

2011-2012

CARACTERISATION CELLULAIRE DE L'EXPRESSION
DE GENES APPARTENANT AU CLUSTER *HoxB*
DANS LE CERVEAU POST-NATAL ET ADULTE CHEZ
LA SOURIS

Mémoire présenté par Cécile Coste

en vue de l'obtention du diplôme de master en Biochimie
et Biologie Moléculaire et Cellulaire



Institut des sciences de la vie
Université catholique de Louvain La Neuve

Promotrice : Françoise Gofflot
Encadrant : Nicolas Theys



Au terme de cette magnifique expérience je tiens à remercier toutes les personnes y ayant participé.

Je voudrais avant tout remercier le professeur Françoise Gofflot de m'avoir accueillie au sein de son équipe mais également pour son aide, sa disponibilité, son enthousiasme, ses encouragements et ses corrections.

Je tiens également à remercier Nicolas Theys pour son encadrement ainsi que les membres du laboratoire, Benoît Lizen pour son aide au cours de ces dernières semaines, Marie-Thérèse Ahn et Konstantin Doshishti-Agolli pour leur aide précieuse, leurs conseils et leur bonne humeur.

Sans oublier les membres des unités Cell et EMCA pour leur gentillesse, leur disponibilité, leurs conseils judicieux et les verres du vendredi soir.

Un immense merci à mes parents pour m'avoir permis de réaliser ces deux années à l'étranger et pour leur soutien sans faille. Merci également à Bastien pour ses encouragements ainsi qu'à mes amis et les mémorants de l'équipe Cell, Typhanie, Diane, Stéphanie, Denis et Pierre sans qui cette année n'aurait pas été si agréable.

Enfin, un remerciement s'adresse à mes lecteurs pour le temps consacré à la lecture de mon mémoire.

Cécile Coste

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	3
1. LES GENES HOX	3
1.1. GENERALITES SUR LES GENES HOX	3
1.1.1. Structure des gènes <i>Hox</i>	3
1.1.2. Gènes <i>Hox</i> et développement embryonnaire	4
1.1.3. Gènes <i>Hox</i> et système nerveux central	5
1.2. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES HOX	6
1.2.1. Régulation de l'état de condensation de la chromatine	6
1.2.2. Régulation de l'expression des gènes <i>Hox</i> par les éléments cis-régulateurs	6
1.3. LES PROTEINES HOX	8
2. LE SYSTEME NERVEUX ET LE CERVEAU	8
2.1. PRESENTATION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	9
2.2. DEVELOPPEMENT	9
2.2.1. Le prosencéphale	10
2.2.2. Le mésencéphale	10
2.2.3. Le rhombencéphale	10
2.2.4. La moelle épinière	11
2.3. RELATION STRUCTURE-FONCTIONS DU CERVEAU ANTERIEUR	11
2.3.1. Le cortex	11
2.3.2. Le thalamus	13
2.4. RELATION STRUCTURE-FONCTIONS DU CERVEAU MEDIAN	13
2.5. RELATION STRUCTURE-FONCTIONS DU CERVEAU POSTERIEUR ET DE LA MOELLE	14
3. HOXB1, HOXB3 ET HOXB4	15
3.1. CONTEXTE DE L'ETUDE	15
3.2. HOXB1	16
3.2.1. Territoires d'expression embryonnaires et régulation d'expression	16
3.2.2. Mutants	17
3.2.3. Données chez l'adulte	17
3.3. HOXB3	17
3.3.1. Territoires d'expression embryonnaires et régulation d'expression	17
3.3.2. Mutants	18
3.3.3. Données chez l'adulte	19
3.4. HOXB4	19
3.4.1. Territoires d'expression embryonnaires et régulation d'expression	19
3.4.2. Mutants	20
3.4.3. Données chez l'adulte	20
II. OBJECTIFS	21
III. MATERIEL ET METHODES	22
INTRODUCTION	22
1. OBTENTION DES CERVEAUX	23
1.1. SOURIS	23
1.2. PRELEVEMENTS	23
1.2.1. Pour la RT-qPCR	23
1.2.2. Pour les hybridations <i>in situ</i> sur coupe	24
1.2.3. Pour western-blottings : extraction et dosage de protéines	24
1.2.4. Pour les immunohistochimies	25
2. RT-qPCR	26
2.1. GENES DE REFERENCE	26

2.2.	QUANTIFICATION : METHODE DU $\Delta\Delta Cq$	26
2.3.	PROCEDURE.....	26
3.	HYBRIDATION <i>IN SITU</i> (HIS).....	27
3.1.	OBTENTION DES COUPES.....	27
3.2.	PRODUCTION DES SONDES.....	28
3.2.1.	Plasmides.....	28
3.2.2.	Linéarisation.....	28
3.2.3.	Transcription.....	29
3.3.	HYBRIDATION.....	30
3.3.1.	Procédure HIS sur coupes.....	30
3.3.2.	Contre coloration.....	33
3.3.3.	Observations et annotations.....	34
4.	DETECTION DES PROTEINES.....	34
4.1.	TEST DE SPECIFICITE DES ANTICORPS COMMERCIAUX PAR WESTERN-BLOTTING.....	34
4.1.1.	Dosage BCA.....	34
4.1.2.	Western-Blotting.....	35
4.2.	IMMUNOHISTOCHIMIES SUR COUPES DE CERVEAUX PERFUSES.....	39
4.2.1.	Procédure.....	39
4.2.2.	Observation.....	40
IV.	RESULTATS.....	41
INTRODUCTION.....		41
1.	RT-qPCR.....	41
2.	HYBRIDATION <i>IN SITU</i>.....	42
2.1.	LES CONTROLES.....	42
2.2.	BRUIT DE FOND.....	42
2.3.	ANNOTATION DU SIGNAL.....	43
2.4.	PATRON D'EXPRESSION CHEZ L'ADULTE.....	43
2.4.1.	<i>Hoxb1</i>	43
2.4.2.	<i>Hoxb3</i> et <i>Hoxb4</i>	45
2.5.	MISE EN PLACE DU PATRON ADULTE : STADES POSTNATAUX.....	47
3.	WESTERN-BLOTTINGS.....	49
4.	IMMUNOHISTOCHIMIES.....	51
4.1.	VALIDATION DES ANTICORPS SUR EMBRYONS DE 12,5DPC.....	51
4.2.	IMMUNOHISTOCHIMIES SUR CERVEAUX ADULTES.....	52
V.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	54
1.	ANALYSE COMPARATIVE DES DONNEES D'EXPRESSION.....	54
2.	DETECTION DES PROTEINES HOX.....	56
3.	ANALYSE DES PROFILS D'EXPRESSION DES GENES <i>HOXB1</i>, <i>HOXB3</i> ET <i>HOXB4</i>.....	57
4.	FONCTIONS DES GENES <i>HOX</i> DANS LE SNC ADULTE.....	59
4.1.	LES VOIES SENSORIELLES.....	59
4.2.	LES VOIES MOTRICES.....	60
4.3.	FONCTIONS BIOLOGIQUES DES GENES <i>HOX</i>	61
4.4.	ETUDE DES CIBLES POTENTIELLES.....	63
5.	CONCLUSIONS.....	64
VI.	ANNEXES.....	66
LISTE DES ABREVIATIONS.....		66
VII.	BIBLIOGRAPHIE.....	68

I. Introduction

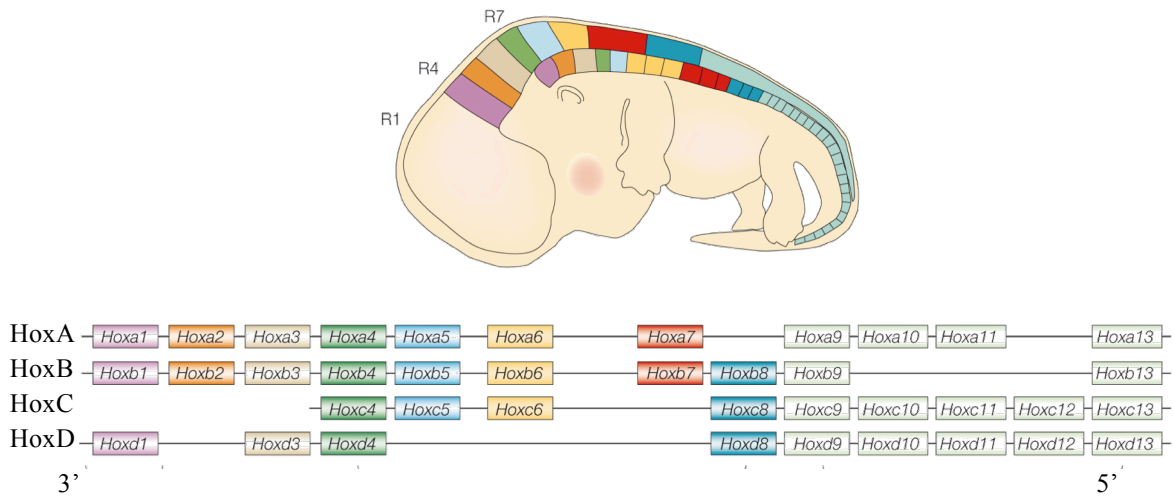


Fig. 1 : Représentation des 39 gènes *Hox* des mammifères répartis sur 4 chromosomes et en 13 groupes paralogues, en relation avec leurs territoires d'expression chez un embryon de souris à 12,5dpc. (Pearson *et al.*, 2005)

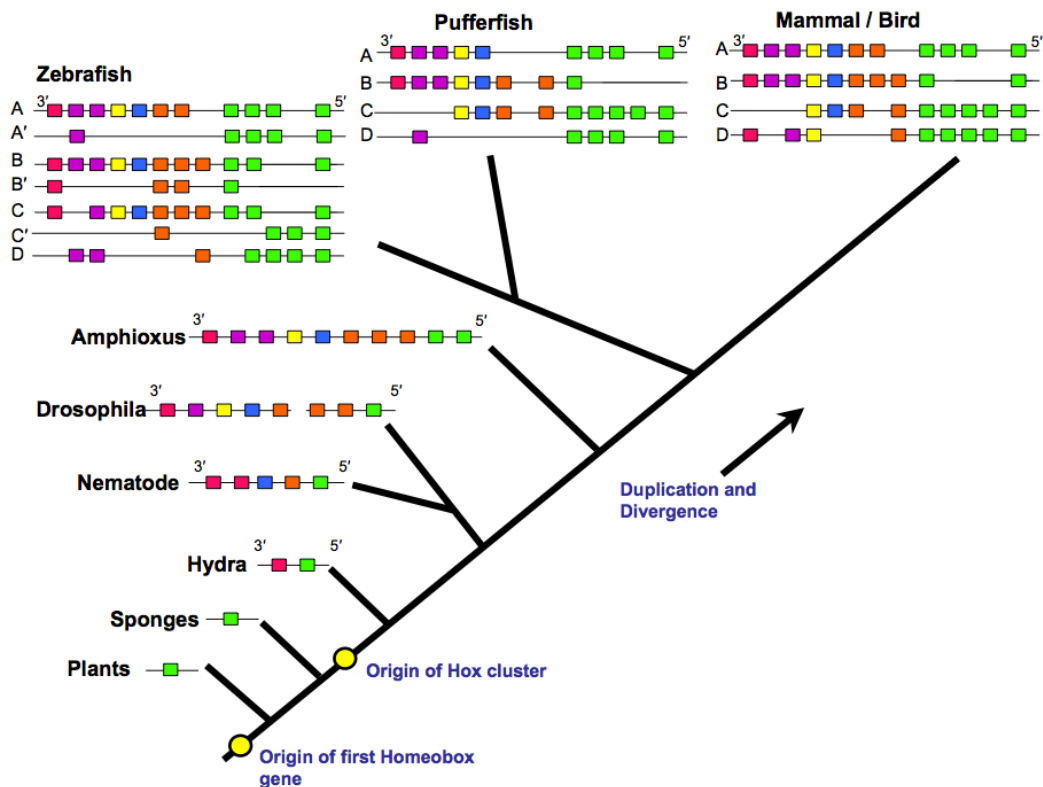


Fig. 2 : Arbre phylogénétique représentant l'évolution des complexes *Hox*. Duplication de l'homéogène pour former un complexe protohox de 2 gènes. Ce complexe est homologue au complexe ancestral et les 4 complexes connus aujourd'hui sont issus de deux événements de duplication durant l'évolution des vertébrés. (Lappin *et al.*, 2006)

1. LES GENES HOX

1.1. GENERALITES SUR LES GENES HOX

Les gènes *Hox* appartiennent à la grande famille des gènes homéotiques présents dans le génome de tous les animaux ainsi que chez les plantes et les champignons. Leur origine se situe avant la divergence de ces différents règnes, ce qui explique leur grande conservation en terme évolutif (Lappin, 2005).

Les gènes homéotiques (HOM) ont été découverts en 1978 chez la drosophile par EB Lewis (Lewis EB, 1978). Le terme homéotique vient du grec "homéosis" signifiant la transformation d'une partie du corps en une autre. En effet, des mutations au niveau des gènes homéotiques entraînent la transformation d'un segment du corps en un autre segment. Par exemple, chez la drosophile, le phénotype de la mutation du gène *antennapedia* (*Ant-C*) est caractérisé par la présence de pattes à la place des antennes. Chez la drosophile il y a 8 gènes répartis en 2 loci sur le chromosome 3. Ils forment les complexes *Antennapedia* (*Ant-C*) et *Bithorax* (*Bx-C*). Les gènes HOM sont caractérisés par une séquence d'ADN conservée de 183pb appelée l'homeoboîte (Gehring *et al.*, 1987 ; Favier & Dollé, 1997).

Ils codent pour des facteurs de transcription liant des séquences d'ADN spécifiques via leur homéodomaine, une séquence conservée de 60 acides aminés encodée par l'homeoboîte (Gehring *et al.*, 1990 ; Favier & Dollé, 1997).

1.1.1. Structure des gènes Hox

Chez les mammifères on dénombre 39 gènes *Hox*. Ces gènes sont répartis en 4 complexes : HoxA, B, C et D sur 4 chromosomes distincts, et en 13 groupes de paralogues localisés à la même position relative dans chaque complexe (Pearson *et al.*, 2005 ; Figure 1).

Peu après l'origine des animaux, l'unique homéogène a été dupliqué pour former un complexe protohox de 2 gènes qui sont toujours présents chez les *cnidaires*. *Amphioxus* est un chordé possédant un seul complexe comportant 10 gènes *Hox*. Ce complexe est homologue au complexe ancestral dont dérivent tous les complexes de vertébrés. Les 4 complexes sont issus de deux événements de duplication à grande échelle ayant eu lieu tôt dans l'évolution des vertébrés (Lappin *et al.*, 2006 ; Figure 2).

Chez la souris les gènes *Hox* sont répartis sur 4 chromosomes qui sont les chromosomes 6C2 pour le complexe HoxA, 11B4 pour le complexe HoxB, 15F2 pour le complexe HoxC et 2C3

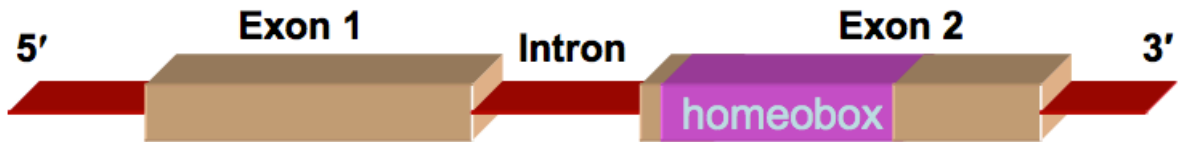


Fig. 3 : Représentation schématique d'un gène *Hox*. Présence de 2 exons, d'un intron et de l'homéoboite dans le second exon
(Lappin *et al.*, 2006)

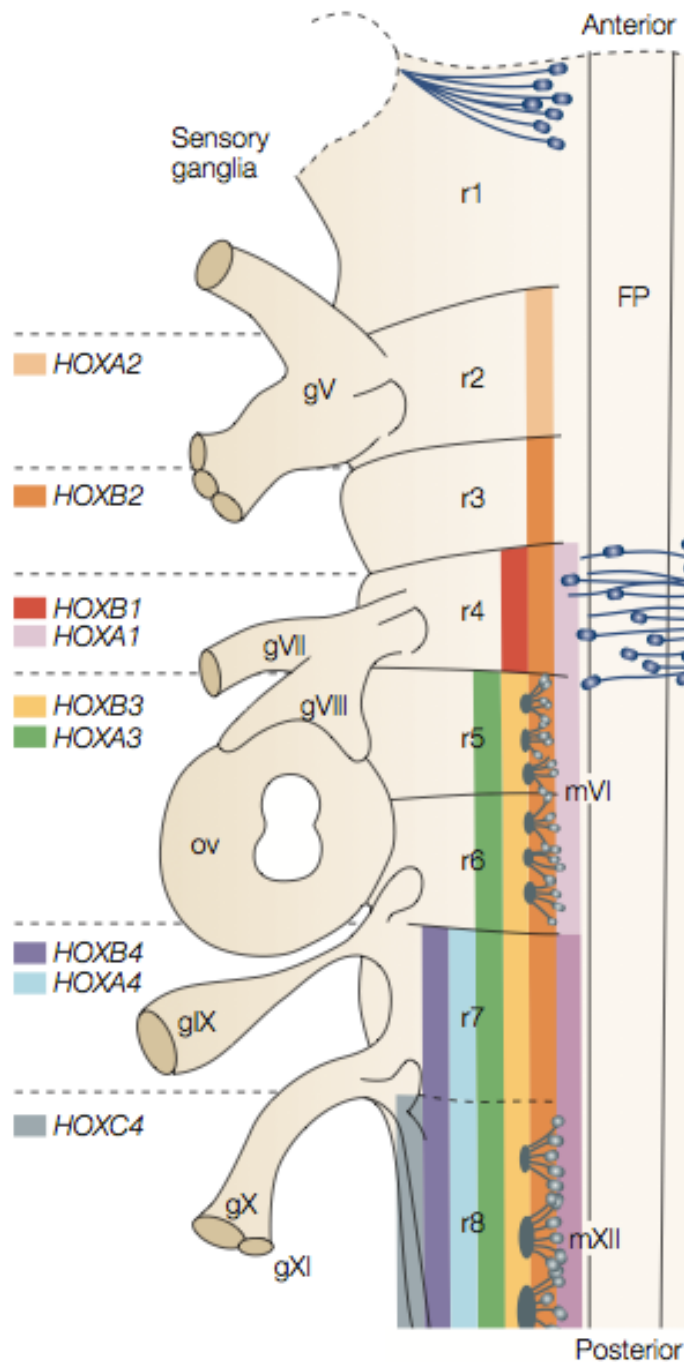


Fig. 4 : Représentation du "code Hox". Dans certaines régions, notamment au niveau des rhombomères, une expression combinée de plusieurs gènes *Hox* est observée. C'est cette combinaison unique dans chaque segment qui détermine son identité.
(Kiecker & Lumsden, 2005)

pour le complexe HoxD. Les gènes *Hox* comportent chacun deux exons et un seul intron. L'homeoboîte est toujours située dans le deuxième exon et présente un fort degré d'homologie au sein des gènes *Hox* et principalement au sein d'un même groupe paralogue (Lappin *et al.*, 2006 ; Figure 3). Ces gènes codent pour les protéines Hox qui sont des régulateurs majeurs du développement embryonnaire et, pour certaines d'entre-elles, sont encore présentes durant la vie postnatale (Favier & Dollé, 1997).

1.1.2. Gènes *Hox* et développement embryonnaire

Les gènes *Hox* en tant que gènes homéotiques sont primordiaux lors du développement embryonnaire. En effet, leur expression dès la gastrulation détermine l'identité et le devenir de territoires précis selon l'axe antéro-postérieur. Ce devenir est contrôlé par l'expression combinée de plusieurs gènes *Hox*.

Il existe une "stricte" corrélation (exception pour *Hoxa1* et *Hoxb1*) entre l'ordre des gènes sur le chromosome et leur domaine d'expression. En effet, les gènes *Hox* situés le plus en 3' au niveau des complexes vont être exprimés plus précocement et dans des territoires plus antérieurs que ceux situés plus en 5'. Cette expression séquentielle dans le temps et selon le positionnement sur l'axe antéro-postérieur est appelée la colinéarité spatio-temporelle. La colinéarité spatiale résulte d'une activation successive des gènes le long des complexes (de 3' en 5') au cours de la gastrulation (cf. figures 1). C'est une résultante de la colinéarité temporelle (Lappin *et al.*, 2006 ; Favier & Dollé, 1997).

Etant donné la présence de 4 complexes, on peut observer dans certaines régions une expression combinée de plusieurs gènes, qui peut entraîner une certaine redondance. Cette combinaison spécifique de l'expression de différents gènes *Hox* dans des territoires précis, appelée "code Hox", permet le développement adéquat des différentes structures le long de l'axe antéro-postérieur (Kiecker & Lumsden, 2005 ; Figure 4).

Comme mentionné ci-dessus, lors du développement embryonnaire les gènes *Hox* ont des rôles primordiaux dans l'organisation de différentes structures. L'étude d'organismes mutants a permis de mettre en évidence l'implication des gènes *Hox* dans la détermination de l'identité de différentes structures telles que les rhombomères (Alexander *et al.*, 2009, Studer *et al.*, 1996), les crêtes neurales (Manley *et al.*, 1997), le squelette axial (Deschamps *et al.*, 2005, Manley *et al.*, 1997) et les membres (Lappin, 2006 ; Favier *et al.*, 1997). Ils sont également impliqués dans l'organogenèse de certains organes tels que la thyroïde ou le thymus (Manley & Capecchi, 1998 ; Su *et al.*, 2001).

1.1.3. Gènes *Hox* et système nerveux central

Lors du développement précoce du système nerveux central (SNC) aucune expression de gènes *Hox* n'est détectée dans les territoires donnant naissance au cerveau antérieur ou prosencéphale et au cerveau moyen ou mésencéphale. L'expression des gènes paralogues 1 à 4 est détectée dans le cerveau postérieur ou rhombencéphale et enfin les gènes paralogues 5 à 13 sont exprimés dans la future moelle épinière (Nolte & Krumlauf, 2007) (Figure 4). En accord avec la colinéarité spatiale d'expression, les gènes situés le plus en 3' sont donc exprimés dans des territoires plus antérieurs que ceux situés plus en 5'.

Dans le rhombencéphale, et plus précisément dans chaque rhombomère l'expression d'une combinaison unique de gènes *Hox* est détectée (Figure 4) ; cette combinaison ou code est critique pour la détermination de l'identité des rhombomères et des structures qui en dérivent. La fonction des protéines Hox dans le rhombencéphale peut être illustrée avec le mutant *Hoxa2*. Chez les souris mutantes knock-out (KO) pour le gène *Hoxa2* des malformations sont présentes ; plus précisément, au niveau du rhombencéphale une perte d'identité est observée. En effet, *Hoxa2* est le seul gène *Hox* exprimé dans le rhombomère 2 au cours du développement précoce. Son expression dans ce territoire est très importante pour le maintien de son identité. En conséquence, le mutant *Hoxa2*^{-/-} présente des malformations homéotiques au niveau des rhombomères 2 et 3. Celles-ci se marquent dans la suite du développement par une rotation caudale des axones moteurs du trijumeau au niveau des rhombomères 2 et 3 et par leur sortie du rhombencéphale par le point de sortie du nerf facial dans le rhombomère 4 au lieu de leur point de sortie par le rhombomère 2. De plus, une perte des noyaux cochléaires et un élargissement des parties latérales du cervelet sont observés (Gavalas *et al.*, 1997).

Après la période embryonnaire, très peu d'études se sont intéressées aux fonctions des gènes *Hox* dans le SNC. Cependant Geisen et collaborateurs ont montré que les gènes *Hoxa2* et *Hoxb2* étaient nécessaires pour la migration des neurones du pont selon l'axe rostro-caudal. Cette action implique le récepteur Robo2, cible directe d'*Hoxa2*, qui intervient en empêchant l'attraction ventrale trop précoce des neurones en migration. Enfin *Hoxa2* serait également impliqué dans la topographie des axones du circuit du trijumeau au niveau du tronc cérébral et du thalamus, par un processus qui pourrait impliquer des éphrines et leurs récepteurs (Oury *et al.*, 2006).

Les domaines d'expression des gènes *Hox* seront étudiés dans ce travail seront plus amplement détaillés dans la partie 3.

1.2. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES HOX

Etant donnée l'importance fonctionnelle des gènes *Hox*, leur expression est finement régulée afin qu'ils ne soient exprimés que dans des territoires précis et au moment adéquat. La décondensation de la chromatine est une étape préalable nécessaire à l'expression des gènes *Hox*. En effet, cette étape permet de rendre accessible les séquences régulatrices des gènes *Hox* aux différents acteurs de la régulation de l'expression. Ces acteurs peuvent alors se fixer aux séquences régulatrices des gènes *Hox* pour activer (ou réprimer) leur expression.

1.2.1. Régulation de l'état de condensation de la chromatine

Des modifications au niveau de la chromatine la rendent permissive ou non à la transcription. En 2011, Noordermeer, Duboule et leurs équipes ont proposé le mécanisme suivant : la colinéarité d'expression serait en réalité accompagné d'une modification du "microenvironnement" de la chromatine passant d'un état répressif à la transcription à un état permissif. Lors de leurs études, un profil bimodal est observé, c'est à dire que chaque complexe est divisé en 2 compartiments 3D différents. Ces changements au niveau de la chromatine (ouverture) précèdent les mécanismes de transcription dans le sens 3' vers 5' de chaque complexe (Kobrossy *et al.*, 2006). Le passage d'un comportement négatif à un comportement positif vis à vis de la transcription sera donc nécessaire à l'activation colinéaire des différents gènes *Hox*. Cette activation colinéaire est essentielle pour la mise en place du plan d'organisation des mammifères.

1.2.2. Régulation de l'expression des gènes *Hox* par les éléments cis-régulateurs

L'acide rétinoïque (AR) est un acteur clé dans l'initiation de l'expression d'un grand nombre de gènes *Hox*. En effet, l'AR régule l'expression des gènes *Hox* des groupes paralogues 1 à 5 à travers des séquences cis-régulatrices appelées éléments de réponse à l'AR (RARE) (Nolte & Krumlauf, 2007). Des hétérodimères formés d'un récepteur RXR "retinoid X receptor" activé par son association à un des trois types de récepteurs à l'AR : RAR α , RAR β , et RAR γ se lient à la séquence RARE. En l'absence de ligand un répresseur est recruté mais en présence d'AR un changement allostérique intervient et des co-activateurs sont recrutés.

Le long de l'axe A-P du rhombencéphale un gradient d'AR est présent. Les concentrations les plus importantes sont présentes dans les régions les plus rostrales alors qu'au niveau des régions caudales les concentrations sont plus faibles. L'AR est synthétisé grâce à la rétinaldéhyde déshydrogénase 2 (Raldh2) et va activer l'expression des gènes *Hox* situés le

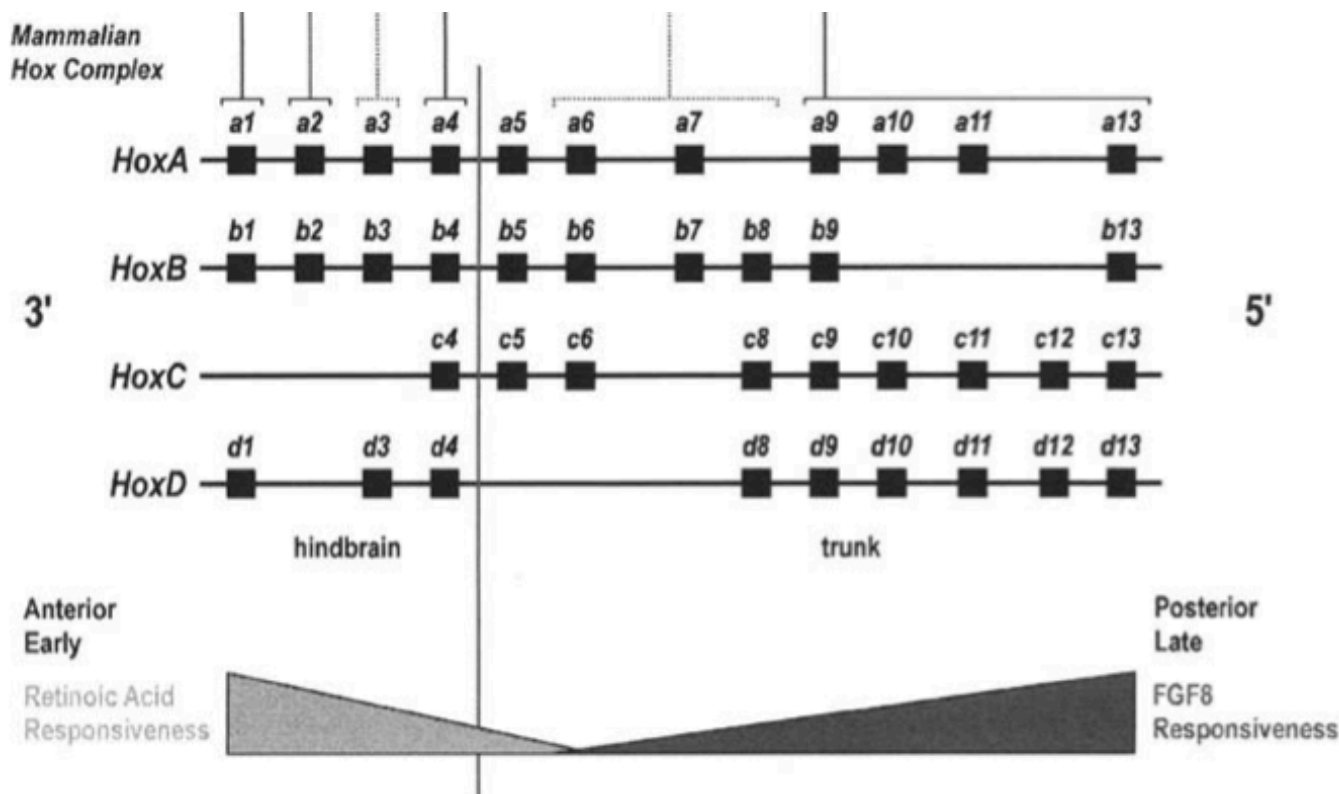


Fig. 5 : Régulation globale de l'expression des gènes *Hox*. Schématisation des gradients opposés de concentration d'acide rétinolique (AR) et de FGF aux deux pôles des embryons. Au dessus sont représentés les 4 complexes de gènes *Hox* des mammifères avec les 13 groupes paralogues dont l'expression peut être activée soit par l'AR soit par les FGF. (Nolte & Krumlauf, 2007)

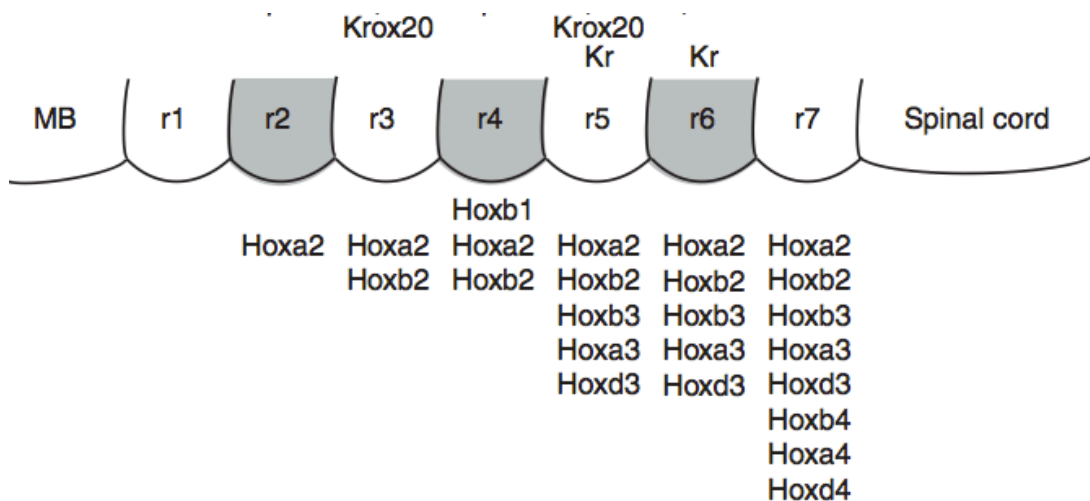


Fig. 6 : Régulation locale de l'expression des gènes *Hox*. La partie caudale du cerveau médian (MB) ainsi que les 7 rhombomères et le début de la moelle épinière sont schématisés. Dans la partie supérieure les acteurs de la régulation locale des gènes *Hox* sont représentés, au niveau des rhombomères où ils agissent. (Tümpel *et al.*, 2009)

plus rostralement alors que dans les parties caudales où sa concentration est plus faible il est dégradé par l'enzyme Cyp26 (Alexander *et al.*, 2009).

Les FGF "fibroblasts growth factor" sont également des acteurs clés dans l'initiation de l'expression d'un grand nombre de gènes *Hox*. En effet, ils contrôlent également le patterning de l'axe A-P via une action sur les gènes *Hox* des groupes paralogues 6 à 13. La famille des FGF comprend 22 membres interagissant avec l'un des 4 récepteurs au FGF appelés FGFR (Ornitz *et al.*, 2001). Un gradient de concentration de FGF est présent lors du développement embryonnaire. Celui-ci est opposé au gradient d'AR. En effet, c'est l'expression des gènes situés les plus en 5' au niveau des complexes qui va être influencée par les FGF.

L'AR a donc la capacité d'initier l'expression des gènes les plus en 3' (paralogues 1 à 5) alors que les FGF agissent sur ceux plus en 5'. En ce qui concerne le groupe paralogue "central" c'est-à-dire le groupe 6, il peut être activé par les deux voies de signalisation (Nolte & Krumlauf, 2007). Les gradients de concentration de ces éléments sont donc opposés et leurs actions semblables mais aux pôles opposés des embryons. Ils influenceront donc le devenir des gènes les plus rostraux ou les plus caudaux (Figure 5).

L'AR et les FGF ont une action de contrôle de l'expression d'un grand nombre de gènes *Hox* alors que d'autres acteurs contrôlent l'expression d'un nombre plus restreint de gènes *Hox*. Nous ne mentionnerons ici que ceux qui interviennent pour la régulation de nos gènes d'intérêt.

Parmi ceux-ci, le gène *Kreisler* (*kr*) codant pour la protéine KRML1 agit au niveau de l'expression des gènes *Hoxa3* et *Hoxb3*. *Krox20* code quant à lui pour une protéine à motif doigt de zinc. Celle-ci est nécessaire (avec KRML1) pour la régulation de l'expression d'*Hoxb3* au niveau du rhombomère 5, elle est également nécessaire pour la mise en place du rhombomère 3. Dans le pré-rhombomère 3 l'expression d'*EphA4* a été détectée ; ce gène serait une cible directe de *Krox20*. L'expression précoce de *Krox20* pourrait être initiée par les FGF (Tümpel *et al.*, 2009 ; Figure 6).

Enfin les protéines Nuclear factor Y (NFY) et Ying-Yang 1 (YY1) semblent importantes pour l'expression d'*Hoxb4* au niveau du tube neural, alors que le couple Sox et Oct sont des acteurs régulant l'expression d'*Hoxb1* au niveau du r4 (Nolte & Krumlauf, 2007).

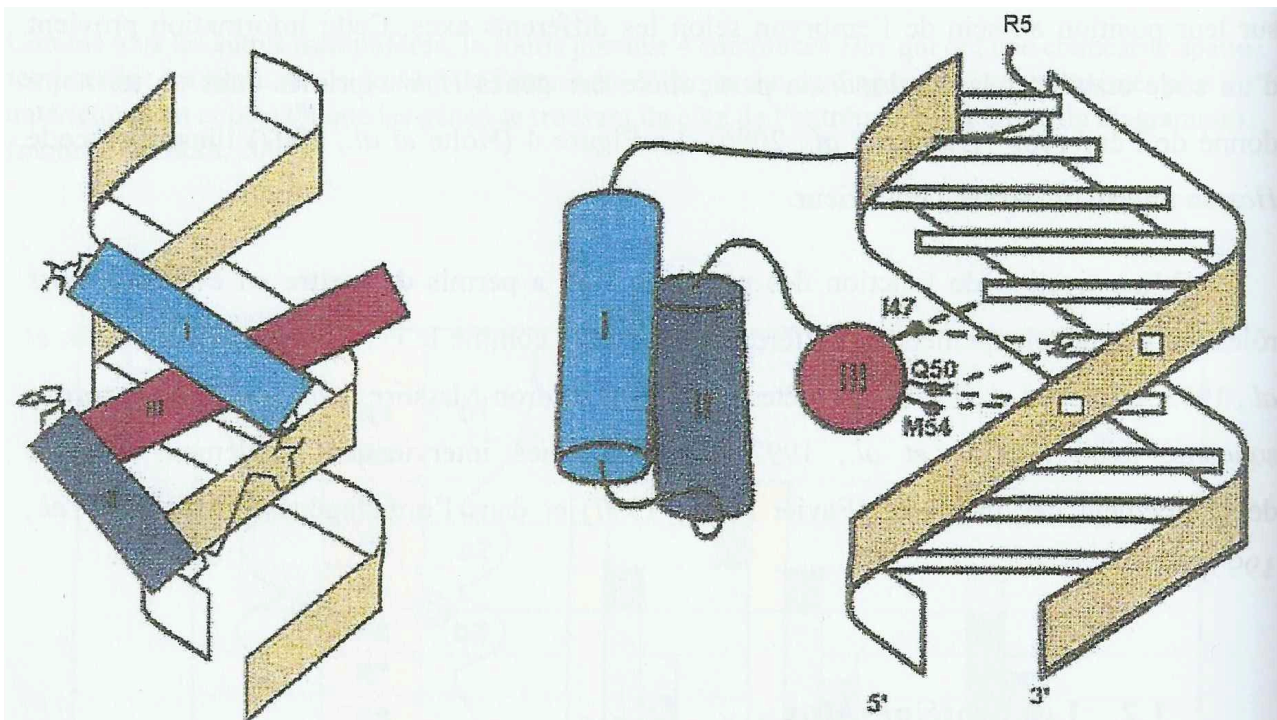


Fig. 7 : Représentation de l'interaction entre l'ADN et l'homéodomaine des protéines Hox chez la drosophile. L'image de gauche est une représentation en vue perpendiculaire de l'axe de l'hélice III de l'homéodomaine Antennapedia lié à l'ADN. L'image de droite est une représentation selon une vue de l'axe de l'hélice III.

C'est l'hélice III qui se lie à l'ADN au niveau du sillon majeur via les résidus Ile47, Gln 50 et Met54. Le bras N terminal se lie quant à lui à l'ADN au niveau du sillon mineur.
(Gehring *et al.*, 1994)

1.3. LES PROTEINES HOX

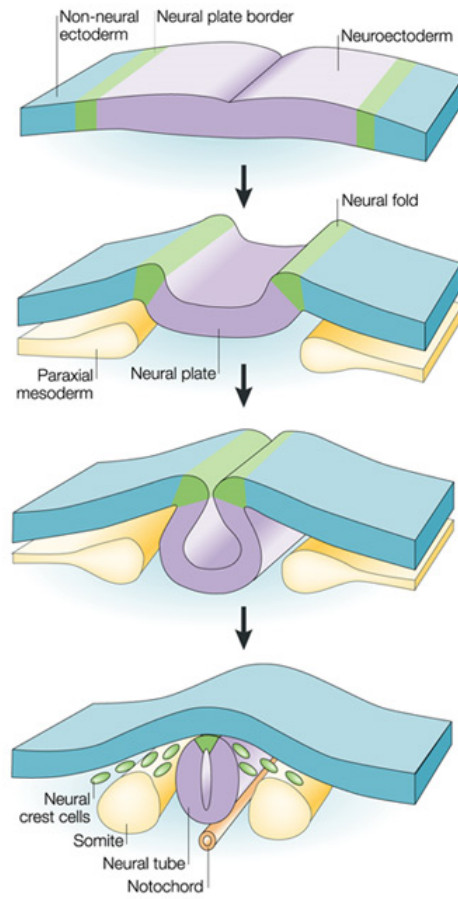
Différentes études structurales ont permis d'attribuer certaines fonctions à différentes régions des protéines Hox. En effet, ces dernières possèdent toutes un homéodomaine très conservé de 60 acides aminés à motif hélice-tour-hélice qui est mis en jeu dans la liaison à l'ADN. Dans certains cas cette structure intervient également dans la localisation sub-cellulaire (Prochiantz, 2000, les contacts avec l'ARN (démonstré chez la drosophile avec la protéine Bicoïd) (Dubnau & Struhl, 1996) et enfin dans les interactions protéine-protéine avec d'autres protéines (Zappavigna *et al.*, 1996) ou avec des protéines Hox pour former des hétérodimères (Zappavigna *et al.*, 1994 ; Lambert *et al.*, 2010). En position N-terminale par rapport à l'homéodomaine un hexapeptide est présent. Cette petite séquence de 6 acides aminés est un motif conservé chez les gènes paralogues 1 à 8. Il intervient dans l'interaction avec les cofacteurs mais également avec la machinerie de transcription. De plus, la liaison de l'hexapeptide avec la protéine *Pbx* permet d'augmenter la sélectivité de la liaison ADN-protéine Hox (Lappin, 2006).

La reconnaissance entre l'homéodomaine et l'ADN peut être illustrée par les travaux de Gehring et ses collaborateurs en 1994. Ils ont montré que l'homéodomaine est un ensemble de 3 hélices alpha et d'un bras N terminal non structuré. La 3^{ème} hélice alpha se lie au sillon majeur de l'ADN via les résidus Ile47, Gln50, Asn51 et Met54 (Ekker *et al.*, 1991). Ces résidus vont favoriser la liaison au niveau d'un site riche en AT. Le bras N terminal précédant la première hélice alpha contacte les bases du sillon mineur de l'ADN via des résidus spécifiques 2, 3 et l'Arg5 (Gehring *et al.*, 1994; Figure 7).

