mutant

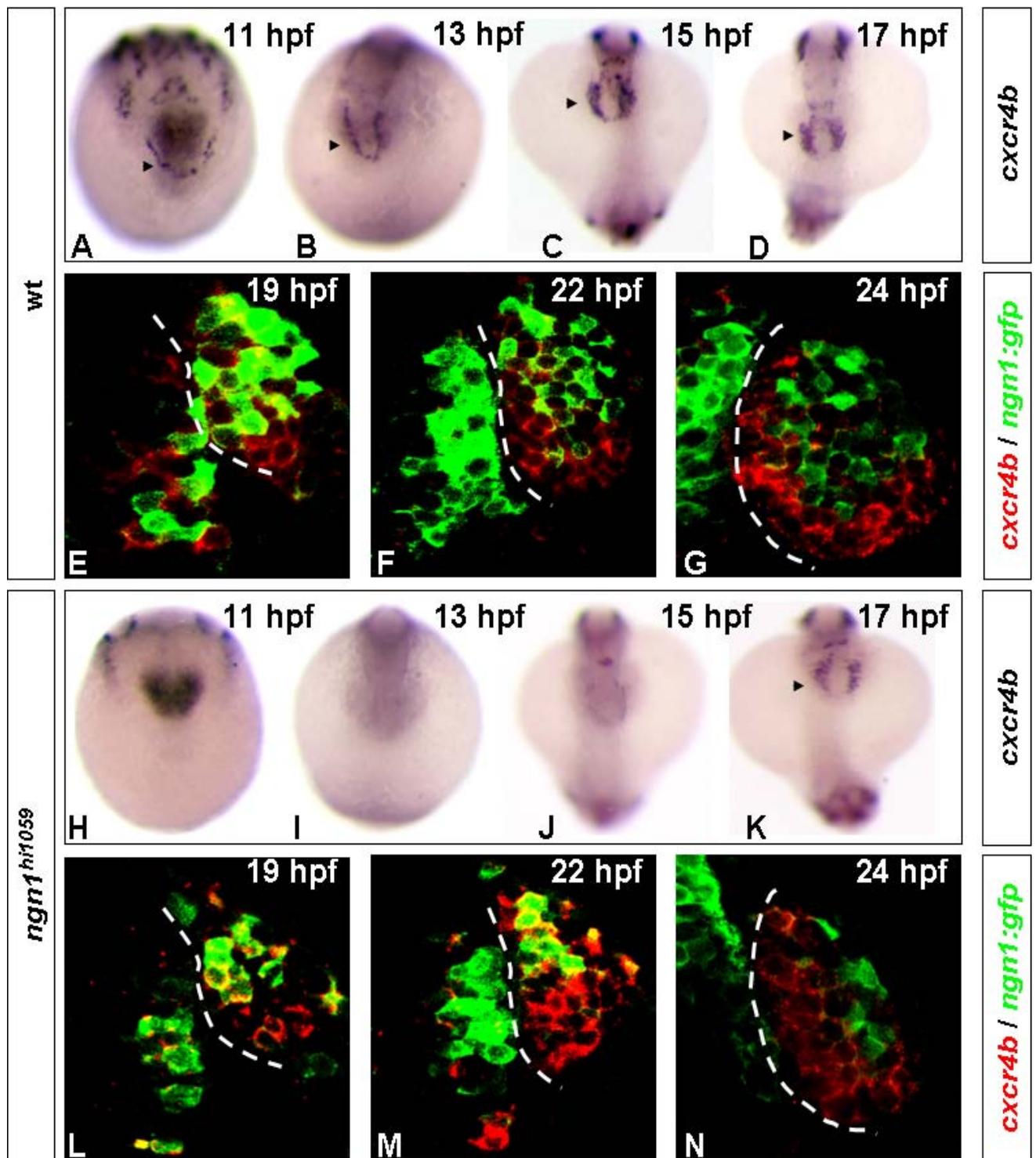
embryos injected with *cxcr4b* or *ody* under the control of *ngn1* regulatory elements. Whereas wild type *cxcr4b* efficiently and significantly rescues the projection phenotype of olfactory projection in the *ngn1* mutant, reintroducing *ody* has no effect. \*P<0.05; \*\*P<0.001; \*\*\*P<0.0005 using a *ki2* test.



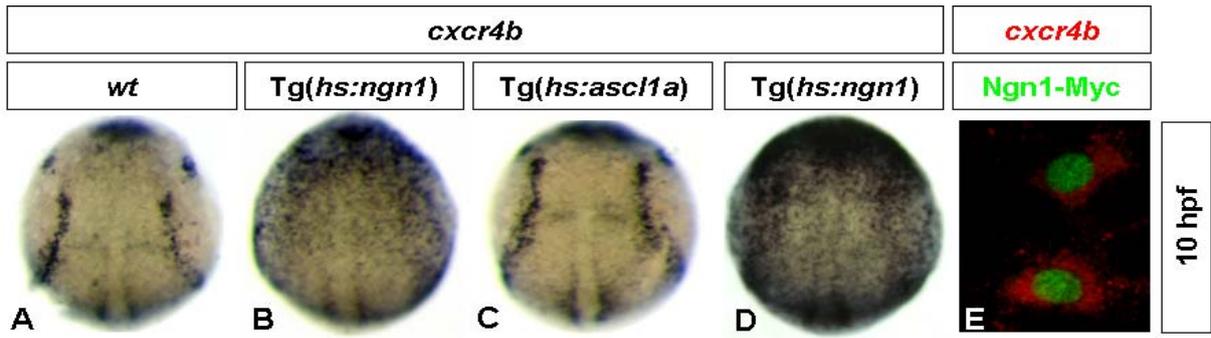
Madelaine et al, Fig.1



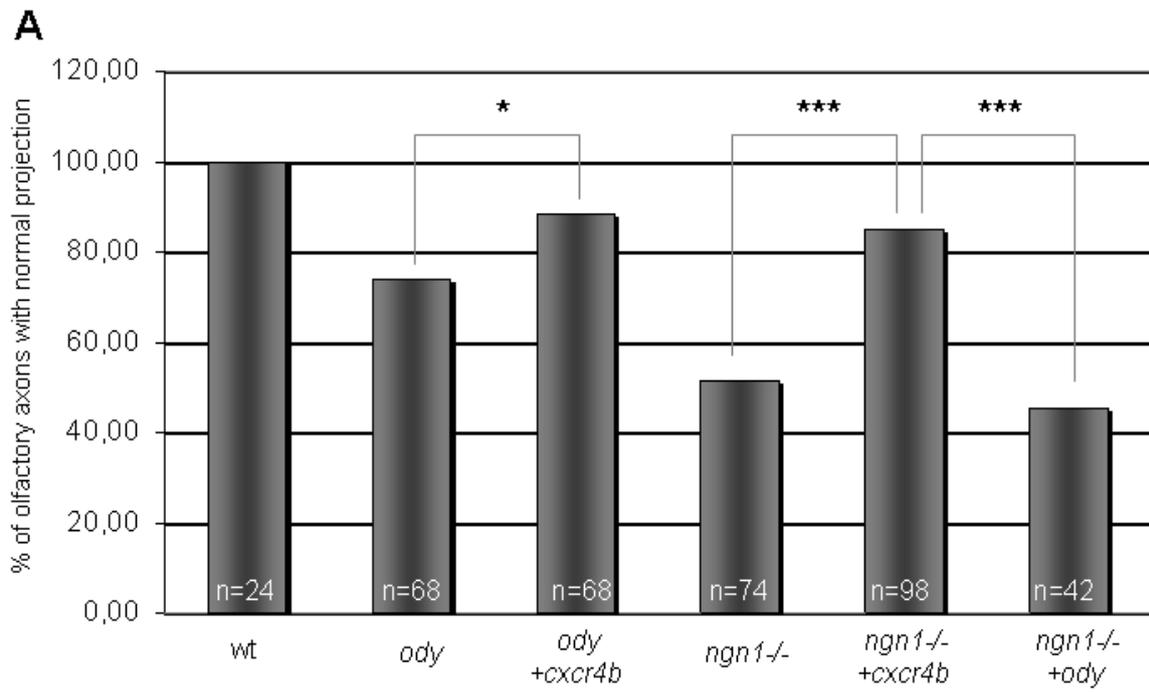
Madelaine et al, Fig.2



Madelaine et al, Fig.3



Madelaine et al, Fig.4



**Madelaine et al, Fig.5**

## Discussion générale

### **I. Ngn1 régule l'expression d'un réseau de gènes impliqués dans le contrôle de la détermination neurale.**

La détermination neurale est très importante pour le bon développement du système nerveux central chez les vertébrés. Il permet à la neurogenèse de se dérouler au bon moment et au bon endroit et de contrôler qu'un nombre correct de neurones soient formés. Les différentes étapes de la détermination neurale qui mettent en jeu la voie Delta/Notch ont été particulièrement bien décrites chez la drosophile et sont conservées chez les vertébrés, bien que la régulation de la différenciation neuronale soit plus complexe (Bertrand et al., 2002). En effet contrairement aux clusters proneuraux de drosophile, la neurogenèse chez les vertébrés s'effectue à partir d'un neuroépithélium qui est composé d'un nombre plus important de progéniteurs neuraux. Dans ce cas, au lieu de contrôler l'identité neurone/épiderme, la voie Notch a pour fonction de contrôler le nombre de neurones qui se différencient à un moment donné afin de ne pas dépleter prématurément le stock de progéniteurs neuraux. De nombreux acteurs impliqués dans ce contrôle de la balance entre prolifération et différenciation ont été étudiés chez les vertébrés. La majorité d'entre eux ont pour fonction de réguler l'activité de la voie Notch et/ou l'expression des facteurs proneuraux.

#### **1. Les oscillations entre Ngn et Her sont régulées par un double rétrocontrôle négatif autonome et non autonome cellulaire.**

L'observation de l'existence d'oscillations en phases opposées entre Ngn2 et Hes1 a permis de mettre en évidence qu'un fort niveau d'expression de Ngn2 n'était pas suffisant pour permettre la différenciation neuronale. En revanche le maintien d'un haut niveau d'expression de Hes1 est suffisant pour l'inhiber (Kageyama et al., 2008b; Shimojo et al., 2008). Les niveaux d'expression de Hes1 et Ngn2 sont différents dans chaque progéniteur à un temps T. De plus, les oscillations de Ngn2 et Hes1 ne sont pas toujours en parfaite opposition de phase. C'est pourquoi, la différence relative entre les niveaux de Hes1 et de Ngn2 est différente dans chaque progéniteur en fonction des phases d'oscillation de chaque facteur à un temps T. Dans ce cas, seul le progéniteur ayant des oscillations de Hes1 et Ngn2

en parfaite opposition, c'est-à-dire le niveau de Ngn2 le plus haut et le niveau de Hes1 la plus bas pourra se différencier.

Nos résultats ont confirmé qu'un haut niveau d'expression de Ngn1 n'était pas suffisant pour induire la différenciation neuronale mais aussi que l'induction de *her4* par Ngn1 pouvait être responsable de l'inhibition de la différenciation. De manière intéressante, nous avons montré que Ngn1 peut activer l'expression de *her4* de manière autonome cellulaire. Ce résultat est soutenu par des expériences réalisées chez le poisson zèbre où une perte d'activité de la voie Notch (morpholino contre Su(H)) n'induit pas une réduction totale de l'expression de *her4* dans la plaque neurale. En revanche, la perte de fonction des gènes de la famille *ato* entraîne une très forte diminution de l'expression de *her4* (Yeo et al., 2007). Ce résultat suggère également qu'une partie de l'activation de *her4* par les facteurs proneuraux est indépendante de Notch. L'ensemble de ces données met donc en évidence que la régulation positive de Ngn1 sur *her4* induit deux boucles de rétrocontrôles négatifs sur l'expression de *ngn1*. Quantitativement, la régulation non autonome cellulaire de l'expression de *her4* par Ngn1 représente la plus importante. En revanche, la régulation autonome cellulaire pourrait permettre une induction de l'expression de *her4* plus rapide (car elle ne nécessite pas plusieurs étapes de transcription et de signalisation) et par conséquent un meilleur contrôle de l'expression et de l'activité de *ngn1*.

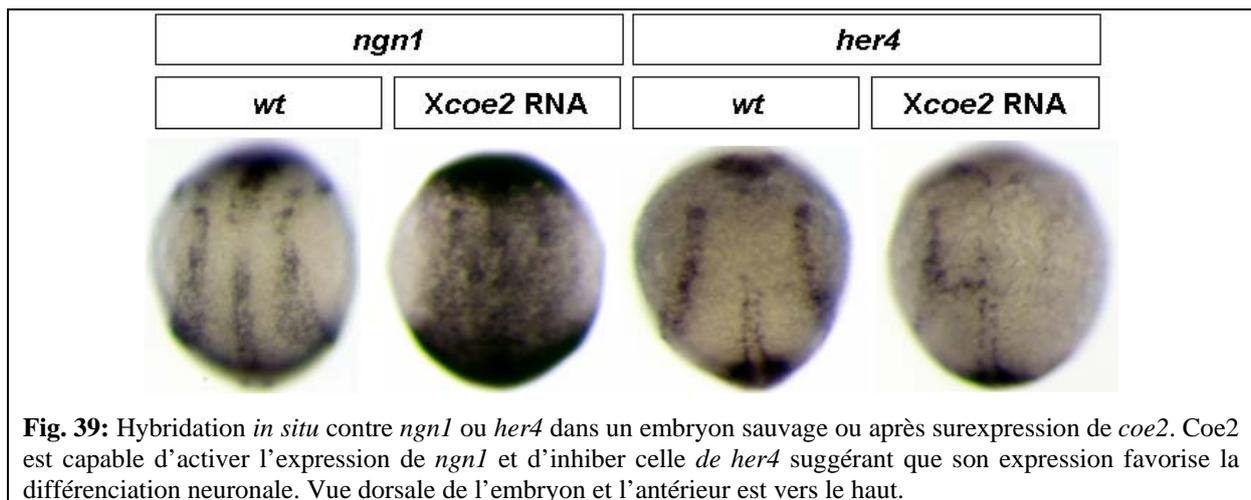
L'intégration du niveau d'expression de Ngn et Her qui est régulé par ces deux boucles de rétrocontrôle est nécessaire afin de choisir le destin du progéniteur neural. Ngn entraîne l'activation de *her* qui en retour régule négativement sa propre expression et celle de Ngn. Actuellement, la fonction de la boucle de rétrocontrôle négatif autonome cellulaire entre Ngn et Her est mal comprise. Néanmoins, on peut supposer qu'elle a pour rôle de maintenir le progéniteur neural qui exprime Ngn à l'état indifférencié. Il est envisageable que lorsque le progéniteur commence à exprimer Ngn, cette expression de *her* serve à « tamponner » rapidement l'activité de Ngn afin d'éviter qu'il se différencie prématurément en neurone.

