



HAL
open science

Rôle du facteur RFX3 dans la formation du cerveau chez l'embryon de souris

Carine Benadiba

► **To cite this version:**

Carine Benadiba. Rôle du facteur RFX3 dans la formation du cerveau chez l'embryon de souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT : . tel-00339137

HAL Id: tel-00339137

<https://theses.hal.science/tel-00339137>

Submitted on 17 Nov 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 192-2008
Année 2008

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE ET
CELLULAIRE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le **24 Octobre 2008**

par

Madame BENADIBA Carine Lucie

**TITRE : Rôle du facteur RFX3 dans la formation du
cerveau chez l'embryon de souris**

Directeur de thèse : **Mme DURAND Bénédicte**

**JURY : Mme DURAND Bénédicte
Mme CASTELLANI Valérie
Mme SCHNEIDER-MAUNOURY Sylvie
Mme LEBRAND Cécile
Mr ROBERT Benoît**

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire
Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX
M. le Professeur J. LIETO
M. le Professeur D. SIMON
M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche
UFR de Médecine Lyon-Nord
UFR de Médecine Lyon-Sud
UFR d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT
Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
Directeur : M. O. ROBIN
Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique
UFR de Biologie
UFR de Mécanique
UFR de Génie Electrique et des Procédés
UFR Sciences de la Terre
UFR de Mathématiques
UFR d'Informatique
UFR de Chimie Biochimie
UFR STAPS
Observatoire de Lyon
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon
IUT A
IUT B
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK
Directeur : M. le Professeur H. PINON
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : M. le Professeur G. CLERC
Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
Directeur : M. C. COLLIGNON
Directeur : M. le Professeur R. BACON
Directeur : M. le Professeur J. LIETO
Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

RESUME

RESUME en français

Les membres de la famille de facteur de transcription RFX sont extrêmement conservés au cours de l'évolution et sont retrouvés de la levure aux mammifères. Au sein de notre laboratoire, nous disposons d'un modèle murin *Rfx3*. Au cours de mon doctorat, j'ai entrepris d'analyser le phénotype cérébral de ce mutant. Il est ressorti de cette étude que les souris *Rfx3* présentent de multiples atteintes cérébrales au niveau de l'Organe Sous Commissural, de la Glande Pinéale, des Plexus Choroïdes et de la Commissure Postérieure. L'analyse de la formation du cerveau, chez ces mutants, a révélé qu'une mauvaise spécification de la ligne médiane dorsale du prosencéphale peut en être à l'origine. Comme RFX3, est un régulateur de la ciliogenèse, ces travaux supposent l'existence d'un nouveau rôle des cils dans la genèse cérébrale. Appuyant cette hypothèse, une des atteintes cérébrales classiquement rencontrées chez les patients souffrant de ciliopathies, qu'est l'agénésie callosale, est également retrouvée chez les mutants murins *Rfx3*. Et l'analyse de la région de formation du Corps Calleux, en contexte mutant, a mis en évidence des défauts cellulaires pouvant expliquer cette atteinte cérébrale majeure. L'ensemble des travaux réalisés sur ce modèle murin de ciliopathie permettent progressivement d'apporter des réponses essentielles quant aux mécanismes physiopathologiques des ciliopathies.

TITRE en anglais

Involvement of RFX3 transcription factor in mouse brain genesis

RESUME en anglais

Regulatory Factor X (RFX) transcription factors are conserved in wide range of species. We work on a murine model, that is inactivated for *Rfx3*. We show here that *Rfx3* deficient mice suffer from numerous brain defects as the abnormal development of the Choroid Plexuses, Sub-Commissural Organ, Pineal Gland and Posterior Commissure. And fine analysis, realized at early stages of embryonic development, reveals that these brain defects could be due to a mis-specification of the forebrain dorsal midline. As RFX3 is a ciliogenic regulator, these data support a new ciliogenic function in brain morphogenesis. Moreover, these mice suffer from accallosality, a classic ciliopathy phenotype. And a mis-localization of corticoseptal cells, involved in callosal guidance, could be explain this cerebral affection. Thus this work will bring new understandings of the physiopathological mechanisms of ciliopathies.

DISCIPLINE

Biologie du Développement, Neurologie

MOTS-CLES

RFX, Cil, Ciliopathies, cerveau, souris, Télencéphale, Diencephale, Corps Calleux, Commissure Hippocampique, Organe Sous Commissural, Glande Pinéale, Commissure Postérieure, Prosencéphale, Ligne médiane.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Centre de Génétique Cellulaire et Moléculaire,
UMR5534 Bâtiment Mendel, Université Claude Bernard Lyon 1
16, rue Raphaël Dubois
69622 Villeurbanne Cedex

REMERCIEMENTS

La première personne que je tiens à remercier c'est évidemment Bénédicte qui m'a donné l'opportunité de réaliser ce travail. Je tiens également à la remercier de m'avoir transmis une partie de son immense savoir faire.

Je souhaite également remercier mon Jury pour avoir accepté de juger ce travail et avoir su être extrêmement patient et compréhensif.

Je tiens à remercier Pierre Couble pour m'avoir si gentilement accueilli au sein du CGMC et avoir su être à l'écoute.

Je remercie évidemment tout le CGMC et le CTMu avec un pensée particulière pour Anneso, les Caro A et B, Cat, Sabine, Maryline, JX, Fred C, Odile, Manuella, Michelle, Géraldine, Marie-Hélène, Tony, Béatrice et tous ceux que j'oublie là maintenant mais à qui je pense bien sûr...

Je veux faire une spéciale dédicace à quatre équipes plus particulièrement :

En premier lieu la mienne : l'équipe Durand.

Merci à Jéré pour ses blagues fines, à JLD pour son Jocker ;-), à Zabeth pour sa gentillesse et sa générosité, à Guigui pour sa joie de vivre communicative, à Seb pour sa gentillesse et sa disponibilité, à Ryan parti trop vite, à Vivi, à Laurette pour sa gentillesse, sa patience et sa sagesse, à Anne pour son amitié précieuse, à Camille que j'aurai aimé connaître d'avantage, à Domi pour son aide indispensable (même si ce n'est plus techniquement une Durand) et à Joëlle pour sa joie de vivre et sa gentillesse.

A toute l'équipe Couble avec qui notre équipe partage tout ou presque :

Merci à Milie pour sa complicité, à Guiche pour nos duos, à Benjy pour ses railleries moqueuses, à Cécile et Tzvet pour nos déj sur le pouce.

A toute l'équipe Castellani pour m'avoir formée à différentes techniques et avoir su être là.

Merci à Homāi pour notre collaboration et complicité, à Mumu pour sa gentillesse et son aide précieuse, à Isa ma coloc et confidente, à Yohan pour sa gentillesse et son aide, à Julien pour avoir partagé son savoir, à Valérie pour sa générosité, sa gentillesse et son aide, et à Fred pour des tas de raisons trop longues à énumérer (mais qu'il sait déjà), un grand grand MERCI Fred.

A toute la clique Vaudoise pour leur grande gentillesse, leur générosité, et leur accueil.

Merci à Cécile pour ses encouragements, sa gentillesse, sa motivation communicative et sa religion la monotâchie à laquelle je souhaite me convertir, à Jean-Pierre pour son immense savoir qu'il sait partager, pour ses bon petits plats et pour nos soirées passées à refaire le monde, à Mathieu pour son extrême bonté et sa disponibilité, à Belkacem, à Delphin (sans le E) pour nos midis, sa patience et son aide précieuse, à

Christiane pour sa joie de vivre, sa gentillesse et son aide et aussi à Domi pour ses coups de main indispensables et son savoir faire hors pair.

Merci aussi à mes collègues de l'enseignement, avec un profond respect pour Patrick et Michelle. O pour avoir su me supporter et pour leur extrême gentillesse, à Laurent pour sa gentillesse mais à qui j'en veux toujours un peu de m'avoir caché la boîte de lame.

Merci aussi à Sophie, aux souris bien sûr et à Tanniniou pour s'être si bien occupé d'elles pendant mon absence et après.

Je tiens également à remercier Marion Wassef et Isabelle Bachy qui m'ont beaucoup apprises. Mais aussi Aouatef Ait-Lounis et Walter Reith pour leur aide précieuse.

Je voudrais poursuivre en remerciant mes amis qui ont beaucoup souffert pendant ces 4 années et qui ont dû faire preuve de self contrôle.

Merci à toute l'équipe toulousaine : Manue, Jean-Marc, Julie, Fred, Alice, Guillaume, Jovani, Alexandre et Sylvie.

Merci à Flo, Fred et Louis pour nos grands moments de farniente.

Merci à Nath pour nos mardis c'est permis qui vont beaucoup me manquer, et merci à Amélie, Seb et Eric ses trois accolites.

Merci à Laurent, Laurence et à Gégé pour nos moments de complicité et nos délires collectifs.

Enfin je souhaiterais terminer cette pléthore de remerciement par ma famille.

Merci évidemment à mes proches parents : Dédé, Manu, Aurel, Lylis et Stella ; Papi et Manou ; Jacroute, Pilou, David, Loïc et Velour ; Guy, Gladouille, Vivette, Vonvon, Gilou, Marie-Laure, Noé, Romrom, Bében et Prisc ; Bernard, Florent, Véro, Simon, Karine, Philippe, René, Yvonne, Coco, Thierry, Alexis et Morgan, et une pensée à tous ceux que j'oublie sûrement.

Mais surtout merci à l'être qui m'a toujours encouragé, motivé et poussé. Merci pour son amour, son soutien, sa patience si rare et surtout de m'avoir fait le plus beau cadeau qu'une femme puisse espérer. Merci de me permettre de la voir briller à nos côtés chaque jour, merci pour notre petit bout d'étoile : Candice. Enfin merci d'être simplement toi, STEF.

SOMMAIRE

RESUME	1
REMERCIEMENTS	4
SOMMAIRE	7
INTRODUCTION GENERALE	11
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	13
A. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION RFX :.....	14
I. DEFINITION ET STRUCTURE PROTEIQUE :.....	14
II. ROLES CONNUS DES RFX :.....	15
1. RFX CHEZ LES EUCARYOTES UNICELLULAIRES :.....	15
a. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> :.....	15
b. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	15
c. <i>Acremonium chrysogenum</i> :.....	16
2. RFX CHEZ LES INVERTEBRES :.....	16
a. <i>DAF-19</i> de <i>C.elegans</i> :.....	16
b. <i>dRFX</i> de <i>Drosophiles</i> :.....	17
3. RFX CHEZ LES MAMMIFERES :.....	18
a. <i>Les rôles des facteurs RFX : études in vivo.</i>	18
i. <u><i>RFX5</i></u> :.....	18
ii. <u><i>RFX3</i></u> :.....	18
iii. <u><i>RFX4</i></u> :.....	19
b. <i>Les rôles présomptifs des facteurs RFX : études in vitro.</i>	20
i. <u><i>Régulation de l'expression du gène codant la protéine c-myc</i></u> :.....	20
ii. <u><i>Régulation du gène codant un inhibiteur de protéines bHLH</i></u> :.....	21
iii. <u><i>Régulation des gènes de collagène de type I</i></u> :.....	21
iv. <u><i>Régulation du gène codant un variant d'histone</i></u> :.....	21
v. <u><i>Régulation des protéines spécifiques des cellules neuronales</i></u> :.....	22
III. LES GENES CIBLES DES RFX :.....	23
1. CHEZ CAENORHABDITIS :.....	23
2. CHEZ LES DROSOPHILES :.....	24
3. CHEZ MUS MUSCULUS :.....	24
B. CILS ET CILIOPATHIES :.....	26
I. DEFINITION ET STRUCTURE DES CILS :.....	26
1. DEFINITION DES CILS :.....	26
2. PROTEINES CILIAIRES :.....	26
a. <i>Les tubulines</i> :.....	27
b. <i>Protéines de L'IFT</i> :.....	27
i. <u><i>Moteur à Kinésine 2</i></u> :.....	27
ii. <u><i>Moteur à Dynéine (dynéines cytoplasmiques)</i></u> :.....	28
iii. <u><i>Particules de l'IFT</i></u> :.....	29
c. <i>Protéines nécessaires à la motilité des cils</i> :.....	30
i. <i>les dynéines axonémales</i>	30
ii. <i>Fibres rayonnantes</i> :.....	30
II. CILIOPATHIES HUMAINES :.....	31
1. LE SYNDROME DE DYSKINESIE CILIAIRE PRIMITIVE (PCD) :.....	31
2. LES POLYKYSTOSES RENALES (PKD) :.....	32
3. LES NEPHRONOPHTISES (NPHP) :.....	32
4. LES DYSTROPHIES RETINIENNES :.....	33
5. LE SYNDROME DE BARDET-BIEDL (BBS) :.....	34
6. LE SYNDROME D'ALSTROM (ALMS) :.....	34

8.	LES SYNDROMES DE MECKEL-GRUBER ET DE JOUBERT :	35
a.	<i>Le syndrome de Meckel-Gruber (MKS) :</i>	35
b.	<i>Le syndrome de Joubert (JBTS) :</i>	35
9.	DE NOUVELLES CILIOPATHIES ?	36
III.	<u>ROLES DES CILS CHEZ LES MAMMIFERES :</u>	38
1.	LES CILS MOTILES :	38
2.	LES CILS PRIMAIRES MOTILES : LES CILS DU NŒUD EMBRYONNAIRE :	38
3.	LES CILS PRIMAIRES OU SENSORIELS :	39
a.	<i>Les cils et la voie de signalisation WNT :</i>	40
i.	<i>La voie de signalisation WNT :</i>	40
-	<i>La voie WNT canonique :</i>	40
-	<i>La voie WNT non canonique/PCP :</i>	40
ii.	<i>Lien entre cils et voie de signalisation WNT :</i>	41
b.	<i>Cils et voie de signalisation SHH :</i>	42
i.	<i>La voie de signalisation SHH :</i>	42
ii.	<i>IFT et la voie de signalisation SHH :</i>	43
iii.	<i>Cils et voie de signalisation SHH dans la patte :</i>	44
iv.	<i>Les cils et la voie de signalisation SHH dans les cellules du cervelet :</i>	46
-	<i>La formation du cervelet :</i>	46
-	<i>Les cils primaires des cellules du cervelet :</i>	46
C.	LA MISE EN PLACE DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES DU CERVEAU ANTERIEUR :	48
I.	<u>LE ROLE DE LA PLAQUE DU TOIT DANS LA MISE EN PLACE DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES DU CERVEAU ANTERIEUR.</u>	48
1.	LA FORMATION DES HEMISPHERES CEREBRAUX :	48
2.	LA FORMATION DES PLEXUS ET DE L'OURLET CORTICAL DANS LE TELEENCEPHALE :	50
3.	LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES DU DIENCEPHALE :	50
II.	<u>LA FORMATION DE LA PLAQUE DU TOIT :</u>	51
1.	LE ROLE DE LA SIGNALISATION AUX BMP :	51
2.	ROLE DES EFFECTEURS DE LA SIGNALISATION BMP :	52
3.	LA SIGNALISATION WNT :	54
4.	LES MARQUEURS CORTICAUX DORSAUX :	54
5.	LA LIGNE MEDIANE ROSTRALE ET LA SIGNALISATION FGF :	56
6.	LA LIGNE MEDIANE VENTRALE (PLAQUE DU PLANCHER) DU CERVEAU ANTERIEUR :	57
III.	<u>LA FORMATION D'UNE STRUCTURE DORSO-MEDIANE LE CORPS CALLEUX :</u>	59
1.	LE CORPS CALLEUX :	59
2.	LA FORMATION DU CORPS CALLEUX :	59
a.	<i>Les axones pionniers :</i>	60
b.	<i>Les populations cortico-septales :</i>	60
i.	<i>Les populations gliales de la région cortico-septale :</i>	61
ii.	<i>Les populations neuronales de la région cortico-septale :</i>	62
c.	<i>Le ciblage des aires corticales contra-latérales :</i>	64
D.	CONCLUSIONS :	65
	RESULTATS	66
	PAPIER 1	67
	PAPIER 2	70
	PAPIER 3	95
	CONCLUSION GENERALE	111

BIBLIOGRAPHIE.....119

INTRODUCTION

GENERALE

Les membres de la famille RFX sont des facteurs de transcription, partageant un domaine de liaison à l'ADN extrêmement conservé au cours de l'évolution, et sont retrouvés de la levure aux mammifères. Ces facteurs RFX sont impliqués dans la régulation des gènes nécessaires à l'assemblage et aux fonctions ciliaires chez le nématode, la drosophile et la souris.

Lors de mon arrivée au laboratoire, il avait été montré que l'hydrocéphalie retrouvée, chez les mutants murins *Rfx3*, était corrélée à l'atrophie de l'organe sous commissural et des plexus choroïdes. La poursuite de la caractérisation phénotypique des mutants *Rfx3* que j'ai menée, a permis de mettre en évidence que d'autres structures cérébrales majeures comme le corps calleux, la commissure hippocampique, la glande pinéale et la commissure postérieure sont également affectées chez ces mutants. Afin de déterminer les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces atteintes cérébrales, j'ai analysé la mise en place de ces différentes structures au cours de l'embryogenèse chez ces mutants. Et je montre qu'un défaut de spécification de la ligne médiane dorsale peut en être à l'origine.

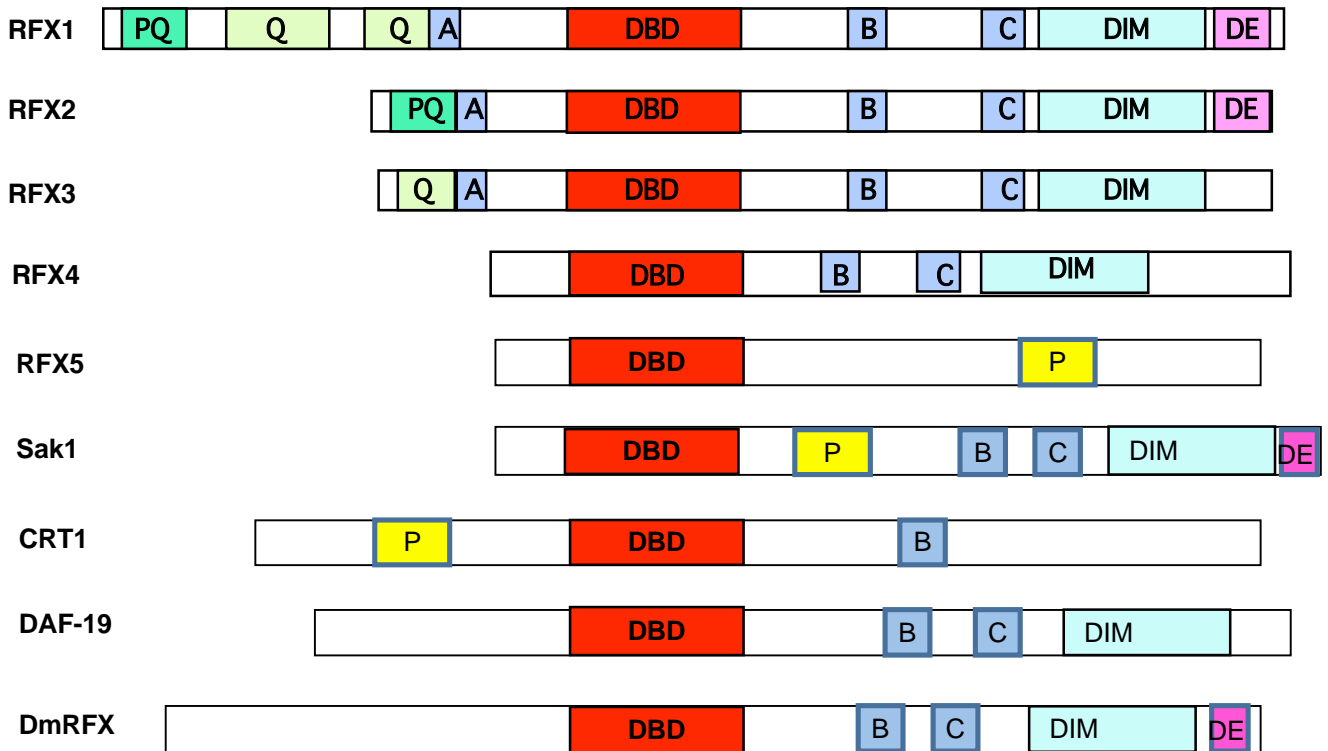
Je vais dans un premier temps présenter dans l'introduction bibliographique, l'état de nos connaissances sur les facteurs RFX et les rôles qu'ils assurent au sein de différents organismes. Puis je traiterai des cils et de leur importance physiologique via notamment l'étude des ciliopathies, pathologies humaines dues à une atteinte ciliaire, recensées à ce jour. Et enfin, je discuterai des travaux existants sur la mise en place des structures dorso-médianes du cerveau antérieur et plus particulièrement de la formation du corps calleux.

Dans une seconde partie, je vais présenter les résultats obtenus au cours de ce doctorat sous forme de trois articles. Le premier, où je figure en tant que co-auteur, concerne la caractérisation des défauts cérébraux à l'origine de l'hydrocéphalie chez les mutants *Rfx3*. Le deuxième révèle que les atteintes cérébrales, des mutants *Rfx3*, peuvent être expliquées par le défaut de formation de la ligne médiane dorsale du cerveau antérieur. Et le troisième qui a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Cécile Lebrand, à Lausanne, traite d'un nouveau défaut cérébral présenté par les mutants *Rfx3* qu'est l'agénésie callosale.

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

A. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION RFX



Boîte X 

Figure 1 : Structure protéique des facteurs RFX.

Ces facteurs sont caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN (DBD :DNA Binding Domain) qui reconnaît une séquence spécifique sur les gènes cibles appelée boîte X. Ces facteurs possèdent un domaine de dimérisation (DIM) qui leur permet de s'homo ou de s'hétérodimériser. Il y a d'autres domaines, notamment le domaine A, et des régions riches en proline (P), en glutamine (Q) et en acides aminés (DE).

Sak1 : RFX *Saccharomyces pombe*

CRT1 : RFX *Saccharomyces cerevisiae*

DAF-19 : RFX *C.elegans*

DmRFX : RFX *Drosophiles*

A. Les facteurs de transcription RFX :

I. Définition et structure protéique :

Les facteurs de transcription de type RFX (Regulatory Factor X) ont été initialement découverts chez les mammifères, puis par la suite, dans différentes espèces jusque chez la levure. Ces facteurs de transcription sont relativement conservés dans tous ces organismes.

Ces facteurs sont caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN en hélice ailée (DBD : DNA Binding Domain) qui reconnaît une séquence spécifique sur les gènes cibles, appelée boîte X (Emery et al., 1996). Elle se présente sous la forme d'un palindrome imparfait de douze nucléotides. En plus, du domaine de liaison à l'ADN, certains de ces facteurs possèdent un domaine de dimérisation (DIM). Ce domaine DIM permet à ces facteurs de s'homo ou s'hétérodimériser. Il y a d'autres domaines, notamment le domaine A, et des régions riches en proline (P), en glutamine (Q) et en acides aminés (DE) (Katan-Khaykovich and Shaul, 1998) (Figure 1) dont les fonctions ne sont pas encore connues.

L'établissement d'un arbre phylogénétique, sur la base du domaine de liaison à l'ADN, a révélé l'existence d'un sous groupe de facteurs RFX (en rouge sur la figure 2). En effet, comme on le voit sur l'arbre de la figure 2, ce sous groupe de facteurs comprend les facteurs RFX1 à 4 de mammifères, l'un des facteurs RFX de drosophile, et le facteur RFX de *Caenorhabditis elegans* appelé DAF-19. Cet ensemble regroupe les facteurs RFX qui présentent le plus de similitude. On observe également dans cet arbre, l'existence d'un deuxième sous groupe beaucoup plus divergent. Ce deuxième groupe contient le facteur RFX5, le deuxième facteur RFX de drosophile et les facteurs RFX des eucaryotes unicellulaires. Chez les mammifères, le séquençage des génomes a permis d'identifier deux autres facteurs RFX, RFX6 et RFX7 (Aftab et al., 2008). Le facteur RFX6 est retrouvé exprimé dans les îlots pancréatiques alors que RFX7 est exprimé un peu partout et notamment dans le cerveau.

A. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION RFX

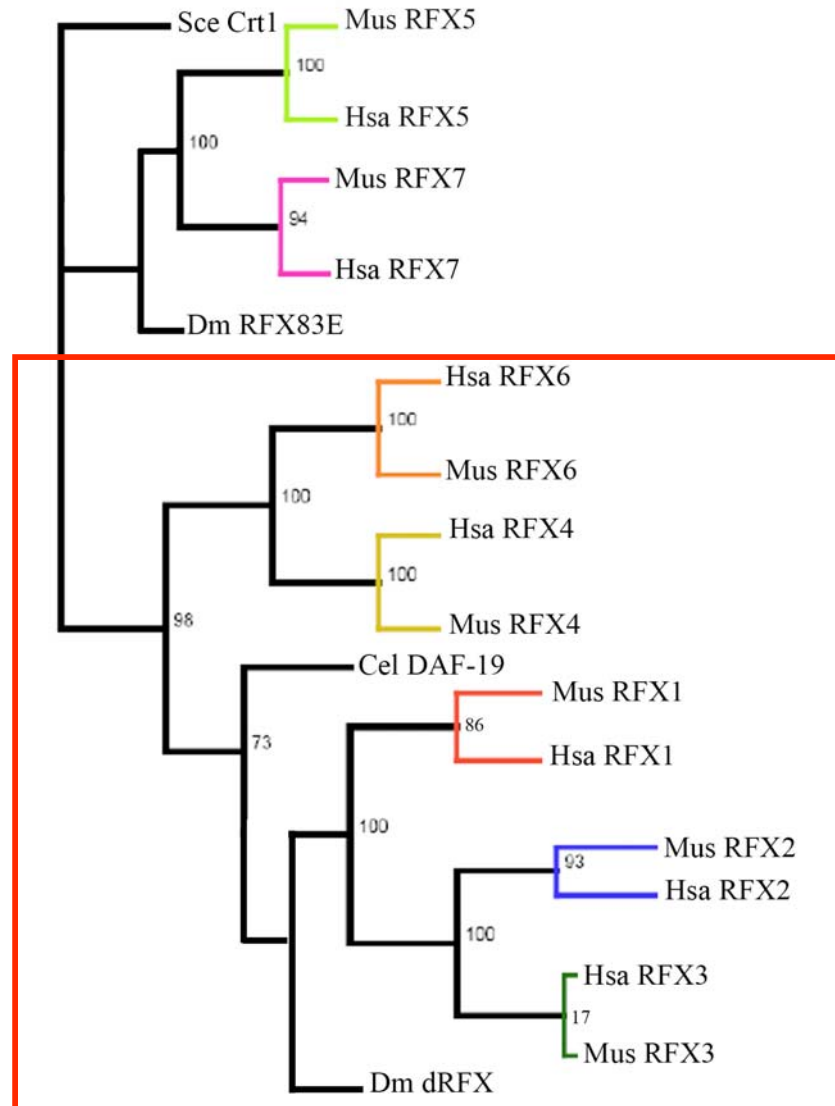


Figure 2 : Arbre phylogénétique des facteurs de transcription RFX.

Cet arbre a été défini d'après l'analyse des séquences géniques, du domaine de liaison à l'ADN, des différents RFX. D'après cet arbre un sous groupe de facteur RFX, présentant de fortes similitudes, émerge (carré rouge). Il s'agit de RFX1 à 4, RFX6 de mammifères (Mus : *Mus musculus* ; Hsa : Homme) et de dRFX (Dm : *Drosophila melanogastera*) et de DAF-19 (Cel : *Ceanorhabditis elegans*). D'autres membres de cette famille sont plus éloignés, signe d'une plus grande divergence, comme RFX5 de mammifères ou encore le deuxième RFX de drosophile (RFX83E). Tiré et modifié de *Aftab et al., 2008*.

II. Rôles connus des RFX :

1. *RFX chez les eucaryotes unicellulaires :*

a. *Schizosaccharomyces pombe :*

L'analyse d'un mutant incapable de sortir du cycle cellulaire végétatif chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, a permis l'identification du seul gène *Rfx* de cette levure appelé *Sak1* (Wu and McLeod, 1995). SAK1 est impliqué dans la reprise du cycle cellulaire chez la levure permettant ainsi la conjugaison et la méiose aboutissant à une reproduction sexuée. L'analyse du mutant *Sak1* a permis de déterminer que le facteur transcriptionnel SAK1 régule l'expression du gène indispensable à l'entrée en méiose qu'est *mei2+* (Wu and McLeod, 1995).

b. *Saccharomyces cerevisiae :*

CRT1, seule protéine RFX de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, est un répresseur transcriptionnel impliqué dans le contrôle de la réplication suite à des lésions de l'ADN (Huang et al., 1998; Katan-Khaykovich and Shaul, 1998). En cas de lésions dans l'ADN, des gènes comme *rnr2*, *rnr3*, *rnr4* et *hug1*, nécessaires au métabolisme des ribonucléotides, sont spécifiquement exprimés pour permettre la réparation de l'ADN. CRT1 forme un complexe répresseur avec les facteurs de remodelage de la chromatine Ssn6 et Tup1, le complexe va réprimer les gènes du métabolisme des nucléotides nécessaires à la réparation de l'ADN. En cas de lésion dans l'ADN, CRT1 est hyperphosphorylé afin d'empêcher sa fixation sur l'ADN ce qui permet l'expression des gènes de réparation de l'ADN.

Connaissant le motif consensus de liaison à l'ADN de CRT1, une étude a été réalisée visant à analyser la distribution de ces sites dans les gènes de levure. Un cluster de 30 gènes cibles putatifs de CRT1 a ainsi été déterminé. Des études de profil d'expression ont permis de sélectionner un ensemble de gènes qui sont probablement des cibles de CRT1. Trois d'entre elles ont été testées et sont bien des cibles de CRT1 : *YLR345W*, *NTH2*, et *Fsh3*. D'après la bibliographie existante sur FSH3 et l'analyse de sa séquence protéique, il semblerait que cette protéine intervienne dans la synthèse du folate via la voie métabolique impliquant la dihydrofolate réductase. CRT1 pourrait jouer un rôle dans le

contrôle de la synthèse de désoxyribonucléotides en modulant l'activité de cette dihydrofolate réductase. La régulation de YLR345W et NTH2, enzymes impliquées dans le métabolisme basal en condition de stress, par le facteur CRT1 indique un lien entre le contrôle de la réplication suite à des lésions dans l'ADN et le métabolisme basal (Zaim et al., 2005).

c. *Acremonium chrysogenum* :

Chez le champignon *Acremonium chrysogenum*, CPC1 code une protéine appartenant à la famille RFX. Ce facteur de transcription a été impliqué dans le contrôle des gènes intervenant dans les voies de synthèse de la céphalosporine C (antibiotique) (Schmitt et al., 2004). Il régule notamment l'expression de *pcbC*, codant une enzyme de la voie de biosynthèse de cet antibiotique.

De plus, l'analyse d'une souche d'*A.chrysogenum*, où *cpc1* est délété, révèle que CPC1 intervient dans la régulation de la morphogénèse fongique puisque les champignons mutants de *cpc1* présentent des défauts de formation des arthrospores. L'ajout du gène *cpc1* sauvage est capable de restaurer un phénotype sauvage à savoir la formation des arthrospores chez ces mutants (Hoff et al., 2005).

2. RFX chez les invertébrés :

a. DAF-19 de *C.elegans* :

DAF-19, est le seul RFX chez le nématode et possède un domaine DBD de type RFX fortement conservé, ainsi qu'un domaine de dimérisation fonctionnel. Chez le nématode, il y a 60 neurones ciliés sur les 302 neurones répertoriés et ce sont les seules cellules ciliées présentes dans cet organisme. L'étude de ces cellules ciliées, chez les mutants *daf-19*, montre que les cils y sont difformes et plus courts (Swoboda et al., 2000). Par la recherche d'une boîte X dans les séquences promotrices des gènes du nématode, plusieurs gènes cibles de DAF-19 ont été identifiés. Parmi les gènes cibles identifiés, on retrouve *che2*, *che13*, *osm1*, *osm5* et *osm6* qui codent des protéines impliquées dans le transport

intraflagellaire (IFT) nécessaire à la croissance ciliaire (Swoboda et al., 2000; Haycraft et al., 2001; Haycraft et al., 2003).

Il a été montré que d'autres gènes codant des protéines impliquées dans la ciliogenèse sont des cibles de DAF-19, *xbx1* (protéine de l'IFT (homologue de D2lic)) (Schafer et al., 2003), *bbs3* (Fan et al., 2004), *bbs5* (Li et al., 2004), *bbs8* (Ansley et al., 2003) (les protéines BBS sont des protéines ciliaires), *dyf3* (Murayama et al., 2005), *dyf5* (Chen et al., 2006), *dyf11* (Kunitomo and Iino, 2008) (ces protéines Dyf sont des protéines de l'IFT), *nph1* et *nph4* (Winkelbauer et al., 2005) (codant les néphrocystines qui sont des protéines ciliaires). Tous les gènes cibles de DAF-19 codent des protéines de ciliogenèse ou impliquées dans la fonction ciliaire. Le facteur RFX assure donc le contrôle de la ciliogenèse chez le nématode. Pour l'instant, on ne connaît pas d'autres facteurs qui assurent cette fonction chez *C. elegans*.

D'après toutes ces données, on peut dire que le contrôle génétique de la ciliogenèse chez le nématode est assuré par ce facteur de transcription.

b. *dRFX* de Drosophiles :

Il y a deux RFX connus chez la drosophile *dRFX* et *RFX83E*. *RFX83E* est l'homologue du facteur *RFX5* de mammifère. Ce facteur doit son nom à sa localisation chromosomique. L'analyse du profil d'expression de *dRfx* montre qu'il est exprimé dans les neurones sensoriels de type I du système nerveux périphérique, dans les neurones (non caractérisés) dans le cerveau des drosophiles et dans les spermatides (Vandaele et al., 2001). Les drosophiles mutantes pour *dRfx* présentent des défauts de perceptions mécanosensorielles et chémo-sensorielles. La perte de la proprioception conduit à un phénotype sévère de non coordination des pattes et des ailes. Les cils des neurones sensoriels de type I de ces mutants présentent des défauts de morphologie et d'ultrastructure (Dubruille et al., 2002). Ces résultats suggèrent donc que *dRFX* est un régulateur essentiel de la différenciation des neurones sensoriels ciliés.

Le type cellulaire exprimant *dRfx* dans le cerveau n'a pas encore été caractérisé. Le rôle de *dRfx* dans cet organe reste encore à être déterminé. Cette étude est d'autant plus intéressante, qu'à l'heure actuelle, aucun cil n'a été observé dans les cerveaux de

A. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION RFX

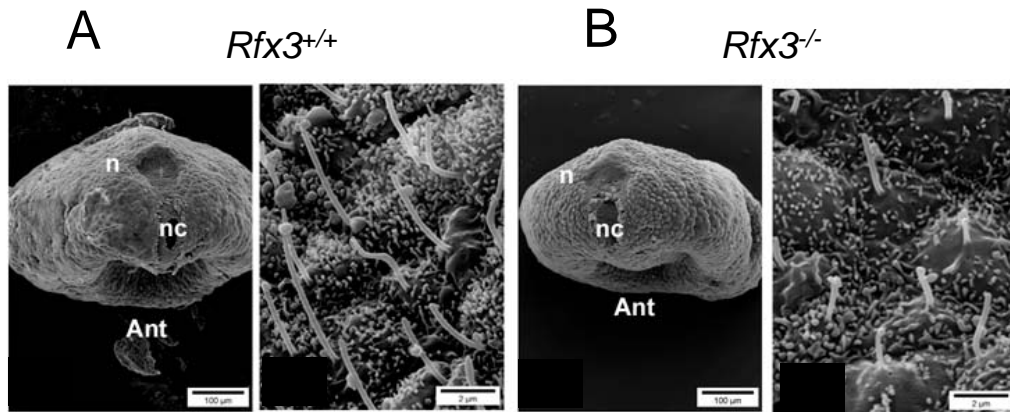


Figure 3 : Cils du noeud embryonnaire des mutants *Rfx3*^{-/-}.

Les cils du noeud embryonnaire sont plus courts chez les souris *Rfx3*^{-/-} (B) en comparaison avec les souris sauvages(A). Ce défaut ciliaire explique l'origine des défauts de latéralisation observés chez les mutants *Rfx3*^{-/-}. D'après *Bonnafe et al., 2004*.

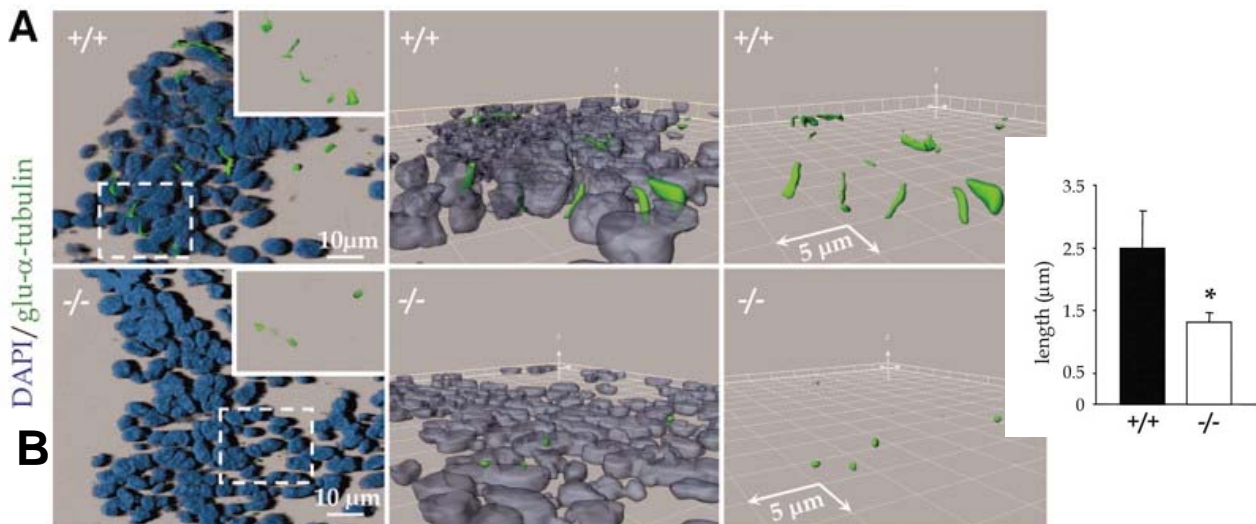


Figure 4 : Les cils primaires des cellules du pancréas endocrine chez les mutants *Rfx3*^{-/-}.

Les cils primaires sont plus courts chez les mutants *Rfx3*^{-/-} (B) que chez les sauvages (A). D'après *Ait-Lounis et al., 2007*.

drosophiles. Cette absence ciliaire supposerait donc un rôle nouveau pour dRFX qui serait indépendant de son implication dans la régulation de la ciliogenèse ou que des cellules ciliées non identifiées à l'heure actuelle sont présentes dans le cerveau des drosophiles.

3. *RFX chez les mammifères :*

a. Les rôles des facteurs RFX : études *in vivo*.

i. RFX5 :

A l'heure actuelle, la fonction du facteur RFX5 est bien caractérisée chez l'homme. Il est impliqué dans la régulation des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Villard et al., 2000) et sa mutation entraîne une immunodéficiência sévère : le syndrome des lymphocytes dénudés (Steimle et al., 1995). RFX5 agit au sein d'un complexe triprotéique puisqu'il s'hétérotrimérise avec deux autres facteurs RFXANK (RFX Ankyrin) et RFXAP (RFX Associated Protein) (Durand et al., 1997; Masternak et al., 1998) pour exercer cette régulation.

ii. RFX3 :

L'étude des souris déficientes pour *Rfx3* réalisée par notre équipe a montré que ce facteur est impliqué dans le contrôle de la croissance des cils du nœud embryonnaire (Bonnafe et al., 2004). Les embryons *Rfx3*^{-/-} présentent des défauts de positionnement des organes, responsables d'une létalité embryonnaire importante. Parmi les rares mutants qui naissent, certains présentent un *situs inversus*. L'analyse des cils du nœud embryonnaire réalisée en microscopie électronique à balayage montre qu'ils ont des défauts de croissance (figure 3). Cette anomalie ciliaire pourrait donc être responsable des défauts de latéralisation observés chez ces mutants.

L'analyse des cibles de RFX3 a été réalisée par *RT-PCR* quantitative, et cette étude a montré que le gène codant la protéine D2LIC dans le nœud embryonnaire, dynéine impliquée dans l'IFT rétrograde, est réduit chez les mutants *Rfx3*^{-/-}. En outre, le niveau d'expression de *Tg737*, codant une protéine du complexe B de l'IFT, ne varie pas (Bonnafe et al., 2004).

A. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION RFX

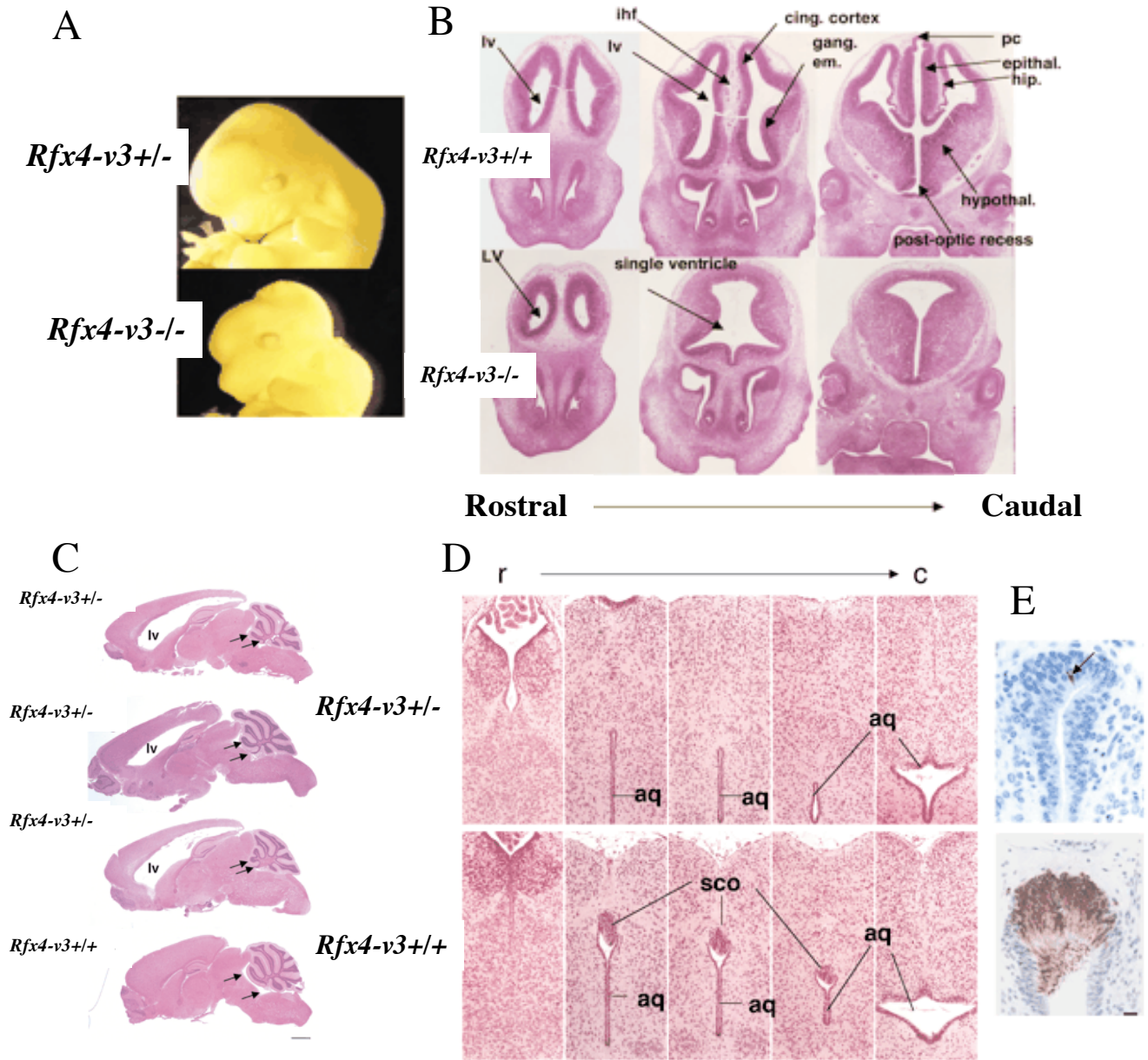


Figure 5 : Phénotypes des souris *Rfx4-v3*^{-/-} ou *Rfx4-v3*^{+/-}.

On observe que les souris déficientes pour *Rfx4-v3*^{-/-} sont holoprosencéphales et présentent une perte des structures issues de la ligne médiane (A et B).

Les souris *Rfx4-v3*^{+/-} sont hydrocéphales (C), sans obstruction de l'aqueduc de Sylvius (D), et présentent une atrophie de l'organe sous commissural (E). L'analyse de la glande pinéale et de la commissure postérieure de ces souris transgéniques ne montrent pas de défauts évidents de ces structures. D'après *Blackshear et al., 2003*.

Une étude récente menée par *Ait-Lounis et al.* en 2007 (*Ait-Lounis et al.*, 2007), révèle que la protéine RFX3 est exprimée dans les cellules du pancréas endocrine durant l'embryogenèse et chez l'adulte. L'analyse des cils primaires présents à la surface de ces cellules, dans les souris *Rfx3*^{-/-}, sont plus courts et moins nombreux (figure 4). Cette anomalie ciliaire est associée à des défauts développementaux entraînant l'altération de la composition cellulaire des îlots de Langerhans. Juste avant la naissance, les mutants *Rfx3*^{-/-}, présentent des îlots contenant moins de cellules productrices d'insuline, de glucagon, de ghrelin. Chez les souris adultes déficientes pour *Rfx3*, les îlots sont désorganisés, la production d'insuline est diminuée et la tolérance au glucose est réduite. Toutes ces données suggèrent que RFX3 joue un rôle dans les mécanismes gouvernant la différenciation cellulaire du pancréas endocrine et que les cils primaires présents dans ces îlots cellulaires sont impliqués dans ce processus.

iii. RFX4 :

Le facteur RFX4 diverge des facteurs RFX1, 2 et 3 par l'absence dans sa séquence protéine de certains domaines comme les domaines riches en glutamine (Q) et le domaine A. En outre, tout comme les autres facteurs RFX, il possède un domaine de dimérisation lui conférant la capacité de s'homo ou s'hétérodimériser. *In vitro*, des études de formation de complexe entre RFX4 et les autres facteurs RFX a montré que RFX4 était capable de se complexer avec lui-même mais aussi avec RFX2 et 3. En revanche, aucun complexe RFX4/RFX1 n'a été retrouvé supposant que RFX4 et RFX1 ne s'hétérodimérisent pas ensemble (*Morotomi-Yano et al.*, 2002). Il existe plusieurs transcrits de RFX4, v1, v2, v3 et v4 (*Blackshear et al.*, 2003). Seul le transcrit v3 a été étudié au niveau fonctionnel. Les mutants homozygotes *Rfx4-v3*^{-/-} présentent des anomalies sévères des structures médianes du cerveau entraînant une létalité périnatale de ces individus (figure 5). Ces mutants sont notamment holoprosencéphales (figure 5A et B). Les mutants hétérozygotes *Rfx4-v3*^{+/-}, quant à eux, développent une hydrocéphalie qui serait due à une absence ou une atrophie de l'organe sous commissural (figure 5C, D et E). L'analyse du profil d'expression de ce facteur montre qu'il est présent dans de nombreuses régions cérébrales dont les épithéliums des ventricules cérébraux, l'organe sous commissural, les plexus choroïdes.

Une étude visant à sélectionner des souris présentant des défauts de cortex cérébral menée par *Zarbalis et al., 2004* (Zarbalis et al., 2004), confirme l'implication de ce facteur de transcription dans l'établissement des structures cérébrales. En effet, ils ont réalisé un crible de souris traitées à l'ENU (agent mutagène qui induit des substitutions de nucléotides dans la séquence génomique), pour identifier des gènes nécessaires à la formation du cortex cérébral. Une des lignées obtenue présente une substitution d'une base dans la séquence du gène *Rfx4* et un défaut de formation de la ligne médiane dorsale du cerveau antérieur. Cette lignée transgénique a un phénotype identique à celui qui est retrouvé chez un mutant nul de *Rfx4-v3^{-/-}*. Cette étude est d'autant plus intéressante que la substitution est localisée dans la séquence génomique à l'origine du domaine de dimérisation (changement d'un résidu leucine en proline).

Dans un résumé de congrès paru dans *Developmental Biology* (Ashique, 2007), l'existence d'un lien entre cils et RFX4 a été confirmée. Sur la lignée de souris précédente issue du crible avec l'agent mutagène ENU, ils ont étudié les profils d'expression des marqueurs corticaux et sous-corticaux et révèlent un défaut de mise en place de la frontière pallium/sous pallium signe que la dorso-ventralisation du télencéphale est affectée. Afin de comprendre le mécanisme par lequel RFX4 régule le développement du système nerveux central, ils ont cherché à identifier les gènes cibles de ce facteur de transcription. De manière intéressante, une de leur cible est *Ifi172* qui code une protéine du transport intra-flagellaire (IFT). Ils ont également montré que cette lignée mutante présentait des défauts de formation des cils dans le télencéphale et dans la moelle. Ces résultats nous montrent que RFX4 régule la ciliogenèse et l'établissement du patron d'expression génique dorso-ventral du SNC.

b. Les rôles présomptifs des facteurs RFX : études *in vitro*.

i. Régulation de l'expression du gène codant la protéine c-myc :

Le proto-oncogène *c-myc* code une protéine nucléaire, qui s'hétérodimérise avec Max, et régule l'expression des gènes impliqués dans la croissance cellulaire (taille), le métabolisme, la différenciation, l'apoptose, la stabilité génétique. Une région intronique de 20pb, du gène *c-myc*, a été définie comme le site de liaison pour une protéine intronique

MIF. Des expériences de co-immunoprécipitations, faites à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa, ont mis en évidence que RFX1 interagit avec MIF. Des expériences de transfections de différentes constructions portant le gène *c-myc* dans des cellules HL60, révèlent que RFX1 régule l'expression de *c-myc* dans les cellules HL-60 non différenciées. Ces données suggèrent donc que RFX1 régule l'expression du proto-oncogène, *c-myc* (Reinhold et al., 1995; Chen et al., 2000).

ii. Régulation du gène codant un inhibiteur de protéines bHLH :

Une étude récente montre que RFX1 est le régulateur de la protéine Id2 (Inhibitor of DNA binding/differentiation), qui est un répresseur des facteurs de transcription hélice-boucle-hélice (bHLH) dont plusieurs d'entre eux sont impliqués en neurogenèse. Id2 joue un rôle important dans le contrôle cellulaire de différents types de cellules. Des expériences d'immunoprécipitations de chromatine et d'inactivation par RNAi de RFX1 dans des cultures cellulaires, montrent que RFX1 régule *id2*. Il agirait avec l'histone HDAC1 empêchant ainsi la fixation de HDAC1 sur le promoteur du gène *id2*, levant la répression exercée par ce dernier (Wang et al., 2007).

iii. Régulation des gènes de collagène de type I :

Des études révèlent que des protéines RFX répriment l'expression des gènes de collagène 1 et 2 (Sengupta et al., 2002; Sengupta et al., 2005). Dans la séquence de *COL1A1*, il y a un motif consensus de liaison de RFX entourant le site d'initiation de la transcription. Cette boîte X contient trois sites de méthylation alors que *COL1A2* n'en possède qu'un seul. Il y a une meilleure affinité de liaison de RFX1 sur *COL1A1* lorsque la boîte X est méthylé. En absence de méthylation, RFX1 réprime *COL1A1* moins efficacement que *COL1A2*. De plus, RFX1 est capable de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser avec le facteur RFX2, pour se lier aux séquences régulatrices du gène *COL1A2*. Le facteur de transcription RFX5 est lui aussi impliqué dans la régulation des gènes de collagène de type I. Une étude faite en 2006 montre que les deux facteurs, RFX1 et RFX5, s'associent avec différents co-répresseurs sur les gènes de collagène afin de réprimer leur expression. Ainsi, RFX1 s'associe avec HDAC1 (comme on l'a vu

précédemment) et mSin3A (répresseur transcriptionnel de mammifère) alors que RFX5 coopère avec HDAC2 et mSin3B pour réprimer l'expression du collagène (Xu et al., 2006).

iv. Régulation du gène codant un variant d'histone :

Un nouveau variant d'histone (Hlt) exprimé uniquement pendant la spermatogenèse serait régulé par les facteurs de transcription RFX2 et RFX4. Il a été montré qu'il y a une forte expression de RFX2 et de RFX4 dans les spermatocytes. Le pic d'expression de ces facteurs coïncide avec l'apparition de Hlt dans ces cellules. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatines (Chip) révèlent que RFX4 et RFX2 sont capables de se lier au promoteur de *hlt* (Horvath et al., 2004; Wolfe et al., 2004; Grimes et al., 2005; VanWert et al., 2008; Wolfe et al., 2008). Ces données suggèrent que RFX2 et RFX4, fortement exprimés au cours de la spermatogenèse, pourrait interagir ensemble pour réguler l'expression de Hlt.

v. Régulation des protéines spécifiques des cellules neuronales :

- Régulation de la protéine associée aux microtubules MAP1A :

La protéine associée aux microtubules (MAP1A) est exprimée abondamment dans les neurones matures, cette protéine y est nécessaire au maintien de la morphologie neuronale et à la localisation de PSD93 (Postsynaptic Density 93) dans le cytosquelette de microtubules. *In vivo*, il a été montré que les facteurs RFX1 et RFX3 répriment l'expression du gène de *Map1A* dans des cellules non neurales. Il y a donc une répression cellulaire spécifique qui aboutirait à favoriser l'expression de cette protéine uniquement dans les cellules neuronales (Nakayama et al., 2003).

- Régulation de l'expression du transporteur neuronal de glutamate de type 3 :

Les transporteurs de glutamate jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du glutamate extracellulaire et dans la régulation de la neurotransmission de glutamate. Une séquence de liaison du facteur RFX1 existe dans la région promotrice des

gènes codants les transporteurs de glutamate de type 3, qui sont spécifiques des cellules neuronales, mais pas dans les gènes codant les transporteurs de glutamate de type 1 et de type 2, spécifiques des lignées gliales. L'expression de RFX1 a été détectée dans les neurones du cerveau de rat, et notamment dans les neurones du cortex cérébral et dans les cellules Purkinje. Dans des cultures de neurones corticaux, en présence de *RNAi* de *Rfx1*, l'expression des gènes codant les transporteurs de glutamate de type 3 est réduite. Cette étude prouve que RFX1 régule l'expression des gènes spécifiques des cellules nerveuses (Ma et al., 2006).

III. Les gènes cibles des RFX :

1. Chez *Caenorhabditis* :

Sachant que le facteur de transcription DAF-19, chez le nématode, est connu pour réguler la ciliogenèse, des approches bioinformatiques et génomiques ont tenté d'identifier de nouveaux gènes de ciliogenèse en recherchant la présence de boîte X dans les séquences promotrices. Une étude de cet ordre a été menée par l'équipe de *Peter Swoboda en 2005* (Efimenko et al., 2005). Cette étude a permis d'identifier pas moins de 750 gènes ayant une boîte X et donc potentiellement cibles de DAF-19. Une approche similaire a été réalisée par *Blacque et al., 2005* (Blacque et al., 2005) et a ainsi dégagé 1572 gènes. L'application de critères plus stringents, comme la réduction de la distance de la boîte X par rapport au site d'initiation de la transcription, a permis de réduire le nombre de gènes cibles potentiels à 293 gènes. Pour réduire encore ce nombre, cette approche génomique a été combinée à une étude de comparaison de profil d'expression (SAGE) faite entre des cellules ciliées et des cellules non ciliées chez *C.elegans*. Au final 46 gènes cibles « potentiels » de DAF-19 ont été identifiés. Parmi ces gènes, ils retrouvent 10 gènes connus pour coder des protéines ciliaires et 7 qui codent des protéines localisées dans les cils.

Ces approches bioinformatiques et génomiques ont fourni un large échantillonnage de gènes connus, potentiellement régulés par le facteur RFX. Ces approches sont limitées par le nombre élevé de faux positifs et de faux négatifs. Afin d'augmenter la stringence du crible, l'équipe de *Peter Swoboda en 2006* (Chen et al., 2006) a entrepris de réaliser une approche génomique comparative en analysant la présence de boîte X canonique dans les

promoteurs des gènes de trois espèces de nématode : *C. elegans*, *C. briggsae* et *C. remanei*. Comme les séquences génomiques des facteurs RFX sont bien conservées entre ces espèces, cette approche permet de mieux définir la boîte X afin d'identifier les gènes potentiellement cibles les plus pertinents. L'intérêt de ce crible est qu'il permet de ne garder que les gènes qui possèdent une boîte X conservée entre deux espèces, donc compte tenu de la divergence des séquences promotrices inter-espèces, cela permet d'isoler les gènes ayant des boîtes X fonctionnelles. Ils ont ainsi pu identifier 93 gènes cibles potentiels de DAF-19. Pour beaucoup d'entre eux, l'étude de leur profil d'expression vient confirmer leur rôle ciliaire puisqu'ils sont spécifiquement retrouvés dans les cellules ciliées. Ainsi cette dernière étude, a permis d'identifier des nouveaux gènes ciliaires chez *C.elegans*.

2. Chez les Drosophiles :

Une étude récente de génomique comparative, sur des espèces étroitement apparentées, a été réalisée au sein de notre laboratoire par *Laurençon et al. en 2007* (Laurençon et al., 2007). Cette étude montre que les gènes cibles des RFX sont conservés entre des organismes différents comme *C.elegans* et *D.melanogaster*, puisque certains des gènes cibles de DAF-19, sont des cibles de dRFX. Cette étude a également montré que les boîtes X de ces gènes cibles sont bien conservées entre deux espèces de drosophile fortement divergentes que sont *D.melanogaster* et *D.pseudoobscura*. La séquence consensus de boîte X a été utilisée pour une recherche informatique afin d'identifier de nouveaux gènes cibles de dRFX. Par cette approche, 412 gènes ont été identifiés, dont 83 gènes avec une séquence consensus plus stricte. Parmi ces gènes, 25 ont été analysés et 16 sont bien des gènes cibles dont 11 qui sont des nouveaux gènes cibles de dRFX. Parmi ces nouveaux gènes cibles, 9 sont décrits ou supposés être des gènes de ciliogenèse et les 2 gènes qui restent n'ont encore jamais été décrits comme impliqués dans la ciliogenèse.

Cette approche a permis d'identifier de nouveaux gènes cibles de dRFX qui peuvent être impliqués en ciliogenèse.

3. Chez *Mus musculus* :

Le groupe de *Zhang et al. en 2006* (Zhang et al., 2006), a choisi d'entreprendre l'étude des gènes cibles de RFX4-v3. Ils ont choisi de rechercher les gènes différentiellement exprimés, chez les souris déficientes pour *Rfx4-v3*, grâce à l'utilisation d'une puce génomique portant 20 000 oligonucléotides, permettant d'analyser la quasi-totalité du génome murin. Cette approche a permis de sortir 109 gènes différentiellement exprimés. Parmi les gènes cibles identifiés, beaucoup codent des protéines impliquées dans la morphogenèse cérébrale, tels que des composants des voies de signalisation WNT (WNT3, WNT3a, FRIZZLED10, CELSR1) et l'acide rétinoïque (RA). La perte de *Rfx4-v3* affecte également l'expression de plusieurs facteurs de transcription tels que RAX, FOXA2, ZIC1 et ZIC3. Ces facteurs sont connus pour réguler plusieurs aspects du développement cérébral, tels que la formation des yeux, la spécification du cerveau antérieur ou encore le développement du cervelet. L'expression de *Cxc3cl1* (code une chimiokine) est également affectée chez ces mutants et l'analyse plus poussée de ce gène, révèle qu'il possède une boîte X conservée, entre l'homme et la souris, et que RFX4-v3 est capable d'activer le promoteur de *Cxc3cl1* via sa fixation sur la boîte X.

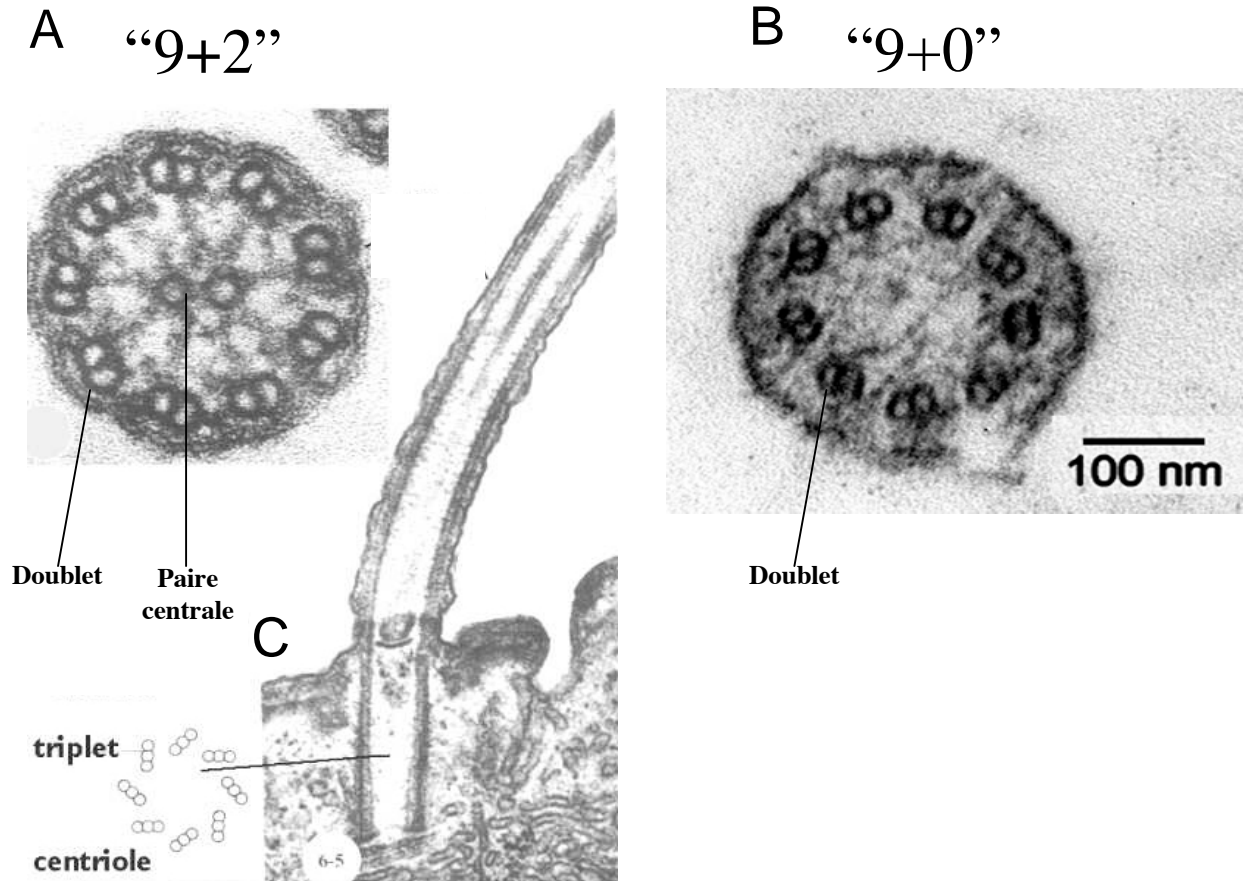


Figure 6 : Structure des cils.

Les cils sont caractérisés par un squelette de microtubules ordonné appelé axonème qui est organisé en 9 doublets de microtubules périphériques. Cet axonème peut entourer une paire centrale de microtubules et dans ce cas on parle de structure en « 9+2 » (cil motile) (A) et si il n’y a pas de paire centrale, il s’agit d’une structure dite en « 9+0 » (cil sensoriel ou primaire) (B). Les cils sont ancrés dans la cellule au niveau du corps basal. Le corps basal est composé d’un centriole, assemblage de 9 triplets de microtubules périphériques, et de matériel péricentriolaire (C).

B. Cils et Ciliopathies :

I. Définition et structure des cils :

1. *Définition des cils :*

Les cils ou les flagelles sont de petits organites qui forment des extensions cellulaires. Ils sont présents dans la plupart des organismes uni ou pluri-cellulaires puisqu'on les retrouve depuis l'algue verte *Chlamydomonas* jusque chez l'Homme. Leur existence est depuis longtemps connue puisque la première observation de flagelles de protozoaires a eu lieu à la fin du 17^{ème} siècle par Leeuwenhoek (Satir, 1995). Les cils forment à la surface des cellules qui les portent des extensions cellulaires pouvant mesurer jusqu'à 10 µm de long pour un diamètre de 250 nm. Ils sont caractérisés par un squelette microtubulaire ordonné appelé axonème. D'après leur organisation axonémale, on distingue deux types de cils : les cils motiles et les cils primaires ou sensoriels. Concernant les cils motiles, ils sont caractérisés par une structure axonémale dite en « 9+2 » (Figure 6A) ce qui signifie qu'il y'a 9 doublets de microtubules périphériques entourant une paire centrale de microtubules. A ce squelette, de microtubules ordonnés, s'ajoute des protéines indispensables à la motilité ciliaire comme les fibres rayonnantes, ou encore les dynéines axonémales. Les cils primaires ou sensoriels, quant à eux, sont caractérisés par l'absence de la paire centrale de microtubules, on parle alors de structure en «9+0 » (figure 6B).

Les cils sont ancrés dans la cellule au niveau du corps basal. Le corps basal est composé d'un centriole, assemblage de 9 triplets de microtubules périphériques, et de matériel péricentriolaire. La croissance des cils a lieu à leur extrémité distale, par l'assemblage de la tubuline et des structures qui leur sont associées (comme les bras de dynéine dans le cas des cils motiles). Pour que les cils soient allongés, il faut donc que les composants ciliaires soient acheminés depuis leur lieu de synthèse, à savoir le cytoplasme, jusqu'à l'extrémité des cils par un transport actif appelé Transport IntraFlagellaire ou IFT.

2. *Protéines ciliaires :*

Les cils sont composés de plusieurs centaines de protéines différentes. Ces dernières années des études protéomiques, génomiques et bioinformatiques basées sur

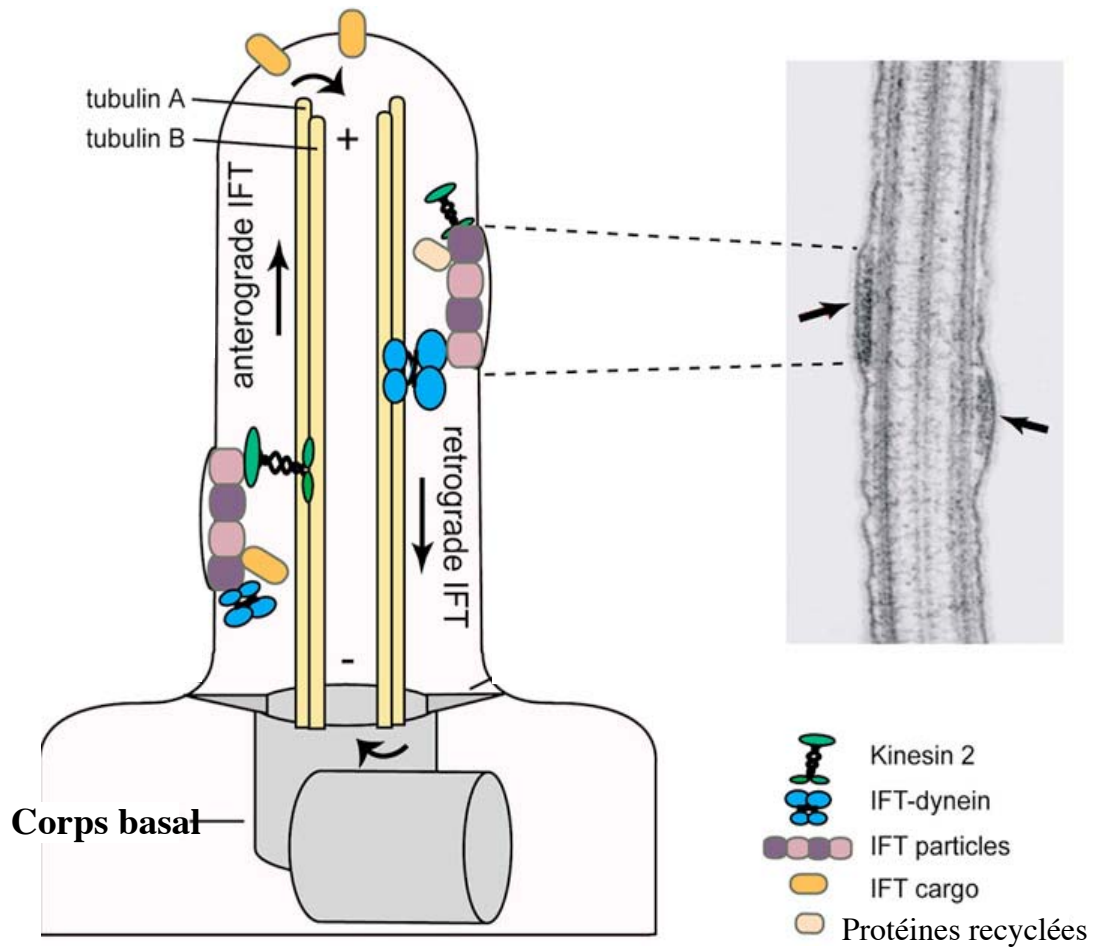


Figure 7 : Le transport intraflagellaire IFT.