Avant de présenter en détail les trois acteurs de ce travail, je vais au préalable présenter notre modèle d'étude, le système nerveux central, et introduire les éléments nécessaires à la compréhension de mes résultats.

2. LE SYSTEME NERVEUX ET LE CERVEAU

Le système nerveux comporte deux grandes entités, le système nerveux central et le système nerveux périphérique. Le premier, le système nerveux central ou SNC, correspond à l'encéphale (cerveau, cervelet et tronc cérébral) et à la moelle épinière alors que le second, le système nerveux périphérique ou SNP, comprend les voies nerveuses véhiculant les informations afférentes et efférentes du SNC. Dans ce travail nous allons nous focaliser sur le SNC.



Nature Reviews | Neuroscience

Fig. 8 : La neurulation. Formation du tube neural après épaissement, courbure, invagination et fusion dorsale de la plaque neurale. Les cellules présentes au niveau des crêtes du tube neural (vert) vont former la population migratoire des cellules des crêtes neurales. (Gammill & Bronner-Fraser, 2003)

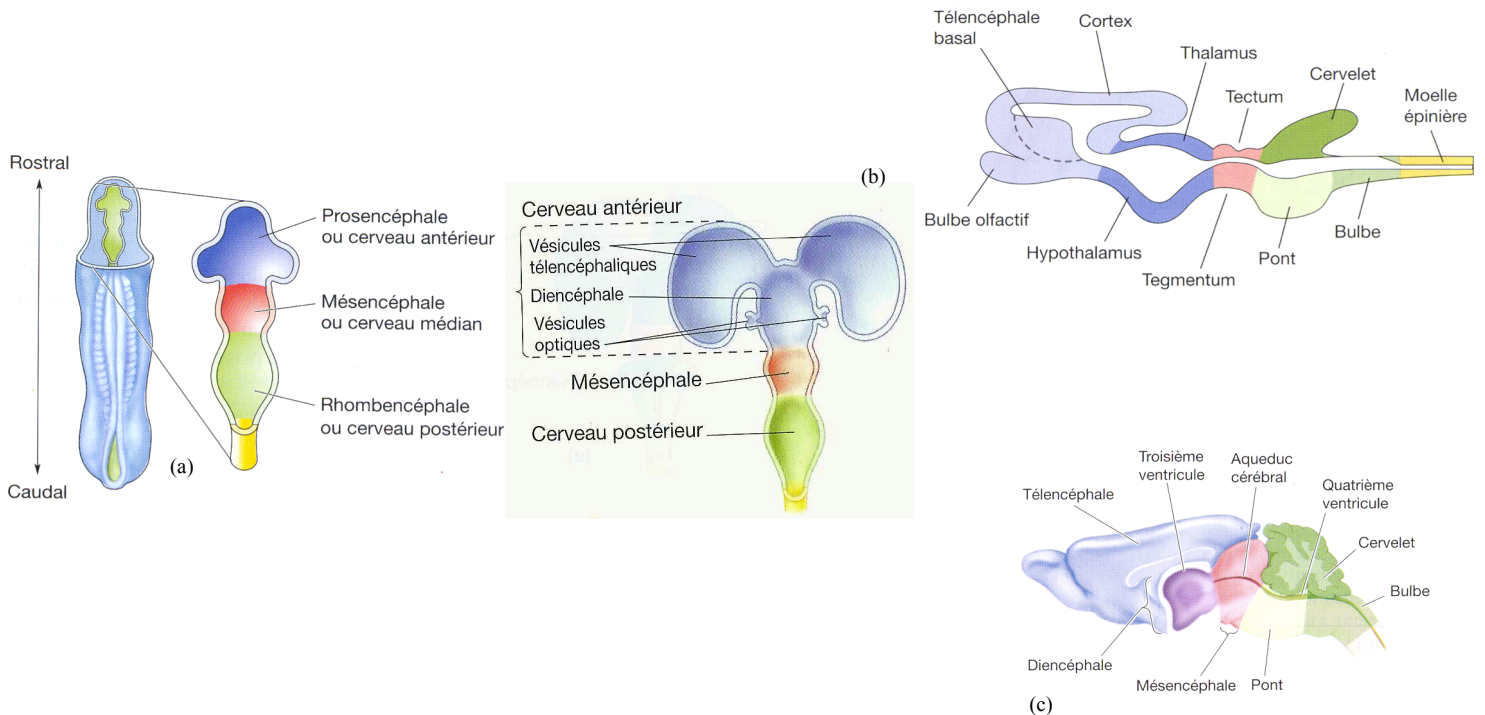


Fig. 9 : Développement schématique d'un cerveau de souris. (a) La partie la plus rostrale du tube neural va se segmenter en 3 vésicules primitives (prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale) qui vont poursuivre leur développement et (b) donner les 5 vésicules céphaliques : télencéphale, diencéphale, mésencéphale, métencéphale et myélocéphale. (c) Ces 5 vésicules sont à l'origine des différentes régions du cerveau adulte. (Bear *et al.*, 2006)

Les informations données dans cette partie sont tirées des livres de référence Neurosciences (Purves *et al.*, 2005), Neurosciences (Bear *et al.*, 2006), Development of the nervous system, (Sanes *et al.*, 2011) et The brain an introduction to functional neuroanatomy (Watson *et al.*, 2010)

2.1. PRESENTATION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Le SNC est composé du cerveau (au sens strict), du cervelet, du tronc cérébral et de la moelle épinière. Le cerveau correspond à la partie la plus rostrale. Il est divisé en deux hémisphères, chacun contrôlant la partie opposée du corps. Le cervelet fait la jonction entre les hémisphères cérébraux et la moelle épinière ; il est en charge essentiellement du contrôle du mouvement. Le tronc cérébral est une zone de liaison entre le cerveau, le cervelet et la moelle épinière. Il est constitué de nombreuses fibres et cellules et est en charge d'activités telles que la respiration, la conscience et la température corporelle. Au sens large le cerveau regroupe le cerveau antérieur ainsi que le cervelet et le tronc cérébral. Pour la suite de ce mémoire le terme cerveau désignera le cerveau au sens large c'est-à-dire l'encéphale. Enfin la moelle épinière est enfermée et protégée par la colonne vertébrale et reliée à l'encéphale. Elle guide les informations provenant de la peau, des muscles et des articulations vers le cerveau et inversement.

2.2. DEVELOPPEMENT

Lors du développement embryonnaire, le premier événement dans la formation du système nerveux ou neurulation est l'apparition de la plaque neurale. Cette plaque provient de l'épaississement de l'ectoderme, induit par le mésoderme axial sous-jacent, et va se courber, s'invaginer et finalement fusionner pour donner le tube neural (Gammill *et al.*, Figure 8).

La partie la plus rostrale du tube neural ainsi formée va subir des étranglements successifs pour donner naissance aux trois vésicules primitives du cerveau qui sont le prosencéphale ou cerveau antérieur, le mésencéphale ou cerveau médian et le rhombencéphale ou cerveau postérieur qui communique avec le reste du tube neural à l'origine de la moelle épinière. Ces 3 vésicules primitives ainsi que la moelle épinière vont encore se développer de manière importante pour donner les 5 vésicules céphaliques puis le cerveau (Bear *et al.*, 2006 ; Figure 9).

2.2.1. Le prosencéphale

Le prosencéphale correspond à la partie la plus rostrale du tube neural et donne naissance au télencéphale et au diencéphale. Le télencéphale va former les bulbes olfactifs et les hémisphères cérébraux dans lesquels le cortex cérébral et le télencéphale basal s'individualisent suite à la prolifération des progéniteurs neuraux des vésicules télencéphaliques. Le diencéphale donnera le thalamus dorsalement, l'hypothalamus ventralement et les vésicules optiques latéralement. La lumière du prosencéphale va donner les deux ventricules latéraux dans le télencéphale et le troisième ventricule au centre du diencéphale (Figure 9).

2.2.2. Le mésencéphale

Le mésencéphale est la seconde vésicule primitive, située entre le prosencéphale et le rhombencéphale. Lors de son développement il ne se divise pas en vésicule secondaire mais sa partie dorsale, le toit ("tectum"), donnera les colliculi alors que la partie ventrale, le plancher ("tegmentum"), donnera le pédoncule. L'espace rempli de liquide situé entre ces deux structures va diminuer lors de la différenciation et donner l'aqueduc cérébral. Ce dernier est relié par sa partie rostrale au troisième ventricule du diencéphale (Figure 9).

2.2.3. Le rhombencéphale

Le rhombencéphale correspond à la jonction entre le cerveau et la moelle épinière. Le rhombencéphale est organisé en 8 segments ou rhombomères qui se distinguent de manière transitoire tant sur le plan morphologique que génique. En effet, dans le rhombencéphale l'expression des gènes appartenant aux 4 premiers groupes paralogues est détectée, comme illustré ci-dessus (partie 1.1.3). La colinéarité spatiale y est observée et dans chaque rhombomère une combinaison unique de gènes *Hox* est exprimée.

Lors du développement du cerveau le rhombencéphale va se différencier en 2 parties. La plus rostrale est le métencéphale (rhombomères 1 et 2) alors que la plus caudale est le myélencéphale (rhombomères 3 à 8). Le premier est à l'origine du pont et du cervelet alors que le second donnera la moelle allongée ou bulbe rachidien. La lumière du tube neural à ce niveau forme le quatrième ventricule qui est en communication avec le troisième ventricule via l'aqueduc cérébral du mésencéphale (Figure 9).

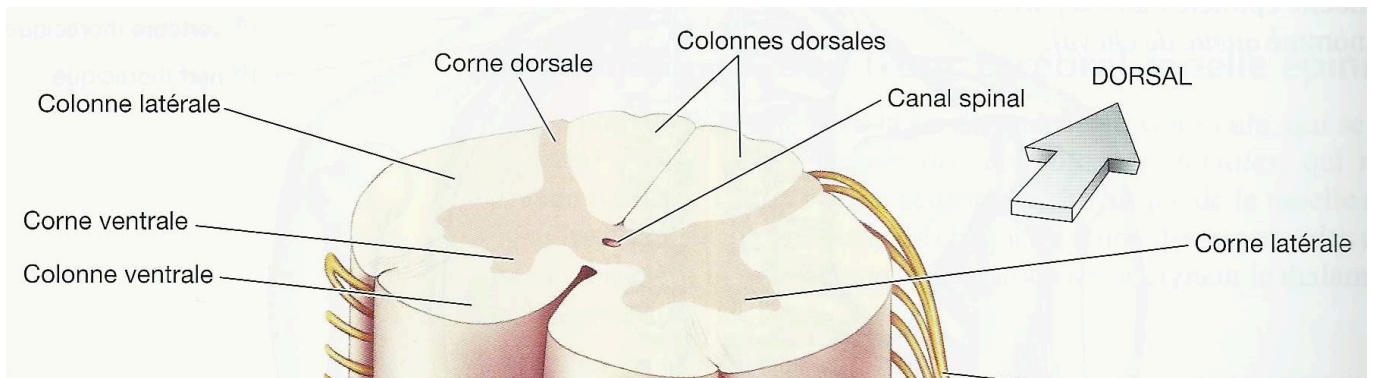


Fig. 10 : Coupe transversale de la moelle épinière. Au centre est situé le canal spinal. La matière grise est au centre de la moelle épinière et en forme de papillon. Les cornes dorsales recevant les fibres sensibles, latérales contenant les fibres sympathiques et ventrales abritant les corps des motoneurones sont bien visibles. Autour de la matière grise se situe la substance blanche qui est constituée des faisceaux d'axones longitudinaux montants ou descendants le long de la moelle.

(Bear *et al.*, 2006)

2.2.4. La moelle épinière

La différenciation de la moelle épinière apparaît moins spectaculaire que celle du cerveau. Les tissus se développent et la lumière du tube neural diminue pour former le canal spinal. Lorsque l'on observe une coupe transversale de moelle épinière une forme de papillon apparaît. Ce papillon est formé par la substance grise, la zone où se trouvent les corps neuronaux, des axones et dendrites. La partie supérieure du papillon est appelée la corne dorsale, elle reçoit les fibres sensibles (fonction sensitive) alors que la partie inférieure est la corne ventrale abrite des corps des motoneurons (fonction motrice), la partie intermédiaire est la zone intermédiaire contenant les corps cellulaires des fibres sympathiques. Tout le reste est la substance blanche constituée de faisceaux d'axones longitudinaux formant des faisceaux montants ou descendants le long de la moelle épinière (Figure 10).

2.3. RELATION STRUCTURE-FONCTIONS DU CERVEAU ANTERIEUR

Les mouvements volontaires, la cognition, la perception ou encore la conscience ont leur siège au niveau du cerveau antérieur. Cela implique donc un grand nombre de connexions neuronales dans cette partie du cerveau. Pour assurer ces fonctions, la structure majoritaire et la plus importante est le cortex cérébral. Son développement très important lors de l'évolution semble en lien avec son rôle important.

2.3.1. Le cortex

Le cortex est donc à l'origine de la perception du monde extérieur et de la commande des mouvements volontaires. En effet, il reçoit les informations provenant de la vue, de l'ouïe, de l'odorat et enfin du toucher. Les sensations relatives à la vue et à l'ouïe font un relais au niveau du thalamus.

Le cortex reçoit donc des informations via le thalamus mais il en émet également par le biais de projections axonales (les axones corticaux) en direction de la moelle épinière et passant par la capsule interne. Ces axones forment le faisceau corticospinal. Il existe également d'autres projections axonales passant cette fois-ci par les ganglions de la base situés dans le télencéphale.

Le cortex cérébral est constitué de plusieurs aires corticales fonctionnelles, elles mêmes organisées en différentes couches. En vue supérieure, il est possible d'observer 4 aires différentes. En effet, selon l'axe antéro-postérieur on retrouve le cortex moteur, somatosensoriel, auditif et visuel. Deux autres aires sont situées plus ventralement ; au niveau

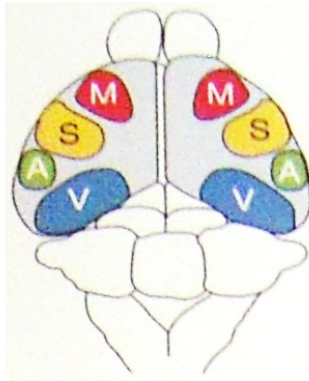


Fig. 11 : Vue dorsale des différentes aires corticales chez la souris adulte. Selon l'axe antéro-postérieur nous pouvons localiser le cortex moteur (M), le cortex somatosensoriel (S), le cortex auditif (A) et le cortex visuel (V).

(Sanes, Reh & Harris, 2011)

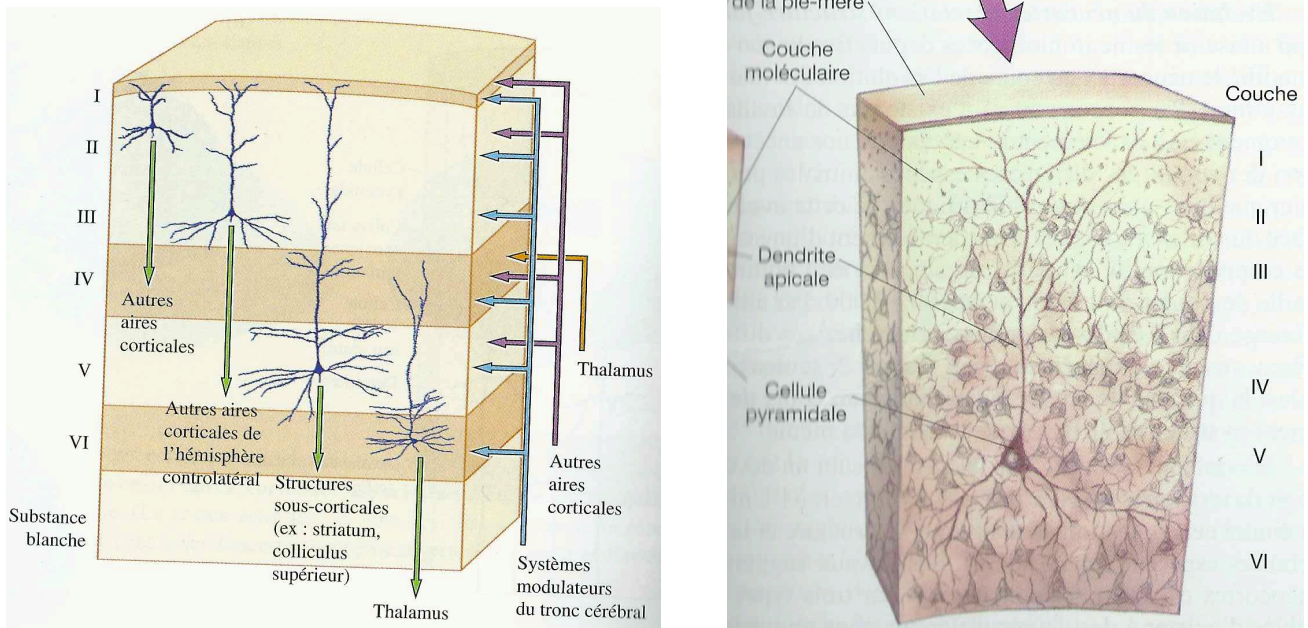


Fig. 12 : Deux représentations schématiques des 6 couches du cortex somatosensoriel. L'image de gauche représente également les efférences et afférences du cortex somatosensoriel.

(Purve *et al.*, 2005 ; Bear *et al.*, 2006)

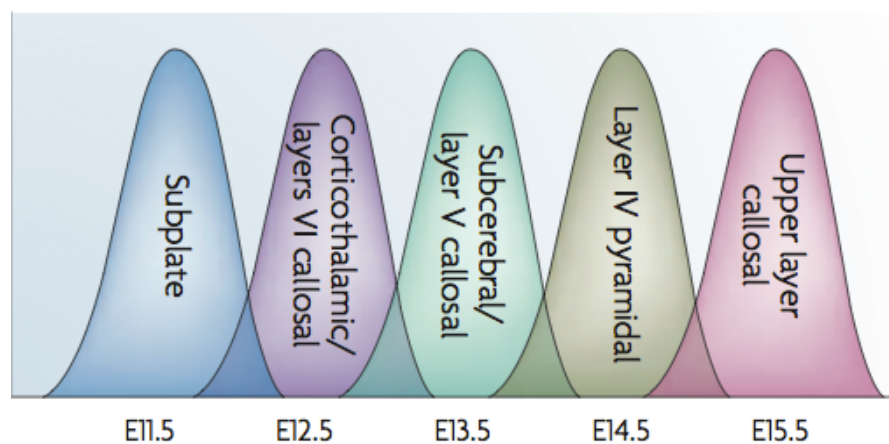


Fig. 13 : Développement et mise en place des différentes couches du cortex somatosensoriel chez la souris.

Pour chaque couche, une vague de naissance de neurones progéniteurs est observée à un stade précis du développement embryonnaire. Les 3 couches les plus profondes sont créées les unes après les autres entre 12,5 et 14,5dpc alors que les couches les plus superficielles sont créées à partir de 15,5dpc toujours selon le même schéma. La couche la plus profonde est formée puis les neurones de la couche supérieure la traverse et forment cette nouvelle couche et ce jusqu'à la couche I qui est la plus externe.

(Molyneux *et al.*, 2007)

antéro-ventral on retrouve le cortex piriforme (olfactif) alors qu'au niveau caudo-ventral on retrouve le cortex entorhinal (Sanes *et al.*, 2011 ; Figure 11). Les aires présentées ci-dessus sont les principales mais il existe également le cortex prémoteur, cingulaire, gustatif ou encore agranulaire...

Focalisons nous sur le cortex somatosensoriel dont l'organisation structurale est assez caractéristique. Il est en effet composé de 6 couches disposées parallèlement à la surface du cerveau et les unes au dessus des autres (Figure 12). Ces couches se forment au cours de la neurogenèse de manière successive, de l'intérieur vers l'extérieur. Chaque couche est fonctionnellement et moléculairement différente. En effet, chacune est formée par des corps neuronaux bien spécifiques de par leur forme et leur taille. Une exception est à noter, elle concerne la couche numéro I, c'est-à-dire la couche la plus externe du cortex. Elle sépare la couche de neurones la plus proche de la surface (couche II) de la pie-mère et est dépourvue de neurones. Elle reçoit cependant les projections (grandes dendrites apicales) des neurones pyramidaux. Ces projections se subdivisent en branches multiples dans cette couche. Chez la souris, les couches II et III sont formées à 15,5 jours post-coïtum (dpc), elles sont peu distinctes l'une de l'autre et sont formées de petits neurones pyramidaux dont les connexions sont essentiellement cortico-corticales. La couche IV est formée à 14,5dpc et comporte de nombreux neurones étoilés (couche granulaire) avec des axones à ramifications locales. Ce sont les neurones qui reçoivent les informations sensorielles après transit par le thalamus. La couche V (formée à 13,5dpc) et la couche VI (formée à 12,5dpc) dans une moindre mesure contiennent des neurones pyramidaux dont les axones s'étendent souvent hors du cortex (Molyneaux *et al.*, 2007 ; Figure 13). Les axones des neurones des couches V et VI vont projeter sur le thalamus. La première semaine après la naissance, la couche V fait des projections massives notamment au niveau des noyaux antéroventraux (AV) du thalamus mais également au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière. Les projections de la couche V sont les premières à quitter le cortex et à rejoindre le thalamus. De manière opposée, les projections de la couche VI se font beaucoup moins rapidement (Clascá *et al.*, 1995).

Récemment, la découverte de gènes exprimés de manière restreinte au sein de populations neuronales spécifiques de chaque couche a permis de découvrir les mécanismes sous jacents à la formation et à la spécification des projections neuronales. La figure 14 (page suivante) (Molyneaux *et al.*, 2007) illustre les patrons d'expression de ces gènes pouvant être utilisés comme marqueurs spécifiques des différentes couches et populations neuronales.

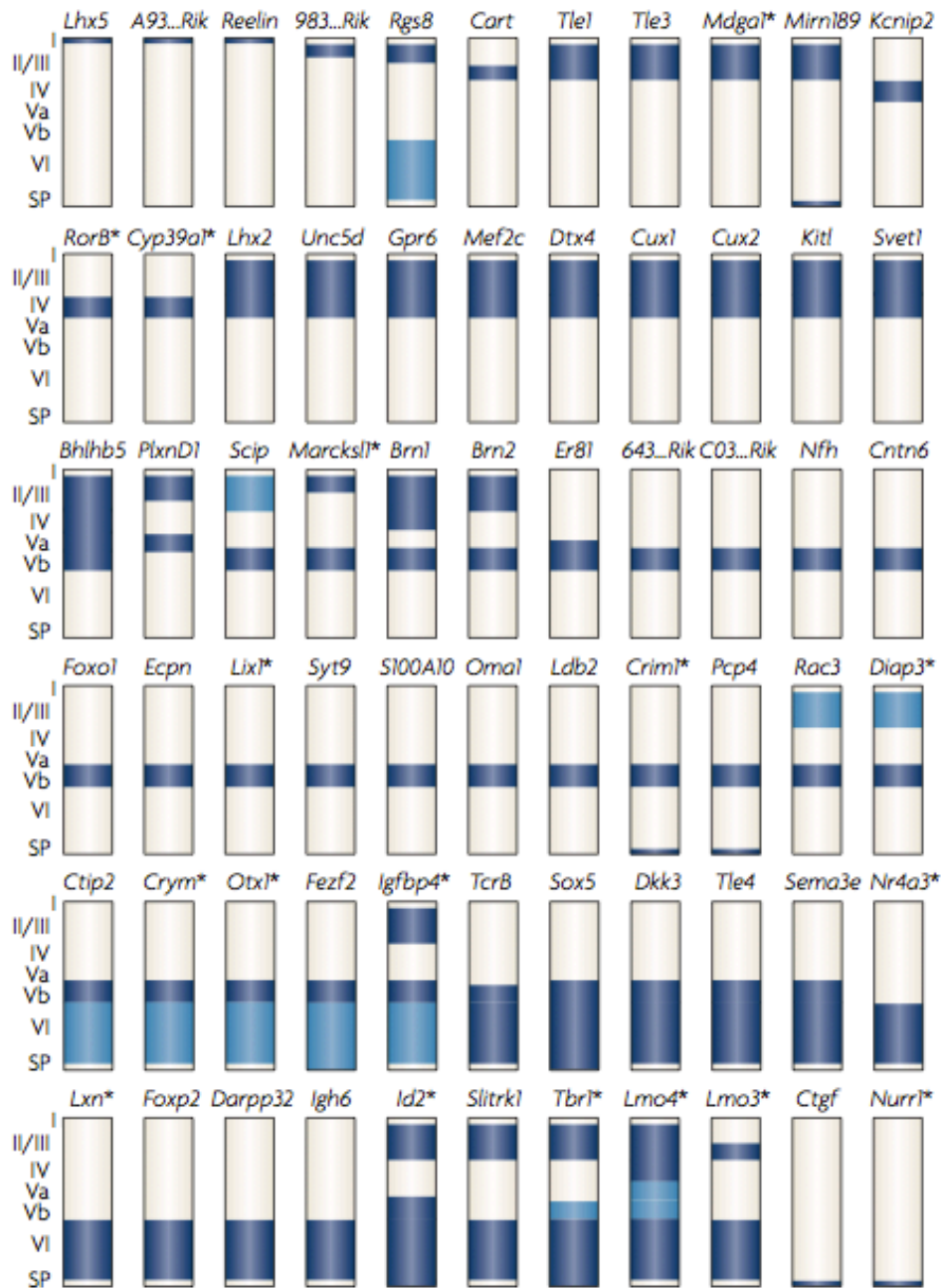


Fig. 14 : Gènes spécifiques des différentes couches du cortex somatosensoriel de souris. Représentation schématique de l'expression de différents gènes au sein des différentes couches du cortex cérébral (notée à gauche de chaque rangée). Cette étude permet d'identifier les couches corticales au niveau moléculaire. SP : subplate (base), 1-VI : couches I à VI du cortex somatosensoriel. (Molyneux *et al.*, 2007)

2.3.2. Le thalamus

Le thalamus est le territoire le plus massif dérivant du diencephale. Il est recouvert dorsalement et latéralement par le cortex cérébral et est situé dorsalement par rapport à l'hypothalamus. Ses deux hémisphères se situent autour du troisième ventricule.

Le thalamus est constitué de substance grise et comporte de nombreux noyaux. C'est un centre de relais majeur tant au niveau du nombre de relais effectués qu'au niveau de leur importance entre le cortex cérébral et la moelle épinière pour l'information sensorielle afférente et motrice efférente. C'est une des principales voies de passage vers le cortex via la capsule interne. Le thalamus et le cortex cérébral sont donc liés fortement tant du point de vue fonctionnel que structural (Jones *et al.*, 1998). Plus précisément, les connexions thalamo-corticales se font entre le thalamus et la couche IV du cortex somatosensoriel, ou encore les cortex auditifs et visuels. Des signaux attracteurs et répulsifs présents dans les différentes couches vont guider la mise en place des afférences thalamo-corticales, notamment les éphrines et leurs récepteurs Eph pourraient intervenir dans la mise en place de ces connexions. Chez la souris, les premières connexions thalamo-corticales rejoignent le cortex à 14dpc. Une fois que les axones ont atteint leur aire cible, ils entament une croissance radiale afin de coloniser la couche cible (IV). Deux jours après la naissance (P2), la croissance radiale des axones est stoppée et l'élaboration des synapses avec leurs cellules cibles a lieu. Le choix d'un arrêt au niveau de la couche IV mais également d'une mise en place des synapses thalamo-corticales dans cette même couche semble être guidé par les éphrines et leurs récepteurs Eph. Les éphrines seraient donc des molécules donnant des informations aux afférences thalamiques, possédant les récepteurs Eph à leur surface, lors du choix de leur sélection en terme de zone et de cibles synaptiques dans le cortex (Mann *et al.*, 2002). Une fois que les projections se sont arrêtées dans la couche cible et que les synapses se sont développées, il y a seconde étape d'élagage des certaines synapses et de renforcement des autres. Ces étapes d'élagage et de renforcement ont lieux à partir de P4 et s'étendent pendant plusieurs semaines pour éliminent environ 50% des connexions réalisées plus tôt.

2.4. RELATION STRUCTURE-FONCTIONS DU CERVEAU MEDIAN

Le mésencéphale est comme nous l'avons vu précédemment une structure qui se différencie peu lors du développement mais ce n'est pas pour cette raison que ses fonctions sont limitées, bien au contraire. Cette région est le lieu de passage des faisceaux de fibres allant du cortex cérébral au tronc cérébral et à la moelle épinière et inversement. Elle comporte également de

Les nerfs crâniens et leurs fonctions principales

Nerf crânien	Nom	Sensitif et/ou moteur	Fonction principale
I	Nerf olfactif	Sensitif	Odorat
II	Nerf optique	Sensitif	Vision
III	Nerf oculomoteur commun	Moteur	Mouvements des yeux ; constriction de la pupille et accommodation ; muscles des paupières
IV	Nerf pathétique (ou trochléaire)	Moteur	Mouvements des yeux
V	Nerf trijumeau	Sensitif et moteur	Sensibilité de la face, de la bouche, de la cornée ; muscles masticateurs
VI	Nerf oculomoteur externe (ou abducens)	Moteur	Mouvements des yeux
VII	Nerf facial	Sensitif et moteur	Contrôle des muscles de l'expression faciale ; sensibilité gustative de la partie antérieure de la langue ; glandes salivaires et lacrymales
VIII	Nerf cochléo-vestibulaire	Sensitif	Audition ; sens de l'équilibre
IX	Nerf glossopharyngien	Sensitif et moteur	Sensibilité du pharynx ; sensibilité gustative de la partie postérieure de la langue ; barorécepteurs carotidiens
X	Nerf vague	Sensitif et moteur	Fonctions végétatives du tube digestif ; (ou pneumogastrique) ; sensibilité du pharynx ; muscles des cordes vocales ; déglutition
XI	Nerf spinal accessoire	Moteur	Muscles de la nuque et de l'épaule
XII	Nerf grand hypoglosse	Moteur	Mouvements de la langue

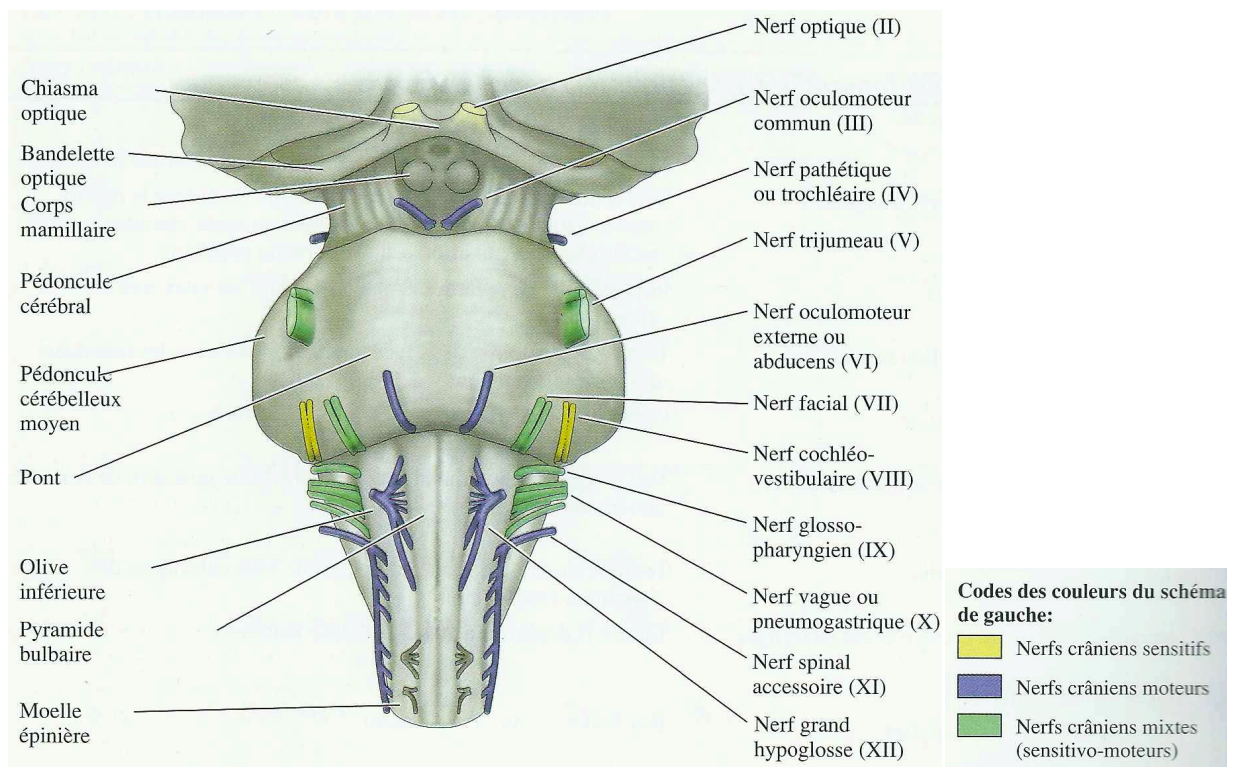


Fig. 15 : Haut : Tableau descriptif des nerfs crâniens et de leurs principales fonctions.

Bas : Vue ventrale du tronc cérébral montrant l'emplacement des différents nerfs crâniens ainsi que leurs points d'entrée dans le mésencéphale, le pont et le bulbe. Les nerfs sensitifs sont représentés en jaunes, les nerfs moteurs en violet et les nerfs mixtes en vert.

(Purve *et al.*, 2005)

nombreux neurones impliqués dans le système sensoriel, le contrôle du mouvement et d'autres actions.

Le mésencéphale donne naissance aux colliculi depuis sa partie dorsale (tectum) et au pédoncule depuis son plancher. Les colliculi supérieurs reçoivent des informations en provenance de l'œil et sont responsables en réponse des mouvements des yeux et de la tête, par l'intermédiaire de neurones moteurs du tronc cérébral. Les colliculi inférieurs quant à eux reçoivent des informations provenant de l'oreille avant de les transmettre vers le thalamus (rôle de relais). Le pédoncule contient les noyaux rouges et la substance noire qui sont impliqués dans les mouvements volontaires. Il contient également de nombreux axones projetant dans une grande partie du SNC et agissant sur la conscience, l'humeur, le plaisir ou encore la régulation et la perception de la douleur.

2.5. RELATION STRUCTURE-FONCTIONS DU CERVEAU POSTERIEUR ET DE LA MOELLE

Le cerveau postérieur est comme le cerveau médian un lieu de passage de l'information depuis le cortex vers la moelle épinière et inversement. De plus les neurones du cerveau postérieur sont mis en jeu dans le traitement des informations relatives aux mouvements volontaires et à l'activité du système nerveux autonome. Il comporte entre autre l'un des centres majeurs du contrôle du mouvement qu'est le cervelet. Celui-ci reçoit des informations de la part de la moelle épinière et du pont respectivement à propos de la situation du corps dans l'espace et des ordres issus du cortex cérébral pour adapter les mouvements à leurs objectifs. Le cervelet intègre ces informations et détermine les contractions musculaires nécessaires pour effectuer les mouvements correctement.

Le pont, lui, transmet les informations provenant du cortex au cervelet et inversement. C'est pour cela que la majeure partie des axones traversant le mésencéphale forme des synapses au niveau des neurones du pont.

Au niveau du bulbe (ou moelle allongée) on trouve des neurones impliqués dans le relais de l'information sensorielle entre le thalamus et la moelle épinière ou encore de l'information gustative entre la langue et le thalamus.

Enfin, 12 paires de nerfs crâniens naissent au niveau du tronc cérébral et innervent essentiellement la tête (figure 15). Les deux premières paires entrent directement dans le cerveau antérieur, les autres entrent ou sortent via différents points du mésencéphale, du pont et du bulbe. Le nerf trijumeau (V^{ème} paire), le plus gros des nerfs crâniens sort au niveau du

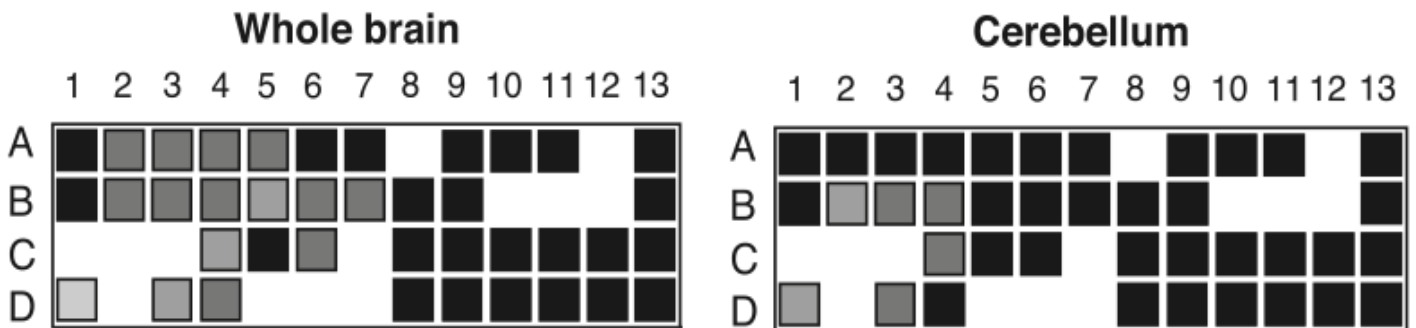


Fig. 16 : Résultats de RT-qPCR effectués sur des tissus humains adultes. Les 4 complexes Hox sont représentés en ordonnée et les 13 paralogues en abscisse. Chaque carré représente un gène *Hox*. Plus la couleur de ce carré est claire plus son expression est forte. On peut observer que les gènes *Hoxb3* et *Hoxb4* sont exprimés faiblement et qu'aucune expression n'est détectée ici pour *Hoxb1*. (Takahashi *et al.*, 2004)

pont ventrolatéral alors que le nerf vague (X^{ème} paire) sort au niveau du bulbe latéral et enfin le nerf de l'hypoglosse (XII^{ème} paire) sort entre les pyramides et l'olive inférieure au niveau du bulbe ventromédian. Ces trois nerfs crâniens sont respectivement impliqués la sensibilité de la face, les fonctions végétatives du tube digestif et la sensibilité du pharynx et enfin dans les mouvements de la langue.

Il a été décrit précédemment que la substance blanche de la moelle épinière est parcourue par de nombreux faisceaux de fibres des racines dorsales, ventrales ou encore intermédiaires.

Les cellules de la corne dorsale reçoivent donc les informations sensorielles via les fibres des racines dorsales. Elles transfèrent ensuite les informations reçues vers le bulbe où les neurones postsynaptiques les transmettent jusqu'au thalamus.

Les cellules de la corne ventrale, quant à elles, projettent leurs axones dans les fibres des racines ventrales innervant les muscles.

Enfin les interneurons de la zone intermédiaire structurent les réponses suites aux ordres et informations reçues du cerveau. Les axones des colonnes latérales innervent les neurones de la zone intermédiaire ainsi que ceux de la corne ventrale. Les signaux transmis contrôlent les mouvements volontaires.

3. HOXB1, HOXB3 ET HOXB4

Après avoir introduit les gènes *Hox* et notre modèle d'étude, nous allons dans cette section présenter les trois gènes sélectionnés dans notre projet.

3.1. CONTEXTE DE L'ETUDE

En 2004 Takahashi et son équipe ont analysés l'expression des 39 gènes *Hox* au stade adulte dans 20 tissus chez l'humain par RT-qPCR. Bien que l'origine des tissus étudiés dans le SNC, et notamment la représentativité des différentes structures, soit peu précise cette étude a mis en évidence que certains gènes *Hox* étaient toujours exprimés au stade adulte dans le cerveau (Figure 16). Au laboratoire, une étude similaire à celle de Takahashi a été réalisée. Cependant, la méthode était plus sensible : l'étude, menée chez la souris, était restreinte au cerveau et à la moelle cervicale ; le cerveau était disséqué en 7 sous-régions plus la moelle cervicale de manière à augmenter la sensibilité des mesures ; et enfin, des amorces spécifiques de chaque gène ont été utilisées. Dans cette étude, l'expression de nombreux gènes *Hox* a été détectée dans les 8 sous-régions analysées. En effet, bien qu'aucun gène *Hox* ne soit exprimé aux

Detected in brain regions				Cervical SC only		Not Detected	
Hoxa1	Hoxb3	Hoxa5	Hoxa7	Hoxa9	Hoxd10	Hoxa13	
Hoxb1	Hoxd3	Hoxb5	Hoxb7	Hoxb9	Hoxa11	Hoxb13	
Hoxd1	Hoxa4	Hoxc5	Hoxb8	Hoxc9	Hoxc11	Hoxc13	
Hoxa2	Hoxb4	Hoxa6	Hoxc8	Hoxd9	Hoxd11		
Hoxb2	Hoxc4	Hoxb6	Hoxd8	Hoxa10	Hoxc12		
Hoxa3	Hoxd4	Hoxc6	Hoxd13	Hoxc10	Hoxd12		

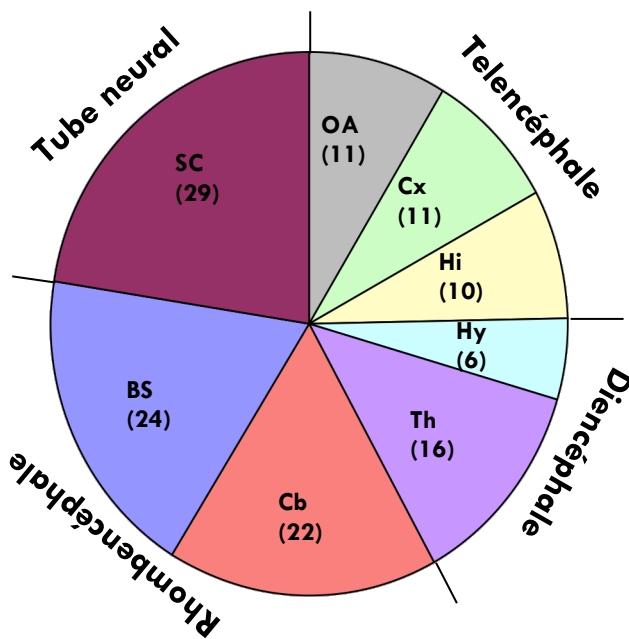


Fig. 17: - Tableau récapitulatif des gènes détectés par RT-qPCR dans au moins une région du cerveau, dans la moelle épinière ou non détectés.