Les oscillations, qui intègrent la régulation autonome et non autonome cellulaire de l'expression de *ngn* et *her*, peuvent être un moyen d'éviter une déplétion prématurée des progéniteurs neuraux. Lorsqu'un progéniteur neural va se différencier avec un haut niveau de Ngn2, ses voisins exprimeront Hes1 et seront maintenus en prolifération et cela même si leur niveau de Ngn2 était important. Il est possible qu'en plus de réguler l'expression de Ngn2, Hes1 puisse réprimer l'expression de certains de ces gènes cibles impliqués dans la différenciation. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi le niveau de Hes1 doit être bas pour autoriser la différenciation neuronale. De plus, il est envisageable que les oscillations

conduisent à l'accumulation de certains autres facteurs dans les progéniteurs neuraux (par exemple *Coe2* ou *Fezf1/2*) qui feront pencher l'équilibre vers la différenciation (Dubois et al., 1998; Shimizu et al., 2010).

## 2. Le différentiel d'activité entre Ngn et Her est régulé par de nombreux facteurs.

En addition de l'expression de Ngn et Her, et afin de mieux maîtriser l'aspect temporel de la différenciation neuronale, certains facteurs peuvent réguler l'expression des facteurs proneuraux et/ou des gènes *her/hes*. Il a récemment été mis en évidence que les facteurs de transcription à doigts de zinc *Fezf1* et *Fezf2* régulent positivement la différenciation neuronale en réprimant directement l'expression de *Hes5* (Shimizu et al., 2010). Les souris double KO *Fezf1/Fezf2* présentent une surexpression de *Hes5* et une diminution de l'expression de *Ngn2*. Ces souris mutantes montrent une inhibition de la différenciation neuronale dans le télencéphale. De même, *Coe2* est un facteur régulant l'expression des facteurs proneuraux et des gènes *her/hes*. Des expériences réalisées chez le xénope et le poisson zèbre ont montré que *coe2* était également régulé positivement par les gènes proneuraux et négativement par les facteurs *her/hes* (Dubois et al., 1998; Geling et al., 2004). En effet, *coe2* est une cible, probablement directe de *Ngn1* mais *Coe2* peut aussi activer l'expression de *ngn1* (Figure 39). De plus, *Coe2* peut inhiber l'expression de *her4* mais *Her4* peut aussi inhiber l'expression de *coe2* (Figure 39). En conclusion, le gain de fonction de *coe2* favorise la neurogenèse alors que sa perte de fonction la réduit.



Une étude réalisée chez le poisson zèbre a montré que l'activité de *btbd6a1/2* renforce l'expression de *ngn1* et favorise la différenciation neuronale. Les gènes *btbd6a1* et *btbd6a2* (*btbd6a*) codent pour des adaptateurs protéiques permettant de cibler les protéines à dégrader

par le complexe ubiquitine/protéasome après ubiquitinylation. *Ngn1* est nécessaire pour l'expression de ces gènes. La perte d'activité de *btbd6a1/2* entraîne une très forte réduction de l'expression de *ngn1* dans la plaque neurale mais aussi des gènes *delta* ou du marqueur de neurones différenciés *islet1*. La capacité de *Btbd6a* à promouvoir la différenciation neuronale est due à son interaction avec une protéine appelée *Plzf* qui est un répresseur transcriptionnel à doigts de zinc. La surexpression de *Plzf* entraîne une diminution de l'expression de *ngn1* et une absence de différenciation neuronale. En revanche, lorsque *Btbd6a* et *Plzf* sont coexprimés dans les progéniteurs neuraux, leur interaction entraîne la relocalisation de *Plzf* du noyau vers le cytoplasme pour y être dégradé. Ainsi, *Plzf* ne peut plus maintenir les progéniteurs à l'état indifférencié et inhiber la neurogenèse. La dégradation de *Plzf* par l'intermédiaire de *Btbd6a* est un mécanisme nécessaire pour promouvoir la différenciation neuronale (Sobieszczuk et al., 2010). Ces résultats montrent que *ngn1* et *btbd6a* forment une boucle de rétrocontrôle positif dans laquelle *Ngn1* active l'expression de *btbd6a* qui va permettre de réduire l'activité de *Plzf* et renforcer l'expression de *ngn1*.

La glycosyltransférase Lunatic-fringe (*Lfng*) a pour fonction de glycosyler certains sites spécifiques dans le domaine extracellulaire du récepteur Notch pour renforcer la liaison entre le récepteur Notch et le ligand Delta. Chez le poisson zèbre, la perte de fonction de *lfng* a pour effet d'induire une augmentation de la différenciation neuronale. Dans ce contexte l'expression de gènes comme *ngn1 ascl1a/b* ou *deltaA/B* est augmentée suggérant que le nombre de progéniteurs neuraux est plus important et que l'activité de la voie Notch est réduite. Effectivement, l'expression des gènes *her4* et *her12*, qui est un reflet de l'activité de la voie Notch, est réduite en l'absence de *Lfng*. Au contraire, la surexpression de *Lfng* entraîne une diminution importante de la différenciation neuronale (Nikolaou et al., 2009). J'ai également montré que *lfng* est une cible des facteurs proneuraux (*Figure 29M-O*). La triple perte de fonction de *ngn1* et *ascl1a/b* entraîne une importante réduction de l'expression de *lfng* et la surexpression de *Ngn1* induit l'expression ectopique de *lfng* (Nikolaou et al., 2009). La régulation de l'expression de *lfng* est indépendante de l'activité de la voie Notch car dans un contexte où la voie Notch est inactivée par ajout de DAPT, l'expression de *lfng* est augmentée. Ce résultat indique que *lfng* est activé en aval des facteurs proneuraux et indépendamment de la voie Notch. Finalement, il a été mis en évidence par des expériences de transplantation de cellules (cellules *lfng*<sup>-/-</sup> vers embryons sauvages) que la fonction de *lfng* est d'augmenter l'activation de Notch de manière autonome cellulaire afin d'inhiber la différenciation neuronale (Nikolaou et al., 2009). Cette étude a révélé un nouveau mécanisme de contrôle de la détermination neurale où les facteurs proneuraux initient une boucle de

rétrocontrôle négatif par l'activation de *Lfng* qui en retour favorise l'inhibition latérale et la répression des gènes proneuraux.

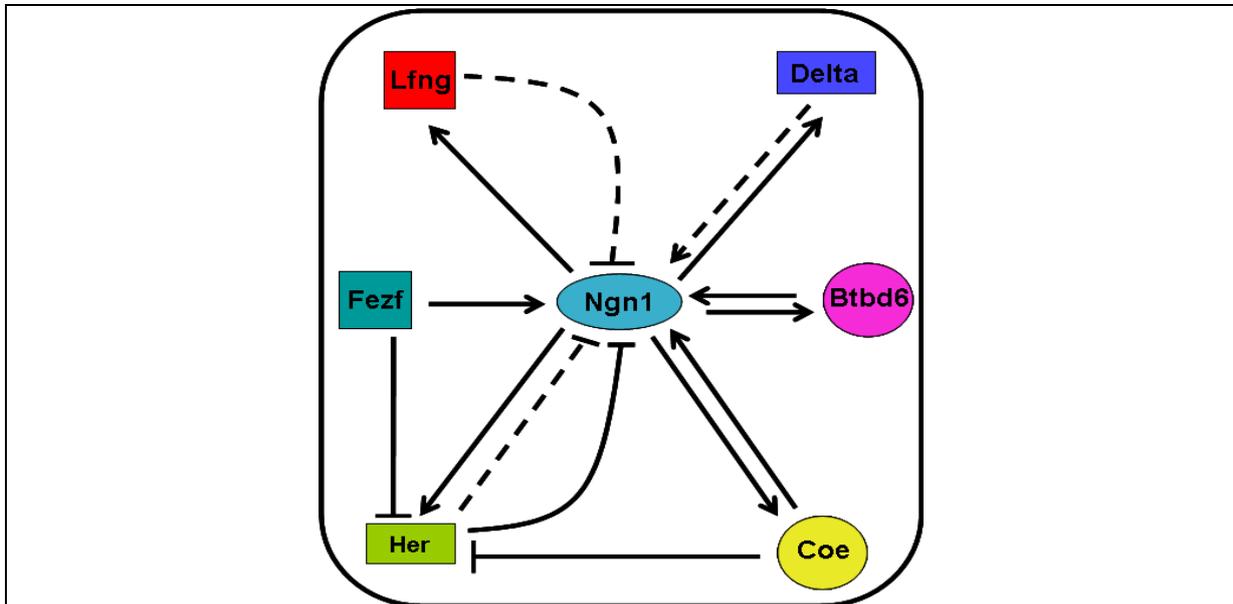
L'ensemble de ces études met en évidence un nombre important de rétrocontrôles positifs et négatifs entre les facteurs proneuraux et un ensemble de facteurs impliqués dans la différenciation neuronale. Ces exemples et les oscillations entre *Ngn* et *Her* montrent comment les interactions entre plusieurs facteurs rendent complexe l'établissement d'un choix entre prolifération et différenciation pour un progéniteur neural. Il semblerait que le but principal de tous ces rétrocontrôles est d'étendre la différence entre *Ngn* et *Her* dans un nombre restreint de progéniteurs.

### **3. L'intégration du niveau d'activité et des interactions entre tous les facteurs : une nécessité pour modéliser la différenciation neuronale ?**

Il semble que bien qu'un haut niveau d'expression des facteurs proneuraux soit nécessaire à la différenciation neuronale celui-ci ne soit pas suffisant car en parallèle le niveau d'expression des gènes *her* doit être bas. Les mécanismes permettant d'établir ces différences affectent soit directement l'expression de *Ngn* et/ou de *Her* (*ngn*, *Fezf*, *coe*, *her*, *btbd6*...) ou indirectement leurs activités par la régulation de la voie Notch (*delta*, *lfng*...). L'intégration du niveau d'activité de tous ces facteurs à un temps T permet de sélectionner un progéniteur qui va se différencier (niveau d'expression de *Ngn* élevé et niveau d'expression de *Her* faible). Cette description du système contrôlant la différenciation neuronale est loin d'être exhaustive et de nombreux autres facteurs contrôlant ce processus peuvent être impliqués dans ces rétrocontrôles (Kageyama et al., 2008b; Kageyama et al., 2009). Dans l'avenir, si nous souhaitons comprendre de manière plus précise la différenciation des progéniteurs neuraux et modéliser ce processus développemental important, il est nécessaire d'identifier la majorité des interactions entre les différents facteurs impliqués. De plus, il est nécessaire de savoir à quel niveau la régulation entre chaque facteur s'effectue. Nous avons suggéré qu'en plus d'une régulation négative de la transcription de *ngn1* par les facteurs *Her*, l'activité de *Ngn1* pouvait également être régulée de manière « post-transcriptionnelle ». *Her* pourrait éventuellement s'hétérodimériser avec *Ngn* pour bloquer son activité ou alors réguler négativement l'expression de gènes cibles de *Ngn1*. Il est également connu que les facteurs de la famille *Ngn* peuvent être régulés au niveau protéique par phosphorylation (contrôle son activité) ou par le système ubiquitine-protéasome (contrôle sa dégradation) (Hand et al., 2005;

Vosper et al., 2007; Vosper et al., 2009). Comme décrit précédemment, l'activité de Ngn1 est également régulée par l'expression du gène *btbd6a*, qui permet de dégrader un répresseur transcriptionnel de *ngn1* (Sobieszczuk et al., 2010). Ces différentes manières de réguler l'activité de Ngn, n'ont pas le même effet sur le destin du progéniteur neural et ses voisins car la vitesse de réduction de l'activité de Ngn est différente et influe sur l'expression des autres facteurs de manière autonome et non autonome cellulaire. Il est probable que les mécanismes de contrôle de l'activité de Ngn soient dépendants du niveau d'activité d'un ensemble de facteurs pour un progéniteur donné à un temps donné. Par conséquent, et en extrapolant ces hypothèses aux différents facteurs impliqués dans la différenciation neuronale, il est actuellement difficile d'établir un modèle permettant de définir quand un progéniteur neural va se différencier.

Finalement, il semblerait que les différents mécanismes de contrôle de la différenciation neuronale aient pour point central la régulation positive de l'expression des facteurs proneuraux au dépend des gènes *her*. Une grande partie des facteurs régulant l'activité des facteurs proneuraux est également régulée positivement par l'activité de ces mêmes proneuraux. De plus, ces facteurs sont aussi soumis à des rétrocontrôles positifs et négatifs (Figure 40).



**Fig. 40:** Représentation schématique de nombreux facteurs impliqués dans le contrôle de la différenciation neuronale et des rétrocontrôles qu'ils exercent les uns sur les autres. Tous ces acteurs ont comme point commun la régulation positive ou négative de l'expression/activité de Ngn. Les flèches pleines représentent un effet autonome cellulaire alors que les pointillés représentent une régulation dépendante de Notch.

Il est intéressant de noter que des gènes tels que *deltaA*, *deltaD*, *her4*, *her15*, *lfng* ou *coe2* sont des gènes cibles communs à Ngn1 et *Ascl1a* chez le poisson zèbre. Cette observation renforce

l'idée qu'un ensemble de gènes cibles communs est impliqué dans un processus général à tous les neurones comme la détermination neurale.