L'IFT assure deux types de transport., Le premier qui est le transport antérograde, permet la croissance du cil en acheminant des protéines en partie distale. Il est composé de kinésines 2 (KIF3A/KIF3B/KAP3). Le second est le transport rétrograde, permettant le recyclage de particules. Il est assuré par des dynéines (DHC2/D2LIC). Ces moteurs intracellulaires que sont les kinésines et les dynéines sont des protéines ATPases. D'après *Blacque et al, 2008*.

l'étude des cils chez différents organismes modèles ont entrepris de caractériser la composition protéique complète des cils : « le ciliome ». Ce ciliome comprend une multitude de protéines différentes incluant des composants structuraux de l'axonème, des protéines associées à la membrane, des protéines du transport intraflagellaire, des protéines régulatrices telles que des kinases ou des protéines G. Le ciliome actuel est consultable dans des bases de données accessibles à tous telles que : <http://www.ciliome.com> (Inglis et al., 2006) et <http://www.ciliaproteom.org> (Gherman et al., 2006).

a. Les tubulines:

Les microtubules de l'axonème sont constitués d'hétérodimères de tubulines α et β . Il y a plusieurs types de tubulines qui sont retrouvés dans les cils. Certains gènes codent des tubulines qui sont spécifiques de l'axonème, permettant de réaliser des marquages ciliaires comme β I ou encore β IV chez les mammifères. Pour chaque gène codant ces tubulines il existe plusieurs isoformes (Million et al., 1999; Pechart et al., 1999), les tubulines, peuvent également subir différentes modifications post-traductionnelles comme des tyrosination, acétylation, ... à l'origine de la complexité de la composition ciliaire.

b. Protéines de L'IFT :

C'est en 1993 que pour la première fois, il a été montré qu'un transport bidirectionnel a lieu le long du flagelle, entre la membrane et l'axonème chez *Chlamydomonas* (Kozminski et al., 1995). Ce transport permet l'acheminement des composants ciliaires le long des cils. La machinerie de l'IFT est composée des complexes protéiques appelés particules de l'IFT et de deux moteurs moléculaires qui assurent le transport bidirectionnel (figure 7) (Blacque et al., 2008). Le transport antérograde qui permet la croissance du cil en acheminant des protéines en partie distale est composé d'un complexe protéique trimérique à kinésine 2. Le transport rétrograde, permettant le recyclage de particules, est assuré par un complexe multiprotéique à dynéine cytoplasmique. Ces protéines sont souvent assemblées en complexe et sont dépendantes de la présence de microtubules qui leur servent de rails pour transporter différents substrats.

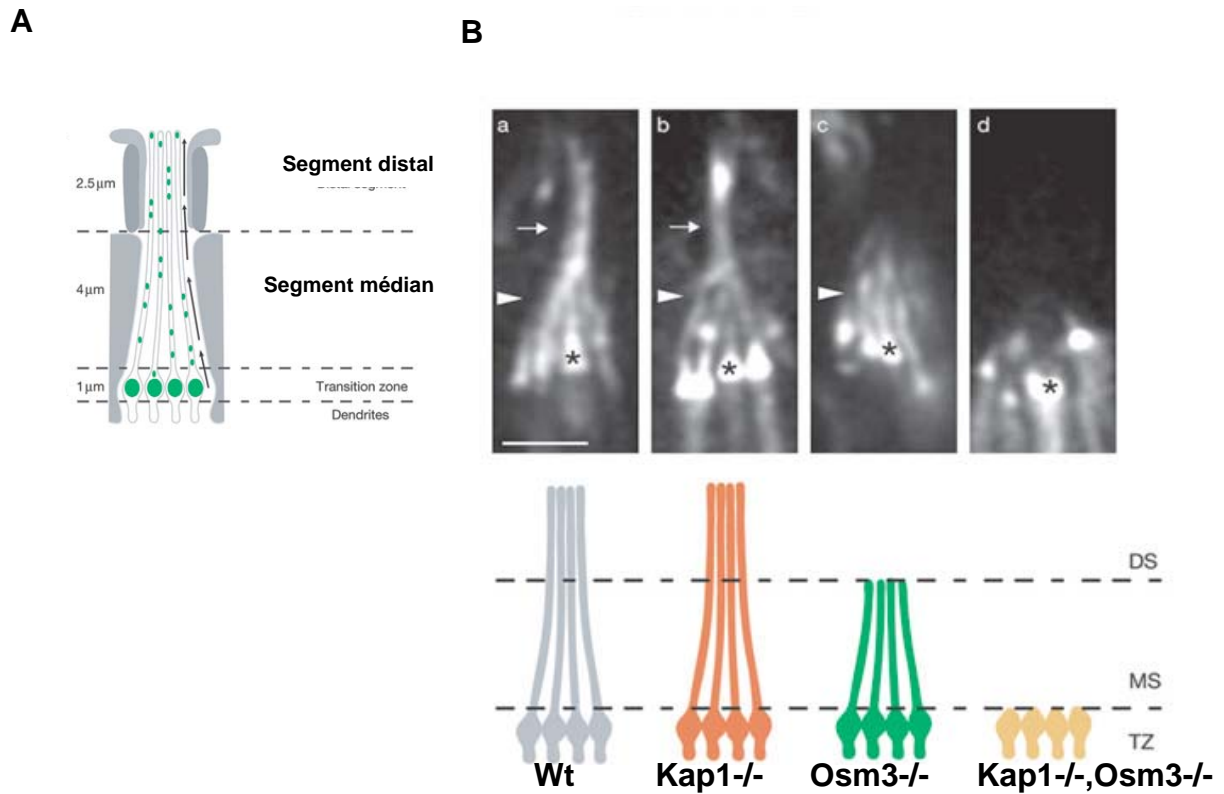


Figure 8 : Mutants de l'IFT chez *C.elegans*.

Structure d'un cil de neurone sensoriel cilié chez *C. elegans* (A).

Les composants de l'IFT coopèrent pour permettre l'élaboration de cil. Le mutant *kap1*^{-/-} (Bb) ne présente pas de défaut de formation des cils. Le mutant *osm3*^{-/-} (Bc) présente un cil raccourci dépourvu d'extrémité distale par rapport aux cils retrouvés chez un nématode sauvage (Ba). Le double mutant *kap1*^{-/-}, *osm3*^{-/-} (Bd) n'a plus de cil. Ces résultats suggèrent donc qu'il y ait une coopération des protéines de l'IFT permettant ainsi la formation de cil (B). Illustrations tirées de *Snow et al., 2004*.

i. Moteur à Kinésine 2 :

Le premier moteur à kinésine 2, à avoir été isolé et caractérisé biochimiquement fut découvert chez l'oursin. Ce moteur est composé d'un complexe hétérotrimérique contenant deux sous-unités motrices KRP85 et KRP95 et d'une protéine associée aux kinésines KAP (Cole et al., 1993).

C'est chez l'algue verte *Chlamydomonas* qu'a été démontré, pour la première fois, l'implication du moteur à kinésine 2 dans l'IFT. L'homologue de KRP95 dans cet organisme est appelé *fla10* (flagellar assembly) et est indispensable à la formation du flagelle ainsi qu'au fonctionnement de l'IFT. Il a été montré que des mutations dans KAP de *Chlamydomonas* (*fla3-1*) ou dans KRP85 (*fla-8*) provoquent des défauts d'assemblage du flagelle (Mueller et al., 2005) (Iomini et al., 2001) (Miller et al., 2005).

Des études faites chez la souris montrent qu'il existe une conservation de fonction pour ces protéines de l'IFT dans l'élaboration des cils. Le moteur à kinésine 2 est requis pour la formation normale des cils et leur fonctionnalité (Nonaka et al., 1998; Marszalek et al., 1999) (Takeda et al., 1999) (Morris and Scholey, 1997; Brown et al., 1999). Chez la souris le complexe hétérotrimérique composant un moteur de l'IFT est composé de KIF3A (homologue de KRP85), de KIF3B (homologue de KRP95) et de la protéine associée aux kinésines KAP3.

Des études réalisées sur d'autres organismes modèles permettent d'étailler les données existantes sur l'IFT. Notamment l'analyse de mutants chez le nématode a permis de préciser le rôle de différents complexes de kinésines dans l'IFT antérograde. En effet, l'analyse de mutants *osm3*^{-/-} (Figure 8Bc), qui code une sous unité homodimérique (Khan et al., 2000), révèle que ce mutant a un cil raccourci dépourvu de partie distale et qu'il présente des défauts de perception sensorielle. Le mutant *kap1*^{-/-} (Figure 8Bb), codant une sous-unité non motrice KAP, de la kinésine 2 hétérotrimérique, ne présente par contre pas de défauts apparents des cils, ni de défauts de perception sensorielle. En revanche, les doubles mutants *osm3*^{-/-}, *kap1*^{-/-} ont de graves défauts sensoriels et les cils sont absents (Snow et al., 2004) (Figure 8Bd). Ces résultats suggèrent que ces deux types de kinésine homodimérique ou hétérotrimérique coopèrent pour former un cil et notamment pour l'élaboration de la partie proximale et médiane du cil. En outre, la croissance et le maintien des cils dans la partie distale seraient dus à OSM3.

ii. Moteur à Dynéine (dynéines cytoplasmiques) :

La dynéine cytoplasmique 1b (DHC1B ou DNCH2) a été identifiée comme chaîne lourde de dynéine. Chez l'embryon d'oursin, son expression est induite juste avant la formation des cils (Gibbons et al., 1994). La perte de cette dynéine conduit à des défauts de formation des cils, puisque les cils présentent des protubérances remplies de particules de l'IFT accumulées chez *Chlamydomonas* et *C.elegans* (Pazour et al., 1999; Signor et al., 1999). Cette chaîne lourde de dynéine est donc impliquée dans le moteur rétrograde de l'IFT (Pazour et al., 1999; Porter et al., 1999; Signor et al., 1999). Plusieurs sous unités accessoires sont associées à DNCH2 dont une chaîne légère de dynéine (LC8), ainsi qu'une chaîne intermédiaire de dynéine (D2LIC) (Perrone et al., 2003; Schafer et al., 2003; Pfister et al., 2006). Chez le mutant *D2lic* de *Chlamydomonas*, la taille des flagelle est variable et on observe une accumulation des particules de l'IFT confortant un rôle de cette chaîne légère de dynéine dans le transport rétrograde (Hou et al., 2004). Il semblerait que d'autres composants des dynéines existent et interagissent, mais ils doivent être caractérisés (Rompolas et al., 2007).

iii. Particules de l'IFT :

Le moteur antérograde à kinésine 2 de *Chlamydomonas* transporte classiquement des particules de 120nm de diamètre, alors que le moteur rétrograde à dynéine transporte des particules de 60nm de diamètre. Ces particules se fractionnent biochimiquement en deux complexes : le complexe A et le complexe B. Ces complexes sont retrouvés dans tous les organismes ciliés. Il a été montré que chez *Chlamydomonas*, le complexe A contient au moins 6 protéines tandis que le complexe B en contient 12 (comme IFT88 et IFT172) (Piperno and Mead, 1997; Cole et al., 1998). Comme les moteurs de l'IFT, les particules de l'IFT sont indispensables à la formation des structures ciliaires. Des études faites principalement chez *Chlamydomonas* (Qin et al., 2007), *C.elegans* (Haycraft et al., 2001) et la souris (Huangfu et al., 2003; Follit et al., 2006), mais aussi dans d'autres organismes comme *Tetrahymena* (Brown et al., 2003), la drosophile (Han et al., 2003), et le zebrafish (Tsujikawa and Malicki, 2004) démontrent que le rôle dans la ciliogenèse de ces particules de l'IFT est très conservé dans l'évolution.

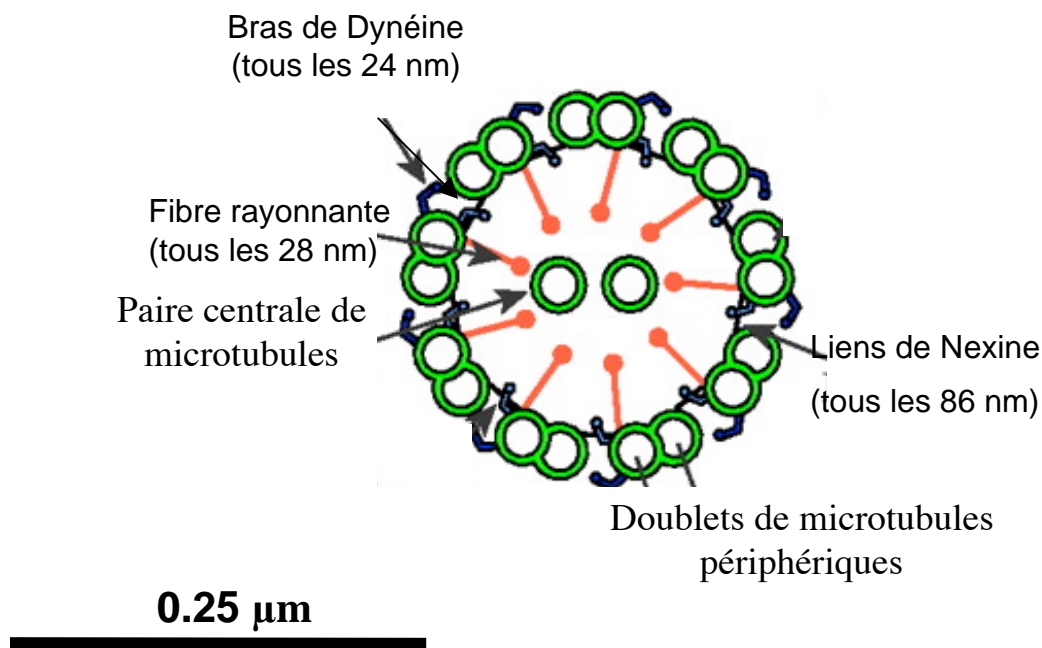


Figure 9 : Les protéines nécessaires à la motilité ciliaire.

Dans le cas de cils motiles en structure « 9+2 », il y a des protéines indispensables à la motilité ciliaire. Il y a notamment des bras de dynéines (bleu) qui vont s'associer pour former des bras internes et externes dont la répartition tout au long du cil est bien définie. Elles interagissent avec les microtubules de façon à créer une force motrice et permettre ainsi la motilité correcte du cil.

Les fibres rayonnantes (rouge) sont, elles aussi, indispensables à la motilité des cils, ce sont des structures complexes ancrées entre la paire centrale de microtubules et les microtubules périphériques. D'après *Dawe et al., 2007*.

c. Protéines nécessaires à la motilité des cils :

i. les dynéines axonémales

Ces protéines confèrent aux cils leur motilité, et ne seraient donc présentes que dans les cils motiles, exception faite pour les cils primaires du nœud embryonnaire. En effet, les cils primaires des cellules du nœud embryonnaire possèdent des bras de dynéines externes.

Comme les dynéines cytoplasmiques, les dynéines axonémales sont des complexes multiprotéiques possédant une activité ATPasique. Les unités de dynéines sont composées de chaînes lourdes (DHC Dynéin Heavy Chain ou également appelée DNAH), de chaînes légères (LC Light Chain) et de chaînes intermédiaires (IC Intermediated Chain ou DNAI). L'assemblage de ces différentes dynéines permet la formation des bras internes et externes variés, dont la répartition tout au long du cil est bien définie (figure 9). Elles interagissent avec les microtubules de façon à créer une force motrice et permettre ainsi la motilité correcte du cil.

ii. Fibres rayonnantes :

Ces fibres rayonnantes sont nécessaires à la motilité ciliaire et sont donc retrouvées dans les cils motiles. L'importance de ces fibres rayonnantes pour la motilité des cils et des flagelles a été montrée grâce à l'analyse de patients humains présentant une atteinte ciliaire (Sturgess et al., 1979) et chez *Chlamydomonas* dans des mutants qui ont perdu la totalité du complexe formant les fibres rayonnantes (Witman et al., 1978; Huang et al., 1981). Les fibres rayonnantes sont des complexes multi sous-unités ancrées entre la paire centrale de microtubules et les microtubules périphériques et sont un composant essentiel des cils en 9+2 (figure 9 (Dawe et al., 2007)). Chez *Chlamydomonas*, il a été montré que les fibres rayonnantes sont composées d'au moins 23 protéines (RSP1 à RSP23) (Patel-King et al., 2004) dont 8 ont été caractérisées au niveau moléculaire. La connaissance de la composition protéique de ces fibres provient d'études faites chez *Chlamydomonas*, grâce à la comparaison de profils de gels 2D entre des algues sauvages et d'autres dépourvues de fibres rayonnantes. Par la suite, ces études ont été complétées par l'analyse de fibres rayonnantes, de *Chlamydomonas*, isolées (Yang et al., 2001). Certaines de ces protéines ont été bien caractérisées. En effet, RSP3 permettrait l'ancrage des fibres aux microtubules périphériques (Gaillard et al., 2001). RSP2, quant à lui, serait capable de se lier à la calmoduline de manière calcium dépendante qui permettrait ainsi de mettre en place une

réponse calcium-dépendante de motilité ciliaire (Yang et al., 2004).

II. Ciliopathies humaines :

Des pathologies humaines dues à des défauts de formation ou de fonction ciliaires sont regroupées sous le terme de ciliopathies. La caractérisation des gènes affectés, chez les patients humains, a permis d'identifier plusieurs gènes mis en cause dans ces ciliopathies.

Chez les mammifères, il y a de nombreuses cellules monociliées ou multiciliées qui sont présentes dans tout l'organisme. Nous ne connaissons pas encore toutes les fonctions que ces petits organites assurent au sein de notre organisme. Mais l'identification des gènes impliqués dans les ciliopathies humaines, ainsi que l'analyse de mutants dans différents modèles nous apporte bon nombre de réponses.

1. *Le syndrome de Dyskinésie Ciliaire Primitive (PCD) :*

La première ciliopathie qui a été décrite est le syndrome de dyskinésie ciliaire primitive encore appelé syndrome des cils immobiles. C'est une maladie rare dont la prévalence est de 1/16 000 (Bush, 2000; Aylsworth, 2001). Les patients atteints présentent des infections pulmonaires, des sinusites, qui sont dues à des défauts d'évacuation de mucus des voies respiratoires, puisque le battement ciliaire est indispensable à l'épuration mucociliaire, et ces patients présentent également des otites chroniques. Dans quelques rares cas, les patients ont également une hydrocéphalie (Wessels et al., 2003) et la moitié des sujets atteints ont un *situs inversus* (positionnement des organes en miroir par rapport à la situation normale). On parle alors de syndrome de Kartagener.

A l'heure actuelle, certains gènes ont été identifiés comme impliqués dans ces pathologies. Parmi eux six gènes ont été caractérisés : 4 gènes codant des chaînes de dynéine : *DNAI1*, *DNAH5*, *DNAH9* et *DNAH11*, le gène *RPGR* (Moore et al., 2006) qui code un régulateur de la guanosine triphosphate indispensable au maintien de la survie des photorécepteurs (Meindl et al., 1996), le sixième gène est *TXNDC3* et code une thioredoxine impliquée dans l'assemblage des spermatozoïdes (Pennarun et al., 1999; Bartoloni et al., 2001; Bartoloni et al., 2002; Olbrich et al., 2002; Duriez et al., 2007). Concernant les trois autres loci bien que la localisation chromosomique soit connue, les

gènes en cause n'ont pas encore été isolés.

Jusqu'à présent les analyses des cils de ces patients, faites en microscopie électronique à transmission, ont révélé des défauts de structure axonémale et le plus souvent la perte des bras de dynéine externe, mais une étude récente réalisée par *Schwabe et al. en 2008* (Schwabe et al., 2008) montre que des patients atteints de PCD, qui présentent une mutation dans le gène DNAH11, ne présentent pas de défauts de structures axonémales.

2. Les polykystoses rénales (PKD) :

Les patients atteints de polykystoses rénales souffrent d'insuffisance rénale sévère. Deux formes de cette maladie existent, la forme autosomique dominante qui est assez fréquente en Europe puisque la prévalence est de 1/1000 (ADPKD), et la forme autosomique récessive qui est plus rare 1/10 000 (ARPKD). L'analyse du génome de certains patients atteints de la forme ARPKD révèle la présence de mutations dans le gène *PKHD1* qui code la polyductine (ou fibrocystine) protéine localisée dans les cils primaires des cellules rénales. Il a été suggéré que cette protéine serait un récepteur affectant la différenciation des cellules des canaux collecteurs (Ward et al., 2002; Xiong et al., 2002; Ward et al., 2003). Pour la forme dominante ADPKD, des mutations ont été retrouvées dans deux gènes *Pkd1* (European Polycystic Kidney Disease Consortium 1994) et *Pkd2* (San Millan et al., 1995). Les produits de ces deux gènes sont la polycystine 1 et 2, qui sont des protéines transmembranaires, qui interagissent afin de former un canal calcique dans les cils primaires des cellules épithéliales rénales (Gonzalez-Perrett et al., 2001; Yoder et al., 2002; Nauli et al., 2003).

3. Les néphronophyses (NPHP) :

Il s'agit d'une maladie autosomique récessive qui est caractérisée comme les PKD par la présence de kystes dans les reins qui conduisent à une insuffisance rénale sévère. Sa prévalence est de 1/100 000 personnes. Il y a trois formes de néphronophyse : la néphronophyse juvénile, forme la plus fréquente, elle évolue vers l'insuffisance rénale terminale avant l'âge de 15 ans, certains enfants présentant également des signes extra-rénaux comme une dégénérescence rétinienne (on parle alors de syndrome de Senior-Loken), un déficit intellectuel, une ataxie cérébelleuse, ou encore des anomalies osseuses

ou une atteinte hépatique. Dans la néphronophthise infantile, on retrouve une atteinte rénale grave évoluant vers l'insuffisance rénale terminale avant l'âge de cinq ans. La néphronophthise tardive est une forme plus rare. Les signes cliniques et histologiques sont comparables à ceux de la forme juvénile, mais l'âge auquel l'insuffisance rénale atteint le stade terminal est retardé par rapport à la forme juvénile, avec un âge moyen de 19 ans.

Cinq gènes ont été identifiés comme étant liés aux néphronophthises. Le premier gène identifié est *NPHP1* (JBTS4) et code une protéine impliquée dans la division cellulaire, l'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice (Saunier et al., 1997). Les mutations du gène *NPHP2* (*INVS*) (Otto et al., 2003) codant l'inversine (le rôle de cette protéine sera traité dans la suite), sont responsables de la forme infantile. Des mutations du gène *NPHP3* (code une protéine de fonction inconnue) (Olbrich et al., 2003) sont responsables de la forme tardive, des mutations du gène *NPHP4* (code une protéine de fonction inconnue) (Otto et al., 2002) ont été mises en évidence dans plusieurs familles dont certaines ont une atteinte rétinienne associée (syndrome de Senior-Loken) et enfin des mutations de *NPHP5* (*IQCB1*) (code une protéine ayant un domaine de liaison à la calmoduline) (Otto et al., 2005) ont été identifiées.

4. Les dystrophies rétiniennes :

La dystrophie rétinienne ou rétinopathie est une affection congénitale de la rétine entraînant la perte progressive de la vue due à la dégénérescence des photorécepteurs. Des études récentes montrent que deux protéines, RP1 et RPGR, impliquées dans les rétinites pigmentaires sont localisées dans les cils des photorécepteurs. Des études *in vivo*, ont montré que RP1 est une protéine qui se lie aux microtubules et qui participe au contrôle de la taille et de la stabilité de l'axonème des photorécepteurs (Liu et al., 2004). RPGR, comme on l'a vu dans les PCD, est indispensable au maintien et la survie des photorécepteurs (Meindl et al., 1996).

Les patients qui présentent à la fois des atteintes rénales, polykystoses rénales, mais également des atteintes oculaires comme la dystrophie rétinienne, souffrent du syndrome de Senior-Loken (SLS) (Hildebrandt and Zhou, 2007). On retrouve chez les patients atteints de ce syndrome des mutations dans les gènes *NPHP1*, 3, 4 et 5 (Otto et al., 2005). De manière intéressante, *NPHP5* interagit avec RPGR dans la rétine et est localisé dans les cils des photorécepteurs mais aussi dans les cils primaires des cellules épithéliales rénales.

B. CILS ET CILIOPATHIES

Gènes	Localisation chromosomique	Localisation cellulaire	Fonctions putatives
BBS1	11q13	Corps basal cil	Fonction ciliaire
BBS2	16q21	Corps basal cil	Fonction ciliaire/formation flagelles
BBS3/ARL6	3p12-q13	Corps basal cil	Trafic vésicules
BBS4	15q23	Corps basal cil/péricentriolaire	Transport microtubules
BBS5	2q31	Corps basal cil	Fonction ciliaire/formation flagelles
BBS6/MKKS	20p12	Corps basal cil	Fonction ciliaire/formation flagelles Chaperon
BBS7	4q32	Corps basal cil	Assemblage de particules d'IFT
BBS8/TTC8	14q31	Corps basal cil	Assemblage de particules d'IFT
BBS9/B1	7p14.3	Inconnue	Inconnue
BBS10	12q21.2	Inconnue	Inconnue (chaperon?)
BBS11/TIM32	9q31-34.1	Inconnue	Ubiquitine ligase
BBS12	4q27	Inconnue	Chaperon

Tableau 1 : Les gènes BBS.

Ce tableau fait état des connaissances concernant les gènes BBS, la localisation cellulaire des protéines BBS et les fonctions putatives des différentes protéines. Tableau tiré de *Tobin and Beales, 2007*.

Ces données illustrent le fait qu'un dysfonctionnement ciliaire va provoquer tout un ensemble de phénotypes.

5. *Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS) :*

Le syndrome de Bardet-Biedl est un syndrome rare avec une prévalence de 1/160 000, qui est caractérisé par un ensemble de symptômes complexes associant une polydactylie, une obésité, une rétinopathie, un retard mental (Koenig, 2003). Chez certains patients on retrouve également une atteinte cérébrale puisqu'ils présentent une agénésie ou une hypoplasie du Corps Calleux. Il s'agit d'une maladie génétique hétérogène, d'origine ciliaire, au moins 12 loci y sont impliqués. La majorité des protéines BBS montre une localisation ciliaire ou participent à l'IFT (voir tableau 1).

Les gènes *bbs9* à *bbs12* sont les derniers gènes *bbs* récemment découvert et leur lien avec la ciliogenèse et/ou l'IFT n'a pas encore été démontré. Au vu de la similitude existant entre BBS6 et les protéines BBS10 et BBS12, il a été suggéré que ces protéines comme BBS6 sont impliquées dans la conformation protéique en tant que chaperons. *bbs11* code une ubiquitine ligase qui pourrait être impliquée dans la dégradation protéique et donc intervenir dans la régulation de la stabilité et/ou la durée de vie des protéines associées au corps basal et de l'IFT. La localisation cellulaire de ces nouvelles protéines BBS n'a pas encore été étudiée et leurs fonctions *in vivo* n'ont pas encore été explorées.

6. *Le syndrome d'Alstrom (ALMS) :*

Ce syndrome est une ciliopathie extrêmement rare (1/1 000 000). Son mode de transmission est autosomal récessif et un des gènes responsables est *ALMS1*. Les patients atteints de ce syndrome présentent des phénotypes semblables à ceux observés dans le cas de BBS comme les rétinites pigmentaires, l'obésité ou encore le diabète mais ne présentent pas de polydactylie, ni de retards mentaux. La protéine *ALMS1* est retrouvée dans le centrosome et le corps basal des cils comme certaines protéines BBS (Hearn et al., 2005).

7. *Le syndrome Orofaciodigital (OFD) :*

Ce syndrome orofacioidigital est une maladie liée à l'X qui est caractérisée par des malformations de la face, de la cavité buccale et des membres (polydactylie). Les patients présentent également une pathologie rénale et parfois des défauts de développement du

système nerveux central. Le gène *Ofd1* code la protéine OFD1 qui est localisée au centrosome et dans le corps basal des cils (Romio et al., 2004) et est nécessaire à la formation des cils (Ferrante et al., 2006). Les mutants murins pour *Ofd1*^{-/-}, n'ont pas de cils dans le nœud embryonnaire. La perte des cils du nœud serait à l'origine du phénotype de *situs inversus* retrouvé chez ces mutants murins.

8. Les syndromes de Meckel-Gruber et de Joubert :

a. Le syndrome de Meckel-Gruber (MKS) :

Le syndrome de Meckel-Gruber est un syndrome caractérisé par l'apparition de kystes rénaux, d'une fente palatine, de fibrose hépatique, de polydactylie et de défauts de formation du système nerveux central incluant pour certains patients une agénésie du Corps Calleux ou encore une encéphalocèle occipitale (défaut de fermeture du tube neural). La prévalence de cette pathologie est d'environ 1/10 000 et implique cinq loci (de *MKS1* à *MKS5*). Il est intéressant de noter que *MKS3* correspond à une mutation dans le gène *JBTS6* (*TMEM67*), que *MKS4* correspond à une mutation dans le gène *CEP290* ou *JBTS5* (code la néphrocystin 6, protéine centriolaire) et que *MKS5* est due à une mutation dans le gène *JBTS7* (*RPGRIP1L* ou *CORS3*) (code une protéine localisée dans le corps basal et dans les cils primaires).

Récemment il a été montré que des mutations dans le gène *NPHP3* (Bergmann et al., 2008), ou dans des gènes *bbs* conduisent à des phénotypes retrouvés dans le MKS (Karmous-Benailly et al., 2005; Leitch et al., 2008). Ces données suggèrent que les BBS, les MKS et également les NPHP, bien que cliniquement distinctes, sont dues à la déficience des mêmes gènes.

b. Le syndrome de Joubert (JBTS) :

Le syndrome de Joubert a une prévalence de 1/100 000 et est caractérisé par un retard de développement, des anomalies de la respiration, des anomalies des mouvements oculaires, une hypoplasie du cervelet et dans 10% des cas les patients sont atteints de la malformation de Dandy-Walker (malformations cérébrales et notamment atteinte du cervelet, et hydrocéphalie chez plus de la moitié des patients).

Sept loci ont été identifiés comme étant à l'origine du syndrome de Joubert. En

1	Malformation de Dandy Walker
2	Agénésie du Corps Calleux
3	<i>Situs inversus</i>
4	Encephalocoele région postérieure (défaut fusion des os du crâne)
5	Maladie polykystique rénale
6	Polydactylie
7	Maladie du foie
8	Rétinite pigmentaire
9	Retard mental

Tableau 2 : Critères phénotypiques de diagnostic de ciliopathies.

Les paramètres phénotypiques classés par ordre d'importance pour l'établissement d'un diagnostic prédictif de ciliopathie.

Tableau tiré de *Badano et al., 2006.*

effet, on retrouve associé à cette ciliopathie des mutations dans *JBTS1/CORS1* (type de gène inconnu) (Saar et al., 1999), dans *JBTS2 (CORS2)* (type de gène inconnu) (Keeler et al., 2003), dans *JBTS3 (AH11)* (fonction de la protéine codée inconnue) (Ferland et al., 2004), dans *JBTS4 (NPHP1)* (même gène impliqué que dans les NPHP) (Parisi et al., 2004), dans *JBTS5 (CEP290 ou MKS4)* (Sayer et al., 2006), dans *JBTS6 (TMEM67 ou MKS3)* et dans *JBTS7 (RPGRIPL1 ou MKS5 ou CORS3)* (Delous et al., 2007). On retrouve parmi ces loci associés au JBTS, des gènes qui sont également impliqués dans d'autres ciliopathies comme les *NPHP* ou encore les *MKS*.

9. De nouvelles ciliopathies ?

L'étude des symptômes que présentent les patients humains atteints de ciliopathies, a permis d'établir un diagnostic prédictif de ciliopathie. En effet, ce diagnostic est basé sur la combinatoire phénotypique retrouvée chez un patient. Neuf caractéristiques communes aux BBS, SLS, OFD1, MKS et JBTS ont servi à établir ce diagnostic prédictif : les rétinites pigmentaires, les maladies kystiques rénales, la polydactylie, le situs inversus, le retard mental, l'hypoplasie du Corps calleux, les malformations du syndrome de Dandy Walker (défauts de formation du cerveau postérieur comme une hypoplasie du cervelet, une dilatation du 4^{ème} ventricule et chez la moitié des patients ayant un syndrome de Dandy Walker ils présentent également un retard mental et pour certains d'entre eux une hydrocéphalie), l'encéphalocoèle (défaut de fermeture du tube neural) et enfin les maladies hépatiques. L'équipe de *Badano et al., 2006* a alors réalisé des recherches afin de déterminer les proportions de patients, atteints de ciliopathies, qui présentaient ces différents symptômes. Cette étude a permis de déterminer l'occurrence et donc l'importance relative de chacune de ces caractéristiques. Ils ont ainsi classé les phénotypes en fonction de leur poids dans l'établissement d'un diagnostic prédictif de ciliopathie. Le tableau qui en a découlé (tableau 2) révèle que les malformations cérébrales que sont les malformations de Dandy-walker (DWM) ou encore l'agénésie du Corps Calleux sont les deux meilleurs critères phénotypiques pour permettre l'établissement de ce diagnostic prédictif de ciliopathie. Afin de valider leur classement, ils ont recherché les pathologies associant deux de ces critères : DWM et le situs inversus (3^{ème} position après l'agénésie du

Corps Calleux). Parmi les pathologies qui sont sorties via ce crible, 3 ont été retenues : Ellis-Van Creveld, Asphyxiating thoracic dystrophy (ATD) et Marden-Walker.

Une étude récente menée par *Beales et al., en 2007* valide la pertinence de cette étude de diagnostic prédictif en confirmant que certains patients de l'ATD présentent des mutations dans le gène *Ift80*, codant une protéine de l'IFT. Deux locus sont retrouvés comme étant impliqués dans ce syndrome ATD1 et ATD2/IFT80. Les patients atteints de ce syndrome, autosomal récessif, présentent des défauts de formation du thorax conduisant à des insuffisances respiratoires, dans certains cas des atteintes rénales sont observées ainsi qu'une polydactylie.

Les patients atteints d'Ellis-Van Creveld (EVC) sont de petites tailles avec des membres courts, ils présentent en plus une polydactylie, des défauts cardiaques, des kystes dans le pancréas, le foie et les reins. Plusieurs patients présentent également une dégénérescence rétinienne.

Dans le cas du syndrome de Marden-Walker, les patients présentent une arachnodactylie (doigts plus long), des défauts de développement moteur et souvent des kystes rénaux, des malformations du syndrome de Dandy-Walker ainsi qu'une agénésie du Corps Calleux. Il reste encore à démontrer que les gènes mis en cause dans ces deux pathologies sont des gènes de ciliogenèse et donc à confirmer qu'il s'agit bien de ciliopathies.

Depuis ces dix dernières années, il est devenu clair que des défauts de fonctions ou de structures des cils sont impliqués dans des pathologies humaines. La connexion entre cils, corps basal et pathologies humaines a été facilitée par l'identification des gènes, conservés au cours de l'évolution, associés spécifiquement aux cils et au corps basal des cils.

L'altération des cils primaires est à l'origine de phénotypes multiples. L'observation de ces anomalies soulève l'interrogation suivante : comment une atteinte ciliaire peut conduire à des phénotypes divers et variés comme ceux rencontrés dans le cas de BBS ?

L'analyse de mutants murins, présentant des mutations dans les gènes de ciliogenèse, permet progressivement de comprendre les rôles des cils dans l'organisme et l'implication ciliaire dans le développement de certains phénotypes comme la polydactylie, les polykystoses rénales ou encore l'obésité. En revanche, l'implication des cils dans l'établissement de certains phénotypes complexes comme le retard mental ou certaines malformations cérébrales restent encore à être approfondi.

III. Rôles des cils chez les mammifères :

1. *Les cils motiles :*

Depuis longtemps, il est connu que la motilité des cils confère aux cellules qui les portent de nouvelles capacités. Leur présence dans le système respiratoire (sinus, trachée, poumon) permet l'évacuation de mucus, et ainsi la colonisation par des bactéries afin de limiter les risques d'infection. Bordant les parois ventriculaires cérébrales les cellules épendymaires multiciliées qui y battent, créent un flux nécessaire à la circulation du fluide cérébrospinal préservant ainsi l'homéostasie cérébrale. Les gamètes sont eux aussi pourvus de cils comme dans l'oviducte chez la femelle, ou bien sur les spermatozoïdes chez le mâle.

2. *Les cils primaires motiles : les cils du nœud embryonnaire :*

A l'heure actuelle, chez les mammifères, il n'y a qu'un seul type de cil primaire connu comme étant motile, il s'agit des cils primaires du nœud embryonnaire.

L'origine des défauts de latéralisation chez la moitié des patients PCD, qui présentent alors un syndrome de Kartagener, serait l'atteinte des cils primaires du nœud embryonnaire. En effet, des études faites chez la souris sur le nœud embryonnaire montre le rôle des cils primaires nodaux dans la mise en place de l'asymétrie droite/gauche. Ces cils primaires, sont les seuls décrits comme possédant des bras de dynéines. Les dynéines axonémales présentes dans ces cils leur confèrent une motilité caractéristique puisqu'ils n'ondulent pas, comme le font classiquement les cils motiles, mais ont un mouvement rotatoire. Ce mouvement conduit à la création d'un flux nodal dirigé vers la gauche qui est responsable de la mise en place de l'asymétrie droite/gauche (Nonaka et al., 1998; Nonaka et al., 2002; McGrath et al., 2003). Comment ce flux nodal peut être à l'origine de

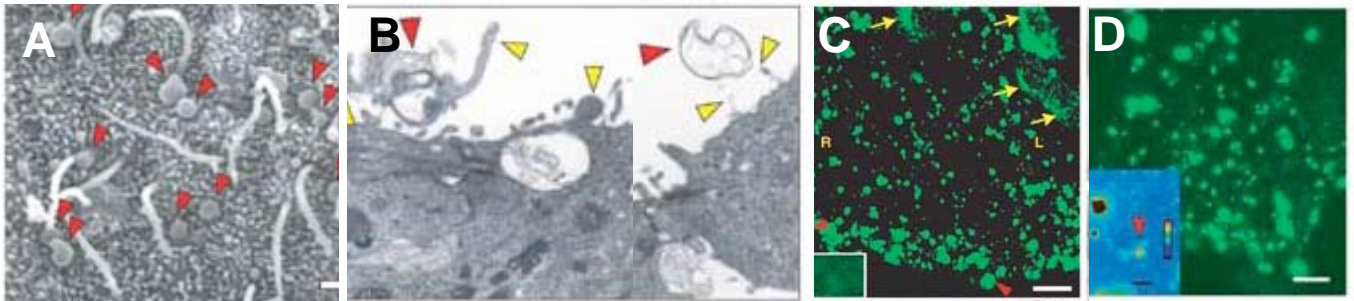


Figure 10 : Les particules vésiculaires du nœud embryonnaire.

On observe la présence de vésicules dans le nœud embryonnaire à la fois en microscopie électronique à balayage (A) mais aussi à transmission (B). Les immunomarquages révèlent que les particules contiennent du SHH (C) et également de l'acide rétinoïque (D). Illustrations tirées de *Tanaka et al., 2005*

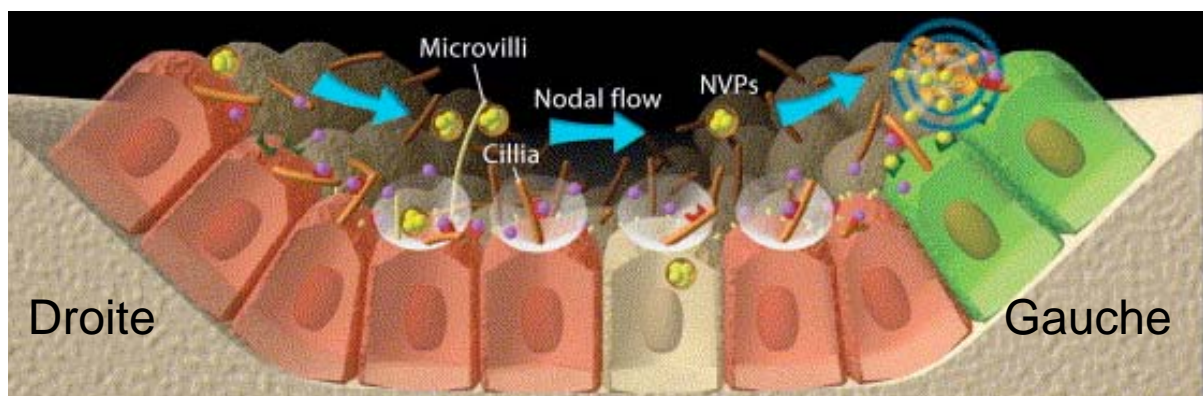


Figure 11 : Modèle d'établissement de l'asymétrie droite/gauche.

Les cils primaires localisés au centre du nœud sont motiles et émettent des mouvement rotatoire (cercles blancs) à l'origine de la création d'un flux dirigé de la droite vers la gauche (Nodal Flow). Les cellules du nœud embryonnaires re-larguent des particules (par bourgeonnement cytoplasmique) remplies de morphogènes (SHH et acide rétinoïque). Ces vésicules (jaunes) vont aller induire l'activation de voies de signalisation sur le flanc gauche de l'embryon, induisant la mise en place de l'asymétrie droite-gauche. Schéma tiré d'*Hirokawa et al., 2006*.

l'établissement de l'asymétrie droite/gauche ?

McGrath et al., en 2003 (McGrath et al., 2003) ont trouvé que seuls les cils primaires nodaux localisés au centre du nœud possédaient des bras de dynéine et qu'ils seraient donc les seuls responsables de la création du flux. En revanche, les cils primaires situés en périphérie du nœud seraient non motiles et serviraient de senseur de ce flux. Le flux ainsi créé conduit à l'ouverture d'un canal calcique dans les cils primaires non motiles localisés en périphérie. Ce canal constitué des polycystines 1 et 2 (PKD1 et PKD2) va permettre la création d'un flux de calcium asymétrique puisqu'il est retrouvé uniquement sur le côté gauche du nœud. Ce flux de calcium pourra ensuite induire une voie de signalisation afin d'induire l'asymétrie.

Tanaka et al., 2005 (Tanaka et al., 2005) proposent un autre mécanisme qui implique un relargage, induit par les FGF, de particules vésiculaires transportant du SHH et de l'acide rétinoïque (Figure 10). Une fois sécrétée ces particules seraient transportées par le flux et envoyées sur le flanc gauche de l'embryon afin d'y induire une signalisation SHH (Figure 11) (Hirokawa et al., 2006).

3. *Les cils primaires ou sensoriels :*

Les cils primaires ou sensoriels sont présents dans les photorécepteurs, à la surface des récepteurs auditifs et olfactifs mais ils sont également présents à la surface de la plupart des cellules quiescentes au sein de notre organisme. Des études récentes ont démontré le rôle majeur que jouent les cils primaires dans la régulation des voies de signalisation et l'homéostasie tissulaire. Comme on l'a vu précédemment, des mutations des gènes impliqués dans la formation ou la fonction des cils primaires conduisent à de nombreux désordres tels que des défauts de mise en place de l'asymétrie droite/gauche, des polykystoses rénales, des polydactylies, ou encore des anomalies de formation de structures cérébrales (hypoplasie du cervelet). L'analyse de mutants murins présentant des défauts de cils primaires permet de comprendre le rôle des cils dans la genèse de ces défauts.

Dans la suite de cette étude, je voudrais plus particulièrement m'intéresser aux rôles des cils dans la morphogenèse et notamment dans la transduction de signaux de types morphogénétiques. Je vais donc traiter du lien existant entre les cils et les voies de signalisation WNT et SHH.

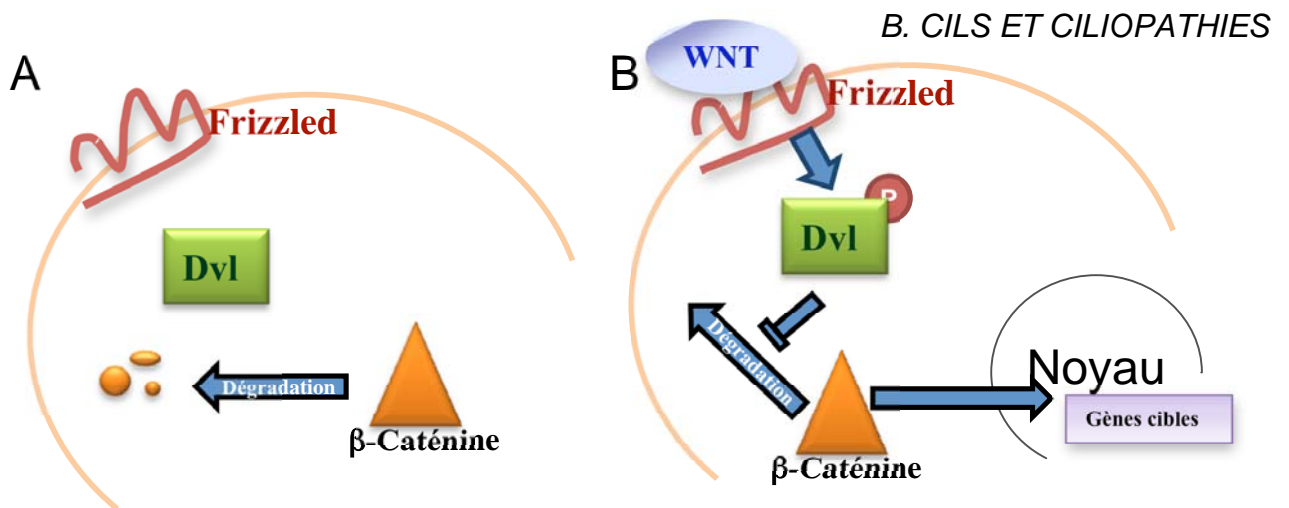


Figure 12 : La voie WNT canonique.

En absence de molécules WNT, la β -Caténine va être ciblée au protéasome et dégradée (A). En présence de WNT, sa fixation sur un complexe protéique composé du récepteur Frizzled (et de corécepteur) va activer Dvl. Une fois activé Dvl va inhiber la dégradation de la β -Caténine. La β -Caténine sera alors transloquée au noyau où elle est impliquée dans la régulation des gènes cibles de la voie WNT canonique (B) et notamment induit la prolifération cellulaire.

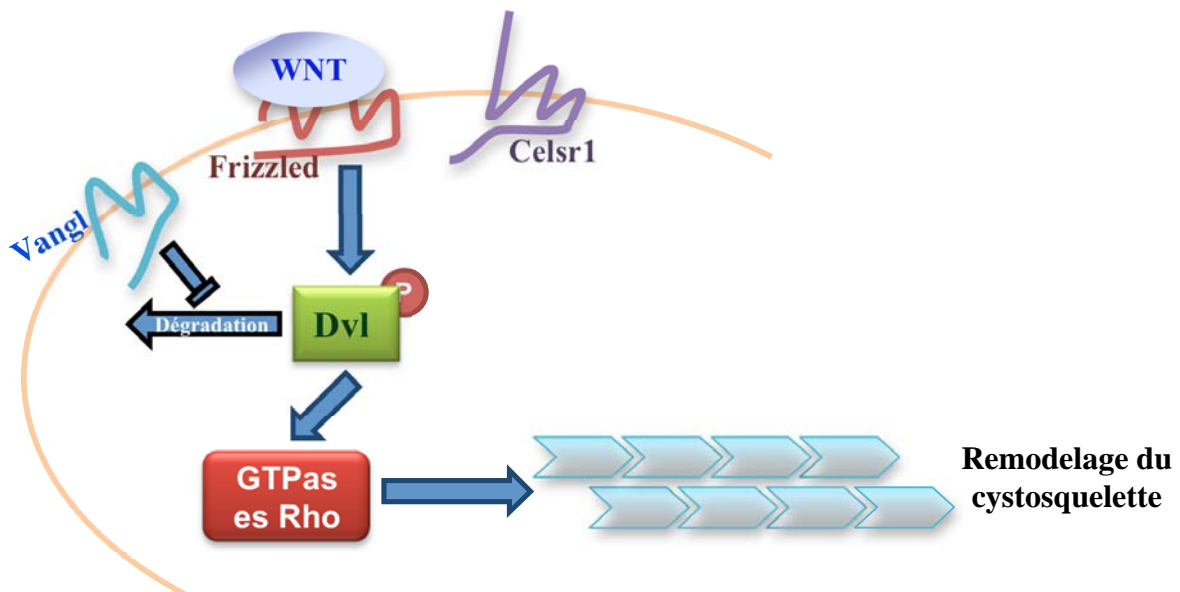


Figure 13 : La voie WNT non canonique/PCP.

Dans la voie WNT non canonique (PCP), WNT se lie toujours à son récepteur Frizzled pour activer Dvl, mais dans la suite de cette voie, la β -Caténine n'est pas impliquée. Dvl entraîne l'activation de protéines appartenant à la famille des GTPases Rho comme RhoA qui vont induire le remodelage du cytosquelette afin de polariser les cellules. Vangl, protéine transmembranaire inhiberait la dégradation de Dvl.

a. Les cils et la voie de signalisation WNT :

i. La voie de signalisation WNT :

La voie de signalisation WNT joue un rôle important au cours du développement embryonnaire en régulant l'expression la croissance, la migration, le déterminisme et la polarisation cellulaires. Elle a été particulièrement étudiée chez le nématode, la drosophile et les amphibiens et pas moins de 19 gènes *Wnt* ont été identifiés chez les vertébrés.

Cette voie de signalisation est divisée en plusieurs voies de transduction bien distinctes. D'un côté on retrouve la voie canonique WNT/ β -Caténine-dépendante qui contrôle la stabilité de la protéine cytoplasmique β -Caténine (Logan and Nusse, 2004; Clevers, 2006) et qui lorsqu'elle est activée induit la prolifération cellulaire (figure 12), et de l'autre on a la voie non canonique qui englobe à la fois la voie de signalisation de la polarité planaire (PCP) (remodelage du cytosquelette) (Veeman et al., 2003) (figure 13) et une voie de signalisation calcique (je ne traiterais pas de cette voie WNT dans la suite), ces deux voies sont dites β -Caténine-indépendantes.

- La voie WNT canonique :

Dans la voie de signalisation WNT canonique, WNT extracellulaire se lie à son récepteur Frizzled entraînant l'activation de Disheveled (Dvl) intracellulaire. Cela va conduire à l'inhibition de la dégradation de la β -Caténine, donc à sa stabilisation. Elle pourra alors être transloquée au noyau afin d'y réguler l'expression de ses gènes cibles. L'activation de la voie WNT canonique conduit à la prolifération ou encore à la différenciation cellulaire (figure 12).

- La voie WNT non canonique/PCP :

Historiquement, la voie PCP a d'abord été découverte et étudiée chez la drosophile, où il a été montré que des mutations dans les gènes PCP conduisaient à des défauts de polarisation des poils et des soies, leur orientation étant alors rendue complètement aléatoire (figure 14) (Gubb and Garcia-Bellido, 1982). Chez les vertébrés, il a été montré que la signalisation WNT/PCP joue un rôle important dans les mécanismes de convergence-extension (mouvements cellulaires coordonnés) qui sont nécessaires lors de la gastrulation ou de la fermeture du tube neural (Figure 15A). Cette voie de signalisation

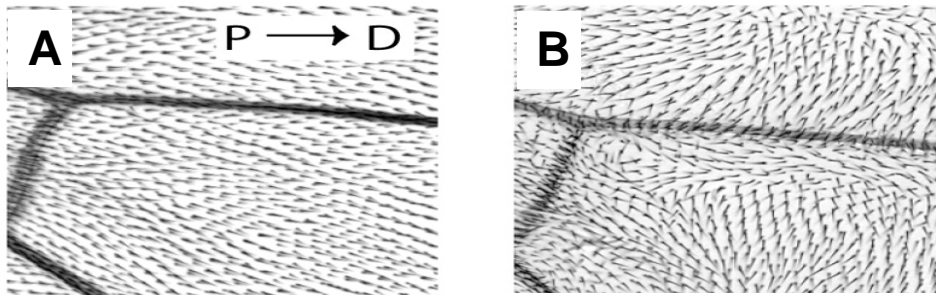


Figure 14 : Orientation des poils sur les ailes de drosophiles.

Chez la drosophile sauvage on constate que les poils sont disposés parallèlement les uns par rapport aux autres (A). Chez la drosophile qui présente une mutation dans le gène PCP *Vangl*, les poils sont disposés de façon aberrante sans organisation apparente (B). D'après Wang *et al.*, 2006.

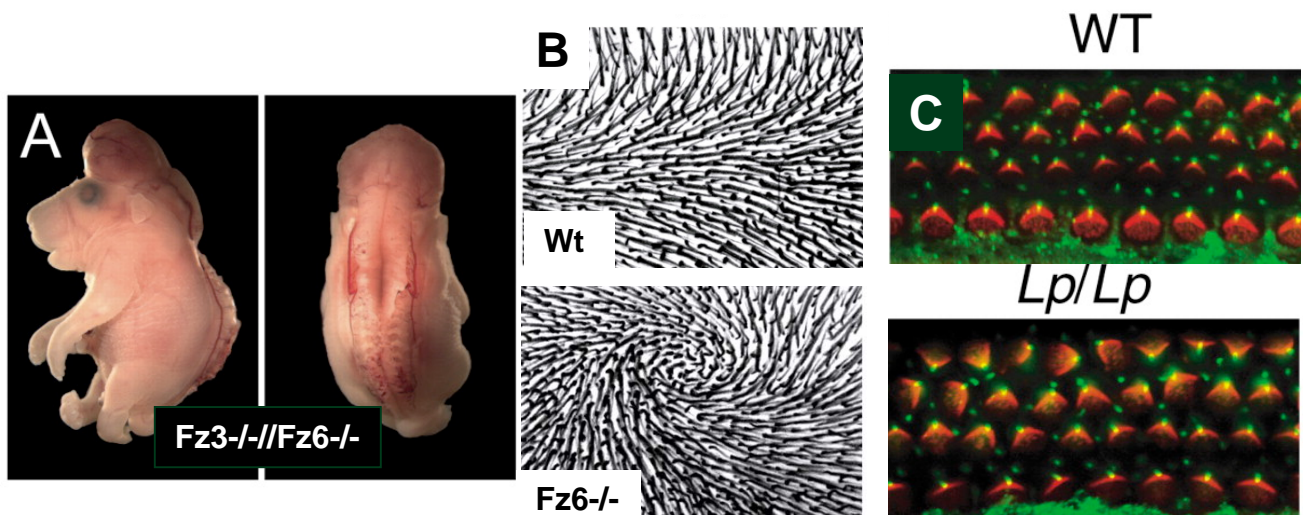


Figure 15 : Phénotypes de mutants murins de PCP.

La voie de signalisation PCP régule les mécanismes de convergence-extension nécessaires à la neurulation. Des défauts de cette voie de signalisation peuvent donc conduire, chez des mutants PCP, à des défauts de neurulation traduits par une craniorachistose (A). Cette voie de signalisation intervient également dans la mise en place de la polarité planaire cellulaire (orientation des cellules dans le plan de l'épithélium) notamment pour la disposition des poils du pelage (B), des cils sensoriels de l'oreille interne (C). D'après Wang *et al.*, 2006.

WNT non canonique permet l'établissement du pelage, puisque chez des mutants murins PCP les poils sont complètement désorientés (figure 10B), mais aussi l'orientation des stéréocils sensoriels de l'oreille interne (figure 15C).

Au niveau moléculaire, WNT se lierait toujours sur son récepteur membranaire Frizzled afin d'activer une cascade de signalisation, via les protéines GTPases Rho, conduisant ainsi au remodelage du cytosquelette (figure 13).

ii. Lien entre cils et voie de signalisation WNT :

Au vu des phénotypes retrouvés chez les patients et chez les modèles murins, atteints de ciliopathies, l'existence d'un lien entre les cils et la voie de signalisation WNT/PCP a été proposée. Certains mutants murins de ciliogenèse présentent des défauts de mise en place de la polarité planaire cellulaire dans la cochlée, c'est le cas des mutants pour les gènes *bbs* (*bbs1*, *bbs4* et *bbs6*) (Figure 16), qui codent des protéines du corps basal ciliaire, ou pour le gène *Ift88* ou le gène *Kif3a* (mutants conditionnels dans des cellules de cochlée) (Ross et al., 2005; Jones et al., 2008). De plus, on observe des défauts de fermeture du tube neural chez les mutants murins de ciliogenèse déficients pour les gènes *Ift88*, *Ift172*, *Dnchc2*, *RPGRIP1L(Ftm)*, *Hnn* (petite GTPase ciliaire) (Figure 17) (Huangfu and Anderson, 2005; Liu et al., 2005; Caspary et al., 2007; Vierkotten et al., 2007).

L'étude de l'origine des polykystoses rénales, chez les mutants de ciliogenèse, montre l'implication des cils dans la morphogénèse rénale et dans la voie de signalisation WNT. Le mutant murin *invs* présente une polykystose rénale, ce gène code l'inversine. Cette protéine ciliaire est nécessaire pour inhiber la signalisation WNT canonique afin de limiter la prolifération cellulaire dans les tubules rénaux. En contexte sauvage, le taux d'inversine intracellulaire augmente en réponse au flux d'urine dans les tubules rénaux. La transfection de cellules HEK293T avec l'inversine entraîne la diminution du taux de Dvl en réponse au recrutement du protéasome (Simons et al., 2005).

De même, le mutant *Kif3a*^{-/-} présente une polykystose rénale associée à une dérégulation de la voie WNT canonique avec une stabilisation de la β -caténine soluble endogène (Lin et al., 2003; Corbit et al., 2008). La perte des protéines BBS (BBS1, BBS4 et BBS6) dans des cultures de cellules ciliées (cellules rénales) et dans des embryons de zebrafish, induit également une stabilisation de la β -caténine (Gerdes et al., 2007). Les

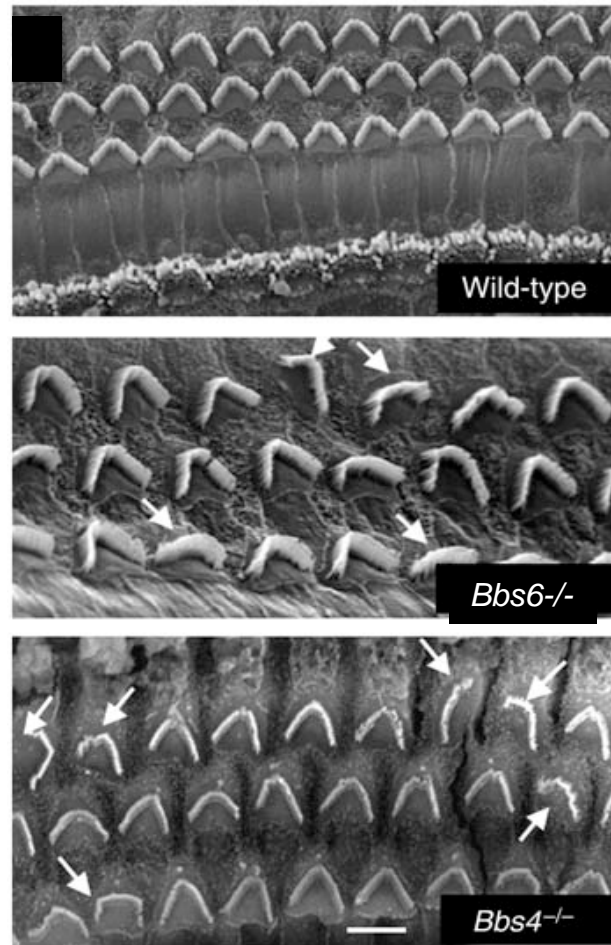


Figure 16 : Défauts de polarité planaire dans la cochlée.

On observe chez des mutants de ciliogenèse comme *bbs6*^{-/-} ou *bbs4*^{-/-}, des défauts de mise en place de la polarité planaire. D'après *Ross et al., 2005*.

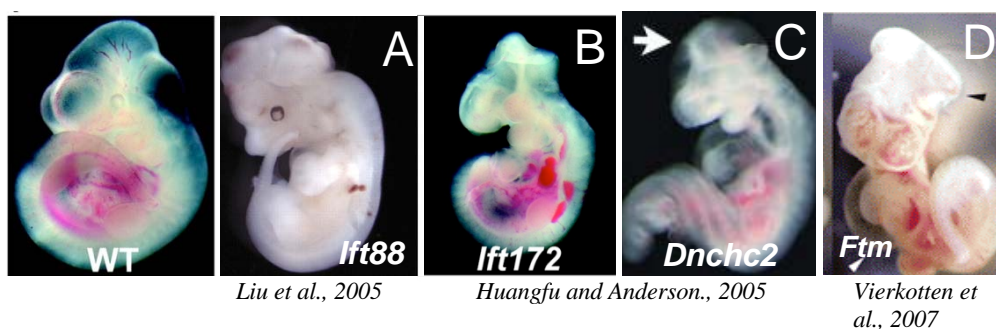


Figure 17 : Mutants murins présentant des défauts de fermeture du tube neural.

Des défauts de fermeture du tube neural sont retrouvés chez des mutants de ciliogenèse;

En effet, on observe des exencéphalies chez le mutant *Ift88* (A), *Ift172* (B), *Dnchc2* (C) qui sont affectés pour un gène codant des protéines de l'IFT, ou encore chez le mutant *Ftm* (D) affecté pour un gène codant une protéine du corps basal du cil.

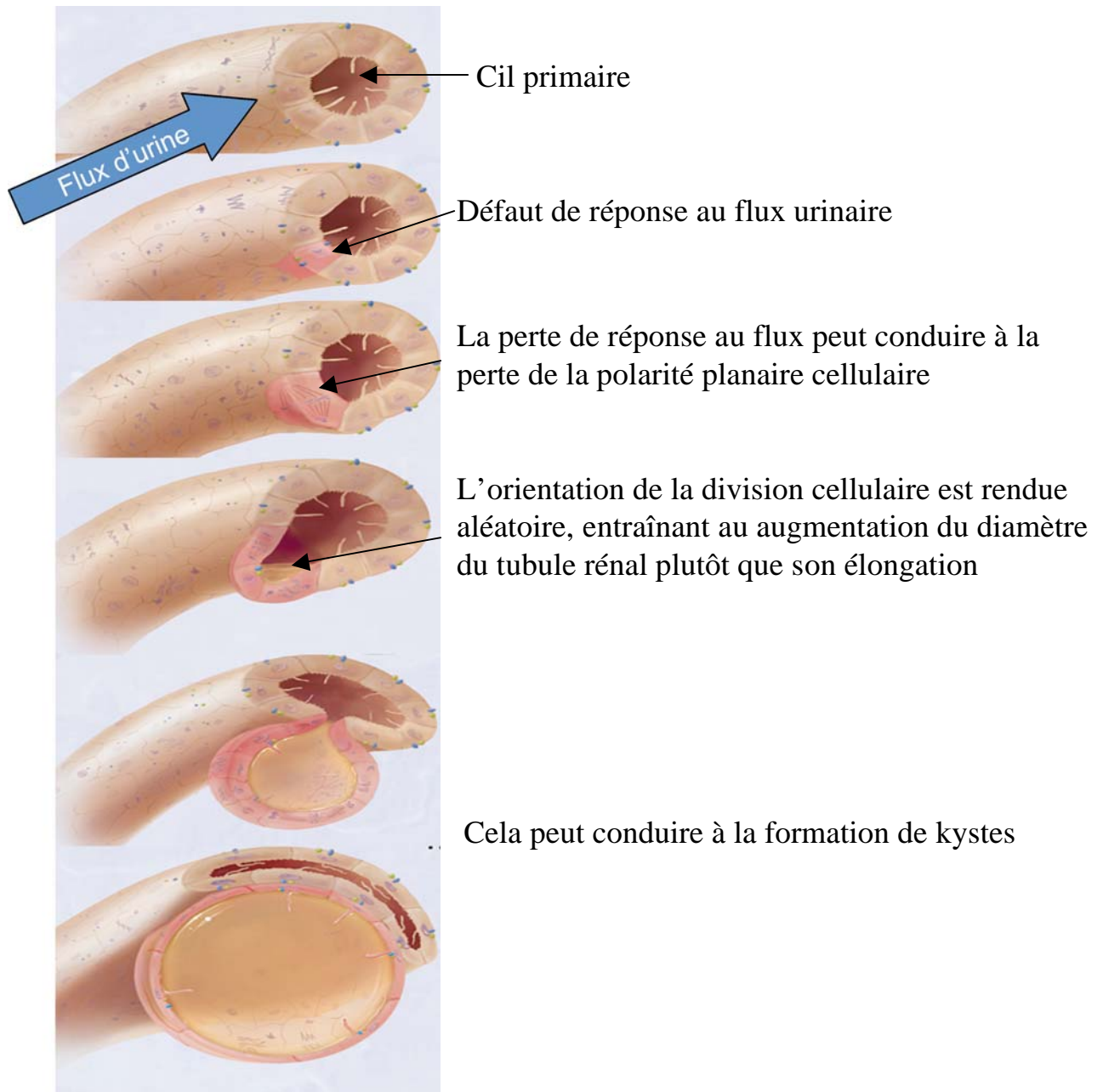


Figure 18 : Modèle de formation kystique dans les tubules rénaux.

La formation de kystes dans les tubules rénaux peut être due à un défaut de réponse des cils à un stimulus mécanique comme le flux d'urine. Cela peut conduire à la perte de la polarité planaire cellulaire et à des divisions cellulaires organisées aléatoirement pouvant induire la formation de kystes.

D'après *Kolb et Nauli., 2008.*

protéines BBS sont localisées au corps basal et BBS4 interagit spécifiquement avec une sous unité du protéasome, RPN10 (Gerdes et al., 2007). Il a donc été proposé que les cils primaires sont nécessaires au recrutement du protéasome permettant ainsi l'induction de la voie de signalisation WNT non canonique au détriment de la voie WNT canonique.

Le modèle de formation des tubules rénaux qui émergent de ces données est le suivant : en réponse au flux d'urine, les cils présents à la surface des cellules de l'épithélium rénal vont induire la production d'inversine. L'inversine intracellulaire va promouvoir la voie WNT/PCP, via le ciblage au protéasome de Dvl cytoplasmique, et cela va donc permettre aux cellules de s'agencer les unes par rapport aux autres concourant ainsi à l'élongation des tubules rénaux plutôt qu'à l'augmentation de la taille de ces tubules (puisque la voie WNT canonique/prolifération cellulaire est inhibée).

En cas d'atteinte ciliaire, la voie WNT canonique est dérégulée, l'orientation de la division cellulaire est alors rendue aléatoire et conduit à l'augmentation du diamètre des tubules rénaux et à la formation des kystes (Figure 18).

b. Cils et voie de signalisation SHH :

i. La voie de signalisation SHH :

Les protéines Hedgehogs sont une famille de protéines conservées au cours de l'évolution. Elles interviennent à différents niveaux au cours du développement embryonnaire sur le contrôle du devenir cellulaire. Chez les vertébrés, elles sont notamment impliquées dans la formation du tube neural mais également dans différentes organogenèses et parmi elles, je vais traiter la morphogenèse des membres et celle du cervelet.