- Diagramme représentant les différentes régions du cerveau et de la moelle épinière avec le nombre de gènes *Hox* exprimés par région.

OA : bulbes olfactifs, Cx : cortex, Hi : hippocampe, Hy : hypothalamus, Th : thalamus, Cb : cervelet, BS : tronc cérébral, SC : moelle épinière cervicale.
(Données non publiées)

stades embryonnaires dans les territoires antérieurs au rhombencéphale, cette étude a mis en évidence l'expression d'un nombre significatif de gènes Hox dans le cerveau antérieur : 11 gènes *Hox* (28%) dans les bulbes olfactifs et dans le cortex, 10 (25%) dans l'hippocampe, 6 (15%) dans l'hypothalamus et enfin 16 (41%) dans le thalamus (Figure 17).

Parmi ces gènes nous nous sommes intéressés plus particulièrement à *Hoxb1*, *b3* et *b4* afin de réaliser une étude plus poussée. Cette sélection repose sur les données préliminaires obtenues au laboratoire, mais également sur des données disponibles dans la littérature.

3.2. HOXB1

3.2.1. Territoires d'expression embryonnaires et régulation d'expression

Hoxb1 (*Hox2.9* dans l'ancienne nomenclature) appartient au groupe paralogue 1 qui compte 2 autres membres, *Hoxa1* et *Hoxd1*. De par leur position sur les complexes, les gènes de ce groupe paralogue sont parmi les premiers à être exprimés chez l'embryon. En effet, ils commencent à être exprimés pendant la gastrulation. (McNulty *et al.*, 2005).

Plus précisément, l'expression d'*Hoxb1* commence dès le stade LS "Late Streak", au niveau de la partie postérieure de la ligne primitive. L'expression est initiée par l'AR, via le RARE présent à l'extrémité 3' de la région régulatrice (Tümpel *et al.*, 2009). Lors de l'élargissement de la partie rostrale de la plaque neurale, c'est à dire au stade EHF "early Head Fold", la limite antérieure d'expression d'*Hoxb1* s'étend rostralement et dépasse le nœud de Hensen. Au stade LHF "Late Head Fold" elle s'étend antérieurement jusqu'au territoire correspondant à la limite entre les territoires présomptifs correspondant aux r3 et r4. Ensuite, de 8 à 8,5dpc l'expression d'*Hoxb1* régresse en direction caudale à l'exception du territoire correspondant au r4 dans lequel l'expression reste intense (Deschamps *et al.*, 1999). Cette régression a lieu grâce à l'expression de *Cyp26C* qui est impliqué dans la dégradation de l'AR dans ces territoires (Tümpel *et al.*, 2009).

A 8,5dpc, toutes les cellules du r4 expriment *Hoxb1* ; l'expression se concentre ensuite dans les zones basales et alaires du r4 puis dans une troisième zone intermédiaire (Gaufo *et al.*, 2000).

La restriction d'*Hoxb1* dans r4 implique un mécanisme moléculaire de régulation positive et négative. Négative pour inhiber l'expression dans r3 et r5 grâce à un site situé à l'extrémité 5' de la région codante d'*Hoxb1* (Studer *et al.*, 1994). Ce site inclus un élément DR2 RARE pouvant lier l'hétérodimère RAR-RXR. *Krox20* se lie également au module de répression et est important pour l'inhibition d'*Hoxb1*. L'action positive permet le maintien de l'expression

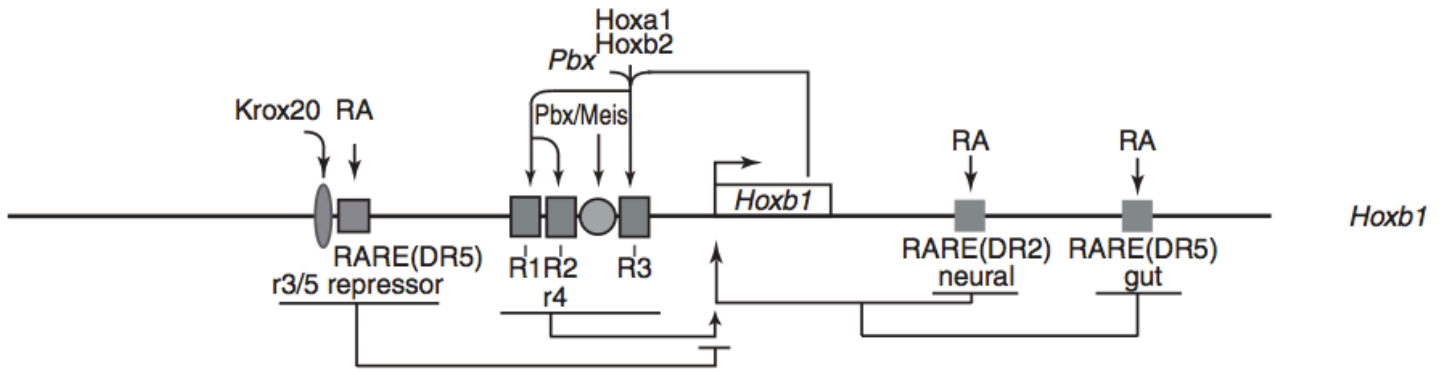


Fig. 18 : Organisation des éléments cis-régulateurs d'*Hoxb1* dans le cerveau postérieur en développement. Les éléments cis sont présents sur la ligne du gène alors que les éléments trans agissant sur ces éléments cis sont présentés au-dessus et que les éléments cis-régulateurs et les territoires d'expression sont présentés en-dessous. (Tümpel *et al.*, 2009)

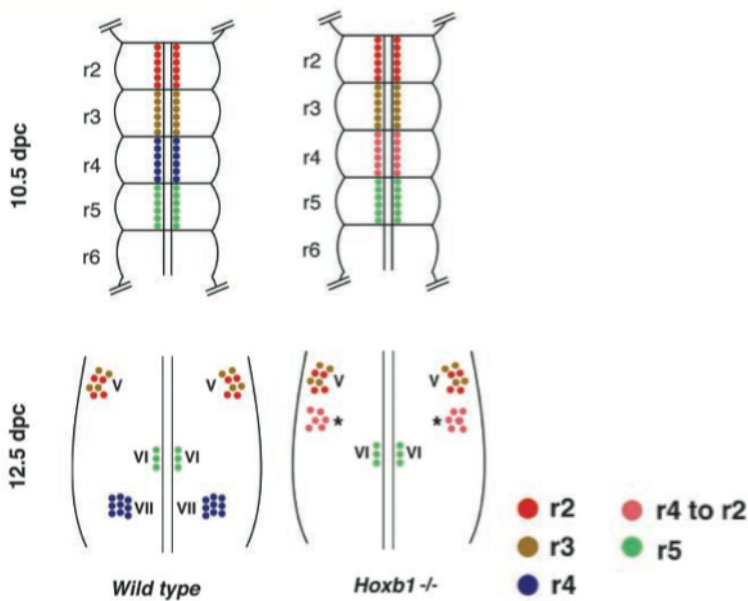


Fig. 19 : Phénotype rhombencéphalique des embryons mutants *Hoxb1*^{-/-}.

Devenir des précurseurs de motoneurons du rhombencéphale pour les mutants *Hoxb1*. Vue schématisée du rhombencéphale à un stade précoce de développement (10,5 dpc) et devenir des motoneurons du rhombencéphale à un stade plus tardif (12,5 dpc). Au stade 10,5 dpc les précurseurs des motoneurons des rhombomères 2 à 5 ont déjà acquis leur identité spécifique. Les différentes populations de précurseurs vont donner naissance aux noyaux moteurs du trijumeaux (V, dérivés du r2 et du r3), des noyaux abducens (VI, dérivés r5) et des nerfs faciaux (VII dérivés du r4). Chez les mutants *Hoxb1* les précurseurs présumés du r4 sont mal spécifiés et acquièrent une identité semblable au r2. Ils migrent donc tous de manière semblable aux motoneurons des nerfs trijumeaux et forment des motoneurons ectopiques (*) qui seront éliminés par mort cellulaire.

(Gavalas *et al.*, 2003)

d'*Hoxb1* dans r4 via un enhancer. Celui-ci peut être activé par liaison coopérative d'*Hoxb1*, *Hoxa1* et *Hoxb2* mais également avec *Pbx* ou *Meis*. Il est très conservé et contient également un site de liaison pour *Sox2/Oct* qui module l'activité de régulation, notamment lors de l'induction par l'AR (Di Rocco *et al.*, 2001 ; Tümpel *et al.*, 2009 ; Figure 18).

Finalement *Hoxb1* s'autorégule pour rester exprimé dans r4.

3.2.2. Mutants

La mutation knock-out (KO) pour *Hoxb1* est létale aux stades périnataux. Dans les embryons mutants, r4 prend l'identité du r2. Ceci a pour conséquence de spécifier incorrectement les précurseurs neuronaux le long de l'axe dorso-ventral dans le territoire correspondant à r4. Il est donc observé que lors du développement du r4, les populations de motoneurones ectopiques sont anormalement nombreuses et éliminées pas mort cellulaire. Celle-ci devient donc plus importante qu'à l'accoutumée dans ce territoire (Gavalas *et al.*, 2003 ; Gaufo *et al.*, 2000 ; Figure 19).

Les populations persistantes présentent un comportement migratoire inhabituel, la migration se fait plus dorsalement. C'est un problème de migration au niveau de deux types de motoneurones qui est plus particulièrement observé. Ce problème touche d'une part les neurones efférents contralatéraux vestibuloacoustiques (nerf VIII), mais il touche également motoneurones faciaux (nerf VII), ce qui provoque une paralysie faciale. De plus, *Hoxb1* serait également impliqué dans le maintien du nerf crânien VII à travers son rôle dans la spécification des crêtes neurales en cellules gliales qui permettront de myéliniser ce nerf (Arenkiel *et al.*, 2004).

3.2.3. Données chez l'adulte

Bien qu'aucune autre donnée ne soit rapportée dans la littérature, au sein du laboratoire l'expression d'*Hoxb1* a été détectée par RT-qPCR dans les bulbes olfactifs et le thalamus dans le cerveau adulte (cf. partie résultats). Des données préliminaires d'HIS semblaient confirmer ces données. Même si l'intensité du signal semblait faible, le rapport signal/bruit de fond était bon.

3.3. HOXB3

3.3.1. Territoires d'expression embryonnaires et régulation d'expression

Hoxb3 (*Hox2.7* dans l'ancienne nomenclature) appartient au groupe paralogue 3 qui compte 2 autres membres *Hoxa3* et *Hoxd3*. De par leur position sur les complexes, les gènes de ce

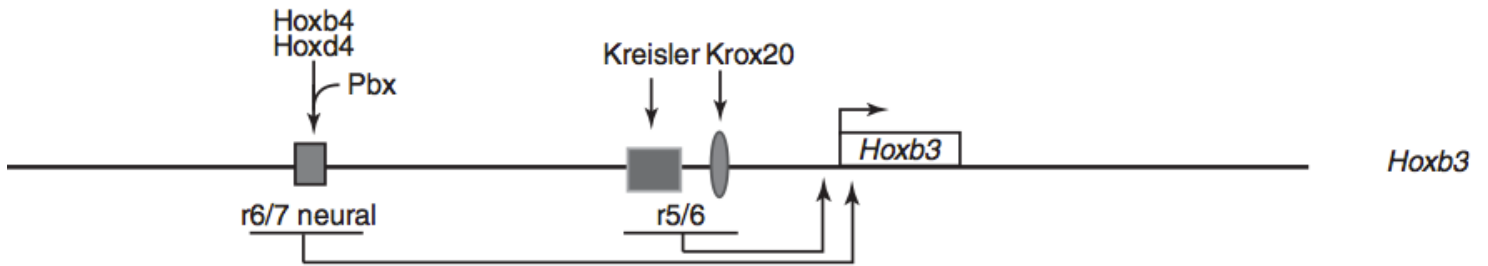
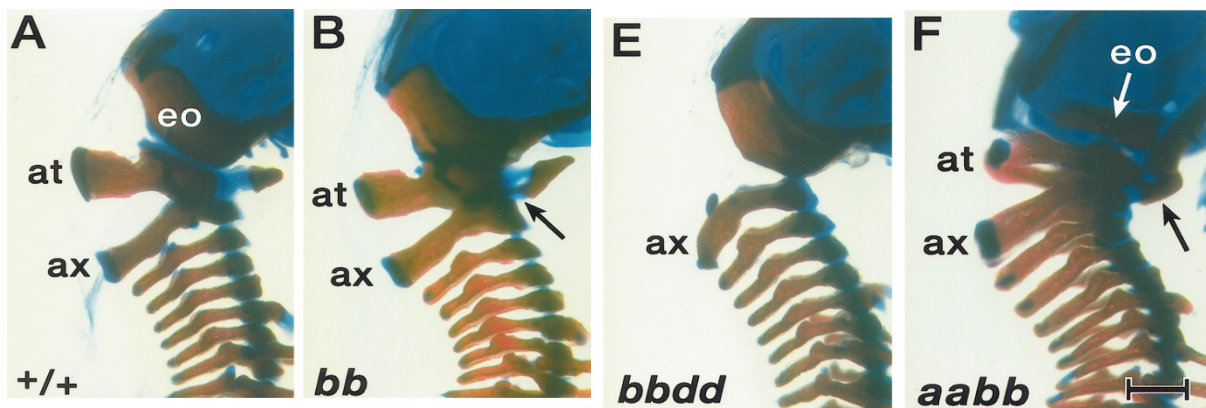


Fig. 20 : Organisation des éléments cis-régulateurs d'*Hoxb3* dans le cerveau postérieur en développement. Les éléments cis sont présents sur la ligne du gène alors que les éléments trans agissant sur ces éléments cis sont présentés au-dessus et que les éléments cis-régulateurs et les territoires d'expression sont présentés en-dessous. (Tümpel *et al.*, 2009)

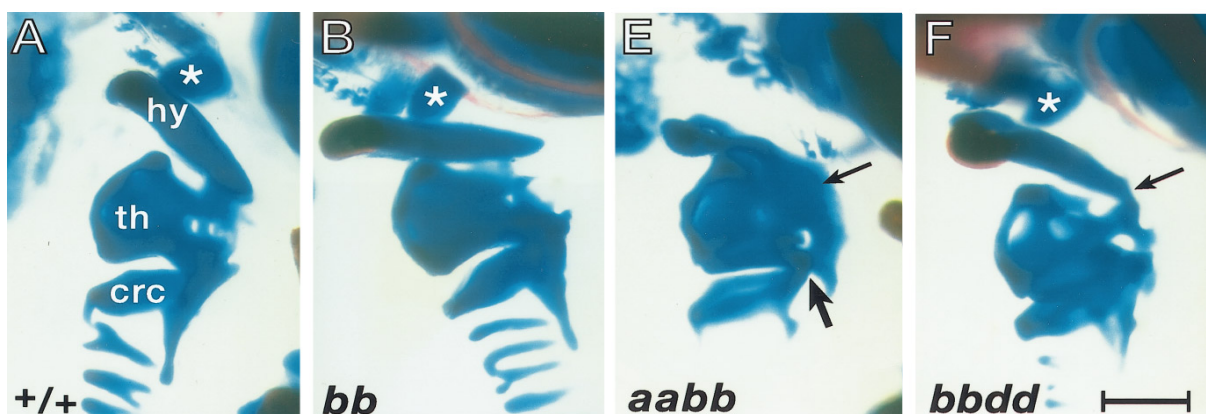
Fig. 21 : Mutants *Hoxb3* : effets aux niveaux des somites et des crêtes neurales.



Effets au niveau de la formation des somites.

(A) WT. Atlas (at), axis (ax) et os exoccipital (eo). (B) pour le mutant *Hoxb3*^{-/-} : présence d'une fusion ou ossification entre l'arche antérieure de l'atlas et du processus odontoïde de l'axis. (E) Mutant *Hoxb3*^{-/-}/*Hoxd3*^{-/-} : déletion de l'atlas et transformation de l'axis qui a dès lors un phénotype semblable à des vertèbres plus postérieures. (F) *Hoxa3*^{-/-}/*Hoxb3*^{-/-} : diminution de la taille de l'os exoccipital (flèche blanche). L'arche antérieure de l'atlas est fusionnée à l'os basoccipital ainsi qu'au processus odontoïde (flèche noire). L'arche neurale a une taille réduite.

(Manley & Capecchi, 1997)



Effets au niveau de la formation des dérivés des crêtes neurales.

(A) WT. (B) pour le mutant *Hoxb3*^{-/-} : aucun phénotype mutant n'est observé. (E) *Hoxa3*^{-/-}/*Hoxb3*^{-/-} : réduction importante de l'os hyoïde (hy) accompagnée d'une faible formation du cartilage de la thyroïde (th). En vue dorsale (petite flèche) on observe une masse amorphe de cartilage. La grosse flèche montre que le cartilage cricoïde (crc) est fusionné avec le cartilage thyroïde. (F) *Hoxb3*^{-/-}/*Hoxd3*^{-/-} : les mutations sont mineures sur ce mutant. La flèche montre une fusion entre la corne hyoïde supérieure et le cartilage de la thyroïde. L'astérisque indique que la corne inférieure n'est pas affectée.

(Manley & Capecchi, 1997)

groupe paralogue sont exprimés parmi les premiers (entre 8 et 8,5dpc) et dans des territoires antérieurs. Selon différents auteurs, la limite antérieure d'expression d'*Hoxb3* a été décrite à la frontière r5/r6 à 9,5dpc (Nolte & Krumlauf, 2007) et à la frontière r6/r7 (Gaufo *et al.*, 2003). Il est à noter que nos données d'HIS-WM (non illustrées dans ce mémoire) confirment la limite d'expression décrite par Capecchi à r6/r7.

Plus précisément, l'initiation de l'expression d'*Hoxb3* dans r5 se fait grâce à une collaboration de *Kreisler* et *Krox20* : *Kreisler* se lie a niveau du locus d'*Hoxb3* alors que *Krox20* coopère avec *Kreisler* pour potentialiser l'activité régulatrice du module (Tümpel *et al.*, 2009 ; Figure 20).

3.3.2. Mutants

L'embryon mutant KO pour *Hoxb3* est viable et présente de petites malformations au niveau des vertèbres cervicales (atlas, axis). Ces animaux présentent également des problèmes dans l'hématopoïèse, plus particulièrement dans la lymphopoïèse (Ko *et al.*, 2007). Aucune malformation ou défaut n'ont décrits au niveau du SNC.

Le double mutant *Hoxb3/Hoxa3* a été généré et présente de nombreux types d'anomalies. En effet, des défauts ont été décrits au niveau de la formation des structures dérivées des somites et de la crête neurale, mais également au niveau de l'identité des rhombomères et enfin au niveau du développement et de la migration des glandes comme le thymus, la thyroïde et la parathyroïde. La glande thyroïde est normale chez le KO *Hoxb3* simple.

L'étude des mutants composés a permis de mettre en évidence des fonctions de ce groupe paralogue. Tout d'abord, concernant l'implication d'*Hoxb3*, *a3* et *d3* dans la formation des structures dérivées des somites et de la crête neurale, on a remarqué que la mutation d'*Hoxb3* exacerbe les phénotypes des mutants *Hoxa3* et *Hoxd3*. Plus précisément, pour la formation des structures dérivées de la crête neurale on remarque que les structures ainsi que le cartilage de la région de la gorge sont atteints. Au niveau des vertèbres, le développement de l'atlas et l'axis (vertèbres cervicales 1 et 2) ainsi que d'autres vertèbres cervicales est anormal. Une diminution de la taille des os occipitaux a également été décrite, notamment une forte malformation du supra-occipital et l'absence d'ossification (Manley & Capecchi, 1997 ; Figure 21).

Hoxb3, *a3* et *d3* sont également impliqués dans la mise en place des motoneurones branchiaux et somatiques. En ce qui concerne les anomalies touchant les rhombomères on observe une perte des motoneurones somatiques au niveau du r5, dans les noyaux abducens (nerf II). Par

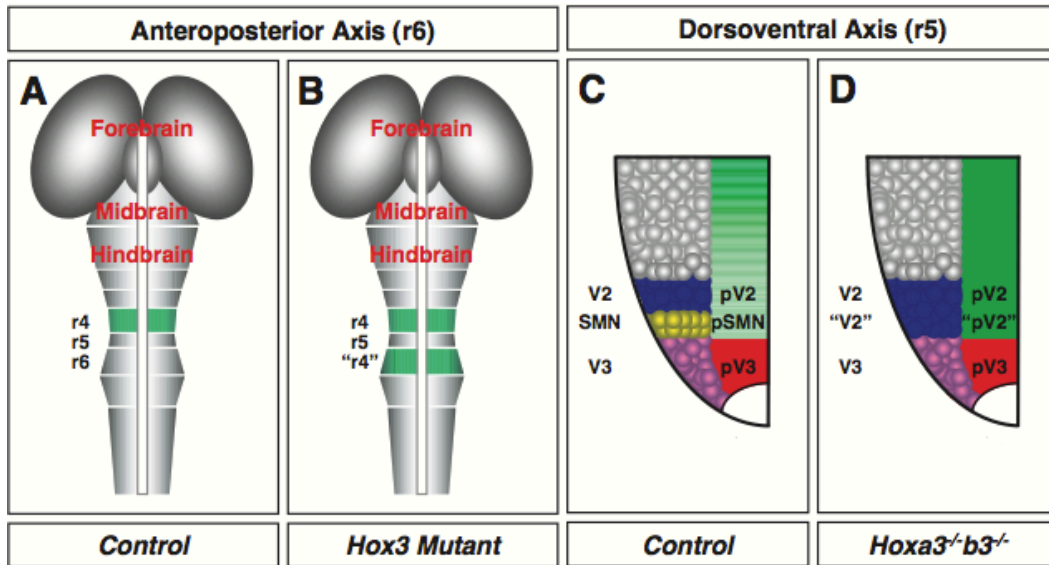


Fig. 22 : Mutants *Hoxb3* : effets au niveau des motoneurones branchiaux et somatiques.

Les paralogues du groupe 3 jouent 2 rôles cruciaux dans le devenir des neurones. **(A, B)** selon l'axe A-P du rhombencéphale les paralogues du groupe 3 sont nécessaires pour inhiber l'expression d'*Hoxb1* dans le r6. (la perte des gènes du groupe 3 provoque un changement au niveau du r6 qui devient semblable au r4 : "r4" à cause de l'expression ectopique d'*Hoxb1* dans ce territoire. **(C, D)** selon l'axe D-V du rhombomère 5 l'expression combinée d'*Hoxb3* et *a3* est nécessaire pour le devenir des progéniteurs de motoneurones somatiques (pSMN) des noyaux abducens. Des mutations touchant *Hoxb3* et *a3* sont associées à une expression ectopique, des progéniteurs d'interneurones V2 dans les domaines plus ventraux du SMN (domaines des motoneurones somatiques). On retrouve donc des interneurones V2 dans la zone généralement occupée par SMN. (Gaufo *et al.*, 2003)

ailleurs l'inhibition exercée sur *Hoxb1* au niveau du r6 est levée, ce territoire exprime *Hoxb1* et devient donc semblable au r4 (Gaufo *et al.*, 2003 ; Figure 22).

Enfin, *Hoxb3*, *a3* et *d3* sont impliqués dans le développement et la migration des glandes telles que le thymus, la thyroïde et la parathyroïde. Au niveau des anomalies touchant les glandes, les cellules sécrétrices de calcitonine sont absentes dans les lobes de la thyroïde, et dans les cas où elles sont présentes elles ne sont pas intégrées aux glandes. Le phénotype peut être différent entre les 2 côtés de l'animal. Enfin, la structure de la glande thyroïde est anormale, tout comme la migration du thymus et/ou de la parathyroïde (Manley & Capecchi, 1998).

3.3.3. Données chez l'adulte

En 1998, Sanlioglu et ses collaborateurs ont réalisé une étude visant à étudier les gènes exprimés uniquement dans le cervelet. Pour cela ils ont quantifié l'expression des gènes *Hox* chez des souris le jour de la naissance (P0), par PCR utilisant des amorces dégénérées, dans le cervelet et l'ont comparée à l'expression dans le cerveau antérieur. Les résultats révèlent qu'*Hoxb3* est exprimé dans le cerveau antérieur. Ces études n'ont pas été poursuivies. Cependant, les données obtenues par RT-qPCR au sein du laboratoire ont mis en évidence l'expression d'*Hoxb3* dans le thalamus de souris adulte, confirmant une expression tardive d'*Hoxb3* dans des territoires antérieurs du SNC (cf. figure 17).

3.4. HOXB4

3.4.1. Territoires d'expression embryonnaires et régulation d'expression

Hoxb4 (*Hox2.6* dans l'ancienne nomenclature) appartient au groupe paralogue 4 qui compte 3 autres membres, *Hoxa4*, *Hoxc4* et *Hoxd4*.

De par leur position sur les complexes, les gènes de ce groupe paralogue sont exprimés tôt dans le développement embryonnaire (entre 8,5 et 9,5dpc) et dans des territoires du rhombencéphale.

L'expression d'*Hoxb4* lors du développement embryonnaire a comme limite antérieure la frontière entre r6 et r7 (Nolte & Krumlauf, 2007). Elle débute en réponse directe à l'AR via l'intermédiaire d'un 3' RARE (Gould *et al.*, 1997 ; Morrison *et al.*, 1997). Cet élément est nécessaire pour l'expression précoce dans r7. Comme pour *Hoxb1*, l'expression d'*Hoxb4* est maintenue par auto- et cross-régulation avec d'autres gènes *Hox* et implique les cofacteurs *Pbx*, *Meis* et *Prep* (Figure 23).

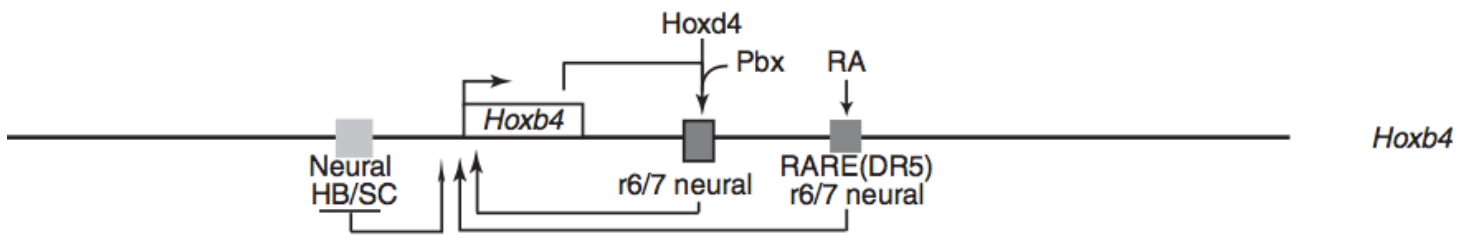


Fig. 23 : Organisation des éléments cis-régulateurs d'*Hoxb4* dans le cerveau postérieur en développement. Les éléments cis sont présents sur la ligne du gène alors que les éléments trans agissants sur ces éléments cis sont présentés au-dessus et que les éléments cis-régulateurs et les territoires d'expression sont présentés en-dessous. (Tümpel *et al.*, 2009)

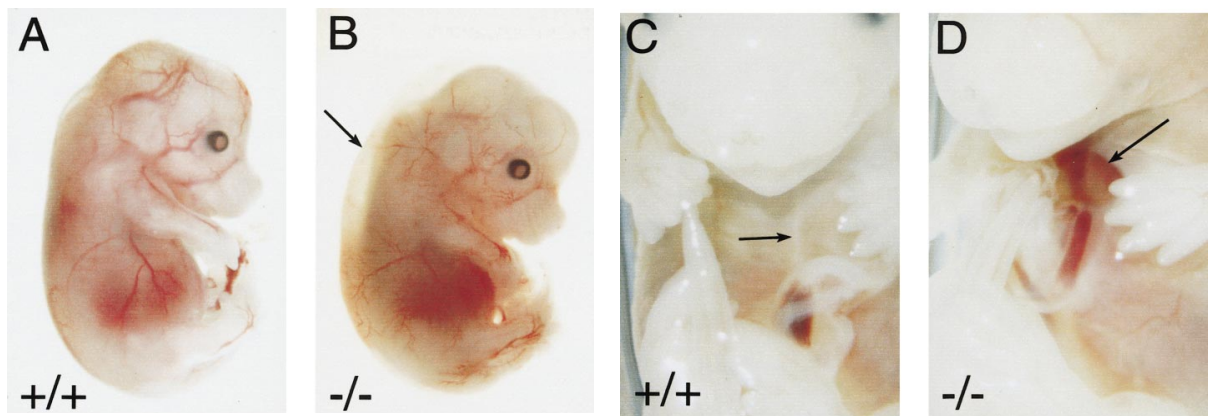


Fig. 24 : Souris mutantes pour *Hoxb4*. (A) Vue latérale d'un embryon entier de 15,5 dpc. (B) on remarque une forme recroquevillée accompagnée d'un œdème dorsal (flèche). (C) Vue ventrale de ce même embryon. La flèche montre la ligne dorsale de formation correcte de la paroi abdominale. (D) Vue ventrale du mutant on observe un trou béant dans la poitrine à travers lequel le cœur est visible. (Manley *et al.*, 2001)

Des évidences quant à un feedback positif entre *Hoxb4* et le signal rétinoïque ont été illustrées. Le gène du récepteur RAR β contient un élément de réponse aux gènes *Hox* pouvant lier *Hoxb4*, *Hoxd4* et les cofacteurs. L'AR déclenche donc l'expression d'*Hoxb4* qui à son tour régule positivement l'expression du récepteur RAR β (Tümpel *et al.*, 2009).

Il existe 3 séquences enhancers pour *Hoxb4*. On les note A, B et C. A est situé en 3' et détermine la limite antérieure d'expression d'*Hoxb4* dans r6/r7 alors que respectivement B et C sont responsables de la régulation de l'expression au niveau des poumons et du mésoderme mais également au niveau du tube neural caudal (Maconochie *et al.*, 1996).

3.4.2. Mutants

L'embryon mutant KO pour *Hoxb4* présente une forte létalité embryonnaire et néonatale. Du point de vue du phénotype externe on dénote un nombril déplacé et ouvert, une forme recroquevillée due à un œdème dorsal et enfin un sternum percé. Du point de vue des organes internes on remarque des problèmes au niveau de la paroi abdominale pour le double mutant *Hoxb2/b4* mais également un défaut au niveau du péricarde, des hernies au niveau du diaphragme et enfin une désorganisation des organes tels que le cœur, les poumons ou encore le foie. Le cœur est notamment déplacé antérieurement (Manley *et al.*, 2001 ; Figure 24).

Ce sont des phénotypes similaires au syndrome humain de Pentalogy of Cantrell (Manley *et al.*, 2001).

3.4.3. Données chez l'adulte

Au sein du laboratoire *Hoxb4* a été détecté par RT-qPCR dans toutes les régions antérieures du cerveau. En accord avec ces données, Nicolay (2004) montrent également par immunocytochimie qu'*Hoxb4* est présent dans les hémisphères cérébraux issus de souriceaux nouveaux nés et mis en culture. Cet article indique qu'*Hoxb4* est co-exprimé dans des oligodendrocytes *in vitro* ; cependant ce n'est pas un gène spécifique des oligodendrocytes. Il est également présent dans d'autres cellules telles que les neurones.

II. Objectifs

Les gènes *Hox* ont donc été assez largement étudiés dans le SNC embryonnaire ; ils y jouent un rôle prépondérant dans la détermination de l'identité des différentes structures du futur cerveau postérieur ou rhombencéphale et de la moelle épinière. A ces stades de développement, ces gènes ne sont pas exprimés dans les territoires du cerveau antérieur ni du cerveau moyen.

Récemment, des données de la littérature mais surtout obtenues au laboratoire suggèrent que chez l'adulte les gènes *Hox* seraient toujours exprimés dans le cerveau. Si les gènes *Hox* sont exprimés, on ignore cependant tout de leur rôle dans ces territoires. Mon travail s'inscrit dans ce contexte de détermination d'importance biologique et d'étude de fonctions tardives des gènes *Hox* dans le SNC. Plus précisément, les objectifs de ce mémoire sont d'améliorer les connaissances actuelles au sujet de l'expression des gènes et des protéines *Hox* dans le système nerveux central adulte, et particulièrement, le cerveau antérieur. Connaître où et quand des gènes sont exprimés permet en effet d'émettre des hypothèses fonctionnelles plus précises sur leurs fonctions potentielles. Pour les raisons décrites dans l'introduction, nous avons sélectionnés trois gènes appartenant au complexe B, à savoir, *Hoxb1*, *b3* et *b4*.

Afin d'atteindre nos objectifs, une stratégie triple a été mise en œuvre. Dans un premier temps, les niveaux d'expression des 3 gènes ont été étudiés de manière quantitative par RT-qPCR. L'étape suivante a été une localisation neuro-anatomique des transcrits par hybridation *in situ*. Par cette méthode, les transcrits codés par nos gènes d'intérêts ont été visualisés au niveau cellulaire dans les différentes sous régions du cerveau. Les profils d'expression de chaque gène ont été dégagés et étudiés.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la détection des protéines par des immunohistochimies. C'est une méthode complémentaire aux HIS dans le sens où elle permet de confirmer que les transcrits observés sont bien traduits en protéines agissant dans le cerveau et non pas dégradés. En effet, si les protéines *Hox* sont présentes dans le cerveau adulte, cela renforce l'hypothèse d'une importance fonctionnelle pour les gènes *Hox* dans les SNC adulte.

Nos résultats seront présentés, puis discutés, après la section Matériel et Méthodes.

III. Matériel et Méthodes

INTRODUCTION

Dans le cadre de mon mémoire, afin d'étudier l'expression de gènes *Hox* j'ai utilisé deux approches qui sont la RT-qPCR et l'hybridation *in situ* (HIS). Je me suis également intéressée à l'étude des protéines Hox en réalisant des détections immunohistochimiques (IHC).

La RT-qPCR est une méthode de quantification en temps réel. Elle consiste à mesurer l'amplification d'un fragment d'ADNc grâce à un agent intercalent fluorescent. Cet agent s'intercale dans les doubles brins (ici d'ADN) qui s'hybrident et se dénaturent lors des différents cycles d'amplification et de dénaturation. Ceci nous permet de déterminer les niveaux d'expression des gènes étudiés.

L'HIS implique la synthèse de sondes d'acides nucléiques anti-sens, ARN ou ADN, complémentaires des ARNm (sens) présents dans les tissus. Ces sondes sont synthétisées avec une des bases, l'uracile, couplée à la digoxygénine. Par cette complémentarité les sondes s'hybrident avec les ARNm dans les conditions appropriées. La détection de la sonde se fait par une réaction immunologique, grâce à un anticorps anti-digoxygénine. Cet anticorps est couplé à la phosphatase alcaline, un enzyme qui va réagir à l'ajout de NBT/BCIP et catalyser la formation d'un précipité bleu-violet dans les cellules contenant l'ARNm transcrit depuis nos gènes d'intérêt (Chotteau-Lelièvre *et al.*, 2006 ; Roche Applied Science Technical Manual on ISH, and the Technical Bulletin 507 of Applied Biosystems).

Afin d'étudier les protéines Hox, j'ai utilisé la méthode d'immunohistochimie. Cette méthode implique l'utilisation d'anticorps primaires mono ou polyclonaux pour la détection des protéines. Les anticorps monoclonaux sont très spécifiques car ils ne reconnaissent qu'un seul épitope alors que les polyclonaux peuvent contenir des sous-populations d'anticorps qui réagissent avec de multiples épitopes mais l'interaction avec les différents épitopes est difficile à contrôler. Pour la détection des anticorps primaires, des anticorps secondaires sont utilisés. La révélation des anticorps secondaires peut se faire par fluorescence, celle d'un fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire utilisé, ou par une réaction enzymatique (comme pour les HIS) conduisant à un marquage colorimétrique stable. La méthode de révélation par fluorescence est celle que nous avons privilégiée pour mon mémoire car elle offre la possibilité de colocalisation en superposant différents marquages. Afin de tester les anticorps, une étape préliminaire par western-blotting sur protéines extraites de cerveaux et d'embryons a été réalisée.

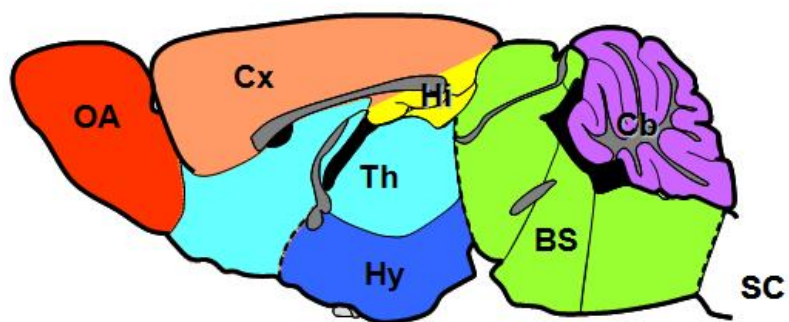


Fig. 25 : Représentation schématique des 8 territoires séparés lors des macrodissections.

OA : bulbes olfactifs, Cx : cortex, Hi : hippocampe, Th : thalamus, Hy : hypothalamus, Cb : cervelet, BS : tronc cérébral, SC : moelle épinière cervicale

1. OBTENTION DES CERVEAUX

1.1. SOURIS

Les souris utilisées sont des souris de fond génétique C57BL/6J, elles sont commandées chez Charles Rivers, arrivent à l'animalerie âgées de 10 semaines, 2 semaines avant la mise à mort afin de diminuer au maximum les variations de résultats liées au mode de vie des souris. A l'animalerie les souris sont soumises à des cycles Jour/Nuit de 14h/10h. Elles sont mises à jeun à 7h soit au début de la période de jour et sont ensuite mises à mort à 11h, par inhalation de CO₂ ou décapitation (le plus souvent pour les stades postnataux).

Un élevage est également mis en place à l'animalerie. Celui-ci nous permet de générer des souris de fond génétique C57BL/6J issues de croisements entre individus commandés chez Charles Rivers. Ces souris de deuxième génération (jamais au-delà) ont été utilisées pour la mise au point des techniques et l'obtention des stades embryonnaires, fœtaux et postnataux.

1.2. PRELEVEMENTS

1.2.1. Pour la RT-qPCR

- Matériel
 - Souris C57BL/6J
 - Tri Reagent, Sigma, T9424
 - QuantiTect® RT Kit, Qiagen 205311

- Procédure

Après euthanasie les cerveaux sont prélevés et macrodisséqués (Figure 25). Les sept sous-régions des cerveaux plus la moelle épinière cervicale sont ensuite broyées de manière individuelle à l'aide de billes de céramique stériles ajoutées dans les eppendorfs (Precellys24) puis les ARNs totaux sont extraits dans du Tri Reagent (phénol, chloroforme) afin d'extraire les ARNs. Ces ARNs subissent une reverse transcription à l'aide d'un kit RT afin d'obtenir l'ADNc qui est dilué 50x et conservé à -80°C.

Un pool d'embryon a également été préparé afin d'être utilisé comme calibrateur. Des embryons ont été prélevés à différents stades de développement : 8.5, 9.5, 10.5 et 12.5dpc (membres). Ils ont été traités comme décrit ci-dessus.

Ces étapes d'obtention du matériel et de réverse transcription ont été réalisées au laboratoire par Nicolas Theys et Konstantin Doshishti-Agolli avant mon arrivée.

1.2.2. Pour les hybridations *in situ* sur coupe

- Matériel
 - Souris C57BL/6J
 - Milieu d'enrobage, Shandon Cryomatrix, 679006

- Procédure

Après euthanasie des souris adultes les cerveaux sont prélevés par extraction de la boîte crânienne, ils sont orientés dans des moules, enrobés dans un milieu de congélation (OCT), et congelés sur de la carboglace avant conservation à -80°C.

Les souriceaux aux stades P14 et P21 sont traités comme les souris adultes. Pour les stades postnataux P0 et P7, la boîte crânienne étant trop fragile pour être ôtée, les cerveaux sont congelés en conservant cette structure.

1.2.3. Pour western-blottings : extraction et dosage de protéines

- Matériel
 - Embryons et fœtus de souris C57BL/6J

- Solutions

- Tampon de lyse : 20 ml

Tris HCl UltraPure 1M pH 7.5 (MP Biomedicals, 819623)	200 µl
NaCl 5M (Acros Organics, 207790010)	600 µl
EDTA 0,5M (Sigma, E5134)	40 µl
Inhibiteur de protéases (Roche, 11836170001)	2 pastilles
Triton X-100 (SigmaUltra, T9284)	200 µl
Eau milliQ	18,96 ml

- Procédure

Les embryons au stade 9,5dpc sont prélevés des cornes utérines des femelles gestantes, puis extraits de leurs membranes extra-embryonnaires sous loupe binoculaire. Les cerveaux adultes disséqués pour certains en 7 régions, pour d'autres coupés en 2 de manière longitudinale. Les échantillons sont ensuite lavés dans du PBS et placés individuellement dans des eppendorfs de 1,5ml. Le PBS est ensuite ôté, les échantillons sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'au jour de l'extraction des protéines.