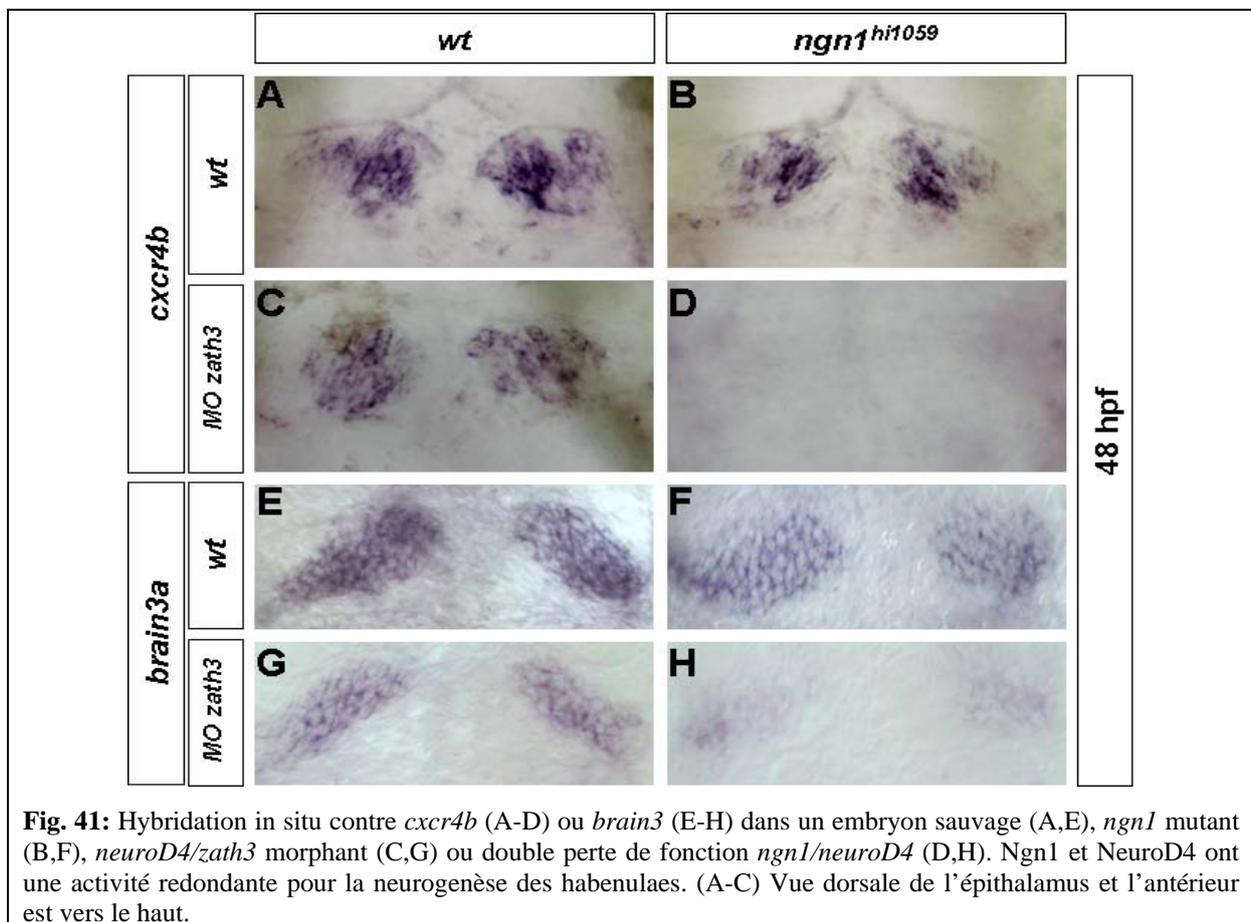
## **II. Ngn1 contrôle la guidance axonale des neurones olfactifs par la régulation d'un ensemble de gènes.**

J'ai précédemment cité de nombreux gènes cibles communs à Ngn1 et Ascl1a chez le poisson zèbre impliqués dans la détermination neurale. Néanmoins, il a été établi par plusieurs études que même des gènes cibles communs étaient régulés par l'intermédiaire d'éléments de régulation (CRM) distincts (Castro et al., 2006; Hans and Campos-Ortega, 2002; Madelaine and Blader, 2010). En effet, les gènes *deltaD* (ou *Delta1* chez la souris) et *deltaA* sont régulés par l'intermédiaires de CRM composés d'E-Box ayant un consensus particulier. Cela suggère que les facteurs proneuraux ont la capacité de réguler des gènes cibles différents par l'intermédiaire de CRM différents. Ils peuvent donc avoir des activités différentes lors de la spécification neuronale. A ce jour, le meilleur exemple de ce rôle spécifique est la régulation de *Rnd2* par Ngn2 (Heng et al., 2008). *Rnd2* est nécessaire à la migration radiale et à la morphogénèse des neurones corticaux chez la souris. Durant ma thèse, j'ai utilisé le développement des neurones olfactifs chez le poisson zèbre comme modèle afin d'identifier des nouvelles fonctions pour Ngn1. Tout d'abord, j'ai pu montrer que Ngn1 avait une activité redondante avec un autre facteur proneural, Neurod4 pour la neurogenèse olfactive. Ensuite, j'ai pu mettre en évidence une nouvelle activité pour Ngn1 dans le contrôle de la guidance axonale, incluant la projection et la fasciculation axonale.

### **1. Les activités redondantes de Ngn1 et NeuroD4 sont conservées pour la neurogenèse habenulaire.**

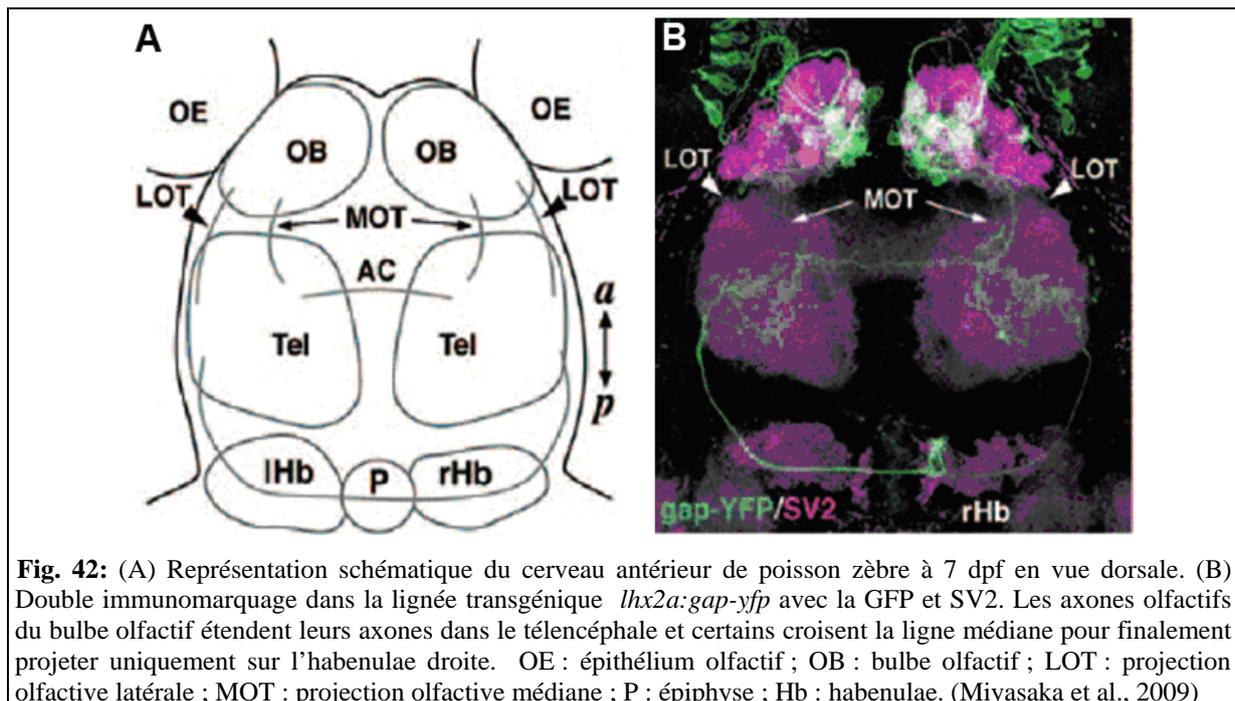
Tout comme lors du développement de la placode olfactive, Ngn1 est exprimé dans les progéniteurs neuraux des habenulaes en formation qui sont localisées dans l'hypothalamus dorsal. De manière intéressante, *cxcr4b* est également exprimé dans les habenulaes, dans une population de cellules qui semblent être *ngn1+* (Roussigne et al., 2009). Cette observation m'a amené à émettre l'hypothèse que la régulation de *cxcr4b* par Ngn1 pourrait être conservée dans les progéniteurs habenulaires. La perte de fonction de *ngn1* n'entraîne pas la perte d'expression de *cxcr4b* ou des habenulaes. En revanche, comme dans la placode olfactive, la double perte de fonction *ngn1/neurod4* conduit à une absence des progéniteurs neuraux (*cxcr4b+*). De plus, cette double perte de fonction conduit à une absence des habenulaes car l'expression de *brain3a* qui est un marqueur des neurones différenciés est très fortement réduite (R.Madelaine, C.Halluin, M.Roussigné et P.Blader, en préparation)

(Figure 41). Il semblerait que les habenulae et les placodes olfactives utilisent les mêmes mécanismes moléculaires (redondance entre Ngn1 et Neurod4) pour la neurogenèse. Néanmoins, alors que certains aspects de la neurogenèse (progéniteurs *cxcr4b*+, redondance fonctionnelle) sont conservés, d'autres semblent différents. En effet, alors que dans une perte de fonction de *ngn1* on observe un délai dans la formation des neurones olfactifs, il ne semble pas y avoir de délai ou de réduction du nombre de neurones dans les habenulae. Cela signifierait que contrairement à la placode olfactive où l'expression précoce de *neurod4* est dépendante de Ngn1, cela ne soit pas le cas dans les habenulae. Toutefois, il est possible que la redondance ne soit pas totale mais qu'une analyse quantitative précise en terme d'expression de *neurod4* et du nombre de neurones formés soit nécessaire pour observer un phénotype.



Les habenulae sont les cibles des projections axonales provenant des bulbes olfactifs (Koide et al., 2009; Miyasaka et al., 2009) (Figure 42). Il est très intéressant de se rendre compte que deux systèmes sensoriels qui participent au même circuit neuronal présentent la même régulation de la neurogenèse impliquant les facteurs de la famille *atonal*. Il serait

intéressant de savoir si la formation d'autres structures qui participent à ce circuit est également contrôlée par *Ngn1* et *NeuroD4*. Une étude a déjà mis en évidence qu'un seul facteur, *phox2b*, était nécessaire à la formation de plusieurs structures connectées dans un même circuit neuronal dans le système nerveux autonome (viscéral) (Dauger et al., 2003). Ce circuit permet de moduler l'activité d'organes internes (réflexe viscéral). En l'absence de *phox2b*, des ganglions parasympathiques et crâniens, les neurones entériques, les motoneurones viscéraux, le « carotid body » et le « nucleus solitary tract » ne sont pas formés ou ne sont pas correctement spécifiés (Dauger et al., 2003; Pattyn et al., 2000; Pattyn et al., 1999). Cet exemple montre qu'un facteur de transcription peut être nécessaire à la mise en place d'un circuit neuronal spécifique en induisant la formation de structures qui sont éloignées spatialement mais connectées physiologiquement. *Ngn1* est lui aussi impliqué dans la formation de structures connectées dans un même circuit neuronal. Il est nécessaire à la formation des neurones sensoriels de Rohon-Beard, des ganglions trijumeaux et du neurone réticulo-spinal de Mauthner qui sont tous impliqués dans le réflexe de fuite chez la poisson zèbre (Andermann et al., 2002; Cornell and Eisen, 2002; Fetcho and Faber, 1988; Fetcho et al., 2008; Fetcho and O'Malley, 1995). Il est possible que le couple de facteurs de transcription *ngn1/neurod4* soit également nécessaire au développement d'un circuit spécifique à l'olfaction, permettant la sensation (placode olfactive), l'intégration (habenulae) et la réaction (?). Afin de le déterminer, il faudrait par exemple étudier la formation du bulbe olfactif (où projettent les axones de la placode olfactive) ou du noyau inter-pédonculaire (où projettent les axones des habenulae) (Aizawa et al., 2005; Miyasaka et al., 2009).



**Fig. 42:** (A) Représentation schématique du cerveau antérieur de poisson zèbre à 7 dpf en vue dorsale. (B) Double immunomarquage dans la lignée transgénique *lhx2a:gap-yfp* avec la GFP et SV2. Les axones olfactifs du bulbe olfactif étendent leurs axones dans le télencéphale et certains croisent la ligne médiane pour finalement projeter uniquement sur l'habenulae droite. OE : épithélium olfactif ; OB : bulbe olfactif ; LOT : projection olfactive latérale ; MOT : projection olfactive médiane ; P : épiphyse ; Hb : habenulae. (Miyasaka et al., 2009)

## **2. Assemblage de la placode olfactive dans le mutant *ngn1*.**

Dans un mutant pour *Ngn1*, la mise en place de la placode olfactive n'est pas fortement affectée par la perte d'expression précoce de *cxcr4b*. Pourtant, le mutant *cxcr4b* (mutant *odysseus*) présente des défauts d'assemblage de la placode olfactive (Miyasaka et al., 2007). Il est possible que dans le mutant *ngn1*, l'expression de *cxcr4b* qui est dépendante de NeuroD4 à partir de 16 hpf soit capable de sauver le phénotype. En effet, à ce stade, les territoires de la placode olfactive et du télencéphale n'ont pas encore ségrégués. Cette observation peut expliquer pourquoi l'expression tardive de *cxcr4b* est suffisante pour assembler correctement la placode olfactive. Nous ne pouvons tout de même pas exclure totalement que les défauts de projections axonales soit un phénotype secondaire dû à des défauts subtils dans l'assemblage de la placode. Néanmoins, la surexpression de *cxcl12a*, le ligand de *cxcr4b*, conduit à un mauvais positionnement des neurones olfactifs mais pas à des défauts de projections axonales (Miyasaka et al., 2007). Ce résultat suggère que les défauts de projections axonales observés dans le mutant *ngn1* sont, au moins en partie, dus à la perte d'expression précoce de *cxcr4b* qui a une fonction spécifique dans la guidance axonale.