La lipoprotéine SHH, sécrétée par les cellules, se fixe sur son récepteur Patched (PTCH). Cette fixation ligand-récepteur a pour effet d'abolir l'inhibition créée par PTCH sur le récepteur transmembranaire Smoothed (SMO) (Alcedo and Noll, 1997; Murone et al., 1999). Une fois activé, SMO induit les médiateurs de la voie de signalisation SHH que sont les protéines GLI. Il y a trois protéines GLI : GLI1 qui a un domaine activateur, GLI2 et GLI3 qui possèdent à la fois un domaine activateur et un domaine répresseur (Dai et al., 1999). Lorsque la signalisation SHH est activée, les médiateurs GLI sont maturés en leur forme activatrice GLIA. En revanche, en absence de SHH, les protéines GLI2 et GLI3 sont clivées en leur forme répresseur nommée GLIR. Les protéines une fois sous leur forme

En absence de SHH

En présence de SHH

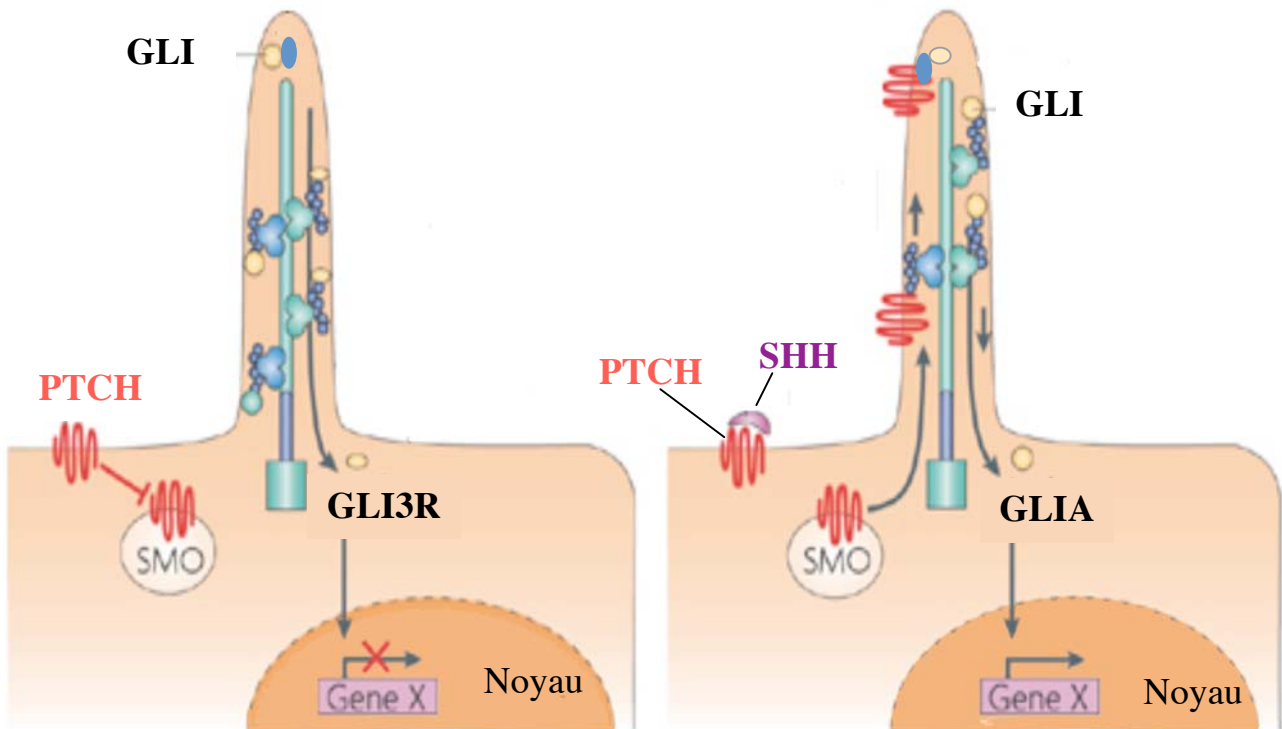


Figure 19 : Cil et voie de signalisation SHH.

En absence de SHH, Patched (PTCH) inhibe le récepteur Smoothened (SMO), il n'y a donc pas de transduction de signal. Au sein du cil, cela se traduit par la maturation de GLI en sa forme répressive GLIR. Il va y avoir translocation nucléaire de GLIR afin de réprimer l'expression génique des cibles.

En présence de SHH, l'inhibition de PTCH sur SMO est levée par la fixation de SHH sur PTCH, SMO va donc permettre la transduction du signal via le cil. Cela va conduire à l'activation des GLI en GLIA qui pourra alors réguler l'expression des gènes cibles dans le noyau.

Tirée et modifiée de *Fliegauf et al., 2007*.

GLIA ou GLIR sont transloquées au noyau afin d'activer ou de réprimer les gènes cibles de la voie de signalisation de SHH (telles que *Ptch* ou encore *Gli1*).

ii. IFT et la voie de signalisation SHH :

Ces dernières années, l'analyse des phénotypes mutants des gènes de l'IFT chez la souris et des études de l'interaction épistasique, montrent que les protéines de l'IFT sont nécessaires à la régulation de l'expression des gènes cibles de la voie de signalisation SHH, en aval de PTCH (Huangfu et al., 2003). Parmi les gènes de ciliogenèse nécessaires à la voie de signalisation SHH, il y a notamment *Kif3A* (Kolpakova-Hart et al., 2007) (composant du moteur moléculaire antérograde), *Ift88*, *Ift172* (Huangfu et al., 2003; Huangfu and Anderson, 2005; Liu et al., 2005), *Ift52*, *Dnhc2* (composant du moteur moléculaire rétrograde) (May et al., 2005), *Hnn* (Casparly et al., 2007). Les mutants pour ces gènes de ciliogenèse présentent un phénotype de mutants de voie de signalisation SHH qui se traduit par la perte du devenir ventral des cellules de la moelle épinière caractérisable par la perte ou la diminution des marqueurs ventraux tels que *Shh* lui-même, *Nkx2.2* et *Foxa2*, et une extension en région ventrale de l'expression des marqueurs dorsaux comme *Pax6* et *Olig2*. Ces mutants présentent également une polydactylie qui serait due à l'atteinte de la voie de signalisation SHH.

Il a été montré qu'en présence de SHH, SMO (membranaire) va être relocalisée dans les cils (Corbit et al., 2005). En cas d'atteinte ciliaire, la localisation ciliaire de SMO est perdue (May et al., 2005). De plus, les trois protéines GLI sont également localisées dans les cils primaires (Haycraft et al., 2005) et la maturation des GLI en GLIA ou le clivage des GLI en GLIR nécessite l'intégrité ciliaire (May et al., 2005). Toutes ces données suggèrent que l'induction de la voie de signalisation SHH a besoin de l'intégrité ciliaire et conduit au modèle suivant. Lorsque SHH est présent, elle se fixe sur PTCH libérant SMO qui est relocalisée dans le cil. Au sein du cil, SMO permet l'induction de l'activation de GLI en GLIA. Les protéines sous forme GLIA induisent l'expression des gènes cibles de la voie de signalisation SHH dans le noyau (Figure 19B). En absence de SHH, SMO est séquestrée au cytoplasme par PTCH et dans les cils les protéines GLI sont clivées en GLIR. GLIR est alors transloquée au noyau afin d'y réprimer l'expression des gènes cibles de la signalisation SHH (Figure 19A) (Fliegeauf et al., 2007).

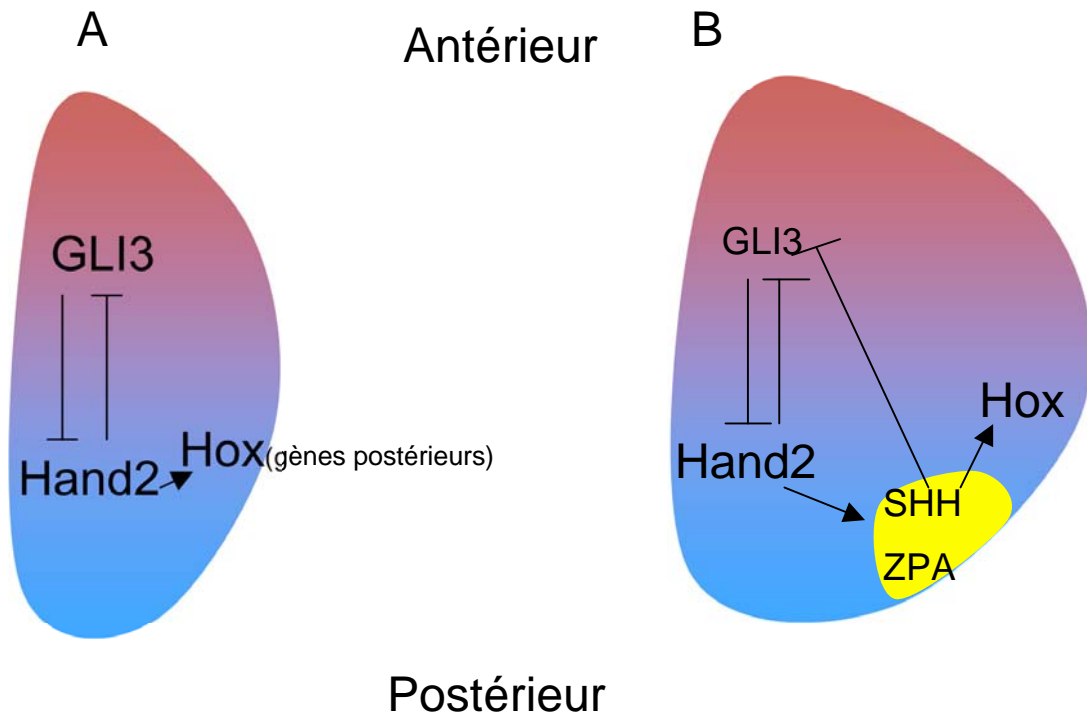


Figure 20 : Formation du bourgeon de membre.

Au départ, on observe la mise en place d'un pré-patron d'expression dans le bourgeon de membre. Ce pré-patron s'établit grâce à la répression mutuelle de Hand2 et de GLI3 (A). Il va permettre la formation de la ZPA, zone sécrétrice de SHH nécessaire à la morphogénèse des membres (B).

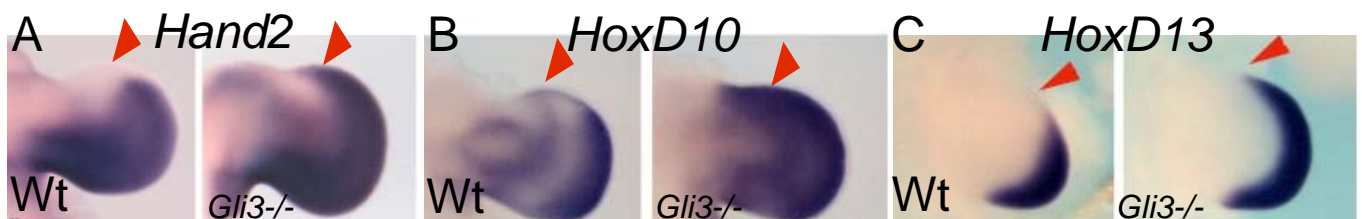


Figure 21 : Profil d'expression des gènes postérieurs dans les bourgeons de membre des mutants *Gli3*^{-/-}.

On observe une extension de l'expression de *Hand2* (A), *HoxD10* (B) et *HoxD13* (C) en région antérieure du bourgeon de membre chez les mutants *Gli3*^{-/-}. D'après *Fernandez-Teran et al., 2000*.

Des défauts d'induction de la voie de signalisation SHH entraînent un large éventail d'anomalies du développement allant de la létalité embryonnaire, aux défauts de mise en place du tube neural, à l'holoprosencéphalie (phénotype que je détaillerai dans la suite de mon travail), à la polydactylie ou encore à des défauts de latéralisation (McMahon et al., 2003).

J'aimerais dans la suite de cette étude, m'intéresser à la formation de la patte et aux rôles des cils dans cette morphogenèse.

iii. Cils et voie de signalisation SHH dans la patte :

- La formation des membres :

Au cours de la formation des membres, il y a l'établissement précoce selon l'axe antéro-postérieur d'un pré-patron d'expression de *Gli3* et de *Hand2*. La répression mutuelle exercée par ces protéines, GLI3 en région antérieure, et HAND2 en région postérieure permet la mise en place de la ZPA (Zone Polarizing Activity) côté postérieur (Figure 20A) (te Welscher et al., 2002). La ZPA se caractérise par la sécrétion de SHH et par l'expression des gènes *HoxD*.

Ce pré-patron est extrêmement important, en effet, si on injecte le cDNA de *Hand2* en région antérieure du bourgeon de membre chez le poulet, on affecte la polarisation antéro-postérieure du bourgeon et une duplication de la ZPA en région antérieure. Cette duplication est caractérisée par l'induction de la signalisation SHH (*Shh*, *Ptch* et *Gli1*) et de l'expression ectopique des marqueurs postérieurs comme *HoxD11* et *HoxD13*. Ce défaut de polarisation va conduire à la duplication des doigts ou polydactylie (Fernandez-Teran et al., 2000). Une greffe de la ZPA en région antérieure du bourgeon de membre entraîne également une polydactylie (Tickle et al., 1975; Saunders et al., 1976). Chez les souris *Shh*^{-/-}, on observe une réduction drastique du nombre de doigts, accompagnée de la perte de la signalisation de SHH (plus d'expression de *Gli1*, *Ptch*), de la perte d'expression des marqueurs postérieurs comme les gènes *HoxD* et une augmentation de GLI3 dans les bourgeons de membre en région postérieure (Chiang et al., 2001). A l'inverse, chez les souris *Gli3*^{-/-} qui présentent une polydactylie, on observe une extension de l'expression, dans la région antérieure, des marqueurs postérieurs comme *Hand2* (Figure 21A), et *HoxD* (Figure 21B et C) (Buscher et al., 1997; Sheth et al., 2007). Cette dérégulation de l'expression des marqueurs postérieurs entraîne une polydactylie. De manière intéressante, l'analyse du double mutant *Gli3*^{-/-} ; *Shh*^{-/-} révèle la présence d'une polydactylie qui est

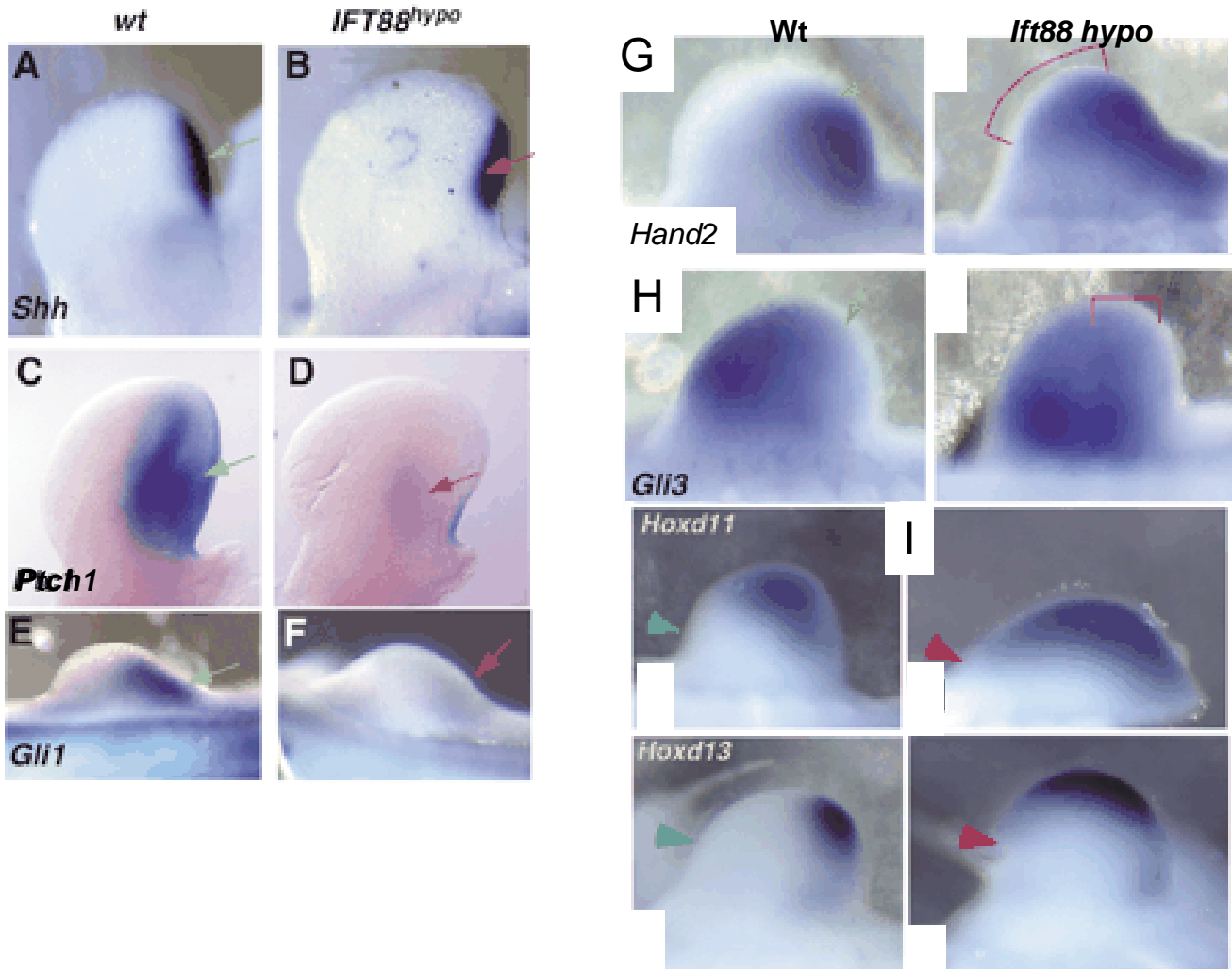


Figure 22 : Bourgeon de membre du mutant hypomorphe *Ift88*.

Dans le bourgeon de membre du mutant hypomorphe *Ift88*, on observe un défaut de signalisation SHH, puisque bien que SHH soit toujours présent en région postérieure (flèche) (B), on ne retrouve pas l'expression des gènes cibles de la signalisation SHH comme *Ptc1* (D) et *Gli1* (F) d'après la comparaison avec le profil d'expression génique dans le bourgeon de membre d'un embryon murin sauvage (A, C et E).

On constate un défaut de mise en place du pré-patron, gouverné par l'expression de *Hand2* (G), *Gli3* (H), qui conduit à l'extension de l'expression des gènes postérieurs *HoxD* en région antérieure du bourgeon de membre (I). D'après *Liu et al., 2005*.

indistinguable de celle retrouvée chez un mutant *Gli3*^{-/-} (Litingtung et al., 2002). Cela signifie qu'en cas de perte de *Shh*, les défauts de formation des doigts sont dus à un excès de la forme GLI3R, en région postérieure.

- Cils et formation des membres :

D'après l'équipe de *Badano et al.*, en 2006, l'un des critères phénotypiques qui concourt à l'établissement d'un diagnostic prédictif de ciliopathie est la polydactylie. Ce phénotype est retrouvé chez des patients atteints de BBS, OFD, MKS. Afin de déterminer comment une atteinte ciliaire conduit à un tel phénotype, des mutants murins de ciliopathies, présentant une polydactylie, ont été étudiés.

Chez les mutants *flexo* (allèle hypomorphe de *Ift88*), *Dnhc2*, *Ift52*, *Tg737*, on observe dans le bourgeon de membre une expression de *Shh* normale (Figure 22B), en revanche on n'observe pas l'expression des gènes cibles de la voie de signalisation SHH (Haycraft et al., 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005) (Figure 22D et F). En effet, les gènes *Ptch1* et *Gli1* ne sont pas exprimés. Cette perte d'induction de la signalisation SHH peut être due à la diminution de l'efficacité de maturation de GLI dans les cils en GLIA. De plus, l'extension de l'expression de *Hand2* (Figure 22G) et des gènes *HoxD* dans le bourgeon de membre des embryons *flexo* peut être expliqué par la perte pour la diminution du clivage de GLI3 en GLI3R. Et donc cette extension pourra réprimer l'expression de *Gli3* (Figure 22H). Donc l'intégrité ciliaire est nécessaire pour une signalisation SHH dans les bourgeons de membre.

Récemment, il a été montré qu'un défaut de la signalisation SHH dans les cellules du cervelet était à l'origine d'une hypoplasie du cervelet. De tels défauts de formation cérébelleuse sont des phénotypes rencontrés chez les patients atteints de ciliopathies, comme par exemple le syndrome de Dandy-Walker. J'ai donc voulu faire un bilan de nos connaissances sur le lien existant entre les cils et la voie de signalisation SHH au cours de la formation du cervelet.

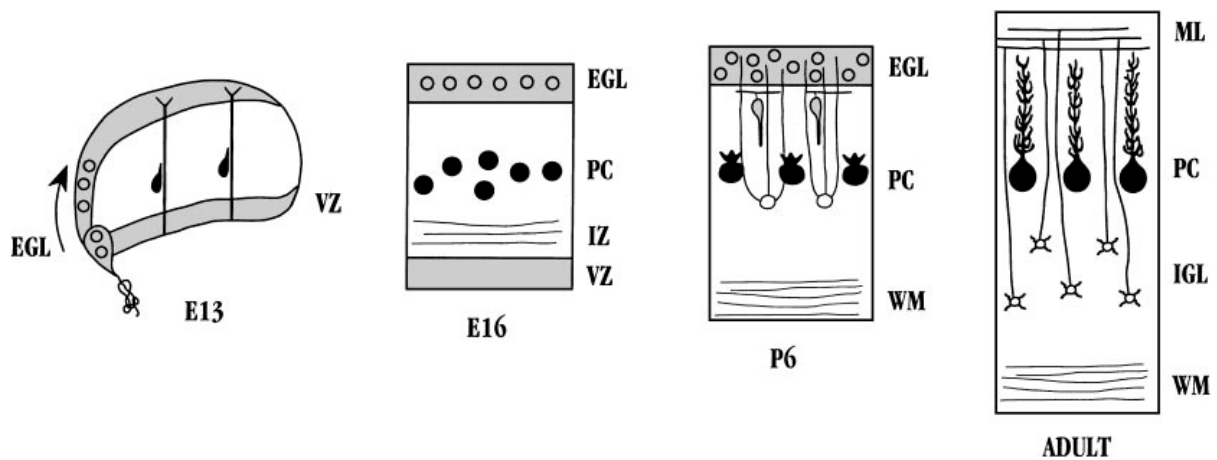


Figure 23 : Développement du cervelet.

Au stade précoce de développement, les progéniteurs de la lèvre rhombique (cellules blanches) migrent à la surface du cervelet et vont former l'EGL (External germinal layer). Pendant ce temps là, les cellules de Purkinje deviennent post-mitotiques et migrent vers les précurseurs du cervelet et forment la couche de cellules de Purkinje (cellules noires) (PC). Par la suite, les cellules du granule deviennent post-mitotiques et migrent dans le cortex du granule et forment la couche interne (IGL) en dessous de la couche des cellules de Purkinje.

VZ : zone ventriculaire, WM : matière blanche, ML : zone marginale.

iv. Les cils et la voie de signalisation SHH dans les cellules du cervelet :

- La formation du cervelet :

Par vagues de migration cellulaire progressives, plusieurs couches cellulaires se mettent en place afin de former le cervelet. Les progéniteurs des cellules granulaires proviennent de la lèvre rhombique et migrent à la surface du cervelet pour former la couche cellulaire externe granulaire (EGL). Au sein de l'EGL, les cellules granulaires prolifèrent sous la dépendance de SHH, qui est sécrété par les cellules de Purkinje (Lewis et al., 2004). Pendant la différenciation, les neurones granulaires migrent dans le cortex du cervelet le long de la glie de Bergmann pour établir la couche granulaire interne (IGL) sous la monocouche de cellule de Purkinje (figure 23).

- Les cils primaires des cellules du cervelet :

Des cils primaires sont présents à la surface des cellules progénitrices granulaires. La perte de ce cil peut être induite de manière conditionnelle en croisant des souris *Kif3a^{flox/-}* avec des souris *Gfap-cre^{+/-}* (expression de la recombinaison CRE dans les cellules exprimant GFAP, dans le cervelet. Il s'agit des cellules progénitrices des neurones granulaires). La perte de KIF3a dans les progéniteurs des cellules granulaires conduit à la perte de leur prolifération et ainsi à la disparition de la couche d'EGL donc à défauts de formation du cervelet (Spassky et al., 2008). Ces défauts de prolifération cellulaire sont également retrouvés dans d'autres mutants de ciliogenèse comme *Ift88* (Chizhikov et al., 2007) ou encore *Ftm*. De manière intéressante, les phénotypes cérébelleux de ces mutants conditionnels sont relativement similaires au phénotype des mutants conditionnels du cervelet pour *Shh* (Lewis et al., 2004) ou pour *Smo* (Spassky et al., 2008). L'explication la plus évidente de la perte de prolifération des cellules progénitrices granulaires dans les mutants de ciliogenèse est donc que le cil est indispensable à leur réponse à SHH. Il a été montré que l'inhibition de la ciliogenèse dans ces cellules induisait une diminution drastique de deux rapporteurs de la voie de signalisation SHH que sont *Gli1* et *Cyclin D1*. Ces données suggèrent donc que les cils jouent un rôle majeur dans le développement du cervelet en médiant la prolifération SHH-dépendante des cellules granulaires.

On commence donc à comprendre le rôle des cils dans la signalisation de type SHH et WNT et par là l'origine de plusieurs phénotypes rencontrés en cas de mutations dans les gènes ciliaires.

De manière intéressante, l'un des phénotypes associés dans les ciliopathies BBS, OFD1, Meckel et Joubert (pour revue *Badano et al., 2006*), est l'agénésie du Corps Calleux. Or l'holoprosencéphalie (HPE), qui correspond à l'absence de scission interhémisphérique suite à un défaut d'invagination de la ligne médiane dorsale dans le télencéphale, est l'un des phénotypes sévères retrouvés en cas de défaut de signalisation SHH. Et parmi les structures cérébrales affectées par le défaut de formation de la ligne médiane dorsale on retrouve le Corps Calleux. Dans la suite de cette introduction bibliographique, je me suis donc intéressée, à la mise en place des structures dorso-médianes du cerveau antérieur.

C. La mise en place des structures dorso-médianes du cerveau antérieur :

Différentes structures cérébrales médianes se mettent en place dans le cerveau antérieur. Au vu des phénotypes rencontrés chez les mutants *Rfx3*, que je détaillerai plus longuement dans la suite, je me suis plus particulièrement intéressée à la formation des structures prosencéphaliques dorso-médianes. Parmi elles, on retrouve dans le télencéphale, les commissures interhémisphériques avec le Corps Calleux et la Commissure Hippocampique, mais aussi les Plexus Choroïdes des ventricules latéraux et l'Hippocampe. Le diencephale est le siège de la formation de la Glande Pinéale, du Plexus Choroïde du 3^{ème} ventricule, de la Commissure Postérieure ainsi que de l'Organe Sous Commissural. Toutes ces structures cérébrales sont originaires de la ligne médiane dorsale (ou plaque du toit), centre organisateur localisé dans le toit du cerveau antérieur. Ce centre de signalisation est indispensable à la mise en place correcte de ces structures prosencéphaliques médianes.

Dans le télencéphale, l'ourlet cortical, qui est un deuxième centre organisateur dorsomédian requis pour la formation de structures dorso-médianes, occupe une place centrale entre la plaque du toit et le cortex cérébral.

I. Le rôle de la plaque du toit dans la mise en place des structures dorso-médianes du cerveau antérieur.

1. *La formation des hémisphères cérébraux :*

La plaque du toit télencéphalique subit d'importantes modifications indispensables à son invagination au sein du le télencéphale en vu de former les deux hémisphères cérébraux. Il y a notamment induction d'apoptose dans les cellules de la plaque du toit conduisant à l'affinement de ce tissu. Parallèlement à cela, dans les territoires dorso-latéraux adjacents, les cellules prolifèrent contraignant la plaque du toit à s'invaginer dans

le télencéphale. De façon concomitante à son invagination, la plaque du toit se différencie en tissu épithélial non neural, sous l'effet des BMP, à l'origine des plexus choroïdes qui sécrèteront par la suite le liquide céphalorachidien {Dziegielewska, 2001 #283; Sturrock, 1979 #284; Zaki, 1981 #285}. Un défaut de formation de la plaque du toit, dans les cas les plus sévères, est à l'origine d'un défaut de scission du télencéphale en deux hémisphères et conduit à l'apparition d'un phénotype d'holoprosencéphalie (HPE). Chez l'homme, cette malformation congénitale cérébrale est la plus commune et entraîne la formation d'un seul hémisphère dans le cerveau antérieur appelé alors holosphère. L'HPE a une prévalence élevée puisqu'elle est de 1/250 au cours du développement embryonnaire précoce et conduit souvent à une létalité intra-utérine (1/16 000 naissances). L'HPE est associée à un retard mental et dans 80% des cas à des défauts de formation de la face. Le phénotype d'HPE est assez variable au sein d'une même famille puisque les patients peuvent présenter des atteintes allant de manifestations cérébrales et faciales majeures à aucune manifestation clinique. Grâce aux progrès de l'imagerie cérébrale (IRM, rayons X) deux types d'HPE sont distinguables chez l'homme : les HPE dites classiques et les MIH HPE. On verra dans la suite, quels sont les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces deux types d'HPE.

a. Les HPE classiques :

Les HPE dites classiques sont séparées en trois types d'HPE en fonction de la gravité des défauts cérébraux. La forme la plus sévère et souvent non viable est l'HPE alobaire caractérisée par la non séparation des deux lobes cérébraux et la non séparation de la région ventrale. Les patients présentent un seul ventricule de petite taille, ils n'ont souvent qu'un seul œil (cas de cyclopie) et pas de bulbes olfactifs, ni de Corps Calleux.

Dans le cas d'une HPE semi-lobaire, la fission inter-hémisphérique est présente en région caudale du cerveau antérieur mais pas en région rostrale. Les patients ont un troisième ventricule qui est petit et partiellement formé, et le cortex, les éminences ganglionnaires ainsi que le thalamus sont fusionnés. Les patients présentent également une hypoplasie voire une absence des bulbes olfactifs et du Corps Calleux.

Enfin la forme la moins sévère d'HPE classique est la forme lobaire. Les lobes cérébraux sont bien définis bien qu'il y ait une absence de fissure inter-hémisphérique dans

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

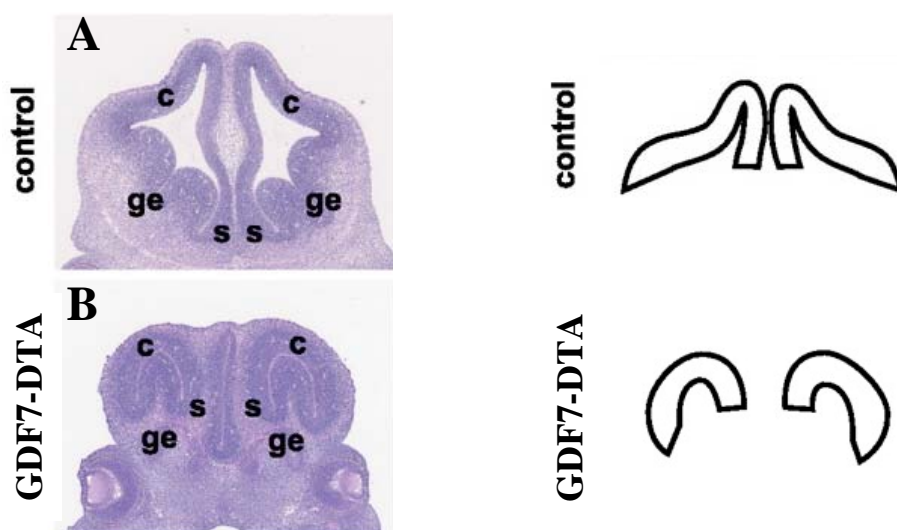


Figure 24 : Télencéphale d'embryon de souris transgéniques GDF7-DTA.

On constate que chez ces mutants, les structures médianes dorsales sont absentes (B) lorsqu'on compare avec le cas sauvage (A). D'après *Cheng et al., 2006*.

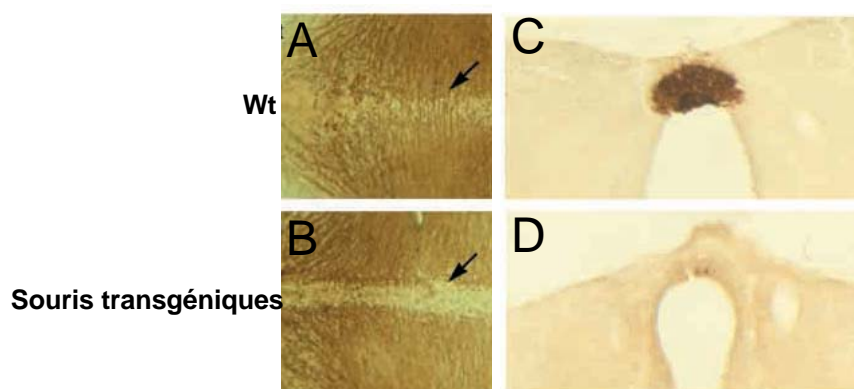


Figure 25 : Embryons transgéniques exprimant *En1* sous dépendance du promoteur de *Wnt1*.

Chez ces mutants, on observe un défaut de formation de la commissure postérieure (flèche) (B) et la perte de l'organe sous commissural (D), structures cérébrales correctement formées chez le sauvage (A et C). D'après *Louvi et Wassef., 2001*.

la région la plus rostrale du cerveau antérieur. Les individus ont un troisième ventricule formé mais ils présentent une hypoplasie voire une absence des bulbes olfactifs et du Corps Calleux {Krauss, 2007 #286}.

b. Les MIH HPE :

La syntélocéphalie ou MIH HPE (Middle InterHemispheric HPE) qui est une variante rare d'HPE est caractérisée par un défaut de séparation des lobes cérébraux en région caudale du cerveau antérieur. Comme dans les autres types d'HPE, les bulbes olfactifs ainsi que le Corps Calleux peuvent être hypoplasiques voire absents.

2. La formation des plexus et de l'ourlet cortical dans le télencéphale :

Comme les structures dorso-médianes sont originaires de la plaque du toit, la formation anormale ou la perte de cette ligne médiane dorsale va compromettre la formation de ces structures cérébrales. Il a été montré que l'ablation de la plaque du toit, grâce à l'utilisation de la toxine diphtérique exprimée spécifiquement dans les cellules de plaque du toit (souris DTA-GDF7), était à l'origine de la perte des structures télencéphaliques dorso-médianes que sont les plexus choroïdes des ventricules latéraux et l'ourlet cortical à l'origine de la formation de l'hippocampe (Figure 24B) {Cheng, 2006 #287}.

3. La formation des structures dorso-médianes du diencéphale :

Dans le diencéphale, un défaut de spécification de la plaque du toit induit par l'expression ectopique de *En1* (marqueur du cerveau postérieur) spécifiquement dans les cellules de plaque du toit du diencéphale (sous dépendance des séquences promotrices de *Wnt1*), conduit à la formation anormale des structures dorso-médianes du diencéphale comme l'organe sous commissural ou encore la commissure postérieure (Figure 25B et D) {Louvi, 2000 #82}.

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

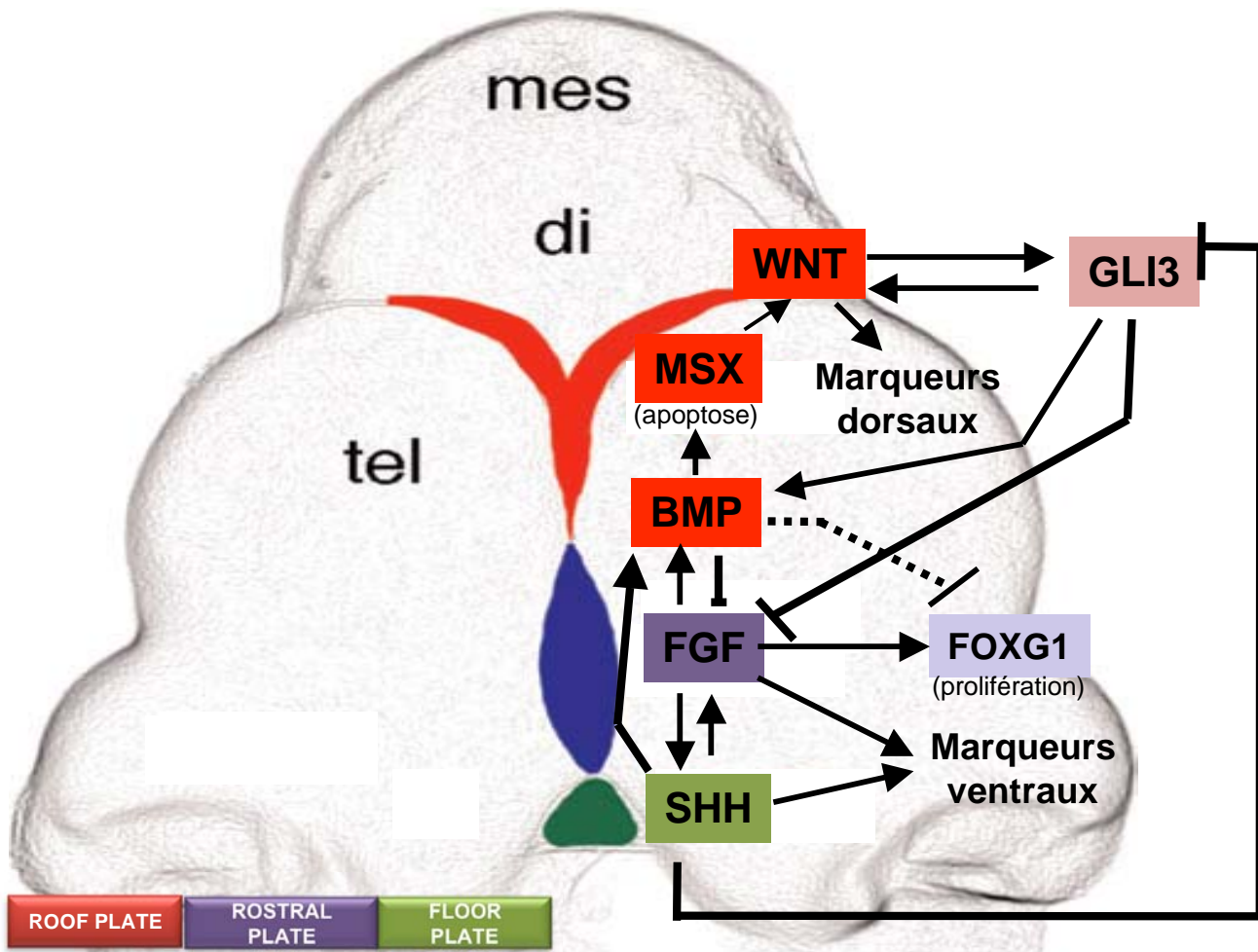


Figure 26 : Modèle de formation du télencéphale.

Côté dorsal, la signalisation BMP induit l'expression de *Msx* dans la roof plate. MSX va induire l'expression de gènes *Wnt* dans la région de formation de l'ourlet cortical. Par la suite, la signalisation WNT canonique va permettre l'expression de marqueurs dorsaux comme *Gli3* ou encore *Pax6*. GLI3 permettra de maintenir l'expression des WNT dans l'ourlet cortical et des BMP dans les plexus choroïdes favorisant le maintien de la roof plate. GLI3 va empêcher l'extension de l'expression de marqueurs ventraux en réprimant l'expression de *Fgf*.

Côté ventral, les signalisations SHH et FGF sont nécessaires à la formation de la floor plate et à l'établissement des domaines progéniteurs ventraux. La signalisation FGF, nécessaire au maintien de la spécification de la plaque commissurale, va être induite directement ou non par la signalisation SHH, notamment via la répression de GLI3R.

Côté rostral, la signalisation FGF va permettre la prolifération cellulaire de tout le télencéphale en induisant l'expression de *Foxg1*. L'expression de *Foxg1* et la signalisation FGF, seront réprimées dans la roof plate par la signalisation BMP qui y est elle-même maintenue par les signalisations FGF et SHH.

Di : diencéphale ; Mes : mésencéphale ; Tel ; télencéphale.

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

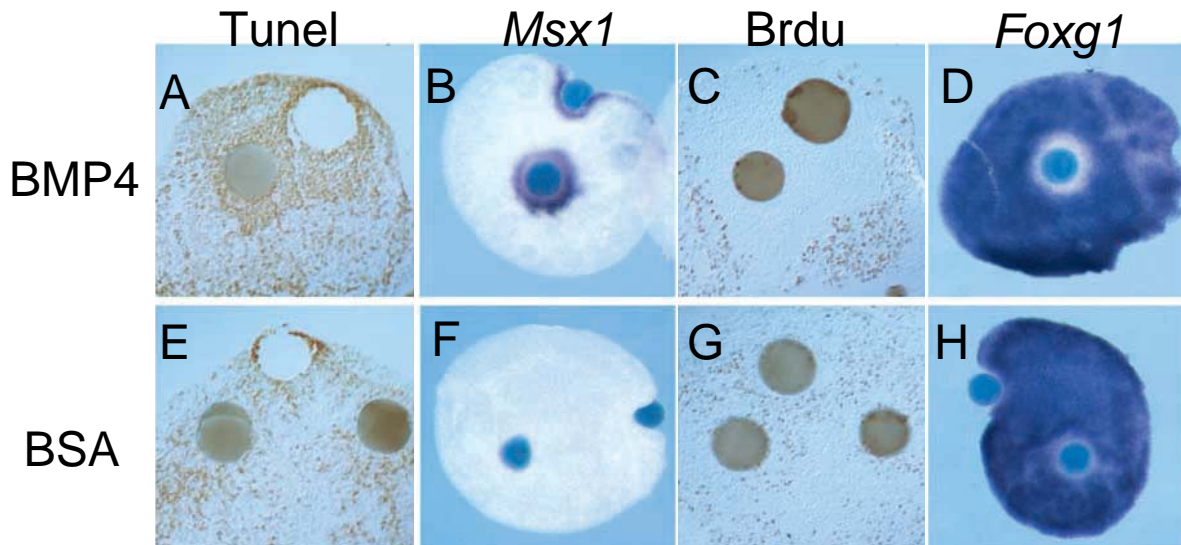


Figure 27 : La signalisation BMP induit des caractéristiques de roof plate dans le télencéphale latéral. L'implantation de billes recouvertes de BMP4 dans des explants de télencéphale latéral suffit à induire des caractéristiques spécifiques de la roof plate du télencéphale avec augmentation de l'apoptose (A), l'apparition de l'expression de *Msx1* (B), la diminution de la prolifération cellulaire (C) et de l'expression de marqueurs télencéphaliques comme *Foxg1* (D). Situations contrôles E,F,G et H où les billes implantées sont recouvertes de BSA. D'après *Furuta et al., 1997*.

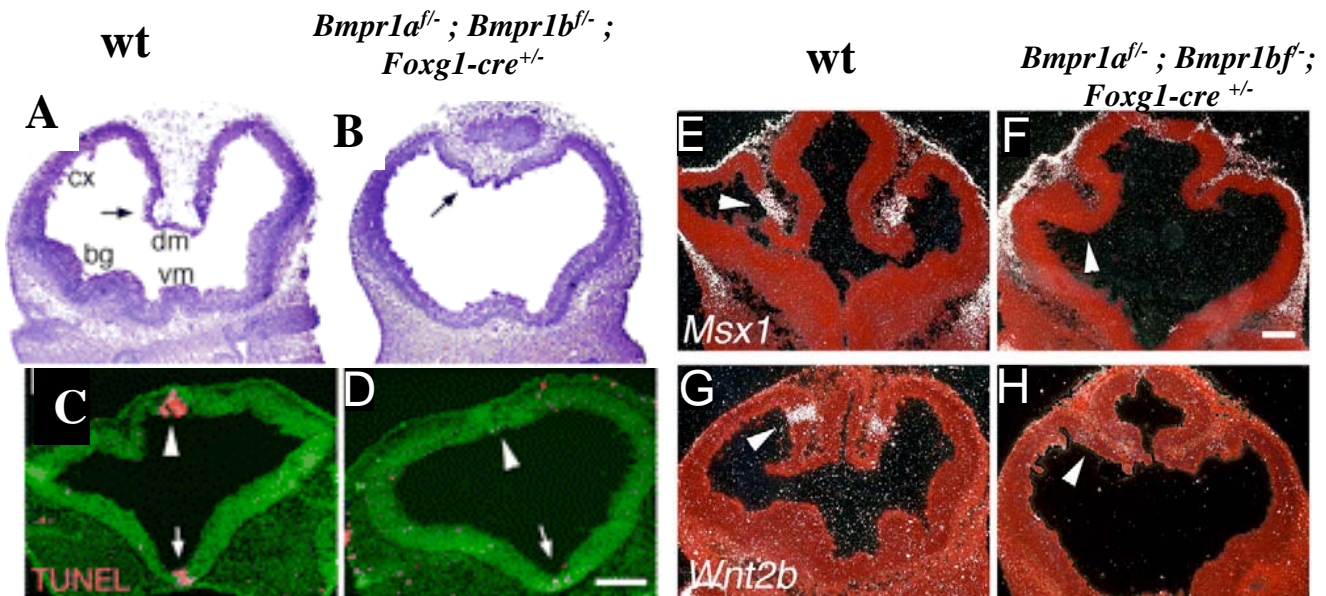


Figure 28 : Double mutant *Bmpr1a^{-/-} ; Bmpr1b^{-/-} ; Foxg1-cre^{+/-}*. Les doubles mutants *Bmpr1a^{-/-} ; Bmpr1b^{-/-} ; Foxg1-cre^{+/-}* présentent une holoprosencéphalie (B) due à la perte de la ligne médiane dorsale caractérisée par la réduction de l'apoptose dans la ligne médiane dorsale (ainsi qu'en région ventrale non discuté ici) (D), la perte de l'expression de *Msx1* (F) et de *Wnt2b* (H). A comparer avec les cas sauvages présentés dans les figures A, C, E et G. *Fernandes et al., 2007*.

Ces résultats révèlent l'importance de la plaque du toit dans l'établissement des structures prosencéphaliques dorso-médianes. L'analyse de mutants murins présentant des défauts des structures médianes du cerveau antérieur a permis progressivement de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans leur formation. J'ai ressorti de ces données, un modèle de formation de ligne médiane du télencéphale retrouvé en figure 26. Dans la suite, je vais revenir sur chacun des acteurs moléculaires impliqués dans ce modèle afin d'expliquer la formation de cette plaque du toit.

II. La formation de la plaque du toit :

La plaque du toit est donc un centre de signalisation qui sécrète un ensemble de molécules impliquées dans la dorso-ventralisation du cerveau.

1. Le rôle de la signalisation aux BMP :

La plaque du toit télencéphalique exprime tout un éventail de molécules de type BMP, puisqu'au moins 6 gènes *Bmp* (*Bmp2/4/5/6* et *7*, *Gdf7*) sont retrouvés dans cette ligne médiane dorsale. Cette signalisation BMP est nécessaire à l'induction de la ligne médiane dorsale. *In vitro*, l'implantation de billes recouvertes de BMP4 (mais aussi de BMP2) dans des explants de télencéphale latéral suffit à induire des caractéristiques de la plaque du toit télencéphalique (Figure 27). En effet, on observe une augmentation de l'apoptose et l'apparition de l'expression de *Msx1*, marqueur spécifique de la plaque du toit. Parallèlement à cela, le devenir neuroépithélial du télencéphale est inhibé puisqu'on retrouve la diminution de la prolifération cellulaire et de l'expression de marqueurs télencéphaliques comme *Foxg1* {Furuta, 1997 #27}. L'analyse de mutants murins présentant des défauts de mise en place de la signalisation BMP vient conforter son rôle dans la formation de la plaque du toit. En effet, chez des mutants murins conditionnels du gène *Bmpr1a*^{f/-}; *Foxg1-cre*^{+/-}, codant un récepteur des BMP, on perd la formation de structures issues de la plaque du toit télencéphaliques comme les plexus choroïdes {Hebert, 2002 #293}. Ce phénotype est aggravé chez des doubles mutants conditionnels puisqu'il y a perte de la plaque du toit *Bmpr1a*^{f/-}; *Bmpr1b*^{f/-}; *Foxg1-cre*^{+/-}, où deux gènes codant les récepteurs des BMP sont déplétés. L'absence de cette plaque du toit est caractérisée par la perte de l'apoptose et de l'expression de marqueurs spécifiques de la plaque du toit comme *Msx1* et *Wnt2b* (Figure 28), et s'accompagne de la perte à la fois des plexus choroïdes mais également de l'ourlet cortical {Fernandes, 2007 #31}. Ces doubles

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

A En contexte WT

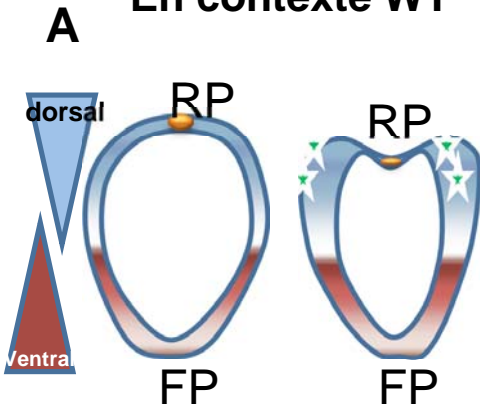
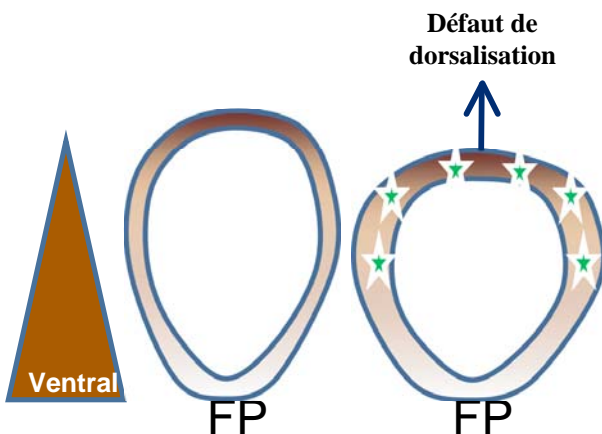


Figure 29 : Modèles illustrants l'origine des HPE.

Chez les souris sauvages, la dorso-ventralisation du télencéphale est régulée par une balance entre des facteurs dorsalisants (tels que WNT, BMP) et des facteurs ventralisants (tels que SHH, FGF). Au niveau de la RP, l'expression de *Bmp* induit *MSX1*, molécule pro-apoptotique, conduisant à l'apoptose des cellules de la RP. En région latérale l'expression de *Foxg1* (due à FGF8 dans la plaque commissurale) induit la prolifération cellulaire. L'amincissement de la RP et la prolifération des régions latérales va conduire à l'accolement et l'invagination de la RP scindant le télencéphale en deux vésicules.

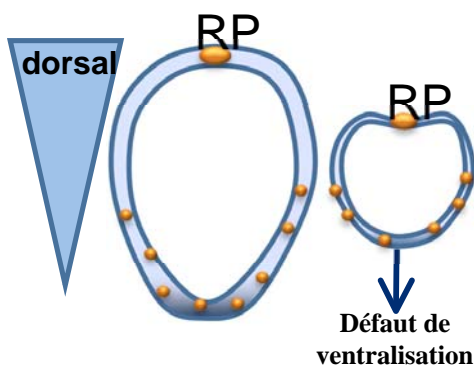
B MIH HPE



Chez des souris qui présentent un défaut de dorsalisation du télencéphale, la perte de la RP, va conduire à la perte de l'apoptose dans cette région. Parallèlement à cela, la perte de la dorsalisation va conduire à la ventralisation de la région dorsale. En absence de signalisation dorsale, comme la signalisation BMP, il y aura prolifération des cellules de la roof plate au lieu de l'induction de l'apoptose. La roof plate ne s'affinant pas, elle ne va pas s'invaginer dans le télencéphale.

La FP ne sera pas atteinte chez ces mutants.

C HPE



Les souris qui présentent un défaut de formation de la roof plate et de la plaque commissurale ont un télencéphale réduit en taille. Cette réduction peut être due à la perte de la signalisation SHH (nécessaire à la viabilité cellulaire) qui va conduire à une augmentation de l'apoptose. Et comme ces deux centres médians sont nécessaires à la formation de la roof plate, en cas de défaut de l'un des deux, il n'y aura pas d'invagination de la roof plate dans le télencéphale.



Apoptose



Prolifération

RP : Floor Plate FP : Floor Plate

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

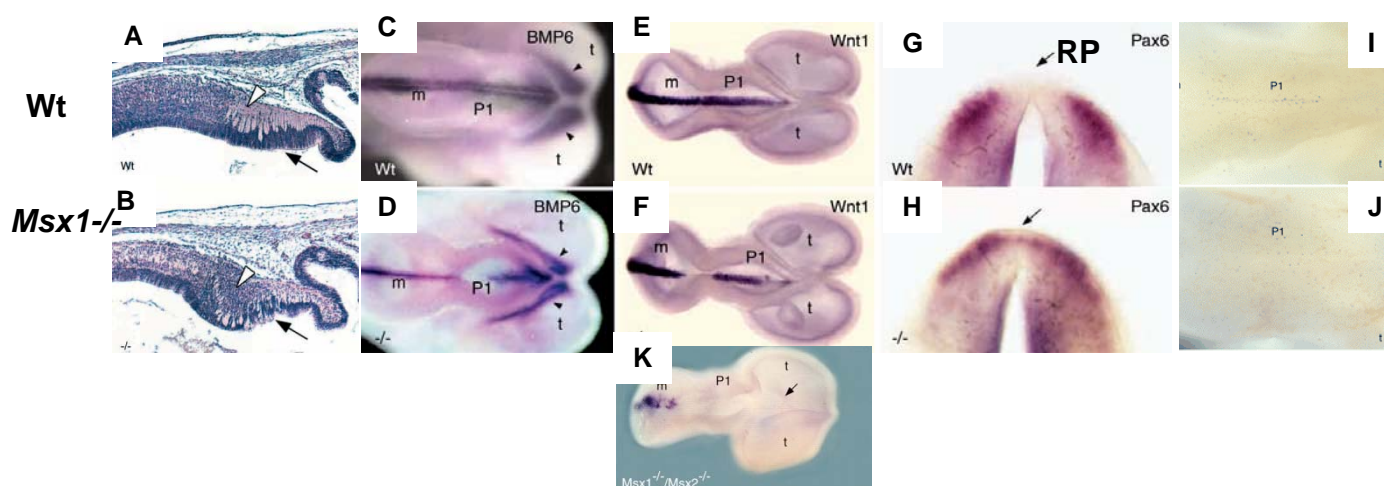


Figure 30 : MSX et la formation de la ligne médiane dorsale.

Chez les mutants *Msx1*^{-/-}, on observe la formation anormale des structures dorso-médianes diencéphaliques comme l'organe sous commissural (tête de flèche) (B) due à un défaut de spécification de la roof plate, en région prosomérique 1, caractérisée par la perte d'expression de marqueurs spécifiques de la roof plate comme *Bmp6* (D), *Wnt1* (F) et une expression ectopique de *Pax6* (H). De plus, l'apoptose de la roof plate du diencéphale est réduite chez ces mutants (J).

Chez les doubles mutants *Msx1*^{-/-} ; *Msx2*^{-/-}, on observe la perte de l'expression de *Wnt1* (K). A comparer avec les embryons murins retrouvés en figure A, C, E, G et I. D'après *Bach et al., 2003*.

mutants présentent une holoprosencéphalie de type MIH HPE. Ce type d'HPE, comme le montre le modèle figure 29, est dû à un défaut d'invagination de la plaque du toit dans le télencéphale sûrement suite à la perte de l'affinement de la plaque du toit (diminution de l'apoptose).

Dans la plaque du toit du diencéphale, on retrouve également l'expression de *Bmp* comme *Bmp4*, *5*, *6*, *7* et *Gdf7* {Furuta, 1997 #27}. Ce patron d'expression est similaire à celui retrouvé dans la plaque du toit du télencéphale suggérant que la signalisation BMP est également nécessaire à la formation de la ligne médiane dorsale du diencéphale. Mais le rôle de la signalisation BMP dans cette plaque du toit reste à être démontré.

2. Rôle des effecteurs de la signalisation BMP :

a. Facteurs de transcription MSX :

Comme on vient de le voir, l'induction ectopique de la signalisation BMP est capable d'induire l'expression ectopique de *Msx1*. A l'inverse un défaut de signalisation BMP conduit à la perte d'expression de *Msx1*. De plus, il a été montré que la présence de BMP2, BMP4, dans différents tissus au cours de l'embryogenèse, suffisait à induire l'expression de *Msx1* {pour revue Davidson, 1995 #294}. Ces données suggèrent que *Msx1* est une cible de la signalisation BMP.

De manière intéressante, chez les mutants murins *Msx1*^{-/-}, il y a un défaut de spécification de la plaque du toit dans la région prosomérique 1 du diencéphale (territoire diencéphalique défini d'après le modèle de segmentation antéro-postérieur du SNC {Puelles, 2003 #295}). Cette formation anormale est responsable de défauts de mise en place des structures diencéphaliques (l'organe sous commissural et la commissure postérieure) (Figure 30B) et de l'apparition d'une hydrocéphalie et de l'hypoplasie du cortex cérébral {Bach, 2003 #296; Fernandez-Llebrez, 2004 #297; Ramos, 2004 #298}. Chez ces mutants, la perte de la plaque du toit est caractérisée par l'absence de marqueurs spécifiques comme *Bmp6* (Figure 30D), *Wnt1* (Figure 30F), *Wnt3a*, une diminution de l'apoptose (Figure 30J) et par l'expression ectopique de marqueurs dorso-latéraux comme *Pax6* dans le territoire dorso-médian du diencéphale (figure 30H). L'aggravation de ce phénotype cérébral est retrouvé chez les doubles mutants *Msx1*^{-/-} ; *Msx2*^{-/-} suggérant une coopération entre les protéines MSX pour la formation de la plaque du toit du cerveau

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

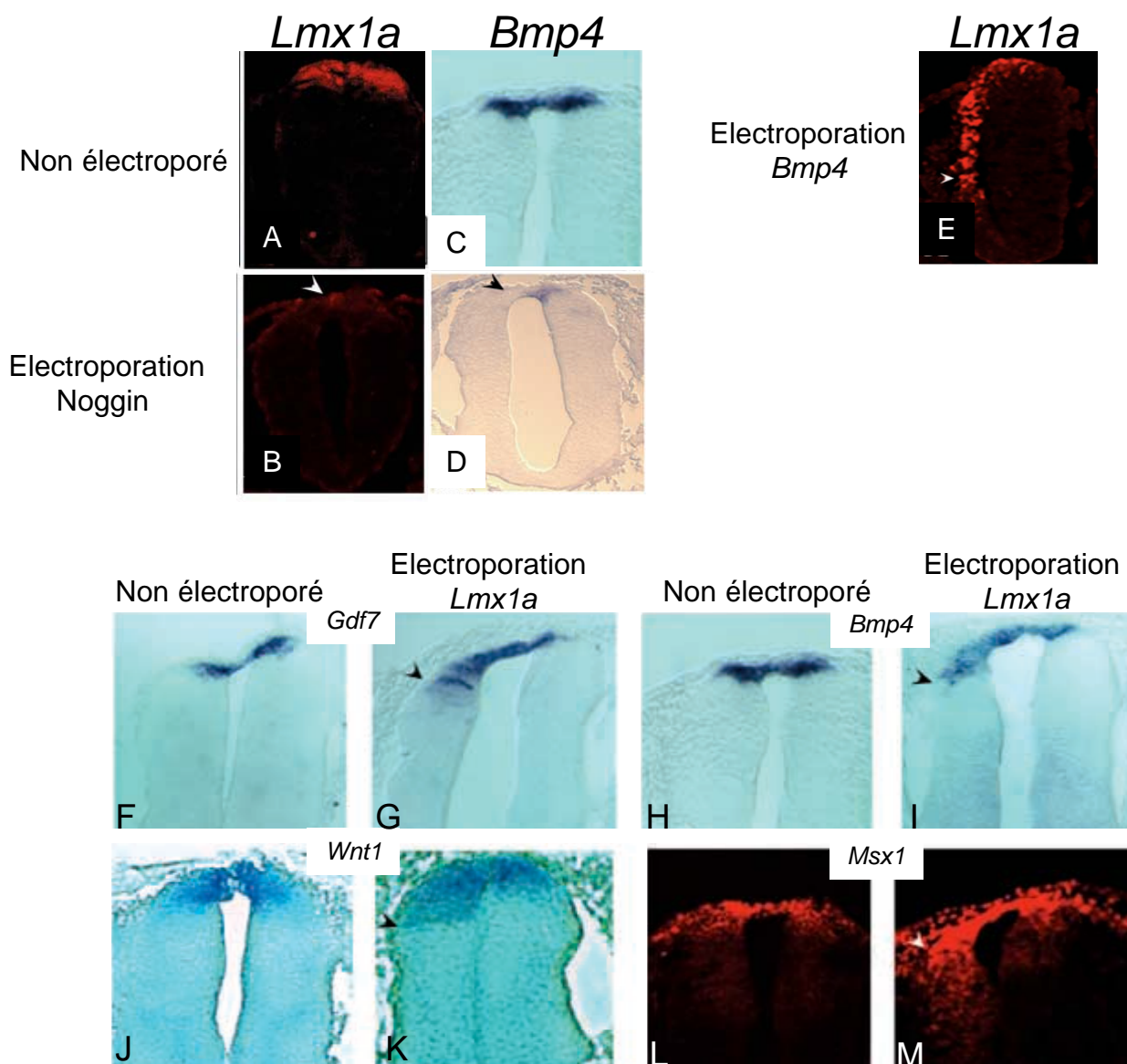


Figure 31 : Le facteur LMX1a et la roof plate de la moelle épinière.

Si on électroporation *Noggin*, inhibiteur des BMP, dans la région dorso-médiane de la moelle (tête de flèche), on observe une inhibition de l'expression de *Lmx1a* (B) et de *Bmp4* (D) par rapport au cas non électroporé (A et C). Une électroporation de *Bmp4* dans la moelle en région latérale (tête de flèche) est responsable de l'induction de l'expression ectopique de *Lmx1a* (E). Chez le poulet, l'électroporation de *Lmx1a* dans la plaque neurale, juste avant la fermeture du tube neural, induit l'extension du domaine de la roof plate en région dorso-latérale. Cette extension est caractérisée par l'expression ectopique des marqueurs roof plate spécifiques comme *Gdf7* (G), *Bmp4* (I), *Wnt1* (K) et *Msx1* (M) dans la région dorso-latérale de la moelle. Ces électroporations sont à comparer avec les situations sauvages non électroporées (Figure A, C, F, H, J et L) . D'après *Chizhikov et Millen., 2004.*

antérieur. Chez ces doubles mutants, la perte de l'expression de *Wnt1* s'étend à toute la ligne médiane dorsale du diencephale (figure 30K) {Bach, 2003 #296}.

De plus, il est intéressant de noter que les molécules MSX sont pro-apoptotiques {Tribulo, 2004 #299}, elles pourraient donc induire l'apoptose dans les cellules de la plaque du toit télencéphalique.

a. Facteurs de transcription à homéodomaine LIM :

Dans la plaque du toit, l'activation de l'expression de *Lmx1a*, qui code un facteur de transcription, dépend de la signalisation BMP. En effet, il a été montré que si on électropore *Noggin*, inhibiteur des BMP, dans la région dorso-médiane de la moelle, on observe une inhibition de l'expression de *Lmx1a* et de *Bmp4* (Figure 31B et D). En revanche, une électroporation de *Bmp4* dans la moelle en région latérale est responsable de l'induction de l'expression ectopique de *Lmx1a* (Figure 31E) {Chizhikov, 2004 #300}.

Le rôle de LMX1a dans la formation de la plaque du toit a surtout été démontré dans le cerveau postérieur et la moelle. Il a été montré que chez les souris *dreher*, où le gène muté *Lmx1a* code une protéine non fonctionnelle, il y avait perte de la plaque du toit dans la région caudale du SNC (depuis le mésencéphale jusque dans la moelle). Cette perte de plaque du toit est caractérisée par la perte d'expression de marqueurs plaque du toit spécifique comme *Bmp6* {Millonig, 2000 #291}. De plus, confirmant le rôle de LMX1A dans la formation de la plaque du toit, il a été montré que chez le poulet, l'électroporation de *Lmx1a* dans la plaque neurale, juste avant la fermeture du tube neural, induit l'extension du domaine de la plaque du toit en région dorso-latérale. Cette extension est caractérisée par l'expression ectopique des marqueurs plaque du toit spécifiques comme *Gdf7*, *Bmp4*, *Wnt1* et *Msx1* dans la région dorso-latérale de la moelle (Figure 31) {Chizhikov, 2004 #300}.

Chez le rat *Lmx1a*^{-/-}, on observe des défauts de formation des structures dorso-médianes issues de la plaque du toit comme les plexus choroides ou le corps calleux {Kuwamura, 2005 #301}, suggérant un rôle de LMX1a également dans la formation de la plaque du toit du cerveau antérieur même si cela n'a pas encore été formellement démontré.

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

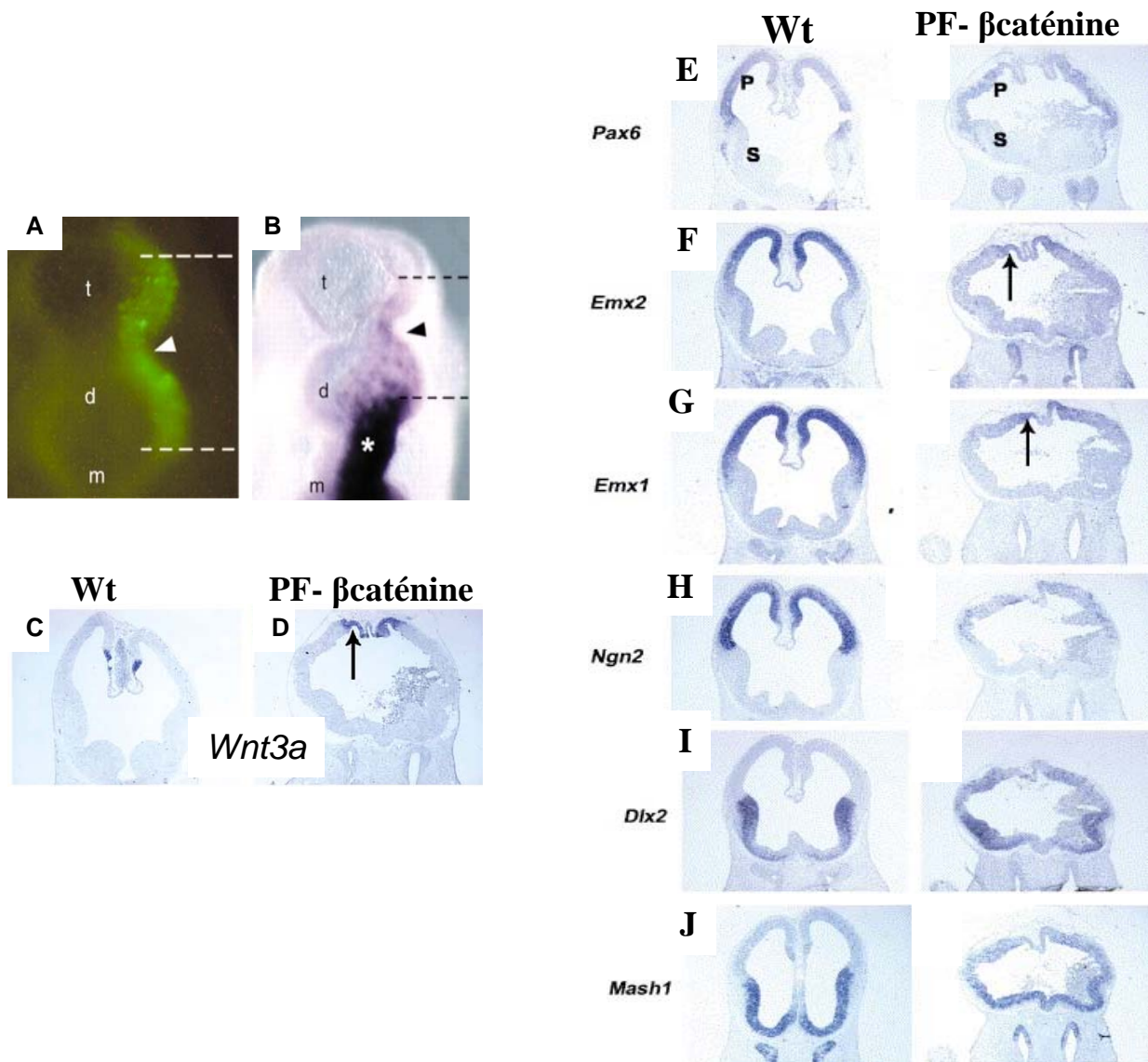


Figure 32 : La signalisation WNT et la roof plate.

L'électroporation de *Msx1* dans le diencéphale de poulet (A) permet l'induction de l'expression de *Wnt1* (tête de flèche B). D'après *Bach et al., 2003*. Chez les mutants perte de fonction β -caténine (PF- β -caténine), la perte de la roof plate est caractérisée par l'extension de l'expression de *Wnt3a* dans les territoires dorso-médians du télencéphale (D) en comparaison avec la situation sauvage (C). Ces mutants présentent également un défaut de dorso-ventralisation dans le télencéphale puisqu'on observe une diminution de l'expression de marqueurs dorsaux comme *Pax6* (E), *Emx2* (F), *Emx1* (G), *Ngn2* (H) et une extension de l'expression de marqueurs ventraux comme *Dlx2* (I), *Mash1* (J). D'après *Backman et al., 2005*.

3. La signalisation WNT :

Une fois induites dans le cerveau, les molécules WNT vont participer à la formation de la plaque du toit du diencephale. En effet, il a été montré que chez les mutants *Wnt1*^{-/-} la formation anormale de l'organe sous commissural et de la commissure postérieure était due à des défauts de spécification de la ligne médiane dorsale du diencephale {Louvi, 2000 #82}. Il est intéressant de noter que *Wnt1* est une cible de MSX1 puisque l'électroporation de MSX1 dans des cerveaux de poulet suffit à induire l'expression de *Wnt1* (Figure 32B) {Bach, 2003 #296}.