Pour l'extraction, du tampon de lyse (100 à 200µl selon la taille de l'échantillon à solubiliser) est ajouté aux échantillons avant de leur faire subir deux cycles de congélation / décongélation dans l'azote liquide suivis d'une sonication (dans un bain à sonication (Branso 3510) ou à l'aide d'un sonicateur sur tige (Ultrasonic processor, Bioblock Scientific, Vibra Cell 75022) selon la taille des échantillons). Le surnageant est récupéré après une centrifugation à 1500rpm et 4°C pendant 20 minutes et conservé à -20°C.

1.2.4. Pour les immunohistochimies

- Matériel

- Nembutal, Ceva dilué 2x dans du NaCl 0,9%
- Milieu d'enrobage, Shandon Cryomatrix, 679006

- Solutions

- PFA4% dans PBS

PFA 20% (Aldrich, 441244)	4%	40 ml
PBS 1x (Gibco, Invitrogen, Tablets, 928974)	1x	160 ml

- PBS 1x
- Sucrose, Aldrich, 179949

- Procédure

Les cerveaux utilisés pour les IHC sont obtenus après perfusion des souris à l'aide de PFA4% dans PBS.

Les souris sont anesthésiées avec du Nembutal® par injection intrapéritonéale, la dose injectée est égale au poids de la souris multiplié par 5. La cage thoracique est ensuite ouverte, l'oreillette droite est entaillée et une aiguille est insérée dans le ventricule gauche. La perfusion débute avec une solution de 20ml PBS afin d'éliminer le sang de l'animal, suivie d'une solution de 20 à 25ml de PFA4% PBS afin de fixer les tissus. A la fin de la perfusion, le cerveau est extrait de la boîte crânienne et post-fixé 24h à 4°C dans du PFA4% PBS. Après les étapes de fixation, lavages (1h dans PBS) le tissu est cryopréservé par gradient de sucrose. Une première solution de sucrose à 10% dans PBS puis lorsque les échantillons sont tombés au fond du tube dans une solution de sucrose à 20% dans PBS jusqu'à ce que les échantillons tombent au fond du tube. Les cerveaux sont orientés dans les moules, enrobés dans l'OCT et conservés à -80°C.

2. RT-qPCR

Les RT-qPCR correspondent au volet quantitatif de mon mémoire, cette procédure permet de déterminer le niveau relatif d'expression des gènes d'intérêt dans le cerveau adulte par rapport à celui dans le pool d'embryon. Pour cela nous utilisons le SybrGreen comme agent intercalant, celui-ci ne s'intercale que lorsqu'il y a formation d'un duplex. Toutes les mesures sont réalisées en duplicata. La machine utilisée est une Step One Plus (Applied Biosystems).

2.1. GENES DE REFERENCE

Sur base des recommandations publiées dans le "MIQE guideline" (<http://miqe.gene-quantification.info/>, Bustin *et al.*, 2009) nous utilisons 3 gènes de références qui sont H2A, 36B4 et 18S. L'ARN ribosomique 18S est utilisé communément comme gène de référence. *H2A* code pour l'histone H2A et *36B4* code pour une phosphoprotéine faisant des jonctions serrées avec la sous unité 40S du ribosome. Ces gènes ont un niveau d'expression homogène dans toutes les régions du cerveau qui nous intéressent.

2.2. QUANTIFICATION : METHODE DU $\Delta\Delta C_q$

La méthode de quantification utilisée est celle du $\Delta\Delta C_q$, le "Quantitative Cycle" ou C_q étant le cycle PCR à partir duquel l'amplification de notre échantillon devient exponentielle. Dans un premier temps les niveaux d'expression obtenus pour nos gènes d'intérêt dans les différentes régions du cerveau sont normalisés par la moyenne géométrique des gènes de référence, puis dans un second temps ces valeurs sont calibrées par rapport aux valeurs du pool d'embryon. Nous obtenons donc une expression relative à celle du pool d'embryon, établie arbitrairement à 1.

2.3. PROCEDURE

- Matériel

- Quantitect® SYBR® Green PCR, Qiagen 204143

Quantitect SYBR Green PCR Buffer (KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄)
HotStarTaq® DNA Polymerase
dNTP mix, including dUTP
SYBR Green I
ROX™ passive reference dye
5mM MgCl ₂
RNase-free Water

Nombre de puits	SYBR GREEN mix (μl)	Primer 100 μM (μl)	RF water (μl)	Volume total (μl)
1	6	0.2	2.8	9
88 => x95	570	19	266	855

Tableau 1 : Mix PCR

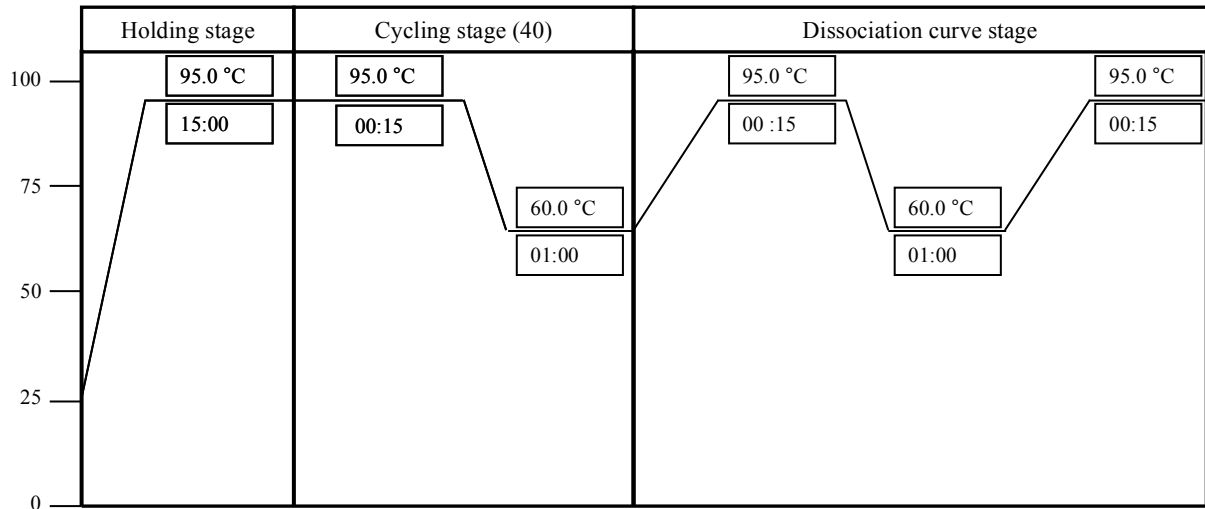


Fig. 26 : Représentation schématique des différents cycles de RT-qPCR. Etapes de dénaturation, d'amplification et de dissociation avec les durées et températures correspondantes.

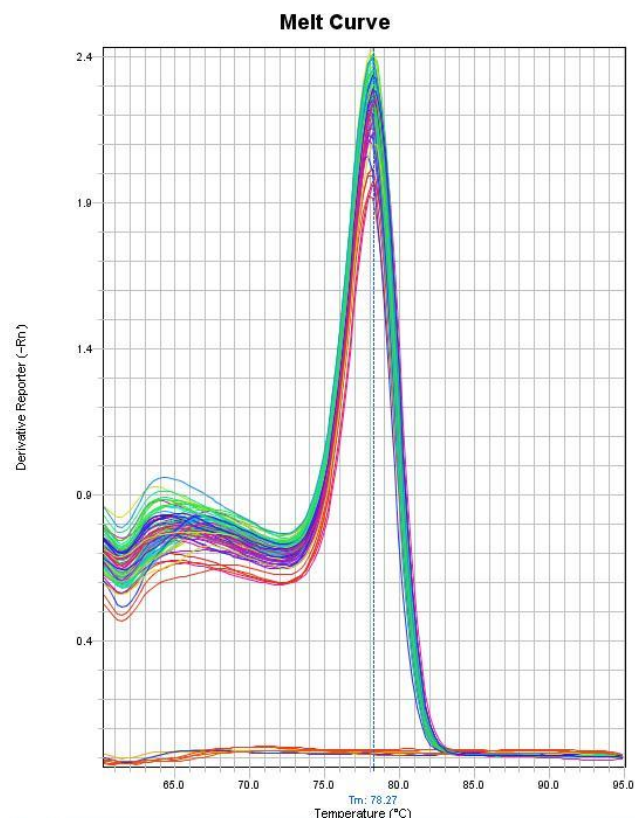


Fig. 27 : Exemple de courbe de dissociation pour le gène *H2A*

- Plaques 96 puits, MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL, Applied Biosystems®, 4346906
- Film, MicroAmp® Optical Adhesive Film, Applied Biosystems®, 4311971
- Primers

	Foward	Reverse
<i>Hoxb1</i>	catcagcctacgacctctc	gtgaagtttgtcggagacc
<i>Hoxb3</i>	cgcacctaccagtaccact	gccaccaccacaaccttc
<i>Hoxb4</i>	caaagagcccgtcgtctac	gcgtcaggtagcgattgtagt

- Tableau mix : par puits

Primers	0,2 µl
Eau milliQ	2,8 µl
SybrGreen	6 µl

- Procédure

Par puits, on dépose 3µl d'ADNc issu d'échantillon (1 échantillon correspondant à une des 8 sous-régions du cerveau ou 1 échantillon correspondant à un contrôle) ainsi que 9µl de mix PCR contenant les primers, de l'eau et un mix QIAGEN contenant du Sybrgreen, de la polymérase, et les dNTP (Tableau 1).

La plaque est ensuite insérée dans la machine PCR et l'ADNc subit une dénaturation à 94°C suivie de 40 cycles d'amplification à 60°C (Figure 26). Lorsque les étapes d'amplification sont terminées, le Tm "Melting Temperature" est déterminé. Ce calcul nous permet de déduire les courbes de dissociation et de savoir si les amplicons sont spécifiques ou non (Figure 27).

3. HYBRIDATION IN SITU (HIS)

Le protocole d'hybridation *in situ* utilisé ici est un protocole d'hybridation non radioactive sur cryosections utilisant la phosphatase alcaline. Il a été validé dans le cadre du consortium européen Eumorphia <http://empress.har.mrc.ac.uk/>.

3.1. OBTENTION DES COUPES

Des coupes sériées de 18µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat (Leica CM3050 S). Les cerveaux adultes sont sériés sur 12 alors que les fœtus et embryons sont sériés sur 8 lames.

Les cerveaux, conservés à -80°C, sont sortis au minimum 30 minutes avant la réalisation des premières coupes afin qu'ils s'adaptent à la température de la chambre du cryostat.

Les réglages de température du cryostat peuvent varier en fonction de la qualité des cerveaux et de l'enrobage. Généralement la température de l'objet varie entre -13 et -17 °C et celle de

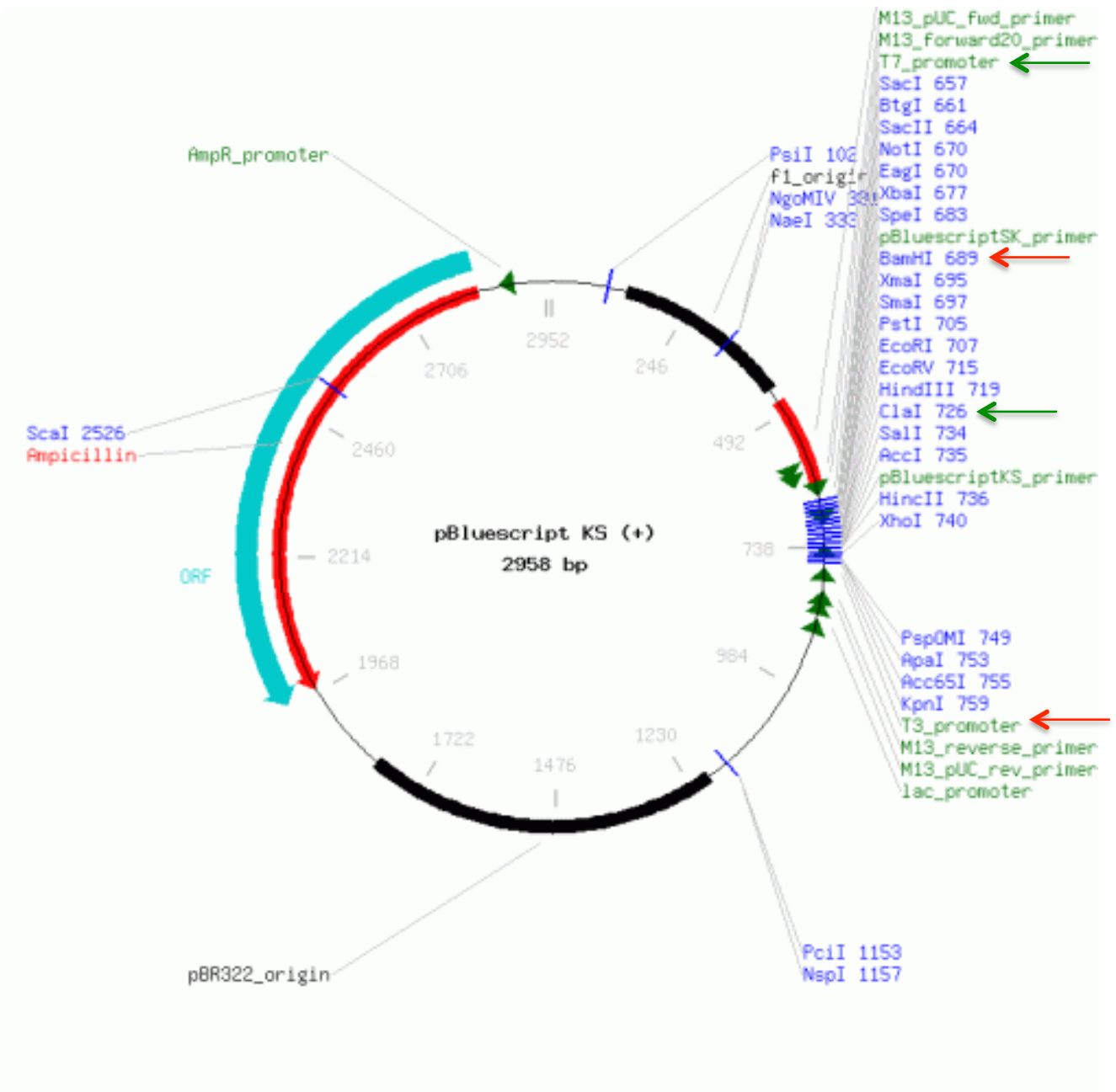


Fig. 28 : Plasmide PBluescript KS. Plasmide utilisé pour la production des sondes. Les flèches vertes correspondent aux enzymes de restriction pour *Hoxb1* ainsi qu'à la polymérase utilisé pour produire la sonde *Hoxb1* anti-sens; les flèches rouges correspondent aux enzyme de restriction et polymérase pour produire la sonde *Hoxb3* anti-sens.

la chambre entre -17 et -25°C. Après réalisation, les coupes sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

3.2. PRODUCTION DES SONDÉS

3.2.1. Plasmides

Grâce à des collaborations nous avons obtenus des plasmides permettant de produire les sondes pour cette étude. Ces plasmides contiennent une cassette de résistance à l'ampicilline, des sites de restriction ainsi que des sites d'initiation pour les polymérase T7, T3 ou encore Sp6 mais surtout une séquence d'ADNc complémentaire de nos gènes *Hox* d'intérêts. En ce qui concerne mes trois gènes d'intérêts les plasmides sont de PBluescript KS (Figure 28) provenant du laboratoire de R. Krumlauf (Stowers Institute of Medical Research, Kansas City, Missouri).

3.2.2. Linéarisation

- Solutions

- Enzyme de restriction BamHI, New England Biolabs, R0136S
- Enzyme de restriction ClaI, New England Biolabs, R0197S
- Enzyme de restriction BglII, New England Biolabs, R0144S
- Tampon de linéarisation n°3, New England Biolabs, B7003S
- Tampon de linéarisation n°4, New England Biolabs, B7004S
- Agarose, Eurogentec, EP 001005
- Bromure d'éthidium 100µl de bromure d'éthidium à 10mg/ml dans 1l de TBE
- TBE 5x

Tris	50 g
Acide borique (Merk, 100156)	27,5 g
EDTA	3,7 g
Eau milliQ	Jusqu'à 1 l

- Procédure

Sur base des informations données par nos collaborateurs, les plasmides sont linéarisés. Nous utilisons les sites de restriction ClaI pour *Hoxb1*, BamHI pour *Hoxb3* et BglII pour *Hoxb4*. Le site de restriction BglII n'est pas présent sur le plasmide mais est présent dans l'insert de 1300pb.

Au départ de 5µg de plasmide circulaire, le mix de linéarisation est préparé selon le tableau 2 puis incubé à 37°C over night (Thermoblock Eppendorf).

Mix de Linéarisation	20 µl	Hoxb1	Hoxb3	Hoxb4
H2O		13,5µl	13,5µl	13,5µl
Linearisation buffer 10x	2 µl	N°4	N°3	N°3
Plasmid DNA (2mg/ml)	(5 µg)	2,5µl	2,5µl	2,5µl
Restriction enzyme	2 µl	ClaI	BamHI	BglII
Plasmid DNA		2µg/µl	2µg/µl	2µg/µl

Tableau 2 : Mix de linéarisation

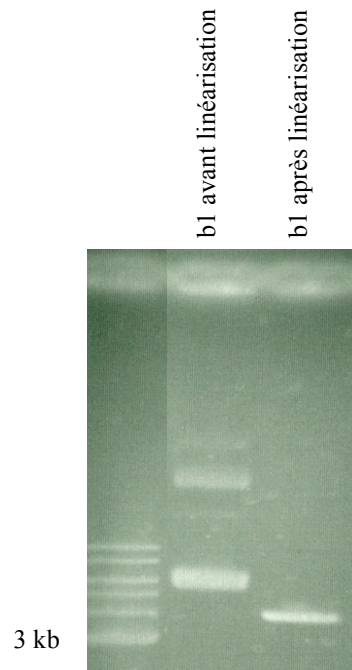


Fig. 29 : Gel d'électrophorèse de vérification de linéarisation pour le plasmide *Hoxb1*. La première piste contient le marqueur de taille, la seconde le plasmide non linéarisé et la troisième le plasmide linéarisé par ClaI.

Transcription Mix	20 µl	Hoxb1	Hoxb3	Hoxb4
H2O		5µl	8µl	8µl
Transcription buffer 5x or 10x	4µl 2 µl	4µl	4µl	4µl
0.1 M DTT	2 µl	2µl	2µl	2µl
DigRNA Labelling Mix	2 µl	2µl	2µl	2µl
RNase Inhibitor	2 µl	2µl	2µl	2µl
Linear DNA 0.25 µg/µl ou 0.125 µg/µl	1 µg	4µl	1µl	1µl
Polymerase (T3, T7, Sp6)	1 µl	1µl T7	1µl T3	1µl T3

Tableau 3 : Mix de transcription.

Le mix contient le plasmide (5 μ g), l'enzyme de restriction approprié et son tampon de linéarisation. La concentration finale du plasmide linéarisé est de 0,25 μ g/ μ l (Tableau 2).

La linéarisation est vérifiée par une électrophorèse sur gel d'agarose 1%, en présence d'un marqueur de taille. Un mélange constitué d'1 μ l d'ADN linéarisé, de 9 μ l d'H₂O et de 2 μ l de tampon de charge (loading dye) est déposé par échantillon. Afin d'avoir un contrôle d'efficacité de linéarisation de l'échantillon nous faisons également un dépôt d'ADN non linéarisé.

Les gels d'électrophorèse sont incubés durant 20 minutes dans du bromure d'éthidium puis visualisés et photographiés sous UV (Figure 29).

3.2.3. Transcription

- Produits

- ARN Polymérase T3, Promega P208C
- ARN Polymérase T7, Promega P208C
- Tampon 5x, Promega, P118B
- Acétate de sodium 3M, Fluka, 71188
- Ethanol absolu (100%), Normapur, VWR, 20821.296
- DTT, Promega, P117B24503408
- RNase inhibitor, Roche, 03335399001

- Procédure

D'après les cartes des plasmides et l'enzyme de restriction, nous utilisons la polymérase T7 pour Hoxb1, et la polymérase T3 pour Hoxb3 et Hoxb4 afin de transcrire nos sondes.

Le mix de transcription contient de l'ADN linéaire (1 μ g), les nucléotides (marqués et non marqué), un inhibiteur de RNase, la polymérase appropriée et le tampon de transcription (Tableau 3).

Au départ d'1 μ g d'ADN linéaire est préparé le mix de transcription selon le tableau 3 puis incubé 2h à 37°C au themoblock Eppendorf. Après transcription 1 μ l est prélevé afin de vérifier l'efficacité de la transcription. Les sondes sont purifiées par deux précipitations successives :

- Eau
- Acétate de sodium
- Ethanol 100%
- Faire précipiter à -80°C, 30 minutes
- Centrifuger à 4°C, 25 minutes
- Eliminer le surnageant
- Faire sécher les culots sous hotte

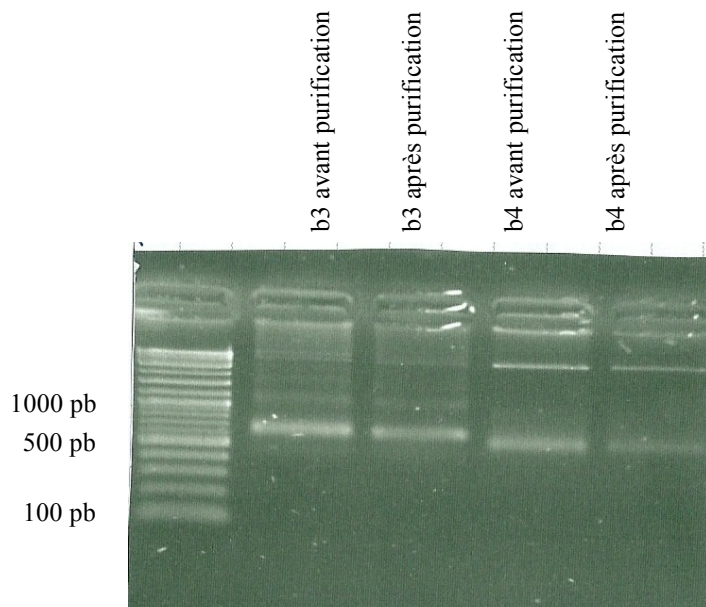


Fig. 30 : Gel d'électrophorèse de vérification des transcriptions. La première piste contient le marqueur de taille. Les deuxième et troisième pistes contiennent des échantillons de sonde *Hoxb3* anti-sens respectivement après transcription et après purification. Les quatrième et cinquième pistes contiennent des échantillons de sonde *Hoxb4* anti-sens respectivement après transcription et purification.

- Resuspendre dans 100µl d'eau
- Répéter les étapes de précipitation et centrifugation comme précédemment
- Reconstituer le culot dans 50µl d'eau
- Laisser sur glace et prélever 2µl pour la vérification de l'absence de dégradation.

L'efficacité de la transcription ainsi que l'absence de dégradation des ARN sont vérifiées par une électrophorèse sur gel d'agarose 2% réalisée en condition RNase free (Figure 30).

Avant purification nous prélevons 1µl d'ARN que nous ajoutons à 9µl d'H₂O et 2µl de loading dye. Après purification nous prélevons 2µl d'ARN que nous ajoutons à 8µl d'H₂O et 2µl de loading dye.

Une mesure de la concentration et de la pureté de l'ARN obtenu est réalisée le lendemain de la transcription (NanoDrop ND-1000). La concentration finale est ajustée à 100ng/µl. Les sondes sont stockées à -20°C dans un mélange contenant de la formamide.

3.3. HYBRIDATION

3.3.1. Procédure HIS sur coupes

- Produits

- Anticorps anti DIG AP, Roche, 11093274910
- Chloroforme, Acros Organics, 232090025
- Ethanol, Normapur, VWR, 20821.296
- Substitut de xylol, Shandon, 9990505
- Milieu de montage Eukitt, Fulka, 03989

- Solutions

- PFA4% PBS : cf. ISH WM
- Anhydride acétique dans tampon TEA

TEA 10M (Merck, 1.08379.0250)	0,1M	20 ml
Anhydride acétique (Sigma-Aldrich, A6404)	0,3%	600 µl
Eau milliQ		180 ml

- SSC 20x pH 5

NaCl	175,3 g
Citrate de sodium (Sigma-Aldrich, c8532)	88,2 g
Eau milliQ	Jusqu'à 1 l

Matériel et Méthodes

- SSC 2x

SSC 20x	2x	20 ml
Eau milliQ		180 ml

- Solution de lavage

Formamide 100% (Acros Organics, 205820025)	50%	100 ml
SSC 20x	1x	10 ml
Tween 20 10% (Sigma-Aldrich, P1379)	0,1%	2 ml
Eau milliQ		288 ml

- Mix hybridation

Formamide BG (Sigma, 47671-1LF)	50%	50 ml
10x Salts (NaCl, Tris HCl, Tris base, NaH ₂ PO ₄ (Sigma, S3264), EDTA (Sigma, E5134))	1x	10 ml
50% Dextran sulfate (MP Biomedicals, 193992)	10%	20 ml
Yeast tRNA 10mg/ml (Roche, 10109509001)	1mg/ml	10 ml
50x Denhardt's (Ficoll (Sigma, F2637), Polyvinylpyrrolidone (Sigma Aldrich, PVP40), BSA (New England Biolabs, B9001S))	1x	2 ml
Eau milliQ		8 ml

- MAB 5x

Acide maléique (Acros Organics, 125230010)	0,5M	116,1 g
NaOH, Pastille (Merk, 1064821000)	Jusqu'à pH 7.5	160 à 200 ml
NaCl	0,75M	87,66 g
Eau milliQ		Jusqu'à 2 l

- MABT

MAB 5x	1x	40 ml
Tween 20 10%	0,1%	2 ml
Eau milli Q		158 ml

- TBST

Tris HCl 1M pH 7,5	0,1M	50 ml
NaCl 5M	0,15M	15 ml
Tween 20 10%	0,1%	5 ml
Eau milliQ		430 ml

- Solution de blocage

MABT	1x	20 ml
Blocking reagent 10% (Roche, 11096176001)	2%	180 ml
Heat inactivated goat serum (Sigma-Aldrich, G-6767)	20%	600 µl

Echantillon	Lames	Sondes	Synthèse	Durée Coloration	Comments	Température Hybridation et Lavage
Cerveau n°...	1.1 à 10.1	Hoxb1-AS	02/03/11		Conc.sonde : 1/400	65°C
Cerveau n°...	1.2 à 10.2	Hoxb3-AS	21/05/10		Conc.sonde : 1/300	65°C
Cerveau n°...	1.3 à 10.3	Hoxb4-AS	16/12/09		Conc.sonde : 1/400	65°C
Cerveau n°...	1.4 à 10.4	Gad67-AS	08/12/10		Conc.sonde : 1/200	65°C
Cerveau n°...	1.5 à 10.5	Hoxb8-S	08/12/10		Conc.sonde : 1/200	65°C

Tableau 4 : Tableau utilisé afin de sélectionner et répertorier les lames utilisées pour chaque hybridation ainsi que les sondes utilisées, leur concentration, la durée de la manipulation et les températures de lavage et d'hybridation

Sonde	Nombre de lames	Dilution sonde	Volume sonde à prélever (vol buffer / dilution sonde)	Volume du buffer (nb lames x 150µl)
Hox b1 AS	10	400 x	3,75µl (1500/400)	1500
Hox b3 AS	10	300 x	5µl	1500
Hox b4 AS	10	400x	3,75µl	1500
Hox b8 S	10	200 x	7,5µl	1500
Gad 67 AS	10	200 x	7,5µl	1500

Tableau 5 : Tableau utilisé afin de préparer le mix de sonde à déposer sur chaque lame. La concentration de chaque sonde ainsi que le nombre de lames et le volume à déposer sur chaque lame sont répertoriés.

- NTMT

Tris HCl 1M pH 9,5	0,1M	10 ml
NaCl 5M	0,1M	2 ml
MgCl ₂ 1M (Merk, 1058330250)	50mM	5 ml
Tween 20 10%	0,1%	1 ml
Eau milliQ		82 ml

- NTMT/PVA

Tris HCl pH 9,5 1M	0,1M	2 ml
NaCl 5M	0,1M	14 ml
Eau milliQ		16,4 ml
PVA (Sigma-Aldrich, P1763)		1g
Chauffer la solution à 90°C au micro onde		
MgCl ₂ 1M	50mM	1 ml
Tween 20 10%	0,1%	200 µl

- Solution de révélation

NTMT/PVA	5,5 ml
NBT (Roche, 11383221001)	19,25 µl
BCIP (Roche, 11383213001)	18,4 µl

- PBT/EDTA = solution d'arrêt

PBS 1x	1x	179,6 ml
Tween 20 10%	0,1%	20 ml
EDTA 0,5M	1mM	0,4 ml

• Procédure

Les séries de coupes sont sélectionnées avant le début de l'hybridation selon le tableau 4. Elles sont sorties du -80°C et dégelées, sous hotte, à l'abri de la poussière. Les coupes sont dans un premier temps fixées 10 minutes dans du PFA 4% dans PBS, rincées 2x 10 minutes dans du PBS, acétylées 10 minutes dans de l'anhydride acétique (dans un tampon de TEA) et enfin lavées 2x 10 minutes dans du SSC 2x. Elles sont ensuite déshydratées par des bains successifs dans des solutions d'éthanol de plus en plus concentrées (60 à 100%) puis dans du chloroforme afin de "délipidiser" et de favoriser l'accès de la sonde. Les coupes sont rincées dans 95% d'éthanol et séchées sous hotte.

Parallèlement, les sondes sont préparées à la concentration appropriée dans le mix d'hybridation, puis dénaturées à 70°C pendant 10 minutes.

Les sondes aux concentrations de 0,25 ng/µl pour *Hoxb1* et *Hoxb4* et 0,33 ng/µl pour *Hoxb3* (Tableau 5) sont déposées sur les coupes. On dépose 110µl de solution sur chaque lame. Ces lames sont recouvertes d'une lamelle couvre-objet et sont incubées over night à 65°C dans un bain marie, dans une atmosphère de formamide.

Le lendemain des lavages successifs sont réalisés afin d'éliminer l'excédent de sonde, ainsi que les sondes qui se seraient fixées de manière aspécifique. Ces lavages (1x 10 minutes et 2x 30 minutes) se font à 65°C, dans une solution contenant 50% de formamide et des sels (SSC). La première solution de lavage est une solution de formamide, SSC et Tween.

Les étapes de détection par l'anticorps et de révélation débutent par 2x 30 minutes de lavage dans du MABT puis un dépôt de la solution de blocage sur les lames dont les bords ont préalablement été entourés à l'aide d'un marqueur hydrophobe. L'incubation se fait 1h à température ambiante.

L'anticorps anti-digoxygénine dilué à 1/1500 dans la solution de blocage est déposé sur les lames pour une incubation 2h sous lamelle couvre objet et à température ambiante. L'anticorps en excès est éliminé par 6 lavages de 20 minutes dans un tampon TBST. L'ajout des substrats de la phosphatase alcaline soit NBT et BCIP dans une solution de NTMT/PVA. Le NTMT est à pH 9,5 et contient du MgCl₂, le magnésium étant nécessaire pour une bonne activité de la phosphatase alcaline. Le PVA a pour rôle de potentialiser la réaction du BCIP/NBT avec la phosphatase alcaline et empêche des réactions intermédiaires, il permet d'augmenter la sensibilité sans augmenter le bruit de fond. L'incubation se fait à température ambiante et à l'obscurité.

L'apparition du signal est évaluée après 20h sur les lames tests et sur le contrôle négatif. Si la révélation doit être poursuivie on reprend à l'étape de lavage dans le NTMT.

Si la révélation est adéquate, la réaction est stoppée avec une solution de PBT/EDTA pendant 2 x 10 minutes, les lames sont déshydratées (éthanol et substitut de xylol) puis montées avec de l'eukitt.

3.3.2. Contre coloration

- Solution

- Safranine O

Safranine O (Fluka, 84120)	1%	2 ml
Acide citrique (Vel, 192,13)	0,1M	1,3 ml
Disodium phosphate (Normapur, 28029292)	0,2M	0,7 ml
Eau milliQ		179 ml

- Procédure

La safranine O a été utilisée pour contre colorer les coupes de cerveaux dans le but d'aider à l'observation et aux annotations de signal.

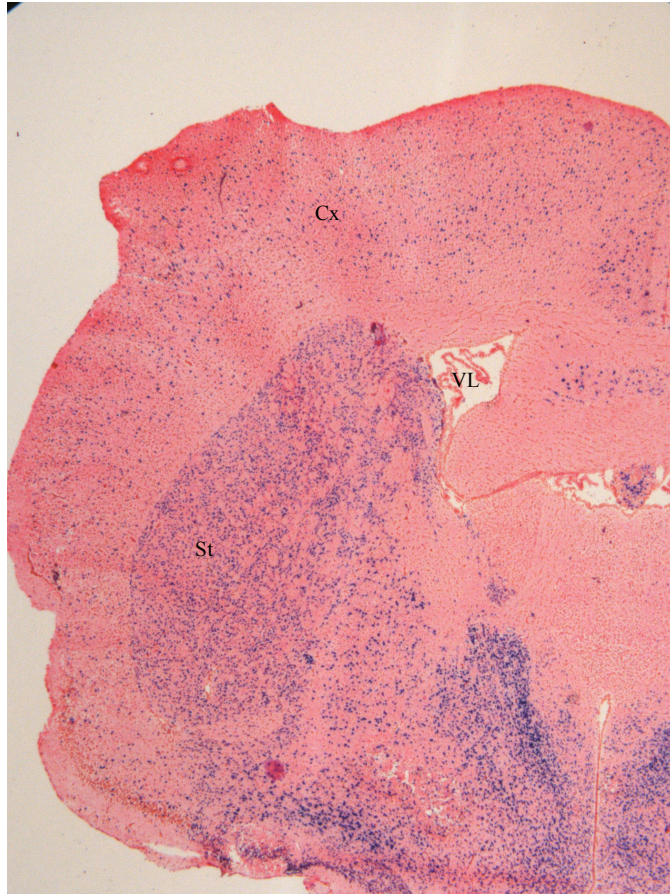


Fig. 31 : Photo d'une hémisection de coupe coronale de cerveau de souris hybridée avec la sonde *Gad67* anti-sens (cellules colorées en bleu) et contre colorée avec une solution de Safranin-O (rose). Repères : VL : ventricules latéraux, Cx : cortex, St : striatum.

C'est un colorant basophile qui colore donc en rouge/rose les constituants cellulaires tels que le noyau, les ribosomes, le REG mais pas les membranes (Figure 31).

Lorsque les lames sont contre colorées, la révélation est stoppée comme dans le cas général avec la solution de PBT/EDTA mais la suite de la manipulation change.

En effet, les lames sont plongées durant 5 secondes dans une solution de safranine-O puis 30 secondes dans de l'eau milliQ. Elles sont ensuite déshydratées dans de l'acétone pendant 1 minute puis dans un mélange acétone/substitut de xylol pendant 1 minute et enfin 2x 1 minute dans du substitut de xylol. Les lames sont montées avec de l'eukitt.

3.3.3. Observations et annotations

Les HIS sont observées grâce à un microscope Leica DM2500. Celui-ci est relié à un ordinateur via une caméra DFC420 C ce qui nous permet de prendre des photos des territoires intéressants.

Les différentes régions du cerveau présentant un marquage sont répertoriées dans le but d'en faire ressortir les territoires et dynamiques d'expression des gènes *Hox* dans le cerveau de souris.

4. DETECTION DES PROTEINES

4.1. TEST DE SPECIFICITE DES ANTICORPS COMMERCIAUX PAR WESTERN-BLOTTING

4.1.1. Dosage BCA

Le dosage BCA est l'étape préalable au western-blotting, il permet de déterminer par colorimétrie la quantité de protéines extraite de nos échantillons. Les protéines réduisent les ions cuivre du milieu alcalin ($\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$) et l'acide bicinchonique forme un complexe très spécifique de couleur violette avec le Cu(I) . Ce complexe a une absorbance maximale à 562nm qui est proportionnelle à la concentration de protéines.

- Produits
 - BCA protein assay reagent kit, Pierce, 23227
 - BSA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	I	I	H	H	G	G	F	F	E	E	D	D
B	C	C	B	B	A	A	1/2 cerv	1/2 cerv	1/2 cerv	1/2 cerv	Bo	Bo
C	Cx	Cx	Hi	Hi	Th+	Th+	Hy	Hy	Cb	Cb	Bs	Bs
D	Sc	Sc										
E												
F												
G												
H												

200µl sol réactive
 étalon (A à I) 25µl/puit faire en duplicat
 échantillon 25µl/puit préparer 60µl --> 3µl échant + 57µl tp lyse

Tableau 6 : Schéma de plaque réalisée pour effectuer un dosage BCA. Les étalons sont annotés de A à I et les échantillons à doser sont des ½ Cerveaux, Bulbes olfactifs, Cortex, Hippocampe, Thalamus, Hypothalamus, Cervelet, Tronc cérébral et Moelle épinière.

On prépare 60µl de solution contenant l'échantillon à doser et du tampon de lyse. On dépose 25µl de cette solution ainsi que 200µl de solution réactive par puits. Enfin on mesure l'absorbance à 562nm avec un spectrophotomètre.

- Plaque 96 puits NUNC
- Solution réactive, contenue dans le kit Pierce : 50:1 = 50 parts de la solution A pour 1 part de la solution B

- Protocole

Des standards (9) sont réalisés via des dilutions successives de BSA avec du tampon de lyse (point 2.1.3).

On dépose 25µl de chaque étalon de concentration connue par puits (en duplicata). Dans les puits suivant, 25µl de chaque échantillon de concentration inconnue (sont déposés en duplicata également). 200µl de solution réactive sont ensuite déposés dans chaque puits. Le tableau 6 est un exemple de plaque.

Après une incubation de 30 minutes à 37°C, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 562nm

4.1.2. Western-Blotting

- Produits

- Caséine : Régilait 0%
- Membranes de nitrocellulose : Hybond, AMERSHAM
- Membranes de révélation : Hyperfilm, AMERSHAM
- Anticorps primaire
 - o Hoxb1 : 1mg/ml, Covance Rabbit polyclonal antibody, PRB-231P
 - o Hoxb3 : 200µg/ml, Santa Cruz Rabbit polyclonal antibody, sc 28606
 - o Hoxb4 : 200µg/ml, Santa Cruz Goat polyclonal antibody, sc 15001
- Anticorps secondaire couplé à HRP
 - o Anti rabbit : 0,25g/l, DakoCytomation P0448
 - o Anti goat : 0,65g/l, DakoCytomation P0160
- Kit de détection HRP Perkin-Elmer, NEL104

- Solutions

- Tampon de charge : Laemmli 5x

Tris 0,5 M pH 6,8 (MP Biomedicals, 819623)	0,225 M	2,25 ml
Glycérol ultrapur (MP Biomedicals, 193996)	50 %	2,5 ml
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate ; MP Biomedicals, 811030)	5 %	250 mg
BPP (Bleu de bromophénol ; Sigma-Aldrich, B5525)	0,125 %	petite spatule
DTT (Fermentas, R0861)	0,25 M	192,8 mg
Eau milliQ		250 µl

- Tampon d'électrode 5x concentré

Tris	15,14 g	250 mM
Glycine (MP Biomedicals, 808822)	28,15 g	750 mM
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate ; MP Biomedicals, 811030)	2,5 g	0,5 %
Eau milliQ		500 ml

- Tampon de transfert 1x concentré

Tris	15 g
Glycine	72 g
SDS 10 %	5 ml
Méthanol technique	1 l
Eau milliQ	4 l

- APS (Ammonium Persulfate, Sigma, A3678-25G) : 10 % (100 mg dans 1 ml d'H₂O milliQ)

- Ethanol (95 % + éther 5 %)

- TBS (Tris Buffer Saline) 10x

Tris	121 g
NaCl	450 g
Eau milliQ	Jusqu'à 5 l
Acide hydrochlorique (Prolabo, 20252290)	Pour ajuster à pH 7,5

- TTBS

TBS 10x	1x	
Tween 20 10%	0,1%	1 ml
Eau milliQ		900 ml

- TTBS 10% caséine (Régilait)

TTBS	1L
Caséine 5%	100 g

- TTBS 5% caséine (Régilait)

TTBS	1L
Caséine 1%	50g

- Gel de séparation 15%

Eau milliQ	4,7 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	5 ml
SDS 10 %	200 µl
Acrylamide 30 % Bio-Rad	10 ml
APS 10 %	100 µl
TEMED (N,N,N', N' tétraléthyléthylènediamine, Acros Organics)	10 µl

Durée de polymérisation : environ 30 minutes

Pour 40 µg de protéines

	Volume lysat (µl)	Laemmli (µl) 1/5 du V _{tot}	Eau mQ (µl)	Total
échant 2	6,62	6	17,4	30
échant 4	16,82	6	7,2	30
Hi	2,45	6	21,5	30
Hy	7,69	6	16,3	30
Cb	2,44	6	21,6	30
Bs	7,01	6	17,0	30

Tableau 7 : Tableau représentant les échantillons à préparer pour les westernblots. Le volume de lysat est obtenu après le dosage BCA.