## **3. *cxcr4b* et *robo2/olfm1b* sont exprimés à des étapes différentes de la neurogenèse.**

Nous avons identifié de nouveaux gènes cibles spécifiques de *Ngn1* impliqués dans la guidance axonale. Le récepteur aux chemokine *cxcr4b* est nécessaire pour la projection des axones olfactifs tandis que *robo2* et *olfactomedin1b* sont impliqués dans la fasciculation du nerf olfactif. Il est intéressant de noter que dans le mutant *ngn1*, l'expression de ces trois facteurs est perdue dans la placode olfactive en développement. Néanmoins, l'expression de *cxcr4b* est détectée dans les progéniteurs alors que *robo2* et *olfm1b* sont exprimés dans les neurones différenciés. Ces observations suggèrent que *cxcr4b* serait une cible directe de *Ngn1* tandis que *robo2* et *olfm1b* seraient des cibles indirectes. Une régulation indirecte impliquerait que *Ngn1* régule d'autres facteurs intermédiaires, probablement dans les progéniteurs, afin de permettre plus tardivement l'expression de gènes cibles dans les neurones différenciés. *Ngn1* a une activité redondante avec NeuroD4 pour réguler l'expression de *deltaA* ou *cxcr4b* dans les progéniteurs neuraux. En revanche, seul *Ngn1* a la capacité de conduire à la différenciation de neurones olfactifs précoces qui expriment *robo2* et *olfm1b*. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces différences. Premièrement, *Ngn1* a la

capacité d'induire des facteurs spécifiques permettant l'expression de *robo2* et *olfm1b* dans les neurones olfactifs précoces mais pas NeuroD4. Par exemple, ce mécanisme pourrait avoir lieu si à un moment donné, Ngn1 peut interagir avec un cofacteur alors que NeuroD4 en est incapable ou alors que le cofacteur est présent précocement (10-16 hpf) mais pas tardivement (après 16 hpf). Cette hypothèse est néanmoins peu probable car NeuroD4 est tout à fait capable de diriger l'expression d'*olfm1b* dans les neurones sensoriels olfactifs dans un mutant *ngn1*. Deuxième hypothèse, le délai entre l'expression de *neurod4* et la fin de différenciation des neurones olfactifs précoces est trop court (6h). Ce délai ne permettrait pas l'activation de certains gènes dans les progéniteurs qui seront ensuite nécessaires à l'expression de *robo2* et *olfm1b* dans les neurones différenciés. Le fait que la formation des neurones sensoriels olfactifs soit retardée de 12h mais puisse avoir lieu dans un mutant *ngn1* renforce cette hypothèse. Il semble donc que la spécification correcte des neurones olfactifs précoces nécessite d'avoir exprimé un facteur proneural pendant une longue période (plus de 6h) pour être correctement réalisé. Ceci est peut être du au fait qu'un certain nombre de gènes cibles indirectes doivent être activés avant la différenciation.

Cxcr4b est une cible probablement directe de Ngn1, malheureusement, nous n'avons pas eu la possibilité d'identifier les éléments de réponse à Ngn1 dans le promoteur de *cxcr4b*. Néanmoins, il existe un BAC qui permet de diriger l'expression de la GFP de manière similaire à l'expression endogène de *cxcr4b* chez le poisson zèbre (D.Gilmour, communication personnelle). Il est envisageable par une approche de CHIPseq d'identifier les éléments de réponse à Ngn1 dans ce BAC. Ainsi, il serait possible de tester la fonctionnalité de ces CRM. De plus, il serait intéressant de savoir si le CRM identifié est semblable à d'autres en termes de séquence et de nombres d'E-Box. Comme *cxcr4b*, n'est pas régulé par *Ascl1a*, il est envisageable que l'identification d'un nouveau CRM spécifique pour Ngn1 permette de mieux appréhender les différences d'activités entre les facteurs proneuraux de la famille *ato* et *ac-sc*.

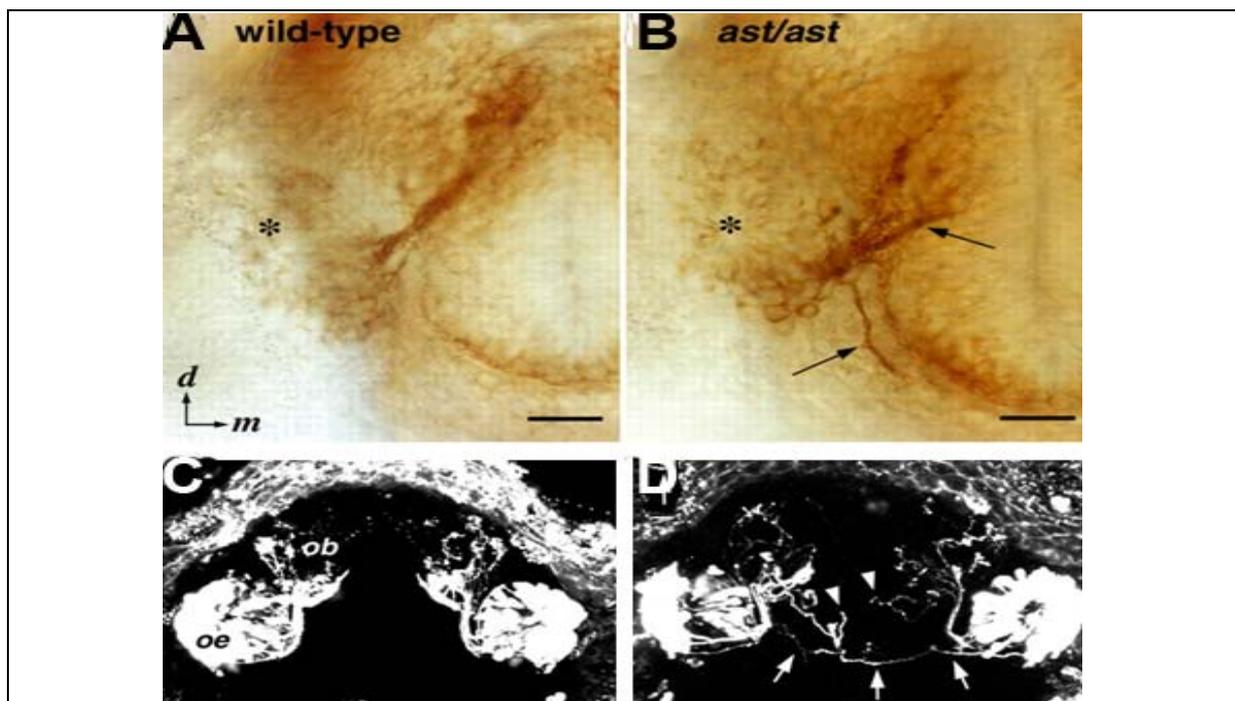
#### **4. Distinction des fonctions de Ngn1 et Cxcr4b dans l'établissement de la guidance axonale des neurones de la placode olfactive.**

Dans un mutant pour *ngn1*, 100% des placodes olfactives présentent des défauts de projections axonales à 24 hpf contre seulement 45% à 48 hpf. Une explication simple est que dans certains cas, l'expression de *cxcr4b* indépendante de Ngn1 à 16 hpf soit suffisante pour sauver la projection des axones à 48 hpf. Si un axone de neurone olfactif précoce est capable

de projeter dans vers le bulbe olfactif, il est peut être capable d'aider les autres axones à projeter également comme suggéré par les expériences de transplantation (effet de groupe ?). Il semble en effet, que le phénotype de projection des axones olfactifs soit de type tout ou rien dans le mutant *ngn1*. Il est possible qu'à 24 hpf, il soit trop tôt pour voir le sauvetage de la projection axonale car *Cxcr4b* a besoin d'être accumulé dans le progéniteur neural. Dans un embryon sauvage, *cxcr4b* est exprimé dans les progéniteurs des neurones olfactifs précoces durant environ 12h contre 6h dans un embryon mutant pour *ngn1*. Cette observation pourrait expliquer la différence dans la pénétrance du phénotype à 24 hpf et 48 hpf. Une autre explication serait que l'expression de *cxcr4b*, dans les progéniteurs des neurones sensoriels olfactifs (OSN), permette de sauver partiellement le phénotype dans le mutant *ngn1*. Le mutant *odysseus (cxcr4b)*, comme le mutant *ngn1* à 48 hpf, n'a pas un phénotype totalement pénétrant. Dans ce cas, cela peut être expliqué car parfois quelques axones de neurones précoces sont capables de projeter et permettent à tous les neurones sensoriels olfactifs de cibler le bulbe olfactif (Miyasaka et al., 2007). Dans le mutant *ngn1*, ce phénotype intermédiaire n'est jamais observé et on a toujours un phénotype de type tout ou rien pour la projection des axones olfactifs. Dans les mutants *odysseus* et *ngn1*, la capacité des axones à projeter dans certains cas suggèrent que d'autres facteurs que *cxcr4b* peuvent être impliqués dans l'établissement des projections axonales mais que ces facteurs n'ont pas une activité complètement redondante avec *Cxcr4b*.

*cxcr4b* est exprimé dans les progéniteurs des neurones olfactifs précoces jusqu'à 22 hpf puis de dans les progéniteurs des neurones sensoriels olfactifs jusqu'à 48 hpf. Après 48 hpf, l'expression de *cxcr4b* est perdue dans la placode olfactive. L'expression de *cxcr4b* dans les progéniteurs des neurones sensoriels olfactifs n'est pas suffisante pour permettre la projection des axones olfactifs dans le mutant *ngn1*. Quelle peut donc être la fonction de *cxcr4b* dans les progéniteurs des neurones sensoriels olfactifs ? Il semblerait qu'elle ne soit pas non plus strictement nécessaire. Dans le mutant *odysseus*, les neurones olfactifs sensoriels sont capables de projeter si un faible nombre de neurones olfactifs précoces projetent vers le bulbe olfactif (Miyasaka et al., 2007). L'expression de *cxcr4b* dans les progéniteurs olfactifs sensoriels pourrait être nécessaire pour leur intégration dans la placode olfactive. Néanmoins, le profil d'expression de *cxcl12a*, le ligand de *cxcr4b*, ne permet pas de favoriser cette éventualité. Une autre possibilité serait que la fonction de *cxcr4b* dans les progéniteurs des neurones sensoriels olfactifs soit d'aider les axones des neurones olfactifs à suivre l'échafaudage d'axones des neurones précoces pour cibler correctement le bulbe olfactif.

Les défauts de projections axonales sont plus pénétrants dans le mutant *ngn1* que dans le mutant *cxcr4b* alors que l'expression de *cxcr4b* réapparaît à 16 hpf dans les progéniteurs neuraux. Contrairement à *Cxcr4b*, *Ngn1* pourrait réguler l'expression d'un grand nombre de gènes cibles impliqués dans la guidance axonale. En plus de la perte d'expression de *cxcr4b*, l'expression de *robo2* et *olfm1b* est aussi perdue dans les neurones pionniers. Il a été montré précédemment que la signalisation *robo/slit* était requise pour la fasciculation des neurones olfactifs (Miyasaka et al., 2005). Dans le mutant pour *robo2* (*astray*), les axones des neurones olfactifs ne sont pas capables d'établir des glomérules correctes avec le bulbe olfactif du aux défauts de fasciculation (Figure 43). En ce qui concerne *olfm1b*, il a été démontré que c'était une glycoprotéine sécrétée nécessaire à la croissance et à la fasciculation des axones des neurones de la rétine chez le poisson zèbre (Nakaya et al., 2008; Tomarev and Nakaya, 2009). De plus, il semble que la protéine *Olfm1b* peut interagir avec *WIF-1* qui est un inhibiteur sécrété de la signalisation WNT. Cette interaction aurait pour but d'activer la voie WNT pour permettre la croissance et la fasciculation des axones. Il est donc envisageable que la voie WNT soit aussi impliquée dans la guidance axonale des neurones olfactifs.