Dans le télencéphale, les gènes *Wnt* sont exprimés dans la région de formation de l'ourlet cortical, cette région est enchâssée entre l'épithélium à l'origine des plexus choroïdes (centre de signalisation BMP) et le cortex cérébral, c'est-à-dire de part et d'autre de la plaque du toit. Au vu de la localisation privilégiée de ce centre, riche en molécules WNT, il est proposé que la signalisation WNT participe à la mise en place de la plaque du toit télencéphalique. Bien que le rôle de la signalisation WNT dans la plaque du toit diencephalique soit clairement établi, dans le télencéphale il reste à être démontré. Néanmoins, cette signalisation est indispensable à la formation du télencéphale puisqu'il a été démontré que la perte de la signalisation WNT canonique était à l'origine de défaut de dorso-ventralisation du télencéphale. En effet, les souris issues du croisement entre une souris présentant l'allèle β caténine floxé et une souris exprimant la cre-recombinase dans les cellules du télencéphale à E8 (*Nes8-cre*^{+/+}), présentent une extension du domaine d'expression de *Wnt3a* à toute la plaque du toit (Figure 32D) (Backman et al., 2005) ainsi qu'un défaut d'établissement de la frontière entre le pallium/sous-pallium (dorso-ventrale) puisqu'on observe une forte diminution de l'expression de marqueurs dorsaux comme *Pax6*, *Emx2*, *Emx1* et *Ngn2* (Figure 32E à H) et l'extension ectopique de l'expression de marqueurs ventraux comme *Dlx2* et *Mash1* en région dorsale (Figure 32I et J) {Backman, 2005 #302}. Ces résultats suggèrent que la signalisation WNT canonique, originaire de l'ourlet cortical, permet la mise en place de la dorso-ventralisation du télencéphale, étape indispensable à l'établissement des différents domaines progéniteurs.

4. Les marqueurs corticaux dorsaux :

L'analyse de défauts de formation de structures cérébrales issues de la plaque du toit du cerveau antérieur chez des mutants murins *Gli3* ou *Pax6* révèle que ces gènes

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

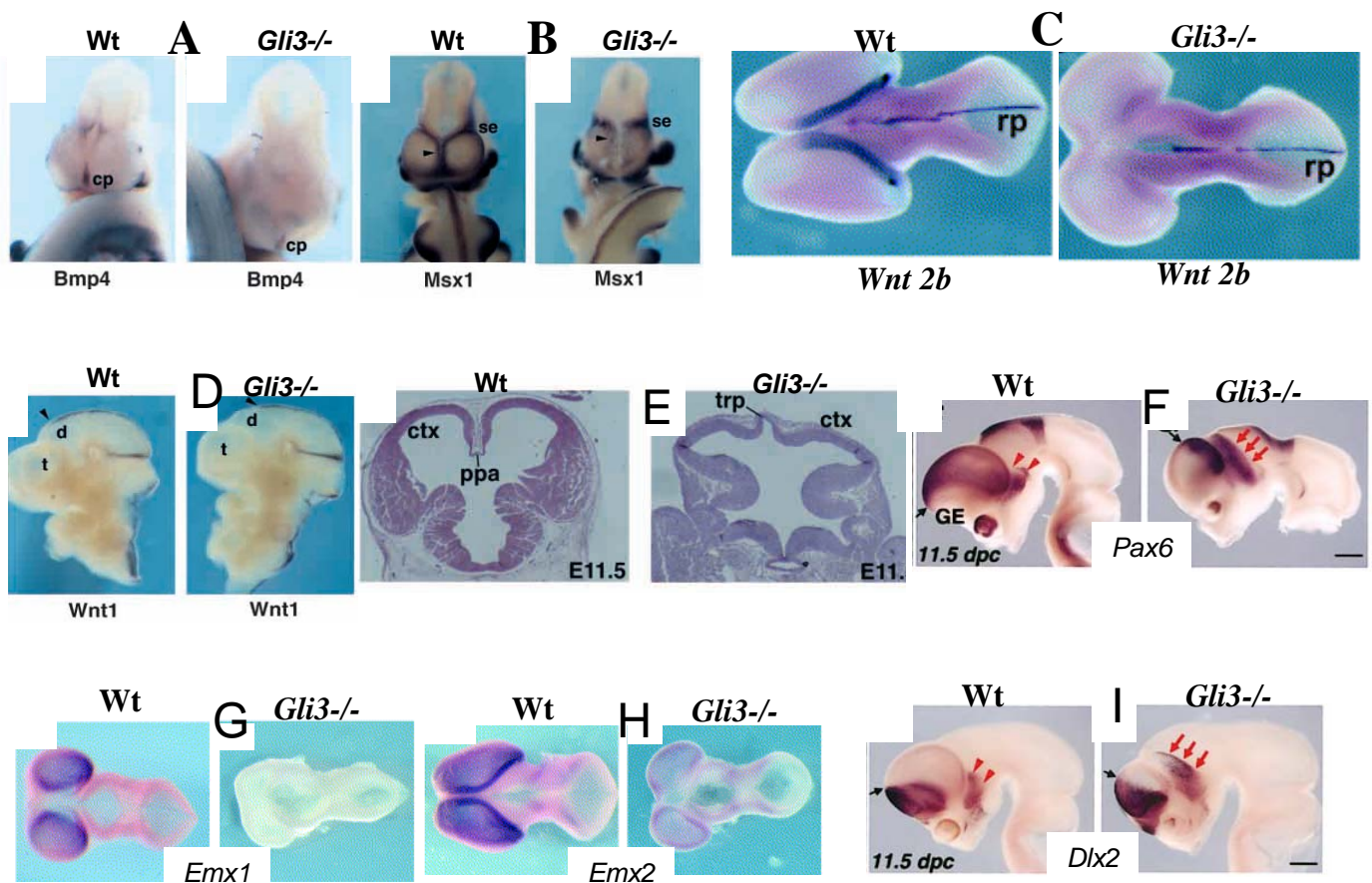


Figure 33 : Mutants *Gli3*^{-/-}.

Les mutants *Gli3*^{-/-} n'ont plus de roof plate, cette absence est caractérisée par la perte de l'expression de *Bmp4* (A), de *Msx1* (B), et de *Wnt2b* (C) dans le télencéphale, mais aussi de *Wnt1* (D) dans la roof plate du diencéphale. Ces mutants présentent des défauts des structures dorso-médianes et notamment la perte des plexus choroïdes (E). De plus, chez ces mutants on observe des défauts de dorso-ventralisation dans le télencéphale puisque l'expression de marqueurs dorsaux comme *Pax6* (F), *Emx1* (G), *Emx2* (H) est réduite et l'expression de marqueurs ventraux comme *Dlx2* s'étend dans le territoire dorsal (flèche) (I). D'après Theil et al., 1999 ; Kuschel et al.,

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

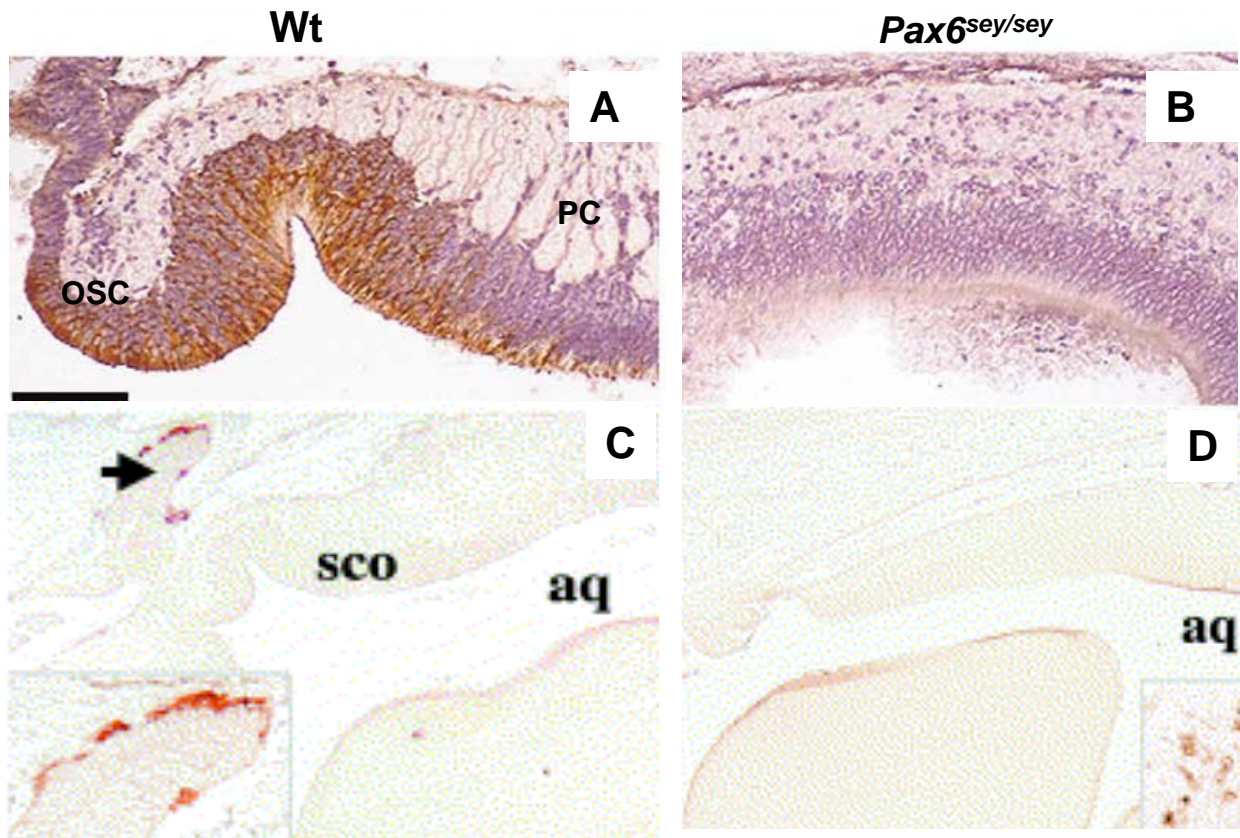


Figure 34 : Mutants *Pax6*^{sey/sey}.

Chez ces mutants murins, on observe la perte de l'organe sous commissural (OSC), de la commissure postérieure (PC) (B) et de la glande pinéale (flèche chez le sauvage B) (D), par rapport aux embryons sauvages (A et C). Tiré de *Estivill-Torru et al., 2001*.

exprimés dans le territoire dorsal sont également impliqués dans la mise en place de la ligne médiane dorsale.

a. Le facteur de transcription GLI3 :

Comme la signalisation WNT canonique, le facteur de transcription GLI3 est nécessaire dans la dorso-ventralisation du télencéphale. Chez les mutants *Gli3*^{-/-}, on observe la perte d'expression de gène *Wnt* dorsaux comme *Wnt2b*, *Wnt3a*, *Wnt5a* (Figure 33C) mais également de l'expression de *Bmp4* (Figure 33A) et de *Msx1* (Figure 33B) {Grove, 1998 #37; Theil, 2002 #303; Kuschel, 2003 #304}. La signalisation originaires de l'ourlet cortical étant perdue, il n'y aura pas formation de la plaque du toit télencéphalique et cela conduit à l'absence de formation des plexus choroïdes (Figure 33E) ainsi qu'à un défaut de dorso-ventralisation du télencéphale. Ici, on retrouve que la frontière pallium/sous-pallium est altérée puisqu'on observe une diminution d'expression de marqueurs dorsaux dans le pallium comme *Pax6*, *Emx1*, *Emx2* (Figure 33F à H) et une extension de l'expression de marqueurs ventraux dans le pallium comme *Dlx2* (Figure 33I) {Theil, 1999 #44; Aoto, 2002 #305}. De manière intéressante, on retrouve chez ces mutants *Gli3*, un défaut d'expression de *Wnt1* (Figure 33D) dans le diencephale suggérant que la plaque du toit diencephalique est également affectée.

Ces données révèlent que GLI3 et WNT sont nécessaires à la mise en place de la ligne médiane du télencéphale. GLI3 contrôle l'expression des gènes *Wnt*, mais il n'est pas exclu que les molécules WNT contrôlent aussi l'expression de GLI3 dans le télencéphale comme cela a été montré dans la moelle {Alvarez-Medina, 2008 #306}.

b. Le facteur de transcription PAX6 :

Les mutants *Pax6*^{sey/sey} présentent des défauts de formation des structures cérébrales originaires de la plaque du toit du diencephale comme l'organe sous commissural, la commissure postérieure et la glande pinéale (Figure 34A et B) {Mastick, 1997 #308; Estivill-Torres, 2001 #309} suggérant un rôle de ce facteur dans la formation de la plaque du toit du cerveau antérieur. *Pax6* s'exprime en région dorso-latérale et non dorso-médiane du cerveau antérieur, il semblerait donc qu'il soit impliqué dans la mise en place de la dorso-ventralisation, nécessaire à la formation de la plaque du toit, comme pour les signalisations WNT et GLI3.

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

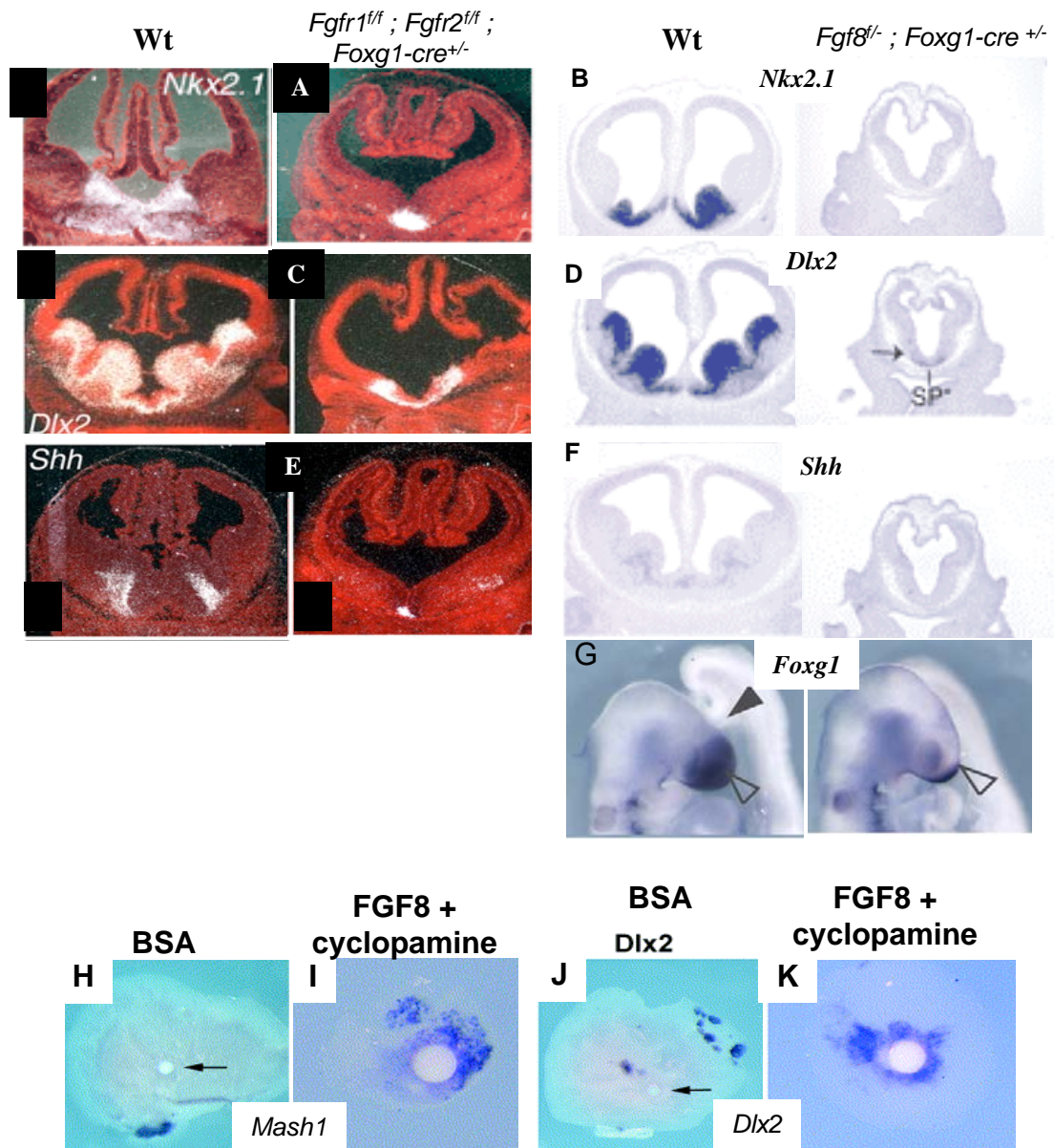


Figure 35 : La signalisation FGF.

Dans les figures de A-G, on observe, chez les doubles mutants *Fgfr1^{ff}; Fgfr2^{ff}; Foxg1-cre^{+/-}* ou chez des mutants *Fgf8^{-/-}; Foxg1-cre^{+/-}*, une réduction voire même la perte d'expression de marqueurs ventraux comme *Dlx2* (A et B), *Nkx2.1* (C et D) et *Shh* (E et F). La réduction de la taille du télencéphale des mutants *Fgf8^{-/-}; Foxg1-cre^{+/-}* peut être due à la diminution de l'expression de *Foxg1* connu pour induire la prolifération (G). D'après *Gutin et al., 2006; Storm et al., 2006*.

Le rôle de la signalisation FGF dans la ventralisation du télencéphale (de H-K) a été mis en évidence grâce à l'ajout de billes recouvertes de FGF8 à des explants de télencéphale latéral, en absence de la signalisation SHH, puisqu'on observe l'expression de marqueurs ventraux comme *Mash1* (I) et *Dlx2* (K). D'après *Kuschel et al., 2003*.

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

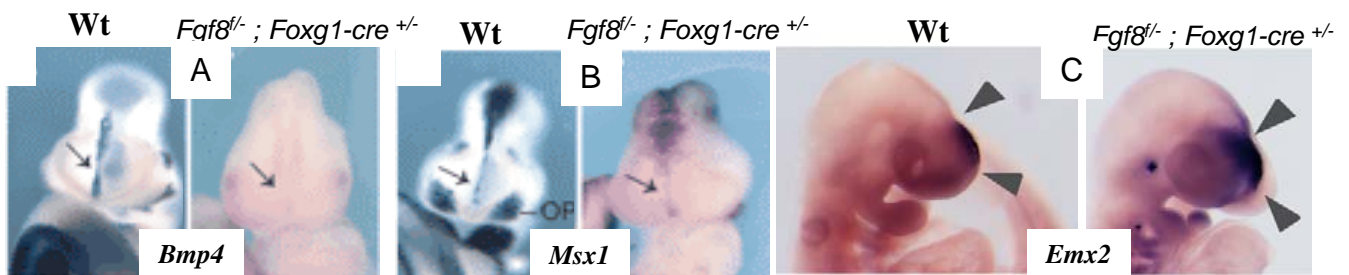


Figure 36 : Mutant *Fgf8*^{-/-}; *Foxg1-cre*^{+/-}.

Chez les mutants *Fgf8*^{-/-}; *Foxg1-cre*^{+/-}, on observe également l'absence de formation de la roof plate. Cette absence est caractérisée par le défaut d'expression de marqueurs roof plate spécifiques comme *Bmp4* (A) et *Msx1* (B). En revanche, le pallium se forme puisqu'on retrouve l'expression des marqueurs dorso-latéraux comme *Emx2* (C). D'après Storm *et al.*, 2003.

Comme on vient de le voir la formation de la plaque du toit dépend de son induction par des molécules de signalisation comme les BMP et leurs effecteurs ainsi que de la mise en place de la dorso-ventralisation qui est une étape indispensable à l'établissement des domaines progéniteurs le long de l'axe dorso-ventral. Mais la formation correcte de la plaque du toit, notamment dans le télencéphale, requiert également la présence de deux autres centres de signalisation, en plus de l'ourlet cortical, que sont la plaque commissurale et la plaque du plancher.

5. La ligne médiane rostrale et la signalisation FGF :

Ce centre organisateur, adjacent à la plaque du toit, est situé dans la région la plus antérieure du télencéphale et exprime au moins 5 *Fgf* (*Fgf3*, 8, 15, 17, 18). FGF8 induit l'expression de *Foxg1* nécessaire à la prolifération cellulaire dans le télencéphale qui va permettre d'induire la croissance du télencéphale {Shimamura, 1997 #319; Ye, 1998 #320}.

Chez des doubles mutants où les gènes *Fgfr1^{ff}* ; *Fgfr2^{ff}* ; *Foxg1-cre^{+/-}* sont spécifiquement inactivés dans le télencéphale ou chez des mutants *Fgf8^{ff}* ; *Foxg1-cre^{+/-}*, on observe la réduction d'expression de marqueurs ventraux comme *Dlx2*, *Nkx2.1*, *Shh* (Figure 35) signe d'un défaut de formation des territoires ventraux {Gutin, 2006 #321; Storm, 2006 #26}. Par ailleurs, chez ces mutants de signalisation FGF, on observe réduction de la taille du télencéphale corrélée à la réduction de l'expression de *Foxg1* (Figure 35G) et l'apparition d'un phénotype d'HPE de type classique (voir figure 28). Cette HPE serait due à un défaut de formation de la plaque du toit. En effet, chez les mutants *Fgf8^{ff}* ; *Foxg1-cre^{+/-}*, la perte de la plaque du toit est caractérisée par la perte d'expression de marqueurs de plaque du toit comme *Bmp4* et *Msx1* (Figure 36A et B). En revanche, le pallium se forme puisqu'on retrouve l'expression des marqueurs dorso-latéraux comme *Emx2* (Figure 36C) et *Pax6* {Storm, 2006 #26}. Inversement, l'induction d'une signalisation FGF induit l'expression de marqueurs ventraux. En effet, l'ajout de FGF8 à des explants de télencéphale murin est capable d'induire l'expression de marqueurs ventraux comme *Mash1*, *Dlx2* (Figure 35I et K), en absence de signalisation SHH (inhibée par l'ajout de cyclopamine) {Kuschel, 2003 #304}.

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

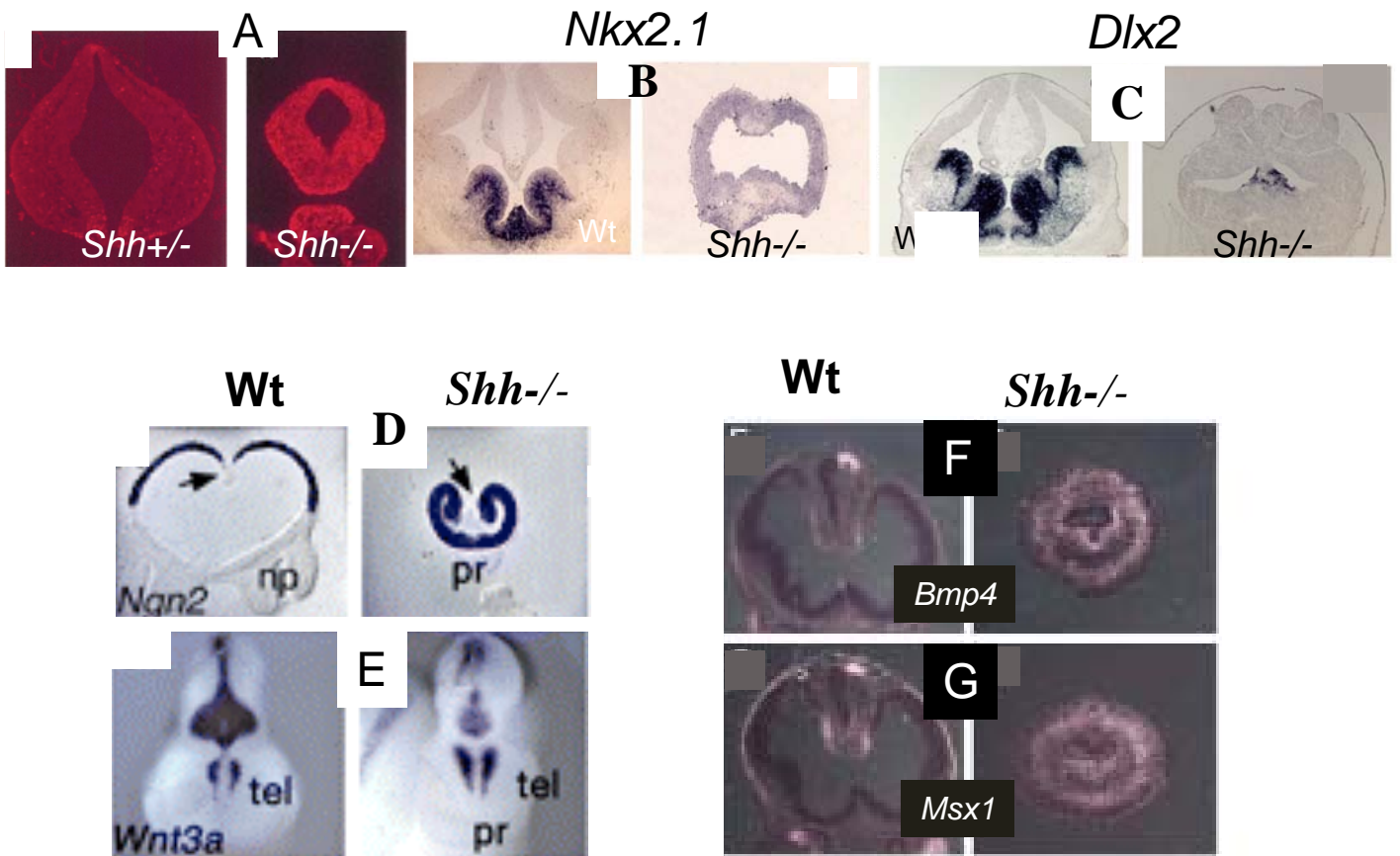


Figure 37 : La signalisation SHH.

Chez les mutants *Shh*^{-/-}, on observe augmentation de l'apoptose (A). D'après *Ohkubo et al., 2002*. Ces mutants ne présentent plus de territoires télencéphaliques ventraux, perte caractérisée par l'absence d'expression de marqueurs ventraux comme *Nkx2.1* (B) et *Dlx2* (C). D'après *Fuccillo et al., 2006*. Les territoires dorso-latéraux sont présents et sont caractérisés par l'expression de *Ngn2* (D) dans le cortex ainsi que de *Wnt3a* (E) dans l'ourlet cortical à E10.5. D'après *Rash et Grove., 2007*. La perte de la roof plate est caractérisée par la perte d'expression de *Bmp4* (F) et de *Msx1* (G).

Ces données révèlent que la signalisation FGF originaire de la plaque commissurale intervient à la fois dans la formation des territoires ventraux mais également de la plaque du toit.

6. La ligne Médiane Ventrale (Plaque du plancher) du cerveau antérieur :

La ligne médiane ventrale comme la plaque commissurale du télencéphale intervient dans la formation du septum, des éminences ganglionnaires et dans la séparation du champ visuel.

La signalisation SHH, originaire de la plaque pré-chordale, induit la formation de la ligne médiane ventrale du cerveau antérieur. Une fois formée, la plaque du plancher met en place une signalisation SHH qui induit l'expression des marqueurs ventraux indispensables à la régionalisation dorso-ventrale. Ceci permet la formation correcte des éminences ganglionnaires dans le télencéphale ventral. Chez les mutants *Shh*^{-/-}, on observe que le télencéphale est réduit en taille par rapport à un télencéphale sauvage, et que cette réduction est corrélée à l'augmentation de l'apoptose dans le télencéphale latéral chez ces mutants (Figure 37A) {Ohkubo, 2002 #310}. Ces mutants présentent une holoprosencéphalie de type classique (voir figure 28) due à la perte des territoires télencéphaliques ventraux, qui est caractérisée par l'absence d'expression de marqueurs ventraux comme *Nkx2.1* et *Dlx2* (Figure 37B et C) {Chiang, 1996 #311; Rallu, 2002 #312; Fuccillo, 2006 #313; Rash, 2007 #314}, ainsi qu'à un défaut d'invagination de la plaque du toit. Une étude récente montre que chez les mutants *Shh*^{-/-}, la plaque du toit télencéphalique est perdue comme le révèle le défaut d'expression de *Bmp4* et de *Msx1* (Figure 37F et G) {Hayhurst, 2008 #323}. En revanche, les territoires dorso-latéraux se forment et sont caractérisés par l'expression de *Ngn2* (Figure 37D) dans le pallium et de *Wnt3a* (Figure 37E) dans l'ourlet cortical. De plus, chez les mutants *Shh*^{-/-}, la formation de la plaque commissurale est affectée puisqu'on observe la perte d'expression de *Fgf8* {Hayhurst, 2008 #323}. Ces résultats révèlent que la signalisation SHH est nécessaire à la fois à la formation des territoires ventraux, de la plaque du toit mais aussi de la plaque commissurale.

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

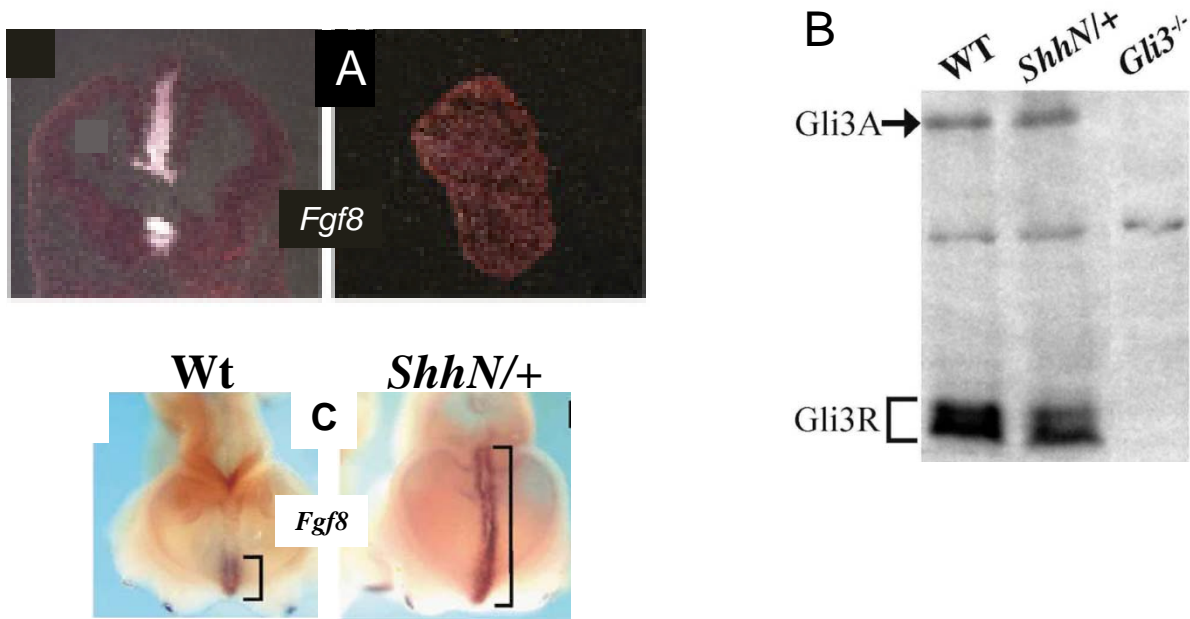


Figure 38 : L'expression de *Fgf8* est perdue chez les mutants *Shh* (A). D'après *Hayhurst et al., 2007*. En revanche, si on induit une signalisation SHH ectopique (*ShhN/+*) on constate l'augmentation de la forme GLI3R dans des extraits de cerveaux totaux à E13.5 (B) et l'extension ectopique du domaine d'expression de *Fgf8* dans le télencéphale (C). D'après *Huang et al., 2007*.

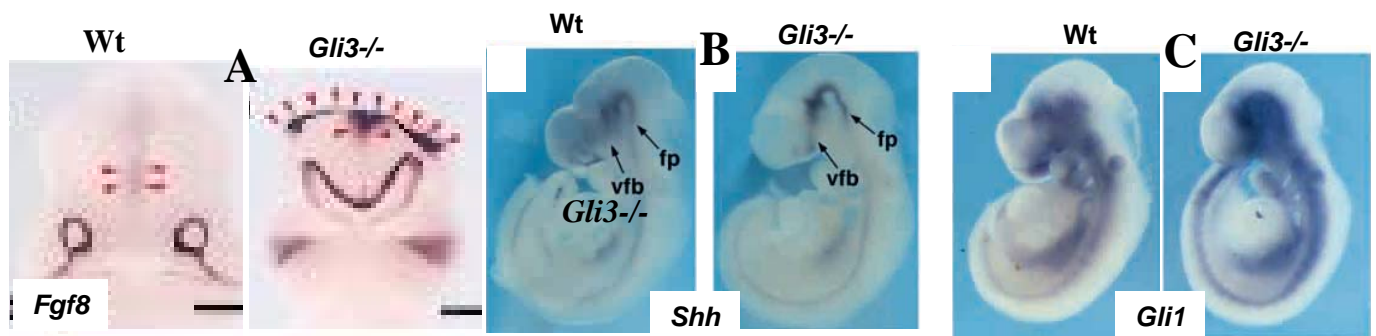


Figure 39 : Les doubles mutants *Shh^{-/-}, Gli3^{-/-}* et les mutants *Gli3^{-/-}*.

On observe chez les doubles mutants *Shh^{-/-}, Gli3^{-/-}*, l'extension de l'expression de *Fgf8* dans la roof plate du télencéphale (A). Tiré de *Aoto et al., 2002*. L'expression de *Shh* (B) et la signalisation de SHH caractérisée par l'expression d'une cible *Gli1* n'est pas modifiée chez les embryons mutants *Gli3^{-/-}* (C). D'après *Theil et al., 1999*.

Bien que ces données révèlent un rôle de la signalisation SHH dans la formation de la plaque du toit, il semble peu probable que cette signalisation agisse directement sur la formation de ce centre de signalisation dorsal puisque *Shh* s'exprime côté ventral. En revanche, comme la signalisation FGF, originaire de la plaque commissurale, intervient également dans la formation de centre organisateur dorsal, l'hypothèse qui est proposée à l'heure actuelle est que la signalisation SHH agisse sur la formation de la plaque du toit via l'induction de la signalisation FGF. Appuyant cette hypothèse, il a été montré que chez les mutants *Shh*^{-/-}, l'expression de *Gli3* est augmentée, alors que celle de *Fgf8* est perdue (Figure 38A). A l'inverse, si on induit une signalisation SHH (*Shh*^{N/+}) ectopique on observe une diminution du taux de GLI3R (Figure 38B) associée à l'extension du domaine d'expression de *Fgf8* depuis la plaque commissurale jusque dans la plaque du toit (Figure 38C) {Huang, 2007 #324}. De plus, la restauration des territoires ventraux en cas de perte de *Gli3*, chez les mutants *Shh*, est corrélée à la restauration et à l'extension de l'expression de *Fgf8* depuis la plaque commissurale jusque dans la ligne médiane dorsale (Figure 39A) {Aoto, 2002 #305}. Ces données suggèrent donc que la signalisation SHH induit la signalisation FGF, via l'inhibition de l'activité répressive de GLI3. Il est intéressant de noter que la réciproque n'est pas vraie, puisque la signalisation SHH n'est pas affectée chez les mutants *Gli3* (l'expression de *Shh* et de *Gli1* est inchangée dans le télencéphale) (Figure 39B et C) {Theil, 1999 #44}.

On vient de voir que la formation de la ligne médiane dorsale fait appel des régulations croisées entre les différentes voies de signalisation en provenance des centres organisateur médians du télencéphale. La formation anormale de l'un de ces centres organisateurs conduit à perturber la formation des territoires médians télencéphaliques et dans les cas les plus sévères à l'apparition d'un phénotype d'holoprosencéphalie. Nous avons vu que l'HPE est associée à des défauts de formation de structures télencéphaliques comme les bulbes olfactifs, les plexus choroïdes, mais également les commissures interhémisphériques comme le Corps Calleux.

L'agénésie du Corps Calleux retrouvée chez les patients souffrant de ciliopathies peut être due à la formation anormale de la ligne médiane du télencéphale. Or, comme les mutants murins présentent des phénotypes sévères compromettant la formation du tube

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

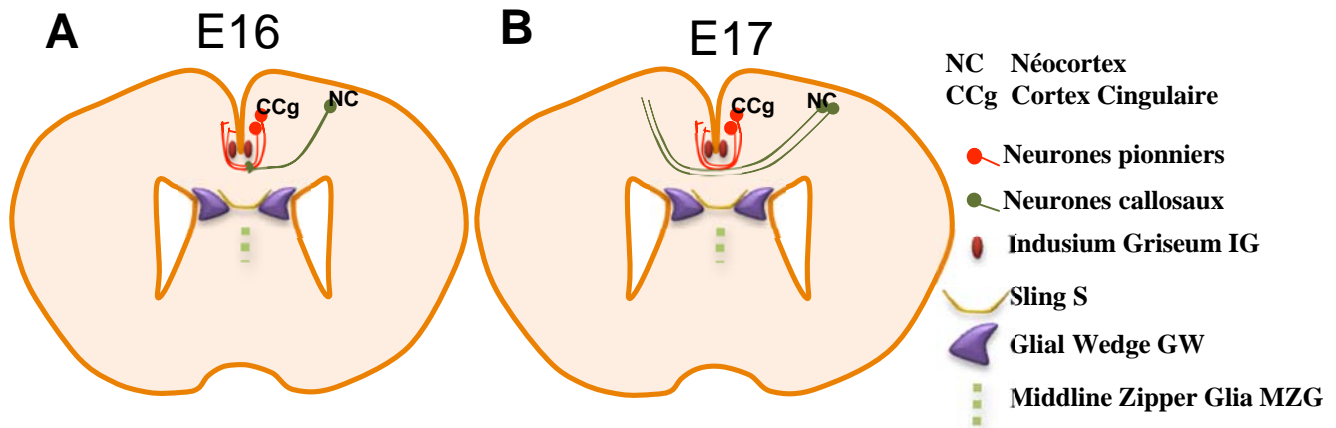


Figure 40 : Formation du CC en région rostrale.

Les neurones pionniers (rouge) issus du Cortex Cingulaire (CCg) projettent leurs axones au travers de la ligne médiane vers E15, formant le passage indispensable à la traversée des axones callosaux (vert) originaires du Néocortex (NC). Les axones callosaux suivent la trajectoire établie au travers de la ligne médiane et cibles les aires contra-latérales. En plus des axones pionniers, les axones callosaux ont besoin de la présence de plusieurs populations cellulaires (GW, MZG, S, IG) situées le long de leur trajectoire.

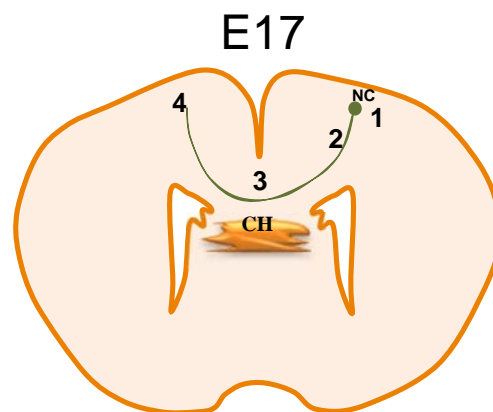


Figure 41 : Formation du CC en région caudale et trajectoire des axones callosaux .

La Commissure Hippocampique (CH) se forme vers E15.5. La présence de cette commissure serait nécessaire à la formation du CC en région caudale. Les axones callosaux suivraient la trajectoire établie par les axones hippocampiques au travers de la ligne médiane.

La trajectoire des axones callosaux peut se décomposer ainsi : (1) ils envoient leurs axones, (2) pivotent médialement, (3) puis traversent la ligne médiane à la frontière cortico-septale et (4) enfin ciblent correctement les aires corticales contra-latérales (et ceci quelque soit la région rostro-caudale concernée).

neural avant que la ligne médiane ne se forme, on ne sait pas si ces mutants présentent ou non une atteinte du Corps Calleux. Dans la suite de cette introduction, je voudrais donc présenter ce que l'on sait sur la formation du Corps Calleux, afin d'avoir toutes les données nécessaires permettant de comprendre comment une atteinte ciliaire peut conduire à l'apparition de l'agénésie callosale.

III. La Formation d'une structure dorso-médiane le Corps Calleux :

1. Le Corps Calleux :

Le Corps Calleux (CC) est une commissure inter-hémisphérique majeure du cerveau antérieur avec la commissure antérieure et la commissure hippocampique {Richards, 2004 #57}. Cette commissure, qui permet de relier les hémisphères cérébraux entre eux, est indispensable à l'établissement de la coordination psycho-motrice. Son absence partielle ou totale, que l'on nomme agénésie du CC, est l'atteinte cérébrale la plus fréquente chez l'homme (1/4 000 individus) et est à l'origine de déficits cognitifs, de manifestations psychotiques mais aussi de crises d'épilepsie rendant l'autonomie des patients difficile.

L'agénésie du CC est un symptôme retrouvé dans un grand nombre de syndromes humains (pour revue {Richards, 2004 #57}) notamment, comme on l'a vu précédemment, chez certains patients atteints de ciliopathies.

Les différentes données obtenues grâce à l'analyse des patients humains et des modèles souris suggèrent que différents mécanismes interviennent dans la régulation de la formation du CC et permettent d'établir progressivement un modèle de genèse callosale.

2. La formation du Corps Calleux :

Suite à la formation des hémisphères cérébraux, lorsque ceux-ci seront complètement individualisés, il va se produire une fusion de ces hémisphères qu'on appelle fusion inter-hémisphérique vers E14-E15 chez la souris. Cette fusion est indispensable à la mise en place du CC au sein de la région cortico-septale. Différentes populations cellulaires gliales ou neuronales se mettent en place au sein de la région cortico-septale. Puis les neurones callosaux qui sont situés dans le néocortex, envoient leurs axones (1),

leurs axones pivotent médiallement (2), traversent la ligne médiane à la frontière cortico-septale (3) et enfin ciblent correctement les aires corticales contra-latérales (4) (Figure 41).

a. Les axones pionniers :

La traversée des axones callosaux nécessite que des axones pionniers aient traversé la ligne médiane et aient rejoint l'hémisphère contra-latéral. C'est grâce à des implantations de différents cristaux de DiI dans le cortex cingulaire (d'où sont originaires les axones pionniers) et le néocortex (d'où proviennent les axones callosaux) que le rôle des axones pionniers, dans la formation du CC, a été mis en évidence. Cette étude a montré que les axones pionniers traversent la ligne médiane à E15.5 avant les axones callosaux. De plus, il a été montré que les premiers axones callosaux qui traversent la ligne médiane fasciculent avec les axones pionniers (Figure 40). Ces données indiquent que les axones du cortex cingulaire préparent le chemin aux axones du CC {Rash, 2001 #325}. Des implantations de cristaux de DiI réalisés dans la ligne médiane du télencéphale le long de l'axe rostro-caudal de E15 à P0 ont montré que les axones pionniers sont nécessaires à la traversée des axones callosaux de la région rostrale à E16 {Richards, 2004 #57}. En région caudale, les axones callosaux croissent en étroite proximité avec les axones de la commissure hippocampique. Comme cette commissure hippocampique se met en place juste avant la formation du CC (vers E15.5 chez la souris) cela suggère que les axones hippocampiques aident les axones callosaux à traverser la ligne médiane en région caudale {Richards, 2004 #57} (Figure 41).

b. Les populations cortico-septales :

Des molécules de guidage, produites par les populations qui peuplent la région cortico-septale, sont nécessaires pour guider correctement les axones callosaux tout au long de leur trajectoire. Il existe de nombreux mutants de molécules guidage qui sont accallosaux (que je ne vais pas traiter dans la suite). Concernant les populations cellulaires productrices de ces molécules de guidage, elles sont retrouvées organisées en quatre zones dans la région cortico-septale : la Glial Wedge (GW) composée de cellules de la glie radiaire est localisée dans la zone ventriculaire des ventricules latéraux ; l'Indusium Griseum (IG) composée de neurones et de cellules gliales est située dans le cortex médian ;

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

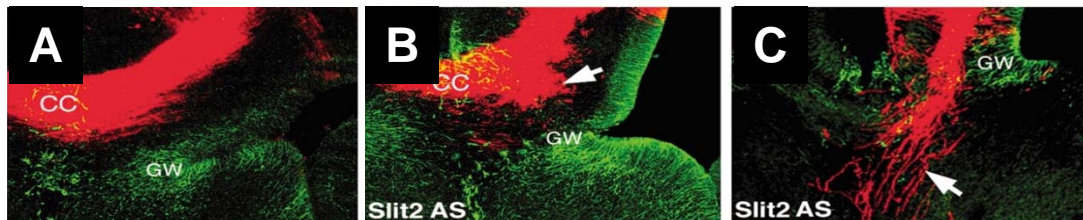


Figure 42 : Coupes coronales de cerveau à E17 après injection *in utero* d'oligonucléotides antisens de Slit2 dans la zone ventriculaire.

A E16, injection d'oligonucléotides contrôles (A), ou antisens de Slit2 (B et C) dans le ventricule latéral. Dissections des embryons à E17 et traçage des axones callosaux au DiI.

On observe des trajectoires aberrantes dans le cas d'oligonucléotides antisens de Slit2 (B et C). Les trajectoires des axones callosaux sont plus ou moins altérées, il y a une gradation de l'atteinte du CC, on remarque notamment en C une agénésie du CC avec tous les axones callosaux qui partent dans le septum. Illustrations tirées de *Shu et al., 2003*.

la Midline Zipper Glia (MZG) dans le septum médian composée de neurones et de cellules gliales et enfin, on retrouve la sling sous callosale localisée dans la frontière médiane cortico-septale et qui est majoritairement composée de neurones {Shu, 2003 #326; Shu, 2003 #327} (Figure 40).

i. Les populations gliales de la région cortico-septale :

Les cellules gliales de la GW sécrètent Slit2 {Shu, 2001 #58}. Le rôle de Slit2 a été mis en évidence grâce à des injections *in utero* d'oligonucléotides antisens de cette protéine dans le ventricule latéral vers E15-E16 chez la souris {Shu, 2003 #59}. L'observation à E17 des cerveaux après injection, révèle des défauts de trajectoires des axones callosaux avec notamment des migrations aberrantes dans le septum (Figure 42B) allant jusqu'à l'accallosalité complète (Figure 42C). Ces résultats révèlent que Slit2 est donc nécessaire pour empêcher les axones callosaux d'entrer dans le septum et permet de promouvoir leur passage au travers de la ligne médiane.

Des études faites, *in vitro*, révèlent que des explants de GW inhibent la croissance des axones corticaux et que dans des tranches organotypiques, la dissection de la GW et sa réimplantation droite/gauche inversée (réorientation) induit des défauts de trajectoires axonales {Shu, 2001 #58}. De plus, l'activité répulsive de cette GW peut être mimée par des cellules exprimant Slit2 *in vitro*. Ces données suggèrent que l'activité répulsive-suppressive médiée par le GW est due à Slit2. Pour confirmer cela, *Shu et al., 2003* {Shu, 2003 #59} ont entrepris d'ajouter des protéines solubles Robo, récepteurs de Slit, dans des gels de collagènes contenant des cocultures de cortex et de GW. L'analyse de ces cocultures révèle qu'en présence de Robo, l'effet répulsif médié par la GW sur les axones corticaux est diminué, confirmant le rôle de Slit2 dans la GW.

Prises ensembles, ces données montrent que la GW, via la sécrétion de Slit2, permet aux axones callosaux de traverser la ligne médiane (pré-crossing), en empêchant l'entrée des axones callosaux dans le septum, mais est également impliquée dans la répulsion des axones callosaux afin d'éviter qu'ils ne retraversent la ligne médiane (post-crossing).

L'IG via sa sécrétion de Slit2 participe également au guidage des axones callosaux au travers de la ligne médiane. Récemment, deux études indépendantes révèlent l'importance de ces populations dans l'établissement du CC. Chez les souris mutantes

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

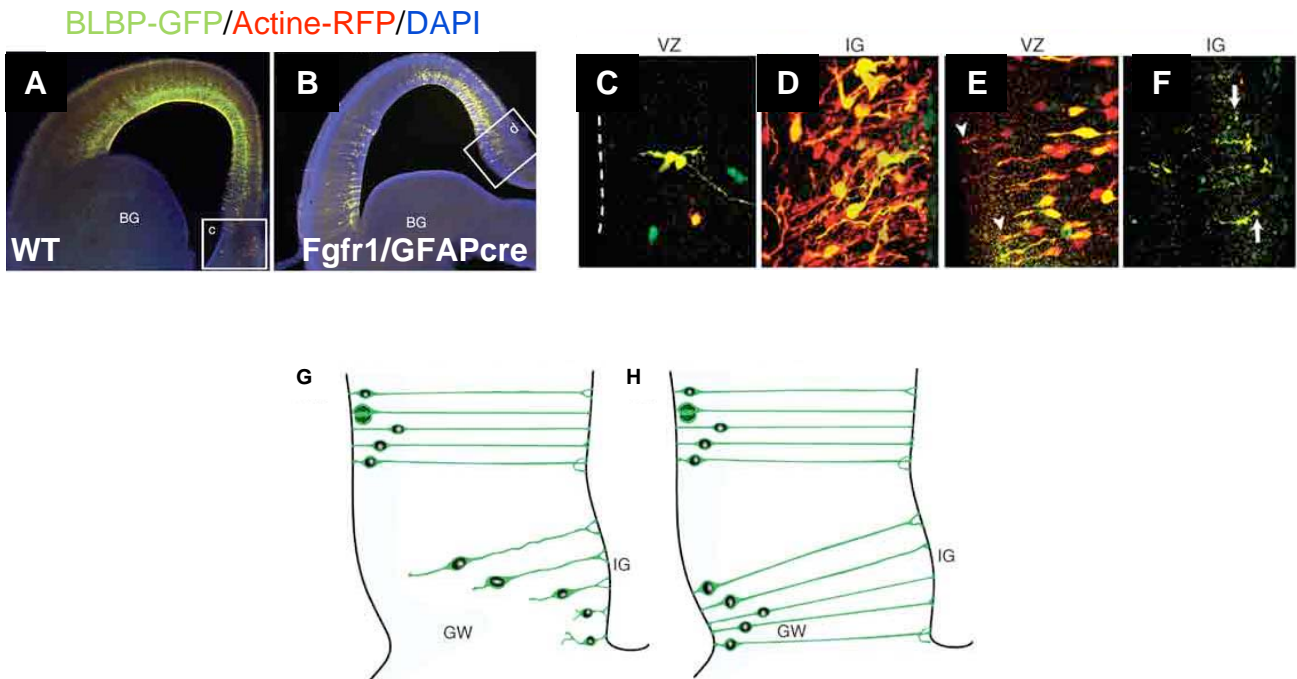


Figure 43 : Coupes coronales de cerveau à E15.5 de mutant conditionnel *Fgfr1* dans la glie.

On observe un défaut de translocation des cellules de la glie radiaire depuis la zone ventriculaire vers l'IG, chez les mutants, les cellules restent bloquées dans la zone ventriculaire (B zoom en E et F, modèle de migration en H) par rapport à la situation sauvage (A zoom en C et D, modèle en G). Afin de marquer spécifiquement les cellules de la glie radiaire, ils utilisent un vecteur exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur BLBP (marqueur de la glie radiaire). Ce vecteur est électroporé dans la zone ventriculaire dorso-médiane à E14.5 avec un vecteur d'expression contrôle (exprimant RFP sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire de l'actine). Illustrations tirées de *Smith et al., 2006*.

Fgfr1 ou doubles mutantes Fgfr1f/f ; Foxg1-cre+/- il n'y a plus ni de GW, ni de MZG, ni d'IG. En absence de ces populations, le CC ne traverse plus la ligne médiane (Smith et al., 2006; Tole et al., 2006). L'inactivation conditionnelle de Fgfr1 spécifiquement dans les cellules gliales (utilisation d'une souris Gfap-cre+/-) conduit à l'apparition d'un phénotype d'accallosalité associée à la perte de l'IG. L'analyse de Fgfr1f/f ; Gfap-cre+/- démontre que l'absence de cette population est due à un défaut de migration de la glie radiaire depuis la zone ventriculaire vers l'IG (Figure 43). Ces résultats suggèrent donc que FGFR1 joue un rôle clé dans cette migration radiaire et donc dans la formation des populations gliales de la ligne médiane. Le fait que l'inactivation conditionnelle de Fgfr1 dans les neurones (Fgfr1f/f ; Syn-cre+/-) ne conduit pas à l'accallosalité conforte le rôle de FGFR1 dans la mise en place des cellules gliales dans l'IG et le rôle de ces populations dans la formation du CC (Smith et al., 2006).

Chez les souris déficientes pour les gènes Nfi, codant des facteurs de transcription, on observe une accallosalité. L'absence du CC, chez les souris mutants pour Nfia et Nfib, est associée à des défauts de formation des populations cortico-septales puisque les populations de l'IG, de la GW sont réduites voire absentes et que la sling sous callosale est perdue (Shu et al., 2003 ; das Neves et al., 1999 ; Steele-Perkins et al. 2005). Il a été montré que les facteurs NFI sont des régulateurs de l'expression de Gfap (Gopalan et al., 2006 ; Cebolla et al., 2006), expliquant que chez les mutants on observe une diminution de l'expression de Gfap. Les facteurs NFI peuvent donc réguler la différenciation des cellules de la région cortico-septale concourant à la formation des populations gliales.

ii. Les populations neuronales de la région cortico-septale :

Pendant longtemps, les seuls neurones connus pour participer à la formation du CC étaient les neurones formant le CC lui-même. La première population neuronale identifiée en tant que telle, est la sling sous callosale. Les premières analyses morphologiques réalisées en microscopie électronique sur cette sling sous callosale,

l'avaient caractérisé à tort comme étant composée de cellules gliales (Silver et al., 1982). Cependant grâce à la découverte des marqueurs cellulaires, il a pu être démontré que ces cellules sont majoritairement des neurones (exprimant NeuN) et non pas des cellules gliales (exprimant très peu ou pas GFAP) (Shu et al., 2003c).

Comme les axones du CC traversent la ligne médiane juste au dessus de la sling (Silver et al., 1982), il a été suggéré que cette population neuronale joue un rôle dans la formation du CC. Confortant cette hypothèse, il a été montré que l'ablation de cette Sling sous callosale in utero, avant la formation du CC, est à l'origine de l'agénésie du CC (Silver and Ogawa, 1983).

Les analyses réalisées sur les modèles animaux d'agénésie callosale permettent d'identifier les gènes qui sont impliqués dans la formation du CC. Les résultats récents émanant de ces études viennent étoffer mais surtout augmenter le degré de complexité de cette genèse callosale.

Pendant de nombreuses années, les seules populations cellulaires qui étaient démontrées comme étant impliquées dans la formation du CC étaient les cellules gliales. Depuis peu un attrait grandissant pour les neurones de la région cortico-septale apporte de nouvelles données et démontre leur rôle majeur dans la formation du CC. En effet, une étude récente menée par l'équipe de Lebrand et al., en 2008 (soumis), révèle que des populations neurales convergent vers la ligne médiane avant que le CC ne se forme et peuplent transitoirement le CC au cours du développement embryonnaire. L'une de ces populations est composée de neurones Glutamatergiques qui expriment la Calrétinine (CR) et qui correspond en partie à la Sling. Une autre population de neurones est composée d'interneurones GABAergiques provenant des précurseurs Mash1 (originaires des éminences ganglionnaires du télencéphale). L'analyse des mutants Mash1^{-/-} montrent que la perte des interneurones GABAergiques du CC est corrélée à des défauts de migration et de traversée de ligne médiane par les axones callosaux. De manière intéressante, des transplantations de CC sauvages dans des coupes de cerveau Mash1^{-/-} restaurent la traversée du CC. Ces données indiquent que les populations neuronales du CC et des régions qui l'entourent participent également à la migration des axones

C. LA FORMATION DES STRUCTURES DORSO-MEDIANES CEREBRALES

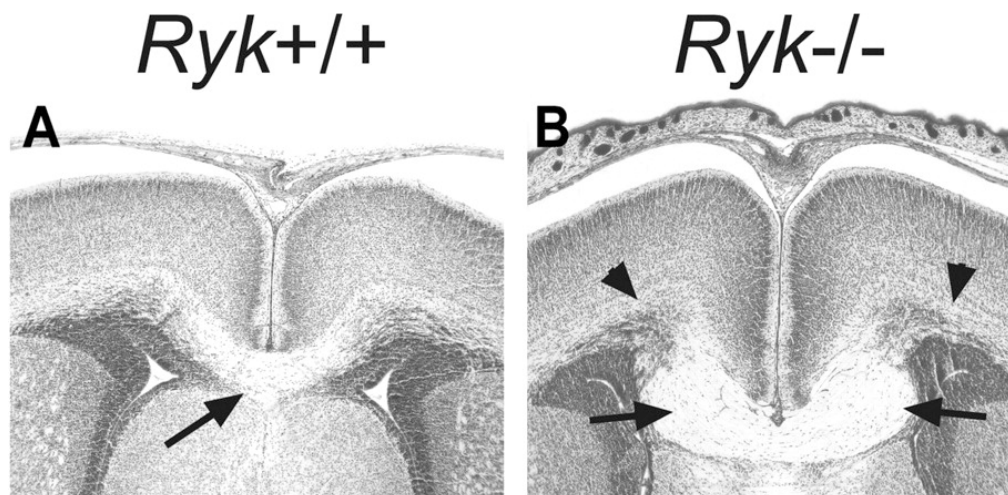


Figure 44 : Coupe coronale du CC du Mutant *Ryk*^{-/-}.

On observe une traversée des axones callosaux, donc pas d'agénésie chez les mutants *Ryk*^{-/-}. En outre, les axones callosaux restent bloqués dans la ligne médiane et ne parviennent pas à cibler les aires corticales contra-latérales (B) par rapport au cas sauvage (A). D'après *Keeble et al., 2006*.

callosaux. De plus des expériences de greffes combinées à l'analyse des souris mutantes démontrent que les neurones Glutamatergiques du CC participent à la croissance des axones callosaux via l'action attractive de Sema3C sur son récepteur Neuropilin1 (Niquille et al., 2008). Ces données récentes révèlent pour la première fois le rôle majeur des neurones dans la genèse callosale et ouvrent de nouvelles perspectives de recherche en ce sens.

c. Le ciblage des aires corticales contra-latérales :

Une fois que les axones callosaux sortent de la ligne médiane, ils vont aller cibler les aires corticales contra-latérales. Une étude récente révèle que cette étape dépend d'une nouvelle voie de signalisation WNT dépendante. L'identification d'une nouvelle famille de récepteur des protéines WNT, que sont les protéines RYK (Hovens et al., 1992), rend plus complexe la compréhension de la signalisation WNT. Cette nouvelle signalisation WNT/RYK est indépendante de Frizzled (Inoue et al., 2004). L'analyse d'embryons de souris déficients pour le gène Ryk, révèle que la voie de signalisation WNT/RYK est impliquée dans l'établissement du CC. En effet, bien que la perte de Ryk chez ces mutants, ne conduit pas à des défauts de traversée de ligne médiane par les axones callosaux, elle empêche les axones callosaux de sortir de la ligne médiane pour aller rejoindre les aires corticales contra-latérales cibles (Figure 44B). Ces données suggèrent que la voie WNT/RYK est nécessaire aux ciblage des aires corticales par les axones callosaux (Keeble et al., 2006).

D. Conclusions :

Nous venons de voir que les cils assurent de nombreuses fonctions au sein de l'organisme. Leur implication dans un certain nombre de morphogenèse commence à être mécaniquement expliqué. Néanmoins, même si leur rôle dans la morphogenèse cérébrale est documenté par les phénotypes des patients atteints de ciliopathies, l'implication des cils au cours de cette organogenèse reste à être caractérisée. L'analyse de mutants murins permet progressivement d'apporter des réponses essentielles quant aux rôles de ces organites cellulaires. Nous avons vu que les facteurs RFX sont des régulateurs de la ciliogenèse. Au sein de notre laboratoire, nous disposons d'un mutant murin *Rfx3* qui présente des caractéristiques phénotypes retrouvés en cas de ciliopathie comme l'hydrocéphalie, un *situs inversus*, des défauts ciliaires au niveau des îlots pancréatiques mais également des atteintes cérébrales majeures et notamment une agénésie du Corps calleux.

J'aimerais dans la suite de ce manuscrit présenter mon travail de doctorat qui a visé à comprendre le rôle de RFX3 dans la formation du cerveau chez la souris et ainsi apporter des éléments de compréhension quant aux rôles des cils dans cette organogenèse. J'ai dans un premier temps entrepris de caractériser les phénotypes cérébraux présentés par les mutants murins *Rfx3* : partie 1 et 2 des résultats. Puis j'ai entrepris d'analyser plus particulièrement la formation du Corps Calleux et de la Commissure Hippocampique afin de comprendre l'origine de l'agénésie callosale des mutants *Rfx3* : partie 3.

RESULTATS

PAPIER 1

Préambule du papier 1

Lors de mon arrivée au sein du laboratoire de Bénédicte Durand, le travail de Dominique Baas, qui avait réalisé un post-doctorat dans l'équipe, était déjà bien engagé et quasiment prêt à faire l'objet d'une publication. Dominique n'étant plus dans l'équipe pour poursuivre son projet, j'ai été amené à réaliser des études complémentaires pour l'acceptation de l'article.

Afin de resituer mon travail dans le contexte scientifique de cette « époque », je vais revenir sur ce qu'avait montré Dominique et ce qui restait à faire pour mettre un point final à cet article.

Lorsque Dominique a commencé son post-doctorat, l'hydrocéphalie des souris *Rfx3*^{-/-} venait d'être démontrée. En revanche, l'origine de cette hydrocéphalie restait à être déterminée. Elle a donc entrepris d'analyser si l'organe sous commissural ainsi que les plexus choroïdes, structures cérébrales indispensables à l'élaboration du liquide céphalorachidien, qui sont fortement RFX3⁺, sont affectées chez les mutants. Ce travail a permis de démontrer que ces structures cérébrales sont anormalement formées, chez les mutants *Rfx3* après la naissance, permettant d'expliquer l'origine de l'hydrocéphalie. En effet, l'organe sous commissural est atrophié et ne produit plus la SCO-spondine et les plexus choroïdes sont moins bien développés et occupent moins d'espace. De plus, la réalisation de coupes coronales de cerveau à l'âge adulte montrait un aqueduc de Sylvius ouvert chez les mutants réfutant l'hypothèse d'une origine obstructive à cette hydrocéphalie. Afin de confirmer cette dernière donnée, j'ai réalisé des coupes sagittales de cerveau de souris adultes pour prouver que l'aqueduc est bien ouvert sur toute sa longueur chez les mutants.

La majeure partie de mon travail sur ce projet, comme pour toute ma thèse, a été de réaliser l'étude des souris *Rfx3* à des stades embryonnaires. Il fallait déterminer quand RFX3 commence à être exprimé par les cellules de l'organe sous commissural et aussi à quel moment de l'embryogenèse les défauts de formation de l'organe sous commissural apparaissent. J'ai donc réalisé le profil d'expression de RFX3 par immunomarquage avec l'anti-RFX3 de E10.5 à E14.5 puisque les autres stades E16.5 et E18.5 avaient déjà été réalisés. Et puis par la suite, j'ai étudié l'expression de la SCO-spondine de E10.5 à E16.5 chez des embryons issus de souris sauvages et mutantes afin de déterminer à quel moment l'organe sous commissural est affecté. Ces travaux ont permis de montrer que les cellules de l'organe sous commissural expriment RFX3 dès le début de cette organogenèse et que

l'organe sous commissural n'est pas formé, chez les mutants, expliquant l'absence d'expression de la SCO-spondine.

Mon analyse des cerveaux à E18.5, a également permis de démontrer que même si l'hydrocéphalie n'apparaît qu'après la naissance chez les mutants *Rfx3*, une dilatation ventriculaire était déjà présente avant, signe que cette hydrocéphalie est due à un défaut au cours de l'embryogenèse plutôt qu'à une origine obstructive confortant alors nos résultats.

A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells

D. Baas,^{1,*} A. Meinie¹, C. Benadiba,¹ E. Bonnafé,¹ O. Meinie², W. Reith³ and B. Durand¹

¹CGMC UMR 5534 CNRS, Université Claude Bernard Lyon-1, 69622 Villeurbanne, France

²INSERM UMR 384, Faculté de Médecine, 63001 Clermont-Ferrand, France

³Department of Pathology and Immunology, University of Geneva Medical School, CH-1211, Geneva, Switzerland

Keywords: choroid plexus, cilia, RFX transcription factors, SCO-spondin, subcommissural organ

Abstract

Ciliated ependymal cells play central functions in the control of cerebrospinal fluid homeostasis in the mammalian brain, and defects in their differentiation or ciliated properties can lead to hydrocephalus. Regulatory factor X (RFX) transcription factors regulate genes required for ciliogenesis in the nematode, drosophila and mammals. We show here that *Rfx3*-deficient mice suffer from hydrocephalus without stenosis of the aqueduct of Sylvius. RFX3 is expressed strongly in the ciliated ependymal cells of the subcommissural organ (SCO), choroid plexuses (CP) and ventricular walls during embryonic and postnatal development. Ultrastructural analysis revealed that the hydrocephalus is associated with a general defect in CP differentiation and with severe agenesis of the SCO. The specialized ependymal cells of the CP show an altered epithelial organization, and the SCO cells lose their characteristic ultrastructural features and adopt aspects more typical of classical ependymal cells. These differentiation defects are associated with changes in the number of cilia, although no obvious ultrastructural defects of these cilia can be observed in adult mice. Moreover, agenesis of the SCO is associated with downregulation of SCO-spondin expression as early as E14.5 of embryonic development. These results demonstrate that RFX3 is necessary for ciliated ependymal cell differentiation in the mouse.

Introduction

Homeostasis of the cerebrospinal fluid (CSF) is critical for the development and survival of mammals. Alterations affecting the flow, synthesis or absorption of the CSF can lead to hydrocephalus (Bruni *et al.*, 1985), which has severe consequences for vital functions. The cellular and genetic causes of most cases of hydrocephalus in humans remain unknown. The disease appears to be multigenic in origin (Bruni *et al.*, 1988).

There is a clear link between defects in the function of cilia and the development of hydrocephalus in mammals. Among human diseases known to result from defects in cilia (Afzelius, 2004; Pan *et al.*, 2005), primary ciliary dyskinesia, a disease characterized by immotile cilia, is associated with hydrocephalus in certain patients (Greenstone *et al.*, 1984; Jabourian *et al.*, 1986; De Santi *et al.*, 1990; al-Shroof *et al.*, 2001). Mutations affecting the assembly or movement of ependymal cilia also give rise to hydrocephalus in mice (Chen *et al.*, 1998; Taulman *et al.*, 2001; Ibanez-Tallon *et al.*, 2002, 2004; Sapiro *et al.*, 2002; Banizs *et al.*, 2005).

Several brain structures composed of ciliated ependymal cells play key roles in controlling the secretion, absorption and circulation of the CSF (Davson & Segal, 1996). The choroid plexuses (CP) are the major sites of CSF secretion (Redzic & Segal, 2004), which is ensured by specialized multiciliated ependymal cells. Microcirculation of the CSF is performed by multiciliated ependymocytes lining the ventricular cavities (Del Bigio, 1995). In the posterior brain and spinal chord, CSF circulation is facilitated by the Reissner fibre, an

extra-cellular protein backbone secreted by the subcommissural organ (SCO; Gobron *et al.*, 2000). The SCO consists of specialized ependymal cells carrying only a few cilia (Rodriguez *et al.*, 1998). The functions of the cilia present in the CP and SCO are not understood. However, a recent study has demonstrated that ciliary integrity is necessary for correct function of the CP (Banizs *et al.*, 2005).

Transcription factors belonging to the regulatory factor X (RFX) family regulate genes involved in the assembly and function of cilia in nematodes, drosophila and mice (Swoboda *et al.*, 2000; Dubrulle *et al.*, 2002; Bonnafé *et al.*, 2004). RFX factors contain a characteristic DNA binding domain that is related to the winged-helix subfamily of helix-turn-helix domains (Emery *et al.*, 1996; Gajiwala *et al.*, 2000). There are five RFX factors (RFX1–RFX5) in mammals. Mice lacking RFX3 are characterized by left–right asymmetry defects resulting from the impaired growth of monocilia on the embryonic node (Bonnafé *et al.*, 2004), which is consistent with the well-documented role of nodal cilia in establishment of the left–right body axis (McGrath & Brueckner, 2003; Shiratori & Hamada, 2006).

In addition to left–right asymmetry defects, we show here that RFX3-deficient mice suffer from severe hydrocephalus without stenosis of the Sylvius aqueduct. This hydrocephalus is associated with abnormal differentiation of the CP and marked agenesis of the secretory ependymal cells of the SCO. These defects are associated with changes in the number of cilia but not with obvious ultrastructural defects of the cilia. Finally, SCO agenesis is accompanied by severe downregulation of SCO-spondin expression, a marker for ependymal cells of the SCO, as early as E14.5 of embryonic development. In full agreement with these phenotypes, we find that RFX3 is expressed strongly and dynamically during embryonic and postnatal development in the ciliated epithelia of the mouse CNS.

Correspondence: Dr B. Durand, as above.

E-mail: Benedicte.Durand@Univ-lyon1.fr

*Present address: IBCP, 7 passage du Vercors, F-69367, Lyon, France.