- Gel de concentration 4,8%

Eau milliQ	5,775 ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
SDS 10 %	100 µl
Acrylamide 30 % Bio-Rad	1,625 ml
APS 10 %	100 µl
TEMED (N,N,N', N' tétraléthyléthylènediamine, Acros Organics)	20 µl

Durée de polymérisation : environ 15 minutes

- Marqueur de poids moléculaire : Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas, SM0671)

- Rouge ponceau

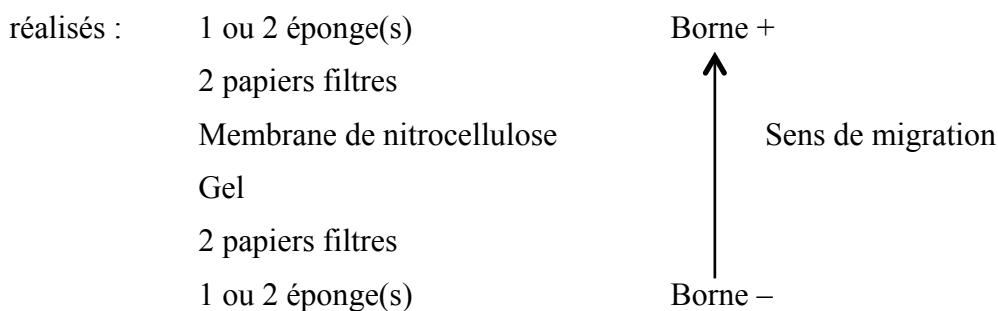
Ponceau S 0,5% (Sigma-Aldrich, P3504)	0,5 g
Acide acétique 1% (Sigma-Aldrich, A6404)	1 ml
Eau milliQ	99 ml

- Protocole

Le westernblot permet de détecter la présence de protéines présentes sur une membrane de nitrocellulose grâce à un anticorps. Les protéines sont tout d'abord séparées grâce à un gel d'électrophorèse puis transférées sur la membrane qui sera analysée.

Dans un premier temps les gels de séparation 15% et de concentration 4,8% sont préparés, en parallèle les échantillons sont préparés. Nous travaillons avec une quantité d'environ 40µg de protéine/puits, nous y ajoutons le tampon de charge (rôle des différents éléments) et l'eau milliQ selon le tableau 7. Les échantillons ainsi préparés sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes puis centrifugés 5 minutes à 13000rpm. Les gels sont ensuite placés dans les cuves d'électrophorèses remplies de tampon 1x et chargés avec les échantillons. Un marqueur de poids moléculaire (le Page Ruler Prestained Protein Ladder) est également déposé. La condensation des protéines dans le gel de concentration puis leur séparation en fonction de leur poids moléculaire dans le gel de séparation se déroule pendant 50 minutes à 200V et 360mA.

Une fois que les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire elles sont transférées depuis le gel vers une membrane de nitrocellulose. Pour cela les montages suivants sont réalisés :



Ces montages sont insérés dans les cuves de transferts en présence d'un bloc refroidisseur et de tampon de transfert. Les cuves sont placées dans des bacs de frigolite contenant de la glace. Le transfert se déroule durant 1h à 200V et 360mA.

Après transfert, les membranes sont rincées afin d'éliminer la solution de transfert contenant du méthanol dans du TTBS. Une étape de blocage est ensuite réalisée dans du TTBS 10% caséine durant 1h à température ambiante et avec agitation. Les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire over night à 4°C dans une chambre d'hybridation. L'anticorps anti Hoxb1 est dilué 1000x dans du TTBS 5% lait, sa concentration est donc de 10µg/ml, les anticorps anti Hoxb3 et Hoxb4 sont dilués 500x dans du TTBS 5% lait, leur concentration est de 4µg/ml. Au matin l'excédent d'anticorps est lavé dans des bains de TTBS 5% lait puis les membranes sont incubées 1h en présence des anticorps secondaires : pour Hoxb1 et Hoxb3 anticorps HRP anti rabbit dilué 2000x dans du TTBS 5% lait ; pour Hoxb4, HRP anti goat dilué 2000x. La concentration des anticorps secondaires est donc de 0,125mg/l pour l'anticorps anti rabbit et de 0,325mg/l pour l'anticorps anti goat.

Avant la révélation les membranes sont lavées dans du TTBS durant 30 minutes.

La révélation a lieu dans une chambre noire avec un kit de détection HRP Perkin-Elmer. Environ 1ml du mélange des produits A et B du kit (mélange 1:1) est déposé sur la membrane. Elle est ensuite recouverte d'une feuille plastique. Le papier photo est placé sur le film plastique, puis plongé dans la solution de révélation. L'apparition des différentes bandes est surveillée. En fin de révélation le film est plongé dans l'eau et enfin dans le fixateur. A la sortie de la chambre noire rincer le film photo à l'eau milliQ et le faire sécher. Les membranes doivent également être rincées dans du TTBS afin d'éliminer la solution de détection. Elles sont ensuite séchées et conservées dans du papier Whatman à 4°C.

Afin de vérifier la quantité de protéine engagée dans chaque puits, l'efficacité du transfert ainsi que la localisation des protéines nous pouvons utiliser une coloration au rouge ponceau qui colore les protéines sur la membrane.

4.2. IMMUNOHISTOCHEMIES SUR COUPES DE CERVEAUX PERFUSES

4.2.1. Procédure

- Produits

- Caséine : Régilait 0%
- Anticorps primaires :
 - Hoxb1 : Covance Rabbit polyclonal antibody, PRB-231P
 - Hoxb3 : Santa Cruz Rabbit polyclonal antibody, #B1506
 - Hoxb4 : Santa Cruz Goat polyclonal antibody, #I2908
- Anticorps secondaires couplés à un fluorochrome
 - Anti Rabbit : Alexa 488 Invitrogen, A11034
 - Anti Goat : Jackson 705-095-147
- Peptide bloquant
 - Pour Hoxb1 : Abgent BP 6759c
 - Pour Hoxb4 : Santa Cruz, sc 15001P
- Vectashield Vector laboratories H1000
- Dapi

- Solutions

- TBS : 1 L, 10x concentré, pH 7,4

Tris base	50 mM	61 g
NaCl	0,9 %	90 g
Eau milliQ	/	1 L

- TBS-T : 1 L

TBS 10x	1x	
Triton X-100	1 %	1 ml
Eau milliQ	/	900 ml

- TBS-T 5% caséine

TBS-T	1x	200 ml
Caséine	5 %	10 g

- TBS-T 1% caséine

TBS-T	1x	1 L
Caséine	1 %	100 mg

- TB : 1 L, pH 7,4

Tris base	0,05 M	6,1 g
Eau milliQ		1 L

- Protocole

La première partie des IHC est la détection des protéines grâce aux anticorps primaires. Pour cela, les coupes subissent des lavages dans du TBS-T. L'étape suivante est un blocage de 1h dans du TBS-T 5% lait. Le dépôt de l'anticorps primaire dilué 50x dans du TBS-T 1% lait que nous laissons incubé over night à 4°C.

Avant l'incubation avec les anticorps secondaires, des lavages dans du TBS-T sont réalisés afin d'éliminer l'excédent d'anticorps primaire. L'incubation avec les anticorps secondaires dilués 500x dans du TBS-T 1% lait dure 1h dans l'obscurité. Les coupes subissent des lavages dans du TBS-T puis dans du TB afin d'éliminer les sels. Dès lors les lames sont montées dans un milieu de montage aqueux, le vectashield, dans lequel nous ajoutons du Dapi à 5µg/ml permettant de marquer les noyaux, leur couleur en fluorescence sera bleue. Le vectashield ne sèche pas et permet d'éviter les pertes de fluorescence lors de la conservation et l'observation des lames.

Les lames sont conservées à l'obscurité à 4°C.

Afin de déterminer la spécificité des anticorps reçus nous avons réalisé des pré-adsorptions à l'aide de peptides synthétiques ou peptides bloquants. Les anticorps sont incubés 2h à 37°C avec agitation en présence du peptide synthétique dont la concentration est 10 fois supérieure à la leur. Une étape de centrifugation de 20 minutes entre 16000 et 100000 g est ensuite réalisée avant de pouvoir utiliser la solution obtenue pour les IHC.

4.2.2. Observation

Les immunohistochimies sont observées grâce à un microscope ZEISS Axioskop 2 mot plus. Celui-ci est relié à un ordinateur via une caméra AxioCam MRc5 ZEISS ce qui nous permet de prendre des photos.

Nous utilisons les filtres FITC et DAPI pour nos observations. Un filtre rhodamine est également disponible (utile pour les colocalisations).

Les différentes régions du cerveau présentant un marquage sont répertoriées afin de faire ressortir les territoires où les protéines Hox sont présentes dans le cerveau de souris.

IV. Résultats

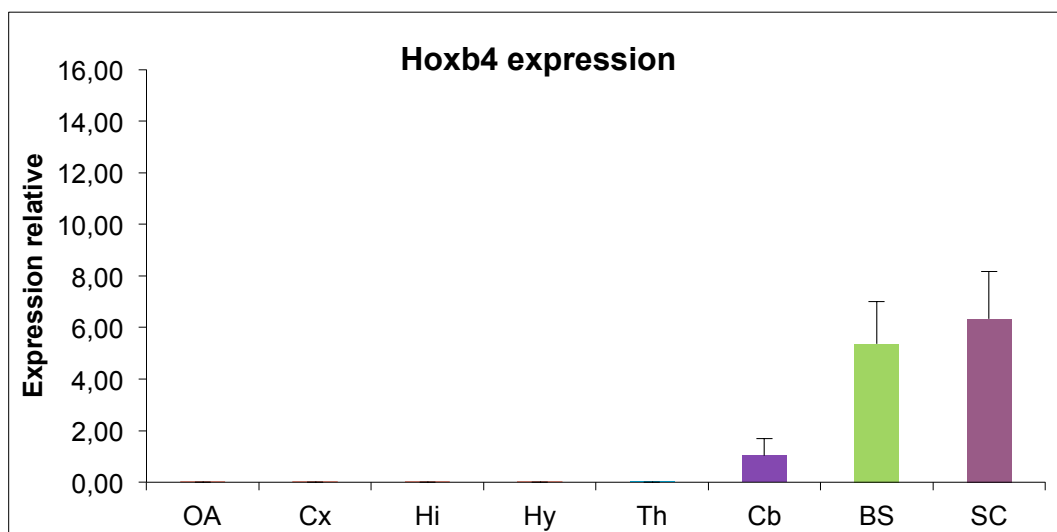
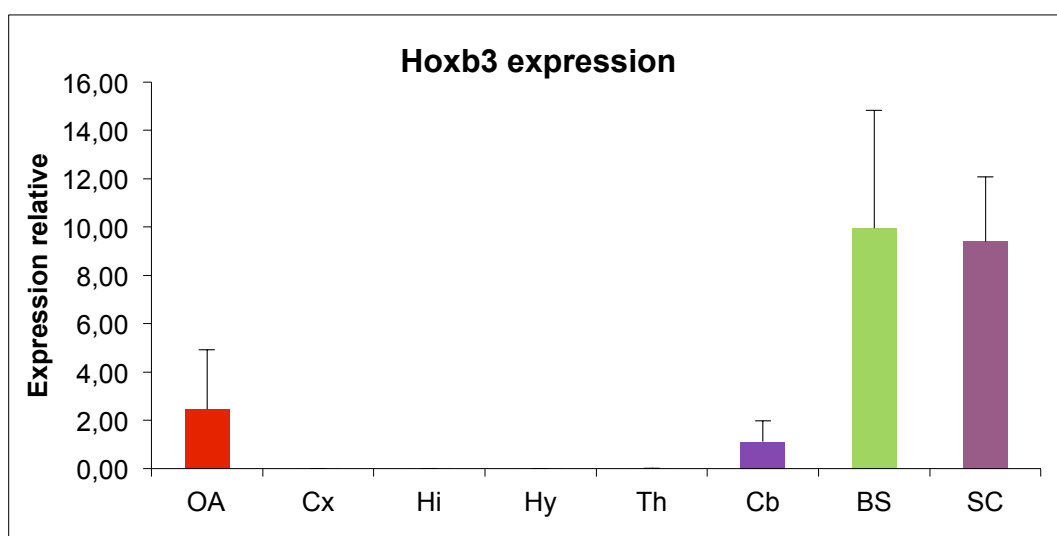
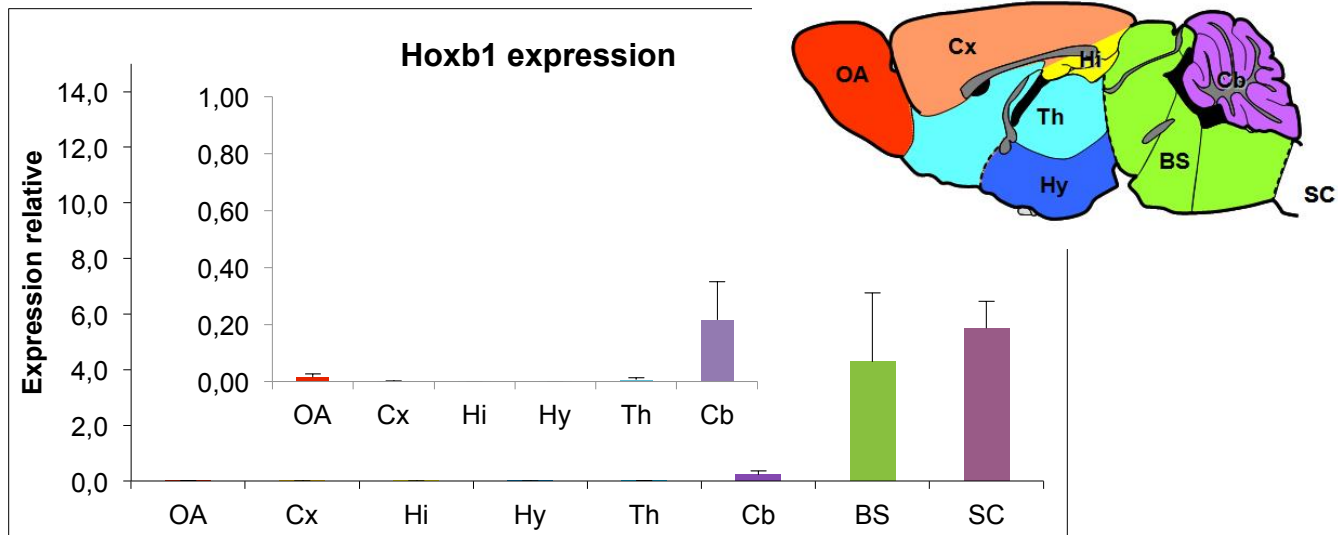


Fig. 32 : Expression relative de *Hoxb1*, *Hoxb3* et *Hoxb4* dans 8 sous régions du cerveau adulte

Les couleurs des histogrammes permettent de localiser les régions disséquées dans le cerveau adulte sur le schéma présenté en haut à droite. Les résultats sont présentés comme moyenne géométrique ($\bar{X} \pm SD$) des mesures réalisées sur 5 cerveaux. OA : bulbes olfactifs, Cx : cortex, Hi : hippocampe, Hy : hypothalamus, Th : thalamus, Cb : cervelet, BS : tronc cérébral, SC : moelle épinière.

INTRODUCTION

Afin d'étudier l'expression des gènes *Hoxb1*, *b3* et *b4* nous avons sélectionné la RT-qPCR comme méthode quantitative, en utilisant des primers designés avant mon arrivée au laboratoire. Pour la localisation neuro-anatomique des transcrits nous avons réalisé des hybridations *in situ*, grâce à des sondes sens et anti-sens transcrites à partir de plasmides linéarisés. Enfin des anticorps commerciaux ont été testés par westernblot et un protocole d'immunohistochimie a été mis au point pour la localisation des protéines Hox.

1. RT-qPCR

Pour quantifier les résultats des RT-qPCR nous avons utilisé la méthode du $\Delta\Delta Cq$, le Cq "quantitative cycle" étant le cycle à partir duquel l'amplification devient exponentielle et donc significative. Le Cq est normalisé avec la moyenne géométrique des 3 gènes de références, on obtient le ΔCq , puis calibré par le pool d'embryon ce qui nous permet d'obtenir le $\Delta\Delta Cq$, valeur relative de l'expression de nos gènes en regard de l'expression embryonnaire de chaque gène.

Une valeur arbitraire de 1 a été attribuée au pool d'embryon. Lorsqu'une valeur supérieure à 1 est obtenue pour nos gènes d'intérêt cela signifie qu'ils sont plus fortement exprimés que dans l'embryon et inversement si la valeur est inférieure à 1. Les données représentées sur la figure 32 sont les moyennes géométriques ($\bar{X} \pm SD$) des valeurs mesurées dans 5 cerveaux.

Pour *Hoxb1*, *b3* et *b4* l'expression est très forte c'est à dire 6 à 8 fois supérieure au niveau d'expression embryonnaire dans les parties les plus postérieures du cerveau, c'est à dire dans la moelle épinière et le tronc cérébral : pont, mésencéphale et moelle allongée. Pour les 3 gènes nous détectons également une expression significative mais plus faible cette fois-ci, dans le cervelet. Le niveau d'expression est similaire à celui du pool d'embryon pour *Hoxb3* et *b4* mais beaucoup plus faible pour *Hoxb1* : 5 fois plus faible que dans le pool d'embryon.

Concernant les régions dérivées du cerveau antérieur, pour *Hoxb1* et *Hoxb3*, une expression est détectée dans les bulbes olfactifs. Le niveau d'expression est semblable à celui des embryons pour *Hoxb3* et très faible mais significatif pour *Hoxb1* : près de 30 fois plus faible que dans le pool d'embryon. Enfin, une expression extrêmement faible mais significative est également détectée dans le thalamus pour *Hoxb1* (100 fois plus faible que dans l'embryon).

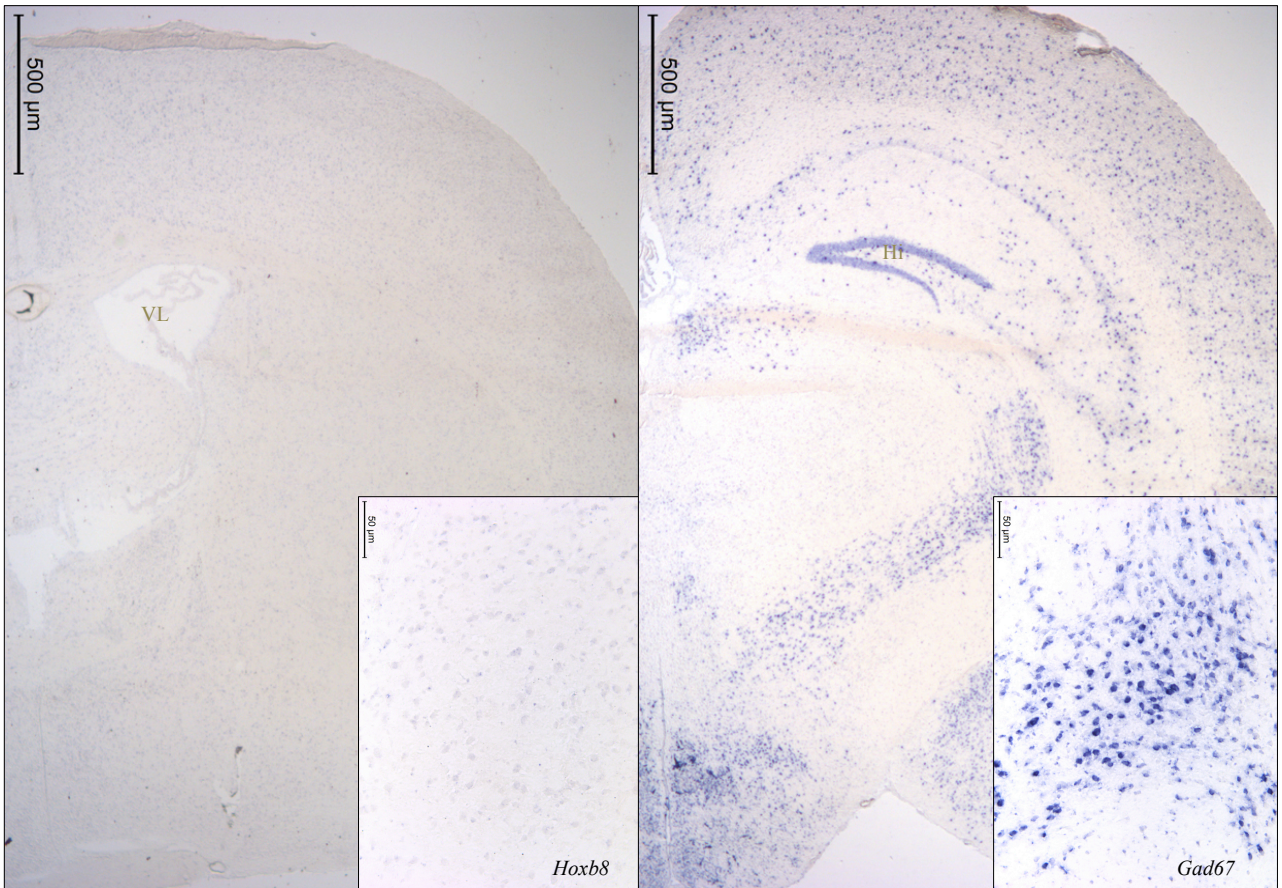


Fig. 33 : Hybridation *in situ* avec la sonde *Gad67* anti-sens contrôle positif (droite) et la sonde *Hoxb8* sens contrôle négatif (gauche). Repères : VL : ventricules latéraux, Hi : hippocampe

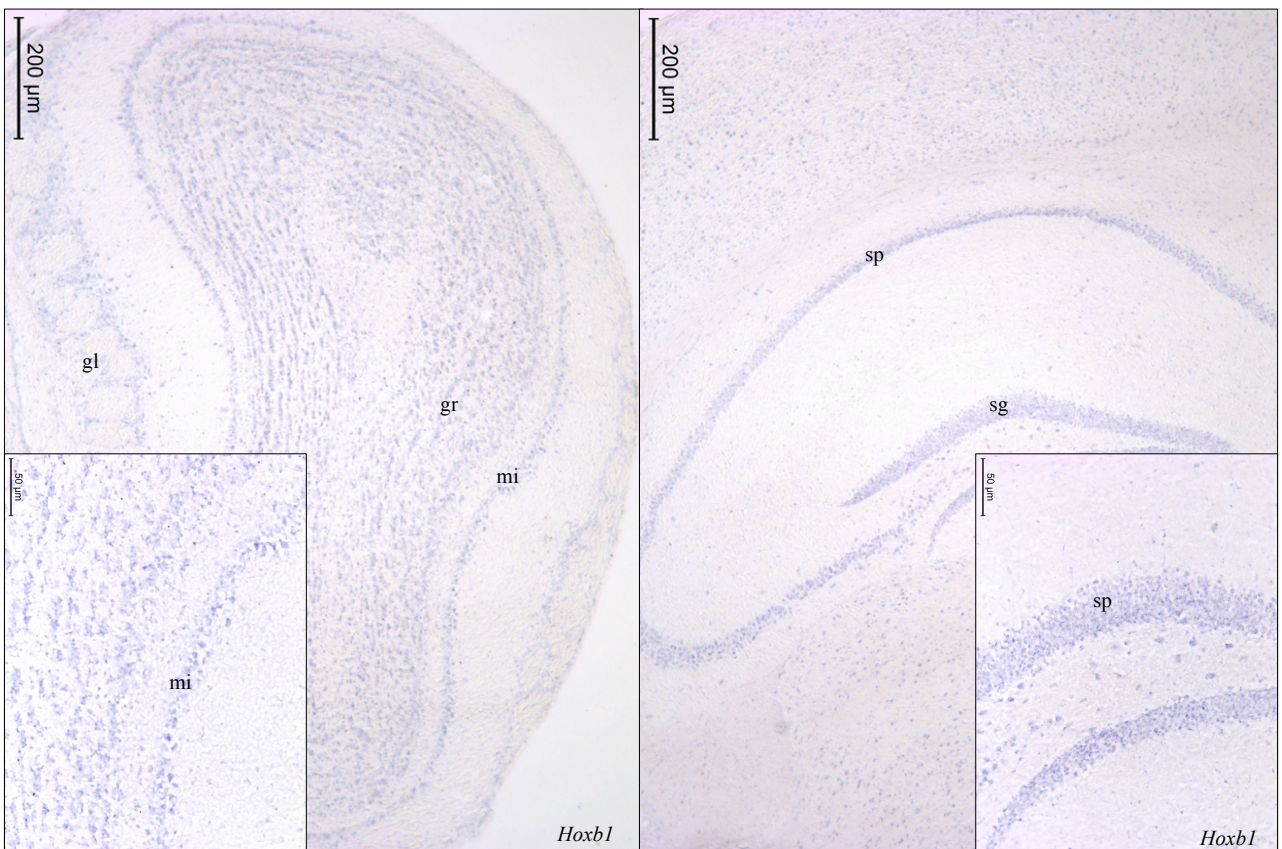


Fig. 34 : HIS avec la sonde *Hoxb1* AS dans la région des bulbes olfactifs (gauche) et de l'hippocampe (droite) illustrant les zones de bruit de fond artificiel. Bulbes olfactifs : gl : couche glomérulaire, gr : couche granulaire, mi : couche mitrale. Hippocampe : sg : couche granulaire du gyrus denté, sp : stratum pyramidal de la corne d'Ammon.

Pour l'analyse des RT-qPCR nous avons considéré comme significatif un résultat reproductible pour au moins 2 cerveaux.

2. HYBRIDATION IN SITU

2.1. LES CONTROLES

Le choix des contrôles est tout aussi important que le protocole ou la qualité des sondes. Nous utilisons pour les HIS une sonde *Hoxb8* sens en tant que contrôle négatif et une sonde *Gad67* anti-sens comme contrôle positif. La sonde *Hoxb8* sens est un ARN sens qui ne doit donc s'hybrider avec aucun ARNm du tissu ; *Gad67* anti-sens est quant à elle une sonde s'hybridant avec les transcrits de *Gad67* qui codent pour un enzyme de synthèse du GABA, la glutamate décarboxylase, dans les neurones GABAergiques présents dans un grand nombre de régions du cerveau (Figure 33).

2.2. BRUIT DE FOND

Du bruit de fond ou signal aspécifique peut apparaître lors de chaque expérience ; plus particulièrement parce que nous détectons des gènes dont le niveau d'expression est faible (cf. partie RT-qPCR). C'est notamment en fonction de son niveau d'intensité que nous décidons si cette expérience peut être prolongée 24h supplémentaires ou pas. De plus, nous essayons de tenir compte du niveau de bruit de fond généré par chaque expérience dans l'interprétation et l'analyse du signal. Un retranchement du niveau de bruit de fond général pour le signal observé est réalisé. Par ailleurs, chaque tissu ou organe peut présenter des "artéfacts" ou zones plus sujettes à l'apparition du bruit de fond.

Ainsi dans le cerveau adulte, des zones caractéristiques de présence de bruit de fond ont été observées. Il s'agit des bulbes olfactifs, plus particulièrement des cellules mitrales (mi), granulaires (gr) et glomérulaires (gl). Mais également de l'hippocampe au niveau des couches granulaires du gyrus denté (sg) et du stratum pyramidale (sp) de la corne d'Ammon et enfin de la couche granulaire du cortex cérébelleux (Figure 34). L'hippocampe est un bon exemple de ce bruit de fond. En effet, un signal bleu est visible à faible grossissement mais dès lors que l'on augmente le grossissement on s'aperçoit que ce n'est pas du marquage spécifique. Le "marquage" apparaît comme diffus et non comme précipité au sein des cellules.

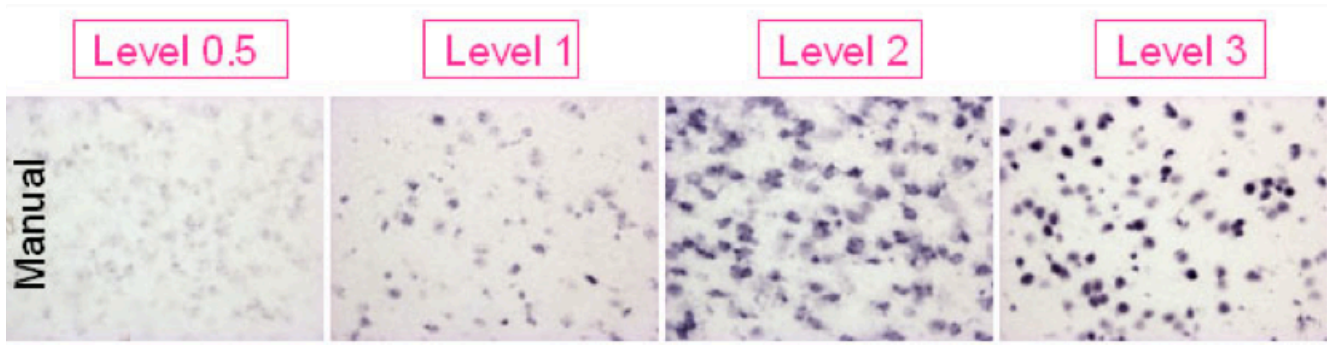


Fig. 35 : Annotation du niveau d'intensité du signal observé en HIS

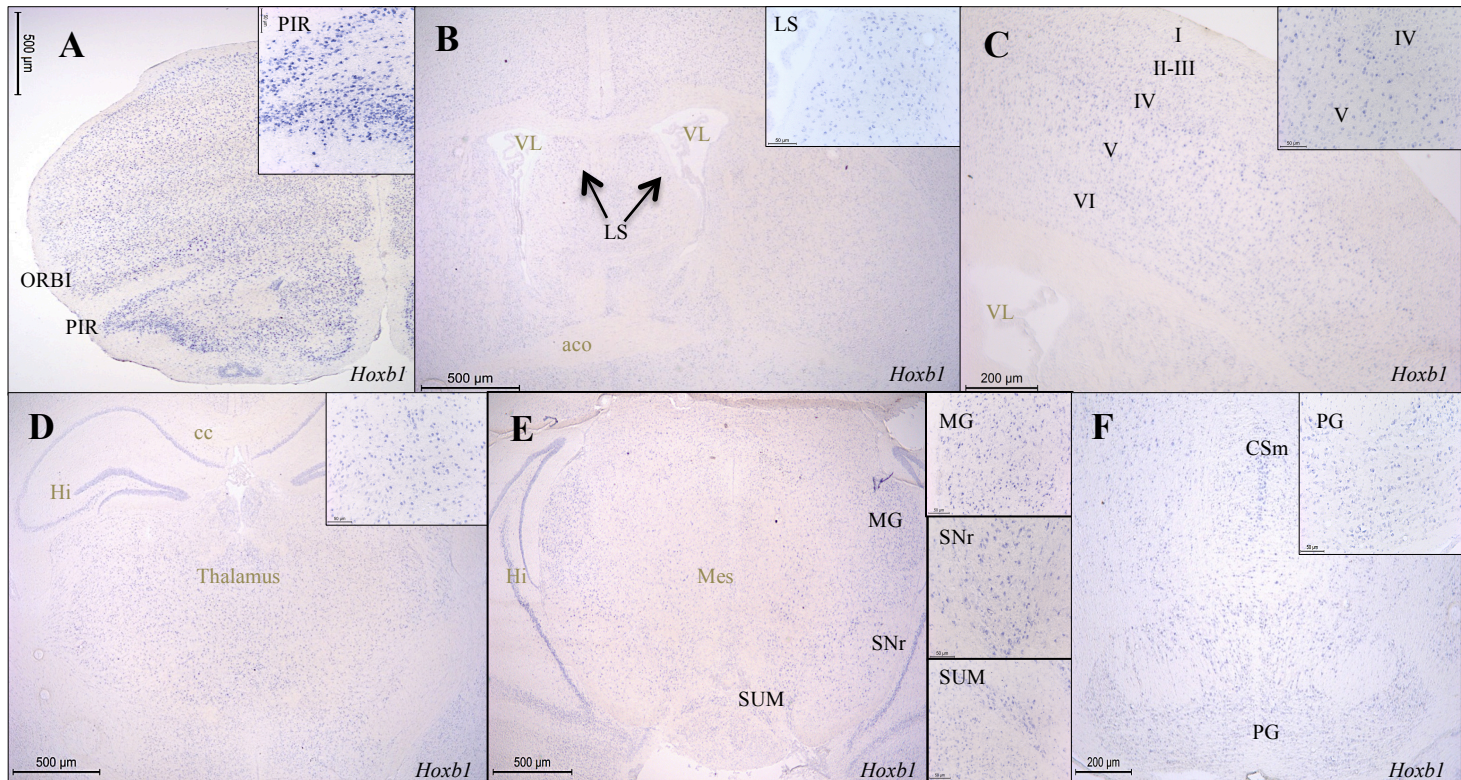


Fig. 36 : Hybridation *in situ* avec la sonde *Hoxb1* anti-sens sur coupes coronales de cerveau de souris adultes. (A) Hémisséction du cortex antérieur. ORBI : cortex orbital, PIR : cortex piriforme, (B) Vue centrale du télencéphale. LS : septum latéral (C) Hémisséction du cortex somatosensoriel, couches I à VI. La couche marquée est la IV ou la Va. (D) Vue centrale du thalamus : tous les noyaux à l'exception des noyaux réticulés (RT) sont marqués (E) Région du mésencéphale (Mes), SUM : noyaux supramammillaires, SNr : partie réticulée de la substance noire, MG : noyaux genouillés médians (F) Zones centrales et inférieures des dérivés du métencéphale. CSm : noyaux centraux supérieurs du raphé et noyaux pré-cérébelleux : PG : matière grise du pont. **Repères** : VL : ventricules latéraux, aco : commissure antérieure, cc : cortex, Hi : hippocampe, Mes : mésencéphale

2.3. ANNOTATION DU SIGNAL

Le signal observé est analysé et son intensité évaluée selon une échelle semi quantitative allant de 0 à 3 (Figure 35).

2.4. PATRON D'EXPRESSION CHEZ L'ADULTE

Des HIS ont été réalisées sur des cerveaux de souris C57BL6/J adultes pour les gènes *Hoxb1* (n=6), *b3* (n=3) et *b4* (n = 2). Un patron d'expression commun à ces trois gènes se dégage. Ces gènes sont principalement exprimés dans les noyaux pontins, le cervelet et la moelle allongée mais un signal est également observé dans le cortex cérébral et dans le thalamus.

Etant donné la similarité des patrons d'expression, nous allons détailler et illustrer celui d'*Hoxb1*. Les résultats obtenus pour *Hoxb3* et *Hoxb4* seront ensuite comparés à ce patron.

2.4.1. Hoxb1

Nous allons donc décrire les domaines d'expression d'*Hoxb1*, de la région la plus antérieure vers la région la plus postérieure (Figures 36 et 37).

Dans le cerveau antérieur, nous observons la présence des transcrits d'*Hoxb1* dans plusieurs aires corticales telles que le cortex somatosensoriel, olfactif (piriforme (pir)), orbital, auditif, visuel et entorhinal. Cependant nous n'observons pas de transcrits dans le cortex moteur. Dans toutes les aires, le signal n'est pas ubiquitaire au niveau des différentes couches. Plus précisément c'est la couche IV ou Va des cortex somatosensoriel (Figure 36. C) et auditif qui est marquée, la couche 2 des cortex piriforme, orbital (Figure 36. A) et entorhinal. L'expression au niveau du cortex peut être qualifié d'intensité 1. Toujours dans le télencéphale, l'expression est observée au niveau des subiculum (SUB), faisant partie avec le cortex entorhinal des structures d'entrée de la formation hippocampique. Du signal est détecté dans les noyaux basolatéraux amygdaliens (BLA) au niveau du lobe temporal et intervenant dans les réponses émotionnelles, et enfin dans la partie ventrale du télencéphale nous détectons de l'expression dans le septum latéral (LSd/v) (Figure 36. B).

Plus caudalement, au niveau du diencephale, une expression d'intensité 1 est observée dans le thalamus (Figure 36.D). Comme mentionné précédemment, le thalamus est une zone importante de relais des afférences sensorielles vers le cortex, et contient de nombreux noyaux dont l'identification précise est peu aisée. Dans cette structure tous les noyaux à l'exception des noyaux réticulaires semblent marqués. Les noyaux réticulaires thalamiques sont les seuls à ne pas projeter sur le cortex. Ils coordonnent les activités des autres noyaux et

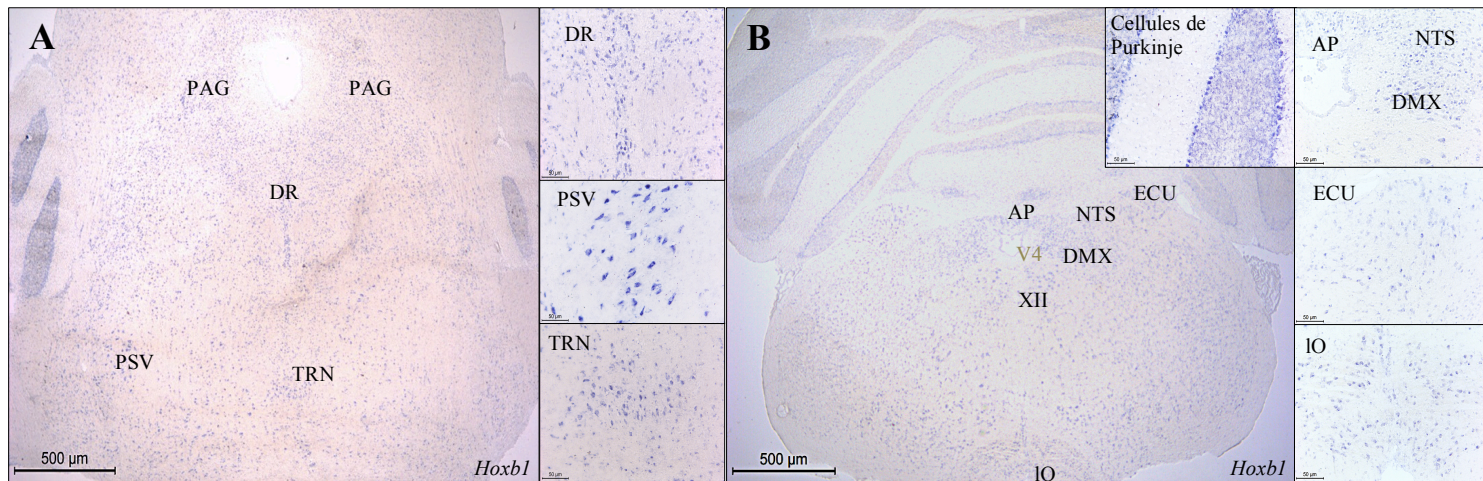


Fig. 37 : Hybridation *in situ* avec la sonde *Hoxb1* anti-sens sur coupes coronales de cerveau de souris adultes (A) Mésencéphale, PAG : matière grise périaqueducatale, DR : noyaux dorsaux du raphé. Noyaux pré-cérébelleux : TRN : noyaux tegmentaires réticulés. Noyaux des nerfs crâniens : PSV : noyau sensoriel principal du trijumeau. (B) AP : aréa postréma, NTS : noyaux du tractus solitaire. Cervelet : Certaines cellules du Purkinje sont marquées. Noyaux pré-cérébelleux : ECU : noyaux cunéiformes externes, IO : complexe olivaire. Noyaux des nerfs crâniens : DMX : noyaux dorsaux moteurs du nerf vague, XII : noyaux de l'hypoglosse. **Repère : V4 : 4^{ème} ventricule.**

interviennent dans les mécanismes du sommeil et de la veille. Une précision est toutefois importante ici ; tous les noyaux du thalamus sont marqués mais dans ces noyaux toutes les cellules ne le sont pas. Il y a en effet entre 30 et 50% des cellules qui sont marquées. De manière plus précise, une expression de *Hoxb1* est notamment observée dans les noyaux antéroventraux et médiaux (AV et AM), les noyaux paraventriculaires (PVT) mais également dans les noyaux genouillés (LG/MG) traitant respectivement l'information visuelle et auditive. Ils sont reliés au cortex. Dans le diencephale les seuls territoires marqués correspondent au thalamus. Une exception est à noter, elle correspond à la partie la plus caudale de l'hypothalamus les noyaux supra mammillaires (SUM, MM, MMme).

Postérieurement au diencephale nous observons du marquage dans les territoires du mésencéphale tels que la matière grise périaqueducatale (PAG), les noyaux interpédunculaires (IPN), mais également au niveau du raphé, plus précisément de la ligne rostrale (RL) donnant plus postérieurement les noyaux centraux supérieurs et noyaux dorsaux (DR) et enfin la substance noire (SNr) impliquée dans le contrôle moteur et projetant sur les noyaux profonds du cervelet (Figure 36. E ; Figure 37. A).

Enfin, dans le cerveau postérieur et plus précisément dans le métencéphale. Le lemnie latéral (ILL/VLL) recevant les informations relatives au touché depuis le corps et le visage et relayant l'information au thalamus est marqué. Les noyaux pré-cérébelleux (ceux appartenant au métencéphale) tels que les noyaux de la matière grise du pont (PG), les noyaux tegmentaires réticulés (TRN) sont marqués et le signal est d'intensité 2 (Figure 36. F). Ces noyaux sont connectés fonctionnellement au cervelet ; ils sont en effet impliqués dans les circuits afférents avec le cervelet. Dans les territoires dérivants du métencéphale nous retrouvons également le locus cœruleus (LC). Au niveau du cervelet nous observons que la couche des cellules de Purkinje est également marquée (Figure 37. B). Ces cellules de Purkinje vont elles même projeter sur les noyaux profonds du cervelet dans lesquels nous détectons également du signal : IP : noyaux interpositus, DN : dentate nucleus.