**Fig. 43:** (A-B) Observation des projections axonales olfactives (*Zns-2*) dans un embryon sauvage (A) ou mutant pour *robo2* (B) à 36 hpf. La perte de fonction de *robo2* induit des défauts de fasciculation axonale (flèche noire) (B). (C-D) Observation des projections axonales olfactives dans la lignée transgénique *omp:gfp* dans un embryon sauvage (C) ou mutant pour *robo2* (D) à 72 hpf. La perte de fonction de *robo2* induit des défauts de projection des axones olfactifs et de formation des glomérules avec le bulbe olfactif (D). Ces défauts peuvent être liés aux défauts de fasciculation qui sont nécessaires pour une guidance axonale correcte vers le bulbe olfactif (B). (Miyasaka et al., 2005)

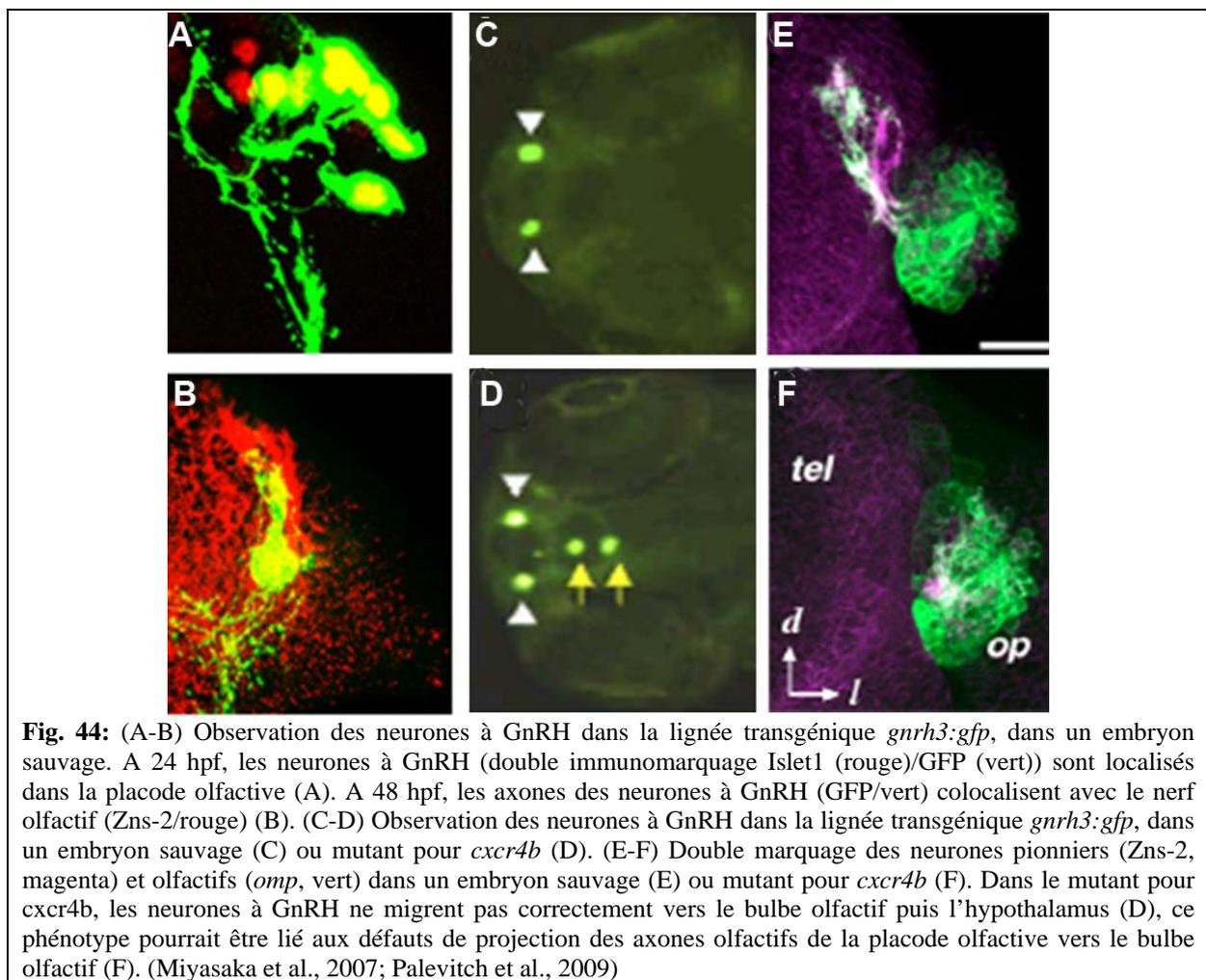
Une autre hypothèse, pour expliquer la différence de pénétrance entre le mutant *ngn1* et le mutant *cxc4b*, peut être que *Ngn1* a la capacité de réguler l'expression de gènes impliqués dans la projection axonale des neurones olfactifs dans d'autres structures que la placode olfactive. J'ai déjà montré que l'expression du ligand pour *cxc4b* (*cxcl12a*) dans le bulbe olfactif n'était pas dépendante de *Ngn1*. Néanmoins, *Ngn1* est exprimé dans le télencéphale, il est alors envisageable que certains gènes (par exemple des ligands pour *robo2*) soit exprimés dépendamment de *Ngn1* pour guider les axones olfactifs vers le télencéphale puis le bulbe olfactif. Dans ce cas, une partie des défauts de projections axonales des neurones olfactifs serait non autonome cellulaire dans le mutant *ngn1*.

Dans le mutant *astray*, les phénotypes observés suggèrent qu'une fasciculation correcte des neurones olfactifs précoces est nécessaire pour l'établissement de contact (glomérule) entre les neurones sensoriels olfactifs et le bulbe olfactif. Dans le mutant *ngn1* à 48 hpf, les axones des neurones olfactifs, qui sont capables de projeter, montrent des défauts de fasciculation et de connection avec le bulbe olfactif. Les axones des neurones pionniers sont très importants pour guider les axones des neurones olfactifs (Whitlock and Westerfield, 1998). Ils servent de structure permettant la fasciculation, la projection et l'établissement d'une carte des glomérules sur le bulbe olfactif. Dans le mutant *odysseus*, quand les axones projettent, la carte glomérulaire est identique à celle observée dans un embryon sauvage contrairement aux mutants *ngn1* où elle est très affectée. Il semble que la diminution du nombre de neurones olfactifs précoces et l'absence d'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la guidance axonale conduisent les neurones olfactifs qui projettent à contacter le bulbe olfactif de manière anarchique dans le mutant *ngn1*.

## **5. *Ngn1* et ses cibles transcriptionnelles comme gènes impliqués dans le syndrome multi-génétique de Kallmann ?**

La perte de fonction de *cxc4b* (mutant *odysseus*) est responsable d'un grand nombre de défauts en addition aux défauts de projections axonales des neurones olfactifs. Par exemple, la migration des cellules germinales, de la ligne latérale et l'assemblage des ganglions trijumeaux sont également affectés (Haas and Gilmour, 2006; Knaut et al., 2005; Knaut et al., 2003). Plus récemment, une étude a mis en évidence une fonction pour *cxc4b* dans la migration des neurones à GnRH chez le poisson zèbre (Palevitch et al., 2009). Effectivement, dans le mutant *odysseus*, les neurones à GnRH ne sont pas capables de migrer de l'épithélium olfactif vers l'hypothalamus entre 26 et 48 hpf. Au début du développement

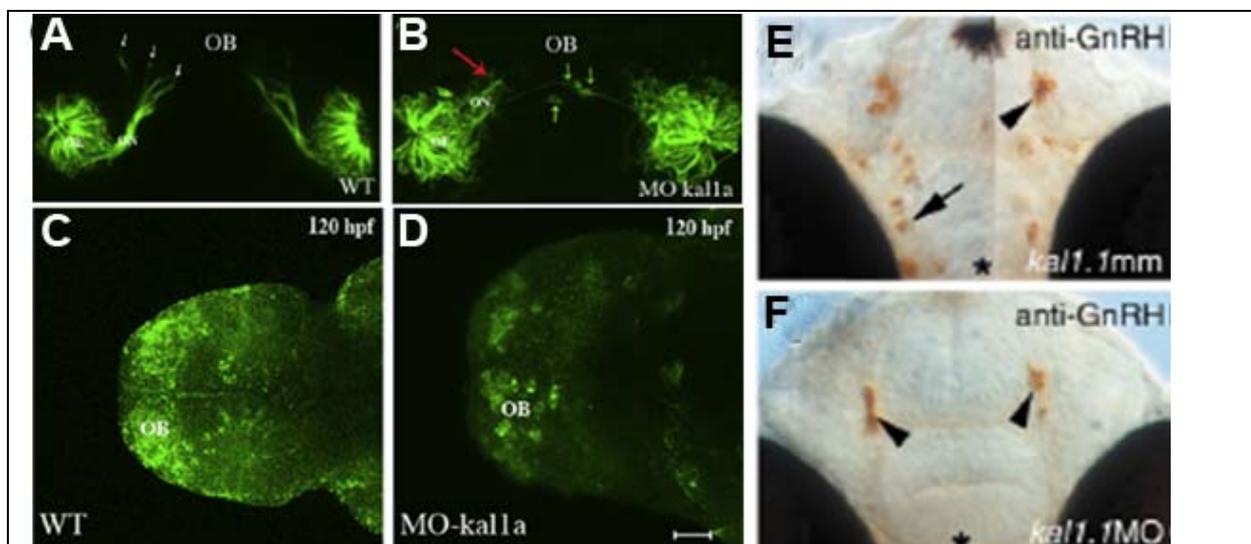
embryonnaire, les neurones à GnRH sont localisés dans la placode olfactive et interagissent physiquement avec le nerf olfactif (RM et PB, résultats non publiés) (*Figure44A-B*). Une hypothèse envisageable est que les défauts de migration des neurones à GnRH soient un phénotype secondaire des défauts de projection du nerf olfactif observé dans le mutant *odysseus* (Miyasaka et al., 2007) (*Figure44C-F*). Il est possible que dans le mutant pour *ngn1*, les neurones à GnRH soient également incapables de migrer vers l'hypothalamus lorsque les axones olfactifs ne projettent pas. De plus, il a été mis en évidence que des défauts de connection entre le nerf olfactif et le bulbe olfactif (comme dans les mutants pour *ngn1* et *cxcr4b*) pouvaient être responsables de défauts de différenciation du bulbe olfactif (Yanicostas et al., 2009).



Il existe une maladie génétique embryonnaire qui associe un hypogonadisme et une anosmie qui est appelée syndrome de Kallmann chez l'homme. L'hypogonadisme est dû à une absence de neurones exprimant la gonatropine (neurones à GnRH) dans l'hypothalamus alors que l'anosmie est due à des défauts de développement du bulbe olfactif (Dode and

Hardelin, 2009). Actuellement, les principales mutations génétiques associées à cette maladie concernent les gènes KAL-1, FGFR1, FGF8, PROK2 et PROKR2 (Dode et al., 2007; Dode et al., 2006; Hardelin and Dode, 2008; Monnier et al., 2009). Néanmoins, seulement 30% des cas du syndrome de Kallmann sont dus à ces 5 gènes. L'identification de nouvelles mutations pouvant être responsables de phénotypes similaires à ceux observés dans le syndrome de Kallmann est très importante. Dans cette optique, une analyse poussée des phénotypes mutants pour *ngn1*, *robo2* et *cxcr4b* pourrait aider à mieux appréhender les événements à l'origine de cette maladie.

L'hypothèse qui peut expliquer l'association entre hypogonadisme et anosmie est que des défauts de projections des axones olfactifs vers le bulbe olfactif soient responsables des deux phénotypes (Schwanzel-Fukuda et al., 1989; Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989). Si les axones olfactifs n'arrivent pas à projeter vers le bulbe olfactif, les neurones à GnRH ne pourront pas migrer vers l'hypothalamus en suivant le nerf olfactif et le bulbe olfactif ne se développera pas correctement. Cette hypothèse est soutenue par des études récentes réalisées chez le poisson zèbre qui ont mis en évidence des défauts de projections axonales, de différenciation du bulbe olfactif et une absence de neurones à GnRH dans l'hypothalamus dans le cas d'une perte de fonction de *kal-1* (*kallmann-1*) (Whitlock et al., 2005; Yanicostas et al., 2009) (Figure 45).



**Fig. 45:** (A-B) Observation des projections axonales olfactives dans la lignée transgénique *omp:gfp*, dans un embryon sauvage (A) ou morphant pour *kall1* à 36 hpf (B). La perte de fonction de *kall1* induit des défauts de fasciculation et projections axonales de la placode olfactive vers le bulbe olfactif. (C-D) Immunomarquage contre la Tyrosine Hydroxylase dans un embryon sauvage (C) ou morphant *kall1* (D) qui montre que la perte de fonction de *kall1* entraîne des défauts de différenciation des neurones situés dans le bulbe olfactif (OB) à 120 hpf. Les défauts de différenciation du bulbe olfactif pourraient être liés aux défauts de projections axonales observés dans le morphant *kall1* (B). (E-F) Immunomarquage contre les GnRH dans un embryon sauvage (E) ou morphant *kall1* (F) montrant que les neurones à GnRH hypothalamiques sont absents dans le morphant (flèche noire dans sauvage) à 26 hpf (F). Les défauts de migration des neurones à GnRH pourraient être liés aux défauts de projection axonales observés dans le morphant *kall1* (B). (Whitlock et al., 2005; Yanicostas et al., 2009)

Chez les mammifères comme chez le poisson zèbre, les neurones à GnRH sont localisés dans l'épithélium olfactif au début du développement et ont besoin de l'activité de *cxcr4* pour migrer (Palevitch et al., 2009; Schwarting et al., 2006). Dans le mutant *ngn1*, dans la moitié des épithéliums olfactifs, les axones olfactifs ne projettent pas mais lorsqu'ils projettent, j'ai observé de graves défauts de fasciculation du nerf olfactif et de formation des glomérules avec le bulbe olfactif. Ces phénotypes sont similaires à ceux décrits chez le poisson zèbre dans des embryons mutants pour *cxcr4b* (absence de projection) et *robo2* (défauts de fasciculation) (Miyasaka et al., 2007; Miyasaka et al., 2005) (*Figure 43 et 44*). Dans le mutant pour *robo2* (*astray*), les défauts de fasciculation du nerf olfactif ont été associés à des défauts de contact entre le nerf et le bulbe olfactif. Comme *Ngn1* est capable de contrôler la guidance axonale par la régulation de gènes cibles, il pourrait être impliqué dans la différenciation du bulbe olfactif et la migration des neurones à GnRH. Alors, il est possible que les mutants pour *ngn1* et ses gènes cibles (*cxcr4b*, *robo2*...) présentent des défauts de développement du bulbe olfactif et de migration des neurones à GnRH. Une analyse de ce processus dans ces mutants permettrait d'identifier s'il existe un lien entre la qualité des projections axonales, la différenciation du bulbe olfactif et la migration des neurones à GnRH. Finalement, une telle étude permettrait d'évaluer si l'association entre hypogonadisme et anosmie est le résultat d'un seul événement qui est l'absence de contact entre les axones olfactifs et le bulbe olfactif. De plus, elle pourrait permettre d'identifier de nouveaux gènes candidats, *ngn1*, *cxcr4b* et *robo2*, dans la maladie multi-génétique qu'est le syndrome de Kallmann.

En conclusion, *cxcr4b* est une cible probablement directe des facteurs proneuraux de la famille *atonal* qui a une fonction dans un processus de spécification neuronale, la guidance axonale. L'ensemble de nos données indique qu'un progéniteur neural n'est pas une cellule multipotente naïve. L'activité spécifique d'un facteur proneural dans un progéniteur neural permet l'expression d'un programme génétique spécifique nécessaire à l'établissement de son identité et à la mise en place d'un système nerveux fonctionnel.