Received 1 March 2006, revised 14 June 2006, accepted 15 June 2006

Materials and methods

Mice and genotyping

Rfx3-deficient mice were generated as described (Bonnafe *et al.*, 2004). Two mutant alleles, *Rfx3^{neoR}* and *Rfx3⁻*, which differ only with respect to the presence of a neomycin resistance gene in the second intron (Bonnafe *et al.*, 2004), were used here. No differences in brain phenotype were observed between mice carrying the two alleles. Genotyping was performed by polymerase chain reaction using genomic DNA isolated from tail biopsies and the primers M3.A (5'-GTC ATG CTG GAA AAT TTG AAG-3') and M3.B (5'-AGT TGG CTT CTA ACT TCT ATG-3'), as described previously (Bonnafe *et al.*, 2004). Mouse breeding and handling were carried out in a certified animal housing facility according to procedures approved by the local animal care and experimentation authorities (Ministère délégué recherche et nouvelles technologies, agreement N° 12635; Direction des services vétérinaires, agreement N° A69.281). Experiments were performed with mice of a mixed 129/Sv × C57BL/6 background.

Scanning electron microscopy

Mice were killed with CO₂ and perfused with 2% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, France), 0.1 M cacodylate buffer (VWR International, France), pH 7.4, brains were removed, cut into small fragments and fixed overnight at 4 °C in the same solution. Brain samples were then washed several times in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.4 and postfixed for 15 min in 1% OsO₄ (Euromedex, France), 0.1 M cacodylate buffer. Fixed brain samples were washed extensively with distilled water and dehydrated in a graded series of ethanol solutions and finally in acetone. Brain samples were then prepared for scanning electron microscopy by the critical point freeze-dry procedure (Balzers-Union, CPD020). Samples were surface-coated using a gold/palladium sputtering device (Hummer 2, Technics) under optimal conditions for 3 min 30 s and observed with a scanning electron microscope (S800, Phillips) at 15 keV. Observations were performed at the Centre for Microstructure Analysis of the University of Lyon.

Transmission electron microscopy

Brain samples were isolated, fixed, postfixed and rinsed in distilled water as described for scanning electron microscopy. The tissues were then dehydrated with a graded series of ethanol solutions, incubated in propylene oxide (Prolabo, France) for 30 min and soaked for 1 h in 50% propylene oxide/50% epoxy resin (eponA/B). After embedding in Epon (Chimie plus, France), samples were cut with an Ultracut S or

E (Leica). Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a transmission electron microscope (HU 12A Hitachi) at the Centre d'Imagerie Cellulaire Santé, Université d'Auvergne.

Light microscopy

For histological analysis, dissected mouse brains were fixed in Bouin's fixative (Sigma-Aldrich), cut into 10–15-µm-thick sections and stained with haematoxylin-eosin. Semi-thin sections (0.5 µm) were stained with toluidine blue and analysed by light microscopy.

Immunohistochemistry

Mouse brains were removed and fixed overnight at 4 °C in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline. Immunohistochemistry was then performed as described (Baas *et al.*, 2000). The rabbit anti-RFX3 serum (Reith *et al.*, 1994) and the anti-SCO-spondin antibody (Goncalves-Mendes *et al.*, 2003) have been described. The anti-RFX3 antibody was affinity purified using recombinant mouse RFX3 produced in *Escherichia coli*. The specificity of the anti-RFX3 antibody was verified by immunostaining of *Rfx3*-deficient mouse brains.

Results

Hydrocephalus in *Rfx3*-deficient mice

Mice having a deficiency in the *Rfx3* gene were generated by homologous recombination in ES cells as described previously (Bonnafe *et al.*, 2004). Most *Rfx3*-deficient mice die during embryogenesis or at birth, probably from severe left–right asymmetry defects. However, a small fraction of the mice survive past birth and up to weaning or adulthood (Bonnafe *et al.*, 2004). We observed that nearly all mice that survive more than 5 days developed hydrocephalus (Table 1, 22 out of 24 postnatal mice examined, Fig. 1A–G). The two mice that showed nearly no postnatal ventricular dilation survived past 6 months of age. For the remaining 22 mice, the severity of hydrocephalus was variable (Fig. 1C–E, Table 1). In the most extreme cases it was readily visible as a marked skull deformation (Fig. 1A). Severe hydrocephalus was always accompanied by a general deterioration in health – characterized by prostration and weight loss – which necessitated killing of the mice. Towards the end of embryogenesis approximately half of the embryos already present a mild dilation of the ventricles (Table 1, Fig. 1I–K) arguing for a congenital origin of the hydrocephalus.

A systematic analysis of brain sections from *Rfx3*-deficient mice indicated that no obstruction of the aqueduct of Sylvius was evident,

TABLE 1 Incidence and severity of hydrocephalus in *Rfx3*-deficient mice

Age of mice	Number of <i>Rfx3</i> ^{-/-} mice analysed	Number with ventricular dilation	Number with no ventricular dilation	Severity of hydrocephalus		
				Moderate	Marked	Severe
E18.5	6	3	3 ^(a)	3 ^(b)	0	0
5 days PN	3	3	0	2	1 ^(c)	0
2 weeks PN	3	3	0	3 ^(d)	0	0
3 weeks PN	3	3	0	1	1	1
6 weeks PN	6	6	0	3 ^(e)	1 ^(f)	2 ^(g)
20 weeks PN	9	7	2	4 ^(h)	2 ⁽ⁱ⁾	1
Totals	30	25	5	16	5	4

^(a)One embryo is shown in Fig. 1K. ^(b)Two of the embryos are shown in Fig. 1I and J. ^(c)The brain section is shown in Fig. 1G. ^(d)The ventricles were observed by SEM in Fig. 3. ^(e)A representative brain section is shown in Fig. 1E. ^(f)The brain section is shown in Fig. 8B. ^(g)One of the brain sections is shown in Fig. 1C. ^(h)The brain sections are shown in Figs 1M, 8C and D, 4B, 5B, D and F, 6B and D, and 7B. ⁽ⁱ⁾A representative brain section is shown in Fig. 1D.

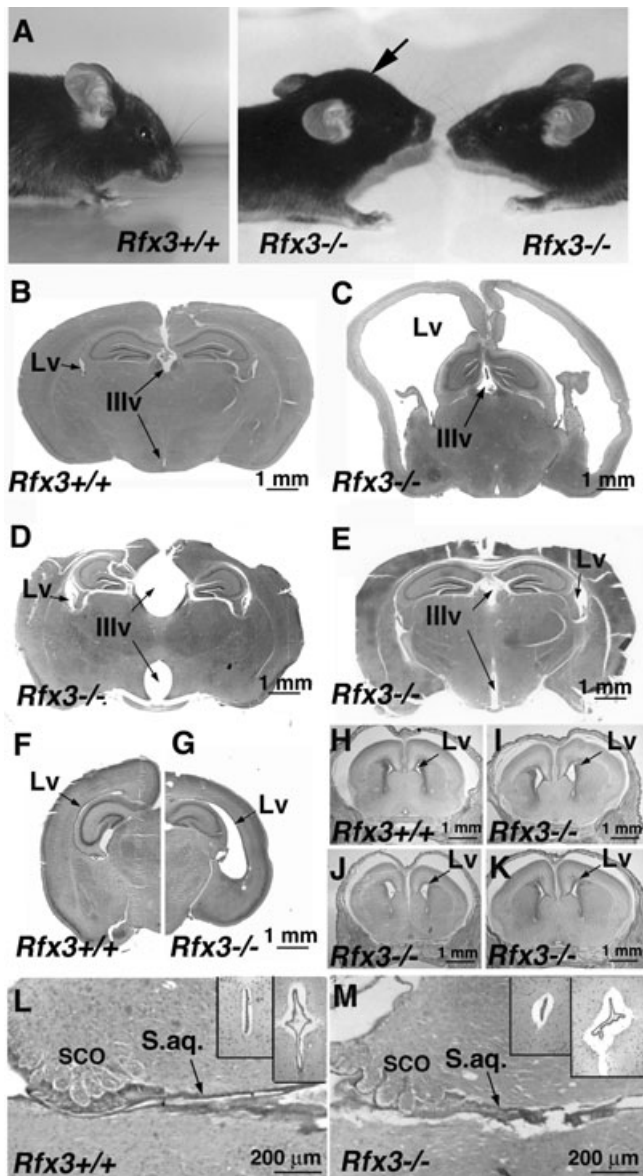


FIG. 1. *Rfx3*-deficient mice suffer from congenital hydrocephalus of variable severity. (A) In the most severe cases, hydrocephalus in *Rfx3*-deficient mice is visible as a typical head deformation (middle, black arrow). In less severe cases, no deformation is evident (right) relative to wild-type mice (left). (B–E) Haematoxylin-eosin-stained transverse sections (15 μ m thick) of adult brains from *Rfx3*-deficient mice exhibiting a variable degree of hydrocephalus (C–E: 6, 20 and 6 weeks postnatal, respectively) and from a littermate control (B, 6 weeks). Note the variable degree of dilatation of the lateral and third ventricles in the *Rfx3*-deficient mice (arrows in C–E). (F and G) Haematoxylin-eosin-stained transverse sections (15 μ m) of brains from a 5-day-old *Rfx3*-deficient mouse (G) and a littermate control (F). Note the strong dilation of the lateral ventricle. (H–K) Haematoxylin-eosin-stained transverse sections (10 μ m) of the brains from wild-type (H) and *Rfx3*-deficient (I–K) 18.5-day-old embryos. Note the mild dilation of the lateral ventricles in two of the mutants (I and J), but no dilation in the third (K). (L and M) Mid-sagittal sections (10 μ m) showing the aqueduct of Sylvius in the brains from a 20-week-old *Rfx3*-deficient mouse (M) and a wild-type control (L). Note that the ependymal cell layer is detached from the underlying tissues in the aqueduct of the *Rfx3*-deficient mouse (M). The insets show transverse sections of the Sylvius aqueducts from two additional wild-type and *Rfx3*-deficient mice at two positions along the anterior–posterior axis. No histological differences can be observed in these transverse sections between the aqueducts of wild-type and mutant mice. Illv, third ventricle; Lv, lateral ventricle; S.aq., Sylvius aqueduct; SCO, subcommissural organ.

thus excluding this as a possible cause of hydrocephalus (Fig. 1L and M). We did, however, observe that the ependymal cell layers lining the ventricles and aqueduct of Sylvius were systematically detached from the underlying cells in *Rfx3*-deficient mice (Fig. 1M, see also Fig. 8B), suggesting that there is a reduction in cell adhesion of the ependymal layer.

Strong and dynamic *Rfx3* expression in ependymal cells during development

The expression of RFX3 during embryogenesis was investigated by immunostaining of brain sections ranging from stage E10.5 to birth (Fig. 2). At E10.5, RFX3 is detected in all neural tube cells but with a distinctly stronger expression in the dorsal midline of the neural tube from which the CPs and SCO will arise (Fig. 2A). At stage E12.5, RFX3 expression is detected in the specialized ependyma primordia of the CP as soon as they differentiate from the cephalic vesicles (Fig. 2B, E and F). By stage E14.5, strong immunoreactivity is observed in the CP of all ventricles (lateral ventricles, Fig. 2C; fourth ventricle, Fig. 2G; third ventricle, data not shown). This RFX3 expression persists in the CP at later stages (Fig. 2D, H and N).

The SCO derives from the dorsal diencephalic midline, which expresses RFX3 at E10.5 (not shown). At E12.5, RFX3 expression in the midline of the diencephalic vesicle is maintained and a slightly stronger staining of cells of the prospective SCO can be observed in the roof of the diencephalic vesicle (Fig. 2I). RFX3 expression is markedly increased in the differentiating SCO at later stages (E14.5, Fig. 2J; E16.5, Fig. 2K; and P0, Fig. 2L).

No distinctive staining of cells lining the lateral walls of the ventricles can be observed at stage E12.5, although a uniform weak staining is visible in the entire neuroepithelium (Fig. 2B). At E14.5, specific staining is consistently observed in cells lining localized regions of the ventricles, for example in the roof of the fourth ventricle (Fig. 2G, arrow). No marked staining can be observed in the nuclei of ependymal cells bordering the lateral ventricles at stages E16.5 (Fig. 2D, arrow) or E18.5 (data not shown), whereas strong RFX3 expression is evident at these stages, in the third and fourth ventricles, and in the Sylvius aqueduct (arrows in Fig. 2K, M and N). Ependymal cells of the third and fourth ventricles (Fig. 2L and O) and of the inner wall of the lateral ventricles (Fig. 2P) all express RFX3 strongly at birth. Finally, all ciliated cells of the ventricles express RFX3 in adult mice (data not shown).

In summary, RFX3 is expressed strongly in the CP and SCO primordia and organ throughout their development and differentiation, whereas RFX3 expression increases progressively during development in ventricular ependymal cells.

No ciliary defects are evident in *Rfx3*-deficient ventricular ependymal cells

Examinations by scanning electron microscopy indicated that the ependymal cells lining the walls of the lateral and third ventricles did not exhibit any obvious ciliary defects in two weeks postnatal mice (Fig. 3). As in control mice, the ventricular ependymal cells of *Rfx3*-deficient mice carry numerous long cilia. These cilia are composed of 9 + 2 doublets of microtubules and exhibit no obvious structural alterations (data not shown). Observations made by differential interference contrast microscopy on brain slices demonstrated that cilia were beating actively in both mutant and wild-type controls. We were, however, unable to compare their beating frequency by video recording due to the small number of *Rfx3*-deficient individuals

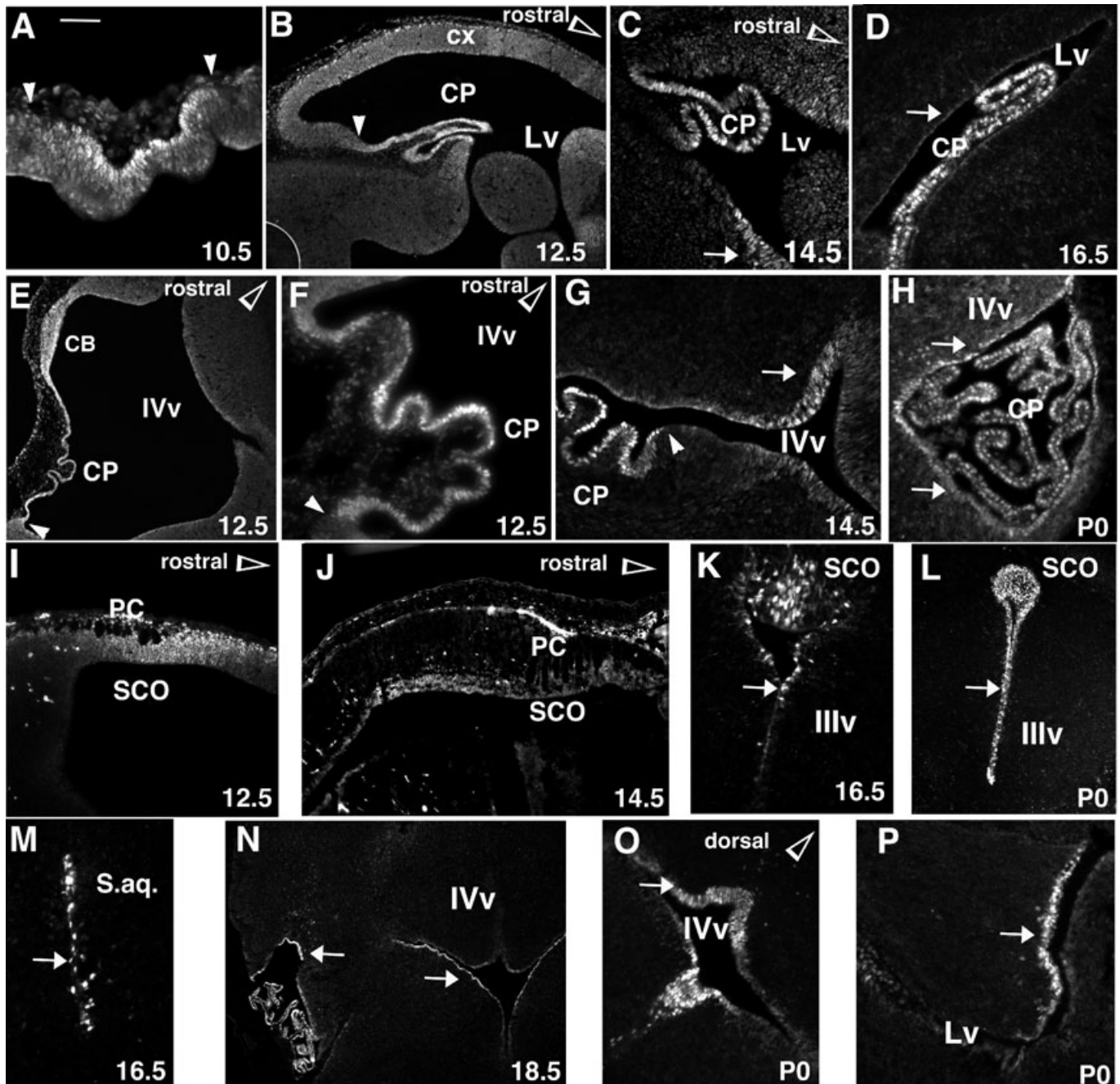


FIG. 2. *Rfx3* is expressed during development in the subcommissural organ (SCO), choroid plexuses (CPs) and ventricular ependymocytes. Sagittal (B, C, E, F, I, J) or transverse (A, D, G, H, K–P) brain sections from the indicated stages were stained with an RFX3-specific antibody. Orientations of the sagittal sections are indicated by open arrowheads labelled 'rostral' or 'dorsal'. For transverse sections, dorsal is to the top, unless indicated. (A) At E10.5, a strong expression of RFX3 is detected in the dorsal midline of the telencephalic vesicle from which the CPs arise at later stages. The white arrowheads indicate the limits of this strong expression compared with the rest of the neural tube. (B) At E12.5, RFX3 is expressed in the developing CPs of the future lateral ventricles. Note the sharp boundary between RFX3-positive and -negative cells (white arrowhead). (C) At E14.5, RFX3 is expressed in the CPs and certain regions (arrow) of the walls of the lateral ventricles. (D) RFX3 expression is maintained in the CPs of the lateral ventricles at E16.5 until birth (not shown). Ependymocytes of the lateral ventricles do not express RFX3 at E16.5 (arrow in D). (E and F) RFX3 is expressed in the roof of the hindbrain and in the developing plexus of the fourth ventricle as early as E12.5. Note the sharp boundary between RFX3-positive and -negative cells situated immediately adjacent to the growing CP of the fourth ventricle (white arrowhead in E, F). (G, H) Strong RFX3 expression is retained until birth in the CP of the fourth ventricle. Note the sharp boundary between RFX3-positive and -negative cells situated immediately adjacent to the growing CP of the fourth ventricle (white arrowhead in G). Only certain regions lining the fourth ventricle are RFX3-positive at E14.5 (arrow in G), whereas all ependymocytes of the IVth ventricle express RFX3 at P0 (white arrows in H). (I) At E12.5, RFX3 is expressed on midline sagittal sections at the level of the posterior commissure. (J) At E14.5 SCO expression increases in the SCO region in the dorsal diencephalic midline. (K and L) RFX3 is expressed strongly in the developing SCO and in the ependymocytes lining the third ventricle (arrows) from E16.5 until birth. (M) RFX3 is expressed strongly in the aqueduct of Sylvius from E16.5 (arrow). (N and O) RFX3 is expressed strongly in the fourth ventricle ependymocytes from E18.5 until birth (arrows). (P) RFX3 expression is first detected in the internal wall of the lateral ventricles at birth (arrow). CB, cerebellar plate; cx, cortex; IIIv, third ventricle; IVv, fourth ventricle; Lv, lateral ventricle; PC, posterior commissure; S.aq., sylvius aqueduct. Scale bar: 50 μ m (A, C, F, H, K, M), 100 μ m (D, G, O, P) or 200 μ m (B, E, I, J, L, N).

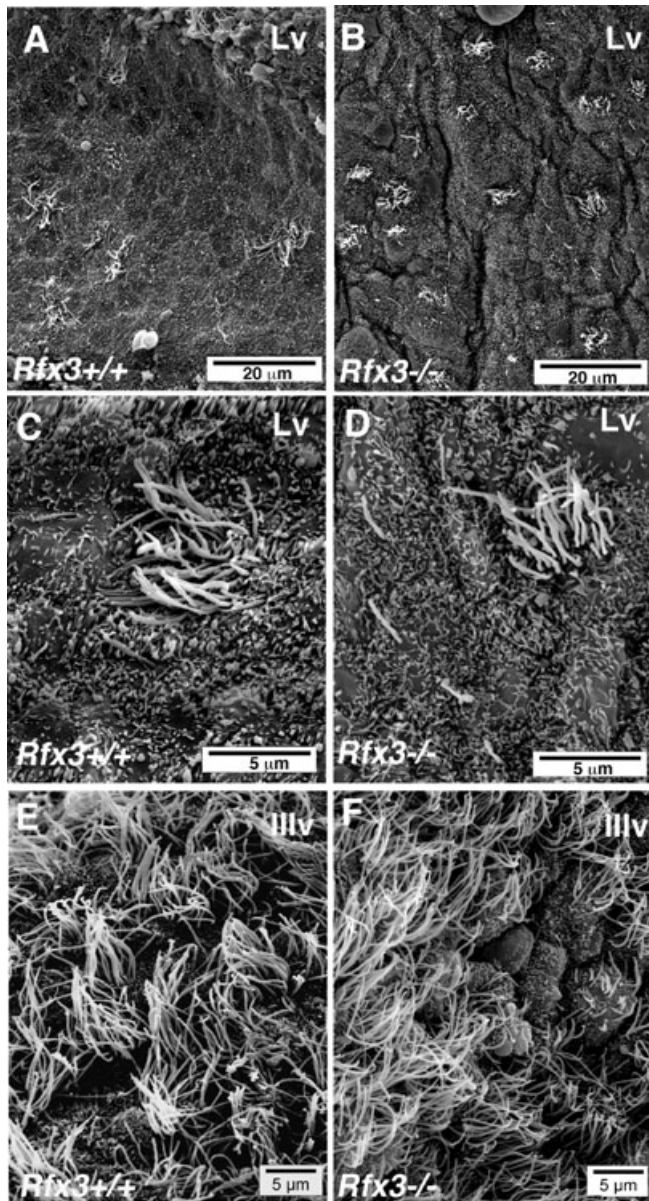


FIG. 3. Cilia are present in normal numbers on classical ependymal cells of 2-week-old *Rfx3*-deficient mice. The presence of cilia on ependymal cells in the lateral (A–D) and third (E and F) ventricles was examined by scanning electron microscopy of brains from 9-day-old wild-type (A, C, E) and *Rfx3*-deficient (B, D, F) mice. At this stage, the density of ciliated cells and the length of cilia are greater in the third ventricle than in the lateral ventricles. No significant differences in the number of cilia were observed between the wild-type and mutant mice. Observations were made on three pairs of wild-type and mutant mice. IIIv, third ventricle; Lv, lateral ventricle.

surviving past birth. Thus, we cannot exclude that there may be variations in their beating frequency or efficiency.

Cellular alterations in the CP of *Rfx3*-deficient mice

In contrast to the absence of a clear phenotype in ventricular ependymal cells, the *Rfx3*-deficient mice exhibit strong defects of the specialized ependyma of the CP (Fig. 4). The CP of all ventricles are markedly smaller (shown for third and lateral ventricles in Fig. 4B and D compared with Fig. 4A and C). The *Rfx3*-deficient CP show reduced convolutions and contain a variable density of bubble-like dilations

between the two epithelial cell layers (Fig. 4D, F–H). In certain mice these dilations are large and frequent (Fig. 4G and H).

Examinations by transmission electron microscopy revealed several major alterations in the CP cells of *Rfx3*-deficient mice. First, compared with control CP epithelial cells, which typically carry well-developed multicilia (Fig. 5C), almost no cilia are evident in the CP of *Rfx3*-deficient mice (Fig. 5D). Seventy per cent of the epithelial cells examined were multiciliated in control plexuses, as shown in Fig. 5C, whereas only 3% of the cells showed cilia in *Rfx3*-deficient plexuses. Not all epithelial cells appear ciliated in the controls because the sections do not include their apical pole. Second, the microvilli present at the surface of normal CP cells are considerably less developed in the *Rfx3*-deficient mice (compare Fig. 5C and D). Third, no secretory vacuoles were observed in the ventricular cavity (compare Fig. 5A and B). Fourth, cell adhesion appears to be altered in the CP of *Rfx3*-deficient mice. When examined at low magnification, the cells appear less tightly joined to each other and the intercellular space is increased (compare Fig. 5A and B). At higher magnifications, wild-type CP cells can be seen to have highly developed membrane interdigitations between the cells (Fig. 5, C1). These interdigitations are poorly developed and loosened in the *Rfx3*-deficient CP (Fig. 5, D1). Tight junctions are, however, present and appear to be normal (Fig. 5, D1). Fifth, there is a marked disorganization of the basal pole of the CP cells (compare Fig. 5E and F). The basal plasma membrane is not apposed to the basal lamina. The latter appears to be more circonvoluted in the *Rfx3*-deficient mice (compare Fig. 5E and F). Numerous vacuoles are observed at the basal pole of the *Rfx3*-deficient CP cells (Fig. 5F). Finally, the basal lamina lining the capillaries is severely affected and the extracellular matrix in the intercellular space between the epithelial cells and the capillaries is disorganized and replaced by less electron-dense material (Fig. 5G and H). Taken together, the absence of multicilia, the reduction of cellular interdigitations and the altered structure of the basal pole suggest that there is a global cell polarity defect in the CP cells of *Rfx3*-deficient mice.

Severe agenesis of the SCO in *Rfx3*-deficient mice

A severe agenesis of the SCO is observed in *Rfx3*-deficient mice. This agenesis affects nearly all *Rfx3*-deficient mice, but can be more or less pronounced (data not shown). In the most extreme cases there is a complete absence of the SCO (Fig. 6B). In control mice, the secretory ependymal cells of the SCO appear as elongated cells that protrude into the ventricular cavity (Fig. 6C). In the *Rfx3*-deficient mice, most of these SCO cells are replaced by cuboid cells having a multiciliated border (Fig. 6D).

When examined by transmission electron microscopy, wild-type SCO cells can be seen to exhibit several characteristic ultrastructural features (Fig. 7A). They carry only a few cilia, generally two, at their apical poles (Fig. 7A, inset). Their cytoplasm is typically loaded with large cisternae of reticulum containing the SCO secretion (black arrows). Finally, wild-type SCO cells are tightly linked together by zonula adherens junctions (white arrowhead). All three of these features are affected in the SCO cells of *Rfx3*-deficient mice (Fig. 7B). Only a minority of the *Rfx3*-deficient SCO cells retain the typical secretory aspect characterized by the presence of cytoplasmic cisternae and zonula adherens junctions (Fig. 7B, black arrow and white arrowhead, respectively). When they are present, the cisternae are moreover only poorly developed (black arrows). Most *Rfx3*-deficient SCO cells are highly ciliated and retain only tight junctions with no zonula adherens (Fig. 7B, inset). These ultrastructural features of *Rfx3*-deficient SCO cells are more reminiscent of those exhibited by

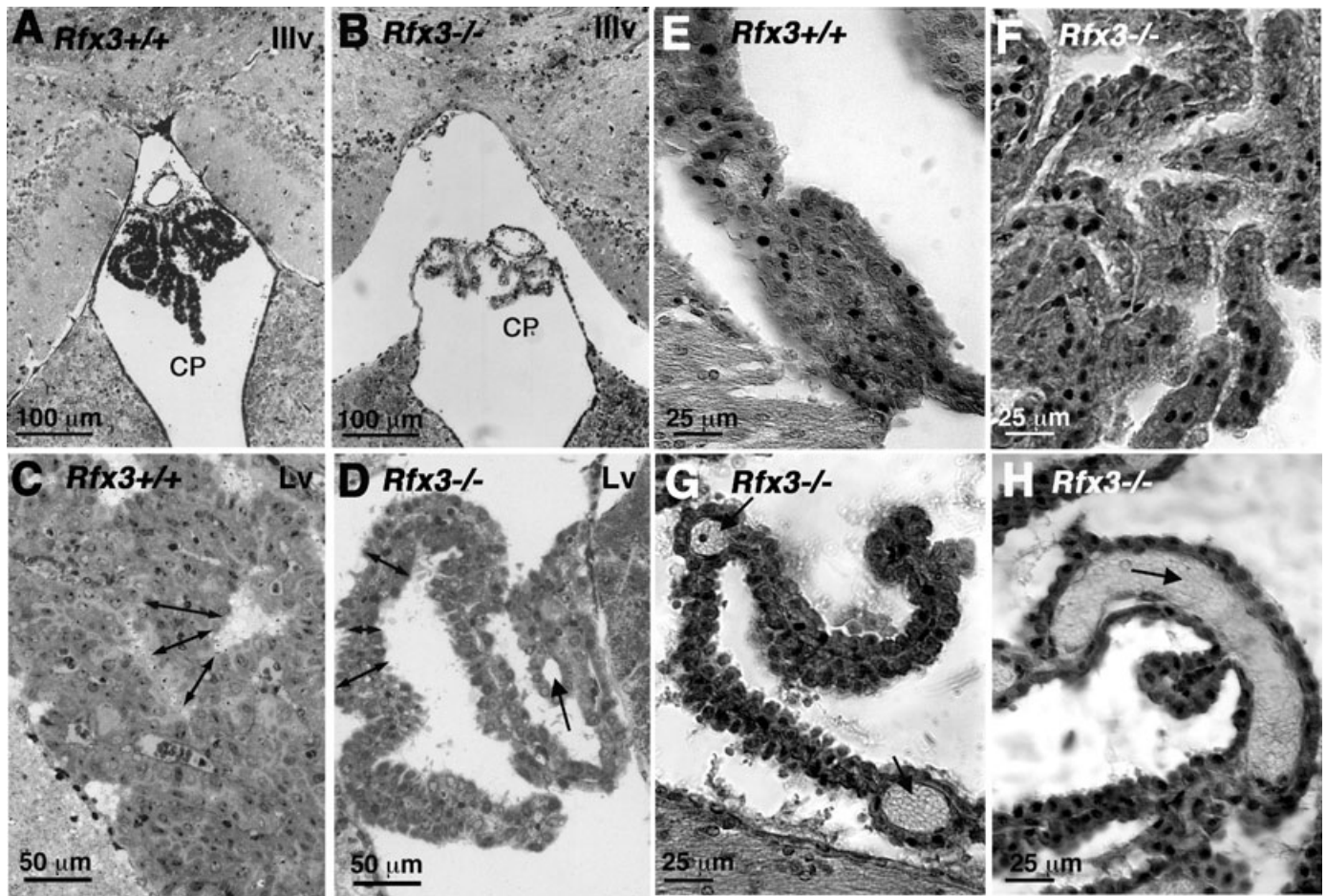


FIG. 4. Abnormal development of the choroid plexuses (CPs) in *Rfx3*-deficient mice. (A–D) Semi-thin toluidine-blue-stained brain sections showing the third (A and B) and lateral (C and D) ventricles from 20-week-old wild-type (A and C) and *Rfx3*-deficient (B and D) mice. The CPs in the third and lateral ventricles are less well developed and occupy less space in the mutant mice. In the mutants, the thickness of the two layers of epithelial cells (double-headed arrows in C and D) is reduced, contact between the two cell layers appears to be loosened, and dilations (arrow in D) are observed between the two sheets of cells. Note also the difference in staining of the choroid cells between normal and *Rfx3*-deficient mice (compare A and B). (E–H) Haematoxylin-eosin-stained sections (15 μ m) showing the CPs in the lateral ventricles of a wild-type (E) and three different *Rfx3*-deficient (F–H) mice. Note the variable presence of dilations (arrows) ranging from the least (F) to most severe (H) phenotype. IIIv, third ventricle; Lv, lateral ventricle.

classical ventricular ependymal cells. Thus, the specialized ependymal cells of the SCO are either absent or inappropriately differentiated in *Rfx3*-deficient mice.

Deregulation of SCO-spondin expression

Markers specific for different types of ependymal cell types are rare. The SCO-spondin protein is an early and specific marker for the secretory ependymal cells of the SCO. This protein is a constituent of the Reissner fibre, a thread-like structure present in the central canal of most chordates. It belongs to the thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily of proteins having major axonal pathfinding functions in the CNS (Meinzel, 2001; Lehmann & Naumann, 2005).

In the brains of wild-type mice, SCO-spondin expression is restricted to the SCO (Goncalves-Mendes *et al.*, 2003): the SCO stains strongly with anti-SCO-spondin antibodies, whereas no staining is detected in the ependymal cells of the lateral wall of the third ventricle or in the CP of the lateral and third ventricles (Fig. 8A and data not shown). SCO-spondin expression is severely reduced in the SCO of *Rfx3*-deficient mice (Fig. 8B). In addition, a low level of

ectopic expression is detected throughout the entire ependyma (shown for the third ventricle in Fig. 8B and D). SCO-spondin expression is thus both reduced in the SCO and expressed ectopically in other ependymal cell types. This indicates that the absence of RFX3 leads to defects in the differentiation of all ependymal cell types, including the classical ependymal cells lining the ventricles. SCO-spondin expression was previously described to be first detectable in the mouse brain at about E14.5 (Goncalves-Mendes *et al.*, 2003). We thus investigated whether SCO-spondin expression was altered in the mutant as early as its initial onset of expression. We detect weak SCO-spondin expression at E14.5 around the fibres of the posterior commissure in controls but not in *Rfx3*-deficient embryos (Fig. 8E and F). SCO-spondin expression increases progressively at later stages in the controls but not in *Rfx3*-deficient embryos (Fig. 8G–J). Thus, SCO-spondin expression is already affected in the mutant early during development.

Discussion

We show here that a deficiency in *Rfx3* causes congenital hydrocephalus in mice. Obstruction of the aqueduct of Sylvius does not appear to

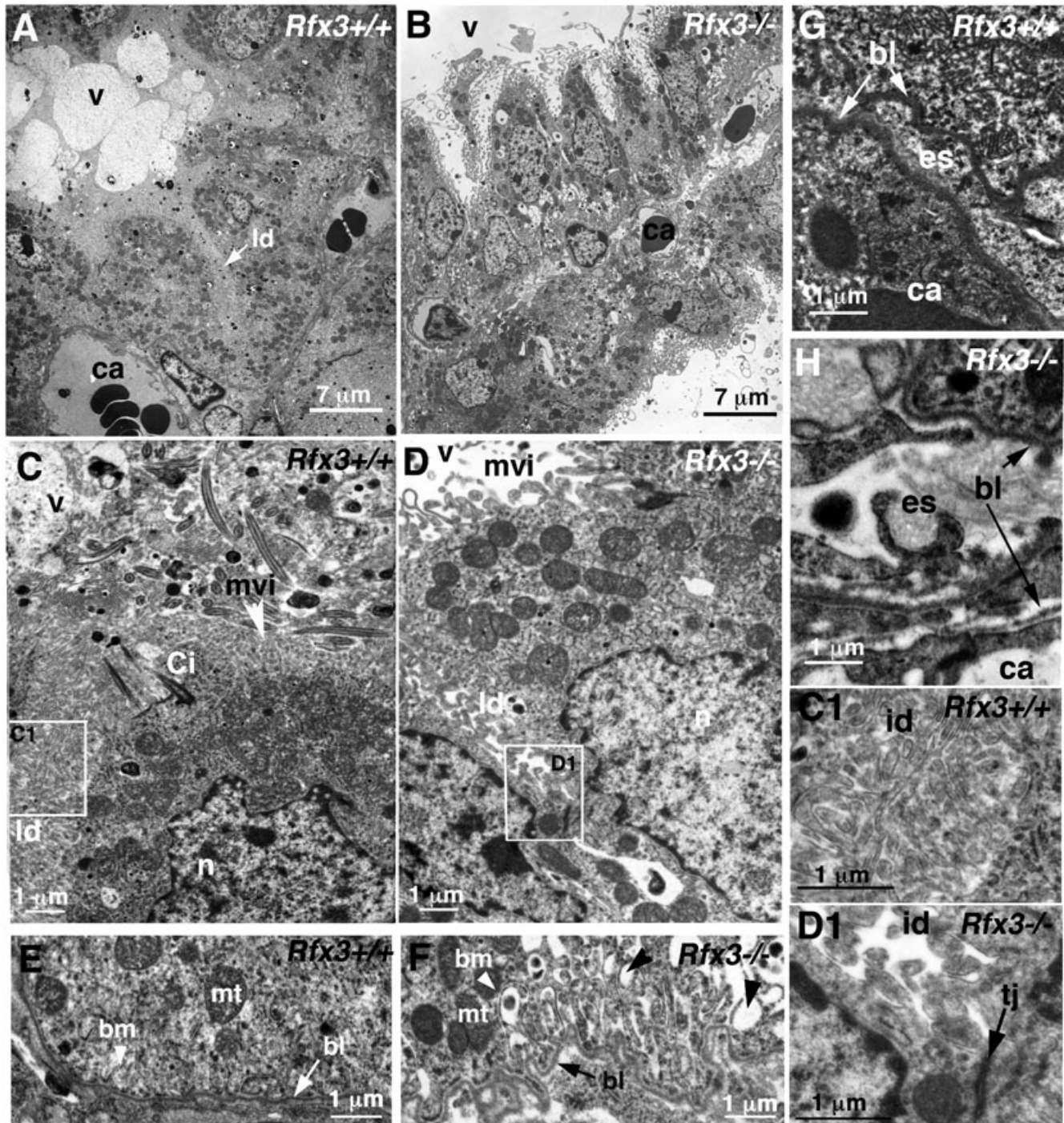


FIG. 5. Ultrastructural alterations in the CPs of adult *Rfx3*-deficient mice. CPs of wild-type (A, C, E, G, C1) and *Rfx3*-deficient (B, D, F, H, D1) mice (20 weeks old) were examined by transmission electron microscopy. CP cells are considerably smaller in the *Rfx3*-deficient mice (compare A and B). The ventricular cavity is filled with secretory vacuoles in wild-type mice (A), whereas it is free of secretions in *Rfx3*-deficient mice (B). Wild-type CP cells are characterized by cilia and well-developed microvillousities at their apical poles (C). They also exhibit extensive interdigitations between contiguous cells (C1). In contrast, CP cells in *Rfx3*-deficient mice do not have cilia and the density of microvillousities at their apical poles is reduced (D). The interdigitations between cells are also less developed and loosened (D1). Tight junctions are, however, still present (D1). In wild-type cells (E), the basal plasma membrane is finely digitated and tightly associated with the basal lamina, whereas in *Rfx3*-deficient cells (F) the basal plasma membrane is associated only loosely with the basal lamina and the digits are dilated (black arrowheads in F). (G and H) Higher magnifications of the epithelial and capillary basal membranes and extracellular space. Note the differences in the basal membrane [which is severely altered in the *Rfx3*-deficient (H) compared with the wild-type (G) plexus] and in the extracellular space surrounding the capillaries [which is rich in electron-dense material in the wild-type (G) compared with the *Rfx3*-deficient (H) plexus]. bl, basal lamina; bm, basal plasma membrane; ca, capillaries; ci, cilia; id, interdigitations; es, extracellular space; mt, mitochondria; mvi, microvillousities; n, nucleus; tj, tight junction; v, ventricles.

be the cause of hydrocephalus. Instead, our results suggest that the hydrocephalus results from ependymal cell defects that perturb CSF production or microcirculation. This conclusion is based on the

finding that *Rfx3* is required for the differentiation of three types of ependymal cells known to contribute to CSF homeostasis, namely those of the CP, SCO and ventricular walls.

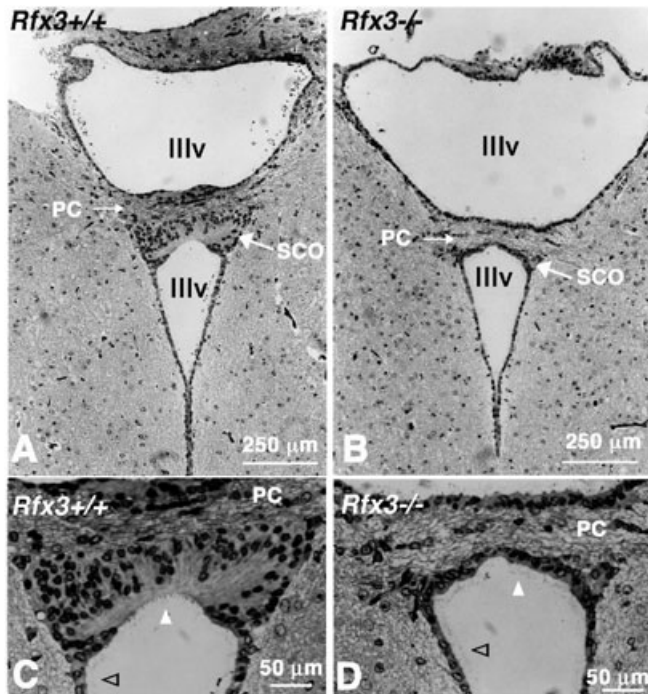


FIG. 6. Agenesis of the subcommissural organ (SCO) in adult *Rfx3*-deficient mice. (A–D) Semi-thin toluidine-blue-stained sections of brains from wild-type (A and C) and *Rfx3*-deficient (B and D) mice (20 weeks old). In wild-type mice, the SCO cells lining the posterior commissure are elongated and their apical poles protrude [white arrowhead in C] into the third ventricular cavity (IIIv). In *Rfx3*-deficient mice, the remaining SCO cells are flattened and their apical borders no longer protrude into the ventricle. They instead have a ciliated aspect similar to that of the ependymal cells lining the lateral walls: the black arrowheads mark the apical borders of the cilia of the ependymal cells bordering the lateral walls of the third ventricle in wild-type and mutant mice (C and D). The white arrowheads mark the protrusions of the SCO cells in wild-type mice (C) and the abnormal ciliated border of the SCO cells in mutant mice (D). IIIv, third ventricle; PC, posterior commissure.

Ciliary dysfunction and hydrocephalus in *Rfx3*-deficient mice

We have not observed major alterations in the number and ultrastructure of the cilia carried by classical ependymal cells in the brains of adult *Rfx3*-deficient mice. We can, however, not exclude that there might be defects in their beating efficiency, particularly if these alterations are only revealed under specific physiological conditions. It is also possible that we did not identify ciliary defects because our observations were restricted to the least severely affected individuals (the 3% that survive past birth). Finally, it is possible that ciliary defects were missed because they are only evident at precise stages of development. For example, the development of cilia on ventricular ependymal cells is highly dynamic around birth (Spassky *et al.*, 2005). During embryogenesis, ventricular ependymal cells are monociliated. Multicilia first appear just before birth in the aqueduct of Sylvius, third and fourth ventricles, and only after birth in the lateral wall of the ventricles (Spassky *et al.*, 2005). In *Rfx3*-deficient mice there could be alterations in the timing of these ciliary growth processes, in a manner similar to what we have documented for the growth of cilia in the embryonic node (Bonnafe *et al.*, 2004).

An alternative explanation for the weak ciliary phenotype could be that there is a redundancy between the four mammalian RFX factors (RFX1–4). All four share high sequence and domain structure similarities with DAF-19 and dRFX, the RFX factors that are implicated in ciliogenesis in *C. elegans* and *D. melanogaster* (Durand *et al.*, 2000; Swoboda *et al.*, 2000). No information is as

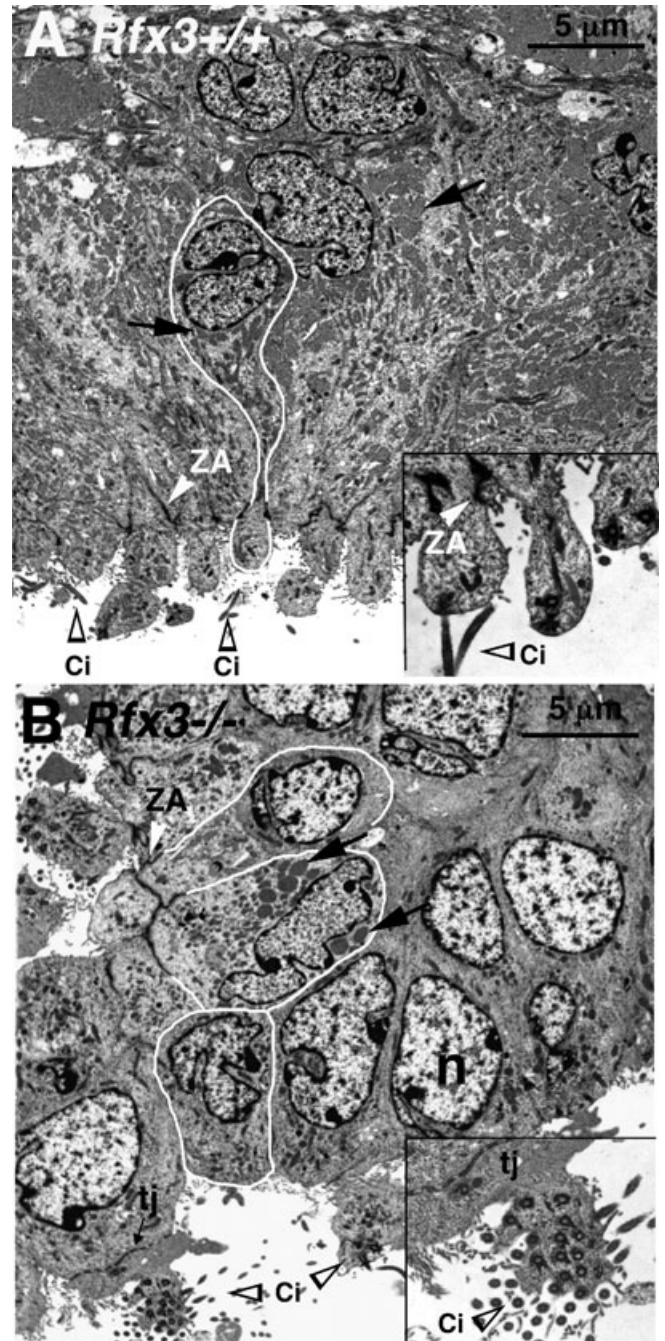


FIG. 7. Ultrastructural alterations of the SCO in adult 20-week-old *Rfx3*-deficient mice. Wild-type SCO cells (A) are typically highly elongated and their clear cytoplasm is loaded with large reticular cisternae filled with SCO-specific secretions (black arrows). Their protruding apical poles (see twofold enlargement shown in inset) typically show only one or two cilia (open arrowheads) and a well-developed zonula adherens (white arrowhead). In *Rfx3*-deficient mice (B), only a few cells retain the characteristic SCO-cell appearance: they are not elongated and only a few contain reticular vesicles filled with electron-dense material (black arrows). Most mutant SCO cells exhibit a large number of cilia at their apical pole with no zonula adherens junctions, characteristic of wild-type SCO cells (see twofold enlargement shown in inset). Ci, cilia; n, nucleus; tj, tight junctions; ZA, zonula adherens.

yet available regarding a possible role of RFX1, RFX2 or RFX4 in ciliogenesis.

The SCO and CP are also composed of ciliated cells (Doolin & Birge, 1966; Rodriguez *et al.*, 1998). The SCO cilia are believed to

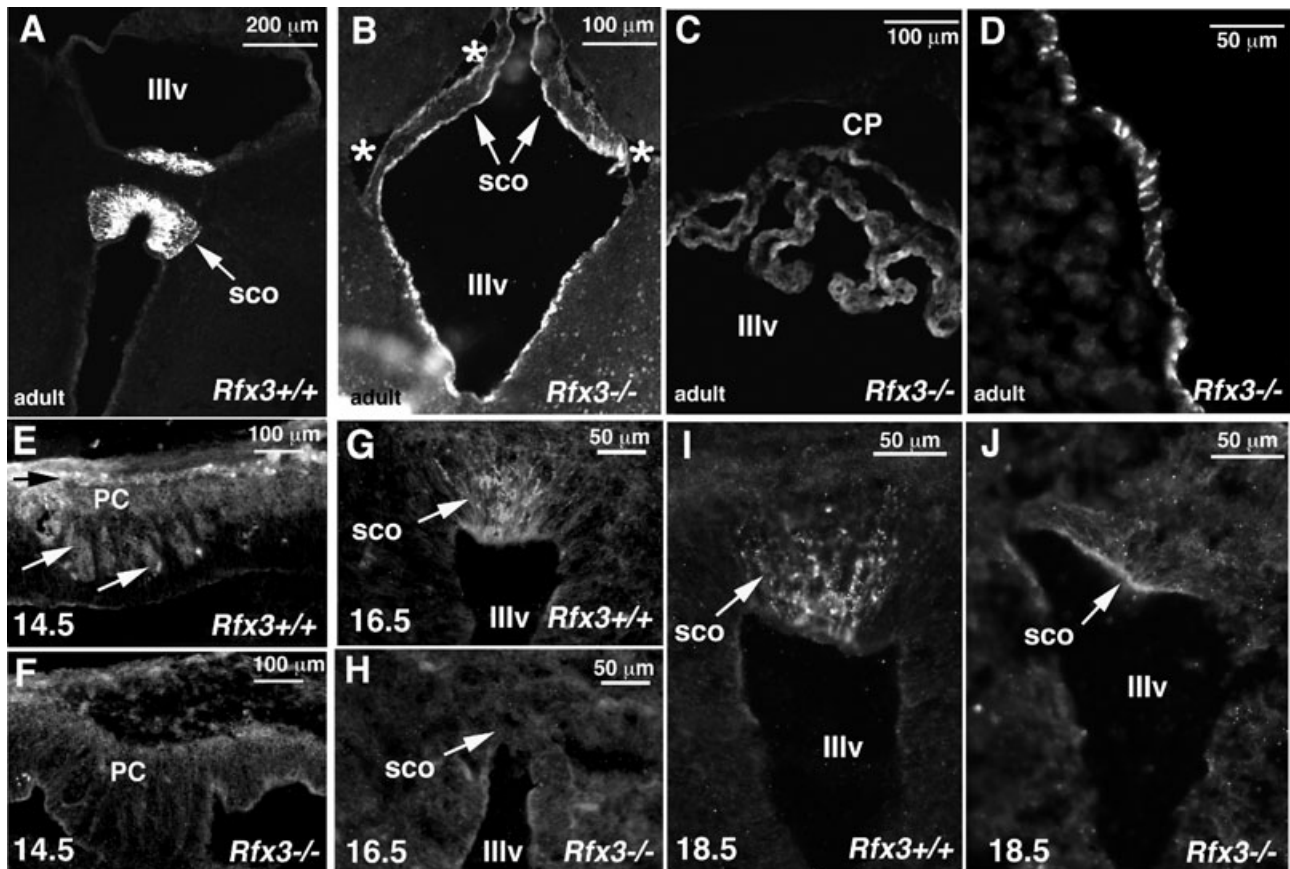


FIG. 8. Subcommissural organ (SCO)-spondin expression is deregulated in *Rfx3*-deficient mice. (A–D) Adult brain sections (6 weeks old, A and B; 20 weeks old, C and D) were stained with an antibody specific for SCO-spondin. In wild-type mice, strong SCO-spondin expression is restricted to the SCO (A). This strong SCO-specific expression is lost in *Rfx3*-deficient littermate mice (B). It is replaced by a lower level of uniformly distributed ectopic SCO-spondin expression in ependymocytes lining the ventricles and in the choroid plexuses (CPs). (B–D) Results are shown for two representative 40 (B and C) and 90 (D) days postnatal *Rfx3*-deficient mice. Note the detachment of the ependyma in the mutant mice (stars in B). (E–J) SCO-spondin expression during development of the SCO in wild-type and *Rfx3*-deficient embryos. (E and F) SCO-spondin expression is detected around the fibres of the posterior commissure (white arrow) at E14.5 on sagittal sections of wild-type (E) but not *Rfx3*-deficient (F) embryos. The black arrow points to high non-specific staining of erythrocytes. (G–J) At E16.5 and E18.5, SCO-spondin expression is observed in the SCO on transverse sections of wild-type (G, I) but not *Rfx3*-deficient (H, J) embryos. A very faint staining can be observed lining the ventricles at E18.5 in *Rfx3*-deficient embryos. IIIv, third ventricle; PC, posterior commissure.

contribute to directional formation of the Reissner fibre backwards towards the aqueduct of Sylvius, fourth ventricle and ependymal canal (Rodriguez *et al.*, 1998). A recent publication supports the hypothesis that cilia on CP cells are necessary for regulating ion transport and CSF production, although the mechanisms involved remain to be elucidated (Banizs *et al.*, 2005). As in the case of ventricular ependymal cells, we have not observed obvious ultrastructural defects of cilia in the SCO and CP of *Rfx3*-deficient mice. However, in contrast to what was observed for ventricular ependymocytes, the number of cilia per cell is strongly increased in the SCO and reduced in the CP of *Rfx3*-deficient mice. At the present time we can not evaluate whether these variations are directly responsible for the hydrocephalus or if they reflect a more general change in the differentiation program of the SCO and CP cells.

CP dysfunction and hydrocephalus in *Rfx3*-deficient mice

CP cells are the major source of CSF production and thus show features characteristic of active secretion, such as a well-developed brush border and numerous basolateral invaginations, which increase their surface area and secretory potential (Brown *et al.*, 2004; Redzic & Segal, 2004). Ependymal cells of the CP secrete CSF by a process

involving the active transport of ions from the blood to the ventricles, which creates an osmotic gradient that drives the secretion of H₂O (Brown *et al.*, 2004). The unidirectional ion transport is achieved thanks to both the polarity of the epithelium and the barrier formed by junctional complexes between the epithelial cells.

Tight junctions are present and apparently normal in the CP of *Rfx3*-deficient mice, on the basis of ultrastructural observations. The presence of vacuoles in the basolateral interstitial space also argues in favour of functional tight junctions that limit the passive diffusion of solutes and thus osmotic buffering.

The reduced size of the CP and the poorly developed microvilli at the apical pole of CP cells might argue for a reduction in the CSF production capacity of *Rfx3*-deficient mice. However, the defects in the basolateral interdigitations between cells, the presence of vacuoles in the basolateral space, changes in the basal pole of the cells and the absence of multicilia suggest that there is a general alteration in the polarity of the CP epithelial cells. This could affect osmotic regulation between the blood and CSF compartments, and result in a net overproduction of CSF. Therefore, alterations in the polarity and physiological properties of CP epithelial cells could well be responsible for hydrocephalus in *Rfx3*-deficient mice. In addition, ultrastructural defects of the basal membrane and the extracellular space

surrounding the CP capillaries may contribute to increase CP dysfunction.

We have not detected alterations in the localization of the Na⁺, K⁺-ATPase, which provides the major pumping force in the CP (data not shown). Further investigations on the various membrane transporters found in CP cells will be necessary to understand the altered CP function in *Rfx3*-deficient mice.

SCO defects and hydrocephaly in *Rfx3*-deficient mice

There is a close correlation between hydrocephalus, abnormal differentiation of the SCO and deposition of the Reissner fibre complex (Galarza, 2002). It has been suggested that the secretory activity of the SCO is responsible for maintaining the aqueduct of Sylvius open. Immunological blockade of the SCO during development, by immunizing pregnant rats with Reissner fibre glycoproteins, leads to SCO dysfunction, stenosis of the aqueduct and hydrocephalus (Vio *et al.*, 2000). In *Rfx3*-deficient mice, the expression of SCO-spondin is downregulated in the SCO, as early as 14.5 days of embryonic development. However, we have not observed stenosis of the aqueduct and obstruction of the aqueduct does thus not appear to be the cause of hydrocephalus. This suggests that a downregulation in SCO-spondin expression is by itself not sufficient to induce stenosis of the aqueduct. Thus, aqueduct stenosis might, in many cases, be a secondary consequence of hydrocephalus and the resulting increase in CSF pressure.

A severe brain phenotype has recently been documented in transgenic mice in which the expression of a variant *Rfx4* transcript (*Rfx4-v3*) is perturbed. Homozygosity of this mutation leads to embryonic death and developmental defects of brain midline structures. Heterozygous *Rfx4-v3*^{+/-} mice show hydrocephalus of the lateral and third ventricles associated with an absence of the SCO (Blackshear *et al.*, 2003). Several aspects of the brain phenotype of *Rfx4-v3*^{+/-} mice (particularly agenesis of the SCO) are quite similar to those found in *Rfx3*-deficient mice. This suggests that RFX3 and RFX4 could be involved in the same processes during SCO development. Because RFX factors are known to form a family of homodimeric and heterodimeric transcription factors, it is tempting to speculate that RFX3 and RFX4 could function as a heterodimer in the SCO, such that mutations affecting these two factors give rise to similar phenotypes. The precise relationship between RFX3 and RFX4 in development of the SCO therefore needs to be established.

Perspectives

The relative contributions of defects in the three different types of ependymal cells to the development of hydrocephalus in *Rfx3*-deficient mice can not be established on the basis of our current data. However, a conditional knockout approach was used to generate the *Rfx3*-deficient mice. This paves the way for experiments in which the deletion of *Rfx3* can be induced specifically in different subterritories of the brain. Such experiments should be valuable for understanding the precise contribution of the SCO, CP and ventricular ependymal cells in CSF homeostasis and in the development of hydrocephalus.

Hydrocephalus affects 1–3 out of 1000 children at birth. So far, only a single gene, L1-CAM gene, has been linked to hydrocephalus in humans (Weller & Gartner, 2001). However, there is abundant evidence that other autosomal recessive forms of hydrocephalus exist (Bruni *et al.*, 1988). Our findings imply that RFX3, other RFX genes, and the target genes that they control could be candidate genes affected in congenital hydrocephalus in humans.

Acknowledgements

We wish to thank Christelle Drégnaux, Claire Szczepaniak and Jean-Luc Duteyrat for technical assistance in transmission electron microscopy. Work in the laboratory of B. Durand was supported by the CNRS, the ACI Bio du Développement et Physiologie Intégrative, the ACI Jeune Chercheur and the Région Rhône-Alpes. Work in the laboratory of W. Reith was supported by the Swiss National Science Foundation and the NCCR on Neural Plasticity and Repair. Work in the laboratory of A. Meinier was supported by INSERM, FNADT and the Association 'Demain Debout'. D. Baas was supported by a fellowship from the Région Rhône-Alpes. E. Bonnafé and C. Benadiba were supported by doctoral fellowships from the French Research Ministry. O. Meinier was supported by a postdoctoral fellowship from the DRRT (Région Auvergne Limousin).

Abbreviations

CP, choroid plexus; CSF, cerebrospinal fluid; RFX, regulatory factor X; SCO, subcommissural organ.

References

- Afzelius, B.A. (2004) Cilia-related diseases. *J. Pathol.*, **204**, 470–477.
- Baas, D., Bumsted, K.M., Martinez, J.A., Vaccarino, F.M., Wikler, K.C. & Barnstable, C.J. (2000) The subcellular localization of Otx2 is cell-type specific and developmentally regulated in the mouse retina. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **78**, 26–37.
- Banizs, B., Pike, M.M., Millican, C.L., Ferguson, W.B., Komlosi, P., Sheetz, J., Bell, P.D., Schwiebert, E.M. & Yoder, B.K. (2005) Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development*, **132**, 5329–5339.
- Blackshear, P.J., Graves, J.P., Stumpo, D.J., Cobos, I., Rubenstein, J.L. & Zeldin, D.C. (2003) Graded phenotypic response to partial and complete deficiency of a brain-specific transcript variant of the winged helix transcription factor RFX4. *Development*, **130**, 4539–4552.
- Bonnafé, E., Touka, M., AitLounis, A., Baas, D., Barras, E., UCLA, C., Moreau, A., Flamant, F., Dubruielle, R., Couble, P., Collignon, J., Durand, B. & Reith, W. (2004) The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 4417–4427.
- Brown, P.D., Davies, S.L., Speake, T. & Millar, I.D. (2004) Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience*, **129**, 957–970.
- Bruni, J.E., Del Bigio, M.R., Cardoso, E.R. & Persaud, T.V. (1988) Hereditary hydrocephalus in laboratory animals and humans. *Exp. Pathol.*, **35**, 239–246.
- Bruni, J.E., Del Bigio, M.R. & Clattenburg, R.E. (1985) Ependyma: normal and pathological. A review of the literature. *Brain Res.*, **356**, 1–19.
- Chen, J., Knowles, H.J., Hebert, J.L. & Hackett, B.P. (1998) Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J. Clin. Invest.*, **102**, 1077–1082.
- Davson, H. & Segal, M.B. (1996) *Physiology of the CSF and Blood-Brain Barriers*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- De Santi, M.M., Magni, A., Valletta, E.A., Gardi, C. & Lungarella, G. (1990) Hydrocephalus, bronchiectasis, and ciliary aplasia. *Arch. Dis. Child.*, **65**, 543–544.
- Del Bigio, M.R. (1995) The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*, **14**, 1–13.
- Doolin, P.F. & Birge, W.J. (1966) Ultrastructural organization of cilia and basal bodies of the epithelium of the choroid plexus in the chick embryo. *J. Cell Biol.*, **29**, 333–345.
- Dubruielle, R., Laurencon, A., Vandaele, C., Shishido, E., Coulon-Bublex, M., Swoboda, P., Couble, P., Kerman, M. & Durand, B. (2002) Drosophila regulatory factor X is necessary for ciliated sensory neuron differentiation. *Development*, **129**, 5487–5498.
- Durand, B., Vandaele, C., Spencer, D., Pantalacci, S. & Couble, P. (2000) Cloning and characterization of *dRFX*, the *Drosophila* member of the RFX family of transcription factors. *Gene*, **246**, 285–293.
- Emery, P., Durand, B., Mach, B. & Reith, W. (1996) RFX proteins, a novel family of DNA binding proteins conserved in the eukaryotic kingdom. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 803–807.
- Gajiwala, K.S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B.P., Reith, W., Mach, B. & Burley, S.K. (2000) Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature*, **403**, 916–921.
- Galarza, M. (2002) Evidence of the subcommissural organ in humans and its association with hydrocephalus. *Neurosurg. Rev.*, **25**, 205–215.

- Gobron, S., Creveaux, I., Meiniel, R., Didier, R., Herbet, A., Bamdad, M., El Bitar, F., Dastugue, B. & Meiniel, A. (2000) Subcommissural organ/Reissner's fiber complex: characterization of SCO-spondin, a glycoprotein with potent activity on neurite outgrowth. *Glia*, **32**, 177–191.
- Goncalves-Mendes, N., Simon-Chazottes, D., Creveaux, I., Meiniel, A., Guenet, J.L. & Meiniel, R. (2003) Mouse SCO-spondin, a gene of the thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily expressed in the brain. *Gene*, **312**, 263–270.
- Greenstone, M.A., Jones, R.W., Dewar, A., Neville, B.G. & Cole, P.J. (1984) Hydrocephalus and primary ciliary dyskinesia. *Arch. Dis. Child.*, **59**, 481–482.
- Ibanez-Tallon, I., Gorokhova, S. & Heintz, N. (2002) Loss of function of axonemal dynein Mdnah5 causes primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 715–721.
- Ibanez-Tallon, I., Pagenstecher, A., Fliegauf, M., Olbrich, H., Kispert, A., Ketelsen, U.P., North, A., Heintz, N. & Omran, H. (2004) Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2133–2141.
- Jabourian, Z., Lublin, F.D., Adler, A., Gonzales, C., Northrup, B. & Zwillenberg, D. (1986) Hydrocephalus in Kartagener's syndrome. *Ear Nose Throat J.*, **65**, 468–472.
- Lehmann, C. & Naumann, W.W. (2005) Axon pathfinding and the floor plate factor Reissner's substance in wildtype, cyclops and one-eyed pinhead mutants of *Danio rerio*. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **154**, 1–14.
- McGrath, J. & Brueckner, M. (2003) Cilia are at the heart of vertebrate left-right asymmetry. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 385–392.
- Meiniel, A. (2001) SCO-spondin, a glycoprotein of the subcommissural organ/Reissner's fiber complex: evidence of a potent activity on neuronal development in primary cell cultures. *Microsc. Res. Tech.*, **52**, 484–495.
- Pan, J., Wang, Q. & Snell, W.J. (2005) Cilium-generated signaling and cilia-related disorders. *Laboratory Invest.*, **85**, 452–463.
- Redzic, Z.B. & Segal, M.B. (2004) The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 1695–1716.
- Reith, W., Kobr, M., Emery, P., Durand, B., Siegrist, C.A. & Mach, B. (1994) Cooperative binding between factors RFX and X2bp to the X and X2 boxes of MHC class II promoters. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20020–20025.
- Rodriguez, E.M., Rodriguez, S. & Hein, S. (1998) The subcommissural organ. *Microsc. Res. Tech.*, **41**, 98–123.
- Sapiro, R., Kostetskii, I., Olds-Clarke, P., Gerton, G.L., Radice, G.L. & Strauss, I.J. (2002) Male infertility, impaired sperm motility, and hydrocephalus in mice deficient in sperm-associated antigen 6. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 6298–6305.
- Shiratori, H. & Hamada, H. (2006) The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development*, **133**, 2095–2104.
- al-Shroof, M., Karnik, A.M., Karnik, A.A., Longshore, J., Sliman, N.A. & Khan, F.A. (2001) Ciliary dyskinesia associated with hydrocephalus and mental retardation in a Jordanian family. *Mayo Clin. Proc.*, **76**, 1219–1224.
- Spassky, N., Merkle, F.T., Flames, N., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J. Neurosci.*, **25**, 10–18.
- Swoboda, P., Adler, H.T. & Thomas, J.H. (2000) The RFX-type transcription factor DAF-19 regulates sensory neuron cilium formation in *C. elegans*. *Mol. Cell*, **5**, 411–421.
- Taulman, P.D., Haycraft, C.J., Balkovetz, D.F. & Yoder, B.K. (2001) Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 589–599.
- Vio, K., Rodriguez, S., Navarrete, E.H., Perez-Figares, J.M., Jimenez, A.J. & Rodriguez, E.M. (2000) Hydrocephalus induced by immunological blockage of the subcommissural organ-Reissner's fiber (RF) complex by maternal transfer of anti-RF antibodies. *Exp. Brain Res.*, **135**, 41–52.
- Weller, S. & Gartner, J. (2001) Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): mutations in the L1CAM gene. *Hum. Mutat.*, **18**, 1–12.

PAPIER 2

Préambule des papiers 2 et 3

Dans la suite de cette partie résultats, j'ai souhaité rédiger mes résultats sous forme d'articles afin de gagner du temps pour la rédaction des papiers.

Les résultats ainsi que le matériel et méthode n'étant pas amenés à changer après l'ajout de nouvelles données, je les ai rédigés en anglais. En revanche, comme certaines expériences sont à compléter, l'introduction et la discussion de chaque article risque d'être largement modifiées d'ici leur soumission, j'ai donc pris le parti de les rédiger en français.

**RFX3 is involved in forebrain dorsal
midline specification.**

Abstract

Regulatory Factor X (RFX) transcription factors have been shown to be key regulators of ciliogenesis from *C. elegans* to mammals. In mouse, RFX3 is essential for establishing left-right asymmetry, for pancreatic islet cell and subcommissural organ or choroid plexuses differentiation. We show here that *Rfx3* deficient mice suffer from early brain midline defects and that RFX3 is necessary for roof plate specification in the forebrain. Indeed, we show that the abnormal development of the Choroid Plexuses, Sub-Commissural Organ, Pineal Gland and Posterior Commissure is correlated with a mis-specification of the dorsal midline in the forebrain at early stages of embryonic development. Indeed, the expression of genes involved in brain midline specification, such *Gdf7*, *Lmx1a*, *Msx1* and *Wnt1* are affected in *Rfx3*^{-/-} brains. In addition, we observe an expansion of *Fgf8* expression from the rostral midline to the dorsal midline. Altogether, our results show that *Rfx3*^{-/-} brains are defective in dorsal midline formation and partially mimic a *Gli3* deficiency. Cilia have been shown to be critical for GLI3 processing in mammals, we are thus currently analyzing GLI3 processing and ciliogenesis defects in *Rfx3*^{-/-} midline.

Introduction

La mise en place des différentes structures cérébrales chez les vertébrés requiert la coordination de plusieurs centres organisateurs au cours du développement embryonnaire. En particulier, l'établissement de la polarité dorso-ventrale du cerveau nécessite la coordination de plusieurs centres sécréteurs de molécules de signalisation qui coopèrent entre eux et sont situés le long de la ligne médiane du tube neural.

La roof plate est un centre de signalisation précoce et transitoire important, situé en position médiane du tube neural dorsal. Elle assure un rôle primordial dans la mise en place des structures dorsomédianes du cerveau antérieur, comme les plexus choroïdes ou l'organe sous-commissural et dans l'établissement de la polarité dorso-ventrale du cerveau. De plus, des défauts de formation de la roof plate telencéphalique ont été impliqués dans la genèse de l'holoprosencéphalie, malformation congénitale assez fréquente chez l'homme.

Elle se caractérise par une absence ou une mauvaise séparation des deux hémisphères cérébraux au cours du développement embryonnaire précoce. Cette séparation se produit grâce à un arrêt de la prolifération cellulaire et à l'induction de l'apoptose des cellules de la roof plate, accompagnée par l'expansion des domaines neuraux adjacents sous contrôle en partie des facteurs sécrétés par la roof plate.