Finalement parmi les noyaux de la moelle allongée dérivant du myélocéphale on retrouve également les noyaux projetant ou en relation avec le cervelet : les noyaux vestibulaires (MVN), les noyaux cunéiformes externes (ECU) et les noyaux du complexe olivaire inférieur (IO) impliqué dans le transfert au cervelet des informations relative à la proprioception (Figure 37. B). De plus, du signal net, de niveau 2, est présent dans les noyaux des nerfs crâniens, notamment le complexe trigéminal (V), les noyaux de l'hypoglosse (XII) et les noyaux dorsaux moteurs du nerf vague (DMX). Les noyaux cochléaires (VCOa) impliqués dans les processus auditifs, les noyaux du tractus solitaire (NTS) impliqués dans le relais de

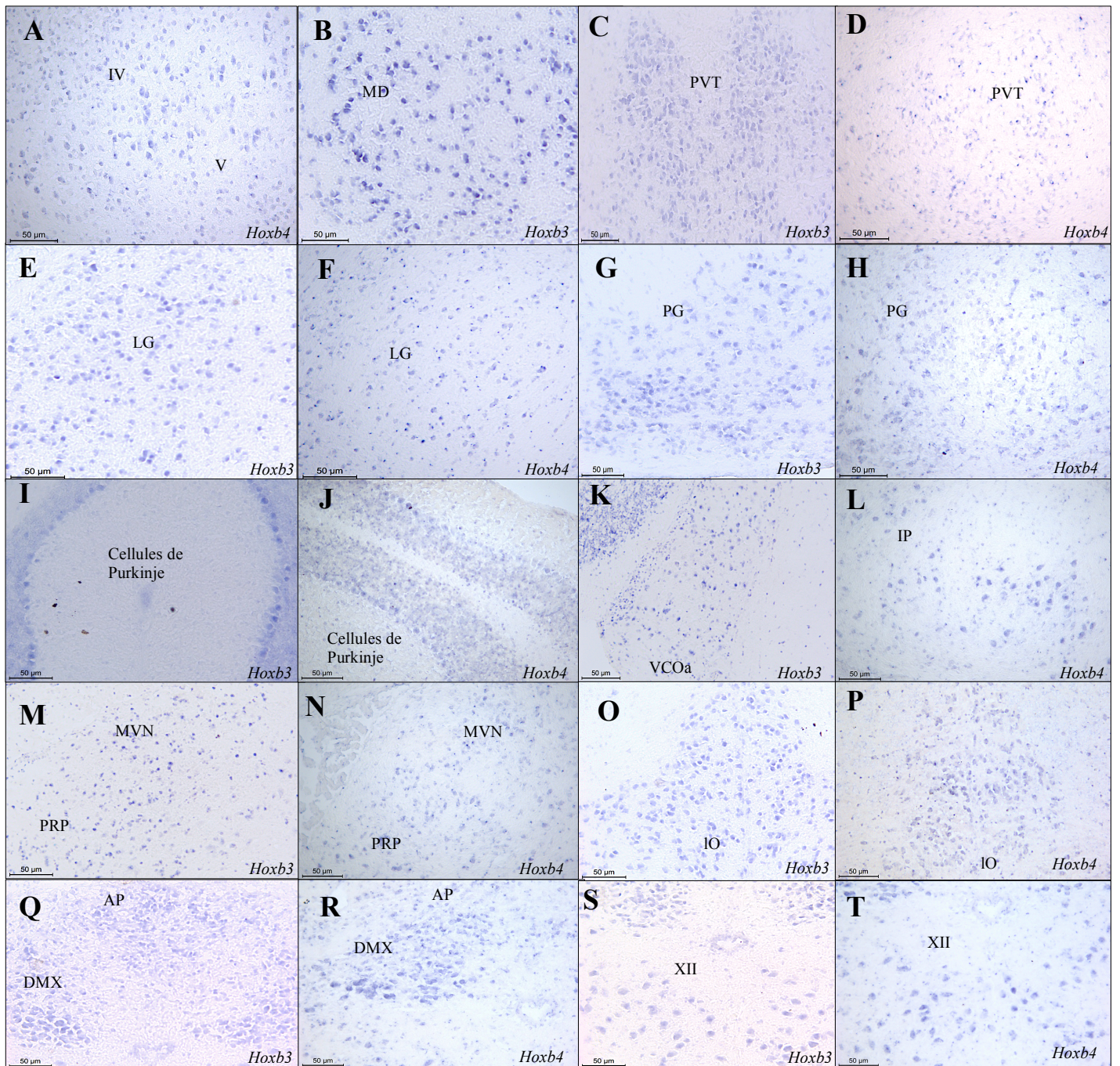


Fig. 38 : Hybridation *in situ* avec les sondes *Hoxb3* et *Hoxb4* anti-sens sur coupes coronales de cerveau de souris adultes (A) Cortex somatosensoriel couche centrale IV ou Va. (B-F) Noyaux du thalamus, respectivement : MD : noyaux médio-dorsaux, PVT : paraventriculaire et LG : latéral genouillé. (G-H) Noyaux pré-cérébelleux : PG : matière grise du pont. (I-J) Cervelet : Cellules de Purkinje, on peut remarquer que toutes les cellules ne sont pas marquées. (K) VCOa : noyaux cochléaires ventraux. (L) Noyaux profonds du cervelet IP : noyaux interpositus. (M-P) PRP : noyaux prépositus, noyaux pré-cérébelleux : MVN : noyaux vestibulaires médians, IO : complexe olivaire. (Q-T) AP : aréa portréma et noyaux des nerfs rachidiens : DMX : noyaux moteur dorsal du nerf vague et XII : noyaux de l'hypoglosse.

l'information sensorielle venant des organes internes, l'arée postrema (AP) ayant un rôle dans les vomissements et enfin, les noyaux des noyaux prépositus (PRP) impliqués dans le contrôle moteur sont d'autres structures dans lesquelles *Hoxb1* est également exprimé (Figure 37. B).

2.4.2. *Hoxb3* et *Hoxb4*

Deux HIS ont été réalisées pour *Hoxb4*, cependant les résultats obtenus ne sont pas totalement convaincants. En effet, le signal obtenu est très faible, surtout dans les parties antérieures du cerveau. Les résultats présentés pour ce gène correspondent donc à l'analyse de mes 2 HIS mais également à l'interprétation des HIS réalisées avant mon arrivée au laboratoire. Les photos présentées sont cependant issues de mes expériences (Figure 38).

Territoire	<i>Hoxb1</i>	<i>Hoxb3</i>	<i>Hoxb4</i>
Cortex orbital (ORBI): couche 2	✓	✓	
Cortex somatosensoriel couche centrale (IV ou Va)	✓	✓	✓
Cortex auditif couche centrale (IV ou V)	✓	✓	✓
Cortex visuel couche centrale (IV ou V)	✓	✓	✓
Cortex piriforme (PIR) : couche 2	✓	✓	✓
Tenia tecta partie dorsale (TTd) : couche 2	✓	✓	✓
Cortex entorhinal (ENTI) : couche 2		✓	
Insidium griseum (IG)		✓	
Olfactory tubercule (OT) : couche 2		✓	
Subiculum (SUB)	✓	✓	✓
Noyaux basolatéraux amygdaliens (BLA)	✓	✓	
Septum latéral (LSd/v)	✓	✓	✓
Septum médial (MS)	✓	✓	
Thalamus (tous sauf noyaux réticulaires)	✓	✓	✓
Noyaux anteroventraux du thalamus (AV)	✓	✓	✓
Noyaux anteromédians du thalamus (AM)	✓	✓	✓
Noyaux paraventriculaires du thalamus (PVT)	✓	✓	✓
Noyaux genouillés latéraux (LG)	✓	✓	✓
Noyaux genouillés médians (MG)	✓	✓	
Noyaux supra mammillaire (SUM, MM, MMme)	✓		✓
Matière grise périaqueducatale (PAG)	✓	✓	✓

Résultats

Noyaux interpédunculaires (IPN)	✓	✓	
Ligne rostrale du raphé (RL)		✓	
Noyaux dorsaux du raphé (DR)	✓	✓	✓
Noyaux rouges (RN)	✓	✓	
Noyau central supérieur du raphé (CSm)	✓	✓	
Substantia nigra partie compacte/réticulée (SNc/r)	✓	✓	✓
Noyaux interpédunculaires (IPN)	✓	✓	
Noyaux du lemnisque latéral (ILL/VLL)	✓	✓	✓
Matière grise du pont (PG)	✓	✓	✓
Noyaux tegmentaires réticulés (TRN)	✓	✓	✓
Noyaux vestibulaires (médiants) (MVN)	✓	✓	✓
Noyaux cunéiformes externes (ECU)	✓	✓	✓
Complexe olivaire inférieur (IO)	✓	✓	✓
Locus ceruleus (LC)	✓	✓	✓
Cellules de Purkinje	✓	✓	✓
Noyaux profonds du cervelet (DN, IP)	✓	✓	✓
Complexe trigéminal (PSV)	✓	✓	✓
Noyaux de l'hypoglosse (XII)	✓	✓	✓
Noyau dorsal moteur du nerf vague (DMX)	✓	✓	✓
Noyaux cochléaires (VCOa)	✓	✓	
Noyaux du tractus solitaire (NTS)	✓	✓	
Area postrema (AP)	✓	✓	✓
Noyaux prépositus (PRP)	✓	✓	✓
Noyaux réticulés magnocellulaires (MARN)		✓	✓
Moelle épinière	✓	✓	✓

Le patron décrit ci-dessus pour *Hoxb1*, *b3* et *b4* est intéressant dans le sens qu'il est original. En effet, comme décrit dans l'introduction, chez l'embryon la limite antérieure d'expression de ces trois gènes se situe au niveau du rhombencéphale. Ces gènes sont donc exprimés dans des territoires plus antérieurs chez l'adulte que chez l'embryon.

Afin de déterminer précisément le moment à partir duquel les gènes sont exprimés dans des territoires plus antérieurs nous avons réalisé des HIS à différents stades postnataux.

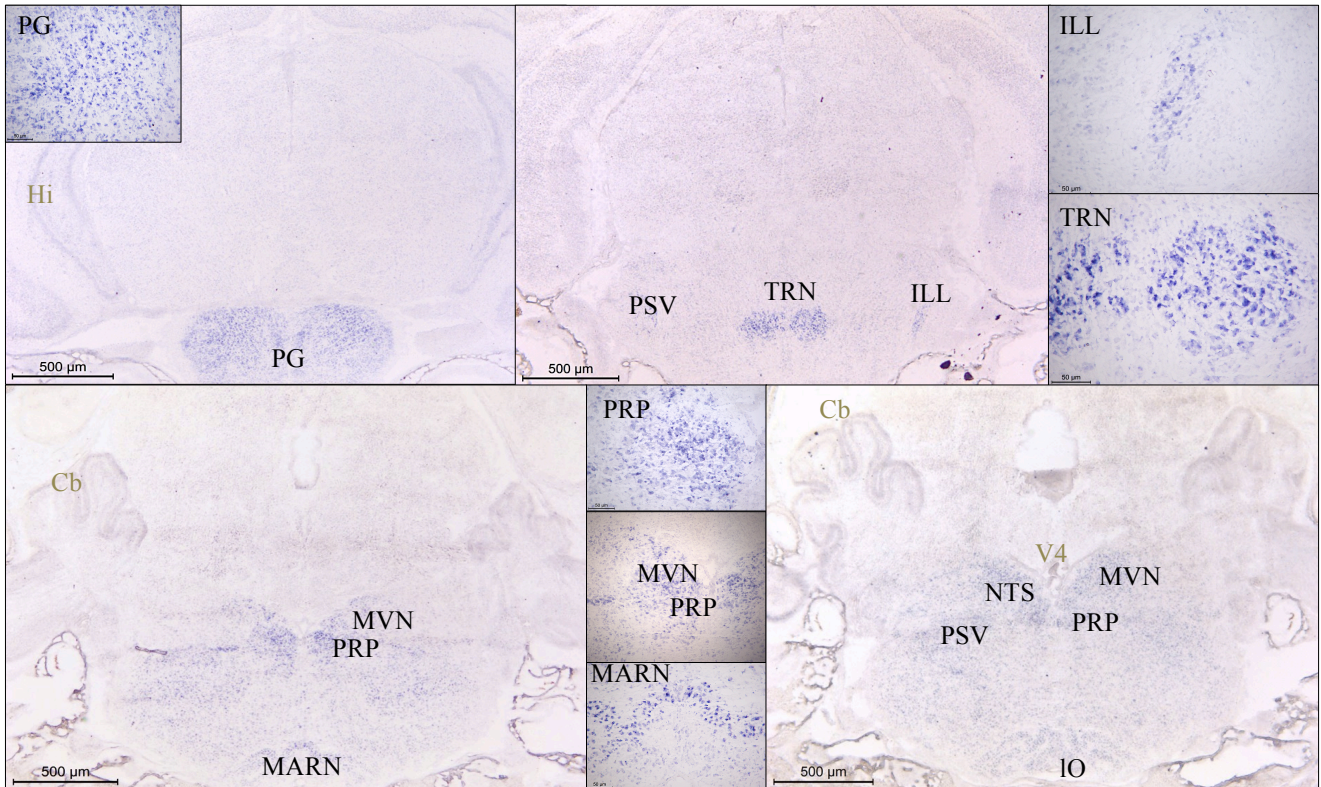


Fig. 39 : Hybridation *in situ* avec la sonde *Hoxb3* anti-sens sur coupes coronales de cerveau de souris de 7 jours (P7) (A) Noyaux pré-cérébelleux : PG : matière grise du pont (B) Coupe oblique (partie droite plus postérieure que la gauche) Mésencéphale : ILL : lemnisques latéraux. Noyaux des nerfs crâniens : PSV : noyaux principal du nerf trijumeau. Noyaux précérébelleux : TRN : noyaux tegmentaires réticulés (C-D) PRP : noyaux prépositus, MARN : noyaux réticulés magnocellulaires, NTS : noyaux du tractus solitaire. Noyaux précérébelleux : IO : noyaux du complexe olivaire, MVN : noyaux vestibulaires médians. Noyaux des nerfs crâniens : PSV : principal noyau sensoriel du nerf trijumeau. **Repères : Hi : hippocampe, Cb : cervelet, V4 : 4^{ème} ventricule**

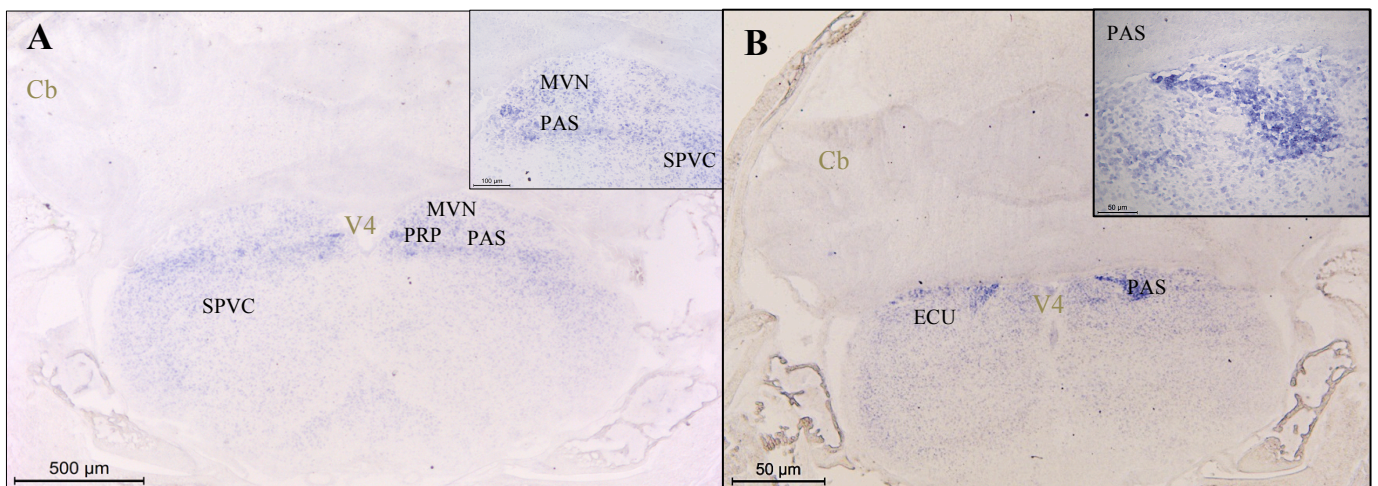


Fig. 40 : Hybridation *in situ* avec la sonde *Hoxb3* AS sur coupes coronales de cerveau de souris âgées de 7 jours (P7) (A-B) PAS : noyaux parasolitaires. Noyaux des nerfs crâniens : DMX : noyaux moteurs dorsaux du nerf vague, SPVC : noyaux spinal du nerf trijumeau partie caudale. Noyaux pré-cérébelleux : ECU : noyaux cunéiformes externes. **Repères : Cb : cervelet, V4 : 4^{ème} ventricule**

2.5. MISE EN PLACE DU PATRON ADULTE : STADES POSTNATAUX

Le travail sur les stades postnataux (P) n'étant pas prévu au début du mémoire une seule hybridation a été réalisée à chaque stade (P7, P14 et P21) et pour chaque gène. Comme précédemment, nous allons focaliser notre description sur un des trois gènes, dans ce cas *Hoxb3*, et nous étendrons ensuite la comparaison à *Hoxb1* et *Hoxb4*.

Au stade P7, on ne détecte une expression que dans les territoires postérieurs du cerveau. En effet, aucun signal significatif n'est observé dans les territoires du télencéphale, diencéphale et mésencéphale décrit chez l'adulte.

Par contre, une expression nette et intense (niveau 2) est détectée dans des territoires issus du métencéphale et du myélencéphale (Figures 39-40). Concernant le métencéphale, le sillon latéral (ILL) est marqué, ainsi que les noyaux pré-cérébelleux; il s'agit de la matière grise du pont (PG), des noyaux tegmentaires réticulés (TRN), des noyaux vestibulaires (MVN), des noyaux cunéiformes externes (ECU) et du complexe olivaire inférieur (IO). Nous observons que la matière réticulée est également marquée. Il y a la matière réticulée dérivant du métencéphale : les noyaux réticulaires caudaux du pont (PRNc) ainsi que la matière réticulée du myélencéphale : les noyaux réticulés magnocellulaires (MARN).

Dans le myélencéphale les noyaux des nerfs crâniens sont marqués. Ce sont les noyaux moteurs dorsaux du nerf vague (DMX) ainsi que des noyaux des nerfs trijumeaux (PSV). Enfin, dans le reste de la moelle allongée nous observons les noyaux prépositus (PRP), et le tractus solitaire (NTS), plus particulièrement le tractus parasolitaire (PAS) et enfin la moelle épinière est marquée dans sa partie plus ventrale.

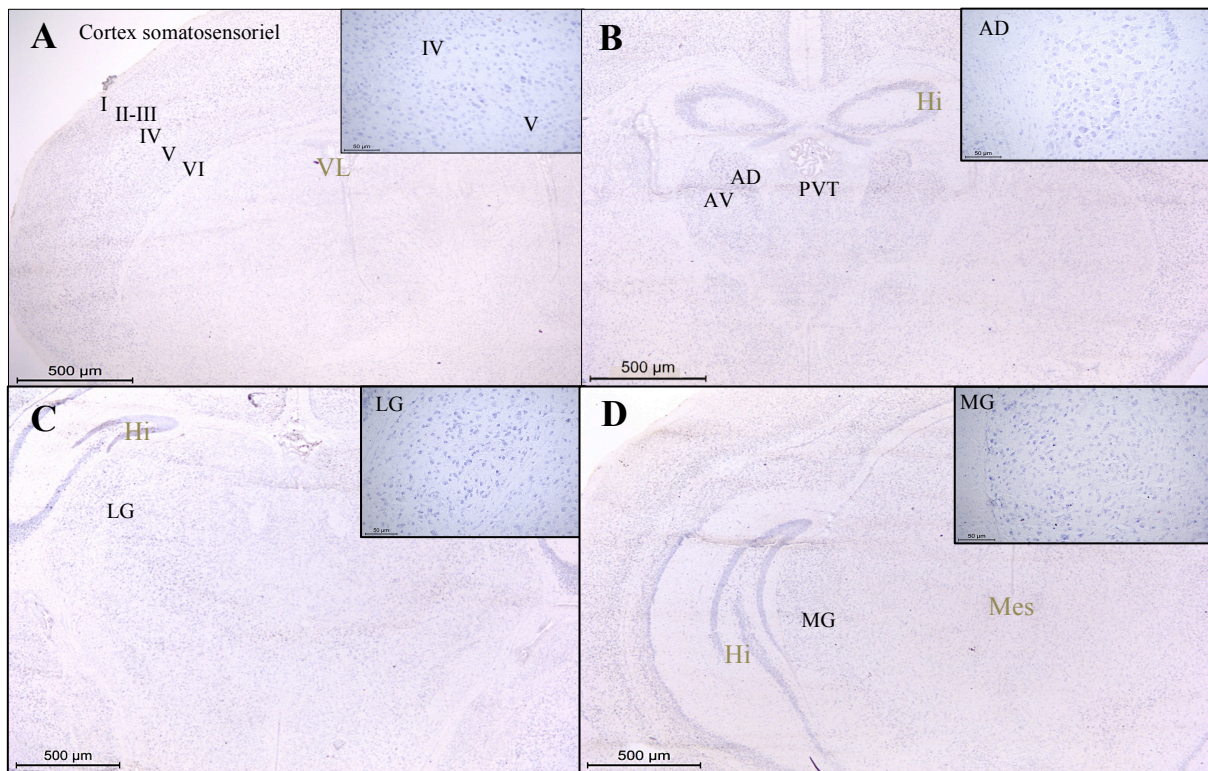


Fig. 41 : Hybridation *in situ* avec la sonde *Hoxb3* anti-sens sur coupes coronales de cerveau de souris âgées de 14 jours (P14) (A) Hémisection du cortex somatosensoriel couches I à VI, (B) Vue centrale du thalamus partie rostrale, AV : noyaux antéroventraux, AD : noyaux antérodorsaux, PVT : noyaux paraventriculaires du thalamus, (C-D) Vue centrale (C) et hémisection (D) de la partie caudale du thalamus, LG : noyaux genouillés latéraux, MG : noyaux genouillés médiaux. Repères : VL : ventricules latéraux, Hi : hippocampe, Mes : mésencéphale.

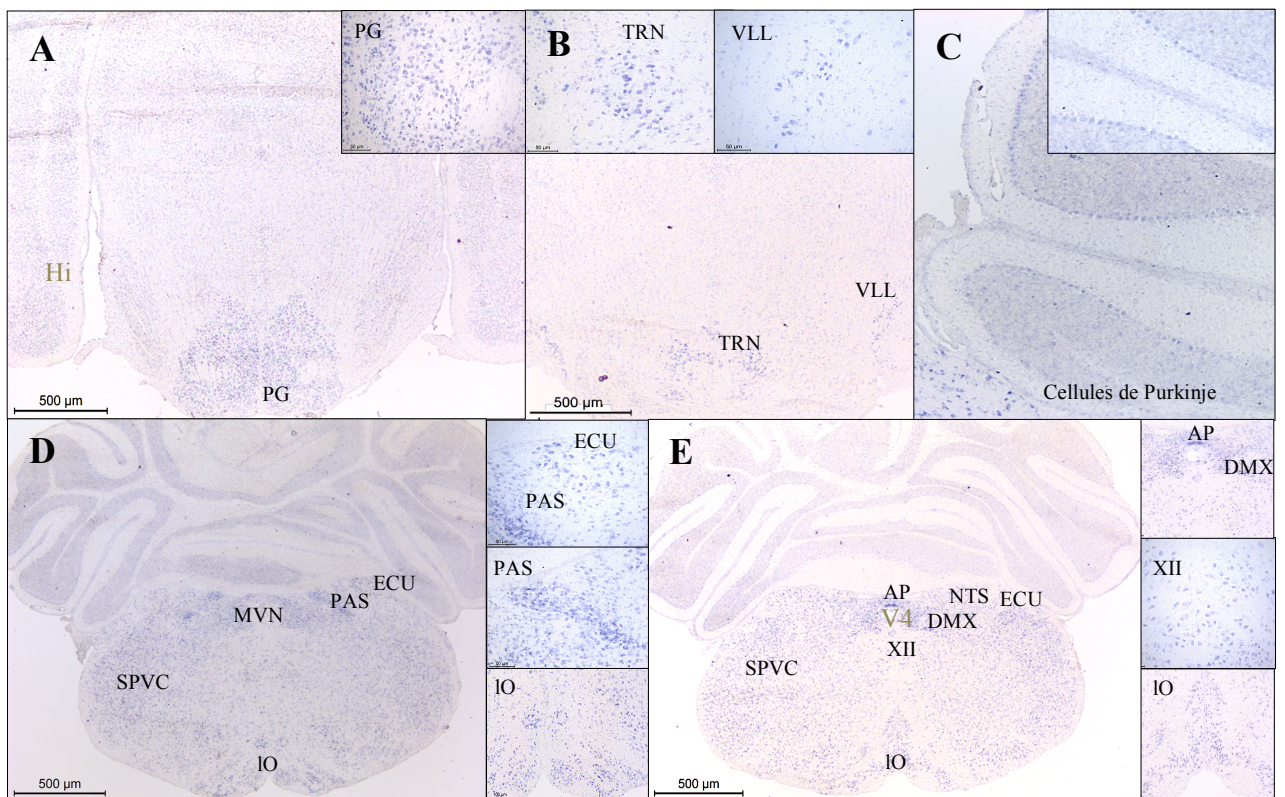


Fig. 42 : Hybridation *in situ* avec la sonde *Hoxb3* anti-sens sur coupes coronales de cerveau de souris âgées de 14 jours (P14) (A-B) Noyaux pré-cérébelleux : PG : matière grise du pont et TRN : noyaux tegmentaires réticulés, Mésencéphale : VLL : lemnisques ventraux (C) cellules de Purkinje (D-E) NTS : noyaux du tractus solitaire, PAS : noyaux parasolitaires, AP : aréa postrema. Noyaux pré-cérébelleux : ECU : noyaux cunéiformes externes, MVN : noyaux vestibulaires médians, IO : noyaux du complexe olivaire. Noyaux des nerfs crâniens : DMX : noyaux moteurs dorsaux du nerf vague, XII : noyaux de l'hypoglosse, SPVC : noyaux spinal du nerf trijumeau partie caudale. Repère : V4 : 4^{ème} ventricule

Aux stades P14, les territoires d'expression dans le métencéphale et le myélencéphale sont les mêmes que ceux décrits à P7 (Figure 42). Un territoire supplémentaire est cependant détecté, il s'agit du cervelet, et plus particulièrement des cellules de Purkinje (cf. Figure 42).

De plus, à partir de P14 une expression est détectée dans les aires somatosensorielle, piriforme, auditive et orbitaire du cortex (Figure 41). Dans les aires somatosensorielle et auditive, c'est la couche centrale qui apparaît comme marquée, pour les autres aires c'est plutôt la couche 2 qui est marquée. Plus précisément, concernant le cortex somatosensoriel, il semblerait que les couches IV à VI présentent du marquage alors que les couches I à III n'en présentent pas. Quelques noyaux du thalamus tels que les noyaux antéromédians (AM), antéroventraux (AV) et les noyaux genouillés (LG/MG) sont également marqués (Figures 41).

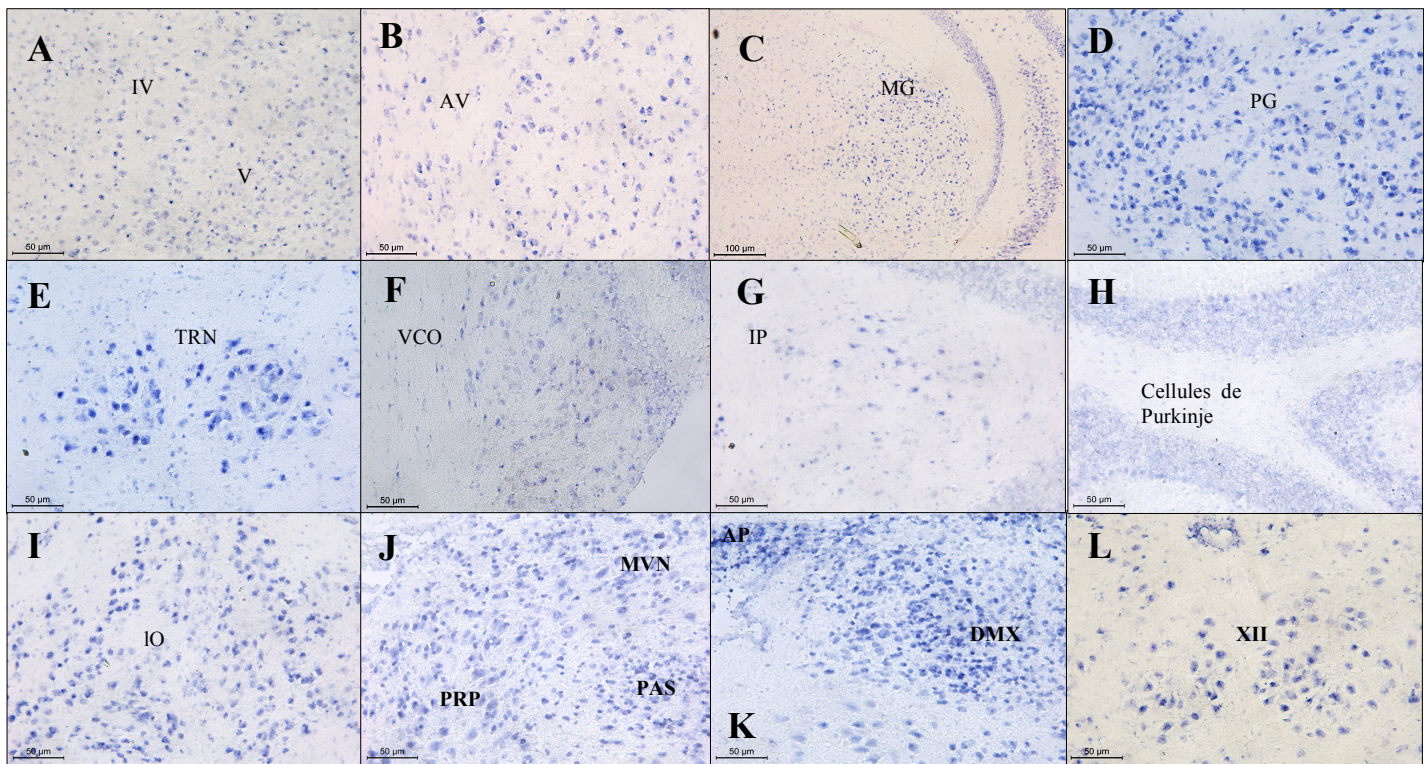


Fig. 43 : Hybridation *in situ* avec la sonde *Hoxb3* anti-sens sur coupes coronales de cerveau de souris âgées de 21 jours (P21) (A) Cortex somatosensoriel couches 4 et 5a (B-C) Diencéphale : Noyaux antéroventraux du thalamus, MG : noyaux genouillés médians (D-E) Noyaux pré-cérébelleux : PG : matière grise du pont, TRN : noyaux tegmentaires réticulés (F) VCO : Noyaux cochléaires ventraux (G) Noyaux profonds du cervelet : IP : interpositus (H) Cervelet : Cellules de Purkinje (I-J) PRP : noyaux prépositus, PAS : noyaux du tractus parasolitaire Noyaux pré-cérébelleux : IO : complexe olivaire, MVN : noyaux vestibulaires médians (K-L) AP : aréa postrema. Noyaux des nerfs crâniens : DMX : noyaux moteur dorsal du nerf vague et XII : hypoglosse.

A P21, le patron d'expression est comparable à celui décrit à P14 (Figure 43) et correspond à celui décrit chez l'adulte. En effet, tant les régions du cerveau antérieur : cortex, thalamus que celles du cerveau médian et postérieur : noyaux pré-cérébelleux, noyaux profonds du cervelet, cellules du Purkinje, noyaux de la moelle allongée et noyaux des nerfs crâniens sont marqués.

Le patron d'expression original observé chez l'adulte dans le cerveau antérieur se mettrait donc en place aux alentours du 14^{ème} jour après la naissance. Cependant des HIS supplémentaires seront nécessaires afin de valider totalement le patron d'expression aux stades postnataux.

Après avoir analysé les transcrits de mes gènes d'intérêt, je me suis intéressée aux protéines.

Si la protéine est présente, cela renforcera l'hypothèse que les gènes *Hox* sont exprimés et qu'ils ont un rôle dans le cerveau de la souris.

3. WESTERN-BLOTTINGS

Afin de tester les anticorps commerciaux pour chacun de mes 3 gènes d'intérêt nous avons dans un premier temps utilisé la méthode de westernblot. Etant donné le degré important de similarité dans les domaines conservés des protéines Hox, la production d'anticorps spécifiques est un problème récurrent et reconnu dans la communauté scientifique. Plusieurs expériences ont été réalisées, avec des variations dans les paramètres suivants : durée de l'étape de blocage, concentration de l'agent bloquant, nombre de lavages, concentration des anticorps et utilisation d'un peptide bloquant. Ces expériences ont été réalisées sur des embryons aux stades 9,5 et 12,5dpc (contrôles positifs) ainsi que sur différentes régions de cerveau adulte, obtenus par macrodissection (cf. figure 25).

Les westernblots obtenus lors des premières expériences présentaient de très nombreuses bandes. Les anticorps étant des polyclonaux il est normal qu'ils reconnaissent un plus grand nombre d'épitopes que des monoclonaux d'où un nombre assez important de bandes. Cependant, l'identification de la bande correspondant à notre protéine d'intérêt s'est avérée très ardue car l'intensité des différentes bandes présentes était assez semblable. Il n'y avait pas une bande qui se dégageait des autres de par son intensité. Nous avons donc essayé d'améliorer la qualité et la spécificité de nos westernblots en augmentant la stringence de quelques étapes. Parmi les différentes conditions testées, c'est le passage d'un blocage avec du TTBS 5% lait à du TTBS 10% lait ainsi que l'augmentation du nombre de lavage (en gardant la même durée totale : changement de la solution de lavage toutes les 5 minutes au lieu de 10 minutes) qui nous ont permis de diminuer de manière significative le nombre de bandes détectées.

Les résultats les plus convaincants ont été obtenus avec l'anticorps dirigé contre Hoxb1 (Figure 44). En effet, on observe dans le dernier westernblot la présence d'une bande majoritaire dans les différents échantillons d'embryons à l'exception du puits correspondant

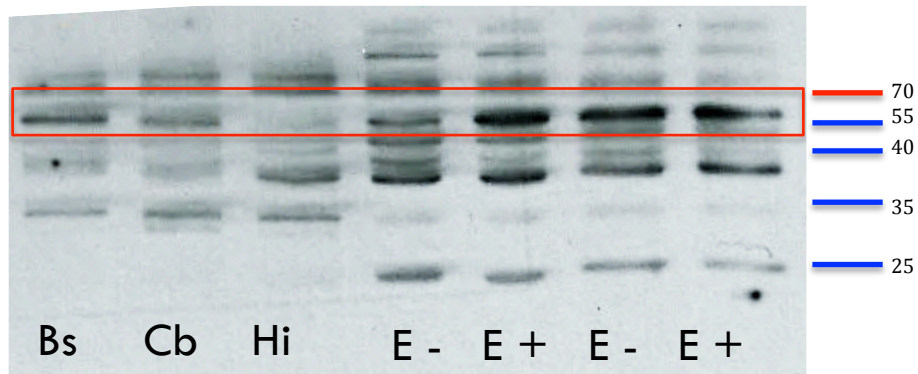


Fig. 47 Westernblot réalisé avec l'anticorps anti-Hoxb1

La partie de gauche correspond au cerveau adulte : BS : tronc cérébral, Cb : cervelet, Hi : hippocampe.

La partie de droite correspond aux embryons de 12,5dpc : E+ : contrôle positif : tube neural, E- : contrôle négatif : partie antérieure de la tête.

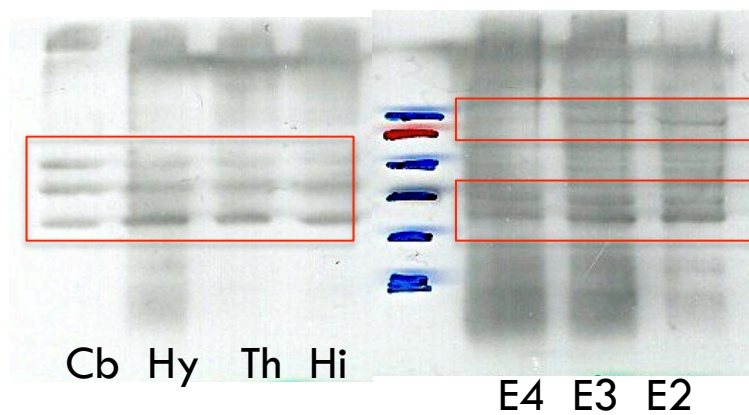


Fig. 48 Westernblot réalisé avec l'anticorps anti-Hoxb3

La partie de gauche correspond au cerveau adulte : Cb : cervelet, Hy : hypothalamus, Th : thalamus, Hi : hippocampe.

La partie de droite correspond à 3 embryons de 9,5dpc.

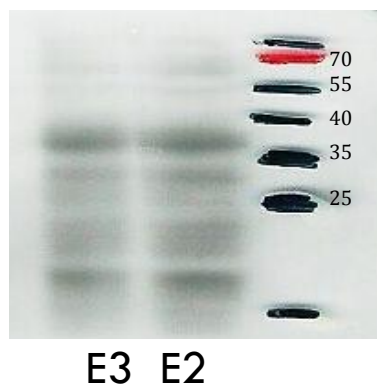


Fig. 49 Westernblot réalisé avec l'anticorps anti-Hoxb4

Partie correspondant à 2 embryons de 9,5dpc.

au contrôle négatif soit la partie antérieure de la tête à 12,5dpc. Chez l'adulte, cette bande est également présente dans le cervelet et dans le tronc cérébral et absente dans l'hippocampe. Ce qui est en accord avec les HIS car nous n'observons jamais la présence de transcrits pour *Hoxb1* dans l'hippocampe. Cependant, la bande correspondant à *Hoxb1* est située aux alentours de 50kDa alors qu'elle est attendue à 32kDa d'après les informations fournies par la firme produisant l'anticorps.

L'anticorps anti-*Hoxb3* quant à lui n'a pas été très convaincant en westernblot. En effet, l'analyse a été complexe en l'absence de bande d'intensité prépondérante. De plus, d'une expérience à l'autre les résultats n'ont été que peu reproductibles. Chez l'adulte, il semblerait que le doublet de bandes correspondant à la protéine *Hoxb3* se situe entre 35 et 40kDa (pour le cervelet il s'agit plutôt d'un triplet de bandes entre 35 et 60kDa (Figure 45). Chez les embryons de 12,5dpc la bande correspondante est située au dessus de 70kDa (non illustré) alors que chez les embryons de 9,5dpc un doublet de bandes est situé aux alentours de 39kDa mais une autre bande plus fine est également située aux alentours de 70kDa pour 2 des 3 embryons utilisés. La firme quant à elle prédit une taille de 44kDa pour la protéine *Hoxb3*.

Enfin, deux westernblot ont été réalisés avec l'anticorps anti-*Hoxb4* et lors de ces deux expériences aucune bande n'a été détectée par l'anticorps dans les différentes sous régions du cerveau adulte. Chez l'embryon, un doublet majoritaire situé entre 35 et 40kDa est détecté ainsi qu'une autre bande à 20kDa (Figure 46). La firme quant à elle indique que la bande attendue se situe à 35kDa.

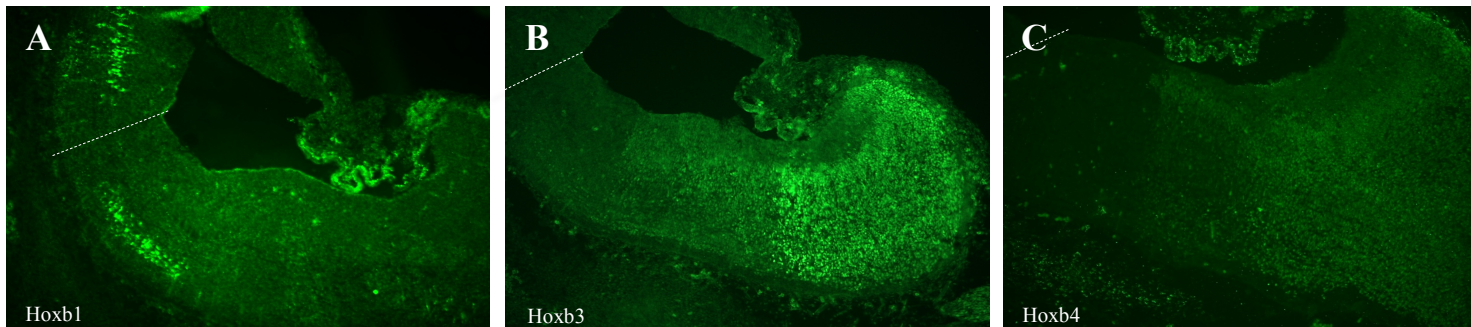


Fig. 47 : Immunohistochimies sur coupes sagittales d'embryons à 12,5dpc. Les photos représentent le rhombencéphale en coupe sagittale. (A) IHC pour Hoxb1, la protéine est présente dans les rhombomères 4 et 5 semblerait-il mais également dans des neurones en migration vers les noyaux cochléaires. (B) IHC pour Hoxb3, la limite antérieure de présence de la protéine semble être le rhombomère 6 ou 7. (C) IHC pour Hoxb4, la limite antérieure de présence de la protéine semble être le rhombomère 7. Les pointillés représentent la limite entre le métencéphale (rhombomères 1 et 2) et le rhombencéphale (rhombomères 3 à 8).