## Bibliographie

- Aizawa, H., Bianco, I. H., Hamaoka, T., Miyashita, T., Uemura, O., Concha, M. L., Russell, C., Wilson, S. W. and Okamoto, H.** (2005). Laterotopic representation of left-right information onto the dorso-ventral axis of a zebrafish midbrain target nucleus. *Curr Biol* **15**, 238-43.
- Akagi, T., Inoue, T., Miyoshi, G., Bessho, Y., Takahashi, M., Lee, J. E., Guillemot, F. and Kageyama, R.** (2004). Requirement of multiple basic helix-loop-helix genes for retinal neuronal subtype specification. *J Biol Chem* **279**, 28492-8.
- Alexandre, D., Clarke, J. D., Oxtoby, E., Yan, Y. L., Jowett, T. and Holder, N.** (1996). Ectopic expression of Hoxa-1 in the zebrafish alters the fate of the mandibular arch neural crest and phenocopies a retinoic acid-induced phenotype. *Development* **122**, 735-46.
- Allende, M. L. and Weinberg, E. S.** (1994). The expression pattern of two zebrafish achaete-scute homolog (ash) genes is altered in the embryonic brain of the cyclops mutant. *Dev Biol* **166**, 509-30.
- Andermann, P., Ungos, J. and Raible, D. W.** (2002). Neurogenin1 defines zebrafish cranial sensory ganglia precursors. *Dev Biol* **251**, 45-58.
- Appel, B.** (2000). Zebrafish neural induction and patterning. *Dev Dyn* **219**, 155-68.
- Appel, B., Givan, L. A. and Eisen, J. S.** (2001). Delta-Notch signaling and lateral inhibition in zebrafish spinal cord development. *BMC Dev Biol* **1**, 13.
- Bae, Y. K., Shimizu, T. and Hibi, M.** (2005). Patterning of proneuronal and inter-proneuronal domains by hairy- and enhancer of split-related genes in zebrafish neuroectoderm. *Development* **132**, 1375-85.
- Bailey, A. M. and Posakony, J. W.** (1995). Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev* **9**, 2609-22.
- Baker, J. C., Beddington, R. S. and Harland, R. M.** (1999). Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits *bmp4* expression and activates neural development. *Genes Dev* **13**, 3149-59.
- Bally-Cuif, L. and Hammerschmidt, M.** (2003). Induction and patterning of neuronal development, and its connection to cell cycle control. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 16-25.
- Barth, K. A., Kishimoto, Y., Rohr, K. B., Seydler, C., Schulte-Merker, S. and Wilson, S. W.** (1999). Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development* **126**, 4977-87.
- Bauer, H., Meier, A., Hild, M., Stachel, S., Economides, A., Hazelett, D., Harland, R. M. and Hammerschmidt, M.** (1998). Follistatin and noggin are excluded from the zebrafish organizer. *Dev Biol* **204**, 488-507.
- Beckers, J., Caron, A., Hrabe de Angelis, M., Hans, S., Campos-Ortega, J. A. and Gossler, A.** (2000). Distinct regulatory elements direct *delta1* expression in the nervous system and paraxial mesoderm of transgenic mice. *Mech Dev* **95**, 23-34.
- Bellefroid, E. J., Kobbe, A., Gruss, P., Pieler, T., Gurdon, J. B. and Papalopulu, N.** (1998). *Xiro3* encodes a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois genes and functions in neural specification. *Embo J* **17**, 191-203.
- Belting, H. G., Hauptmann, G., Meyer, D., Abdelilah-Seyfried, S., Chitnis, A., Eschbach, C., Soll, I., Thisse, C., Thisse, B., Artinger, K. B. et al.** (2001). *spiel ohne grenzen/pou2* is required during establishment of the zebrafish midbrain-hindbrain boundary organizer. *Development* **128**, 4165-76.
- Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**, 517-30.

- Bingham, S., Chaudhari, S., Vanderlaan, G., Itoh, M., Chitnis, A. and Chandrasekhar, A.** (2003). Neurogenic phenotype of mind bomb mutants leads to severe patterning defects in the zebrafish hindbrain. *Dev Dyn* **228**, 451-63.
- Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemot, F. and Strahle, U.** (1997). The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development* **124**, 4557-69.
- Blader, P., Plessy, C. and Strahle, U.** (2003). Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mech Dev* **120**, 211-8.
- Breslin, M. B., Wang, H. W., Pierce, A., Aucoin, R. and Lan, M. S.** (2007). Neurogenin 3 recruits CBP co-activator to facilitate histone H3/H4 acetylation in the target gene INSM1. *FEBS Lett* **581**, 949-54.
- Brewster, R., Lee, J. and Ruiz i Altaba, A.** (1998). Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature* **393**, 579-83.
- Briscoe, J.** (2009). Making a grade: Sonic Hedgehog signalling and the control of neural cell fate. *Embo J* **28**, 457-65.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M. and Ericson, J.** (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435-45.
- Burgess, S., Reim, G., Chen, W., Hopkins, N. and Brand, M.** (2002). The zebrafish spiel-ohne-grenzen (spg) gene encodes the POU domain protein Pou2 related to mammalian Oct4 and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. *Development* **129**, 905-16.
- Campos-Ortega, J. A.** (1998). The genetics of the Drosophila achaete-scute gene complex: a historical appraisal. *Int J Dev Biol* **42**, 291-7.
- Castro, D. S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I. J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J. A., Nguyen, L., Gossler, A., Gottgens, B. et al.** (2006). Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev Cell* **11**, 831-44.
- Chen, H., Thiagalingam, A., Chopra, H., Borges, M. W., Feder, J. N., Nelkin, B. D., Baylin, S. B. and Ball, D. W.** (1997). Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5355-60.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-13.
- Chien, C. T., Hsiao, C. D., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). Neuronal type information encoded in the basic-helix-loop-helix domain of proneural genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13239-44.
- Cornell, R. A. and Eisen, J. S.** (2002). Delta/Notch signaling promotes formation of zebrafish neural crest by repressing Neurogenin 1 function. *Development* **129**, 2639-48.
- Cubas, P., de Celis, J. F., Campuzano, S. and Modolell, J.** (1991). Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the Drosophila imaginal wing disc. *Genes Dev* **5**, 996-1008.
- Dauger, S., Pattyn, A., Lofaso, F., Gaultier, C., Goridis, C., Gallego, J. and Brunet, J. F.** (2003). Phox2b controls the development of peripheral chemoreceptors and afferent visceral pathways. *Development* **130**, 6635-42.
- Delaune, E., Lemaire, P. and Kodjabachian, L.** (2005). Neural induction in Xenopus requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development* **132**, 299-310.

**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**, 2489-503.

**Dode, C., Fouveaut, C., Mortier, G., Janssens, S., Bertherat, J., Mahoudeau, J., Kottler, M. L., Chabrolle, C., Gancel, A., Francois, I. et al.** (2007). Novel FGFR1 sequence variants in Kallmann syndrome, and genetic evidence that the FGFR1c isoform is required in olfactory bulb and palate morphogenesis. *Hum Mutat* **28**, 97-8.

**Dode, C. and Hardelin, J. P.** (2009). Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* **17**, 139-46.

**Dode, C., Teixeira, L., Levilliers, J., Fouveaut, C., Bouchard, P., Kottler, M. L., Lespinasse, J., Lienhardt-Roussie, A., Mathieu, M., Moerman, A. et al.** (2006). Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* **2**, e175.

**Dubois, L., Bally-Cuif, L., Crozatier, M., Moreau, J., Paquereau, L. and Vincent, A.** (1998). XCoE2, a transcription factor of the Col/Olf-1/EBF family involved in the specification of primary neurons in *Xenopus*. *Curr Biol* **8**, 199-209.

**Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V. and Jessell, T. M.** (1997a). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**, 451-66.

**Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T. M. and Briscoe, J.** (1997b). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* **90**, 169-80.

**Farkas, L. M., Haffner, C., Giger, T., Khaitovich, P., Nowick, K., Birchmeier, C., Paabo, S. and Huttner, W. B.** (2008). Insulinoma-associated 1 has a panneurogenic role and promotes the generation and expansion of basal progenitors in the developing mouse neocortex. *Neuron* **60**, 40-55.

**Fehon, R. G., Kooh, P. J., Rebay, I., Regan, C. L., Xu, T., Muskavitch, M. A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* **61**, 523-34.

**Fekany-Lee, K., Gonzalez, E., Miller-Bertoglio, V. and Solnica-Krezel, L.** (2000). The homeobox gene *bozozok* promotes anterior neuroectoderm formation in zebrafish through negative regulation of BMP2/4 and Wnt pathways. *Development* **127**, 2333-45.

**Fekany, K., Yamanaka, Y., Leung, T., Sirotkin, H. I., Topczewski, J., Gates, M. A., Hibi, M., Renucci, A., Stemple, D., Radbill, A. et al.** (1999). The zebrafish *bozozok* locus encodes Dharma, a homeodomain protein essential for induction of gastrula organizer and dorsoanterior embryonic structures. *Development* **126**, 1427-38.

**Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. I., Schier, A. F. and Talbot, W. S.** (1998). Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* **395**, 181-5.

**Fetcho, J. R. and Faber, D. S.** (1988). Identification of motoneurons and interneurons in the spinal network for escapes initiated by the mauthner cell in goldfish. *J Neurosci* **8**, 4192-213.

**Fetcho, J. R., Higashijima, S. and McLean, D. L.** (2008). Zebrafish and motor control over the last decade. *Brain Res Rev* **57**, 86-93.

**Fetcho, J. R. and O'Malley, D. M.** (1995). Visualization of active neural circuitry in the spinal cord of intact zebrafish. *J Neurophysiol* **73**, 399-406.

**Furthauer, M., Thisse, B. and Thisse, C.** (1999). Three different *noggin* genes antagonize the activity of bone morphogenetic proteins in the zebrafish embryo. *Dev Biol* **214**, 181-96.

**Furthauer, M., Thisse, C. and Thisse, B.** (1997). A role for FGF-8 in the dorsoventral patterning of the zebrafish gastrula. *Development* **124**, 4253-64.

**Garcia-Bellido, A.** (1979). Genetic Analysis of the Achaete-Scute System of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* **91**, 491-520.

- Garcia-Bellido, A. and Santamaria, P.** (1978). Developmental Analysis of the Achaete-Scute System of DROSOPHILA MELANOGASTER. *Genetics* **88**, 469-86.
- Gavalas, A. and Krumlauf, R.** (2000). Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 380-6.
- Ge, W., He, F., Kim, K. J., Bianchi, B., Coskun, V., Nguyen, L., Wu, X., Zhao, J., Heng, J. I., Martinowich, K. et al.** (2006). Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1319-24.
- Geling, A., Itoh, M., Tallafuss, A., Chapouton, P., Tannhauser, B., Kuwada, J. Y., Chitnis, A. B. and Bally-Cuif, L.** (2003). bHLH transcription factor Her5 links patterning to regional inhibition of neurogenesis at the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **130**, 1591-604.
- Geling, A., Plessy, C., Rastegar, S., Strahle, U. and Bally-Cuif, L.** (2004). Her5 acts as a prepattern factor that blocks neurogenin1 and coe2 expression upstream of Notch to inhibit neurogenesis at the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **131**, 1993-2006.
- Gershon, A. A., Rudnick, J., Kalam, L. and Zimmerman, K.** (2000). The homeodomain-containing gene Xdbx inhibits neuronal differentiation in the developing embryo. *Development* **127**, 2945-54.
- Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C.** (1988). From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes Dev* **2**, 495-501.
- Gohlke, J. M., Armant, O., Parham, F. M., Smith, M. V., Zimmer, C., Castro, D. S., Nguyen, L., Parker, J. S., Gradwohl, G., Portier, C. J. et al.** (2008). Characterization of the proneural gene regulatory network during mouse telencephalon development. *BMC Biol* **6**, 15.
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S. et al.** (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet* **31**, 135-40.
- Gray, M., Moens, C. B., Amacher, S. L., Eisen, J. S. and Beattie, C. E.** (2001). Zebrafish deadly seven functions in neurogenesis. *Dev Biol* **237**, 306-23.
- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W. S. and Schier, A. F.** (1999). The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* **97**, 121-32.
- Guillemot, F.** (1999). Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates. *Exp Cell Res* **253**, 357-64.
- Guillemot, F.** (2007). Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* **134**, 3771-80.
- Guner, B. and Karlstrom, R. O.** (2007). Cloning of zebrafish nkx6.2 and a comprehensive analysis of the conserved transcriptional response to Hedgehog/Gli signaling in the zebrafish neural tube. *Gene Expr Patterns* **7**, 596-605.
- Haas, P. and Gilmour, D.** (2006). Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev Cell* **10**, 673-80.
- Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D. and Lewis, J.** (1998). Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development* **125**, 359-70.
- Haenlin, M., Kunisch, M., Kramatschek, B. and Campos-Ortega, J. A.** (1994). Genomic regions regulating early embryonic expression of the Drosophila neurogenic gene Delta. *Mech Dev* **47**, 99-110.
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J. I., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A. P., Parras, C. et al.** (2005). Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* **48**, 45-62.