L'analyse de mutants murins, présentant un défaut de spécification de la ligne médiane dorsale, a permis d'identifier un certain nombre d'acteurs importants pour la mise en place de la roof plate et des structures issues de la roof plate. En particulier, le rôle des molécules de la famille des BMP dans l'induction de la roof plate a été démontré par plusieurs approches. Dans des explants de télencéphale latéral murin, l'ajout de billes recouvertes de BMP4 suffit à induire des caractéristiques de ligne médiane dorsale comme la diminution de la prolifération cellulaire, l'augmentation de l'apoptose, l'induction de l'expression de marqueurs spécifiques de ligne médiane dorsale (Furuta et al., 1997). De plus, l'inactivation simultanée des deux récepteurs des BMP dans le télencéphale dorsal conduit à une absence de formation de ligne médiane dorsale (Fernandes et al., 2007).

En accord avec ces données, les effecteurs de la voie de signalisation BMP, comme les facteurs de transcription MSX et LMX, sont également requis pour la formation de la roof plate. Les souris mutantes pour *Msx1*^{-/-} ou doubles mutantes *Msx1*^{-/-} ; *Msx2*^{-/-} présentent un défaut de spécification de la ligne médiane dorsale dans le diencéphale à l'origine de la formation anormale des structures dorsomédianes diencéphaliques comme l'organe sous commissural (Bach et al., 2003). Chez ces mutants, l'expression de *Wnt1*, morphogène impliqué dans la dorsoventralisation du tube neural, est diminuée dans la ligne médiane dorsale du diencéphale, suggérant que son expression est dépendante de MSX1 (Bach et al., 2003). Sachant que chez les mutants *Wnt1*^{sw/sw}, une mauvaise différenciation de la ligne médiane dorsale est à l'origine des défauts de formation de la glande pinéale et de l'organe sous commissural (Shimamura et al., 1994; Louvi and Wassef, 2000), ces résultats suggèrent que la voie de signalisation WNT est elle même impliquée dans la mise en place de la ligne médiane dorsale.

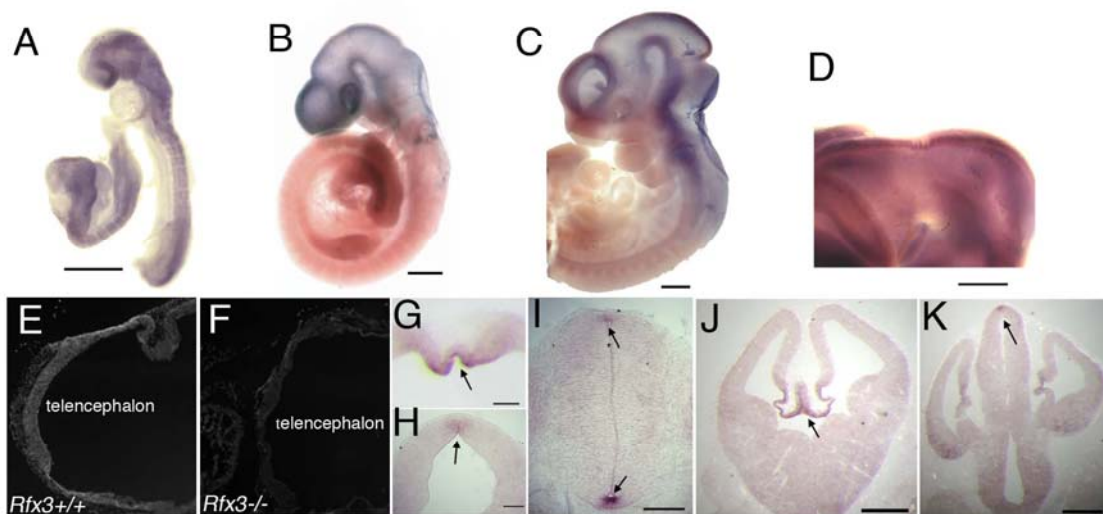
La mise en place de la roof plate nécessite également de contrecarrer les signaux ventralisants en provenance des deux autres centres organisateurs du cerveau antérieur que sont la plaque commissurale et la floor plate. Le premier sécrète FGF8 (Ye et al., 1998) et le second, la molécule SHH, toutes deux essentielles pour l'établissement des domaines ventraux du télencéphale (Echelard et al., 1993); (Kuschel et al., 2003) et pour la

formation de la roof plate (Storm et al., 2006); (Hayhurst et al., 2008). Or la perte de SHH dans la floor plate induit une inhibition de FGF8 dans la plaque commissurale et à l'inverse la surexpression de SHH induit une extension de l'expression de FGF8 jusque dans la roof plate. Ces résultats démontrent donc des interactions croisées entre ces centres de signalisation dans l'établissement de la ligne médiane dorsale. Le facteur de transcription GLI3 exprimé par le télencéphale dorsal est un facteur essentiel dans l'inhibition de ces signaux ventralisants et pour la formation de la roof plate. En effet, les mutants murins *Gli3*^{XT(J)/XT(J)} présentent une mauvaise spécification de la ligne médiane dorsale du cerveau antérieur responsable des défauts de formation des structures dorso-médianes du télencéphale et de la dorso-ventralisation du télencéphale (Grove et al., 1998; Theil et al., 2002; Kuschel et al., 2003). Ils présentent également une extension de l'expression de FGF8 dans la roof plate (Theil et al., 1999). A l'inverse, la perte de SHH dans la floor plate est associée à une augmentation de l'expression de *Gli3*. L'ensemble de ces résultats permettent de comprendre comment la floor plate est indirectement sous contrôle de la voie de signalisation SHH et pourquoi la perte de *Shh* conduit également à une forme sévère d'holoprosencéphalie.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle du facteur de transcription RFX3 dans la mise en place de la roof plate du cerveau antérieur. RFX3 appartient à la famille de facteurs de transcription de type RFX dont les membres partagent un domaine de liaison à l'ADN extrêmement conservé au cours de l'évolution (Emery et al., 1996). Chez la souris, comme chez le nématode et la drosophile, ces facteurs sont nécessaires à la régulation des gènes impliqués dans l'assemblage et la fonction ciliaire (Swoboda et al., 2000; Dubruille et al., 2002; Bonnafé et al., 2004; Baas et al., 2006; Ait-Lounis et al., 2007). Les cils, petits appendices cellulaires, sont nécessaires pour la transduction de plusieurs voies de signalisation en réponse à des morphogènes. En particulier les cils sont nécessaire pour la transduction du signal SHH mais également dans le maintien d'une activité GLI3 repressive en absence de SHH (Corbit et al., 2005; May et al., 2005) (Haycraft et al., 2005).

Ici, nous montrons que la perte de *Rfx3*, chez des mutants murins, conduit à une morphogenèse altérée du tube neural, accompagnée de défauts très précoces de l'induction des structures dorso-médianes du cerveau antérieur comme les plexus choroïdes, l'organe sous commissural, la glande pinéale et la commissure postérieure. De plus, nous montrons que la perte de *Rfx3* est à l'origine d'une mauvaise induction des marqueurs de la ligne

FIGURE 1



médiane. En particulier, la perte de *Rfx3* aboutit à un défaut d'expression des marqueurs *Gdf7*, *Wnt1*, *Msx1* et *Lmx1a* et à l'induction ectopique de l'expression de *FGF8* depuis la ligne médiane rostrale jusque dans la ligne médiane dorsale. L'ensemble de ces caractéristiques phénotypiques est retrouvé chez des mutants murins *Gli3*^{XT(J)/XT(J)} (Grove et al., 1998; Theil et al., 1999; Aoto et al., 2002; Theil et al., 2002; Kuschel et al., 2003). Récemment, il a été démontré que l'activation de GLI3 dépend de l'intégrité ciliaire (May et al., 2005). Bien que l'analyse des cils et de l'activation de la protéine GLI3 chez les mutants *Rfx3*^{-/-} soit toujours en cours, nos travaux proposent l'hypothèse que RFX3, intervient dans la cascade de signalisation nécessaire à la genèse de la ligne médiane dorsale, via la régulation de la ciliogenèse.

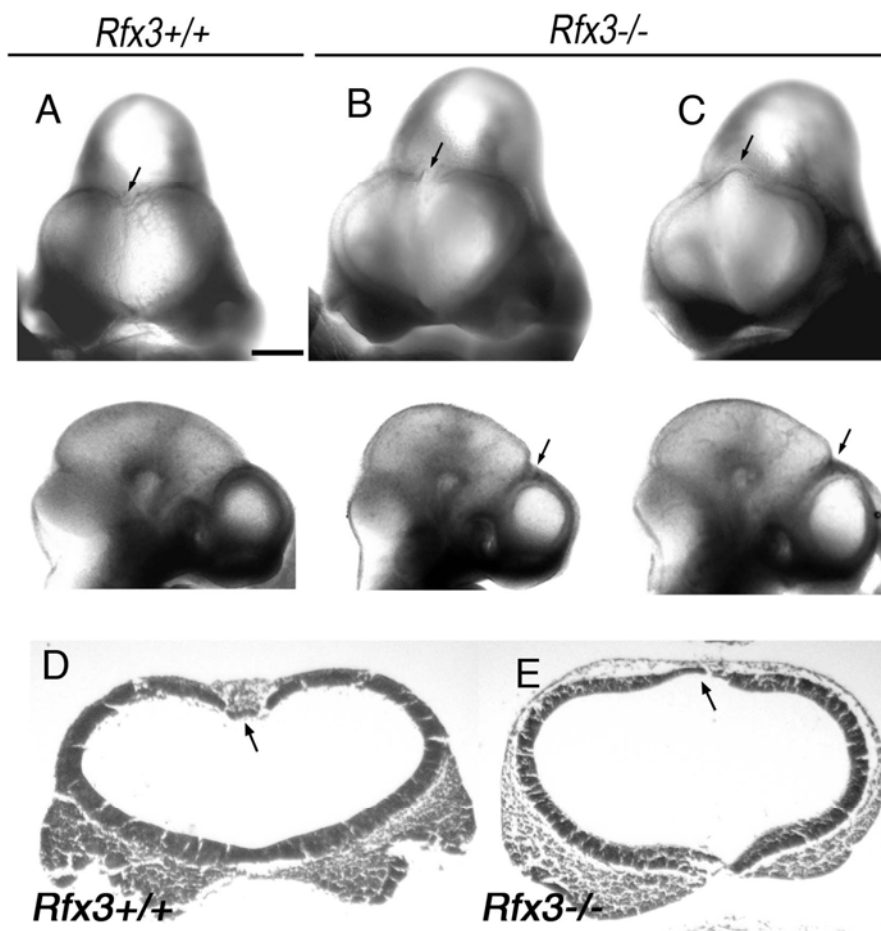
Results

***Rfx3* expression during early mouse embryogenesis.**

We previously described a strong *Rfx3* expression in the node at E7 (Bonnafe et al., 2004). We investigated *Rfx3* expression during later embryonic stages by RNA *in situ* hybridization. From E8 to E10.5, *Rfx3* expression is observed in the entire neuroepithelium (Figure 1A-C). Immunostaining with an antibody against RFX3 on brain sections of wild type (Figure 1E) or *Rfx3*^{-/-} (Figure 1F) embryos at E10.5, confirmed that RFX3 protein is expressed in all the neuroepithelium. *Rfx3* is apparently uniformly expressed at E9.5. However, we observe a stronger expression of *Rfx3* in the roof plate, both in the telencephalon and in the diencephalon at E10.5 and E12.5, as emphasized on transverse brain sections (Figure 1G and H). More caudally, *Rfx3* is expressed at E10.5 in the entire neural tube but more strongly in the roof and the floor plate (Figure 1I). As well, *Rfx3* is more strongly expressed in the dorsal midline of the forebrain at E12.5, as observed on whole dissected brains and in brain sections (Figure 1D, J and K). At later stages *Rfx3* expression is gradually enhanced in some specific regions such as the subcommissural organ, the choroid plexuses and the ependymal layer, as previously described (Baas et al., 2006), but also in several other brain sub-regions such as the hippocampus (not shown).

***Rfx3*^{-/-} homozygote mice have early morphogenesis defects in the forebrain.**

FIGURE 2



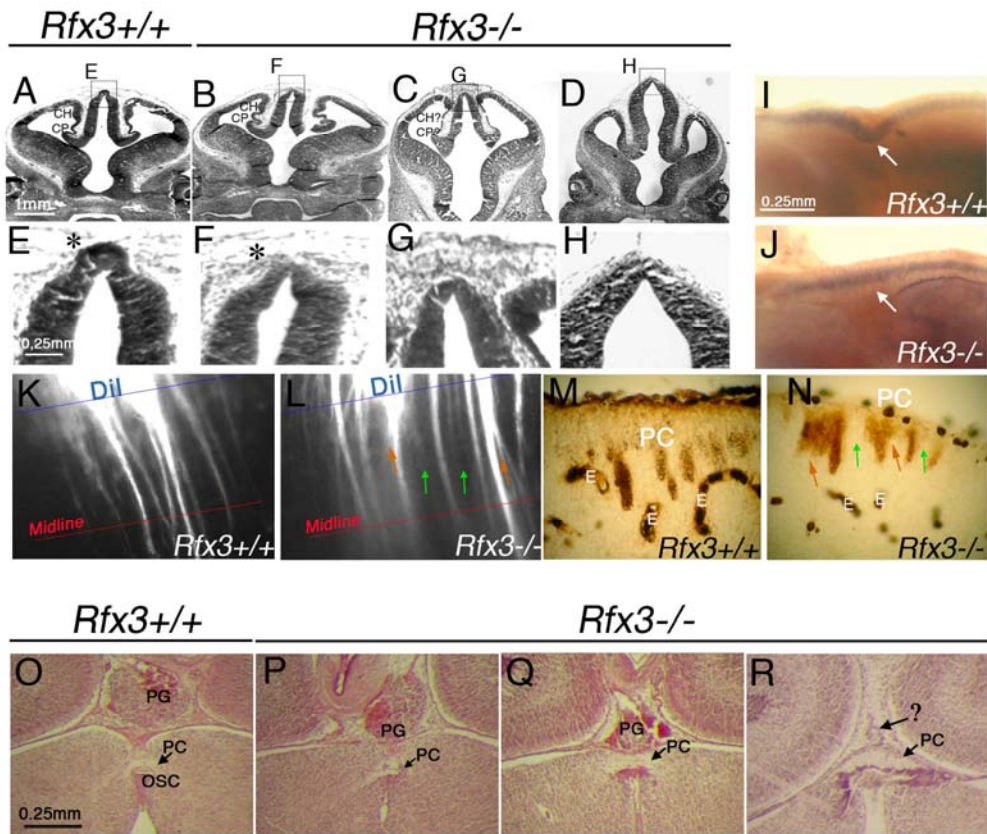
As previously described most of *Rfx3* deficient mice die during embryogenesis (Bonnafe et al., 2004). The few mice that do survive past birth show severe hydrocephalus (Baas et al., 2006) likely due to defects in choroid plexuses and subcommissural organ differentiation as previously shown. We thus looked more precisely for brain defects during development that could occur before embryonic lethality. Our previous work showed that mendelian proportions in heterozygous crosses were distorted after E11 (Bonnafe et al., 2004). We thus closely examined *Rfx3*^{-/-} forebrain at E10.5. Analysis of whole embryos at this stage, reveals that *Rfx3*^{-/-} mutants mice show defects in the dorsal forebrain with variable severity. Indeed, the most severe phenotype that we observe is a strong reduction of roof plate invagination and telencephalic cortex expansion, as observed *in toto* (Figure 2C) or on transverse brain sections 2E (arrows, N=4/7 C57bl/6 background). Interestingly, several mutants show an intermediate phenotype (Figure 2B) with a partial expansion of the cortex compared to wild type (Figure 2A, N=3/7 C57bl/6 background).

At E12.5, we also find morphological defects with variable severity that can be classified in three categories. About one-third of *Rfx3*^{-/-} mutants show no obvious defects in the telencephalon and diencephalon (Figure 3B, N=4/8 mixed C57bl/6 and SV129 background) compared to wild type brains (Figure 3A). On the opposite, we observe for another third of the mutants a severe malformation of the telencephalon (Figure 3D, N=3/8 mixed C57bl/6 and SV129 background) with an almost complete loss of the telencephalic roof plate invagination and a defect in cortical expansion. As expected, in these *Rfx3*^{-/-} mutant forebrains, we observe a drastic reduction or an atrophy of the choroid plexus anlage and a severe reduction of the cortical hem (Figure 3C and D).

More caudally, in the diencephalon, several midline structures that have started to differentiate at E12.5 are affected in mutant brains. For example, the pineal gland evagination (Figure 3G and H), which will give rise to the future pineal gland is absent in 3 out of 6 mutant embryos, consistent with the reduction (Figure 3Q, N=2/6 mixed C57bl/6 and SV129 background) or the complete atrophy of this brain structure that can be observed at E18.5, (figure 3R, N=3/6 mixed C57bl/6 and SV129 background).

As previously described, *Rfx3*^{-/-} mutant embryos show before birth an atrophy of the sub-commissural organ (SCO), a circumventricular gland localized at the forebrain-midbrain boundary (Baas et al., 2006). According to the prosomeric model, this gland derives from the diencephalic dorsal midline of prosomere 1 situated posteriorly to the

FIGURE 3



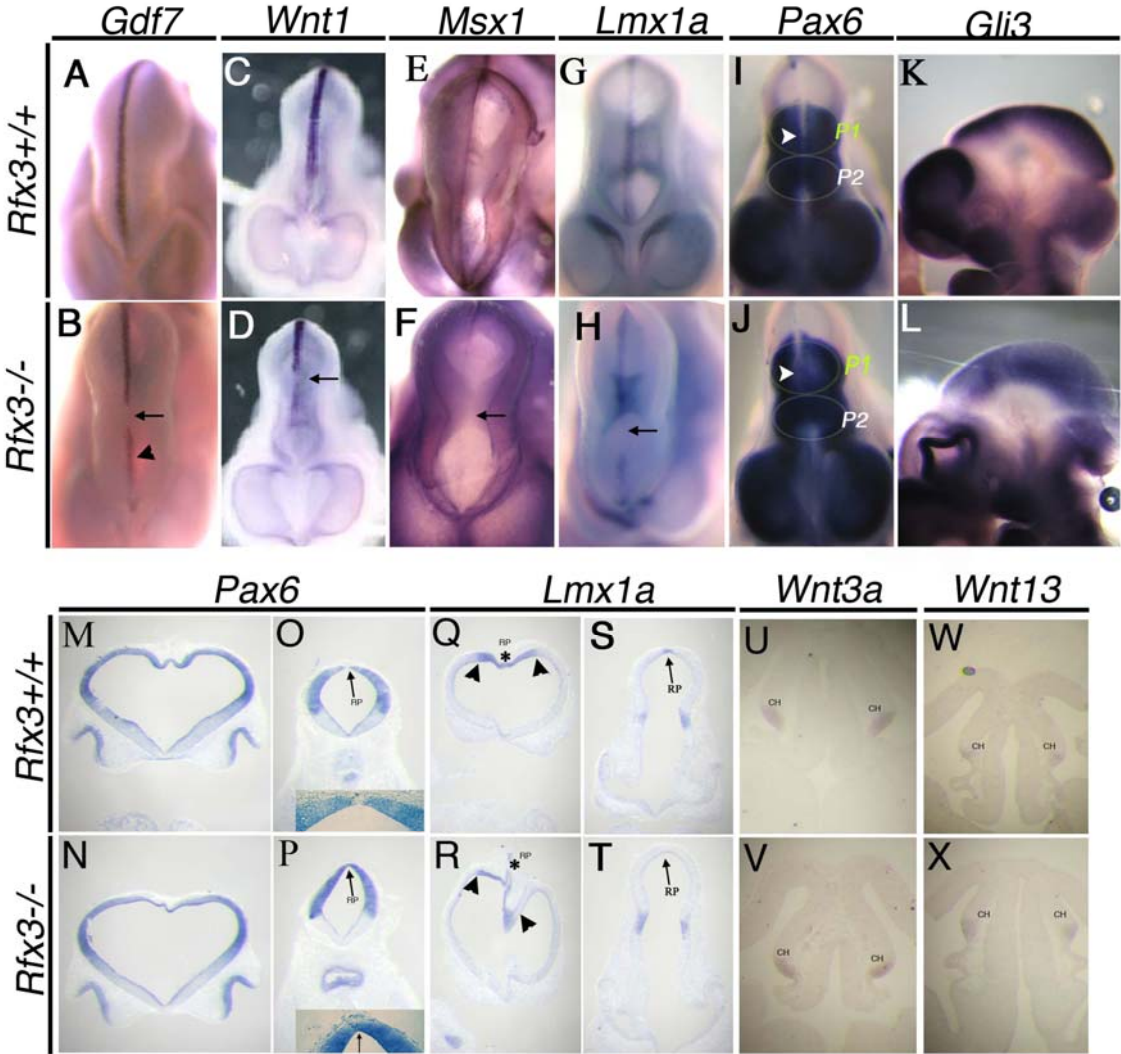
pineal gland primordium in prosomere 2 (Puelles and Rubenstein, 1993; Rubenstein et al., 1994). By *in situ* hybridization with the midline cell marker *Bmp6*, we can easily observe the SCO primordium (arrow) in wild type mice (figure 3I) and show that the thickening of the neuroepithelium is reduced in *Rfx3*^{-/-} SCO primordium (Figure 3J, N=2/2 mixed C57bl/6 and SV129 background). Thus the SCO atrophy, found in *Rfx3*^{-/-} newborn pups results from early defects in midline induction during SCO formation.

More strikingly, defects in the posterior commissure can already be detected at E11 and also at E12.5. By DiI labeling of axonal tracts, we observe that in *Rfx3*^{-/-} brains, PC axons still cross the midline but are more fasciculated, forming abnormal tight (green arrows) and thick (orange arrows) bundles (Figure 3L) (N=2/2 mixed C57bl/6 and SV129 background) compared to dispersed and fine bundles in wild type brain (Figure 3K) at E11. For higher resolution of the axonal tract defect, we performed photoconversion of the DiI labeling and show the same result, abnormal tight (green arrows) and thick (orange arrows) bundles in mutant at E12.5 (Figure 3N) compared to wild type bundles (Figure 3M) (N=1/1 C57bl/6 background). However, in order to evaluate more accurately this defect, more embryos need to be observed. Altogether, these results show that forebrain midline structures of the prosencephalon are affected early during mouse embryonic brain formation in *Rfx3*^{-/-} mice.

Roof plate specification is affected in *Rfx3*^{-/-} forebrain.

In order to understand how RFX3 governs midline structure formation, we first looked for the expression of several midline markers in *Rfx3*^{-/-} embryos by *in situ* hybridization. Dorsal midline specification involves the progressive induction of midline markers in the forebrain. Key signaling molecules and transcription factors have been shown to be involved in midline specification. Among signaling molecules, BMP proteins have been shown to be early markers of the dorsal midline throughout the anteroposterior neural tube (Furuta et al., 1997). The different BMP proteins are redundantly expressed, but with some temporal and spatial differences in the dorsal neural tube. Interestingly, *Gdf7* expression is shown to be strong and restricted to the dorsal midline of the forebrain, as early as E9.5 (Monuki et al., 2001). We thus first analyzed *Gdf7* expression in *Rfx3*^{-/-} mutants. A strong difference can be observed for *Gdf7* expression in the diencephalic dorsal midline (Figure 4B) in *Rfx3*^{-/-} brains at E10.5 with a complete loss of *Gdf7* expression (arrow) in prosomere 1 and a reduction in prosomere 2 (arrowhead).

FIGURE 4

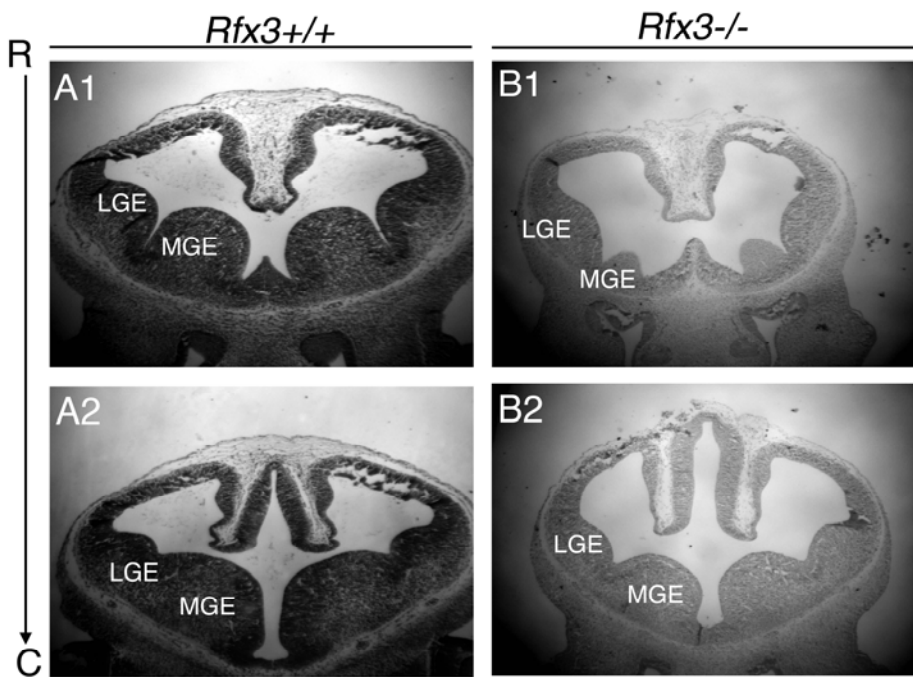


Among the other *Bmp* genes expressed in the dorsal midline, we performed *in situ* hybridization with *Bmp4* and *Bmp6*. Genetic evidences show that *Bmp4* is essential for roof plate formation in the mouse forebrain (Furuta et al., 1997). In addition, grafted BMP4 diffusing beads in the lateral neural tube, can induce ectopic roof plate features (Furuta et al., 1997). BMP4 is expressed in the telencephalic midline at E10.5 and in the entire forebrain midline at E12.5. No difference was detected for *Bmp4* at E10.5 in the only mutant that we have yet observed (N=1/1 C57bl/6 background) and we thus cannot conclude for the moment. At E12.5, *in situ* hybridizations were not conclusive and have to be reproduced. As well, we did not observe any difference in *Bmp6* expression between wild type and *Rfx3*^{-/-} embryos (N=2/2 mixed C57bl/6 and SV129 background) at E12.5 (Figure 3J) and we have to repeat both hybridizations at E10.5 and E12.5 on pure genetic backgrounds.

WNT secreted proteins have also been shown to be necessary for midline induction in the forebrain. *Wnt1* is necessary for midline induction in the diencephalon (Louvi and Wassef, 2000). Interestingly, we observe a strong reduction or a complete loss of *Wnt1* expression in the roof plate of the diencephalon (Figure 4D). More rostrally, WNT proteins have been shown to play crucial role in patterning the dorsal neural tube, *Wnt* genes are expressed in the cortical hem at E12.5 and are essential in hem signaling activity (Grove et al., 1998). Our first observations conducted on E12.5 embryos of a mixed SV129/B157B6 genetic background did not reveal any differences for *Wnt3a* and *Wnt13* (*Wnt2b*) expressions in the cortical hem at E12.5 between wild type and *Rfx3*^{-/-} embryos (N=2/2 mixed C57bl/6 and SV129 background) (respectively shown in figure 4 U and V for *Wnt3a* and W and X for *Wnt13*). We are currently performing *in situ* hybridization with these *Wnt* genes at E10.5 and E12.5 on C57bl/6 backcrossed background in order to definitely assess *Wnt* expression in *Rfx3*^{-/-} embryos in the telencephalic midline.

Midline induction relies also on the specific expression of key transcription factors. The transcription factor MSX1 has been shown to be specific for midline induction in the forebrain in mouse since in *Msx1*^{-/-} mouse, the diencephalic roof plate is affected leading to an abnormal formation of the subcommissural organ (Bach et al., 2003). The transcription factor *Lmx1a* is also expressed in the roof plate in the entire neural tube and loss of this transcription factor affects roof plate formation in the caudal neural tube, the hindbrain and also likely in the forebrain, since *Lmx1a* mutant rat show an abnormal

FIGURE 5



development of midline structures such as the choroid plexuses (Kuwamura et al., 2005). We show that both *Msx1* and *Lmx1a* are down regulated in the dorsal midline encompassing prosomere 1 and 2 (Figure 4E-F, G-H and S-T) at E10.5 in *Rfx3*^{-/-} embryos compared to wild types. The reduction is stronger in prosomere 1. Thus our results show a defect in midline induction at E10.5 in the diencephalon. In the telencephalon, we also observe a reduction of *Lmx1a* expression in the telencephalic roof plate at E10.5 (Figure 4Q-R). A similar apparent reduction of *msx1* expression in the telencephalic midline can be observed by *in toto* hybridization of E10.5 embryos (*data not shown*), but we need to confirm this result by *in situ* hybridization on telencephalic sections.

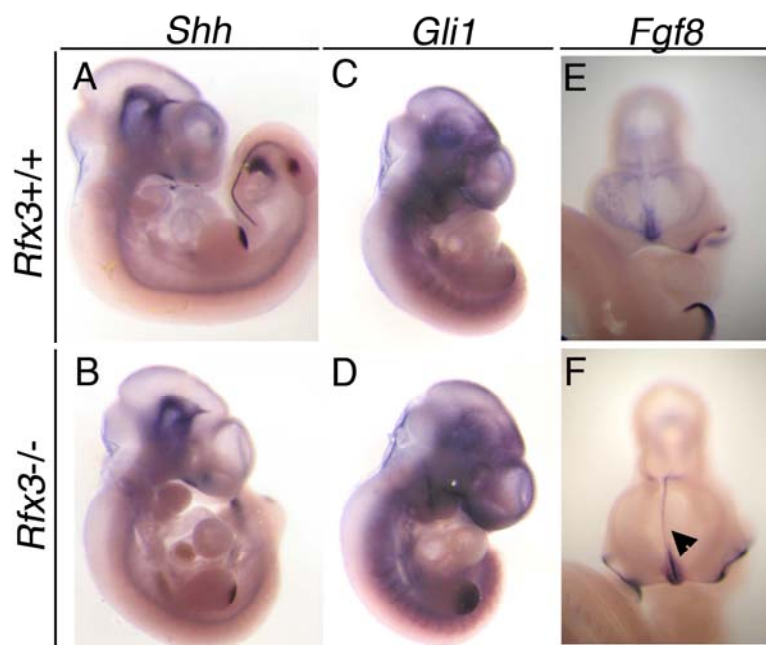
In addition, to roof plate specific transcription factors necessary to specify this roof plate, several other transcription factors expressed in the dorsal neuroepithelium are also necessary to allow proper induction of roof plate specific markers in the dorsal neural tube. For instance, *Pax6* is normally expressed in the dorsal midline of prosomeric 2 region, but excluded from the roof plate (RP) of prosomeric 1 region (white arrowhead in figure 4I and black arrow in 4O) and *Pax6*^{-/-} embryos show abnormal development of dorsomedian structures of diencephalon due to mis-specification of roof plate. PAX6 is thus necessary for roof plate specification in the diencephalon. Interestingly, in *Rfx3*^{-/-} mutants, we observe an ectopic expression of *Pax6* in the midline of prosomeric 1 region supporting the existence of a defect in dorsal midline specification in this region (white arrowhead in figure 4J and black arrows in 4P).

Altogether our results show that *Rfx3*^{-/-} mice present a specific defect in the induction of midline markers in the diencephalon, as early as E10.5, but with a more stronger defect in prosomeric 1 region. Regarding the telencephalon, we observe a reduction of *Lmx1a* expression, suggesting also a midline induction defect as early as E10.5 in the telencephalon, but we still need to complete our studies by analyzing several of the above mentioned markers on telencephalic cross sections either at E10.5 or E12.5.

Defects in ventral structures are also observed in *Rfx3*^{-/-} forebrains.

In *Rfx3* deficient mice, in addition to dorsal midline defects our histological observations also suggest dorsoventral patterning defects in *Rfx3*^{-/-} brains at E12.5. Indeed in the most affected mutants (N=3/6), as shown in figure 5B1-2, we observe a reduction of

FIGURE 6



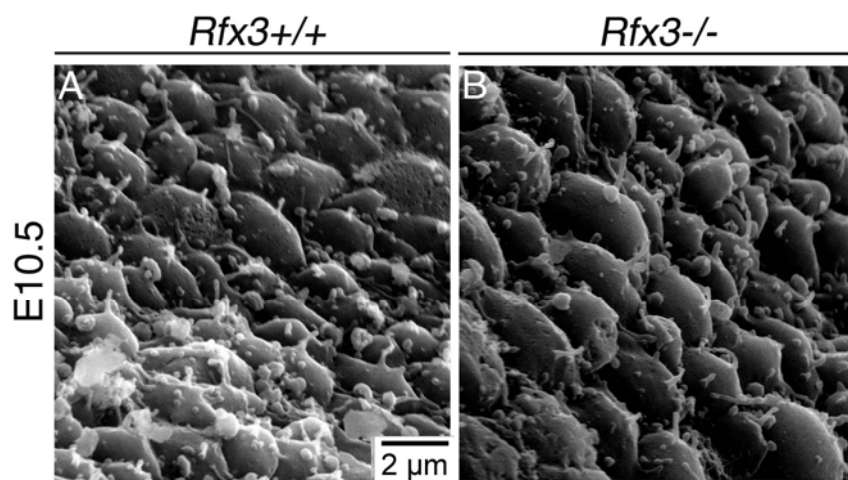
the ganglionic eminences. Since *Rfx3* is also expressed in the ventral neural tube and in the floor plate at E10.5, we checked for the expression of ventral makers in the anterior neural tube. SHH is one of the key morphogen that governs ventral patterning in the entire neural tube. We thus checked for *Shh* expression. *Shh* is found throughout the ventral neuroaxis in wild type embryos (Figure 6A) but also in *Rfx3*^{-/-} embryos (Figure 6B). As well, no extension of SHH signaling is observed, since *Gli1*, a *Shh* target gene, is expressed in the ventral region of the neural tube and excluded from the dorsal forebrain in both *Rfx3*^{+/+} (Figure 6C) and *Rfx3*^{-/-} embryos (Figure 6D). These data indicate that abnormal development of brain structures are neither caused by an ectopic expression of *Shh* or SHH signaling.

Other markers such as *Nkx2.1*, *Mash1*, *Dlx2* are currently tested at E10.5 or E12.5 to investigate further the dorsal ventral patterning defects that can observed in *Rfx3* mutants.

Extension of rostral midline in *Rfx3*^{-/-} forebrains.

The precise dorsal ventral patterning of the forebrain depends on antagonist interactions between the dorsal and ventral midline signaling centers, but also on a third signaling center at the rostral midline, also called the commissural plate. This rostral signaling center expresses several fibroblast growth factors which have been shown to be important to induce ventral and dorsal cell fate (Storm et al., 2003). We looked at the telencephalic rostral expression profile of *Fgf8* in wild type and *Rfx3*^{-/-} embryos. As observed on figure 6E, at E10.5, *Fgf8* expression is restricted to the commissural plate, in wild type embryos. Remarkably, we observe an extension of *Fgf8* expression into the telencephalic dorsal midline in *Rfx3*^{-/-} embryos (Figure 6F). These data suggest that RFX3 is necessary to restrict *Fgf8* expression to the anterior telencephalic midline. Interestingly, in chick, BMP signaling in the roof plate is known to regulate *Fgf8* expression, since FGF8 expression is downregulated by over expression of BMP4 and expanded by the BMP inhibitor noggin in the anterior telencephalon (Ohkubo et al., 2002). Thus, *Fgf8* expansion in *Rfx3*^{-/-} embryos could result from the reduced BMP signaling observed at least for *Gdf7* in the diencephalic roof plate. However, it has been shown in the literature that *Gli3*^{-/-}

FIGURE 7



embryos present an abnormal development of the prosencephalic midline with a similar ectopic expansion of *Fgf8* expression in the telencephalic roof plate (Theil et al., 1999). Since GLI3 processing has been shown to require cilia (May et al., 2005) and that RFX3 regulates ciliogenesis in several mouse cell types, we hypothesized that RFX3 could be necessary for GLI3 expression or signaling and thus that roof plate and FGF8 expression defects could result from a deficiency in Gli3 in *Rfx3*^{-/-} embryos.

***Gli3* expression and function in *Rfx3*^{-/-} embryos.**

Gli3 expression does not appear to be affected in *Rfx3*^{-/-} forebrains (Figure 4K-L) as observed by *in situ* hybridization on whole embryos (N=2/2 C57bl/6 background). We should, however, confirm that there is no difference in mRNA expression on transverse sections. Thus RFX3 does not seem to act on *Gli3* transcription. GLI3 signaling depends on two antagonist protein forms: the full length active form and the proteolytic cleaved repressor form (Dai et al., 1999; Sasaki et al., 1999; Wang et al., 2000). However, biochemical and genetic evidence indicates that GLI3 predominantly acts as a repressor (Hui and Joyner, 1993). We thus investigated GLI3 proteolytic processing by western blot in wild type or *Rfx3* deficient brains. We first settled the conditions to detect GLI3 processing on whole isolated brains. We are now preparing E12.5 and E10.5 isolated forebrains to compare GLI3 processing in wild type or mutant brains. The results should be obtained soon.

Ciliogenesis in the dorsal neural tube.

RFX proteins have been shown to be involved in ciliogenesis from *Drosophila* to humans (Swoboda et al., 2000; Dubruille et al., 2002; Bonnafe et al., 2004; Baas et al., 2006; Ait-Lounis et al., 2007). In order to investigate whether *Rfx3*^{-/-} midline defects could be linked to defects in ciliogenesis, we looked for ciliary defects in *Rfx3* deficient mice. Primary cilia can be found protruding from cells in the entire neural tube during early embryogenesis as observed by scanning electron microscopy of E10.5 forebrain (Figure 7). However in *Rfx3*^{-/-} brains no obvious ciliary defect could be observed on the lateral walls

of the neural tube (Figure 7B, N=1/1 mixed C57bl/6 and SV129 background). Cilia present on the dorsal midline were difficult to observe by scanning electron microscopy due to stereo-constraints of the neural tube architecture. We thus need to look more precisely to ciliary defects of dorsal midline cells by immunostaining markers such as adenylate cyclase III, that we successfully tested in the brain. We will look more precisely in the prosomeric 1 region in *Rfx3* deficient mice as we observed strong midline defects in this region.

Discussion.

RFX3 est nécessaire à la formation de la roof plate du cerveau antérieur

Nous avons montré que les mutants *Rfx3* présentent des défauts de formation des structures prosencéphaliques dorsomédianes. En effet, nous montrons des défauts dès leur mise en place à mi-gestation, de plusieurs structures issues de la ligne médiane dorsale. Ainsi les primordiums de l'organe sous commissural, des plexus choroïdes, de la glande pinéale, ainsi que de la commissure postérieure sont affectés chez les embryons *Rfx3*^{-/-}. Les défauts de ces structures peuvent s'expliquer par une mauvaise induction de la ligne médiane dorsale. Dans le diencéphale, nous avons établi que la perte de *Rfx3* conduit à un défaut de spécification de la ligne médiane dorsale préférentiellement dans la région prosomérique 1 puisque l'expression de marqueurs spécifiques de la roof plate comme *Gdf7*, *Wnt1*, *Msx1*, et *Lmx1a* y est sévèrement affectée. Concernant la mise en place de la ligne médiane au niveau rostral du prosencéphale, nos résultats sont encore trop préliminaires pour démontrer un défaut de spécification de la ligne médiane dorsale, même si les observations histologiques à E10.5 révèlent un défaut d'invagination de la roof plate télencéphalique. En effet, compte tenu de la la variabilité phénotypique retrouvée entre les embryons mutants, l'hybridation *in situ* avec la différentes sondes sur un nombre trop restreint d'embryons ne permet pas de conclure sur l'existence d'un réel défaut de formation de la roof plate du télencéphale. Or ce que l'on observe c'est qu'à E12.5 l'expression de *Wnt3a* et de *Wnt13*, dans l'ourlet cortical, est identique entre des embryons mutants et sauvages. L'ensemble de ces résultats suggèrent que : soit la formation de la roof plate du télencéphale n'est pas compromise chez les mutants *Rfx3*^{-/-} et que par

conséquent l'atteinte des structures dorso-médianes télencéphaliques retrouvée chez ces mutants est due à un autre défaut qui doit être caractérisé ; soit que les embryons testés ne présentent pas les phénotypes les plus pénétrants. La poursuite de ces expérimentations exclusivement sur des embryons issus de croisement de souris à fond génétiquement propre combinée à l'augmentation du nombre d'embryons permettra de confirmer ou d'infirmer ces résultats.

L'atteinte des territoires ventraux, chez les mutants *Rfx3*, pourrait être due à un défaut de dorsoventralisation du télencéphale

La réduction des éminences ganglionnaires observée chez les mutants *Rfx3*, à E12.5 suggère également des défauts de ventralisation dans le télencéphale des souris *Rfx3*^{-/-}. Nous devons préciser plus en détail ces défauts par l'étude de l'expression de marqueurs ventraux tels que *Nkx2.1*, *Dlx2* et *Mash1* mais encore dorsaux comme *Emx1*, *Emx2* et *Ngn2*.

Si nos résultats se confirment, nous pouvons supposer alors que ces défauts de dorsoventralisation puissent être dus à une mauvaise spécification de la ligne médiane dorsale du télencéphale. En effet, il a été montré que la perte de la signalisation émanant de la ligne médiane dorsale était corrélée à un défaut de dorsoventralisation du cerveau antérieur chez les mutants *Gli3*^{XT(J)/XT(J)} conduisant à une ventralisation ectopique des territoires dorsaux (Tole et al., 2000). Les défauts en région ventrale, chez les mutants *Rfx3*, ne sont pas dus à la perturbation de la signalisation SHH, qui est nécessaire à l'établissement des territoires ventraux. En revanche, ils pourraient être la conséquence de l'extension de l'expression de *Fgf8* depuis la ligne médiane rostrale jusque dans la ligne médiane dorsale. Comme la signalisation FGF est connue pour induire l'expression de marqueurs ventraux dans le télencéphale indépendamment de la signalisation SHH (Kuschel et al., 2003). Cette expression ectopique de la signalisation FGF pourrait induire une ventralisation ectopique des territoires dorsaux.

RFX3, via le contrôle de la ciliogenèse, pourrait réguler la formation de la roof plate du cerveau antérieur.

Les mutants murins *Rfx3*, comme les mutants murins *Gli3*^{XT(J)/XT(J)} (Grove et al., 1998; Theil et al., 1999; Aoto et al., 2002; Theil et al., 2002; Kuschel et al., 2003), présentent des défauts de formation de la roof plate du cerveau antérieur à l'origine de l'atteinte des structures dorsomédianes. De plus, chez les mutants *Gli3*, la frontière pallium/sous-pallium est mal définie suite à un défaut de mise en place du patron d'expression génique dorso-ventrale (Tole et al., 2000; Aoto et al., 2002). Cette ventralisation ectopique du télencéphale dorsal n'est pas due à une signalisation SHH ectopique mais serait due à l'extension de la signalisation FGF depuis la plaque commissurale jusque dans la roof plate (Theil et al., 1999; Aoto et al., 2002). Confortant ces résultats, il a été montré que la restauration des territoires télencéphaliques ventraux chez les mutants *Shh*^{-/-}, en cas de perte de *Gli3*, s'accompagne de la restauration de l'expression de *Fgf8* dans la plaque commissurale ainsi que de son extension ectopique dans la roof plate. Donc comme les caractéristiques phénotypiques rencontrés, chez les mutants *Rfx3*, ressemblent à ceux observés chez les mutants *Gli3*, nous proposons que la perte du facteur de transcription RFX3 affecte GLI3. Bien que chez les mutants *Rfx3*, l'expression de *Gli3* ne soit pas modifiée, il est probable que RFX3 soit nécessaire à l'activation de GLI3 en sa forme activatrice GLI3A ou repressive GLI3R. Dans le télencéphale dorsal, c'est majoritairement la forme GLI3R qui est retrouvée (Zaki et al., 2005; Fotaki et al., 2006). Récemment, il a été montré que le clivage de GLI3 en GLI3R, pour avoir lieu, nécessite l'intégrité ciliaire (May et al., 2005). Le facteur de transcription RFX3 est connu pour réguler l'assemblage et la fonction des cils, chez le nématode, la drosophile et la souris (Swoboda et al., 2000; Dubruille et al., 2002; Bonnafé et al., 2004; Baas et al., 2006; Ait-Lounis et al., 2007). On peut donc proposer un modèle dans lequel RFX3 interviendrait dans la formation de la roof plate du cerveau antérieur en contrôlant l'activation de GLI3, via la régulation de la ciliogenèse. Pour confirmer cela, il faudrait quantifier le taux de GLI3R dans le télencéphale des mutants *Rfx3*. Ce modèle suggère donc un nouveau rôle des cils dans la formation de la roof plate. Il nous reste à prouver l'existence d'une atteinte ciliaire chez les mutants *Rfx3*, notamment grâce à l'utilisation d'un marqueur spécifique des cils primaires du cerveau comme l'adénylate cyclase III.

Pourquoi chez les autres mutants de ciliogenèse, ne retrouve t'on pas de défaut de

formation de la roof plate ? Il est possible que cette atteinte cérébrale soit masquée par des défauts plus graves. En effet, les mutants murins, où les gènes de ciliogenèse sont déficients, présentent un défaut de fermeture du tube neural en région crâniale appelé exencéphalie (Huangfu and Anderson, 2005; Liu et al., 2005; Caspary et al., 2007; Vierkotten et al., 2007). Certes, il n'est pas exclu que le rôle de RFX3 dans la formation de la roof plate soit indépendant de la ciliogenèse. Mais si nos résultats se confirment, nous montrerons pour la première fois l'existence d'un lien entre la ciliogenèse et la formation de la ligne médiane chez la souris.

La formation de la roof plate pourrait nécessiter la coopération des facteurs RFX3 et RFX4.

La ligne médiane du cerveau antérieur est composée de trois centres organisateurs : la roof plate, la floor plate et la plaque commissurale. La signalisation émanant de ces centres est indispensable à l'établissement de la ligne médiane du cerveau antérieur. Le phénotype le plus grave rencontré en cas de perte de la ligne médiane (dorsale et/ou ventrale) du télencéphale chez les patients et chez les modèles murins est l'holoprosencéphalie. Ici, nous montrons que la mauvaise spécification de la roof plate conduit, chez les mutants *Rfx3* les plus touchés, à un défaut d'invagination de la roof plate télencéphalique. Nous n'avons jamais observé le phénotype le plus sévère qu'est l'holoprosencéphalie. En revanche les structures dorso-médianes sont, quant à elles, sévèrement affectées. Ces résultats suggèrent l'existence soit d'un phénomène de compensation de l'invagination de la roof plate suffisant pour permettre la formation des hémisphères cérébraux mais qui ne suffit pas à induire la formation des structures dorsomédianes ; soit que les mutants *Rfx3*^{-/-} ayant les défauts les plus sévères sont morts et ne sont pas retrouvés au stade embryonnaire suivant. Mais la gradation de la sévérité des phénotypes cérébraux rencontrés chez les mutants *Rfx3*, conforte l'existence d'un autre facteur qui compense la perte de *Rfx3* dans le cerveau antérieur. De plus, l'analyse de la séquence protéique des facteurs RFX, révèle la présence d'un domaine DIM qui permet aux facteurs de s'homo ou de s'hétérodimériser entre eux. Il est donc envisageable qu'un autre facteur RFX interagisse avec RFX3 dans la formation de la roof plate. RFX4 pourrait coopérer avec RFX3 puisqu'il a été montré que ce facteur est également nécessaire à la formation du cerveau antérieur. En effet, chez les mutants *Rfx4*^{v3}^{-/-} on retrouve des défauts cérébraux sévères, allant jusqu'à l'apparition d'un phénotype d'holoprosencéphalie (Blackshear et al., 2003). Il est intéressant de noter

que les mutants *Rfx3* et les mutants hétérozygotes *Rfx4-v3+/-* présentent les mêmes défauts cérébraux comme la formation anormale de l'organe sous commissural. Des études de formation de complexes *in vitro* révèlent que RFX4 est capable de se complexer avec RFX3 (Morotomi-Yano et al., 2002). De plus, après traitement à l'agent mutagène ENU, des souris présentent une substitution nucléotidique dans le domaine de dimérisation de *Rfx4*. Ces souris transgéniques présentent les mêmes atteintes cérébrales que celles retrouvées chez les souris *Rfx4-v3-/-* (Zarbalis et al., 2004). Cette étude conforte un rôle des dimères RFX dans la formation de la roof plate. Le degré de sévérité diffère entre les mutants *Rfx3* et *Rfx4* suggérant un rôle plus important de RFX4 dans la formation de la roof plate. RFX4 pourrait être nécessaire à la fois sous forme d'homodimères RFX4/RFX4 et/ou d'hétérodimères RFX3/RFX4. Afin de prouver que ces facteurs coopèrent au cours de la formation de la roof plate, il serait intéressant d'étudier la présence et la proportion des complexes RFX dans le cerveau antérieur mais également d'analyser les phénotypes cérébraux des souris doubles mutantes *Rfx3-/- ; Rfx4+/-*. Une aggravation du phénotype cérébral, et notamment l'apparition d'un phénotype d'holoprosencéphalie, chez ces mutants pourrait suggérer que l'atteinte cérébrale des mutants *Rfx3-/-* est en fait due à une forme modérée d'holoprosencéphalie.

Figure legends.

Figure 1: *Rfx3* expression profile during early steps of mouse embryonic development from E8.0 to E12.5.

Rfx3 is expressed in the entire neuroepithelium at E8.0 (left embryo in A), E9.0 (right embryo in A), E9.5 (B) and E10.5 (C). At E10.5 (E-F), RFX3 is weakly but significantly expressed in the neuroepithelium at E10.5 (E) as observed by antibody reactivity on sagittal sections of wild type (E) compared to *Rfx3-/-* brains (F). On cross sections, *Rfx3* appears to be more strongly expressed in the telencephalic roof plate (G) (in the anlage of the future choroid plexus and cortical hem), and in the diencephalic roof plate (H). More caudally, we observe a strong expression in the floor and roof plates (black arrows) from the mesencephalon to the posterior end of the neural tube (I). At E12.5 (D, J-K), this expression is maintained in the forebrain roof plate as observed in diencephalons of whole dissected brain (D), and also observed in *in situ* hybridization on cryosections in the telencephalon (arrow in J) and the diencephalon (arrow in K). Scale bars = 0.5 mm.

Figure 2: Brain morphological defects in *Rfx3*^{-/-} embryos at E10.5.

(A-C) whole mount morphological observations of mouse embryos. *Rfx3*^{-/-} embryos show brain malformations early during embryogenesis. Malformations can be observed on *Rfx3*^{-/-} embryos (B and C face (top) and profile (bottom) views) as a failure of roof plate invagination, with variable degrees of severity compared to wild type (A face (top) and profile (bottom) views). About one half of the mutants (N=3/7 C57bl/6 backcrossed background) have a moderate defect of the dorsal telencephalon invagination (B), whereas the other half of the mutants present a more severe defect as shown in (C), with an almost complete loss of roof plate invagination (N=4/7 C57bl/6 backcrossed background) compared to wild type embryos (A). Scale bars = 0.5 mm. This morphological defect can be emphasized on cross sections of wild type (D) and *Rfx3*^{-/-} (E) embryos.

Figure 3: Several midline structures are affected in *Rfx3*^{-/-} forebrains at E12.5

At E12.5, less affected mutants (B) (N=4/7 mixed C57bl/6 and SV129 background) are quite similar to wild types (A). Others mutants show an intermediate phenotype in the telencephalon with hypoplasia of the choroid plexuses and cortical hem (C) (N=2/7 mixed C57bl/6 and SV129 background), whereas a complete loss of the choroid plexuses and cortical hem, are found in mutants with the more severe phenotypes (D) (N=1/7 mixed C57bl/6 and SV129 background). In the diencephalon, the Pineal Gland is also affected (N=3/6 mixed C57bl/6 and SV129 background), since we observe an absence of pineal evagination (G and H), which give birth to the Pineal Gland in wild type (* in E), or less affected mutants (N=2/5 mixed C57bl/6 and SV129 background) (* in F). At E18.5, the reduction (N=1/5 mixed C57bl/6 and SV129 background) or atrophy (N=2/5 mixed C57bl/6 and SV129 background) of the Pineal gland is observed as shown respectively in Q and R, in comparison with wild type (K). The Sub-Commissural Organ primordium is also affected at E12.5 as observed by the absence of neural epithelial thickening, revealed by *Bmp6* midline staining observed on *Rfx3*^{-/-} embryos compared to wild type (J). At E11 and E12.5, neuronal labeling with crystal of DiI shows that PC axons still cross the midline but they fasciculated forming abnormal tight (green arrows) and thick (orange arrows) bundles in *Rfx3* mutants (L) (N=2/2 mixed C57bl/6 and SV129 background) compared to dispersed and fine bundles in the wild type (K). For higher resolution of the axonal tract defect, we performed photoconversion of the DiI labeling and show the same result, abnormal tight (green arrows) and thick (orange arrows) bundles in mutant at E12.5 (N)

compared to wild type bundles (M) as observed on sagittal sections (N=1/1 C57bl/6 background). At E18.5 one animal has an abnormal posterior commissure (N=8 mixed C57bl/6 and SV129 background) (R) and three on eight show a reduction of this brain structure (P).

CH : Cortical Hem ; CP : Choroïd Plexus ; PC : Posterior Commissure ; PG : Pineal Gland ; SCO : Sub-Commissural organ.

Figure 4: *Rfx3*^{-/-} mutant forebrains show expression defects of several midline markers.

In situ hybridization performed on whole embryos at E10.5 show defects in the induction of several midline markers in *Rfx3*^{-/-} embryos in the dorsal diencephalon. A strong reduction of *Gdf7* expression can be observed in the diencephalic roof plate (N= 2/3 mixed C57bl/6 and SV129 background) (B), compared to wild type (A). Similar results are obtained for *Wnt1* (mutants N= 4/6 mixed C57bl/6 and SV129 background) (C, D), *Msx1* (mutants N= 5/5 mixed C57bl/6 and SV129 background) (E, F) and *Lmx1a* (mutants N= 2/2 mixed C57bl/6 and SV129 background) (G, H) for wild type (C, E, G) or *Rfx3*^{-/-} (D, F, H) mutant embryos. *Pax6* expression is extended across the roof plate of prosomere 1 region (P1) in *Rfx3*^{-/-} embryos (J), whereas it is normally excluded from the roof plate in wild type embryos (I). *Gli3* expression is not affected in *Rfx3*^{-/-} (L) compared to wild type embryos (K) (N=2/2 C57bl/6 background). *Pax6* expression does not appear to be affected in *Rfx3*^{-/-} telencephalons, compared to wild types (M), but is clearly extended across the diencephalic roof plate in *Rfx3*^{-/-} embryos (mutants N=3/3 mixed C57bl/6 and SV129 background) (N). Cross section hybridization show the reduction of *Lmx1a* expression in the telencephalic roof plate (arrow, RP in R) and the complete loss of *Lmx1a* in the diencephalic roof plate (arrow in T) compared to wild type (respectively shown in Q and S). Hybridization on cryosections with *Wnt3a* (Figures U and V (N=2/2 mixed C57bl/6 and SV129 background)) and *Wnt13* (Figures W and X (N=1/1 mixed C57bl/6 and SV129 background)) probes show normal profiles of *Wnt* genes expression in Cortical Hem (CH) at E12.5. P2 : Prosomere 2.

Figure 5 : Ventral structures are affected in *Rfx3*^{-/-} telencephalons.

Histological analyses realized at E12.5 on wild type (A1 and A2) and *Rfx3*^{-/-} (B1 and B2) telencephalons. In *Rfx3* deficient mice, we observe a reduction of the lateral (LGE) and medial (MGE) ganglionic eminences.

Figure 6 : The rostral signaling center is affected in *Rfx3*^{-/-} embryos at E10.5.

The expression of *Shh* (A, B) and of its target gene *Gli1* (C, D) are not affected in *Rfx3*^{-/-} mutant brains (B, D) compared to wild type (A, C) (N=2/2 mixed C57bl/6 and SV129 background for each probe). *Fgf8* expression is extended caudally to the dorsal midline of the telencephalon in *Rfx3*^{-/-} (F) compared to wild type (E) embryos (N=2/2 with 1/1 mixed C57bl/6 and SV129 background and 1/1 C57bl/6 background).

Figure 7: Ciliogenesis in the embryonic neural tube of *Rfx3*^{-/-} embryos.

Scanning Electron microscopy of the internal lumen of the neural tube of E10.5 wild type or mutant embryo (N=1/1 mixed C57bl/6 and SV129 background). Cilia are distributed throughout the forebrain, both in wild type (A) and in *Rfx3*^{-/-} mice (B). No obvious differences can be observed on the lateral walls of the diencephalon. However ciliary size is highly variable from one region to the other in the neural tube in wild type neural tube, and close comparison of cilia length in the roof plate must be done.

Materials and methods

Mice and genotyping

Rfx3-deficient mice were generated as previously described (Bonnafe et al., 2004). Genotyping was performed by polymerase chain reaction using genomic DNA isolated from tail biopsies and the primers M3.A (5'-GTC ATG CTG GAA AAT TTG AAG-3') and M3.B (5'-AGT TGG CTT CTA ACT TCT ATG-3'), as described previously (Bonnafe et al., 2004). Experiments were performed with mice on a C57BL/6 background or on a mixed 129/Sv -C57BL/6 background.

RNA probes.

The probe sequences of *Fgf8*, *Wnt1*, *Wnt3a*, *Gdf7*, *Msx1*, were provided by Marion Wassef, *Wnt13* by Lise Zakin, *Shh* by Thomas Lamonerie, *Gli1* by Benoit Robert, *Lmx1a* by Sylvie Retaux and *Rfx3* was previously described (Bonnafe et al., 2004). Single-stranded RNA probes containing digoxigenin were produced in vitro with appropriate T7, T3 or SP6 RNA polymerase (Roche Diagnostics).

Whole mount *in situ* hybridization.

Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde (PAF) and progressively dehydrated by a graded concentration of ethanol solutions up to 75% ethanol and stocked at -20°C until experimentation. Embryos were transferred to absolute ethanol treated with 0.1% H_2O_2 in absolute ethanol for 1 hour. They were rehydrated progressively in PBT solution (1xPBS / 0.1% Tween20 (Sigma P5927)). Proteinase K (Promega V3021) treatment at $10\mu\text{g/ml}$ was performed during 15 min for E10.5 embryos and 20 min for E12.5 dissected brains. Embryos were rinse twice with PBT, and fixed in 4% PAF / 0.2% Glutaraldehyde (stock solution 25% Sigma C5882) / 0.1% Tween20 for 20 min. After two washes with PBT embryos were pre-hybridized for 1 hour at 70°C into hybridization mix (50% Formamide pro analysis (Sigma 47670) / 5X SSC / $50\mu\text{g/ml}$ YeastRNA / $50\mu\text{g/ml}$ Heparin (Sigma H6279) / 0.1% Tween20). RNA probes were heated in hybridization mix to 80°C for 10 min and probes were added to the embryos at final concentration of 200ng/ml . Hybridization was conducted overnight at 70°C in moist chamber.

Embryos were rinsed twice 30 min at 70°C with wash buffer 1 (50% Formamide / 5X SSC (stock solution 20x Sigma) / 0.1% Tween20) and rinsed in a 1/1 mix of wash buffer 1 and wash buffer 2 (0.5mM NaCl / 10mM Tris-Hcl pH : 7,5 / 0.1% Tween20), for 10 min at 70°C . Three washes of 5 min each in wash buffer 2 with rocking at Room Temperature (RT) was performed followed by 1 wash with wash buffer 3 (50% Formamide / 2XSSC / 0.1% Tween20) at RT and 2 additional washes of 30 min at 65°C with wash buffer 3. Embryos were washed with 1xTBST (stock solution TBST 20x (8g NaCl / 0.2g KCl / 25mL Tris-HCl pH : 7.5 / qsp 50mL H_2O DEPC) 1% Levamisol (Sigma L9756), blocked in 1X TBST / 1% Levamisol / 10% SVF (Invitrogen) for 90 min at RT before adding antibody directed against digoxigenin (Roche Diagnostics,1093274) at 1/2000 in 1X TBST / 1% Levamisol / 1% SVF overnight at 4°C . Embryos were washed three times, 5 min each, with 1X TBST / 1% Levamisol, and then five times for 30 min each. Embryos were washed three times in NTML (100mM Tris-HCl pH :9.5 / 100mM NaCl / 50mM MgCl_2 / 0.1% Tween20 / 1% Levamisol) for 10 min each. Samples were stained with NTMT + NBT/BCIP stock solution (1/50) (ref 1681451 Roche Diagnostics) in a dark chamber at RT. Embryos were fixed for 15 min in 1xPBS/4%Paraformaldehyde and rinsed in 1X PBS and transferred to 1X PBS / 50% Glycerol (99.5% VWR).

***In situ* hybridization on cryosections.**

Embryos were fixed overnight at 4°C in 4% PAF in 1xPBS until embedding and freezing. Embryos were stocked in PBS solution for only one week. Embryos were transferred in 1xPBS / 30% sucrose, cryoprotected in 1X PBS / 15% Sucrose (Sigma S0389) / 7.5% Gelatin (Merck 4078) and frozen at -50°C. Cryosections of 20µm were collected, thaw-mounted on Polylysine coated slides (Microm France). Sections were let to dry 30 min at RT and washed twice with 1X PBS for 5 min. Sections were post-fixed in 4% PAF / 1xPBS for 15 min at RT was performed followed by three washes with 1xPBS and 1 hour pre-hybridization at 65°C in pre-hybridization mix (50% Formamide / 1X Salt solution 10X (114g NaCl / 12.4g Tris / 7.8g NaH₂PO₄ / 7.1g Na₂HPO₄ / 0.5M EDTA / qsp 1L H₂O DEPC adjust pH to 7.5 with HCl 37%)). Heat RNA probes in hybridization mix at 70°C for 10 min. Hybridization is conducted overnight at 65 °C in moist chamber, in hybridization mix (50% Formamide / 1X Salt solution / 1mg/ml Dextran sulfate (Sigma D8906) / 1mg/ml YeastRNA / 1X Denhardt) containing at least 200ng/ml of RNA probe. Two washes of 15 min each with wash buffer 1 (50% / Formamide / 1X SSC / 0.1% Tween20) and 30 min at 65°C. Rinse twice 30 min into MABT buffer (23.2g Maleic acid (Sigma)/17.4g NaCl/16g NaOH/0.1% Tween20 /qsp 2L H₂O DEPC adjust pH to 7.5 with HCl 37%)) and block into MABT / 2% Blocking reagent (Roche Diagnostics) / 20% SVF for 1 hour at RT. Slides were incubated with an antibody directed against digoxigenin (Roche Diagnostics) at 1/2000 into moist chamber and incubated overnight at 4°C. Sections are rinsed four times with MABT for 20 min each bath. Sections were incubated in NTMT (100mM Tris-HCl pH:9.5 / 100mM NaCl / 1mM MgCl₂ / 0.1% Tween20) + NBT/BCIP stock solution (1/50) until apparition of staining, in dark chamber at RT. Then sections were fixed for 15 min in 4%PAF and mounted into 1X PBS / 50% Glycerol.

Sectioning of whole mount in situ hybridization embryos.

After hybridization, embryos were fixed in PAF 4% for 15 min and progressively dehydrated by graded series of ethanol solutions (50%-100%) and in butanol, followed by a graded series of butanol and Paraffin (Fischer Scientific) solutions (25% to 100%). Sections of 20µm were realized with a microtome and deparaffinized in methylcyclohexane (Sigma 66300) and mounted in Eukitt.

Immunohistochemistry.

20µm cryosections of whole embryos at E10.5 were realized as above.

Immunohistochemistry on cryosections, was performed with the rabbit anti-RFX3 serum diluted at 1/50 (Reith et al., 1994), and incubated overnight into 1X PBS / 10% SVF / 0.1% Triton (x100 Merck) at 4°C. Tissue sections were incubated with goat anti-rabbit IgG coupled to biotin (Jackson Laboratory) (1/250 dilution in 1X PBS / 10% SVF / 0.1% Triton) for 1 hour at RT and rinsed twice with 1xPBS Followed by Streptavidin Fluoprobes 547 (Interchim) 1/400 incubation for 1 hour in the dark at RT. Sections were rinsed with 1xPBS and incubated with Dapi solution (5 µg/mL) for 5 min. Sections were rinsed in 1xPBS and mounted in 1X PBS / 50% glycerol.

The anti-RFX3 antibody was affinity purified using recombinant mouse RFX3 produced in *Escherichia coli*. The specificity of the anti-RFX3 antibody was verified by immunostaining of *Rfx3*-deficient mouse embryos.

Histological.

Brains were fixed for 1 week in 4% PAF / 1X PBS at 4°C and then dehydrated in graded series of ethanol (25-100%). Brains were transferred into absolute butanol and substituted for paraffin in graded series of butanol/Paraffin solutions. Sections of 10µm were realized with a microtom. Sections were deparaffinize in Methylcyclohexan, rehydrated and stained. Stain sections into Hematoxylin pure solution for 30 sec (N°3 Gill Sigma) and rinse in running tap water. Differentiation was accomplished with a 10 sec incubation in differentiating solution (0.25ml HCl / 70% Ethanol). Slides were immediately rinsed in running tap water and counterstained in 1% Eosin water (Rhone Alpes Chimie) for 10 sec. Slides were rinsed in tap water and dehydrated in a graded series of ethanol solutions (25 to 100%) and in Methylcyclohexan bath before mounting in Eukitt.

Neuronal labeling.

Dissected brains at E11 or E12.5 were fixed into 4%PAF at 4°C until and during experimentation. We used DiI (Molecular Probes) to trace axons on fixed dissected brain. A fine crystal of DiI was inserted into a lateral incision parallel to the di/mesencephalic midline. For observation, dissected brains were transferred to a depression slide and were observed under a fluorescent microscope. The fluorescence of some embryos was photoconverted to a stable product. In brief, embryos were embedded and cut as previously described for cryosections. Sections were rinsed, treated with 0.1% H₂O₂ for 15 min, equilibrated in 0.1 M Tris, pH 8.2, and transferred into the same solution containing 1.6

mg/ml DAB and incubated at 4°C for 30 minutes. Then illumination of slides was realized under red fluorescent filter for 10 to 30 minutes, solution could be changed every 10 min with a cold DAB solution and converted the fluorescence into a brown color.

Scanning electron microscopy.

Embryos at E10.5, were dissected into PBS at 400mOsm. Brains were removed, cut into small fragments and fixed overnight at 4°C in PBS (200 mOsm) / 2% glutaraldehyde. Brain samples were then washed several times in PBS (400 mOsm) and postfixed for 15 min in PBS (400 mOsm) / 1% OsO₄ (Euromedex, France). Fixed brain samples were washed extensively with distilled water and dehydrated in a graded series of ethanol solutions and finally into acetone pure solution. Brain samples were then prepared for scanning electron microscopy by the critical point freeze-dry procedure (Balzers-Union,CPD020). Samples were surface-coated using a gold / palladium sputtering device (Hummer 2, Technics) under optimal conditions for 1 min 30 sec and observed with a scanning electron microscope (S800, Phillips) at 15 keV. Observations were performed at the Centre for Microstructure Analysis of the University of Lyon.

PAPIER 3

***The* development of the Corpus Callosum
and the Hippocampal Commissure is
impaired in *Rfx3* deficient mice.**

Abstract

The corpus callosum (CC) is one major connecting commissure that bridges the two cerebral hemispheres. Abnormal development during fetal life can lead to a reduction or a complete loss of this structure, also called agenesis of the corpus callosum. It is the most frequent human brain malformation with an incidence that can reach 0.7% of the population. Interestingly, callosal agenesis is found in some human pathologies collectively known as ciliopathies, since they result from defects in the assembly or function of cilia, small cellular organelles found on almost every cell types in mammals. Moreover, corpus callosum agenesis is considered to be a good prognostic marker of ciliopathies. We work on a murine model of ciliopathy, that is inactivated for *Rfx3*, a transcription factor involved in the control of ciliogenesis and our analyses revealed that *Rfx3* mutant suffer from callosal agenesis associated with defects in hippocampal commissure formation. RFX3 is strongly expressed in corticoseptal populations during callosal genesis and we show a mis-localization of these populations in *Rfx3* mutants. These data suggest a crucial role of RFX3 in establishing these populations during embryogenesis of the corpus callosum. As these cells are ciliated, we are currently analyzing any ciliary defect in *Rfx3* mutants. This work will allow us to determine how RFX3 controls CC genesis and how cilia are involved in this process. Moreover, it will bring new understandings of the physiopathological mechanisms of several human genetic diseases, showing major brain malformations, and more generally will bring new clues for the function of cilia in neurogenesis.