4. IMMUNOHISTOCHIMIES

4.1. VALIDATION DES ANTICORPS SUR EMBRYONS DE 12,5dpc

En l'absence de résultats concluants dans nos expériences de westernblots, nous avons décidé de réaliser d'autres tests en immunologie. Etant donné que chez les embryons les domaines d'expression des gènes *Hox* sont bien connus nous avons décidé d'utiliser des immunohistochimies sur coupes sagittales d'embryons de 12,5dpc afin de déterminer la spécificité des anticorps commerciaux.

Concernant *Hoxb1*, la protéine est détectée dans deux sites du rhombencéphale. Le premier correspond au rhombomère 4 et un ou deux rhombomères suivants. Ce territoire est restreint à quelques cellules ventrales. Des protéines sont également détectées dans des neurones plus antérieurs. Ces neurones pourraient correspondre à des neurones en migration à partir de la lèvre rhombique pour donner naissance au complexe cochléaire (Geisen *et al.*, 2008). La présence de la protéine est également détectée dans le tube digestif ainsi que dans la partie ventrale de la moelle épinière (Figure 47. A).

L'anticorps anti-*Hoxb3* permet de mettre en évidence la présence de la protéine dans le rhombencéphale, dans un territoire caudal à celui d'*Hoxb1* et beaucoup plus étendu. Il correspond à toute la largeur du rhombencéphale à l'exception de la couche la plus proche de la lumière du 4^{ème} ventricule (Figure 47. B). Ce territoire semble correspondre aux rhombomères 6/7. La limite antérieure de présence de la protéine dans le rhombencéphale est très nette. La protéine est également détectée dans les reins, les ganglions spinaux, le tube digestif, les gonades ainsi que dans la partie dorsale de la moelle (pas illustré).

Même si l'efficacité de l'anticorps anti-*Hoxb4*, plus particulièrement sa sensibilité semble limitante, la détection des protéines chez les embryons est en accord avec la littérature. En effet, en utilisant l'anticorps anti-*Hoxb4* très concentré, nous avons obtenu un faible signal au niveau du rhombencéphale caudal, avec une limite au niveau du rhombomère 7. La limite antérieure de présence de la protéine au niveau du rhombencéphale est également bien distincte à forte concentration d'anticorps (Figure 47. C). Cependant, même à forte concentration, le signal obtenu reste très faible par rapport à celui des deux autres anticorps. Nous n'utiliserons donc pas cet anticorps chez l'adulte étant donné que son efficacité est déjà faible chez notre contrôle positif.

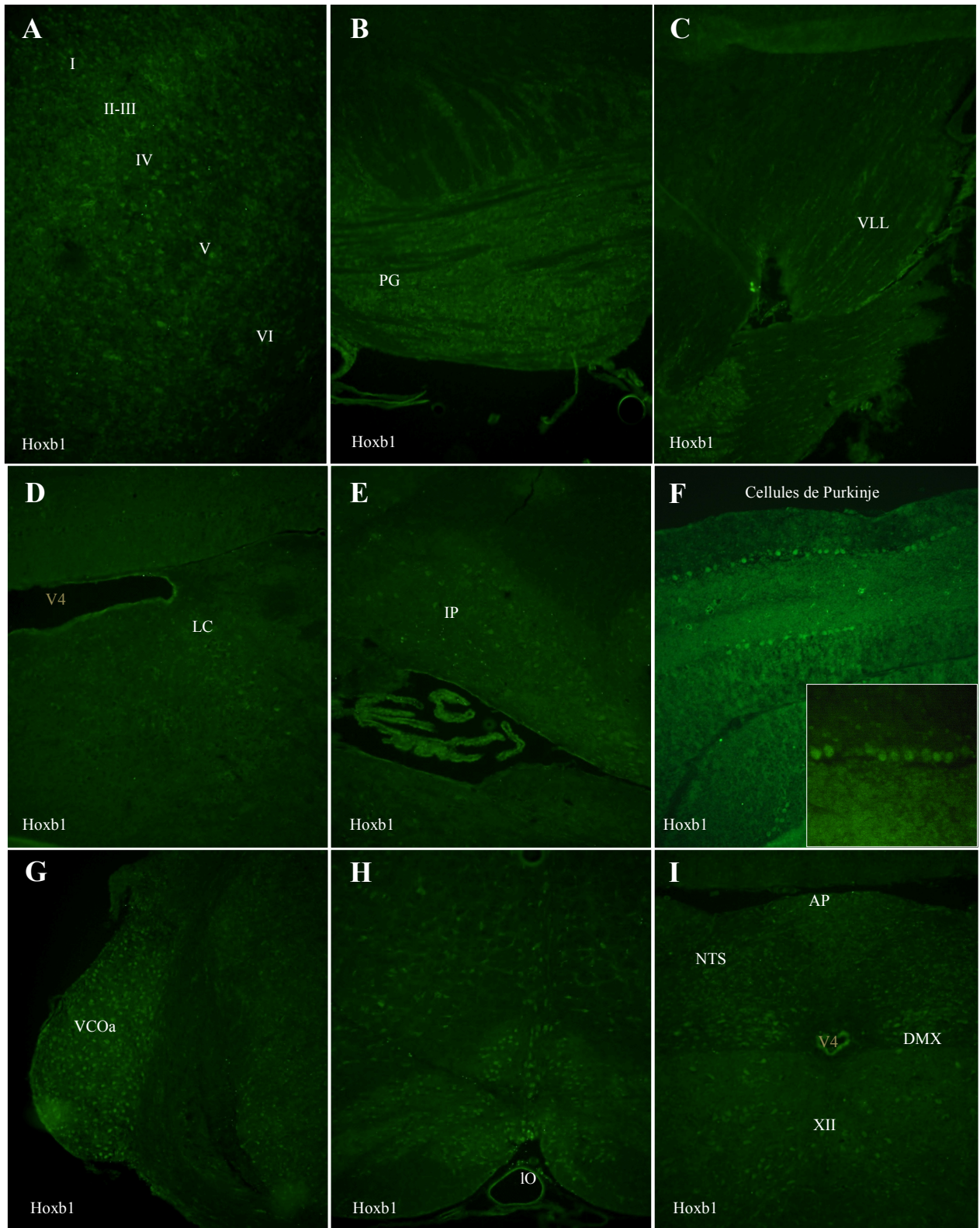


Fig. 48 : IHC sur coupes coronales de cerveaux adultes avec les anticorps Hoxb1. (A) Hémisection du cortex somatosensoriel. Les 6 couches du cortex somatosensoriel. Le marquage semble correspondre à la couche IV ou à la Va. (B) Hémisection de la région pontine. Noyaux pré-cérébelleux : PG : matière grise du pont bien marquée. (C) Hémisection de la partie ventrale des dérivés du métencéphale. VLL : lemnisque latéral. (D) Hémisection de la moelle allongée. LC : locus céruleus. (E) Les noyaux profonds du cervelet sont marqués, plus précisément ici les noyaux interpositus (IP). (F) Cervelet : les cellules de Purkinje sont marquées, mais toutes les cellules ne le sont pas. (G) Hémisection de la moelle allongée. VCOa : noyaux cochléaires. (H) Vue centrale du complexe olivaire : IO (noyaux pré-cérébelleux). (I) Vue centrale de la moelle allongée entourant le 4^{ème} ventricule. AP : aréa postréma, NTS : noyaux du tractus solitaire. Noyaux des nerfs crâniens : XII : noyaux de l'hypoglosse, DMX : noyaux moteurs dorsaux du nerf vague. **Repère** : V4 : 4^{ème} ventricule.

Malgré des résultats peu encourageants obtenus en westernblots, au vu des résultats positifs en IHC sur coupes d'embryons, nous avons décidé de poursuivre notre étude sur les protéines Hoxb1 et Hoxb3 dans le cerveau adulte.

4.2. IMMUNOHISTOCHIMIES SUR CERVEAUX ADULTES

Des immunohistochimies sur coupes de cerveaux fixés et cryopréservés ont été réalisées pour les protéines Hoxb1 et Hoxb3.

Nous avons détecté la présence de la protéine Hoxb1 dans des territoires du cerveau postérieur et également dans des territoires correspondant au cerveau antérieur. Concernant le télencéphale, la protéine est détectée dans le cortex somatosensoriel, plus précisément dans une zone centrale qui pourrait correspondre à la couche IV ou Va (Figure 48. A). Un signal est également détecté dans le diencephale, plus précisément dans quelques noyaux du thalamus, notamment les corps genouillés (LG/MG) (impliqués respectivement dans la vision et l'audition) (non illustré).

En ce qui concerne le métencéphale la protéine est détectée dans les noyaux du lemnisque latéral (Figure 48. C) mais également dans les noyaux pré-cérébelleux comme la matière grise du pont (PG) et le complexe olivaire inférieur (IO) (Figure 48. B, H). Le locus céruleus (LC) présente également un marquage (Figure 48. D). Au niveau du cervelet nous observons que la couche des cellules de Purkinje est également marquée (Figure 48. F). Ces cellules de Purkinje vont elles même projeter sur les noyaux profonds du cervelet dans lesquels nous détectons également du signal : (IP) noyaux interpositus et (DN) dentate nucleus (Figure 48. E).

Enfin dans le myélencéphale nous observons la protéine dans les noyaux des nerfs crâniens comme ceux du nerf moteur vague (DMX) et ceux de l'hypoglosse (XII) (Figure 48. I). Les noyaux vestibulaires (MVN), les cochléaires (VCO), du tractus solitaire (NTS) et de l'aréa postréma (AP) sont également marqués (Figures 48. G-I).

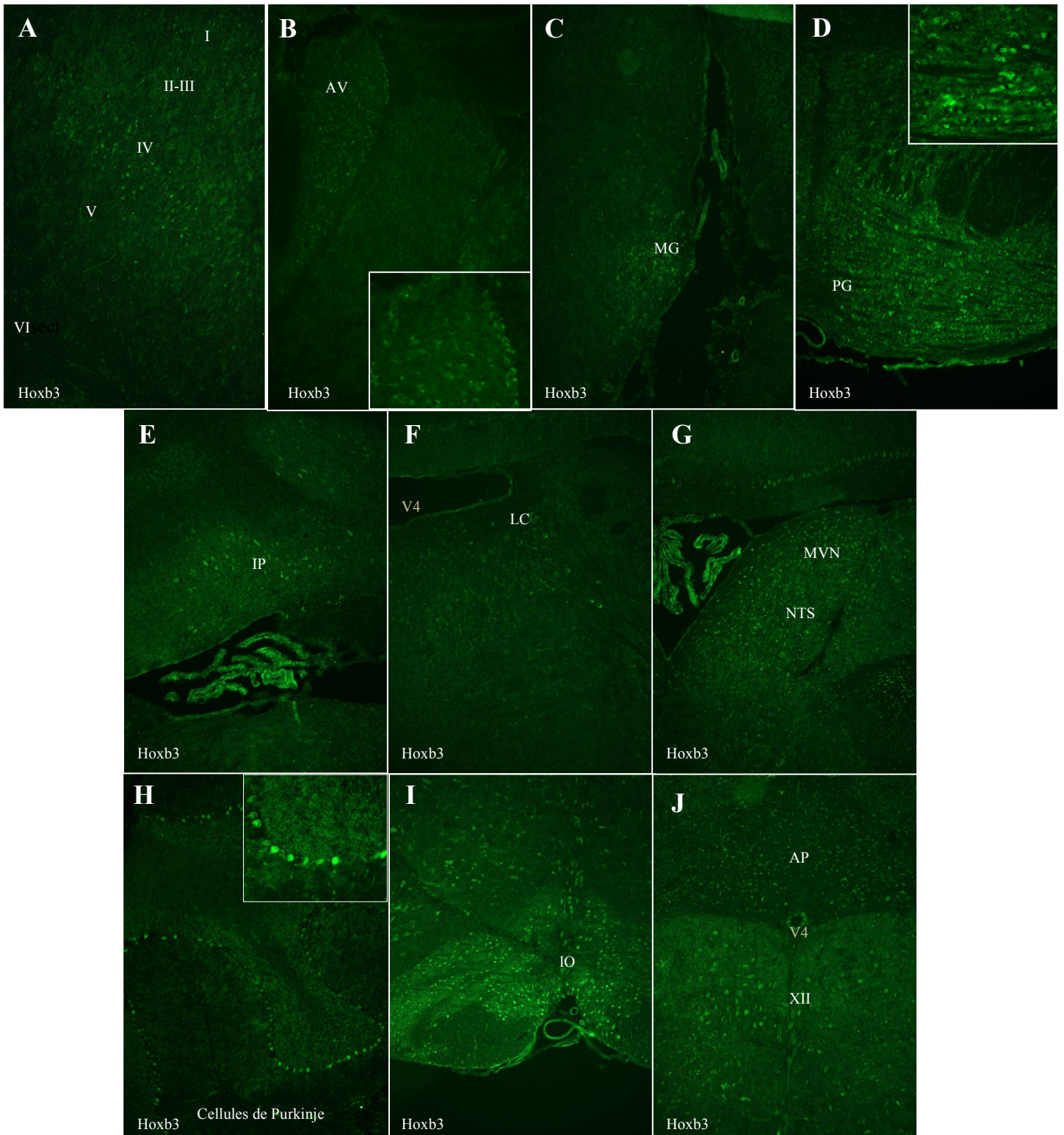


Fig. 49 : IHC sur coupes coronales de cerveaux adultes avec les anticorps Hoxb3. (A) Hémisection du cortex somatosensoriel. Les 6 couches du cortex somatosensoriel. Le marquage semble correspondre à la couche IV ou à la Va. (B) Hémisection de la région pontine. Noyaux pré-cérébelleux : PG : matière grise du pont bien marquée. (C) Hémisection de la partie plus caudale du thalamus. MG : noyaux genouillés médians. (D) Hémisection de la région pontine. Noyaux pré-cérébelleux : PG : matière grise du pont bien marquée. (E) Les noyaux profonds du cervelet sont marqués, plus précisément ici les noyaux interpositus (IP). (F) Hémisection de la moelle allongée. LC : locus cœrulœus. (G) NTS : noyaux du tractus solitaire et noyaux pré-cérébelleux : MVN : noyaux vestibulaires médians. (H) Cervelet : les cellules de Purkinje sont marquées, mais toutes les cellules ne le sont pas. (I) Vue centrale du complexe olivaire : IO (noyaux pré-cérébelleux). (J) Vue centrale de la moelle allongée entourant le 4^{ème} ventricule. AP : arœa postœrema, NTS : noyaux du tractus solitaire. Noyaux des nerfs crâniens : XII : noyaux de l'hypoglosse, DMX : noyaux moteurs dorsaux du nerf vague. **Repère** : V4 : 4^{ème} ventricule.

Comme pour Hoxb1, nous avons observés un signal interprétable pour la protéine Hoxb3 dans le cerveau adulte.

Les territoires où la protéine Hoxb3 est détectée sont des territoires aussi bien antérieurs (Figure 49. A-D) que postérieurs du cerveau (Figure 49. E-J), ce qui est en accord avec les résultats des HIS. Les territoires de détection de la protéine Hoxb3 sont les mêmes que ceux décrits pour Hoxb1 à quelques exceptions près. En effet, on ne retrouve pas la protéine au niveau du lemnisque (métencéphale) ni dans les noyaux cochléaires (myélocéphale). Pour le reste des territoires, se référer à la description pour la protéine Hoxb1 (Figures 48. A-I).

Nous constatons donc que la localisation de la protéine Hoxb3 dans le cerveau adulte de souris est en adéquation avec la localisation des transcrits dans ce même organe.

V. Discussion et Perspectives

1. ANALYSE COMPARATIVE DES DONNEES

D'EXPRESSION

L'analyse de l'expression des trois gènes d'intérêts a été réalisée par deux méthodes ; l'une quantitative mais globale et l'autre semi-quantitative mais permettant une localisation neuro-anatomique des transcrits.

Les données obtenues en RT-qPCR ont tout d'abord été comparées à celles obtenues par Takahashi et ses collaborateurs en 2004. Tout comme lui, nous détectons de l'expression dans le cerveau ainsi que dans le cervelet pour *Hoxb3* et *b4* ; cependant aucune expression n'est détectée pour *Hoxb1* dans ces 2 échantillons dans l'étude de Takahashi *et al.*, (cf. figure 16). Ces différences pourraient s'expliquer par des approches méthodologiques différentes en terme de sensibilité et de résolution ainsi qu'aux variations d'échantillons utilisés (tissus humains) et pour lesquels nous n'avons aucune information concernant l'homogénéité. Les échantillons ne sont donc pas forcément représentatifs de l'ensemble des régions du cerveau. En effet, si la méthode est effectivement moins sensible alors un gène exprimé faiblement, ou dans un nombre restreint de cellules (et dont les ARN-m sont dilués par les ARNm de toutes les cellules n'exprimant pas *Hoxb1*) ne sera pas détecté. Ce qui pourrait être le cas car les niveaux détectés pour *Hoxb1* sont très faibles (en tout cas en comparaison du pool d'embryon) par rapport aux deux autres gènes.

Au sein de notre étude, des différences sont observées dans les résultats obtenus entre les deux méthodes utilisées. En effet, de manière générale en HIS les transcrits des trois gènes d'intérêts sont détectés dans le cerveau antérieur : différentes aires corticales et thalamus, ainsi que dans le cerveau médian : substance noire et dans le cerveau postérieur : pont, cervelet et moelle allongée et enfin dans la moelle épinière cervicale (cf. résultats 2.4). Concernant les territoires du cerveau postérieur les résultats des RT-qPCR sont en accord avec ceux des HIS. A l'opposé, en RT-qPCR, un niveau d'expression significatif dans le cerveau antérieur (cortex et thalamus) est uniquement détecté pour *Hoxb1* (cf. résultats 1.).

Lors de l'analyse des données obtenues en RT-qPCR, l'expression d'un gène dans une sous-région précise du cerveau était qualifiée de significative lorsqu'elle était détectée chez au moins deux individus parmi les cinq. Pour *Hoxb3* et *b4*, une expression a été détectée dans le thalamus et pour *Hoxb1*, *b3* et *b4* dans le cortex, mais seulement chez un même individu. Des

variations sont donc observées entre individus de même fond génétique. Nous pouvons expliquer ceci par deux hypothèses distinctes. D'une part, la RT-qPCR est une approche quantitative réputée très sensible, qui pourrait détecter un à deux ARNm dans une cellule. L'un des problèmes rencontré ici est lié la dilution. L'expression apparaît déjà faible en HIS (au niveau semi-quantitatif l'expression est de l'ordre de 1 dans le cortex alors qu'elle est de 3 dans la moelle allongée), et de plus concerne un nombre très réduit de cellules. Lors de l'extraction, ces ARNm doivent être fortement dilués dans le pool d'ARNm total. Il y a donc une probabilité que l'on soit sous le seuil de détection, ou à la limite. Dans ce contexte de niveau très faible, la moindre variation soit individuelle, soit dans la procédure de dissection, extraction ou réverse transcription va entraîner une amplification tardive voir même une absence d'amplification. Ce qui pourrait aussi expliquer la différence individuelle. D'autre part, ces différences pourraient s'expliquer par le fait que certains gènes sont exprimés dans des conditions spécifiques, pour répondre à des fonctions ou des besoins précis d'un animal. Afin de trancher quant à la détection de l'expression des gènes d'intérêt dans les régions du cerveau antérieur il faudrait répéter les expériences en utilisant un nombre d'individus plus important.

Comme mentionné dans l'introduction, Sanlioglu et ses collaborateurs (1998) ont détecté l'expression d'*Hoxb3* dans le cerveau antérieur à P0 c'est-à-dire le jour de la naissance. Des études similaires mais utilisant des méthodes plus sensibles (amorces spécifiques, cerveau macro-disséqués en 7 sous-régions plus la moelle cervicale) sur des cerveaux postnataux à différents stades de développement sont en cours au laboratoire. Nous n'avons cependant pour l'instant aucun résultat concernant *Hoxb1*, *b3* ou *b4*. A l'heure actuelle, les seuls résultats que nous pouvons comparer à ceux de Sanlioglu sont ceux obtenus par HIS aux stades postnataux. La sensibilité est différente pour ces 2 techniques. Cependant, nous ne détectons la présence des transcrits d'*Hoxb3* dans le cerveau antérieur qu'à partir de P14. Cette différence peut être le fruit d'un manque de sensibilité de la part de notre technique d'HIS. En effet les niveaux d'expression sont très faibles dans ces territoires, et nos expériences n'ont pas été répétées. Alternativement, cette différence pourrait également être imputée aux expériences menées par Sanlioglu. En effet, ils ont réalisé des PCR avec des amorces dégénérées à une époque où les banques de données génomiques étaient incomplètes par rapport aux données actuelles. Ils pourraient dès lors détecter l'expression des autres gènes du groupe paralogue 3. De plus, n'ayant aucune information sur les méthodes de macro-dissection utilisées ; nous ignorons à quoi correspond précisément leur échantillon "cerveau antérieur". Ca pourrait effectivement

être le prosencéphale ou alors la partie du cerveau antérieure au cervelet. Enfin, des contaminations par des territoires tels que le pont (ou la moelle allongée mais c'est quand même moins probable) pourraient être présente du fait de la difficulté d'isoler les différents territoires du cerveau à P0. A ce stade, nous ne disposons d'aucunes informations supplémentaires nous permettant de conclure.

2. DETECTION DES PROTEINES HOX

Un des objectifs de mon mémoire était de développer et de mettre au point la technique d'immunohistochimie (IHC).

La détection des protéines nécessite l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement les protéines d'intérêt. Nous avons commandé les anticorps polyclonaux anti-Hoxb1 chez Covance (publié par Arenkiel *et al.*, 2004) et les anticorps anti-Hoxb3 et Hoxb4 chez Santacruz (non publiés). Bien que l'anticorps anti-Hoxb1 ait déjà été utilisé dans la littérature pour les anticorps anti-Hoxb3 et Hoxb4 nous ne possédions pas d'information. La validation a donc été une étape préalable à leur utilisation ; la méthode la plus couramment utilisée afin de valider des anticorps est le westernblot. L'application de cette méthode s'est révélée peu concluante. En effet, nous avons obtenu un nombre élevé de bandes et aucune ne semblait se dégager de part son intensité plus importante. Des modifications du protocole utilisé ont donc été testées et nous avons réussi à améliorer quelque peu les résultats pour la protéine Hoxb1.

Nous avons ici utilisé comme contrôles positifs des tubes neurax (moelle épinière plus rhombencéphale) de fœtus de souris à 12,5dpc et comme contrôle négatif la partie antérieure de la tête (mésencéphale, diencéphale et télencéphale) de ces mêmes fœtus. L'utilisation de tissus issus d'embryons KO pour les gènes d'intérêts serait le meilleur contrôle négatif possible et permettrait de nous rassurer quant à la spécificité de nos anticorps. Un bon contrôle positif serait de sur-exprimer la protéine d'intérêt dans un système d'expression hétérologue.

Dans l'attente des ces contrôles pour les westernblots, nous avons poursuivi la validation de nos anticorps en IHC en utilisant des tissus exprimant les trois protéines. Pour les protéines Hoxb1 et Hoxb3 les résultats obtenus sont satisfaisants. En effet, pour ces IHC nous avons utilisé comme contrôles positifs des coupes sagittales d'embryons à 12,5dpc. Sur ces coupes les territoires de présence de la protéine sont en accord avec les données de la littérature. Il est tout de même nécessaire prendre ces résultats avec prudence. Il se pourrait que les membres d'un même groupe paralogue ayant des limites antérieures similaires soient également

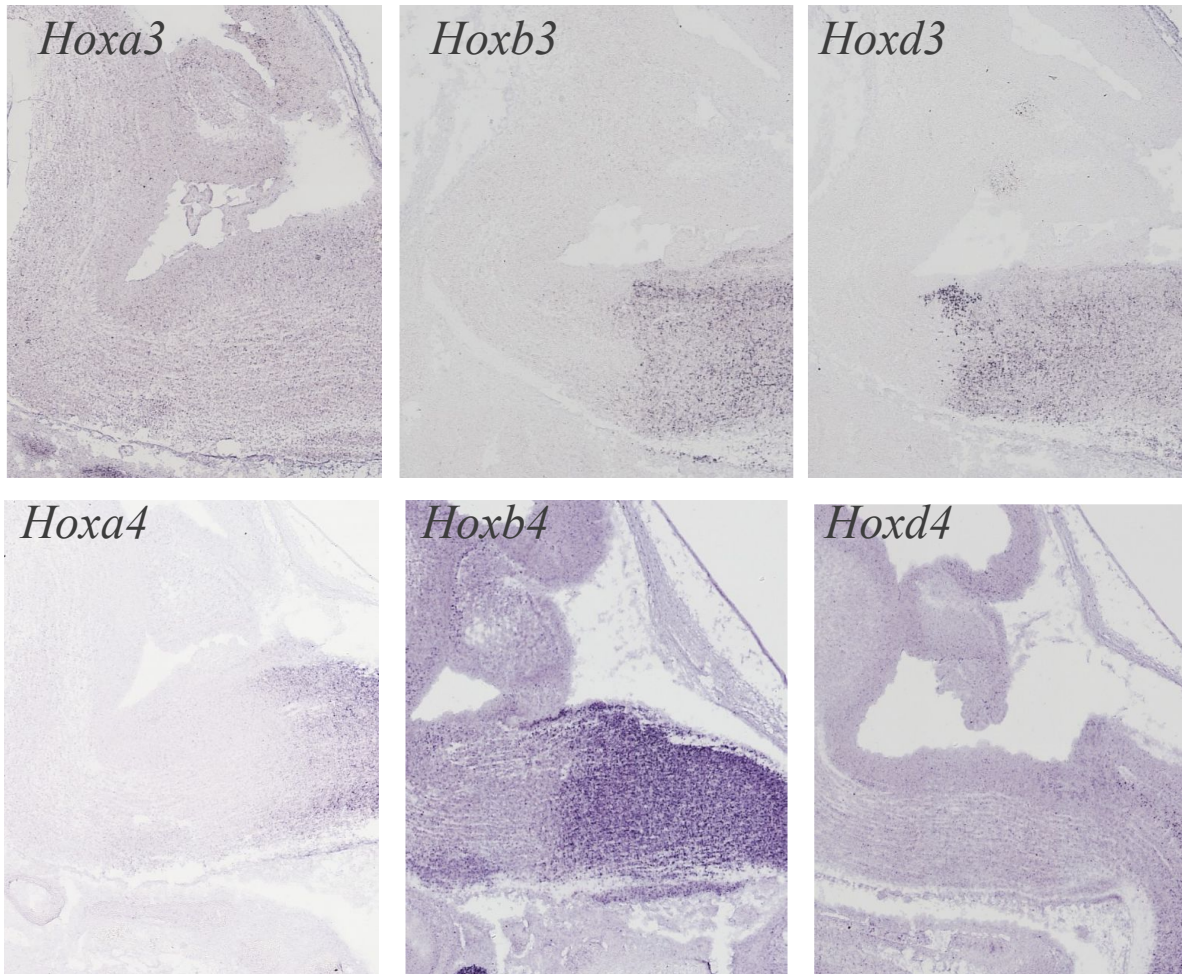


Fig. 50 : Expression des gènes *Hox* des groupes paralogue 3 et 4 à dans le rhombencéphale à 14,5dpc.
(from <http://www.genepaint.org/Frameset.html>).

reconnus. En effet, il semble qu'à ces stades, certains membres des groupes paralogues 3 et 4 présentent des profils d'expression similaires au niveau du rhombencéphale (<http://www.genepaint.org/Frameset.html>); c'est notamment le cas d'*Hoxb3* et *Hoxd3*, et de *Hoxb4* et *Hoxa4* (Figure 50). L'utilisation de tissus KO pour les trois gènes serait donc la meilleure façon de valider les résultats obtenus.

Les différences de niveau de reconnaissance entre les westernblots et les IHC pourraient être dues au fait que les anticorps utilisés reconnaissent mieux la forme native des protéines (comme sur les IHC) que la forme dénaturée (comme sur les westernblots). Une solution pour pallier à ce problème serait d'essayer de réaliser des westernblots en conditions non dénaturantes.

Pour la protéine *Hoxb4*, comme il l'a été indiqué dans la partie résultats, les westernblots et immunohistochimies n'ont pas été poursuivis. Les résultats en westernblot étaient en effet assez surprenants. La protéine *Hoxb4* n'a été détectée que dans les échantillons d'embryons et jamais dans les échantillons de cerveau adulte. Lors des IHC des résultats semblables ont été obtenus, bien que présentant un patron qui semblait spécifique, le signal présentait une intensité très faible déjà chez l'embryon. L'anticorps anti-*Hoxb4* est un anticorps produit chez la chèvre alors que les anticorps anti-*Hoxb1* et *Hoxb3* sont produits chez le lapin et nécessitent des anticorps secondaire anti-rabbit et non pas anti-goat comme c'est le cas pour l'anticorps anti-*Hoxb4*. L'anticorps secondaire utilisé était donc différent. Nous soupçonnons que l'anticorps secondaire anti-goat produise une quantité importante de bruit de fond. Un anticorps secondaire distinct doit être testé afin de vérifier cette hypothèse.

3. ANALYSE DES PROFILS D'EXPRESSION DES GENES

HOXB1, HOXB3 ET HOXB4

Avant d'aller plus loin et de discuter des fonctions potentielles de ces 3 gènes un point sur les profils d'expression paraît judicieux.

D'après les résultats obtenus il est possible de déclarer que les trois gènes d'intérêt ont des profils d'expression comparables. Cependant, étant donné leur expression restreinte au niveau cellulaire nous ne pouvons pas affirmer qu'ils soient exprimés par les mêmes cellules. Des études de colocalisation par double HIS ou double IHC nous éclaireraient davantage.

Les profils d'expression sont tout de même semblables. En effet, dans le cerveau antérieur les transcrits des 3 gènes sont détectés dans différentes aires corticales telles que le cortex

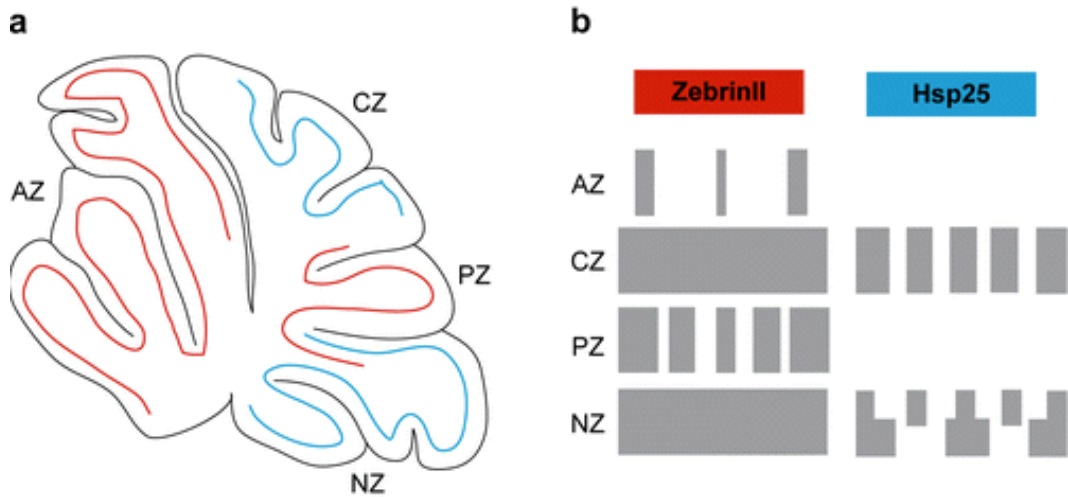


Fig. 51 : Haut : Bandes parasagittales et expression transversale du gène *Zebrine II* dans un cervelet de rongeur.

(from http://www.cell.ucalgary.ca/r_hawkes.html)

Bas : (a) Représentation selon les vues antérieure (AZ), entrale (CZ), postérieure (PZ) et nodulaire (NZ) (b) du patron d'expression des gènes *Zebrine II* et *Hsp25* permettant de distinguer au niveau moléculaire les bandes parasagittales observées dans le cervelet.

(Sillitoe & Joyner, 2007)

somatosensoriel, auditif ou encore olfactif mais également dans la majeure partie des noyaux du thalamus. Dans le cerveau moyen l'expression est détectée dans la substance noire, la matière grise périaqueductale et les noyaux du raphé. Enfin dans le cerveau postérieur les territoires du pont, du cervelet (cellules de Purkinje et noyaux profonds) ou en relation avec le cervelet, les noyaux pré-cérébelleux, ainsi que des noyaux des nerfs crâniens et de la moelle allongée expriment les 3 gènes.

Une caractéristique de ces patrons, comme mentionné ci-dessus, est l'expression restreinte à certaines cellules au sein des noyaux/couche marquées. Afin de caractériser plus précisément les populations cellulaires exprimant ces gènes des études de colocalisation avec des marqueurs moléculaires précis s'avèreraient très utiles.

En effet, la détection de nos gènes dans le cortex somatosensoriel est assez caractéristique. Les transcrits sont présents la couche centrale qui pourrait correspondre à la couche IV ou à la couche Va. L'utilisation de marqueurs tels que *RobB* ou *Cyp39a1* pour la couche IV ou *PlxnD1* pour la couche Va permettraient de déterminer précisément dans quelle couche ces trois gènes *Hox* sont exprimés (Molyneaux *et al.*, 2007 ; cf. Figure 14 de l'introduction). Ces informations permettraient ainsi de déterminer s'il s'agit de neurones recevant des projections au thalamus ou pas. Concernant la couches Va, sa fonction semble encore peu claire, bien qu'il ait été mentionné qu'elle contient des neurones qui font des projections à travers le corps calleux vers le striatum, et ne sortent jamais du télencéphale. Les neurones de la couche Va seraient essentiellement impliqués dans le transport des informations sensorielles de manière intracorticale (Molyneaux *et al.*, 2007 ; Schubert *et al.*, 2006). Enfin, une étude au niveau des cellules de Purkinje serait également utile étant donné que nous avons montré que toutes les cellules de Purkinje n'exprimaient pas ces 3 gènes. Il faudrait ici déterminer par colocalisation si ces 3 gènes sont exprimés par les mêmes cellules appartenant à la couche de cellules de Purkinje ou par des cellules différentes mais également étudier les autres gènes exprimés spécifiquement dans ces cellules. Un candidat possible serait le gène codant pour *Gad67* qui est exprimé dans toutes les cellules de Purkinje et permettrait de confirmer que toutes les cellules n'expriment pas les gènes *Hox* puis il faudrait utiliser des marqueurs plus restreints. Joyner et Sillitoe (2007) ont montré la présence de bandes parasagittales se distinguant au niveau moléculaire par l'expression de gènes spécifiques tels que *Zebrine II* et *Hsp25* (Figure 51). Le gène *Zebrine II* est un marqueur d'autant plus intéressant qu'il a été mis en évidence récemment qu'il serait régulé par *Hoxb1* (voir ci-après).

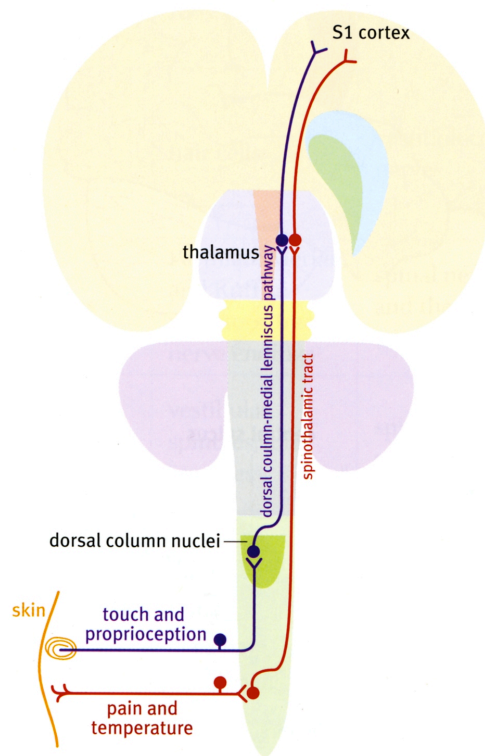


Fig. 52 : Les deux grands types de voies sensorielles : voie du lemni-que médian (violette) et voie spino-thalamique (rouge). La voie du lemni-que médian conduit les informations de proprioception par des faisceaux de fibres regroupant les axones des neurones des noyaux des colonnes dorsales (le lemni-que médian). Les faisceaux vont traverser le bulbe, le pont, le mésencéphale afin de faire relais au niveau des noyaux ventraux postéro-latéraux et postéro-médians du thalamus. Ensuite ce sont ces noyaux du thalamus qui conduisent les informations de proprioception jusqu'au cortex somatosensoriel (couche IV). La voie spino-thalamique conduit elle les informations relatives à la douleur et à la température. Pour cela, elle rejoint le bulbe, traverse le pont et le mésencéphale, près des fibres du lemni-que médian mais n'y fait pas synapse, avant d'atteindre les noyaux postéro-latéraux du thalamus puis la couche IV du cortex somatosensoriel. (Watson *et al.*, 2010)

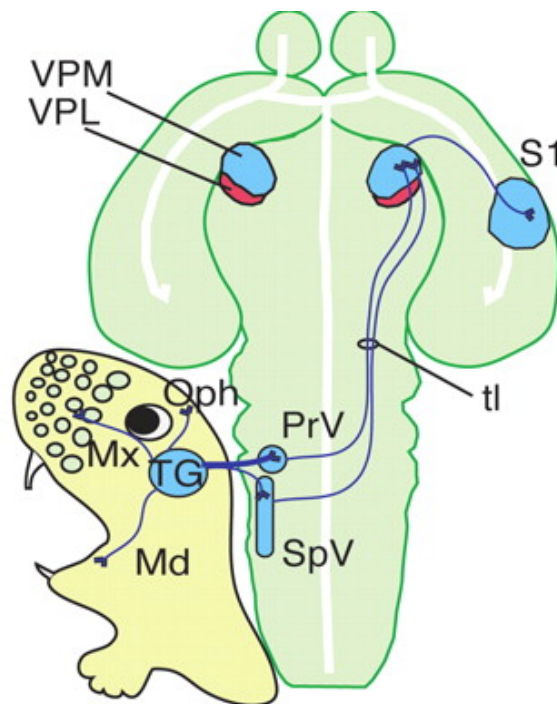


Fig. 53 : Voie trijéminal sensorielle. Cette voie transporte les information afférents relatives à la face du ganglion trijumeau. L'information entre dans la moelle allongée au niveau des noyaux sensoriels du trijumeau (PrV et SpV); elle est ensuite transmise au thalamus (noyaux ventro-postérieurs médians et latéraux) et au cortex somatosensoriel. (Oury *et al.*, 2006)

4. FONCTIONS DES GENES *HOX* DANS LE SNC ADULTE

4.1. LES VOIES SENSORIELLES

L'analyse des patrons d'expression nous laisse penser que ces 3 gènes pourraient être impliqués dans des voies sensorielles.

Il existe deux grands types de voies sensorielles allant de la moelle épinière au cortex et faisant relais par le thalamus, celle des colonnes dorsales et du lemnisque médian et la voie spino-thalamique. La première transmet les informations de proprioception alors que la seconde transmet la douleur et la température (Watson *et al.*, 2010 ; Figure 52). En effet, les informations propres à la proprioception arrivent de tout le corps, les axones des neurones des noyaux des colonnes dorsales vont se retrouver dans un faisceau de fibres denses appelé le lemnisque médian. Celui-ci traverse le bulbe, le pont, et le mésencéphale pour que ses axones se terminent dans le centre relais qu'est le thalamus. Ici ce sont les noyaux ventraux postéro-latéraux et postéro-médians du thalamus qui vont faire relais et conduire les informations sensorielles jusqu'à la couche IV du cortex somatosensoriel. La voie spino-thalamique rejoint le bulbe, traverse le pont et le mésencéphale près des fibres du lemnisque médian mais n'y font pas de synapses avant d'atteindre également les noyaux ventraux postéro-latéraux du thalamus et le cortex somatosensoriel.

Les gènes *Hox* pourraient également être impliqués dans la voie trigéminal sensorielle transportant les informations afférentes relatives à la face. Du ganglion trijumeau, l'information pénètre dans le cerveau au niveau de la moelle allongée, plus précisément au niveau des noyaux sensoriels du trijumeau. L'information est ensuite transmise au thalamus, au niveau des noyaux ventro-postérieurs médians et latéraux avant de rejoindre le cortex somatosensoriel (Figure 53).