- Hans, S. and Campos-Ortega, J. A.** (2002). On the organisation of the regulatory region of the zebrafish deltaD gene. *Development* **129**, 4773-84.
- Hans, S., Scheer, N., Riedl, I., v Weizsacker, E., Blader, P. and Campos-Ortega, J. A.** (2004). her3, a zebrafish member of the hairy-E(spl) family, is repressed by Notch signalling. *Development* **131**, 2957-69.
- Hardelin, J. P. and Dode, C.** (2008). The complex genetics of Kallmann syndrome: KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROK2, et al. *Sex Dev* **2**, 181-93.
- Hartenstein, V. and Posakony, J. W.** (1990). A dual function of the Notch gene in Drosophila sensillum development. *Dev Biol* **142**, 13-30.
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F. and Kageyama, R.** (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* **131**, 5539-50.
- Hatakeyama, J. and Kageyama, R.** (2004). Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 83-9.
- Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T. and Kageyama, R.** (2001). Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* **128**, 1313-22.
- Hauptmann, G., Belting, H. G., Wolke, U., Lunde, K., Soll, I., Abdelilah-Seyfried, S., Prince, V. and Driever, W.** (2002). spiel ohne grenzen/pou2 is required for zebrafish hindbrain segmentation. *Development* **129**, 1645-55.
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C. and Simpson, P.** (1996). Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in Drosophila. *Development* **122**, 161-71.
- Heitzler, P. and Simpson, P.** (1993). Altered epidermal growth factor-like sequences provide evidence for a role of Notch as a receptor in cell fate decisions. *Development* **117**, 1113-23.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Melton, D. A.** (1994). Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in Xenopus. *Cell* **77**, 273-81.
- Heng, J. I., Nguyen, L., Castro, D. S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J. M., Hevner, R. et al.** (2008). Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature* **455**, 114-8.
- Henke, R. M., Meredith, D. M., Borromeo, M. D., Savage, T. K. and Johnson, J. E.** (2009). Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube. *Dev Biol* **328**, 529-40.
- Hernandez, R. E., Rikhof, H. A., Bachmann, R. and Moens, C. B.** (2004). vhnf1 integrates global RA patterning and local FGF signals to direct posterior hindbrain development in zebrafish. *Development* **131**, 4511-20.
- Hild, M., Dick, A., Rauch, G. J., Meier, A., Bouwmeester, T., Haffter, P. and Hammerschmidt, M.** (1999). The smad5 mutation somitabun blocks Bmp2b signaling during early dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* **126**, 2149-59.
- Hinz, U., Giebel, B. and Campos-Ortega, J. A.** (1994). The basic-helix-loop-helix domain of Drosophila lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* **76**, 77-87.
- Ho, C. Y., Houart, C., Wilson, S. W. and Stainier, D. Y.** (1999). A role for the extraembryonic yolk syncytial layer in patterning the zebrafish embryo suggested by properties of the hex gene. *Curr Biol* **9**, 1131-4.
- Holley, S. A., Geisler, R. and Nusslein-Volhard, C.** (2000). Control of her1 expression during zebrafish somitogenesis by a delta-dependent oscillator and an independent wave-front activity. *Genes Dev* **14**, 1678-90.

- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M. and Wilson, S.** (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* **35**, 255-65.
- Houart, C., Westerfield, M. and Wilson, S. W.** (1998). A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature* **391**, 788-92.
- Hynes, M., Ye, W., Wang, K., Stone, D., Murone, M., Sauvage, F. and Rosenthal, A.** (2000). The seven-transmembrane receptor smoothed cell-autonomously induces multiple ventral cell types. *Nat Neurosci* **3**, 41-6.
- Iemura, S., Yamamoto, T. S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino, H. and Ueno, N.** (1998). Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9337-42.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K. and Kageyama, R.** (2010). Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci* **30**, 3489-98.
- Imayoshi, I., Shimogori, T., Ohtsuka, T. and Kageyama, R.** (2008). Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. *Development* **135**, 2531-41.
- Ishibashi, M., Ang, S. L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R. and Guillemot, F.** (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev* **9**, 3136-48.
- Ishibashi, M., Moriyoshi, K., Sasai, Y., Shiota, K., Nakanishi, S. and Kageyama, R.** (1994). Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *Embo J* **13**, 1799-805.
- Itoh, M., Kim, C. H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y. J., Maust, D., Yeo, S. Y., Lorick, K., Wright, G. J., Ariza-McNaughton, L. et al.** (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* **4**, 67-82.
- Itoh, M., Kudoh, T., Dedekian, M., Kim, C. H. and Chitnis, A. B.** (2002). A role for *iro1* and *iro7* in the establishment of an anteroposterior compartment of the ectoderm adjacent to the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **129**, 2317-27.
- Jacob, J. and Briscoe, J.** (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep* **4**, 761-5.
- Jacob, J., Storm, R., Castro, D. S., Milton, C., Pla, P., Guillemot, F., Birchmeier, C. and Briscoe, J.** (2009). *Insm1* (IA-1) is an essential component of the regulatory network that specifies monoaminergic neuronal phenotypes in the vertebrate hindbrain. *Development* **136**, 2477-85.
- Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1993). *atonal* is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell* **73**, 1307-21.
- Jarman, A. P., Grell, E. H., Ackerman, L., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1994). *Atonal* is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* **369**, 398-400.
- Jarman, A. P., Sun, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1995). Role of the proneural gene, *atonal*, in formation of *Drosophila* chordotonal organs and photoreceptors. *Development* **121**, 2019-30.
- Jessell, T. M.** (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-9.
- Jiang, Y. J., Brand, M., Heisenberg, C. P., Beuchle, D., Furutani-Seiki, M., Kelsh, R. N., Warga, R. M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M. et al.** (1996). Mutations

affecting neurogenesis and brain morphology in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 205-16.

**Julich, D., Hwee Lim, C., Round, J., Nicolaije, C., Schroeder, J., Davies, A., Geisler, R., Lewis, J., Jiang, Y. J. and Holley, S. A.** (2005). beamter/deltaC and the role of Notch ligands in the zebrafish somite segmentation, hindbrain neurogenesis and hypochord differentiation. *Dev Biol* **286**, 391-404.

**Kageyama, R., Ohtsuka, T., Hatakeyama, J. and Ohsawa, R.** (2005). Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* **306**, 343-8.

**Kageyama, R., Ohtsuka, T. and Kobayashi, T.** (2008a). Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ* **50 Suppl 1**, S97-103.

**Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H. and Imayoshi, I.** (2008b). Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat Neurosci* **11**, 1247-51.

**Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H. and Imayoshi, I.** (2009). Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 733-40.

**Kanekar, S., Perron, M., Dorsky, R., Harris, W. A., Jan, L. Y., Jan, Y. N. and Vetter, M. L.** (1997). Xath5 participates in a network of bHLH genes in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* **19**, 981-94.

**Kay, J. N., Finger-Baier, K. C., Roeser, T., Staub, W. and Baier, H.** (2001). Retinal ganglion cell genesis requires lakritz, a Zebrafish atonal Homolog. *Neuron* **30**, 725-36.

**Kimmel, C. B., Hatta, K. and Eisen, J. S.** (1991). Genetic control of primary neuronal development in zebrafish. *Development Suppl* **2**, 47-57.

**Kishimoto, Y., Lee, K. H., Zon, L., Hammerschmidt, M. and Schulte-Merker, S.** (1997). The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. *Development* **124**, 4457-66.

**Knaut, H., Blader, P., Strahle, U. and Schier, A. F.** (2005). Assembly of trigeminal sensory ganglia by chemokine signaling. *Neuron* **47**, 653-66.

**Knaut, H., Werz, C., Geisler, R. and Nusslein-Volhard, C.** (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor *Cxcr4* is a germ-cell guidance receptor. *Nature* **421**, 279-82.

**Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K. and Kageyama, R.** (2009). The cyclic gene *Hes1* contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes Dev* **23**, 1870-5.

**Koide, T., Miyasaka, N., Morimoto, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Kawakami, K. and Yoshihara, Y.** (2009). Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9884-9.

**Koos, D. S. and Ho, R. K.** (1998). The *nieuwkoid* gene characterizes and mediates a Nieuwkoop-center-like activity in the zebrafish. *Curr Biol* **8**, 1199-206.

**Koshida, S., Shinya, M., Mizuno, T., Kuroiwa, A. and Takeda, H.** (1998). Initial anteroposterior pattern of the zebrafish central nervous system is determined by differential competence of the epiblast. *Development* **125**, 1957-66.

**Kunisch, M., Haenlin, M. and Campos-Ortega, J. A.** (1994). Lateral inhibition mediated by the *Drosophila* neurogenic gene *delta* is enhanced by proneural proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10139-43.

**Langenau, D. M., Palomero, T., Kanki, J. P., Ferrando, A. A., Zhou, Y., Zon, L. I. and Look, A. T.** (2002). Molecular cloning and developmental expression of *Tlx* (*Hox11*) genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Mech Dev* **117**, 243-8.

**Lecaudey, V., Anselme, I., Rosa, F. and Schneider-Maunoury, S.** (2004). The zebrafish *Iroquois* gene *iro7* positions the r4/r5 boundary and controls neurogenesis in the rostral hindbrain. *Development* **131**, 3121-31.

- Lecourtois, M. and Schweisguth, F.** (1995). The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev* **9**, 2598-608.
- Lee, K. J., Dietrich, P. and Jessell, T. M.** (2000). Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* **403**, 734-40.
- 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**, 731-45.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G. and Jessell, T. M.** (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* **91**, 127-38.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G., Roelink, H. and Jessell, T. M.** (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**, 969-79.
- Litingtung, Y. and Chiang, C.** (2000). Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci* **3**, 979-85.
- Liu, A. and Niswander, L. A.** (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* **6**, 945-54.
- Liu, K. S., Gray, M., Otto, S. J., Fetcho, J. R. and Beattie, C. E.** (2003). Mutations in deadly seven/notch1a reveal developmental plasticity in the escape response circuit. *J Neurosci* **23**, 8159-66.
- Liu, W., Mo, Z. and Xiang, M.** (2001). The Ath5 proneural genes function upstream of Brn3 POU domain transcription factor genes to promote retinal ganglion cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1649-54.
- Liu, W. D., Wang, H. W., Muguira, M., Breslin, M. B. and Lan, M. S.** (2006). INSM1 functions as a transcriptional repressor of the neuroD/beta2 gene through the recruitment of cyclin D1 and histone deacetylases. *Biochem J* **397**, 169-77.
- Lupo, G., Harris, W. A. and Lewis, K. E.** (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**, 103-14.
- Madelaine, R. and Blader, P.** (2010). A cluster of non-redundant Ngn1 binding sites is required for regulation of deltaA expression in zebrafish. *Dev Biol*.
- Marchal, L., Luxardi, G., Thome, V. and Kodjabachian, L.** (2009). BMP inhibition initiates neural induction via FGF signaling and Zic genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17437-42.
- Mattar, P., Britz, O., Johannes, C., Nieto, M., Ma, L., Rebeyka, A., Klenin, N., Polleux, F., Guillemot, F. and Schuurmans, C.** (2004). A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex. *Dev Biol* **273**, 373-89.
- McClintock, J. M., Carlson, R., Mann, D. M. and Prince, V. E.** (2001). Consequences of Hox gene duplication in the vertebrates: an investigation of the zebrafish Hox paralogue group 1 genes. *Development* **128**, 2471-84.
- Mendelson, B.** (1986). Development of reticulospinal neurons of the zebrafish. I. Time of origin. *J Comp Neurol* **251**, 160-71.
- Miyasaka, N., Knaut, H. and Yoshihara, Y.** (2007). Cxcl12/Cxcr4 chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system. *Development* **134**, 2459-68.
- Miyasaka, N., Morimoto, K., Tsubokawa, T., Higashijima, S., Okamoto, H. and Yoshihara, Y.** (2009). From the olfactory bulb to higher brain centers: genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish. *J Neurosci* **29**, 4756-67.

- Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S. Y., Hutson, L. D., Chien, C. B., Okamoto, H. and Yoshihara, Y.** (2005). Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development* **132**, 1283-93.
- Moens, C. B., Yan, Y. L., Appel, B., Force, A. G. and Kimmel, C. B.** (1996). valentino: a zebrafish gene required for normal hindbrain segmentation. *Development* **122**, 3981-90.
- Monnier, C., Dode, C., Fabre, L., Teixeira, L., Labesse, G., Pin, J. P., Hardelin, J. P. and Rondard, P.** (2009). PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum Mol Genet* **18**, 75-81.
- Nakao, K. and Campos-Ortega, J. A.** (1996). Persistent expression of genes of the enhancer of split complex suppresses neural development in Drosophila. *Neuron* **16**, 275-86.
- Nakaya, N., Lee, H. S., Takada, Y., Tzchori, I. and Tomarev, S. I.** (2008). Zebrafish olfactomedin 1 regulates retinal axon elongation in vivo and is a modulator of Wnt signaling pathway. *J Neurosci* **28**, 7900-10.
- Nguyen, V. H., Schmid, B., Trout, J., Connors, S. A., Ekker, M. and Mullins, M. C.** (1998). Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula, including the neural crest progenitors, are established by a bmp2b/swirl pathway of genes. *Dev Biol* **199**, 93-110.
- Nguyen, V. H., Trout, J., Connors, S. A., Andermann, P., Weinberg, E. and Mullins, M. C.** (2000). Dorsal and intermediate neuronal cell types of the spinal cord are established by a BMP signaling pathway. *Development* **127**, 1209-20.
- Nikolaou, N., Watanabe-Asaka, T., Gerety, S., Distel, M., Koster, R. W. and Wilkinson, D. G.** (2009). Lunatic fringe promotes the lateral inhibition of neurogenesis. *Development* **136**, 2523-33.
- Ninkovic, J., Tallafuss, A., Leucht, C., Topczewski, J., Tannhauser, B., Solnica-Krezel, L. and Bally-Cuif, L.** (2005). Inhibition of neurogenesis at the zebrafish midbrain-hindbrain boundary by the combined and dose-dependent activity of a new hairy/E(spl) gene pair. *Development* **132**, 75-88.
- 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**, 773-89.
- Ohsawa, R. and Kageyama, R.** (2008). Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res* **1192**, 90-8.
- Palevitch, O., Abraham, E., Borodovsky, N., Levkowitz, G., Zohar, Y. and Gothilf, Y.** (2009). Cxcl12a-Cxcr4b signaling is important for proper development of the forebrain GnRH system in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* **165**, 262-8.
- Park, H. C., Mehta, A., Richardson, J. S. and Appel, B.** (2002). olig2 is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development. *Dev Biol* **248**, 356-68.
- Parks, A. L. and Muskavitch, M. A.** (1993). Delta function is required for bristle organ determination and morphogenesis in Drosophila. *Dev Biol* **157**, 484-96.
- Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J. and Guillemot, F.** (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* **16**, 324-38.
- Pattyn, A., Hirsch, M., Goridis, C. and Brunet, J. F.** (2000). Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene Phox2b. *Development* **127**, 1349-58.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C. and Brunet, J. F.** (1999). The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* **399**, 366-70.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M.** (1996). Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**, 589-98.