Introduction

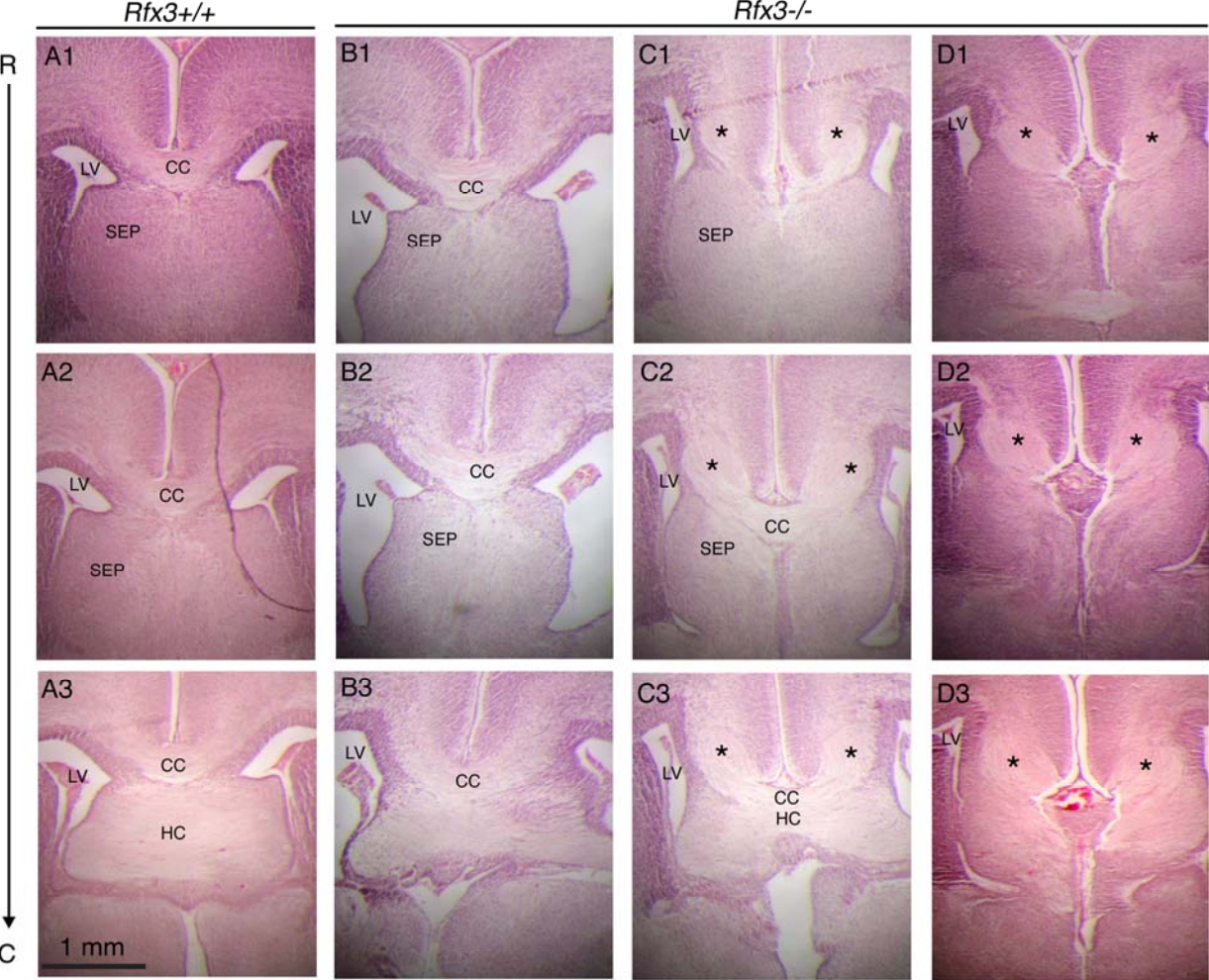
Le Corps Calleux est une commissure inter-hémisphérique majeure du cerveau. Il est composé de plusieurs millions d'axones qui interconnectent les deux hémisphères du cortex cérébral. Des anomalies du développement foetal peuvent conduire à une réduction voire à l'absence de formation de cette structure. On parle alors d'agénésie du Corps Calleux qui représente la plus fréquente des malformations cérébrales humaines (Richards et al., 2004; Paul et al., 2007). Chez la souris, cette commissure se met en place vers E16, au sein de la région cortico-septale. Afin que les axones callosaux, originaires du

néocortex, soient correctement guidés au travers de la ligne médiane, plusieurs populations cellulaires sécrétant des molécules de guidage sont requises. Ces populations sont retrouvées localisées dans quatre zones stratégiques de la région cortico-septale : au niveau de la Glial Wedge (GW) localisée dans la zone ventriculaire des ventricules latéraux, de l'Indusium Griseum (IG) situé dans le cortex médian, de la Midline Zipper Glia (MZG) retrouvée dans le septum médian et de la Sling sous callosale localisée dans la frontière médiane cortico-septale (Shu and Richards, 2001; Shu et al., 2003c; Shu et al., 2003a; Richards et al., 2004). Ces cellules sont soit des cellules gliales, pour lesquelles un rôle dans le guidage des axones callosaux est aujourd'hui bien documenté (pour revue (Richards et al., 2004)), soit comme l'a montré une étude récente menée par l'équipe de C. Lebrand, en 2008 (Niquille et al., 2008) des cellules neuronales de type GABAergique ou glutamatergique qui peuplent transitoirement la région cortico-septale.

De manière intéressante, le phénotype d'agénésie callosale est retrouvé associé à plusieurs pathologies humaines reconnues sous le terme de ciliopathies, car les protéines mises en cause sont toutes associées aux cils. Certaines études proposent même que l'agénésie du Corps Calleux est un bon critère de diagnostic prédictif de ciliopathies (Badano et al., 2006). Néanmoins, si le rôle possible des cils dans la mise en place du CC est révélé par l'étude de cas cliniques, aucune donnée de la littérature ne permet de comprendre les mécanismes mis en jeu, ni les types cellulaires impliqués. L'analyse de mutants murins atteints de ciliopathies a permis progressivement de comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine des phénotypes rencontrés chez les patients humains, mais aucun modèle murin de ciliogenèse présentant d'agénésie du corps calleux n'a encore été publié.

Chez le nématode, la drosophile et la souris, les facteurs de transcription appartenant à la famille RFX jouent un rôle essentiel dans le contrôle des gènes nécessaires à l'assemblage et aux fonctions ciliaires. Les mutants murins *Rfx3* présentent des traits caractéristiques de ciliopathies à savoir un *situs inversus*, une hydrocéphalie ou encore des défauts pancréatiques reliés à une atteinte ciliaire (Bonnafe et al., 2004; Baas et al., 2006; Ait-Lounis et al., 2007). Dans cette étude, nous montrons que les souris *Rfx3*^{-/-} présentent une atteinte cérébrale retrouvée en cas de ciliopathie : l'agénésie callosale. Nous montrons également que RFX3 est exprimée par les cellules gliales et les neurones de type glutamatergiques de la région cortico-septale site de formation du corps calleux. Toutefois, l'inactivation conditionnelle de *Rfx3* spécifiquement dans les cellules gliales

FIGURE 1



n'induit pas d'agénésie callosale montrant que la perte de RFX3 dans les cellules gliales n'est pas suffisante pour induire un phénotype acallosal. L'analyse fine de ces populations cortico-septales, chez les souris *Rfx3*^{-/-}, révèle que les différentes populations cellulaires sont bien présentes, mais qu'elles sont en revanche mal localisées. Nos premières analyses suggèrent que cette mauvaise localisation proviendrait d'un défaut de migration cellulaire de ces populations au cours du développement. Enfin, nous montrons également que ces cellules sont ciliées et nous proposons l'hypothèse qu'un défaut de ciliogenèse chez les mutants *Rfx3* puisse être à l'origine de la migration aberrante de ces cellules conduisant l'agénésie du corps calleux.

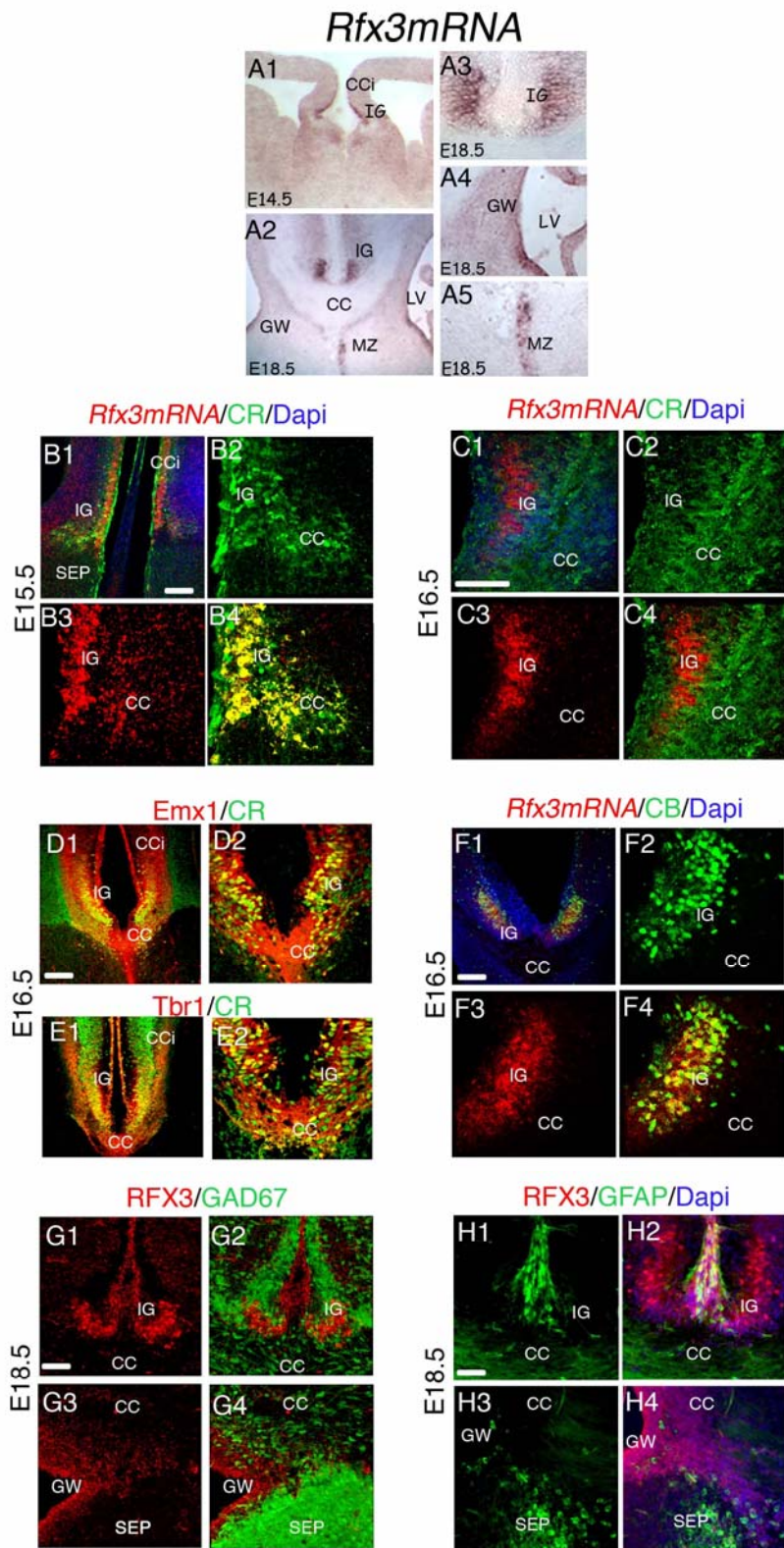
Results

***Rfx3* mutants mice are accallosal**

Haematoxylin-eosin stained coronal sections revealed defects in corpus callosum development in *Rfx3*^{-/-} embryos at E18.5 (N= 4/8) (Figure 1C and D) compared to wild type (Figure 1A). The most severe phenotype that we observed is a complete agenesis of the corpus callosum with no callosal axons crossing the midline (N=3/8) (Figure 1D1-D3). This defect leads to callosal axons accumulation on either side of the midline that forms dense axonal bundles called Probst Bundles (PB), (asterisks on Figure 1C and D), as observed by haematoxylin-eosin staining or anti-NP1 immunohistochemistry (Figure 3D and F). A milder phenotype, characterized by partial callosal agenesis, was observed for one out of eight animals. Typically, we observed no callosal axons crossing the midline in the rostral region of the telencephalon of this embryo, whereas callosal axons still cross the midline in the caudal region (Figure 1C1-C3). For the remaining three embryos, we did not observe any defects of the corpus callosum (Figure 1B1-B3).

As well, we observed strong defects in the formation of the hippocampal commissure in *Rfx3*^{-/-} embryos. The hippocampal commissure was totally absent in two out of eight animals, that also have an agenesis of the corpus callosum, and severely reduced in five out of eight animals (Figure 1C3 and D3). In only one embryo, we did not observe any reduction of the hippocampal commissure. The corpus callosum is also not

FIGURE 2



affected in this embryo (Figure 1B3). Thus *Rfx3* is necessary for the formation of the corpus callosum and the hippocampal commissure

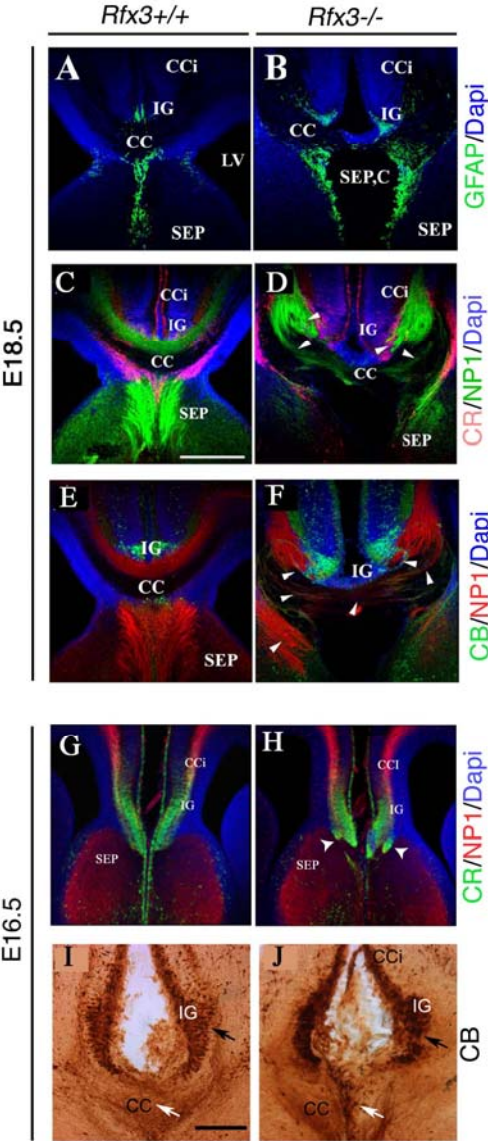
Expression of *Rfx3* in the developing telencephalon.

In order to understand how RFX3 could be involved in corpus callosum formation, we looked more precisely for *Rfx3* mRNA expression in coronal sections of the developing mouse brain during corpus callosum formation. As previously described from E10.5 to E12.5, *Rfx3* is expressed in the entire telencephalon but more strongly in the roof and floor plate (Benadiba et al, in progress). Corpus callosum axons start to cross the midline between E14.5 and E16.5. At E14.5, in the corticoseptal region, *Rfx3* is highly expressed in the primordium of the Indusium Griseum located at the dorsal midline near the marginal zone of the cingulate cortex (Figure 2A). Several cell types can be distinguished in this telencephalic region. In addition to GFAP positive cells, several neuronal populations have been nicely described by the group of C. Lebrand, 2008 (Niquille et al., 2008) and can be distinguished by immuno-labeling the calbindin or calretinin proteins. These neuronal populations are either be glutamatergic or GABAergic interneurons. These latter can be in addition easily identified using a GAD67-GFP mouse line in which the green fluorescent protein (GFP) is reliably expressed in GABAergic neurons (Tamamaki et al., 2003).

We thus first performed colabeling experiments for calretinin (CR) or calbindin (CB) and RFX3. At E15.5, *Rfx3* mRNA colocalizes *with* CR in cells of the Indusium Griseum (Figure 2B). Interestingly, at E16.5, *Rfx3* positive cells no longer express CR (Figure 2C), but express CB until E18.5 (Figure 2F). Cells expressing CR in the IG at E16.5 are glutamatergic since they also express EMX1 (Figure 2D) and TBR1 (Figure 2E).

To determine if RFX3+ neurons can be GABAergic interneurons, we immunodetected RFX3, on brains sections of GAD67-GFP mouse brains. We observed no co-localization between GAD67 and RFX3 expressing neurons at E18.5 (Figure 2G). Thus no RFX3 positive neurons appear to be GABAergic and are thus likely to be glutamatergic. Supporting this hypothesis CR positive neuron in the IG, which express RFX3 at E15.5, are glutamatergic (Figure 2D and E). To confirm, cellular type of RFX3 positive neurons, and to prospect on their origin, a co-immunostaining between RFX3 and EMX1 or TBR1 antibodies will be tested.

FIGURE 3



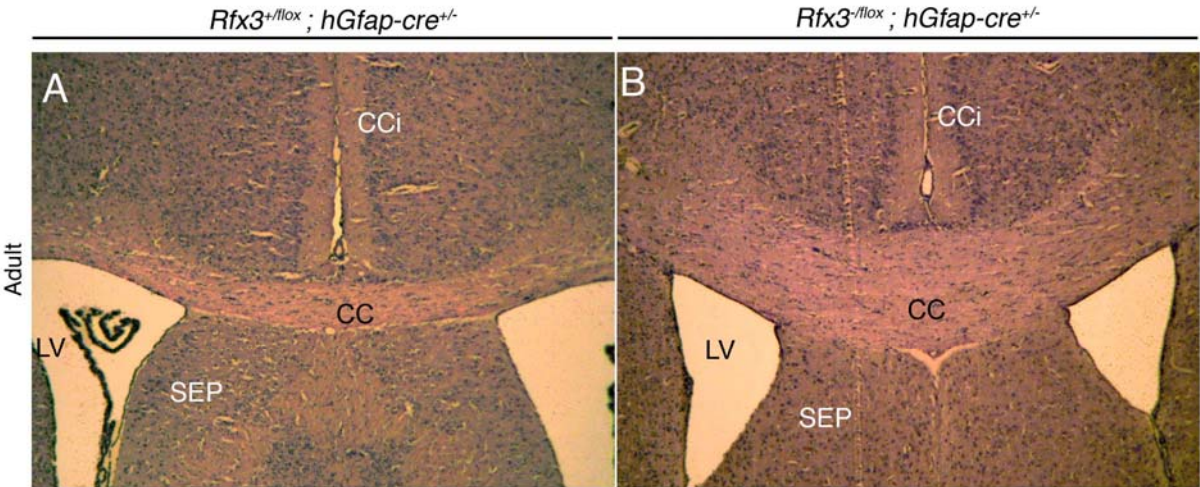
In addition to this strong RFX3 expression in neuronal cell populations, a few *Rfx3*⁺ cells populating the ventricular zone in the glial wedge region at E18.5 are glial cells, since they also express GFAP (Figure 2H1-2). However, no such overlap can be observed in the Indusium griseum region, confirming that *Rfx3*⁺ cells are not glial cells in the IG (Figure 2H3-4).

The presence of *Rfx3* in the indusium griseum, in the glial wedge and in the sling, is consistent with the hypothesis that RFX3 may be important for the proper formation of midline glial and neuronal cells and/or may secondarily affect the production and distribution of the chemotactic signals that emanate from these cell populations. We thus examined if these cortico-septal cell types, could be impaired by *Rfx3* inactivation.

Abnormal development of cortico-septal populations

To follow the distribution of glial cells in *Rfx3*^{-/-} mice, we used GFAP immunohistochemistry. GFAP is still expressed in *Rfx3*^{-/-} glial cells, but these cells appear to be mis-localized, as we observe a lateral shift of glial cells in the indusium griseum at E18.5 (Figure 3B) (N=2/2 Sv129 and C57bl/6 mixed backcrossed) compared to wild type (Figure 3A). Interestingly, neuronal cells, observed by calbindin (N= 3/3 Sv129 and C57bl/6 mixed backcrossed) or calretinin (N= 3/4 Sv129 and C57bl/6 mixed backcrossed) staining, show a similar abnormal distribution in *Rfx3*^{-/-} brains (Figures 3D and F). This cellular mis-localization could either result from a secondary displacement of cells by aberrant axonal tract bundles or from cellular migration defects prior to axonal growth through the midline. We thus analyzed cortico-septal populations before callosal axons cross the midline. We observed that neuronal cells expressing calretinin or calbindin form aggregates in *Rfx3*^{-/-} embryonic brains at E16.5 (Figure 3H (arrowhead) and 3J). We numbered more precisely calretinin and calbindin positive neuronal cell populations by DAB immunostaining to check if this cellular disorganization is associated with a loss of neuronal cells in of *Rfx3*^{-/-} brains at E16.5 (N=4/4 Sv129 and C57bl/6 mixed backcrossed). There is no significant difference in the number of calretinin positive neurons in the indusium griseum of wild type or *Rfx3*^{-/-} embryos (data not shown). However, we observe a significant reduction of calbindin positive neurons in the indusium griseum in *Rfx3*^{-/-} brains at this stage (N=4/4 Sv129 and C57bl/6 mixed background) (black arrow Figure 3I).

Figure 4



Neuronal loss seems to be compensated by an ectopic accumulation of neuronal cells into the corpus callosum tract (N=3/3, white arrow Figure J). These results show that RFX3 is necessary for the proper organization of glial and neuronal cell populations at the cortico-septal boundary.

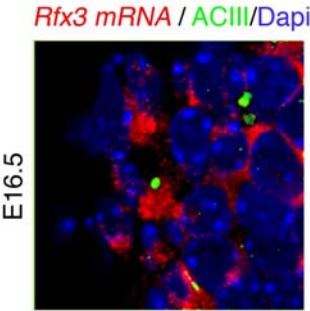
Mouse carrying a conditional deletion of *Rfx3* in Glial cells, have a normal Corpus Callosum.

To determine if *Rfx3* expression in glial cells is necessary for axonal growth in the corpus callosum, we investigated whether the targeted inactivation of *Rfx3* in glial progenitors might result in glial differentiation defects that could have an impact on axon guidance. We thus performed Cre induced recombination of *Rfx3* floxed allele in GFAP positive cells by mating *Rfx3^{fl/fl}* and *hGfap-cre^{+/-}* mice (Zhuo et al., 2001). According to Zhuo et al., 2001, these mice start expressing GFAP in the forebrain at E13.5 (Zhuo et al., 2001). In *Rfx3^{fl/-}*; *hGfap-cre^{+/-}* mice, the corpus callosum is still formed (Figure 4B n=5/5). This result suggest that loss of *Rfx3* in glial cells after E13.5 is not responsible for corpus callosum agenesis. However, we cannot exclude that RFX3 could be needed in the GW before this stage.

RFX3+ cells at the cortico-septal boundary are ciliated.

Our previous studies revealed that RFX3 regulates genes required for ciliogenesis in mice (Bonnafe et al., 2004; Baas et al., 2006; Ait-Lounis et al., 2007). According to its ciliogenic role, we can hypothetize that RFX3 acts on callosal formation by regulating ciliogenesis in neuronal and glial cell populations of the corticoseptal boundary. This hypothesis would support an involvement of cilia in corpus callosum formation. We first have analyzed if RFX3+ cells that populate the cortico-septal boundary are ciliated. We used an antibody against adenylate cyclase III, a specific marker for primary cilia, in the brain (Bishop et al., 2007). We show that at E16.5, RFX3+ neurons of the indusium griseum display primary cilia (Figure 5). To confirm the function of cilia in this morphogenesis comparative analysis of cilia could be performed between wild type and

FIGURE 5



Rfx3-deficient mice, in the cortico-septal boundary. In order to check that *Rfx3* is indeed involved in ciliogenesis control in *Rfx3*⁺ cells of the IG, we will compare the size and the number of cilia on CB⁺ cells of the IG compared to GAD67 cells of the same region in wild type and *Rfx3*^{-/-} brains.

Discussion

L'accallosité des mutants *Rfx3* peut être due à un défaut de formation de la roof plate du télencéphale.

Dans cette étude, nous montrons que les souris *Rfx3*^{-/-} présentent un phénotype cérébral, d'accallosité. Nous montrons que ce phénotype est associé à un défaut de mise en place de plusieurs populations cellulaires au niveau de frontière corticoseptale, zone de formation du corps calleux. Une hypothèse pour expliquer ce défaut pourrait être que ces cellules aient besoin pour se positionner aux stades précoces du développement embryonnaire une mise en place correcte de la signalisation émanant de la ligne médiane. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que certaines formes modérées d'holoprosencéphalie liées à un déficit de formation de la roof plate, étaient associées à une altération de la formation du CC (pour revue Fernandes et al., 2008). Or d'après une étude récente, nous avons montré que les mutants *Rfx3* présentent un défaut de formation de la roof plate qui serait à l'origine de la formation anormale des structures dorso-médianes du cerveau antérieur (Benadiba et al., en préparation). De plus, il a été montré que les mutants hétérozygotes d'un second membre de la famille RFX, le gène *Rfx4-v3* présentent des atteintes cérébrales similaires à celles que nous avons observées dans les souris *Rfx3*^{-/-}, suggérant une coopération de ces deux facteurs pour la formation de la roof plate. Par contre, les mutants homozygotes *Rfx4-v3* sont beaucoup plus sévèrement touchés et présentent une holoprosencéphalie. Ces données proposent que l'accallosité retrouvée, chez les mutants *Rfx3*, serait une forme modérée d'holoprosencéphalie. L'apparition d'un phénotype d'HPE chez les doubles mutants *Rfx3*^{-/-} ; *Rfx4-v3*^{+/-} viendrait conforter cette hypothèse.

RFX3 dans les cellules corticoseptales peut être impliqué dans la formation du CC.

Une seconde hypothèse pourrait être que RFX3 est nécessaire dans ces populations cellulaires de la région corticoseptale pour leur différenciation et leur capacité de répondre aux signaux environnementaux. En effet, dans cette étude nous montrons que RFX3 est fortement exprimé dans les cellules gliales et neuronales glutamatergiques qui peuplent la région cortico-septale bien après la formation de la roof plate. Afin de déterminer si l'accallosité est due à un défaut de formation de la roof plate ou à la perte de RFX3 dans les cellules corticoseptales, nous envisageons de réaliser un mutant conditionnel. L'inactivation de *Rfx3*, spécifiquement dans les cellules de la roof plate, peut être réalisée grâce au croisement entre la souris *Rfx3* floxé avec la souris *GDF7-cre*^{+/+}, qui exprime la recombinaison CRE dans les cellules de la roof plate (Lee et al., 2000). La présence ou non de l'agénésie callosale combinée ou non à la perte de ces cellules apportera une indication essentielle quant à l'origine de l'accallosité (ACC). En effet, si les cellules RFX3 sont toujours présentes et que les mutants n'ont pas d'ACC, cela suggèrera que la perte du CC est due à la perte de RFX3 dans les cellules corticoseptales et non pas à la formation anormale de la roof plate. Inversement, l'ACC associée à la présence des cellules cortico-septales prouvera que le défaut de formation de la roof plate est à l'origine de l'accallosité et que la perte de RFX3⁺ dans les cellules cortico-septales n'est pas impliquée. Enfin, si on les souris sont accallosales et qu'elles n'ont plus de cellules RFX3⁺ cortico-septales, on ne pourra pas trancher sur l'origine de l'accallosité, mais cela prouvera que les populations cortico-septales RFX3⁺ proviennent vraisemblablement de la roof plate. Des expériences de traçage cellulaire seront néanmoins nécessaires pour le confirmer.

Il peut également être envisagé de tester, le rôle des populations RFX3⁺, dans la formation du CC, indépendamment de la formation de la roof plate. En effet, l'inactivation conditionnelle de *Rfx3* spécifiquement dans les populations cortico-septales permettra de déterminer le rôle de RFX3 dans la genèse callosale. Dans cette étude, nous avons réalisé l'inactivation de *Rfx3* spécifiquement dans les cellules gliales grâce à l'utilisation d'une souris *Rfx3* floxé croisée avec la *hGfap-cre*^{+/+} (Zhuo et al., 2001). La présence du CC chez ces mutants, suggère soit que la formation du CC, ne nécessite pas RFX3 dans les cellules gliales, soit que RFX3 est nécessaire dans ces cellules avant leur différenciation. Un mutant conditionnel *Rfx3*, dans les neurones, permettrait de déterminer si RFX3 dans les neurones cortico-septaux est nécessaire à la formation du CC. Pour cela, la souris *Rfx3* floxé peut être

croisée avec une souris exprimant spécifiquement la recombinaison CRE dans les neurones (*Ngn2-cre*^{+/-})

RFX3, dans les cellules cortico-septales, pourrait permettre la différenciation correcte de ces populations.

Nous ne savons pas quel peut être le rôle des neurones RFX3⁺ de la région cortico-septale. Une hypothèse est que ces populations sécrètent des facteurs de guidage des axones callosaux, comme cela a été démontré par le groupe de Cécile Lebrand pour les interneurons GABAergiques qui expriment *Sema3C* nécessaire au guidage des axones callosaux (Niquille et al., 2008). De même nous ne savons pas si les défauts de mise en place des populations cellulaires de la région cortico-septales sont seules responsables de l'accallosité. Ainsi RFX3 pourrait non seulement être nécessaire pour la mise en place de ces cellules mais également pour leur différenciation et l'expression correcte par ces populations de plusieurs molécules de guidage. Dans un premier temps nous devons évaluer si ces populations cortico-septales RFX3 positives ont la capacité de guider les axones callosaux en confrontant ces populations, issues de mutants *Rfx3*, avec des axones callosaux issus de souris sauvages. Dans un second temps, il sera intéressant d'étudier la production par ces populations cellulaires de différentes molécules de guidage et de comparer cette production entre cerveaux sauvages ou déficients pour *Rfx3*.

Les cils des populations cortico-septales pourraient être impliqués dans la formation du CC.

Chez la souris, le facteur de transcription RFX3 est impliqué dans la régulation des gènes nécessaires à l'assemblage et à la fonction ciliaire (Bonnafe et al., 2004; Ait-Lounis et al., 2007). Dans cette étude, nous montrons que les cellules RFX3 de la région cortico-septale sont ciliées. De plus, un des phénotypes retrouvé associés aux ciliopathies est l'agénésie callosale (Badano et al., 2006). Ces données suggèrent donc qu'une atteinte ciliaire chez les souris *Rfx3* pourrait être à l'origine de l'accallosité. A quel niveau les cils peuvent-ils intervenir dans la formation du CC ? Il a été montré que la mise en place de la voie de signalisation FGF est nécessaire à la migration des cellules gliales dans l'indusium griseum permettant la formation du CC (Smith et al., 2006). En effet, la perte d'un récepteur à la signalisation FGF, chez la souris *Fgfr1*, conduit à l'accallosité. De plus, il est intéressant de noter que FGFR1a une localisation ciliaire dans les cellules de l'épithélium respiratoire

(Evans et al., 2002). On peut donc émettre l'hypothèse qu'une atteinte ciliaire va perturber la migration des cellules cortico-septales et donc la formation du CC. Confortant cette hypothèse, nous avons montré que la migration des cellules de l'IG, chez les mutants *Rfx3*, est affectée. Il serait donc intéressant de corrélérer ce défaut de migration cellulaire avec une atteinte ciliaire dans les cellules cortico-septales chez les mutants *Rfx3*.

De plus, il semblerait que les cils assurent d'autres fonctions. Ils interviennent notamment dans la mise en place de la polarité planaire cellulaire. En effet, des mutants murins de ciliogenèse présentent des défauts de mise de la polarité planaire dans la cochlée (Ross et al., 2005; Jones et al., 2008). Chez les mutants *Rfx3*, la présence d'agrégats cellulaires, dans la région cortico-septale, suggère un défaut d'agencement des cellules les unes par rapport aux autres. Il est donc envisageable qu'un défaut ciliaire soit à l'origine de ces agrégats. Si les cellules sont mal agencées au sein de la région cortico-septale, elles ne pourront pas guider correctement les axones callosaux au travers de la ligne médiane. L'analyse de la répartition des centrioles des cellules cortico-septales chez les mutants *Rfx3* en comparaison avec le cas sauvage, permettra de caractériser si il y a un défaut de polarité planaire cellulaire et donc de l'organisation de la région cortico-septale.

Figure legends :

Figure 1 : Defects of the Corpus Callosum and Hippocampal commissure in *Rfx3*^{-/-} brains at E18.5.

Brain sections of wild type (A) or *Rfx3*^{-/-} (B-D) embryos at E18.5 stained by Haematoxylin-eosin. Half of *Rfx3*^{-/-} embryos show either a complete agenesis of the CC (D1-D3) (N=3/8) or a partial agenesis with an absence of callosal midline crossing only in the rostral part of the telencephalon (C1 compared to C3) (1/8). All callosal defects are associated with Probst Bundle formation (asterisks on Figure 1C and D). One half of *Rfx3*^{-/-} embryos have no obvious defect of the Corpus callosum (4/8). The Hippocampal commissure (HC) development is also affected in most mutants either as a reduction (C3) or a complete loss of this commissure (D3). Only one embryo did not show any defects of the hippocampal commissure (B3).

Figure 2 : *Rfx3* expression in the telencephalon during Corpus callosum formation.

In situ hybridization of *Rfx3* mRNA was performed on brain sections of wild type embryos at E14.5 (A1) and E18.5 (A2-A5). At E14.5, *Rfx3* is expressed in the primordium of the indusium griseum (IG) (A1). This expression is maintained and increased at E18.5 (A2 and A3). At E18.5, *Rfx3* is also expressed in the Glial Wedge (GW) and in the Midline Zipper Glia (MZG) (A5).

Coimmunostaining of *Rfx3* with Calretinin (B1-B4, where B2-B4 are larger views (4 fold) of IG as in C1-C4), Calbindin (F1-F4 where F2-F4 are larger views of IG (4 fold)) and GFAP antibodies (H1 and H2 in IG region and H3-H4 in Glial wedge region) at E15.5 (B), E16.5 (C, D, E and F) or E18.5 (H) ; immunostaining of RFX3 in GAD67-GFP mice at E18.5 (G1 and G2 in IG region and G3-G4 in Glial wedge region), coimmunostaining of CR with EMX1 (D1 and larger a view of IG in D2 (2 fold)) and TBR1 antibodies at E16.5 (E1 and a larger view of IG in E2 (2 fold)). At E15.5 but not at E16.5, RFX3+ cells in the IG express Calretinin (B and C). Cells expressing CR at E16.5 are glutamatergic in the IG since they expressed also EMX1 (D) and TBR1 (E). At E16.5 in the IG, RFX3+ cells express Calbindin (F). Interestingly, in the IG and in the GW at E18.5, no RFX3+ cells are GABAergic (G). At E18.5, in the GW but not in the IG, few RFX3+ cells are Glial cells since they express GFAP (H).

Figure 3 : Abnormal organization of corticoseptal cells in *Rfx3*^{-/-} embryos.

Glial (GFAP+ cells) (B), and neuronal cells expressing Calretinin(D) or Calbindin (F) are still present in *Rfx3*^{-/-} brains at E18.5 compared to wild type embryos (A, C and E respectively). However, a lateral shift of these populations can be observed. Aberrant bundles are observed in *Rfx3*^{-/-} embryos with NP1 immunostaining (arrowheads in D and F). Neuronal mis-localization is also observed at E16.5 in *Rfx3*^{-/-} brains (H and J) compared to wild type (G and I). Neural cells forms aggregates in *Rfx3* deficient brains (arrowheads in H). Cellular aggregates are also observed for CB cells and notably ectopic aggregates are found in the septal region (white arrow in J) compared to wild type (white arrow in I). The number of CB positive cells decreases in *Rfx3*^{-/-} brains compared to wild type leading to areas without cells (black arrow in J).

Figure 4 : Corpus Callosum development in *Rfx3*^{fl/fl} ; *hGfap-cre*^{+/-} mice.

Haematoxylin-eosin counterstain on brain sections of *Rfx3^{fl/-} ; hGfap-cre^{+/-}* (B) or wild type mice (A). In conditional knock-out mice (B), CC development is normal (N=5/5). CCi : Cortex Cingulate ; LV : Lateral Ventricle ; SEP : Septum.

Figure 5 : RFX3+ cells are ciliated in the IG.

Immunostaining with RFX3 and ACIII (specific marker of primary cilia) antibodies were performed on wild type brain sections at E16.5. RFX3+ cells of the IG are ciliated.

Material and methods

Animals

Rfx3-deficient mice were generated as previously described (Bonnafe et al., 2004). Genotyping was performed by polymerase chain reaction using genomic DNA isolated from tail biopsies and the primers M3.A (5'-GTC ATG CTG GAA AAT TTG AAG-3') and M3.B (5'-AGT TGG CTT CTA ACT TCT ATG-3'), as described previously (Bonnafe et al., 2004). Experiments were performed with C57BL/6 background mice or with mice of a mixed 129/Sv -C57BL/6 background.

We used heterozygous GAD67-GFP (neo) mice (Tamamaki et al., 2003), which will be referred as GAD67-GFP mice in this work. Experimental animals were obtained by mating C57Bl/6 mice with heterozygous GAD67-GFP mice. GAD67-GFP embryos could be recognized by their GFP fluorescence.

hGfap-cre^{+/-} mice used in this work have been previously described (Zhuo et al., 2001). These heterozygous mice were obtained by mating C57Bl/6 mice with heterozygous GFAP-cre mice.

Histological

Brains were fixed in 4% PAF / 1XPBS at 4°C until experimentation and then dehydrated in graded series of ethanol (25-100%). Brains were transferred into absolute butanol and substituted for paraffin in graded series of butanol/Paraffin solutions. Sections of 10µm were realized with a microtom. Sections were deparaffinized in Methylcyclohexan, rehydrated and stained into Hematoxylin pure solution for 30 sec (N°3 Gill Sigma) and rinsed in running tap water. Differentiation was accomplished with a 10 sec incubation in differentiating solution (0.25ml HCl / 70% Ethanol). Slides were immediately rinsed in

running tap water and counterstained in 1% Eosin water (Rhone Alpes Chimie) for 10 sec. Slides were rinsed in tap water and dehydrated in a graded series of ethanol solutions (25 to 100%) and in Methylcyclohexan bath before mounting in Eukitt.

***In situ* hybridization on cryosections.**

Embryos were fixed overnight at 4°C in 4% PAF in 1X PBS until embedding and freezing. Embryos were stocked in PBS solution for only one week. Embryos were transferred in 1X PBS/30% sucrose, cryoprotected in 1X PBS / 15% Sucrose (Sigma S0389) / 7.5% Gelatin (Merck 4078) and frozen at -50°C. Cryosections of 20µm were collected, thaw-mounted on Polylysine coated slides (Microm France). Sections were let to dry 30 min at RT and washed twice with 1xPBS for 5 min. Sections were post-fixed in 4% PAF/1xPBS for 15 min at RT was performed followed by three washes with 1xPBS and 1 hour pre-hybridization at 65°C in pre-hybridization mix (50% Formamide/1xSalt solution 10X (114g NaCl / 12.4g Tris / 7.8g NaH₂PO₄ / 7.1g Na₂HPO₄ / 0.5M EDTA / qsp 1L H₂O DEPC adjust pH to 7.5 with HCl37%)). *Rfx3* mRNA probe was previously described (Bonnafe et al., 2004). *Rfx3* mRNA probe is first heated in hybridization mix at 70°C for 10 min. Hybridization is conducted overnight at 65 °C in moist chamber, in hybridization mix (50% Formamide /1xSalt solution /1mg/ml Dextran sulfate (Sigma D8906) / 1mg/ml YeastRNA / 1X Denhardt) containing at least 200ng/ml of RNA probe. Two washes of 15 min each with wash buffer 1 (50% / Formamide / 1X SSC / 0.1% Tween20) and 30 min at 65°C followed by two washes of 30 min into MABT buffer (23.2g Maleic acid (Sigma) / 17.4g NaCl / 16g NaOH / 0.1% Tween20 / qsp 2L H₂O DEPC adjust pH to 7.5 with HCl 37%)) were performed before blocking into MABT / 2% Blocking reagent (Roche Diagnostics) / 20% SVF for 1 hour at RT. Slides were incubated with an antibody directed against digoxigenin (Roche Diagnostics) at 1/2000 into moist chamber and incubated overnight at 4°C. Sections are rinsed four times with MABT for 20 min each bath. Sections were incubated in NTMT (100mM Tris-HCl pH: 9.5 / 100mM NaCl / 1mM MgCl₂ / 0.1% Tween20) + NBT/BCIP stock solution (1/50) until apparition of staining, in dark chamber at RT. Then sections were fixed for 15 min in 4%PAF and mounted into 1xPBS/50%Glycerol.

Immunocytochemistry.

Brain embryos were dissected and fixed by immersion overnight at 4°C in a solution

containing 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma P6148) in 1XPBS (10xPBS Invitrogen). Brains were cryoprotected in 30% sucrose, and cut in coronal 50 μ m-thick frozen sections for staining. Embryos were rinsed with 1XPBS. Rabbit polyclonal antibodies were: calbindin (1/2500) and calretinin (1/2000) (Swant, Bellinzona, Switzerland); GFAP (DAKO, Carpinteria, CA); TBR1 (1/500) (Chemicon, Temecula, CA) ; EMX1 (1/250) (gift from A. Trembleau) ; RFX3 (1/100) (Reith et al., 1994) and ACIII (1/400) (Santa Cruz). Goat polyclonal antibodies was NP1 (1/300) (R&D System, Minneapolis, Mn). Fluorescence immunostaining: Unspecific binding was blocked by adding 2% normal horse serum during preincubation and incubations in 1X PBS solutions containing 0.3% Triton X-100. The primary antibodies were detected with secondary antibodies coupled with Cy or Alexa (Jackson ImmunoResearch and Molecular Probes; respectively). For RFX3 detection we used an amplification system with secondary anti-rabbit IgG coupled to biotin (1/250) (Jackson Laboratory) and revelation with Streptavidin Fluorophores 547 (Interchim) (1/400). Sections were counterstained with Hoechst 33258 (Molecular Probes), mounted on glass slides and covered in Mowiol 4-88 (Calbiochem, Bad Soden, Germany).

***In situ* hybridization combined with immunocytochemistry.**

Embryonic brains were treated as described on immunocytochemistry procedure and cryosections were performed. To combine *in situ* hybridization with immunocytochemistry, fast Red (Roche) was used as an alkaline phosphatase fluorescent substrate instead of NBT/BCIP solution. Slides were incubated in fast Red (Roche) until apparition of staining, in dark chamber at RT. Then sections were fixed for 15 min in 4% PAF and immunostaining was performed as previously described.

CONCLUSION GENERALE

Cette étude montre que chez les souris *Rfx3*, la formation des structures prosencéphaliques médianes est affectée. En effet, les plexus choroïdes, l'organe sous commissural, la glande pinéale, la commissure postérieure, la commissure hippocampique et le corps calleux sont mal formés. Comme toutes ces structures sont originaires de la ligne médiane dorsale, le défaut de formation de la roof plate retrouvé, chez ces mutants, peut en être à l'origine. Les mutants murins *Gli3* présentent des phénotypes similaires à ceux retrouvés chez les mutants murins *Rfx3*. On peut donc proposer un modèle dans lequel RFX3 agit dans la cascade de signalisation nécessaire à la formation de la roof plate, via GLI3. L'expression de *Gli3* n'est pas affectée par la perte de *Rfx3*. En revanche, il est probable que l'activation de GLI3 dans le cerveau soit perturbée. D'autant plus que son activation nécessite l'intégrité ciliaire et que RFX3 est un régulateur de la ciliogenèse. Afin de prouver cela, l'analyse comparative du taux de GLI3R entre des souris sauvages et mutantes doit être envisagée. Ces données suggèrent donc un nouveau rôle des cils dans la formation de la roof plate du cerveau antérieur.

La roof plate est également indispensable à l'établissement des domaines progéniteurs le long de l'axe dorso-ventral. Comme la formation de ce centre organisateur médian est compromise, chez les mutants *Rfx3*, il est probable que la dorso-ventralisation le soit également. Les défauts de formation de structures cérébrales ventrales : les éminences ganglionnaires et le chiasm optique (annexe 1) peuvent s'expliquer ainsi. L'étude de l'expression génique des marqueurs du pallium et du sous pallium permettra de caractériser l'existence d'un défaut de dorso-ventralisation. Toutefois, comme *Rfx3* est exprimé en région ventrale du cerveau, il n'est pas exclu que l'atteinte des structures ventrales soit due à la perte de RFX3 dans ces territoires.

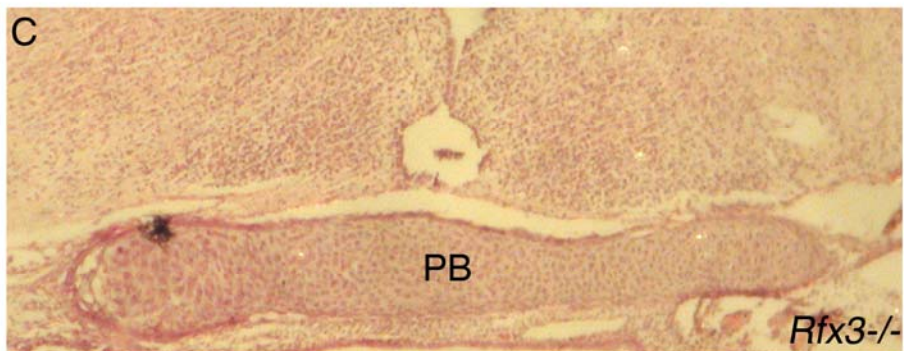
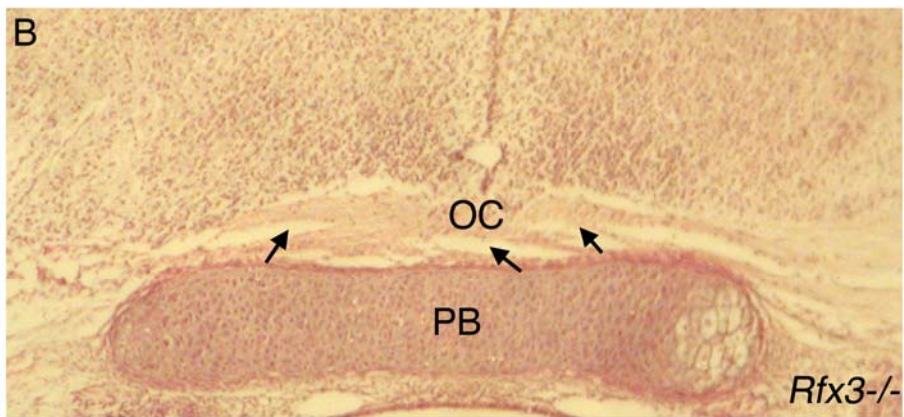
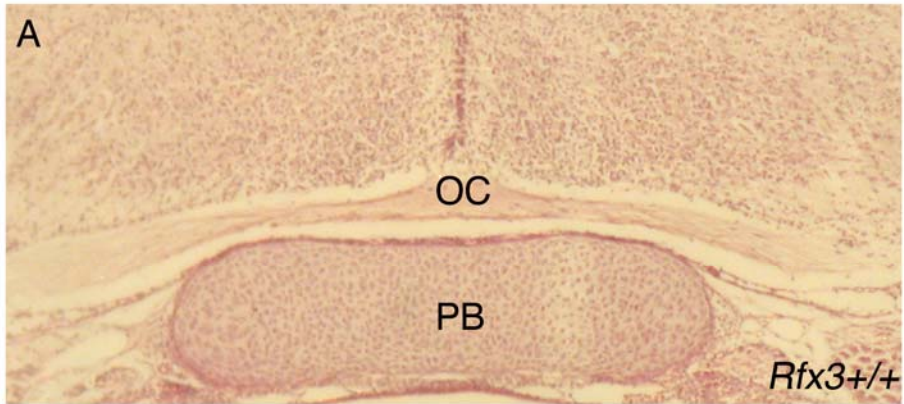
La perte de la roof plate, dans les cas les plus sévères, conduit à l'apparition d'un phénotype d'holoprosencéphalie. L'holoprosencéphalie, au sein d'une même famille, se manifeste sous différentes formes allant de la perte de la scission du télencéphale en deux hémisphères cérébraux à aucunes manifestations cliniques. Donc des patients peuvent présenter des phénotypes associés à l'holoprosencéphalie comme l'hypoplasie du corps calleux avec une formation des hémisphères cérébraux normale. Ici, nous avons montré que malgré le défaut de formation de la roof plate chez les embryons murins, on

n'observait jamais d'holoprosencéphalie. D'après certaines évidences comme la similitude des profils d'expression de *Rfx3* et de *Rfx4* dans le cerveau antérieur, la ressemblance des phénotypes retrouvés entre les mutants *Rfx3*^{-/-} et *Rfx4*^{+/-} ainsi que l'holoprosencéphalie des mutants *Rfx4*^{-/-}, nous proposons que l'atteinte cérébrale des mutants *Rfx3* serait une forme modérée d'holoprosencéphalie. Confortant notre hypothèse, chez deux mutants *Rfx3* (embryons à E13.5 et à E14.5 issus de croisement de souris SV129 et C57bl/6), nous avons observé l'absence de formation des bulbes olfactifs, phénotype classiquement associé à l'holoprosencéphalie (annexe 2). Il n'est pas exclu que ce phénotype ne soit pas dû à la perte de RFX3, car sur l'observation de centaines d'embryons durant mon doctorat, seulement 2 embryons présentent cette atteinte. Mais l'aggravation du phénotype cérébral, avec notamment l'apparition d'un phénotype d'holoprosencéphalie associé à la perte des bulbes olfactifs, chez des mutants *Rfx3*, permettrait de prouver notre hypothèse. Si comme on le pense, RFX3 et RFX4 coopèrent pour former la roof plate, les souris *Rfx3*^{-/-} où une copie du gène *Rfx4* est inactivée devraient présenter ce phénotype.

Les données obtenues au cours de ce doctorat, soutiennent l'hypothèse que RFX3 est nécessaire à l'établissement des structures prosencéphaliques médianes, via la formation de la roof plate. Ce qui suggère un rôle précoce de RFX3 dans la morphogenèse cérébrale. Mais la présence de RFX3 dans les différentes structures cérébrales au cours de leur formation, comme c'est le cas dans les plexus choroïdes, l'organe sous commissural, ou encore dans les cellules cortico-septales nécessaires à la génèse callosale y suppose également un rôle de RFX3. L'analyse des mutants *Rfx3*, révèle que les différentes populations peuplant la région cortico-septale sont bien présentes. En revanche, ces populations sont mal localisées et forment des agrégats cellulaires. Cette localisation anormale n'est pas due au passage des axones callosaux mais est à priori due à un défaut de migration de ces cellules. Dans cette étude, nous avons montré que ces cellules sont ciliées. Et comme les cils sont impliqués dans la migration cellulaire, il est probable qu'une atteinte ciliaire, chez les mutants *Rfx3*, soit à l'origine de cette migration anormale. De plus, l'apparition des agrégats cellulaires chez ces mutants suggère un défaut d'agencement des cellules les unes par rapport aux autres. Comme les cils sont impliqués dans la mise en place de la polarité planaire cellulaire, dans la cochlée, il est possible qu'une atteinte ciliaire perturbe également l'organisation des cellules cortico-septales et donc la formation du corps calleux. Les analyses des cils et de la mise en place de la polarité planaire des

cellules cortico-septales, chez des mutants *Rfx3*, sont à envisager afin de compléter cette étude. La poursuite de ces travaux est indispensable pour comprendre l'origine de l'accallosalité retrouvée en cas d'atteinte ciliaire et permettra de progresser dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des ciliopathies.

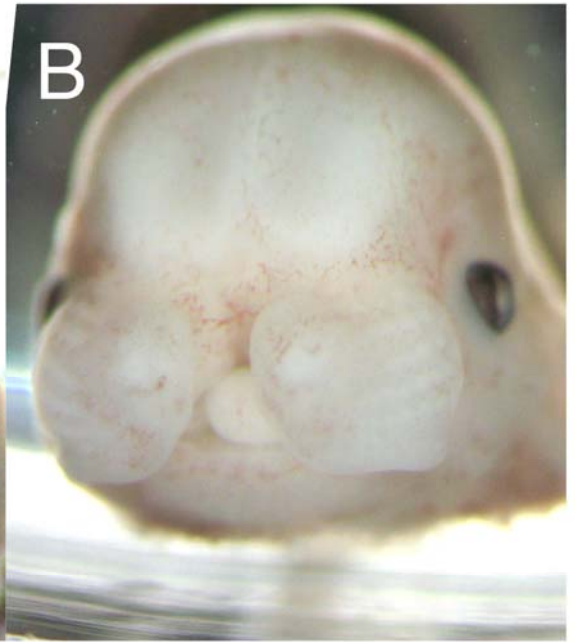
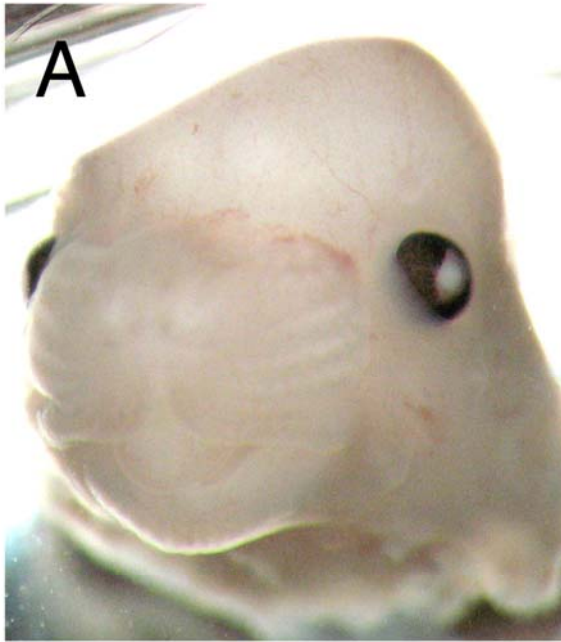
ANNEXES



Annexe 1

Chiasm Optic

Au cours de mon doctorat, je me suis surtout focalisée sur les défauts des structures cérébrales dorsales, or chez les mutants *Rfx3*, j'ai également mis en évidence un défaut de formation d'une structure ventrale le Chiasm Optic. En effet, chez certains mutants *Rfx3* les nerfs optiques qui se croisent au niveau du chiasm optic fasciculent mal (flèches ; N=3/6) (B), et chez d'autres on observe une réduction voire une perte des nerfs optiques et donc du chiasm (N=3/6) (C) en comparaison avec la situation sauvage (A). L'origine de cette atteinte cérébrale ventrale n'a pas encore été caractérisée. Un des phénotypes retrouvés en cas d'holoprosencéphalie est la cyclopie (fusion des yeux, donc pas de séparation du champ visuel), comme on vient de le voir les mutants *Rfx3* présentent plusieurs traits caractéristiques d'holoprosencéphalie et notamment un défaut de formation des éminences ganglionnaires, soit des territoires ventraux, pouvant expliquer l'origine de cette agénésie du chiasm.



Annexe 2

Bulbes olfactifs

De manière intéressante, deux mutants *Rfx3* présentaient également une dysgénésie des bulbes olfactifs (B) (l'un disséqué à E13.5 et l'autre à E14.5) par rapport au cas sauvage (A). Ce phénotype est également retrouvé en cas d'holoprosencéphalie, appuyant notre hypothèse que les mutants *Rfx3* présentent une forme modérée d'holoprosencéphalie. Mais il est surprenant que sur plusieurs centaines d'embryons disséqués au cours de mon doctorat, seulement deux mutants (issus de croisement à fond génétique mixte (SV129 et C57Bl6)) présentent ce phénotype, on peut donc se demander si ce défaut est un phénotype additionnel qui est non lié à la mutation dans le gène *Rfx3*.

Annexe 3 :

Notre équipe collabore étroitement avec une équipe Genevoise dirigée par W. Reith. J'ai été amenée à leur fournir des pancréas disséqués de souris *Rfx3* à différents stades embryonnaires et post-natal, afin qu'ils puissent mener leur expérimentations à bien, car ils manquaient d'animaux. Cette collaboration m'a permise de faire partie des co-auteurs de la publication qui en a découlé. J'ai donc joint à mon manuscrit un exemplaire de cet article.

Novel Function of the Ciliogenic Transcription Factor RFX3 in Development of the Endocrine Pancreas

Aouatef Ait-Lounis,¹ Dominique Baas,^{2,3} Emmanuèle Barras,¹ Carine Benadiba,² Anne Charollais,⁴ Rachel Nlend Nlend,⁴ Delphine Liègeois,⁴ Paolo Meda,⁴ Bénédicte Durand,² and Walter Reith¹

The transcription factor regulatory factor X (RFX)-3 regulates the expression of genes required for the growth and function of cilia. We show here that mouse RFX3 is expressed in developing and mature pancreatic endocrine cells during embryogenesis and in adults. RFX3 expression already is evident in early Ngn3-positive progenitors and is maintained in all major pancreatic endocrine cell lineages throughout their development. Primary cilia of hitherto unknown function present on these cells consequently are reduced in number and severely stunted in *Rfx3*^{-/-} mice. This ciliary abnormality is associated with a developmental defect leading to a uniquely altered cellular composition of the islets of Langerhans. Just before birth, *Rfx3*^{-/-} islets contain considerably less insulin-, glucagon-, and ghrelin-producing cells, whereas pancreatic polypeptide-positive cells are markedly increased in number. In adult mice, the defect leads to small and disorganized islets, reduced insulin production, and impaired glucose tolerance. These findings suggest that RFX3 participates in the mechanisms that govern pancreatic endocrine cell differentiation and that the presence of primary cilia on islet cells may play a key role in this process. *Diabetes* 56:950–959, 2007

Transcription factors belonging to the regulatory factor X (RFX) family are conserved in a wide range of species, including *S. cerevisiae*, *S. pompe*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, and mammals (1). They share a characteristic DNA-binding domain related to the winged-helix DNA-binding motif (2). Five RFX factors (RFX1 to RFX5) have been identified in humans and mice (1,3–6). It has been well established that RFX5 is a critical regulatory factor in the immune system (4,5). In contrast, clues concerning the in vivo functions of

RFX1 to RFX4 have emerged only recently (7,8). The generation of *Rfx3* knockout mice demonstrated that RFX3 plays a key role in controlling the expression of genes required for the formation of cilia (7). The orthologous factors DAF19 and dRFX also are essential for the expression of genes implicated in the formation, maintenance, and/or function of cilia in *C. elegans* and *D. melanogaster* (9,10). Regulation of cilia-related genes, thus, is an evolutionarily conserved function of RFX factors.

Cilia are cell surface protrusions that extend from a centriole-derived microtubule-organizing center called the basal body (11,12). The growth and maintenance of cilia is dependent on the bidirectional transport of proteins along their microtubular axoneme by a process called intraflagellar transport (IFT) (11,12). There are three structurally and functionally distinct types of cilia in mammals: nodal cilia, motile cilia, and primary cilia. Nodal cilia are found on cells of the embryonic node and play essential roles in establishing the left-right body axis (13). RFX3-deficient mice exhibit impaired growth of nodal cilia and consequently have frequent left-right asymmetry defects leading to embryonic lethality and situs inversus in the rare viable adults (7). Motile cilia are abundant on epithelial cells of the respiratory and reproductive tracts and ependymal cells of the brain, where they are involved in mucociliary clearance, the transport of gametes, and the movement of cerebrospinal fluid. Hydrocephalus, resulting from defects in specialized ependymal cells associated with alterations in the number of cilia, is a second characteristic of *Rfx3*^{-/-} mice (14).

Primary cilia are solitary immotile organelles present on cells in many tissues (11). Their functions remain largely unknown, although there is growing evidence that they serve as sensory organelles involved in various biological processes (11,15). Immotile cilia situated in the embryonic node and primary cilia on renal epithelial cells elicit intracellular calcium mobilization in response to extracellular fluid flow (16,17). Primary cilia also are essential components of the vertebrate hedgehog (Hh) signal transduction pathway (18–20). Accordingly, mice carrying mutations in genes involved in IFT (*Ift172*, *Ift88*, *Kif3a*, *Dnchc2*, and *Dync2li1*) exhibit developmental phenotypes characteristic of severe defects in Hh signaling (21–23). Mutations in genes encoding cilia- or basal-body-related proteins are associated with human polycystic kidney diseases, nephronophthisis, and the Bardet-Biedl syndrome (11,15). Many pathological features of these diseases are reproduced in animal models in which genes coding for cilia-related proteins are mutated (24–27). Although the kidney is the major tissue affected in these

From the ¹Department of Pathology and Immunology, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland; the ²Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Université Claude Bernard, Villeurbanne, France; the ³Equipe Différenciation Neuromusculaire, Lyon, France; and the ⁴Department of Cell Physiology and Metabolism, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland.

Address correspondence and reprint requests to Walter Reith, Department of Pathology and Immunology, University of Geneva Medical School, 1 Rue Michel-Servet, CH-1211, Geneva, Switzerland. E-mail: walter.reith@medecine.unige.ch.

Received for publication 25 August 2006 and accepted in revised form 5 January 2007.

Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 17 January 2007. DOI: 10.2337/db06-1187.

Additional information for this article can be found in an online appendix at <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1187>.

dpc, day postcoitum; Hh, hedgehog; IFT, intraflagellar transport; PP, pancreatic polypeptide; RFX, regulatory factor X.

© 2007 by the American Diabetes Association.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

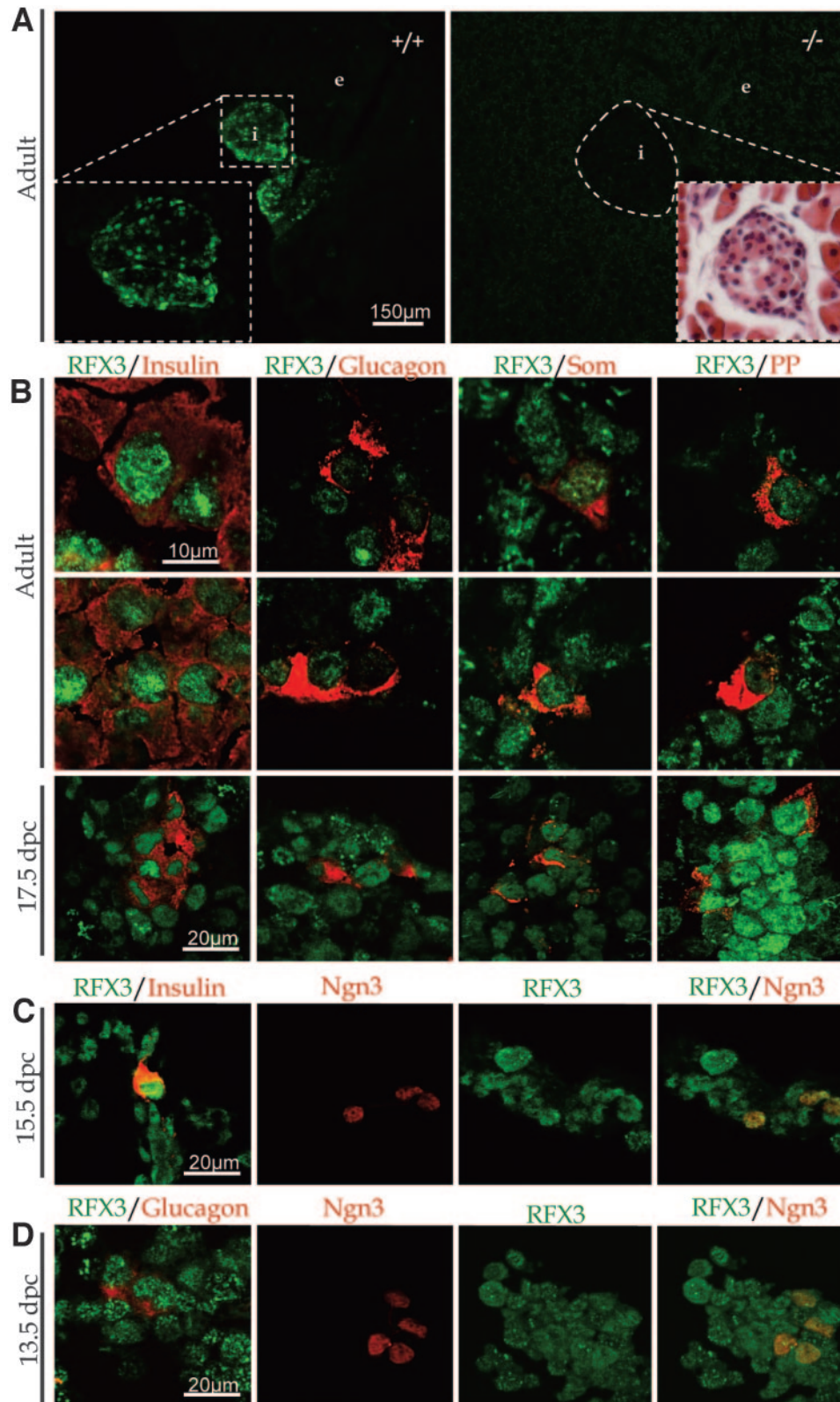


FIG. 1. RFX3 is expressed in pancreatic endocrine cells throughout their development. Pancreas sections from wild-type adult mice (*A* and *B*) and embryos at stages dpc 17.5 (*B*), dpc 15.5 (*C*), and dpc 13.5 (*D*) were stained with RFX3-specific antibodies (*A–D*) and antibodies against insulin, glucagon, somatostatin (Som), PP, or Ngn3 (*B–D*). RFX3 is concentrated in the nuclei of the islet cells (*A*, left inset). Specificity of the RFX3 antibody is demonstrated by the absence of specific staining in the islets of *Rfx3*^{-/-} mice (*A*, right panel). Islets were visualized by means of hematoxylin/eosin staining (*A*, dashed contour and right inset). Only weak nonspecific staining is observed in the exocrine pancreas (compare *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} in *A*). For costaining of nuclei with RFX3- and Ngn3-specific antibodies, both the separate and merged images are shown (*C* and *D*). For costaining with RFX3- and the hormone-specific antibodies, only the merged images are shown (*B–D*). e, exocrine pancreas; i, islets.

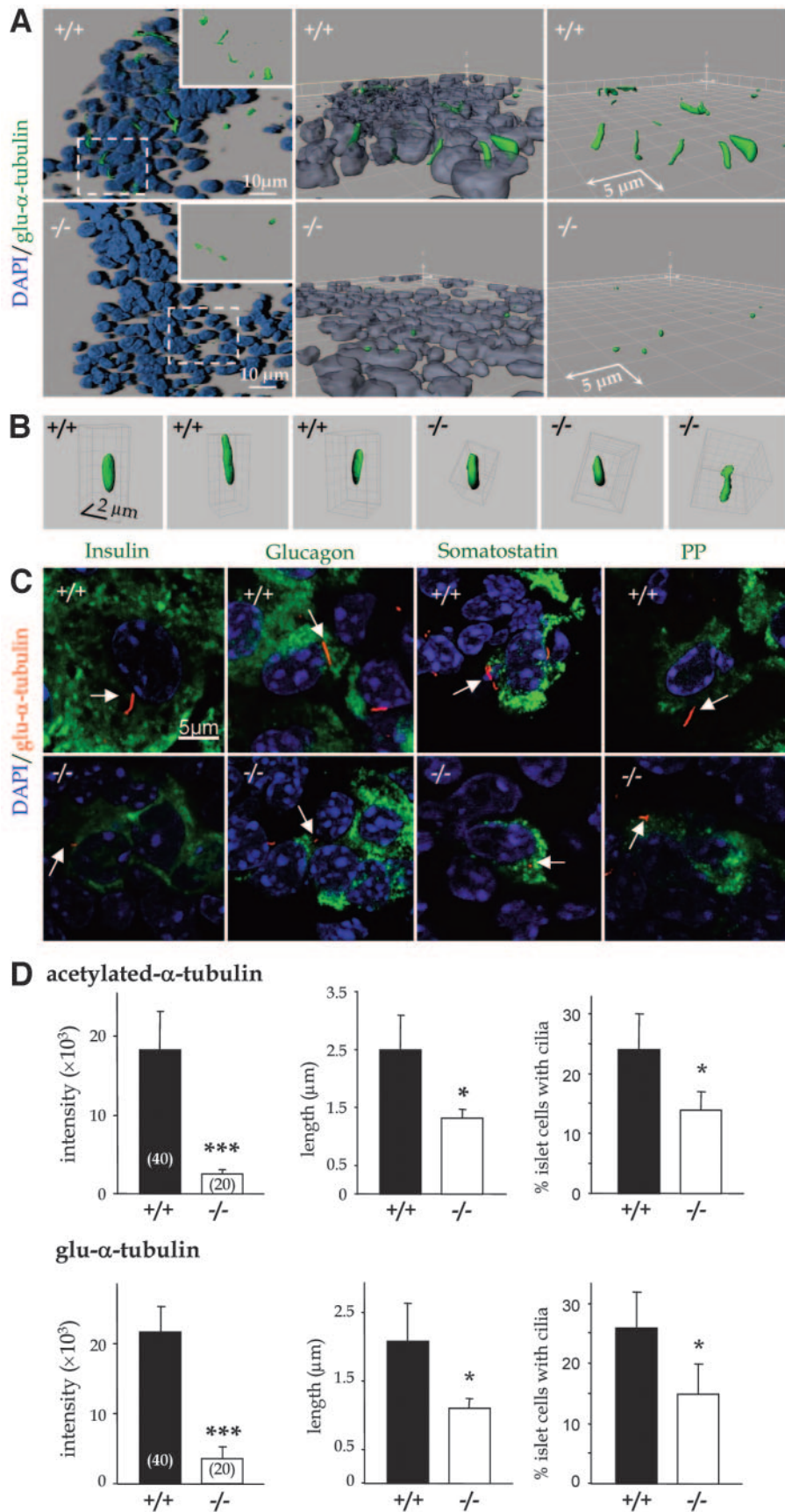


FIG. 2. Cilia are severely stunted in the islets of *Rfx3*-deficient mice. **A:** Cilia (green) were visualized in pancreas sections from dpc 19 *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} littermates using an antibody against detyrosinated- α -tubulin (glu- α -tubulin). Nuclei were stained with DAPI (blue). Composite images of all Z-stack planes are shown in the *left panels*. Insets show the boxed areas after removal of the DAPI staining. Three-dimensional reconstructions of the boxed areas are shown with and without DAPI staining in the *middle and right panels*, respectively. **B:** Three-dimensional

diseases and animal models, the pathology frequently extends to other systems, particularly the liver and pancreas, suggesting that primary cilia play key roles in these organs as well (11,27–30).