Cette voie est la seule pour laquelle une fonction tardive d'un gène *Hox*, *Hoxa2*, a déjà été mise en évidence (Oury *et al.*, 2006). *Hoxa2* jouerait trois rôles. Le premier lors du développement embryonnaire : il est exprimé dans r2 et est critique pour son identité ; les embryons KO présentent une perte d'identité de r2 qui devient semblable au r1. La seconde fonction plus tardive d'*Hoxa2* dans les neurones sensoriels du trijumeau serait l'organisation et l'arborisation des afférences venant des ganglions trijumeaux au niveau du premier relais dans la moelle allongée (au niveau des noyaux sensoriels du trijumeau). Enfin *Hoxa2* serait impliqué les projections topographiques des axones au niveau du second relais dans le

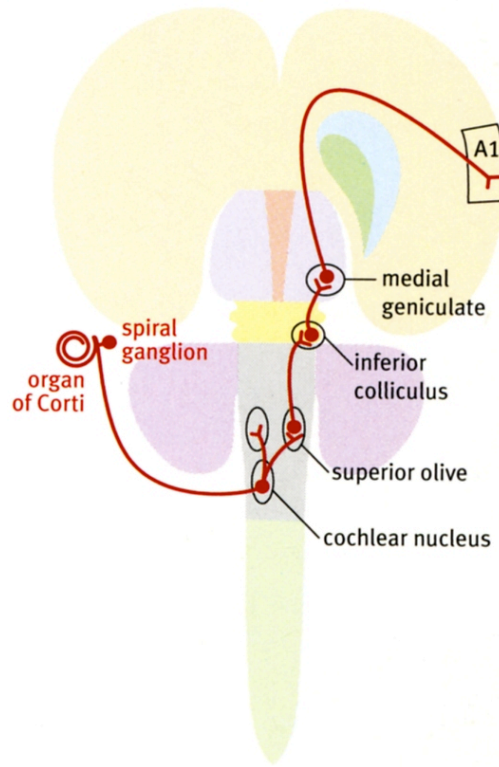


Fig. 54 : Voie auditive. Cette voie conduit les informations depuis les ganglions spiraux vers les noyaux cochléaires, l'olive supérieure, les colliculi inférieurs et enfin fait un relais au niveau des noyaux genouillés médians avant de projeter sur le cortex auditif. (Watson *et al.*, 2010)

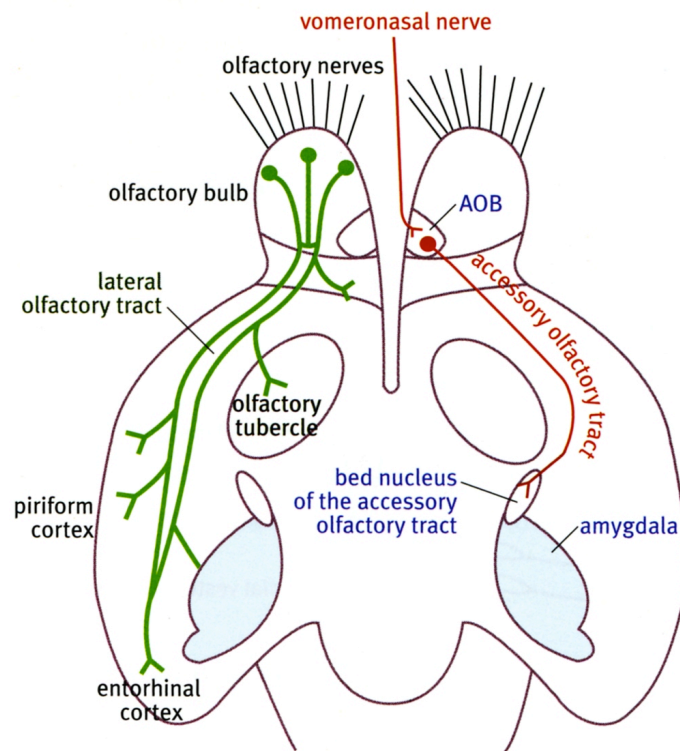


Fig. 55 : Voies olfactives. Chez les animaux 2 voies olfactives coexistent. L'une "principale" (verte) qui met notamment en jeu les bulbes olfactifs et le cortex piriforme et l'autre "accessoire" impliquée dans la détection des phéromones (rouge) et qui met en jeu l'amygdale. (Watson *et al.*, 2010)

thalamus. Les acteurs en aval d'*Hoxa2* pourraient appartenir aux familles des molécules de guidance axonale : Slit/Robo ou Ephrine/Eph.

En ce qui concerne les autres voies sensorielles, ces gènes pourraient être impliqués dans la voie auditive. En effet, nous observons du marquage au niveau des noyaux cochléaires, des noyaux genouillés médians ainsi que dans le cortex auditif qui sont des zones caractéristiques de la voie auditive (Figure 54).

Ils pourraient également être impliqués dans la vision. Du marquage est bien observé au niveau des noyaux genouillés latéraux ainsi que dans le cortex visuel. Dans cette voie les informations sont donc transmises de la rétine au corps latéraux genouillés du thalamus puis au cortex visuel.

Enfin, une implication dans la voie olfactive pourrait également être envisagée. En effet, de l'expression est détectée par RT-qPCR dans les bulbes olfactifs pour *Hoxb1* et *Hoxb3*. En HIS le bruit de fond artéfactuel dans les bulbes olfactifs n'a pas permis de conclure à la présence d'un signal significatif, mais l'expression ne peut pas être exclue. Par contre, nous détectons du marquage significatif dans la couche 2 du cortex piriforme ou olfactif ainsi que dans l'amygdale. Chez les animaux il existe deux voies sensorielles, l'une "normale" et l'autre intervenant dans la détection des phéromones. L'amygdale intervient uniquement dans le second système olfactif propre à certains mammifères et provoque en réponse aux phéromones des changements de comportement (Figure 55).

Finalement, les gènes *Hox* pourraient également intervenir dans le contrôle descendant de la nociception consistant en l'élimination des sensations de douleurs par le stress ou des émotions fortes. Cette voie implique un zone de neurones du mésencéphale : la substance grise périaqueducale qui projette vers des noyaux bulbaires tels que les noyaux du raphé. Ces deux populations neuronales expriment *Hoxb1*, *b3* et *b4*. Certains neurones bulbaires réalisent des projections vers les colonnes dorsales de la moelle épinière afin de réduire la douleur en réduisant l'activité des neurones nociceptifs (Figure 56, page suivante).

4.2. LES VOIES MOTRICES

Lors de l'analyse des territoires d'expression de nos trois gènes d'intérêt certains territoires impliqués dans les voies motrices sont également apparus comme marqués. En effet, du marquage est détecté dans les noyaux pré-cérébelleux (notamment la matière grise du pont et l'olive inférieure), les noyaux profonds du cervelet, et enfin les cellules de Purkinje. Ces circuits sont impliqués dans le contrôle du mouvement en corrigeant les erreurs entre les mouvements prévus et ceux réellement effectués. Pour cela, le cervelet reçoit et renvoie des

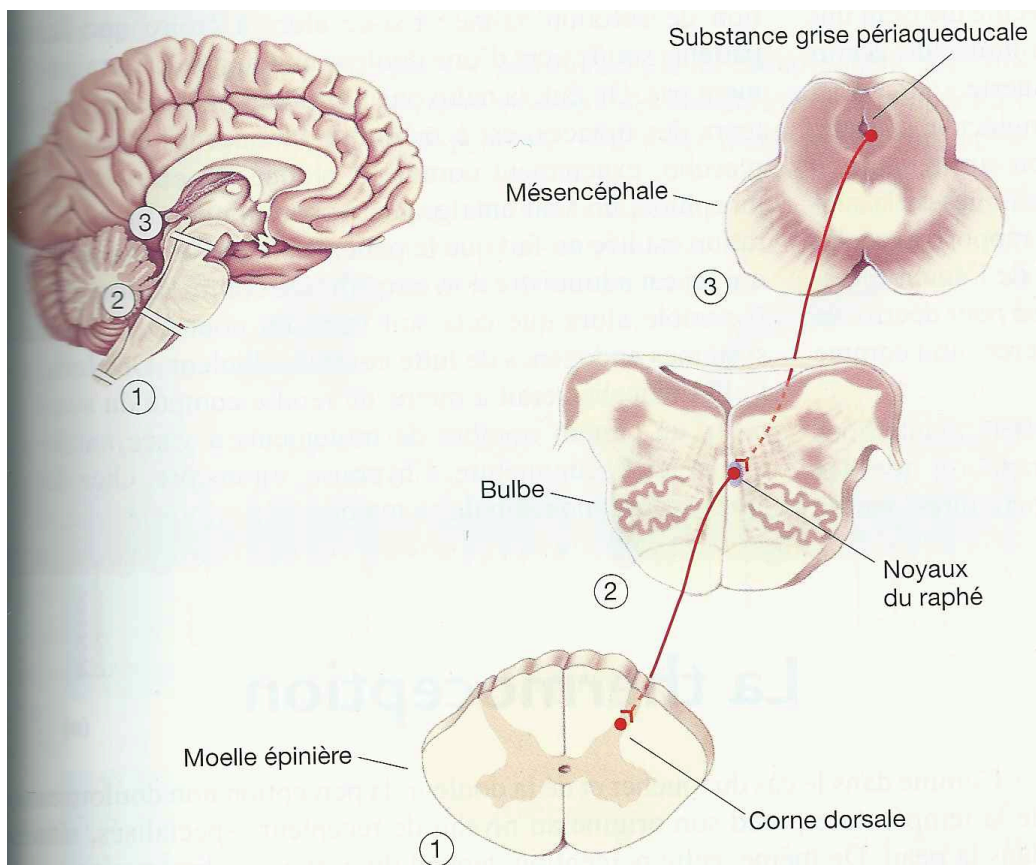


Fig. 56 : Contrôle descendant de la nociception. Cette voie est impliquée dans l'élimination des sensations de douleur par le stress ou des émotions fortes. Elle implique le mésencéphale, plus particulièrement la substance grise périaqueducale (PAG) projetant sur les noyaux bulbaires tels que ceux du raphé projetant à leur tour vers les colonnes dorsales de la moelle épinière.
(Bear *et al.*, 2006)

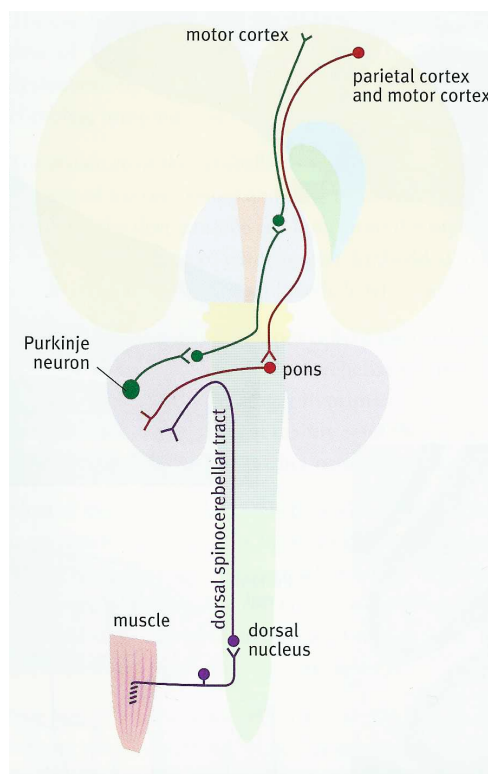


Fig. 57 : Voies afférentes (violette et rouge) et efférentes (verte) du cervelet. La voie efférente implique les neurones du cortex cérébelleux qui projettent depuis les cellules de Purkinje vers les noyaux profonds du cervelet faisant eux-mêmes relais sur les noyaux ventro-latéraux et postéro-latéraux du thalamus projetant dès lors au niveau du cortex. Par ailleurs, 2 types de voies afférentes faisant relais au niveau des noyaux pré-cérébelleux sont observées : l'une conduit les informations provenant du cortex jusqu'aux cellules de Purkinje en réalisant un relais au niveau du pont alors que l'autre conduit des informations issues des muscles jusqu'aux cellules de Purkinje via l'olive inférieure.
(Watson *et al.*, 2010)

informations via différentes voies.

Les neurones efférents du cortex cérébelleux projettent depuis les cellules de Purkinje vers les noyaux profonds du cervelet qui projettent à leur tour sur deux structures différentes. D'une part sur les noyaux ventrolatéraux et postérolatéraux du thalamus projetant ensuite sur le cortex et d'autre part sur les noyaux rouges, vestibulaires et la formation réticulée. Les voies afférentes quant à elles rejoignent les cellules de Purkinje en faisant soit relais au préalable par le pont soit en arrivant directement de l'olive inférieure (fibres grimpantes intégrant les informations de proprioception musculaire) (Figure 57). Il est assez remarquable que l'ensemble de ces noyaux expriment les trois gènes *Hox* étudiés dans ce travail.

4.3. FONCTIONS BIOLOGIQUES DES GENES HOX

Dans le pont/moelle allongée et dans les territoires qui sont antérieurs les gènes *Hox* n'ont peut être pas les mêmes fonctions. En effet, dans le pont et les territoires postérieurs les ARNm des gènes *Hoxb1*, *b3* et *b4* sont présents à P7 alors qu'ils ne sont détectés qu'à partir de P14 dans les territoires antérieurs au pont. Ces données sont en accord avec les données obtenues en parallèle à ce travail pour *Hoxa5* (mémoire Diane Bissen). En effet, l'expression d'*Hoxa5* est détectée dans le pont dès 16,5dpc et dans la moelle allongée dès 12,5dpc.

Les processus de développement et de maturation se déroulant dans le cerveau à ces 2 périodes sont bien distincts. Les neurones du pont sont des neurones migrants de la lèvre rhombique caudale entre 14,5 et 16,5dpc (Geisen *et al.*, 2008). L'expression détectée à P7 au niveau du pont ne serait donc pas due à une néoactivation mais à une migration des cellules d'origine plus caudale exprimant les gènes *Hox*. Dans ce processus, les gènes *Hox* pourraient être impliqués dans la migration. Il a en effet été montré qu'*Hoxa2* était impliqué dans la migration des neurones du pont via la voie Slit/Robo (Geisen *et al.*, 2008). En effet, *Hoxa2* et *Hoxb2* seraient nécessaires dans le maintien d'une migration normale des neurones du pont vers le cervelet selon l'axe rostro-caudal en empêchant leur attraction prématurée sur la face ventrale. Il a ainsi été démontré que Robo2 est une cible directe d'*Hoxa2*. Ce récepteur intervient dans le guidage cellulaire, notamment dans les voies de répulsion par liaison à son ligand Slit2, lui-même sécrété par les noyaux moteurs faciaux. Il serait intéressant de rechercher si des gènes codant pour des acteurs de la migration neuronale sont des cibles de nos trois gènes *Hox* (voir section suivante).

Par contre, l'expression des nos trois gènes est détectée aux alentours de P14 dans le cortex et le thalamus. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées quant à la régulation de l'expression

dans les nouveaux territoires. En effet, l'AR pourrait activer l'expression des gènes *Hoxb1* et *b4* car ils possèdent la séquence RARE. De plus, les enzymes impliquées dans la synthèse de l'AR (Raldh) ont été détectées dans les méninges où elles interviendraient dans la neurogénèse (Siegenthaler *et al.*, 2009). Les récepteurs RAR sur lesquels se lie l'AR afin d'activer la transcription des gènes cibles dans le noyau sont également exprimés dans le système nerveux et même le cerveau adulte. Des protéines telles que Krox20, Kreisler ou encore celles de la famille Pbx et Meis, régulateurs connus des gènes *Hox* pendant la période embryonnaire, pourraient intervenir. Dans un premier temps il serait donc intéressant de vérifier la présence de ces molécules aux stades tardis. Enfin, une hypothèse, déjà décrite pour les homéoprotéines, faisant intervenir une néoactivation peut être exposée. Cette hypothèse s'insère dans le fait que l'on trouve l'expression des gènes *Hox* le long des circuits sensoriels comme nous l'avons décrit ci-dessus et ceci à tous les niveaux relais. Les neurones afférents feraient donc synapses au niveau de leurs neurones cibles puis une fois les synapses réalisées une induction de l'expression de l'expression des mêmes gènes dans les neurones post-synaptiques seraient induite. Les protéines pourraient passer d'une synapse à l'autre, comme cela a été montré pour Engrailed 1 (Joshi *et al.*, 2011) et Engrailed 2 (Brunet *et al.*, 2005), deux autres homéoprotéines. Puis ces protéines activeraient leur propre expression ou celles des autres gènes *Hox* dans les cellules post-synaptiques. En effet, il a été montré qu'*Hoxb1* et *Hoxb4* étaient capables d'autorégulation. Enfin, l'expression d'*Hoxb3* quant à elle ne peut pas s'autoréguler mais peut être régulée par *Hoxb4*. (Tümpel *et al.*, 2009 ; Wong *et al.*, 2011). Cette voie est attrayante, mais reste à ce stade purement spéculative.

Contrairement à ce qui est décrit pour le pont, l'expression tardive des gènes *Hox* vers P14, à des stades postérieurs à la migration des neurones corticaux, suggèrent plutôt un rôle dans l'établissement des circuits neuronaux ou dans le fonctionnement des neurones. Pour les projections thalamo-corticales, l'étape de croissance axonale et de sélection des neurones cibles est terminées (Mann *et al.*, 2002). Les gènes *Hox* apparaissent donc plutôt aux stades de raffinement des connexions. Ils pourraient à ce moment là intervenir dans la mise en place des cartes topographiques dans le cortex somatosensoriel. Comme nous l'avons cité dans l'introduction (partie 1.1.3.), cette fonction a été démontré par Oury à des stades plus précoces (entre P0 et P4) et au niveau du thalamus mais a également été proposée par Daesen dans l'établissement des projections topographiques vers les muscles (les gènes *Hox* interviendraient ici par l'intermédiaire du facteur de transcription Fox1P). Ces fonctions pourraient se poursuivre plus tardivement notamment au niveau du cortex. De plus, selon

Oury ces actions pourraient impliquer les éphrines et leurs récepteurs qui sont des cibles directes d'*Hoxa2* et *b2*. Enfin, la détection des éphrines et leurs récepteurs dans le cortex a été montrée par Mann (2002) et Pietri (2011) et renforce cette hypothèse.

4.4. ETUDE DES CIBLES POTENTIELLES

Si les hypothèses émises ci-dessus sont correctes, on pourrait s'attendre à ce que les gènes *Hox* régulent l'expression de gènes codant pour des acteurs de la migration cellulaire, de la croissance axonale, de la neuritogenèse ou encore de la synaptogenèse. Bien que peu de cibles directes aient été démontrées pour les gènes *Hox*, certaines cibles répondent à ces critères.

Ainsi certaines éphrines et leurs récepteurs, connus pour être impliqués dans les processus décrits ci-dessus sont des cibles des gènes *Hox*. Par exemple *EphA2* est directement régulé par *Hoxb1* (Akin & Nazarali, 2004) mais également *Hoxa1* dans le rhombencéphale (Chen & Ruley, 1998), *EphA5* est quant à lui impliqué dans le branchement et la mise en place de connexions thalamocorticales (Mann *et al.*, 2002), enfin *EphA7* est une cible directe de *Pbx1* qui est un cofacteur entre autre des gènes *Hoxb1* et *Hoxb4* (Pietri *et al.*, 2011).

A côté de cette famille, certaines cibles d'*Hoxb1* appartiennent à la famille des gènes à homéoboite : *Phox2b*, *Hoxb2* et *Hoxb1*, car ce dernier est capable d'autorégulation, comme mentionné précédemment (Gouti & Gavalas, 2008).

Plus récemment, d'autres cibles ont été identifiées dans un modèle cellulaire embryonnaire (Bami *et al.*, 2011). Parmi ces nombreuses cibles quelques gènes nous paraissent intéressants. Ils s'agit tout d'abord de *Gabrg1* et *Slc18a3* étant tous deux impliqués dans les fonctions neuronales. Le premier intervenant dans la signalisation GABAergique (codant pour un récepteur du GABA) et le second intervenant dans le transport vésiculaire de l'acétylcholine et donc impliqué au niveau des neurones cholinergiques. Le second groupe identifié et certainement le plus intéressant comprend les gènes *Aldoc* et *Cbln1* codant respectivement pour l'aldolase C mieux connue sous le nom de *Zebrine II* qui est impliqué dans le patterning en bandes parasagittales observé dans le cervelet ainsi qu'un précurseur de la cérébelline impliquée dans la formation et le maintien des synapses entre les cellules de la couche granulaire et le cellules de Purkinje. Ce groupe de gènes est donc impliqué dans le patterning et la synaptogenèse dans le cervelet. Enfin, *claudin11* est également une cible potentielle d'*Hoxb1* et code pour des protéines présentes dans le SNC et importantes dans la prolifération et la migration des oligodendrocytes.

Comparativement aux études des cibles potentielles d'*Hoxb1* et *Hoxb4* un nombre très limité d'étude existe pour *Hoxb3*. Parmi ses cibles potentielles nous retrouvons cependant le gène *Nkx2-1* (aussi connu sous le nom de thyroid transcription factor 1) qui est un facteur de transcription au niveau de la thyroïde est qui joue des rôles importants dans le développement du télencéphale (Guazzi *et al.*, 1994). Une autre cible connue d'*Hoxb3* n'est autre qu'*Hoxb1* dont l'expression est négativement régulée par *Hoxb3* (Wong *et al.*, 2011).

Ces dernières années des études de transcriptomique à grande échelle se sont multipliées. En 2011, une étude de ce type a été menée sur des cellules progénitrices hématopoïétiques issues des cellules souches embryonnaires de souris. A partir de cette étude, 16000 gènes cibles d'*Hoxb4* ont été identifiés (Oshima *et al.*, 2011). Parmi les gènes fortement activés certains nous semblent intéressants dans le cadre de nos résultats. Tout d'abord, *Sox4* qui est un gène impliqué dans la corticogenèse et la différenciation des cellules neuronales et gliales. *Ptch1* est une seconde cible ; ce gène code pour le récepteur de sonic hedgehog, une molécule impliquée au niveau du cervelet dans la prolifération des neurones précurseurs de la couche granulaire. Dans le cerveau adulte *Ptch1* est exprimé dans le cervelet et plus précisément dans la couche de cellules de Purkinje. Finalement, *Robo2* est également une cible d'*Hoxb4*. Comme mentionné ci-dessus, ce gène cible de *Hoxa2* est impliqué dans la migration des neurones du pont et pourrait être impliqué dans d'autres étapes de migration neuronale ou de croissance axonale. Un autre gène cible ayant une fonction dans la migration neuronale ou la croissance axonale et pourquoi pas dans des fonctions tardives est *celsr1* codant pour une cadhérine. Parmi les gènes moins fortement régulés certains nous sont apparus intéressants. Les gènes des récepteurs *EphA* et *EphB* sont en général réprimés, sauf *Ephb6* ; c'est également le cas pour les cadhérines, certaines sont activées comme *Cdh17* et *Cdh2* alors que d'autres sont réprimées : *Cdh5* et *Cdh11*. Enfin le gène *claudine11* est également réprimé par *Hoxb4* alors qu'il est activé par *Hoxb1* (Jiang *et al.*, 2010).

5. CONCLUSIONS

Grâce à l'utilisation de plusieurs méthodes d'études (RT-qPCR, HIS, IHC), ce travail nous a permis de montrer que certains gènes *Hox* sont toujours exprimés aux stades adultes et qu'ils le sont même dans des territoires où ils n'étaient pas détectés aux stades embryonnaires. En effet, la présence des transcrits mais également des protéines *Hox* a été mise en évidence dans des territoires du cerveau antérieur chez des souris de fond génétique C57BL6/J adulte.

Un protocole de localisation des protéines par IHC a également été développé. Ceci nous permet aujourd'hui d'étudier les protéines Hox en plus des transcrits. Ainsi, des études de colocalisation dans le but d'affiner et de préciser le plus possible les patrons décrits ici pourront être réalisées par deux méthodes différentes que sont l'HIS et l'IHC.

A ce stade, les données d'hybridation aux stades postnataux restent cependant à confirmer, et serait intéressant de les confirmer également par des études quantitatives en RT-qPCR réalisées aux mêmes stades postnataux.

Finalement, une des perspectives de ce travail consisterait en la reproduction et la confirmation des étapes délicates sur lesquelles les hypothèses fonctionnelles se basent. Il s'agirait de déterminer précisément la dynamique d'apparition de l'expression de ces gènes aux stades postnataux, mais également d'affiner les patrons d'expression de chaque gène et enfin d'identifier précisément les territoires et population cellulaires exprimant ces gènes dans les différentes parties du cerveau. Ceci, par l'utilisation des marqueurs de population présentés dans la discussion.

L'étude de souris présentant des mutations conditionnelles (dont un gène serait inactivé à différents moments du développement) permettrait également de préciser les rôles putatifs de ces gènes dans le SNC.

VI. Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
<i>Ant-C</i>	<i>Antennapedia</i>
A-P	Antéro-postérieur
APS	Ammonium Persulfate
AR	Acide rétinoïque
Arg	Arginine
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messagé
Asn	Asparagine
AT	Zone de l'ADN riche en Adénosine et en Thymine
BCA	Acide bicinchoninique
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Bovine Serum Albumine
BPP	Bleu de Bromophénol
<i>Bx-C</i>	<i>Bithorax</i>
Cq	Cuantitativ Cycle
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phénylindole
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
DTT	Dithiothréitol
dUTP	2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate
dpc	Day Post Coïtum
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EPh	Récepteurs aux Ephrines
FGF	Fibroblasts Growth Factor
FITC	Isothiocyanate de Fluorescéine
GABA	Acide γ Aminobutyrique
Gad67	Glutamate décarboxylase, enzyme de synthèse du GABA
Gln	Glutamine
IHC	Immunohistochimie

HIS	Hybridation <i>In Situ</i>
HIS-WM	Hybridation <i>In Situ</i> en Whole-Mount
HRP	Horseradish Peroxidase
Ile	Isoleucine
KO	Knock-Out
MAB	Maleic Acid Buffer
Met	Méthionine
NBT	Bleu de Nitro Tétrazolium
P“X”	X jour(s) après la naissance. P signifie ici postnatal
PBS	Phosphate Buffer Saline
PFA	Paraformaldéhyde
PVA	Polyvinyle Alcool
RAR	Retinoic Acid Receptor
RARE	Retinoic Acid Response Element
REG	Réticulum Endoplasmique Rugueux
rpm	Rotation Par Minute
RT-qPCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
r“X”	Rhombomère X
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SSC	Saline-Sodium Citrate buffer
TBE	Tris, acide Borique, EDTA
TBS	Tris-Buffer Saline
TEA	Triethanolamine
TEMED	N,N,N', N' Tétraléthyléthylènediamine
UTP-Dig	Uraciles marqués à la digoxygénine

VII. Bibliographie

- Alexander, T., Nolte, C., and Krumlauf, R. (2009). Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 431–456.
- Akin, Z. N., and Nazarali, A. J. (2005). Hox genes and their candidate downstream targets in the developing central nervous system. *Cellular and molecular neurobiology* 25, 697–741.
- Arenkiel, B. R., Tvrdik, P., Gaufo, G. O., and Capecchi, M. R. (2004). Hoxb1 functions in both motoneurons and in tissues of the periphery to establish and maintain the proper neuronal circuitry. *Genes & development* 18, 1539–1552.
- Bami, M., Episkopou, V., Gavalas, A., and Gouti, M. (2011). Directed neural differentiation of mouse embryonic stem cells is a sensitive system for the identification of novel hox gene effectors. *PLoS one* 6, e20197.
- Bear, M.-F., Connors, B. W., and Paradiso (2006). *Neurosciences : A la découverte du cerveau*
- Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., Prochiantz, A., and Holt, C. (2005). The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 438, 94–98.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55, 611–622.
- Chen, J., and Ruley, H. E. (1998). An enhancer element in the EphA2 (Eck) gene sufficient for rhombomere-specific expression is activated by HOXA1 and HOXB1 homeobox proteins. *The Journal of biological chemistry* 273, 24670–24675.
- Chotteau-Lelièvre, A., Dollé, P., and Gofflot, F. (2006). Expression analysis of murine genes using in situ hybridization with radioactive and nonradioactively labeled RNA probes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 326, 61–87.
- Clascá, F., Angelucci, a, and Sur, M. (1995). Layer-specific programs of development in neocortical projection neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11145–11149.
- Dasen, J. S., De Camilli, A., Wang, B., Tucker, P. W., and Jessell, T. M. (2008). Hox repertoires for motor neuron diversity and connectivity gated by a single accessory factor, FoxP1. *Cell* 134, 304–316.
- Deschamps, J., van den Akker, E., Forlani, S., De Graaff, W., Oosterveen, T., Roelen, B., and Roelfsema, J. (1999). Initiation, establishment and maintenance of Hox gene expression patterns in the mouse. *The International journal of developmental biology* 43, 635–650.
- Deschamps, J., and van Nes, J. (2005). Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development (Cambridge, England)* 132, 2931–2942.
- Di Rocco, G., Gavalas, a, Popperl, H., Krumlauf, R., Mavilio, F., and Zappavigna, V. (2001). The recruitment of SOX/OCT complexes and the differential activity of HOXA1 and HOXB1 modulate the Hoxb1 auto-regulatory enhancer function. *The Journal of biological chemistry* 276, 20506–20515.
- Ekker, S. C., Young, K. E., Kessler, D. P. V., and Beachy, P. A. (1991). Optimal DNA. *EMBO Journal* 10.
- Favier, B., and Dollé, P. (1997). Developmental functions of mammalian Hox genes. *Molecular human reproduction* 3, 115–131.

- Gammill, L. S., and Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature reviews. Neuroscience* 4, 795–805.
- Gaufo, G. O., Flodby, P., and Capecchi, M. R. (2000). Hoxb1 controls effectors of sonic hedgehog and Mash1 signaling pathways. *Development (Cambridge, England)* 127, 5343–5354.
- Gaufo, G. O., Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (2003). Hox3 genes coordinate mechanisms of genetic suppression and activation in the generation of branchial and somatic motoneurons. *Development (Cambridge, England)* 130, 5191–5201.
- Gavalas, a, Davenne, M., Lumsden, a, Chambon, P., and Rijli, F. M. (1997). Role of Hoxa-2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development (Cambridge, England)* 124, 3693–3702.
- Gavalas, A., Ruhrberg, C., Livet, J., Henderson, C. E., and Krumlauf, R. (2003). Neuronal defects in the hindbrain of Hoxa1, Hoxb1 and Hoxb2 mutants reflect regulatory interactions among these Hox genes. *Development (Cambridge, England)* 130, 5663–5679.
- Gehring, W. J. (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science (New York, N.Y.)* 236, 1245–1252.
- Gehring, W. J., Müller, M., Affolter, M., Percival-Smith, A., Billeter, M., Qian, Y. Q., Otting, G., and Wüthrich, K. (1990). The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends in genetics : TIG* 6, 323–329.
- Gehring, W. J., Qian, Y. Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A. F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., and Wüthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211–223.
- Geisen, M. J., Di Meglio, T., Pasqualetti, M., Ducret, S., Brunet, J.-F., Chedotal, A., and Rijli, F. M. (2008). Hox paralog group 2 genes control the migration of mouse pontine neurons through slit-robo signaling. *PLoS biology* 6, e142.
- Gould, A., Morrison, A., Sproat, G., White, R. A., and Krumlauf, R. (1997). Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping Hox expression patterns. *Genes & development* 11, 900–913.
- Gouti, M., and Gavalas, A. (2008). Hoxb1 controls cell fate specification and proliferative capacity of neural stem and progenitor cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26, 1985–1997.
- Guazzi, S., Lonigro, R., Pintonello, L., Boncinelli, E., Di Lauro, R., and Mavilio, F. (1994). The thyroid transcription factor-1 gene is a candidate target for regulation by Hox proteins. *The EMBO journal* 13, 3339–3347.
- Jiang, J., Yu, H., Shou, Y., Neale, G., Zhou, S., Lu, T., and Sorrentino, B. P. (2010). Hemgn is a direct transcriptional target of HOXB4 and induces expansion of murine myeloid progenitor cells. *Blood* 116, 711–719.
- Jones, E. G. (1998). COMMENTARY VIEWPOINT : THE CORE AND MATRIX OF THALAMIC. *Science* 85, 331–345.
- Joshi, R. L., Torero Ibad, R., Rhee, J., Castagner, F., Prochiantz, A., and Moya, K. L. (2011). Cell non-autonomous functions of homeoproteins in neuroprotection in the brain. *FEBS letters* 585, 1573–1578.
- Kiecker, C., and Lumsden, A. (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nature reviews. Neuroscience* 6, 553–564.

- Ko, K.-H., Lam, Q. L. K., Zhang, M., Wong, C. K. Y., Lo, C. K. C., Kahmeyer-Gabbe, M., Tsang, W. H., Tsang, S. L., Chan, L. C., Sham, M. H., et al. (2007). Hoxb3 deficiency impairs B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Experimental hematology* 35, 465–475.
- Kobrossy, L., Rastegar, M., and Featherstone, M. (2006). Interplay between chromatin and trans-acting factors regulating the Hoxd4 promoter during neural differentiation. *The Journal of biological chemistry* 281, 25926–25939.
- Lappin, T. R. J., Grier, D. G., Thompson, A., and Halliday, H. L. (2006). HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *The Ulster medical journal* 75, 23–31.
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–570.
- Maconochie, M., Nonchev, S., Morrison, A., and Krumlauf, R. (1996). Paralogous Hox genes: function and regulation. *Annual review of genetics* 30, 529–556.
- McNulty, C. L., Peres, J. N., Bardine, N., van den Akker, W. M. R., and Durston, A. J. (2005). Knockdown of the complete Hox paralogous group 1 leads to dramatic hindbrain and neural crest defects. *Development (Cambridge, England)* 132, 2861–2871.
- Manley, N. R., and Capecchi, M. R. (1997). Hox group 3 paralogous genes act synergistically in the formation of somitic and neural crest-derived structures. *Developmental biology* 192, 274–288.
- Manley, N. R., and Capecchi, M. R. (1998). Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Developmental biology* 195, 1–15.
- Manley, N. R., Barrow, J. R., Zhang, T., and Capecchi, M. R. (2001). Hoxb2 and hoxb4 act together to specify ventral body wall formation. *Developmental biology* 237, 130–144.
- Mann, F., Peuckert, C., Dehner, F., Zhou, R., and Bolz, J. (2002). Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development (Cambridge, England)* 129, 3945–3955.
- Marshall, H., Studer, M., Pöpperl, H., Aparicio, S., Kuroiwa, a, Brenner, S., and Krumlauf, R. (1994). A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. *Nature* 370, 567–571.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L., and Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience* 8, 427–437.
- Morrison, A., Ariza-McNaughton, L., Gould, A., Featherstone, M., and Krumlauf, R. (1997). HOXD4 and regulation of the group 4 paralog genes. *Development (Cambridge, England)* 124, 3135–3146.
- Narita, Y., and Rijli, F. M. (2009). Hox genes in neural patterning and circuit formation in the mouse hindbrain. 1st ed. (Elsevier Inc.)
- Nicolay, D. J., Doucette, J. R., and Nazarali, A. J. (2004). Hoxb4 in oligodendrogenesis. *Cellular and molecular neurobiology* 24, 357–366.
- Nolte, C., and Krumlauf, R. (2007). System of Vertebrates. BioScience.
- Noordermeer, D., Leleu, M., Splinter, E., Rougemont, J., De Laat, W., and Duboule, D. (2011). The Dynamic Architecture of Hox Gene Clusters. *Science* 334, 222–225.
- Ornitz, D. M., and Itoh, N. (2001). Protein family review Fibroblast growth factors. *Genome Biology*, 1–12.

- Oshima, M., Endoh, M., Endo, T. A., Toyoda, T., Nakajima-Takagi, Y., Sugiyama, F., Koseki, H., Kyba, M., Iwama, A., and Osawa, M. (2011). Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood* 117, e142–e150.
- Oury, F., Murakami, Y., Renaud, J.-S., Pasqualetti, M., Charnay, P., Ren, S.-Y., and Rijli, F. M. (2006). Hoxa2- and rhombomere-dependent development of the mouse facial somatosensory map. *Science (New York, N.Y.)* 313, 1408–1413.
- Pearson, J. C., Lemons, D., and McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature reviews. Genetics* 6, 893–904.
- Pietri, S., Dimidschstein, J., Tiberi, L., Sotiropoulou, P. A., Bilheu, A., Goffinet, A., Achouri, Y., Tissir, F., Blanpain, C., Jacquemin, P., et al. (2011). Transcriptional Mechanisms of EphA7 Gene Expression in the Developing Cerebral Cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*.
- Purves, Augustine, Fitzpatrick, Hall Lamantia, McNamara., Williams (2005). *Neurosciences*
- Roche Applied Science Technical Manual on ISH, from http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/index.jsp?id=techMan&pageid=/PROD_INF/MANUALS/InSitu/InSi_toc.htm
- Sanes, D., Red, AT., Harris, WA., (2011). *Development of the Nervous System*. Third edition
- Sanlioglu, S., Zhang, X., Baader, S. L., and Oberdick, J. (1998). Regulation of a Purkinje cell-specific promoter by homeodomain proteins: repression by engrailed-2 vs. synergistic activation by Hoxa5 and Hoxb7. *Journal of neurobiology* 36, 559–571.
- Schubert, D., Kötter, R., Luhmann, H. J., and Staiger, J. F. (2006). Morphology, electrophysiology and functional input connectivity of pyramidal neurons characterizes a genuine layer va in the primary somatosensory cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 16, 223–236.
- Siegenthaler, J. A., Ashique, A. M., Zarbali, K., Patterson, K. P., Hecht, J. H., Kane, M. A., Folias, A. E., Choe, Y., May, S. R., Kume, T., et al. (2009). Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell* 139, 597–609.
- Sillitoe, R. V., and Joyner, A. L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annual review of cell and developmental biology* 23, 549–577.
- Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A., and Krumlauf, R. (1996). Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature* 384, 630–634.
- Su, D., Ellis, S., Napier, A., Lee, K., and Manley, N. R. (2001). Hoxa3 and pax1 regulate epithelial cell death and proliferation during thymus and parathyroid organogenesis. *Developmental biology* 236, 316–329.
- Takahashi, Y., Hamada, J.-ichi, Murakawa, K., Takada, M., Tada, M., Nogami, I., Hayashi, N., Nakamori, S., Monden, M., Miyamoto, M., et al. (2004). Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. *Experimental Cell Research* 293, 144–153.

Tümpel, S., Wiedemann, L. M., and Krumlauf, R. (2009). Hox genes and segmentation of the vertebrate hindbrain. *Current topics in developmental biology* 88, 103–137.

Watson, Kirkcaldie and Paxinos. (2010). *The Brain: An Introduction to Functional Neuroanatomy*.

Wong, E. Y. M., Wang, X. A., Mak, S. S., Sae-Pang, J. J., Ling, K. W., Fritsch, B., and Sham, M. H. (2011). Hoxb3 negatively regulates Hoxb1 expression in mouse hindbrain patterning. *Developmental biology* 352, 382–392.

<http://empress.har.mrc.ac.uk/>

<http://miqe.gene-quantification.info/>

<http://mouse.brain-map.org/static/atlas>

<http://www.genepaint.org/Frameset.html>

Résumé

De nombreuses études sur les rôles des gènes *Hox* lors du développement embryonnaire ont été menées depuis la découverte des gènes homéotiques HOM chez la drosophile par Lewis en 1978. Comparativement, peu d'études se sont intéressées à leurs fonctions aux stades postnatals et adultes, notamment dans le système nerveux central. Cependant, des données récentes suggèrent que les gènes *Hox* seraient toujours exprimés dans le cerveau adulte. Dans ce contexte, les objectifs de ce mémoire sont de déterminer l'importance biologique et d'étudier les fonctions tardives des gènes *Hox* dans le SNC. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à 3 gènes *Hox* appartenant au cluster *HoxB* : *Hoxb1*, *Hoxb3* et *Hoxb4*. Une stratégie triple a été mise en place afin de caractériser l'expression cellulaire de ces 3 gènes dans le cerveau de souris de fond génétique C57BL6/J. L'étude par RT-qPCR dans 8 sous-régions de cerveaux de souris adultes a confirmé l'expression de ces 3 gènes dans le cerveau et pour certains d'entre eux dans des territoires antérieurs, c'est-à-dire le cortex et le thalamus. Une localisation neuro-anatomique des transcrits par hybridation *in situ* (HIS) a confirmé et précisé ces données. En effet, du signal a été observé dans les territoires antérieurs, dérivés du prosencéphale, tels que le cortex ou encore le thalamus, mais également dans des territoires issus du mésencéphale ou encore du rhombencéphale tels que les noyaux pré-cérébelleux, les cellules de Purkinje et des noyaux de la moelle allongée. Afin de déterminer la mise en place de ce patron d'expression, des HIS ont été réalisées chez des souris à 3 stades postnatals : P7, P14 et P21. Il semblerait que ce patron original se mette en place aux alentours de 14 jours après la naissance. Finalement, dans le but d'étudier prochainement les fonctions des gènes *Hox* chez les adultes un protocole d'immunohistochimie (IHC) a été mis au point. La détection des protéines en plus de celle des transcrits nous conforte donc dans l'intervention des gènes *Hox* à des stades plus tardifs que les stades embryonnaires. Les territoires de détections des protéines sont en accord avec le patron d'expression découvert.

Summary

Since 1978 and the discovery of homeotic genes in drosophila by Lewis, a lot of study were carried out during embryonic development in order to study the roles of *Hox* genes. In comparison, very few studies were carried out in order to determine their functions in adult and postnatal stages, especially in the central nervous system (CNS). However, recent data suggests that *Hox* genes are still expressed in adult brain. In this context, the aims of this master thesis are to determine the biological importance and to study the late functions of *Hox* genes in the CNS. More specifically, we focused on *Hox* genes belonging to the *HoxB* cluster: *Hoxb1*, *Hoxb3* and *Hoxb4*. A three-step strategy was performed in order to characterize the cellular expression of these genes, in C57BL6/J mice's brain. RT-qPCR analysis in 8 sub-regions of adult mice brains confirmed the expression of these 3 genes in brain and for some of them in anterior territories: the cortex and thalamus. Neuro-anatomical localization of transcripts using *in situ* hybridization (ISH) confirmed and expanded these data. Signal was observed in anterior territories like several cortex areas or thalamus. Labelling was also detected in the mesencephalon and rhombencephalon more precisely in precerebellar nuclei, Purkinje cells and medulla oblongata nuclei. In order to determine the establishment of this pattern, ISH at 3 postnatal stages were performed: P7, P14 and P21. This original and new pattern seems to set up around 14 days after birth. Finally, for further study of *Hox* genes functions in adults an immunohistochemistry (IHC) protocol was developed. Protein detection in addition of that of transcripts strengthens the hypothesis of a role for *Hox* genes in later stages of development. The territories in which proteins were observed are consistent with that of transcripts.