- Pogoda, H. M., von der Hardt, S., Herzog, W., Kramer, C., Schwarz, H. and Hammerschmidt, M.** (2006). The proneural gene *ascl1a* is required for endocrine differentiation and cell survival in the zebrafish adenohypophysis. *Development* **133**, 1079-89.
- Powell, L. M., Deaton, A. M., Wear, M. A. and Jarman, A. P.** (2008). Specificity of Atonal and Scute bHLH factors: analysis of cognate E box binding sites and the influence of Senseless. *Genes Cells* **13**, 915-29.
- Powell, L. M. and Jarman, A. P.** (2008). Context dependence of proneural bHLH proteins. *Curr Opin Genet Dev* **18**, 411-7.
- Prince, V. E., Moens, C. B., Kimmel, C. B. and Ho, R. K.** (1998). Zebrafish hox genes: expression in the hindbrain region of wild-type and mutants of the segmentation gene, *valentino*. *Development* **125**, 393-406.
- Reim, G. and Brand, M.** (2002). *Spiel-ohne-grenzen/pou2* mediates regional competence to respond to Fgf8 during zebrafish early neural development. *Development* **129**, 917-33.
- Rhinn, M. and Brand, M.** (2001). The midbrain--hindbrain boundary organizer. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 34-42.
- Rodriguez, I., Hernandez, R., Modolell, J. and Ruiz-Gomez, M.** (1990). Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordia. *Embo J* **9**, 3583-92.
- Romani, S., Campuzano, S. and Modolell, J.** (1987). The achaete-scute complex is expressed in neurogenic regions of *Drosophila* embryos. *Embo J* **6**, 2085-92.
- Roussigne, M., Bianco, I. H., Wilson, S. W. and Blader, P.** (2009). Nodal signalling imposes left-right asymmetry upon neurogenesis in the habenular nuclei. *Development* **136**, 1549-57.
- Schulte-Merker, S., Lee, K. J., McMahon, A. P. and Hammerschmidt, M.** (1997). The zebrafish organizer requires *chordin*. *Nature* **387**, 862-3.
- Schwanzel-Fukuda, M., Bick, D. and Pfaff, D. W.** (1989). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res* **6**, 311-26.
- Schwanzel-Fukuda, M. and Pfaff, D. W.** (1989). Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* **338**, 161-4.
- Schwarting, G. A., Henion, T. R., Nugent, J. D., Caplan, B. and Tobet, S.** (2006). Stromal cell-derived factor-1 (chemokine C-X-C motif ligand 12) and chemokine C-X-C motif receptor 4 are required for migration of gonadotropin-releasing hormone neurons to the forebrain. *J Neurosci* **26**, 6834-40.
- Schweisguth, F.** (1995). Suppressor of Hairless is required for signal reception during lateral inhibition in the *Drosophila* pupal notum. *Development* **121**, 1875-84.
- Seo, S., Lim, J. W., Yellajoshiyula, D., Chang, L. W. and Kroll, K. L.** (2007). Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers. *Embo J* **26**, 5093-108.
- Shih, J. and Fraser, S. E.** (1996). Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage. *Development* **122**, 1313-22.
- Shimizu, T., Nakazawa, M., Kani, S., Bae, Y. K., Shimizu, T., Kageyama, R. and Hibi, M.** (2010). Zinc finger genes *Fezf1* and *Fezf2* control neuronal differentiation by repressing *Hes5* expression in the forebrain. *Development* **137**, 1875-85.
- Shimizu, T., Yamanaka, Y., Ryu, S. L., Hashimoto, H., Yabe, T., Hirata, T., Bae, Y. K., Hibi, M. and Hirano, T.** (2000). Cooperative roles of *Bozozok/Dharma* and Nodal-related proteins in the formation of the dorsal organizer in zebrafish. *Mech Dev* **91**, 293-303.
- Shimojo, H., Ohtsuka, T. and Kageyama, R.** (2008). Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* **58**, 52-64.

- Simpson, P. and Carteret, C.** (1990). Proneural clusters: equivalence groups in the epithelium of *Drosophila*. *Development* **110**, 927-32.
- Sirotkin, H. I., Dougan, S. T., Schier, A. F. and Talbot, W. S.** (2000). *bozozok* and *squint* act in parallel to specify dorsal mesoderm and anterior neuroectoderm in zebrafish. *Development* **127**, 2583-92.
- Smith, W. C. and Harland, R. M.** (1992). Expression cloning of *noggin*, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* **70**, 829-40.
- Smith, W. C., Knecht, A. K., Wu, M. and Harland, R. M.** (1993). Secreted *noggin* protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing *Xenopus* mesoderm. *Nature* **361**, 547-9.
- Sobieszczuk, D. F., Poliakov, A., Xu, Q. and Wilkinson, D. G.** (2010). A feedback loop mediated by degradation of an inhibitor is required to initiate neuronal differentiation. *Genes Dev* **24**, 206-18.
- Sugimori, M., Nagao, M., Bertrand, N., Parras, C. M., Guillemot, F. and Nakafuku, M.** (2007). Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord. *Development* **134**, 1617-29.
- Takke, C. and Campos-Ortega, J. A.** (1999). *her1*, a zebrafish pair-rule like gene, acts downstream of notch signalling to control somite development. *Development* **126**, 3005-14.
- Takke, C., Dornseifer, P., v Weizsacker, E. and Campos-Ortega, J. A.** (1999). *her4*, a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *E(spl)*, is a target of NOTCH signalling. *Development* **126**, 1811-21.
- Timmer, J. R., Wang, C. and Niswander, L.** (2002). BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. *Development* **129**, 2459-72.
- Tomarev, S. I. and Nakaya, N.** (2009). Olfactomedin domain-containing proteins: possible mechanisms of action and functions in normal development and pathology. *Mol Neurobiol* **40**, 122-38.
- Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F. and Kageyama, R.** (2000). Mammalian *achaete-scute* and *atonal* homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *Embo J* **19**, 5460-72.
- Tsutsumi, M. and Itoh, M.** (2007). Novel transcript *nort* is a downstream target gene of the Notch signaling pathway in zebrafish. *Gene Expr Patterns* **7**, 227-32.
- Varga, Z. M., Amores, A., Lewis, K. E., Yan, Y. L., Postlethwait, J. H., Eisen, J. S. and Westerfield, M.** (2001). Zebrafish *smoothed* functions in ventral neural tube specification and axon tract formation. *Development* **128**, 3497-509.
- Vosper, J. M., Fiore-Herliche, C. S., Horan, I., Wilson, K., Wise, H. and Philpott, A.** (2007). Regulation of neurogenin stability by ubiquitin-mediated proteolysis. *Biochem J* **407**, 277-84.
- Vosper, J. M., McDowell, G. S., Hindley, C. J., Fiore-Herliche, C. S., Kucerova, R., Horan, I. and Philpott, A.** (2009). Ubiquitylation on canonical and non-canonical sites targets the transcription factor neurogenin for ubiquitin-mediated proteolysis. *J Biol Chem* **284**, 15458-68.
- Wang, S. W., Kim, B. S., Ding, K., Wang, H., Sun, D., Johnson, R. L., Klein, W. H. and Gan, L.** (2001). Requirement for *math5* in the development of retinal ganglion cells. *Genes Dev* **15**, 24-9.
- Whitlock, K. E., Smith, K. M., Kim, H. and Harden, M. V.** (2005). A role for *foxd3* and *sox10* in the differentiation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the zebrafish *Danio rerio*. *Development* **132**, 5491-502.
- Whitlock, K. E. and Westerfield, M.** (1998). A transient population of neurons pioneers the olfactory pathway in the zebrafish. *J Neurosci* **18**, 8919-27.

- Whitlock, K. E. and Westerfield, M.** (2000). The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development* **127**, 3645-53.
- Wiellette, E. L. and Sive, H.** (2003). *vhnf1* and *Fgf* signals synergize to specify rhombomere identity in the zebrafish hindbrain. *Development* **130**, 3821-9.
- Wilson, P. A. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1997). Vertebrate neural induction: inducers, inhibitors, and a new synthesis. *Neuron* **18**, 699-710.
- Wilson, S. I. and Edlund, T.** (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1161-8.
- Wilson, S. I., Graziano, E., Harland, R., Jessell, T. M. and Edlund, T.** (2000). An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol* **10**, 421-9.
- Wurst, W. and Bally-Cuif, L.** (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nat Rev Neurosci* **2**, 99-108.
- Yamaguchi, T. P.** (2001). Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol* **11**, R713-24.
- Yamanaka, Y., Mizuno, T., Sasai, Y., Kishi, M., Takeda, H., Kim, C. H., Hibi, M. and Hirano, T.** (1998). A novel homeobox gene, *dharma*, can induce the organizer in a non-cell-autonomous manner. *Genes Dev* **12**, 2345-53.
- Yanicostas, C., Herbomel, E., Dipietromaria, A. and Soussi-Yanicostas, N.** (2009). Anosmin-1a is required for fasciculation and terminal targeting of olfactory sensory neuron axons in the zebrafish olfactory system. *Mol Cell Endocrinol* **312**, 53-60.
- Yeo, S. Y., Kim, M., Kim, H. S., Huh, T. L. and Chitnis, A. B.** (2007). Fluorescent protein expression driven by *her4* regulatory elements reveals the spatiotemporal pattern of Notch signaling in the nervous system of zebrafish embryos. *Dev Biol* **301**, 555-67.
- Zhang, T., Liu, W. D., Saunee, N. A., Breslin, M. B. and Lan, M. S.** (2009). Zinc finger transcription factor INSM1 interrupts cyclin D1 and CDK4 binding and induces cell cycle arrest. *J Biol Chem* **284**, 5574-81.
- Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M. and Harland, R. M.** (1996). The Spemann organizer signal *noggin* binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**, 599-606.

During my thesis, I have studied specific activity of bHLH transcription factor called proneural genes which are necessary and sufficient for the formation of neurons. The two families of proneural genes: *achaete-scute* and *atonal* have divergent activities in the formation of neurons. Proneural genes are transcription factor, making it likely that divergent activity between *atonal* and *achaete-scute* family comes from transcriptional regulation of specific targets genes. To understand these divergences, we have begun a study of *deltaA* gene regulation. The functional analysis of the *deltaA* promoter led us to identify a cluster of three non-redundant E-Box which act in a cooperative manner to allow DNA binding and regulation of *deltaA* by Ngn1. This study provides a novel mechanism for the regulation of target genes by proneural genes of the *neurogenin* family. In order to have a better understanding of specific Ngn1 activity in control of neuronal identity, I have studied the function of two specific Ngn1 target genes, *neurod4* and *cxc4b*. In the developing olfactory placode, early *neurod4* or *cxc4b* expression is dependent of Ngn1. I have show that in absence of Ngn1 and Neurod4, olfactory neurons are totally lost indicating that these two genes act in a redundant manner to control olfactory neurogenesis. I have show that early *cxc4b* expression which is lost in *ngn1* mutant is necessary to allow axonal projection of olfactory neurons on the olfactory bulb. Interestingly, *cxc4b* is expressed only in neural progenitor but his function is required in differentiated neurons. Ngn1 activity is necessary in neural progenitor to control neuron behaviour.

**MADELAINE Romain**

**Identification de nouveaux gènes cibles du facteur proneural Ngn1 et analyse de leurs fonctions dans la détermination et la spécification neuronale chez le poisson zèbre.**

**Directeur de thèse : Dr. Patrick BLADER**

**Le 11 février 2011 à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier**

**Résumé:** Lors de ma thèse, j'ai étudié les activités spécifiques de facteurs de transcription à domaine bHLH, appelés gènes proneuraux, qui sont nécessaires et suffisants pour la formation des neurones. Les deux familles de facteurs proneuraux, *achaete-scute* et *atonal*, ont des activités différentes dans la formation des neurones. Les facteurs proneuraux sont des facteurs de transcription, il est donc possible que leurs activités spécifiques reflètent la régulation d'un ensemble de gènes cibles spécifiques. Afin de mieux comprendre ces divergences d'activités, nous avons étudié la régulation du gène *deltaA*. L'analyse fonctionnelle du promoteur de *deltaA* a permis d'identifier un cluster de trois E-Box non-redondantes qui agissent en coopération pour permettre la fixation de Ngn1 et la régulation de *deltaA*. Cette étude met en évidence un nouveau mécanisme de régulation des gènes cibles par les facteurs proneuraux de la famille *neurogenin*. Dans le but de mieux comprendre l'activité spécifique de Ngn1, nous avons étudié la fonction de deux gènes cibles spécifiques, *neurod4* et *cxcr4b*. Dans la placode olfactive, les expressions précoces de *neurod4* et *cxcr4b* sont dépendantes de Ngn1. Nous avons montré qu'en l'absence de *ngn1* et *neurod4*, les neurones olfactifs sont perdus indiquant que ces deux gènes sont redondants pour la neurogenèse olfactive. Ensuite, nous avons montré que l'expression précoce de *cxcr4b*, qui est perdue dans le mutant *ngn1*, est nécessaire pour la projection des axones des neurones olfactifs sur le bulbe olfactif. Ainsi, *cxcr4b* est exprimé dans les progéniteurs neuronaux mais sa fonction est requise dans les neurones différenciés pour contrôler le comportement cellulaire du neurone.

**Mots clés :** *ngn1*, *deltaA*, *neuroD4*, *cxcr4b*, *robo2*, facteur proneural, neurogenèse, poisson zèbre, régulation transcriptionnelle, guidance axonale.

**Discipline :** Biologie, Santé et Biotechnologies : spécialité Gènes, Cellules et Développement.

Centre de Biologie du Développement – CNRS UMR5547  
Bat.4R3 – 118, route de Narbonne  
31062 Toulouse, France.