Here, we show that RFX3 is specifically expressed in early endocrine cell progenitors as well as in all major endocrine cell lineages in the pancreas of mouse embryos and adults. Cilia on pancreatic endocrine cells consequently are reduced in number and severely stunted in *Rfx3*^{-/-} mice. This ciliary abnormality is associated with a developmental defect that leads to an altered cellular composition of the islets of Langerhans. These results demonstrate that RFX3 is required for the development of pancreatic endocrine cells, raising the intriguing possibility that primary cilia may be implicated in this process.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

All experiments were performed with littermates from crosses between *Rfx3*^{+/-} mice. Adult mice were 8–14 weeks old. The stage of embryos was estimated from the gestational time, with day 0.5 being defined as the morning when a vaginal plug was detected. Adult mice and embryos were genotyped by PCR (7). Animal experimentation was performed with the permission of the federal and cantonal veterinary authorities.

Glucose tolerance tests. Mice were given intraperitoneal injections of 15% glucose (1.5 mg glucose/g body wt) after a 16-h overnight fast. Blood was collected from tail bleedings, and glucose concentrations were measured using ACCU-CHEK Active (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN).

Hormone quantification. Pancreatic tissue was homogenized in ice-cold 0.18 N HCl and 70% EtOH, incubated overnight at 4°C, and centrifuged at 16,000g for 5 min, and supernatants were stored at -20°C. Insulin concentrations were determined by radioimmunoassay, as described (31), using ¹²⁵I-labeled porcine insulin (SB-INS I-1; Sorin Biomedica, Saluggia, Italy) as tracer and rat insulin as standard. Glucagon and pancreatic polypeptide (PP) contents were determined using radioimmunoassay kits from Linco Research (St. Charles, MO). Somatostatin contents were determined using a radioimmunoassay kit from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA).

Histology and immunofluorescence. Tissues were fixed in Bouin's solution and processed by standard procedures for hematoxylin/eosin staining and immunofluorescence labeling (32). Paraffin sections were washed in xylene and rehydrated with a series of ethanol washes. Frozen sections were prepared by standard methods. For ghrelin staining, slides were boiled for 15 min in 10 mmol/l citric acid (pH 6.0) and cooled for 10 min at room temperature. Slides were washed in PBS and blocked with PBS and 2% BSA for 30 min at room temperature. Primary antibodies were diluted in PBS, 0.1% BSA, 0.2% Triton X-100 (PBT) and incubated with the sections for 1 h at room temperature (insulin, glucagon, somatostatin, and PP antibodies) or overnight at 4°C (ghrelin, RFX3, detyrosinated, and acetylated α -tubulin antibodies). Sections were washed in PBS, incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies diluted in PBT, and washed in PBS. The antibodies and dilutions used are indicated in online appendix Table 1 (available at <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1187>). β -Cell apoptosis and proliferation were measured for three mice of each genotype using a transferase-mediated dUPT nick-end labeling assay (Roche Diagnostics) and staining with antibodies against phospho-histone H3. For each parameter, 30–40 positive cells were scored.

Morphometry. A total of 5- to 6- μ m-thick pancreas sections spaced 200 μ m apart were stained and visualized using an Axiophot I (Carl Zeiss Micro-Imaging, Zürich, Switzerland). Photographs were taken with $\times 4$ (for measuring pancreas area), $\times 16$ (for measuring islet area), or $\times 40$ (for measuring endocrine cell area) objectives. Measurements were performed on 15–25 islets per section and on three to four sections covering the entire pancreas of each mouse. The total areas occupied by islets and specific endocrine cell populations were measured using Metamorph v6.2 software (Universal Imaging, Downingtown, PA). Volume densities (V_v) were obtained by expressing the areas occupied by hormone-positive cells as a percentage of total islet area. The fraction of islets occupied by hormone-positive cells in day postcoitum (dpc) 19 embryos is <100% (Fig. 6) because islets contain immature endocrine

cells and other cell types and compartments not visualized in our analysis, notably endothelial cells and blood vessels.

Analysis of cilia. Immunofluorescence images of cilia stained with detyrosinated or acetylated α -tubulin were acquired in 10–20 Z-stack slices using a LSM510 Meta confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The Z-stack images were merged using Metamorph software to obtain composite images that were used to measure the number, fluorescence intensity, and length of cilia. The number of cilia was quantified relative to the number of DAPI-stained nuclei. The fluorescence intensity per cilium was calculated as the sum of values across the entire depth of the Z-stack. This intensity is directly proportional to ciliary length, independently of the orientation of the cilia relative to the confocal plane. Direct measurements of ciliary length on the composite images underestimate the length of cilia because they do not take into account the orientation of the cilia relative to the confocal plane. Three-dimensional depictions of cilia were reconstructed using IMARIS software (Bitplane) and rotated in all orientations to ensure that single cilia were visualized. To determine which endocrine cell types carry cilia, sections were costained with antibodies against insulin, glucagon, somatostatin, or PP.

Quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA was synthesized from 1 μ g RNA using random hexamer primers and Superscript II (Invitrogen). PCR was performed using the iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Philadelphia, PA) and iQ SYBR green Supermix (Bio-Rad). Results were quantified relative to a standard curve generated with serial dilutions of a reference cDNA preparation and normalized using TATA-binding protein mRNA. All experiments were repeated at least three times. Primers are provided in online appendix Table 2. **Statistical analysis.** Statistical significance was evaluated using a *t* test for independent samples, one-way ANOVA followed by posttest comparisons, and the Kolmogorov-Smirnov or median nonparametric tests. *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

RFX3 expression in the pancreas is restricted to endocrine cells. Immunostaining of pancreas sections from adult mice demonstrated that RFX3 expression is restricted to the islets of Langerhans (Fig. 1A). Islet-specific RFX3 expression also was observed in embryos at dpc 19 (data not shown). As expected, RFX3 was localized in the nucleus of islet cells (Fig. 1A). Specificity was demonstrated by the absence of labeling in the islets of *Rfx3*^{-/-} mice (Fig. 1A). Costaining with antibodies against insulin, glucagon, somatostatin, or PP demonstrated that all four major endocrine cell types express RFX3 (Fig. 1B).

We next examined RFX3 expression in the pancreas at various developmental stages. As of dpc 17.5, all four endocrine cell types express RFX3 (Fig. 1B). Insulin- and glucagon-positive cells, which appear before cells producing somatostatin and PP, are already positive at earlier stages. Thus, insulin-positive cells that have developed by dpc 15.5 already express RFX3 (Fig. 1C). Similarly, RFX3 is expressed in glucagon-positive cells that have appeared by dpc 13.5 (Fig. 1D). Finally, in dpc 13.5 and 15.5 embryos, RFX3 is expressed in cells that express Ngn3, which is the earliest known marker of endocrine progenitor cells (Fig. 1C and D). RFX3 thus is expressed throughout the development of the four major pancreatic endocrine cell lineages.

Cilia are defective on islet cells of *Rfx3*^{-/-} mice. Islet cells carry primary cilia (33). We examined these cilia in *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} dpc 19 embryos by staining pancreas sections with antibodies against cilia-specific tubulin isoforms (Fig. 2). Cilia are readily detectable in the islets of wild-type embryos (Fig. 2A). In agreement with the expres-

images of cilia found in the pancreatic ducts of *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} littermates were generated as in A. C: Pancreas sections from *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} dpc 19 embryos were costained with antibodies specific for glu- α -tubulin (red) and antibodies against insulin, glucagon, somatostatin, and PP (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). D: The staining intensity, length, and numerical density of cilia were quantified in composite Z-stack images of pancreas sections from *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} littermates stained with antibodies against acetylated α -tubulin (top) or glu- α -tubulin (bottom). The means \pm SE are shown. Numbers of cilia measured are indicated. Identical results were obtained for at least three mice of each genotype. **P* < 0.05; ****P* < 0.0001.

sion pattern of RFX3 (Fig. 1), these cilia are found on cells that express insulin, glucagon, somatostatin, and PP (Fig. 2C). Cilia were evident on only a fraction of the cells (Fig. 2D). This fraction is likely to be underestimated because the average diameter of the endocrine cells exceeds the thickness of the sections (5–6 μm).

The number of cilia was reduced by >40% in the islets of *Rfx3*^{-/-} mice compared with control littermates (Fig. 2D). The cilia remaining in the mutant mice were severely stunted (Fig. 2A, C, and D). The stunted cilia are retained on all four types of endocrine cells (Fig. 2C). Measurements made by two approaches demonstrated that cilia were up to fivefold shorter in the islets of *Rfx3*^{-/-} embryos (Fig. 2D). In contrast, no alteration in length was observed for cilia found in the exocrine ducts of *Rfx3*^{-/-} mice (Fig. 2B), where RFX3 is not expressed.

We next examined the expression of *Ift88* and *Dync2li1*, two RFX target genes coding for proteins implicated in IFT (23–25,34,35). Both genes contain well-conserved RFX binding sites in their upstream regions (Fig. 3B). *Ift88* and *Dync2li1* mRNA expression was significantly reduced in the pancreas of dpc 19 *Rfx3*^{-/-} embryos (Fig. 3A). No change was observed for the expression of two control IFT genes, *Kif3a* and *Ift172* (Fig. 3A).

Insulin production and secretion is defective in adult *Rfx3*^{-/-} mice. Blood glucose homeostasis was examined in adult *Rfx3*^{-/-} mice. After fasting, *Rfx3*^{-/-} mice had slightly higher basal blood glucose levels than control littermates (Fig. 4A). Moreover, they showed a greater increase in blood glucose levels and a marked delay in the return to baseline values after glucose injection (Fig. 4B).

This impaired glucose tolerance prompted us to assess insulin production and secretion by pancreatic β-cells. Compared with wild-type littermates, the total pancreatic insulin content was threefold lower in adult *Rfx3*^{-/-} mice (Fig. 4C). A reduction in insulin secretion also was observed in response to perfusion of the pancreas with glucose (data not shown). The reductions in insulin content and secretion were highly significant despite the small number of viable adult *Rfx3*^{-/-} mice that were available for these studies.

Islets are small and disorganized in adult *Rfx3*^{-/-} mice. To determine whether the defects in insulin synthesis and secretion were associated with alterations of the islets, we examined pancreas sections stained with antibodies specific for insulin (Fig. 4F). The average size of islets was reduced by ~50% in *Rfx3*^{-/-} mice (Fig. 4D and E). The mutant islets also were disorganized with respect to the relative localization of α- and β-cells (online appendix Fig. 1). In agreement with the islet-specific expression pattern of RFX3, no defect was observed in the exocrine pancreas of *Rfx3*^{-/-} mice (data not shown).

Hormone synthesis is altered in the pancreas of *Rfx3*^{-/-} embryos. Most *Rfx3*^{-/-} mice die in utero and at birth from defects in left-right body patterning (7). We therefore continued our analysis with dpc 19 embryos, because ~25% of the *Rfx3*^{-/-} embryos survive until this stage (7). Pancreatic insulin and glucagon contents were reduced 10- to 15-fold in *Rfx3*^{-/-} embryos (Fig. 5A). In sharp contrast, the PP content was increased 15-fold (Fig. 5A). No significant change was evident for somatostatin (Fig. 5A).

We next quantified the abundance of insulin, glucagon, somatostatin, ghrelin, and PP mRNAs in the pancreases of dpc 19 embryos (Fig. 5B). Insulin 1, insulin 2, and glucagon mRNA levels were reduced ~10-fold in *Rfx3*^{-/-} embryos.

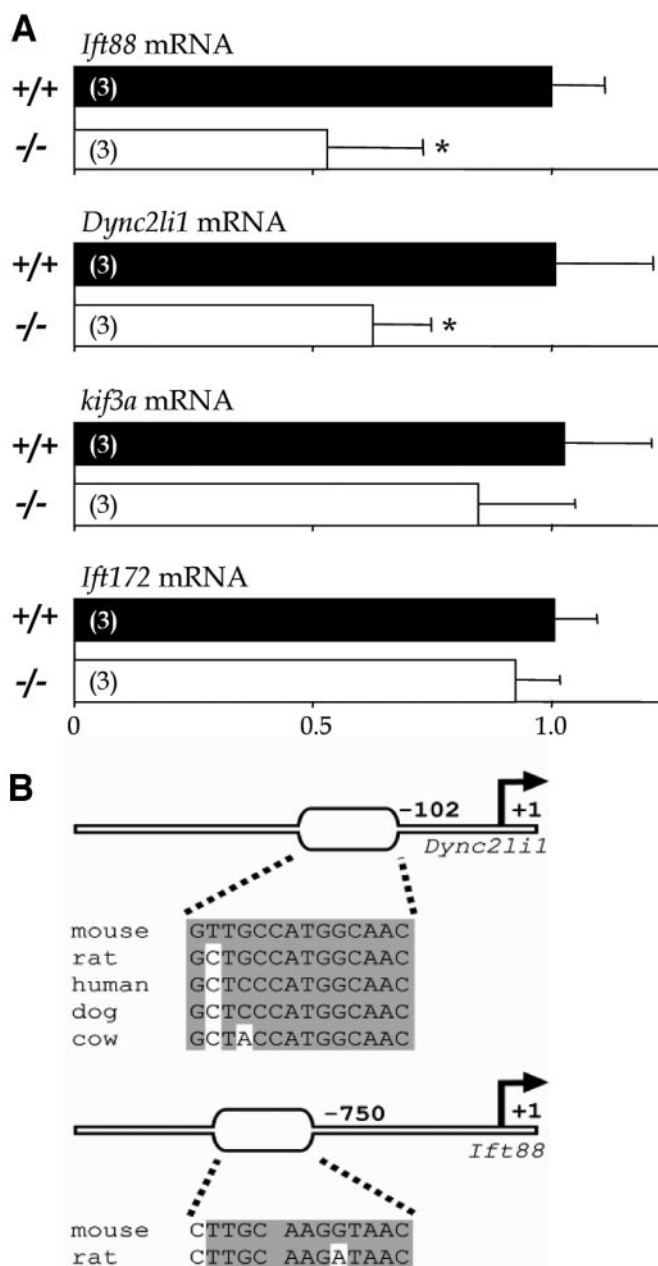


FIG. 3. The expression of RFX3 target genes is reduced in dpc 19 *Rfx3*-deficient embryos. **A:** *Dync2li1*, *Ift88*, *Kif3a*, and *Ift172* mRNAs were quantified in the pancreases of *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} littermates. Values were normalized with respect to TATA-binding protein mRNA and expressed relative to *Rfx3*^{+/+}. The means ± SE are shown. Numbers of mice analyzed are indicated. **P* < 0.05. **B:** Putative RFX3 binding sites in the *Dync2li1* and *Ift88* genes are conserved in all vertebrate species for which the sequences are available. Shading indicates identity with the consensus RFX-binding site (GTNRCCNRR-GYAAC).

A dramatic 150-fold reduction was observed for ghrelin mRNA. In contrast, PP mRNA abundance was increased over sixfold. No change was observed for somatostatin mRNA.

Islet cell development is defective in *Rfx3*^{-/-} embryos. Morphometric analysis revealed that the volume density of islets was decreased by 30% in dpc 19 *Rfx3*^{-/-} embryos (online appendix Fig. 2), although the overall size of islets was largely unaffected (Fig. 6A). The reduction in volume density is attributed to a preferential decrease in the number of small islets (online appendix Fig. 2). This

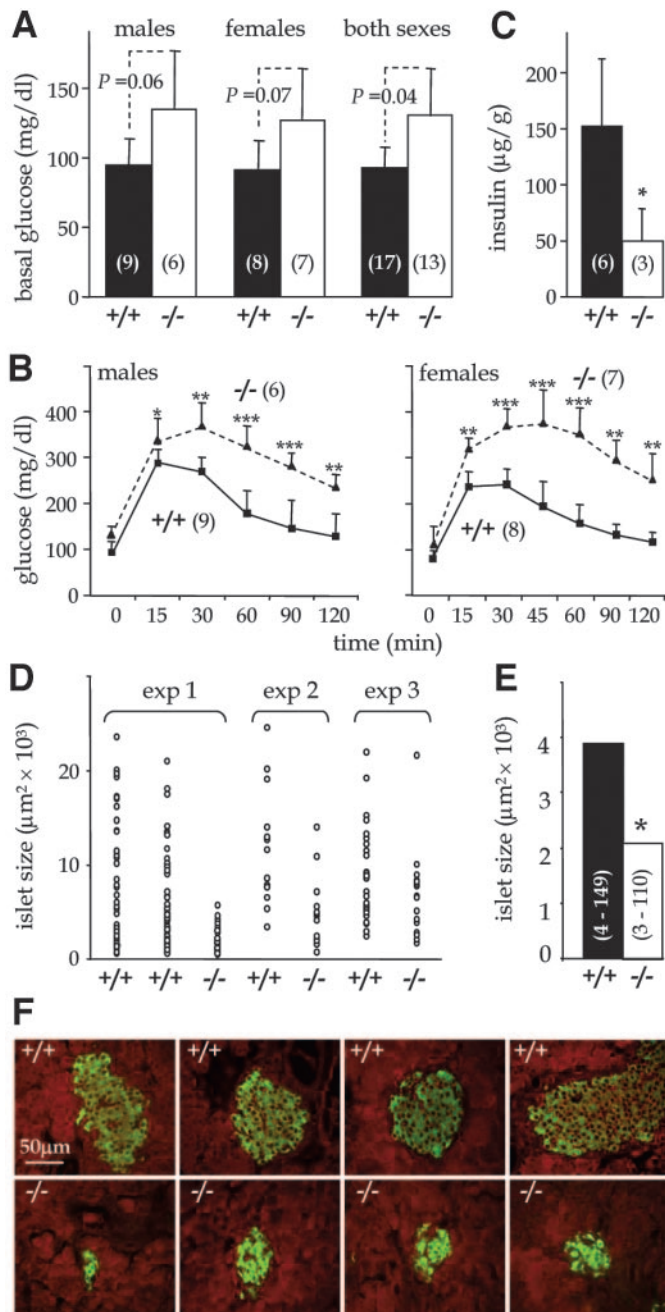


FIG. 4. Adult *Rfx3*-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance, reduced insulin production, and a reduction in islet size. **A:** Basal blood glucose levels were measured in *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} mice after an overnight fast. **B:** Blood glucose concentrations were measured in *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} mice at the indicated times after an intraperitoneal injection of glucose. **C:** Total pancreatic insulin contents were measured in *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} mice. **D:** Scattergram of islet size measured in pancreas sections of adult *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} littermates. Points correspond to individual islets. Three separate experiments are shown. **E:** The median is shown for islet size measurements made in *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} littermates. The numbers of mice and islets analyzed are indicated. **F:** Representative insulin-stained islets from experiment 1 are shown. The means \pm SE are shown. The numbers of mice analyzed are indicated. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

could not be attributed to a reduced rate of proliferation or to an increase in apoptosis of β -cells (data not shown, see RESEARCH DESIGN AND METHODS). No abnormality was detected in the exocrine pancreas of *Rfx3*^{-/-} embryos (data not shown).

Immunostained pancreas sections from dpc 19 embryos

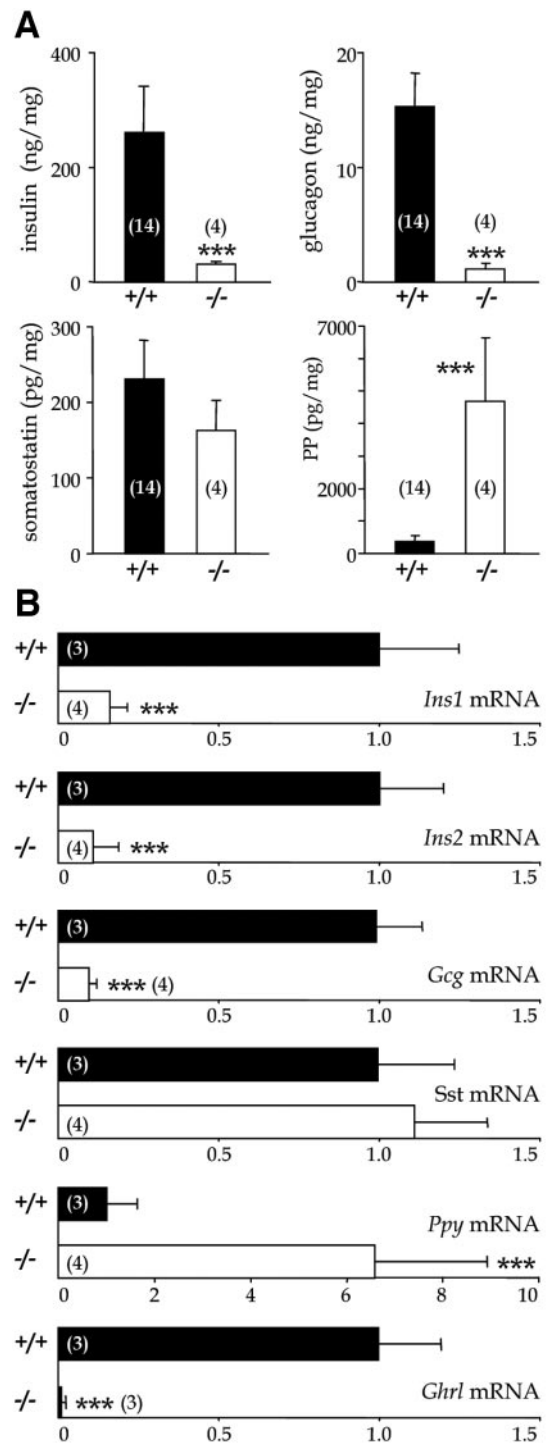


FIG. 5. Pancreatic hormone production is altered in dpc 19 *Rfx3*-deficient embryos. **A:** Pancreatic insulin, glucagon, somatostatin, and PP contents were measured in *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} littermates. **B:** Insulin 1 (*Ins1*), insulin 2 (*Ins2*), glucagon (*Gcg*), somatostatin (*Sst*), PP (*Ppy*), and ghrelin (*Ghrl*) mRNAs were measured in the pancreases of *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} littermates. Values were normalized with respect to TATA-binding protein mRNA and expressed relative to *Rfx3*^{+/+}. The means \pm SE are shown. Numbers of mice analyzed are indicated. *** $P < 0.0001$.

revealed the presence of cells expressing insulin (β -cells), glucagon (α -cells), somatostatin (δ -cells), PP, and ghrelin in the islets of both *Rfx3*^{+/+} and *Rfx3*^{-/-} littermates, although their numbers clearly were different between the control and mutant mice (Fig. 6A). Morphometric analysis

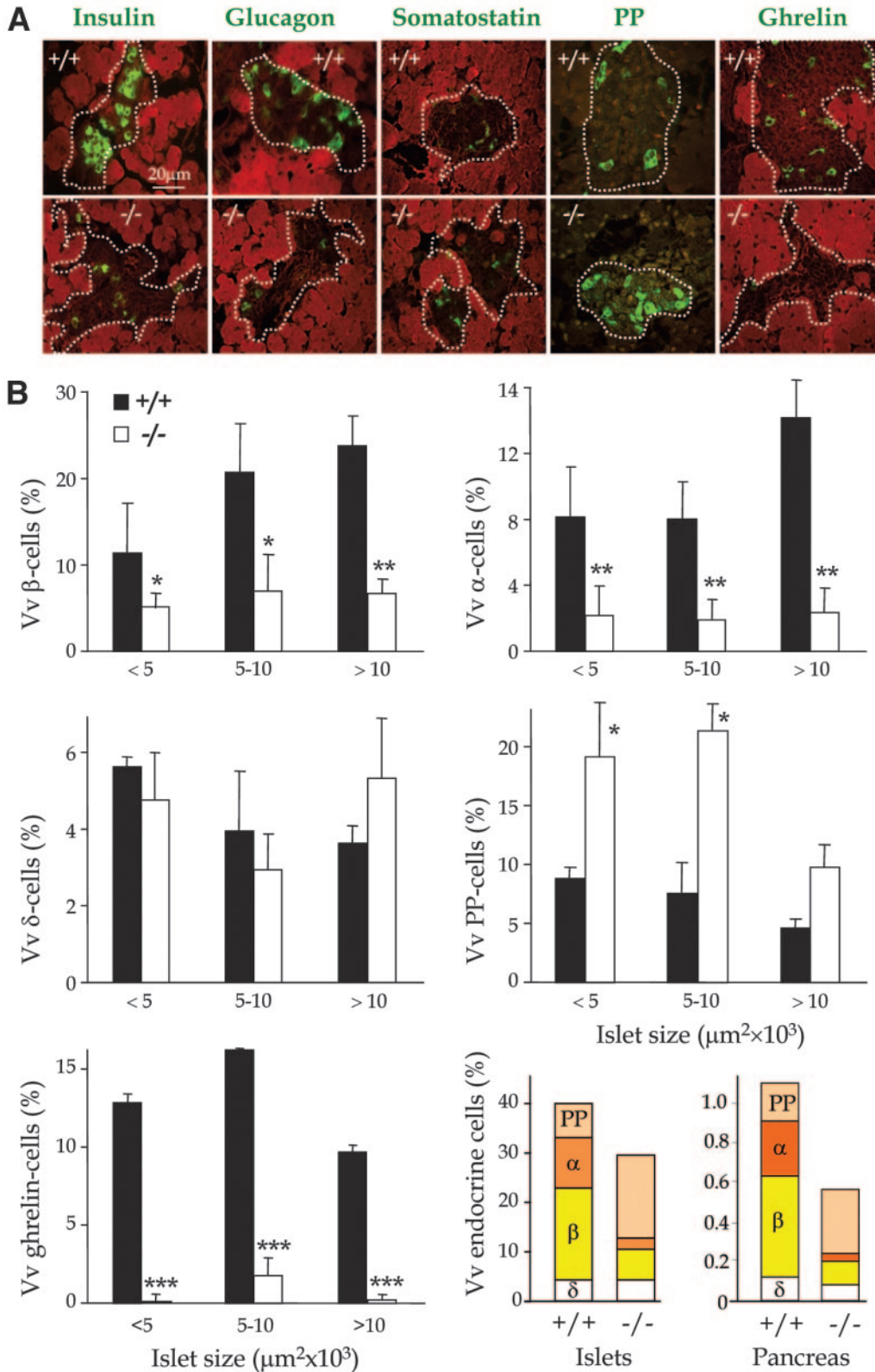


FIG. 6. The endocrine cell composition of pancreatic islets is altered in dpc 19 *Rfx3*-deficient embryos. **A:** Representative views of pancreas sections from wild-type ($+/+$) and *Rfx3*-deficient ($-/-$) littermates, stained with antibodies against insulin, glucagon, somatostatin, PP, and ghrelin. Islets are outlined by a dotted line. **B:** The volume densities (V_v) of insulin-positive β -cells, glucagon-positive α -cells, somatostatin-positive δ -cells, PP-positive cells, ghrelin-positive cells, and the sum of all hormone-positive cells were quantified in the islets of *Rfx3* $^{+/+}$ and *Rfx3* $^{-/-}$ embryos. For each hormone-positive cell type, the results are represented as the percentage of total islet volume (set at 100%) and provided separately for islets of different sizes. The means \pm SE are shown. Five to eight mice were analyzed for each genotype. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$. A summary of the volume densities (V_v) measured for β -, α -, δ -, and PP cells is provided (*bottom right*) relative to both total islet volume (*left*) and total pancreas volume (*right*).

demonstrated that there is a strong reduction in the number of β - (4- to 5-fold), α - (4- to 8-fold), and ghrelin-positive (13-fold) cells, whereas the number of PP-positive cells is increased 2- to 3-fold in *Rfx3*^{-/-} mice (Fig. 6B). The number of δ -cells was unchanged (Fig. 6B).

The β - and α -cells that remain in *Rfx3*^{-/-} embryos appeared to be labeled less intensely with antibodies against insulin and glucagon than those of control littermates (Fig. 6A). Quantification confirmed that the staining intensities for insulin and glucagon were significantly reduced in *Rfx3*^{-/-} embryos, indicating that the residual β - and α -cells express less insulin and glucagon (online appendix Fig. 3).

To confirm the loss of β -cells, we monitored expression of the genes encoding the β -cell-specific markers islet amyloid polypeptide, Glut2, NeuroD1, and Pdx-1. mRNA levels for all four genes were reduced in *Rfx3*^{-/-} embryos (online appendix Fig. 4). Taken together, the skewed cellular composition of the islets (Fig. 6), the altered pattern of pancreatic hormone production (Figs. 4 and 5; online appendix Fig. 3), and the reduced expression of β -cell markers (online appendix Fig. 4) indicate that *Rfx3*^{-/-} mice exhibit major defects in the differentiation of pancreatic endocrine cells.

DISCUSSION

The differentiation of pancreatic endocrine progenitors into hormone-producing islet cells is regulated by specific transcription factors (36). Although the roles of several transcription factors have been defined by the analysis of mice carrying mutations in the corresponding genes (36), a great deal remains to be learned about the molecular and cellular mechanisms that govern cell lineage specification in the islets and differentiation of the different types of endocrine cells. Here, we show that RFX3 is a critical new player in this process. *Rfx3*^{-/-} mice display a developmental defect leading to a markedly skewed composition of pancreatic islets. By birth, the islets of *Rfx3*^{-/-} mice are characterized by a strong reduction in the numbers of cells producing insulin, glucagon, and ghrelin and a concomitant increase in the number of PP cells. The increase in PP cells partly compensates for the loss of the other cells, such that there only is a modest reduction in the volume of the pancreas occupied by islets and in the fraction of islets occupied by endocrine cells. The loss of β -, α -, and ghrelin-positive cells, together with the compensatory increase in PP cells, leads to a markedly altered pattern of pancreatic hormone production. The latter is evidenced by a decrease in total pancreatic insulin, glucagon, and ghrelin expression, whereas PP expression is increased.

In adult *Rfx3*^{-/-} mice, altered islet development manifests itself by abnormal glucose homeostasis resulting from small disorganized islets and defects in insulin production and secretion. A partial effect was evident for several parameters in *Rfx3*^{+/-} littermates, indicating that the haploinsufficiency of RFX3 is sufficient to perturb islet development (online appendix Table 2).

The pancreatic phenotype of *Rfx3*^{-/-} mice is unprecedented, particularly with respect to the marked increase in PP cells, suggesting that RFX3 plays a unique role in pancreatic endocrine cell development. Two possible, nonmutually exclusive functions will be explored in future studies. Both would be consistent with the pattern of RFX3 expression observed during pancreatic endocrine cell development. First, since RFX3 already is expressed in

Ngn3-positive cells, it could be required for one or more early cell fate decisions that favor the differentiation of endocrine progenitors into α -, β -, and ghrelin-positive cells at the expense of PP cells. Interestingly, cell ablation studies have suggested that α - and β -cells develop from precursors that express PP (36,37). A role of RFX3 in this early developmental decision would be consistent with the skewed cell composition we observed in the islets of *Rfx3*^{-/-} mice. A second possibility is that RFX3 functions at later stages in cells that already are committed to specific endocrine cell lineages. RFX3 might be required for the maturation of α -, β -, and ghrelin-positive cells but inhibit the differentiation of PP cells. This would be consistent with the finding that RFX3 is expressed throughout the development of all pancreatic endocrine cell lineages. Our results provide some support for a function of RFX3 in mature β -cells. The residual β -cells in *Rfx3*^{-/-} mice produce less insulin and feature impaired glucose-stimulated insulin release, pointing to defects in the terminal differentiation or function of β -cells.

RFX factors play evolutionarily conserved roles in regulating the expression of genes required for the growth, maintenance, and function of cilia (7,9,10,35,38). In agreement with this function, the phenotypes documented previously in *Rfx3*^{-/-} mice can all be attributed to defects in cilia (7,14). Here, we show that primary cilia on endocrine cells in the islets of Langerhans are reduced in numbers and severely stunted in *Rfx3*^{-/-} mice. This is attributed, at least in part, to a reduction in the expression of *Dync2li1* and *Ift88*, two RFX3 target genes coding for proteins implicated in IFT. The function of primary cilia found on islet cells is unknown (33). However, there is growing evidence that primary cilia function as sensory organelles that relay signals affecting the development and physiological responses of the cells that carry them. The discovery that several kidney diseases are attributed to mutations in genes encoding cilia-related proteins, analysis of the function of these genes, and the study of mouse models of these diseases has provided strong support for the model that primary cilia on renal epithelial cells function as sensors that relay signals in response to extracellular fluid flow (11,16). A sensory role in perceiving extracellular signals also has been attributed to cilia situated in the embryonic node (13,17). Finally, the somatostatin receptor 3 and serotonin 5-HT₆ receptor are localized in cilia of specific brain neurons, suggesting that these cilia have chemosensory functions (39,40). Given these findings, it is tempting to propose that cilia found on pancreatic endocrine cells could function as sensory organelles that relay responses to extracellular cues governing the differentiation, maintenance, and/or function of these cells. The defect we have documented in the pancreas of *Rfx3*^{-/-} mice thus could be a consequence of defective cilia on islet cells.

No pancreatic endocrine phenotype was observed in conditional knockout mice in which cilia formation was perturbed in the pancreas by inducing deletion of the *Kif3a* gene with a Pdx-cre transgene (41). This raises the possibility that the islet phenotype observed in *Rfx3*^{-/-} mice might be because of a mechanism that is independent of cilia. An alternative possibility is that no pancreatic endocrine phenotype was observed in the conditional *Kif3a* knockout mice because the loss of cilia was incomplete or induced at the wrong time during development. Furthermore, the deletion of *Rfx3* could have a more severe impact on the formation and function of cilia than

the deletion of *Kif3a* because RFX3 is likely to control genes coding for numerous components of cilia and their associated basal bodies (9,10,42).

Independent support for a key function of cilia on pancreatic endocrine cells is inherent in several other observations. First, mice deficient in *Dync2li1*—one of the RFX3 target genes that is downregulated in *Rfx3*^{-/-} mice—exhibit a loss of nodal cilia and a strong reduction in *Foxa2* (*Hnf3β*) expression in the embryonic node (23). Early embryonic lethality, resulting from severe developmental defects, precluded an analysis of pancreas development in *Dync2li1*^{-/-} mice (23). However, *Foxa2* is known to be implicated in the development and function of pancreatic endocrine cells (43). Second, mice carrying a hypomorphic allele of the *Ift88* gene—the second RFX3 target gene that is downregulated in *Rfx3*^{-/-} mice—are hypoglycemic after fasting and show a marked delay in return to baseline blood glucose levels after glucose challenge (30). This altered glucose homeostasis could result from deficient glucagon and insulin production, although no overt islet defects were documented (30). Third, the transcription factor *Hnf6* has been implicated in both endocrine cell differentiation and the regulation of primary cilia formation in the pancreas (44,45). Finally, diabetes is associated with certain diseases, such as Bardet-Biedl syndrome, resulting from mutations in cilia-related genes (15). Taken together, these observations constitute compelling evidence for an important function of cilia in the development and/or function of pancreatic endocrine cells.

Recent work (18–22) has established that cilia are essential components of the Hh signaling pathway, which plays multiple roles at different stages of pancreas development. During early development, Hh signaling blocks pancreas formation (46). Less is known about its role at later stages because the ablation of Hh signaling in mice leads to early embryonic lethality (18). Nevertheless, several lines of evidence suggest that Hh signaling is required for endocrine cell development and function. In zebra fish, Hh signaling is required for the specification of pancreatic endocrine cells (47). In the adult mouse pancreas, the expression of components of the Hh pathway is restricted to islets and ducts (48). Finally, Hh signaling enhances insulin production and secretion by β-cells by regulating the expression of *Pdx1*, a key activator of insulin gene transcription (49,50). The defects documented here in the islets of *Rfx3*^{-/-} mice thus could be a consequence of perturbed Hh signaling resulting from defective cilia.

ACKNOWLEDGMENTS

Work in the laboratory of W.R. was supported by grants from the Swiss National Science Foundation, the Roche Research Foundation, and the Fondation Romande du Diabète. Work in the laboratory of B.D. was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the ACI Bio du Développement et Physiologie Intégrative, the ACI Jeune Chercheur, and the Région Rhône-Alpes. Work in the laboratory of P.M. was supported by grants from the Swiss National Science Foundation, the Juvenile Diabetes Research Foundation International, and the National Institutes of Health. A.A.-L. was supported by fellowships from the Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques and the Jules Thorn Foundation. D.B. was supported by a fellowship from the Région Rhône-Alpes and a short-term European Molecular

Biology Organization fellowship. C.B. was supported by a fellowship from the French Research Ministry.

REFERENCES

- Emery P, Durand B, Mach B, Reith W: RFX proteins, a novel family of DNA binding proteins conserved in the eukaryotic kingdom. *Nucleic Acid Res* 24:803–807, 1996
- Gajiwala KS, Chen H, Cornille F, Roques BP, Reith W, Mach B, Burley SK: Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature* 403:916–921, 2000
- Reith W, UCLA C, Barras E, Gaud A, Durand B, Herrero-Sanchez C, Kobr M, Mach B: RFX1, a transactivator of hepatitis B virus enhancer I, belongs to a novel family of homodimeric and heterodimeric DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 14:1230–1244, 1994
- Steimle V, Durand B, Barras E, Zufferey M, Hadam MR, Mach B, Reith W: A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome). *Genes Dev* 9:1021–1032, 1995
- Reith W, Mach B: The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol* 19:331–373, 2001
- Reith W, Herrero-Sanchez C, Kobr M, Silacci P, Berte C, Barras E, Fey S, Mach B: MHC class II regulatory factor RFX has a novel DNA-binding domain and a functionally independent dimerization domain. *Genes Dev* 4:1528–1540, 1990
- Bonnafe E, Touka M, AitLounis A, Baas D, Barras E, UCLA C, Moreau A, Flamant F, Dubruielle R, Couple P, Collignon J, Durand B, Reith W: The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification. *Mol Cell Biol* 24:4417–4427, 2004
- Blackshear PJ, Graves JP, Stumpo DJ, Cobos I, Rubenstein JL, Zeldin DC: Graded phenotypic response to partial and complete deficiency of a brain-specific transcript variant of the winged helix transcription factor RFX4. *Development* 130:4539–4552, 2003
- Dubruielle R, Laurencon A, Vandaele C, Shishido E, Coulon-Bublex M, Swoboda P, Couple P, Kernan M, Durand B: Drosophila regulatory factor X is necessary for ciliated sensory neuron differentiation. *Development* 129:5487–5498, 2002
- Swoboda P, Adler HT, Thomas JH: The RFX-type transcription factor DAF-19 regulates sensory neuron cilium formation in *C. elegans*. *Mol Cell* 5:411–421, 2000
- Davenport JR, Yoder BK: An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F1159–F1169, 2005
- Eley L, Yates LM, Goodship JA: Cilia and disease. *Curr Opin Genet Dev* 15:308–314, 2005
- Shiratori H, Hamada H: The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development* 133:2095–2104, 2006
- Baas D, Meinil O, Bonnafe E, Benadiba C, Bonnafe E, Meinil O, Reith W, Durand B: A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells. *Eur J Neurosci* 24:1020–1030, 2006
- Pan J, Wang Q, Snell WJ: Cilium-generated signaling and cilia-related disorders. *Lab Invest* 85:452–463, 2005
- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J: Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33:129–137, 2003
- Pennekamp P, Karcher C, Fischer A, Schweickert A, Skryabin B, Horst J, Blum M, Dworniczak B: The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol* 12:938–943, 2002
- Huangfu D, Anderson KV: Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* 133:3–14, 2006
- Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ, Yoder BK: Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet* 1:e53, 2005
- Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF: Vertebrate smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437:1018–1021, 2005
- Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV: Hedgehog signaling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426:83–87, 2003
- Huangfu D, Anderson KV: Cilia and hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11325–11330, 2005
- Rana AA, Barbera JP, Rodriguez TA, Lynch D, Hirst E, Smith JC, Bedington RS: Targeted deletion of the novel cytoplasmic dynein mD2LIC disrupts the embryonic organizer, formation of the body axes and specification of ventral cell fates. *Development* 131:4999–5007, 2004
- Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, Seeley ES, Rosenbaum JL, Witman GB,

- Cole DG: Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *tg737*, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* 151:709–718, 2000
25. Taulman PD, Haycraft CJ, Balkovetz DF, Yoder BK: Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell* 12:589–599, 2001
 26. Moyer JH, Lee-Tischler MJ, Kwon HY, Schrick JJ, Avner ED, Sweeney WE, Godfrey VL, Cacheiro NL, Wilkinson JE, Woychik RP: Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. *Science* 264:1329–1333, 1994
 27. Lager DJ, Qian Q, Bengal RJ, Ishibashi M, Torres VE: The *pck* rat: a new model that resembles human autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *Kidney Int* 59:126–136, 2001
 28. Masyuk TV, Huang BQ, Ward CJ, Masyuk AI, Yuan D, Splinter PL, Punyashthiti R, Ritman EL, Torres VE, Harris PC, LaRusso NF: Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. *Gastroenterology* 125:1303–1310, 2003
 29. Cano DA, Murcia NS, Pazour GJ, Hebrok M: Orpk mouse model of polycystic kidney disease reveals essential role of primary cilia in pancreatic tissue organization. *Development* 131:3457–3467, 2004
 30. Zhang Q, Davenport JR, Croyle MJ, Haycraft CJ, Yoder BK: Disruption of IFT results in both exocrine and endocrine abnormalities in the pancreas of *Tg737*(*orpk*) mutant mice. *Lab Invest* 85:45–64, 2005
 31. Meda P, Bosco D, Chanson M, Giordano E, Vallar L, Wollheim C, Orci L: Rapid and reversible secretion changes during uncoupling of rat insulin-producing cells. *J Clin Invest* 86:759–768, 1990
 32. Charollais A, Serre V, Mock C, Cogne F, Bosco D, Meda P: Loss of alpha 1 connexin does not alter the prenatal differentiation of pancreatic beta cells and leads to the identification of another islet cell connexin. *Dev Genet* 24:13–26, 1999
 33. Aughsteeen AA: The ultrastructure of primary cilia in the endocrine and excretory duct cells of the pancreas of mice and rats. *Eur J Morphol* 39:277–283, 2001
 34. Haycraft CJ, Swoboda P, Taulman PD, Thomas JH, Yoder BK: The *C. elegans* homolog of the murine cystic kidney disease gene *Tg737* functions in a ciliogenic pathway and is disrupted in *osm-5* mutant worms. *Development* 128:1493–1505, 2001
 35. Schafer JC, Haycraft CJ, Thomas JH, Yoder BK, Swoboda P: *XBX-1* encodes a dynein light intermediate chain required for retrograde intraflagellar transport and cilia assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 14:2057–2070, 2003
 36. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK: Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 146:1025–1034, 2005
 37. Herrera PL, Huarte J, Zufferey R, Nichols A, Mermillod B, Philippe J, Muniesa P, Sanvito F, Orci L, Vassalli JD: Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12999–13003, 1994
 38. Efimenko E, Bubb K, Mak HY, Holzman T, Leroux MR, Ruvkun G, Thomas JH, Swoboda P: Analysis of *xbx* genes in *C. elegans*. *Development* 132:1923–1934, 2005
 39. Handel M, Schulz S, Stanarius A, Schreff M, Erdtmann-Vourliotis M, Schmidt H, Wolf G, Holtt V: Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience* 89:909–926, 1999
 40. Brailov I, Bancila M, Brisorgueil MJ, Miquel MC, Hamon M, Verge D: Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res* 872:271–275, 2000
 41. Cano DA, Sekine S, Hebrok M: Primary cilia deletion in pancreatic epithelial cells results in cyst formation and pancreatitis. *Gastroenterology* 131:1856–1869, 2006
 42. Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Kim JC, Ross AJ, Eichers ER, Teslovich TM, Mah AK, Johnsen RC, Cavender JC, Lewis RA, Leroux MR, Beales PL, Katsanis N: Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425:628–633, 2003
 43. Lantz KA, Kaestner KH: Winged-helix transcription factors and pancreatic development. *Clin Sci (Lond)* 108:195–204, 2005
 44. Jacquemin P, Durviaux SM, Jensen J, Godfraind C, Gradwohl G, Guillemot F, Madsen OD, Carmeliet P, Dewerchin M, Collen D, Rousseau GG, Lemaigre FP: Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Mol Cell Biol* 20:4445–4454, 2000
 45. Pierreux CE, Poll AV, Kemp CR, Clotman F, Maestro MA, Cordi S, Ferrer J, Leys L, Rousseau GG, Lemaigre FP: The transcription factor hepatocyte nuclear factor-6 controls the development of pancreatic ducts in the mouse. *Gastroenterology* 130:532–541, 2006
 46. Lau J, Kawahira H, Hebrok M: Hedgehog signaling in pancreas development and disease. *Cell Mol Life Sci* 63:642–652, 2006
 47. Roy S, Qiao T, Wolff C, Ingham PW: Hedgehog signaling pathway is essential for pancreas specification in the zebrafish embryo. *Curr Biol* 11:1358–1363, 2001
 48. Hebrok M, Kim SK, St Jacques B, McMahon AP, Melton DA: Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* 127:4905–4913, 2000
 49. Thomas MK, Lee JH, Rastalsky N, Habener JF: Hedgehog signaling regulation of homeodomain protein islet duodenum homeobox-1 expression in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 142:1033–1040, 2001
 50. Thomas MK, Rastalsky N, Lee JH, Habener JF: Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic β -cells. *Diabetes* 49:2039–2047, 2000

BIBLIOGRAPHIE

- Aftab S, Semene L, Chu JS, Chen N (2008) Identification and characterization of novel human tissue-specific RFX transcription factors. *BMC Evol Biol* 8:226.
- Ait-Lounis A, Baas D, Barras E, Benadiba C, Charollais A, Nlend Nlend R, Liegeois D, Meda P, Durand B, Reith W (2007) Novel function of the ciliogenic transcription factor RFX3 in development of the endocrine pancreas. *Diabetes* 56:950-959.
- Alcedo J, Noll M (1997) Hedgehog and its patched-smoothed receptor complex: a novel signalling mechanism at the cell surface. *Biol Chem* 378:583-590.
- Alvarez-Medina R, Cayuso J, Okubo T, Takada S, Marti E (2008) Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development* 135:237-247.
- Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Kim JC, Ross AJ, Eichers ER, Teslovich TM, Mah AK, Johnsen RC, Cavender JC, Lewis RA, Leroux MR, Beales PL, Katsanis N (2003) Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425:628-633.
- Aoto K, Nishimura T, Eto K, Motoyama J (2002) Mouse GLI3 regulates Fgf8 expression and apoptosis in the developing neural tube, face, and limb bud. *Dev Biol* 251:320-332.
- Ashique MK, Youngshik Choea, Johan Ericsonb, John L. Rubensteinc and Andrew S. Petersona (2007) RFX4 transcription factor regulates IFT172 expression, cilia formation and dorsoventral patterning of the central nervous system. In: *Developmental Biology* p360. ? : *Developmental Biology*.
- Aylsworth AS (2001) Clinical aspects of defects in the determination of laterality. *Am J Med Genet* 101:345-355.
- Baas D, Meiniel A, Benadiba C, Bonnafé E, Meiniel O, Reith W, Durand B (2006) A deficiency in RFX3 causes hydrocephalus associated with abnormal differentiation of ependymal cells. *Eur J Neurosci* 24:1020-1030.
- Bach A, Lallemand Y, Nicola MA, Ramos C, Mathis L, Maufras M, Robert B (2003) Msx1 is required for dorsal diencephalon patterning. *Development* 130:4025-4036.
- Backman M, Machon O, Mygland L, van den Bout CJ, Zhong W, Taketo MM, Krauss S (2005) Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon. *Dev Biol* 279:155-168.
- Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (2006) The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:125-148.
- Bartoloni L, Blouin JL, Pan Y, Gehrig C, Maiti AK, Scamuffa N, Rossier C, Jorissen M, Armengot M, Meeks M, Mitchison HM, Chung EM, Delozier-Blanchet CD, Craigen WJ, Antonarakis SE (2002) Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10282-10286.
- Bartoloni L, Blouin JL, Maiti AK, Sainsbury A, Rossier C, Gehrig C, She JX, Marron MP, Lander ES, Meeks M, Chung E, Armengot M, Jorissen M, Scott HS, Delozier-Blanchet CD, Gardiner RM, Antonarakis SE (2001) Axonemal beta heavy chain dynein DNAH9: cDNA sequence, genomic structure, and investigation of its role in primary ciliary dyskinesia. *Genomics* 72:21-33.
- Bergmann C, Fliegauf M, Bruchle NO, Frank V, Olbrich H, Kirschner J, Schermer B, Schmedding I, Kispert A, Kranzlin B, Nurnberg G, Becker C, Grimm T, Girschick G, Lynch SA, Kelehan P, Senderek J, Neuhaus TJ, Stallmach T, Zentgraf H, Nurnberg P, Gretz N, Lo C, Lienkamp S, Schafer T, Walz G, Benzing T, Zerres K,

- Omran H (2008) Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am J Hum Genet* 82:959-970.
- Bishop GA, Berbari NF, Lewis J, Mykytyn K (2007) Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 505:562-571.
- Blackshear PJ, Graves JP, Stumpo DJ, Cobos I, Rubenstein JL, Zeldin DC (2003) Graded phenotypic response to partial and complete deficiency of a brain-specific transcript variant of the winged helix transcription factor RFX4. *Development* 130:4539-4552.
- Blacque OE, Cevik S, Kaplan OI (2008) Intraflagellar transport: from molecular characterisation to mechanism. *Front Biosci* 13:2633-2652.
- Blacque OE, Perens EA, Boroevich KA, Inglis PN, Li C, Warner A, Khattra J, Holt RA, Ou G, Mah AK, McKay SJ, Huang P, Swoboda P, Jones SJ, Marra MA, Baillie DL, Moerman DG, Shaham S, Leroux MR (2005) Functional genomics of the cilium, a sensory organelle. *Curr Biol* 15:935-941.
- Bonnafe E, Touka M, AitLounis A, Baas D, Barras E, Ucla C, Moreau A, Flamant F, Dubruille R, Couble P, Collignon J, Durand B, Reith W (2004) The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification. *Mol Cell Biol* 24:4417-4427.
- Brown JM, Marsala C, Kosoy R, Gaertig J (1999) Kinesin-II is preferentially targeted to assembling cilia and is required for ciliogenesis and normal cytokinesis in *Tetrahymena*. *Mol Biol Cell* 10:3081-3096.
- Brown JM, Fine NA, Pandiyan G, Thazhath R, Gaertig J (2003) Hypoxia regulates assembly of cilia in suppressors of *Tetrahymena* lacking an intraflagellar transport subunit gene. *Mol Biol Cell* 14:3192-3207.
- Buscher D, Bosse B, Heymer J, Ruther U (1997) Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by *Gli3* in mouse limb development. *Mech Dev* 62:175-182.
- Bush A (2000) Primary ciliary dyskinesia. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 54:317-324.
- Caspary T, Larkins CE, Anderson KV (2007) The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Dev Cell* 12:767-778.
- Chen L, Smith L, Johnson MR, Wang K, Diasio RB, Smith JB (2000) Activation of protein kinase C induces nuclear translocation of RFX1 and down-regulates c-myc via an intron 1 X box in undifferentiated leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 275:32227-32233.
- Chen N, Mah A, Blacque OE, Chu J, Phgora K, Bakhom MW, Newbury CR, Khattra J, Chan S, Go A, Efimenko E, Johnsen R, Phirke P, Swoboda P, Marra M, Moerman DG, Leroux MR, Baillie DL, Stein LD (2006) Identification of ciliary and ciliopathy genes in *Caenorhabditis elegans* through comparative genomics. *Genome Biol* 7:R126.
- Cheng X, Hsu CM, Curren DS, Hu JS, Barkovich AJ, Monuki ES (2006) Central roles of the roof plate in telencephalic development and holoprosencephaly. *J Neurosci* 26:7640-7649.
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413.
- Chiang C, Litingtung Y, Harris MP, Simandl BK, Li Y, Beachy PA, Fallon JF (2001) Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol* 236:421-435.

- Chizhikov VV, Millen KJ (2004) Control of roof plate formation by *Lmx1a* in the developing spinal cord. *Development* 131:2693-2705.
- Chizhikov VV, Davenport J, Zhang Q, Shih EK, Cabello OA, Fuchs JL, Yoder BK, Millen KJ (2007) Cilia proteins control cerebellar morphogenesis by promoting expansion of the granule progenitor pool. *J Neurosci* 27:9780-9789.
- Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-480.
- Cole DG, Chinn SW, Wedaman KP, Hall K, Vuong T, Scholey JM (1993) Novel heterotrimeric kinesin-related protein purified from sea urchin eggs. *Nature* 366:268-270.
- Cole DG, Diener DR, Himelblau AL, Beech PL, Fuster JC, Rosenbaum JL (1998) *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J Cell Biol* 141:993-1008.
- Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF (2005) Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437:1018-1021.
- Corbit KC, Shyer AE, Dowdle WE, Gauden J, Singla V, Chen MH, Chuang PT, Reiter JF (2008) Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat Cell Biol* 10:70-76.
- Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S (1999) Sonic Hedgehog-induced activation of the *Gli1* promoter is mediated by *GLI3*. *J Biol Chem* 274:8143-8152.
- Davidson D (1995) The function and evolution of *Msx* genes: pointers and paradoxes. *Trends Genet* 11:405-411.
- Dawe HR, Farr H, Gull K (2007) Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J Cell Sci* 120:7-15.
- Delous M, Baala L, Salomon R, Laclef C, Vierkotten J, Tory K, Golzio C, Lacoste T, Besse L, Ozilou C, Moutkine I, Hellman NE, Anselme I, Silbermann F, Vesque C, Gerhardt C, Rattenberry E, Wolf MT, Gubler MC, Martinovic J, Encha-Razavi F, Boddaert N, Gonzales M, Macher MA, Nivet H, Champion G, Bertheleme JP, Niaudet P, McDonald F, Hildebrandt F, Johnson CA, Vekemans M, Antignac C, Ruther U, Schneider-Maunoury S, Attie-Bitach T, Saunier S (2007) The ciliary gene *RPGRIP1L* is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat Genet* 39:875-881.
- Dubruille R, Laurencon A, Vandaele C, Shishido E, Coulon-Bublex M, Swoboda P, Couple P, Kernan M, Durand B (2002) *Drosophila* regulatory factor X is necessary for ciliated sensory neuron differentiation. *Development* 129:5487-5498.
- Durand B, Sperisen P, Emery P, Barras E, Zufferey M, Mach B, Reith W (1997) RFXAP, a novel subunit of the RFX DNA binding complex is mutated in MHC class II deficiency. *Embo J* 16:1045-1055.
- Duriez B, Duquesnoy P, Escudier E, Bridoux AM, Escalier D, Rayet I, Marcos E, Vojtek AM, Bercher JF, Amselem S (2007) A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3336-3341.
- Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD, Saunders NR (2001) Development of the choroid plexus. *Microsc Res Tech* 52:5-20.
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417-1430.

- Efimenko E, Bubb K, Mak HY, Holzman T, Leroux MR, Ruvkun G, Thomas JH, Swoboda P (2005) Analysis of *xbx* genes in *C. elegans*. *Development* 132:1923-1934.
- Emery P, Strubin M, Hofmann K, Bucher P, Mach B, Reith W (1996) A consensus motif in the RFX DNA binding domain and binding domain mutants with altered specificity. *Mol Cell Biol* 16:4486-4494.
- Estivill-Torrus G, Vitalis T, Fernandez-Llebrez P, Price DJ (2001) The transcription factor Pax6 is required for development of the diencephalic dorsal midline secretory radial glia that form the subcommissural organ. *Mech Dev* 109:215-224.
- Evans MJ, Fanucchi MV, Van Winkle LS, Baker GL, Murphy AE, Nishio SJ, Sannes PL, Plopper CG (2002) Fibroblast growth factor-2 during postnatal development of the tracheal basement membrane zone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L1263-1270.
- Fan Y, Esmail MA, Ansley SJ, Blacque OE, Boroevich K, Ross AJ, Moore SJ, Badano JL, May-Simera H, Compton DS, Green JS, Lewis RA, van Haelst MM, Parfrey PS, Baillie DL, Beales PL, Katsanis N, Davidson WS, Leroux MR (2004) Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 36:989-993.
- Ferland RJ, Eyaid W, Collura RV, Tully LD, Hill RS, Al-Nouri D, Al-Rumayyan A, Topcu M, Gascon G, Bodell A, Shugart YY, Ruvolo M, Walsh CA (2004) Abnormal cerebellar development and axonal decussation due to mutations in *AHI1* in Joubert syndrome. *Nat Genet* 36:1008-1013.
- Fernandes M, Gutin G, Alcorn H, McConnell SK, Hebert JM (2007) Mutations in the BMP pathway in mice support the existence of two molecular classes of holoprosencephaly. *Development* 134:3789-3794.
- Fernandez-Llebrez P, Grondona JM, Perez J, Lopez-Aranda MF, Estivill-Torrus G, Llebrez-Zayas PF, Soriano E, Ramos C, Lallemand Y, Bach A, Robert B (2004) *Msx1*-deficient mice fail to form prosomere 1 derivatives, subcommissural organ, and posterior commissure and develop hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:574-586.
- Fernandez-Teran M, Piedra ME, Kathiriya IS, Srivastava D, Rodriguez-Rey JC, Ros MA (2000) Role of *dHAND* in the anterior-posterior polarization of the limb bud: implications for the Sonic hedgehog pathway. *Development* 127:2133-2142.
- Ferrante MI, Zullo A, Barra A, Bimonte S, Messaddeq N, Studer M, Dolle P, Franco B (2006) Oral-facial-digital type I protein is required for primary cilia formation and left-right axis specification. *Nat Genet* 38:112-117.
- Fliegauf M, Benzing T, Omran H (2007) When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:880-893.
- Follit JA, Tuft RA, Fogarty KE, Pazour GJ (2006) The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Mol Biol Cell* 17:3781-3792.
- Fotaki V, Yu T, Zaki PA, Mason JO, Price DJ (2006) Abnormal positioning of diencephalic cell types in neocortical tissue in the dorsal telencephalon of mice lacking functional *Gli3*. *J Neurosci* 26:9282-9292.
- Fuccillo M, Rutlin M, Fishell G (2006) Removal of Pax6 partially rescues the loss of ventral structures in *Shh* null mice. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1:i96-102.
- Furuta Y, Piston DW, Hogan BL (1997) Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* 124:2203-2212.

- Gaillard AR, Diener DR, Rosenbaum JL, Sale WS (2001) Flagellar radial spoke protein 3 is an A-kinase anchoring protein (AKAP). *J Cell Biol* 153:443-448.
- Gerdes JM, Liu Y, Zaghoul NA, Leitch CC, Lawson SS, Kato M, Beachy PA, Beales PL, DeMartino GN, Fisher S, Badano JL, Katsanis N (2007) Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat Genet* 39:1350-1360.
- Gherman A, Davis EE, Katsanis N (2006) The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia. *Nat Genet* 38:961-962.
- Gibbons BH, Asai DJ, Tang WJ, Hays TS, Gibbons IR (1994) Phylogeny and expression of axonemal and cytoplasmic dynein genes in sea urchins. *Mol Biol Cell* 5:57-70.
- Gonzalez-Perrett S, Kim K, Ibarra C, Damiano AE, Zotta E, Batelli M, Harris PC, Reisin IL, Arnaout MA, Cantiello HF (2001) Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1182-1187.
- Grimes SR, Prado S, Wolfe SA (2005) Transcriptional activation of the testis-specific histone H1t gene by RFX2 may require both proximal promoter X-box elements. *J Cell Biochem* 94:317-326.
- Grove EA, Tole S, Limon J, Yip L, Ragsdale CW (1998) The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development* 125:2315-2325.
- Gubb D, Garcia-Bellido A (1982) A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 68:37-57.
- Gutin G, Fernandes M, Palazzolo L, Paek H, Yu K, Ornitz DM, McConnell SK, Hebert JM (2006) FGF signalling generates ventral telencephalic cells independently of SHH. *Development* 133:2937-2946.
- Han YG, Kwok BH, Kernan MJ (2003) Intraflagellar transport is required in *Drosophila* to differentiate sensory cilia but not sperm. *Curr Biol* 13:1679-1686.
- Haycraft CJ, Swoboda P, Taulman PD, Thomas JH, Yoder BK (2001) The *C. elegans* homolog of the murine cystic kidney disease gene Tg737 functions in a ciliogenic pathway and is disrupted in *osm-5* mutant worms. *Development* 128:1493-1505.
- Haycraft CJ, Schafer JC, Zhang Q, Taulman PD, Yoder BK (2003) Identification of CHE-13, a novel intraflagellar transport protein required for cilia formation. *Exp Cell Res* 284:251-263.
- Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ, Yoder BK (2005) Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet* 1:e53.
- Hayhurst M, Gore BB, Tessier-Lavigne M, McConnell SK (2008) Ongoing sonic hedgehog signaling is required for dorsal midline formation in the developing forebrain. *Dev Neurobiol* 68:83-100.
- Hearn T, Spalluto C, Phillips VJ, Renforth GL, Copin N, Hanley NA, Wilson DI (2005) Subcellular localization of ALMS1 supports involvement of centrosome and basal body dysfunction in the pathogenesis of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Diabetes* 54:1581-1587.
- Hebert JM, Mishina Y, McConnell SK (2002) BMP signaling is required locally to pattern the dorsal telencephalic midline. *Neuron* 35:1029-1041.
- Hildebrandt F, Zhou W (2007) Nephronophthisis-associated ciliopathies. *J Am Soc Nephrol* 18:1855-1871.

- Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S (2006) Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125:33-45.
- Hoff B, Schmitt EK, Kuck U (2005) CPC1, but not its interacting transcription factor AcFKH1, controls fungal arthrospore formation in *Acremonium chrysogenum*. *Mol Microbiol* 56:1220-1233.
- Horvath GC, Kistler WS, Kistler MK (2004) RFX2 is a potential transcriptional regulatory factor for histone H1t and other genes expressed during the meiotic phase of spermatogenesis. *Biol Reprod* 71:1551-1559.
- Hou Y, Pazour GJ, Witman GB (2004) A dynein light intermediate chain, D1bLIC, is required for retrograde intraflagellar transport. *Mol Biol Cell* 15:4382-4394.
- Hovens CM, Stacker SA, Andres AC, Harpur AG, Ziemiecki A, Wilks AF (1992) RYK, a receptor tyrosine kinase-related molecule with unusual kinase domain motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11818-11822.
- Huang B, Piperno G, Ramanis Z, Luck DJ (1981) Radial spokes of *Chlamydomonas* flagella: genetic analysis of assembly and function. *J Cell Biol* 88:80-88.
- Huang M, Zhou Z, Elledge SJ (1998) The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* 94:595-605.
- Huang X, Litingtung Y, Chiang C (2007) Ectopic sonic hedgehog signaling impairs telencephalic dorsal midline development: implication for human holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 16:1454-1468.
- Huangfu D, Anderson KV (2005) Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11325-11330.
- Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV (2003) Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426:83-87.
- Hui CC, Joyner AL (1993) A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nat Genet* 3:241-246.
- Inglis PN, Boroevich KA, Leroux MR (2006) Piecing together a ciliome. *Trends Genet* 22:491-500.
- Inoue T, Oz HS, Wiland D, Gharib S, Deshpande R, Hill RJ, Katz WS, Sternberg PW (2004) *C. elegans* LIN-18 is a Ryk ortholog and functions in parallel to LIN-17/Frizzled in Wnt signaling. *Cell* 118:795-806.
- Iomini C, Babaev-Khaimov V, Sassaroli M, Piperno G (2001) Protein particles in *Chlamydomonas* flagella undergo a transport cycle consisting of four phases. *J Cell Biol* 153:13-24.
- Jones C, Roper VC, Foucher I, Qian D, Banizs B, Petit C, Yoder BK, Chen P (2008) Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nat Genet* 40:69-77.
- Karmous-Benailly H, Martinovic J, Gubler MC, Sirot Y, Clech L, Ozilou C, Auge J, Brahim N, Etchevers H, Detrait E, Esculpavit C, Audollent S, Goudefroye G, Gonzales M, Tantau J, Loget P, Joubert M, Gaillard D, Jeanne-Pasquier C, Delezoide AL, Peter MO, Plessis G, Simon-Bouy B, Dollfus H, Le Merrer M, Munnich A, Encha-Razavi F, Vekemans M, Attie-Bitach T (2005) Antenatal presentation of Bardet-Biedl syndrome may mimic Meckel syndrome. *Am J Hum Genet* 76:493-504.
- Katan-Khaykovich Y, Shaul Y (1998) RFX1, a single DNA-binding protein with a split dimerization domain, generates alternative complexes. *J Biol Chem* 273:24504-24512.

- Keeble TR, Halford MM, Seaman C, Kee N, Macheda M, Anderson RB, Stacker SA, Cooper HM (2006) The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J Neurosci* 26:5840-5848.
- Keeler LC, Marsh SE, Leeftang EP, Woods CG, Sztriha L, Al-Gazali L, Gururaj A, Gleeson JG (2003) Linkage analysis in families with Joubert syndrome plus oculo-renal involvement identifies the CORS2 locus on chromosome 11p12-q13.3. *Am J Hum Genet* 73:656-662.
- Khan ML, Ali MY, Siddiqui ZK, Shakir MA, Ohnishi H, Nishikawa K, Siddiqui SS (2000) *C. elegans* KLP-11/OSM-3/KAP-1: orthologs of the sea urchin kinesin-II, and mouse KIF3A/KIFB/KAP3 kinesin complexes. *DNA Res* 7:121-125.
- Koenig R (2003) Bardet-Biedl syndrome and Usher syndrome. *Dev Ophthalmol* 37:126-140.
- Kolpakova-Hart E, Jinnin M, Hou B, Fukai N, Olsen BR (2007) Kinesin-2 controls development and patterning of the vertebrate skeleton by Hedgehog- and Gli3-dependent mechanisms. *Dev Biol* 309:273-284.
- Kozminski KG, Beech PL, Rosenbaum JL (1995) The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J Cell Biol* 131:1517-1527.
- Krauss RS (2007) Holoprosencephaly: new models, new insights. *Expert Rev Mol Med* 9:1-17.
- Kunitomo H, Iino Y (2008) *Caenorhabditis elegans* DYF-11, an orthologue of mammalian Traf3ip1/MIP-T3, is required for sensory cilia formation. *Genes Cells* 13:13-25.
- Kuschel S, Ruther U, Theil T (2003) A disrupted balance between Bmp/Wnt and Fgf signaling underlies the ventralization of the Gli3 mutant telencephalon. *Dev Biol* 260:484-495.
- Kuwamura M, Muraguchi T, Matsui T, Ueno M, Takenaka S, Yamate J, Kotani T, Kuramoto T, Guenet JL, Kitada K, Serikawa T (2005) Mutation at the *Lmx1a* locus provokes aberrant brain development in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 155:99-106.
- Laurencon A, Dubruille R, Efimenko E, Grenier G, Bissett R, Cortier E, Rolland V, Swoboda P, Durand B (2007) Identification of novel regulatory factor X (RFX) target genes by comparative genomics in *Drosophila* species. *Genome Biol* 8:R195.
- Lee KJ, Dietrich P, Jessell TM (2000) Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* 403:734-740.
- Leitch CC, Zaghoul NA, Davis EE, Stoetzel C, Diaz-Font A, Rix S, Alfadhel M, Lewis RA, Eyaid W, Banin E, Dollfus H, Beales PL, Badano JL, Katsanis N (2008) Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 40:443-448.
- Lewis PM, Gritli-Linde A, Smeyne R, Kottmann A, McMahon AP (2004) Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol* 270:393-410.
- Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H, Li H, Blacque OE, Li L, Leitch CC, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Leroux MR, Davidson WS, Beales PL, Guay-Woodford LM, Yoder BK, Stormo GD, Katsanis N, Dutcher SK (2004) Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* 117:541-552.
- Lin F, Hiesberger T, Cordes K, Sinclair AM, Goldstein LS, Somlo S, Igarashi P (2003) Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal

- ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5286-5291.
- Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C (2002) Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 418:979-983.
- Liu A, Wang B, Niswander LA (2005) Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development* 132:3103-3111.
- Liu Q, Zuo J, Pierce EA (2004) The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein. *J Neurosci* 24:6427-6436.
- Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810.
- Louvi A, Wassef M (2000) Ectopic engrailed 1 expression in the dorsal midline causes cell death, abnormal differentiation of circumventricular organs and errors in axonal pathfinding. *Development* 127:4061-4071.
- Ma K, Zheng S, Zuo Z (2006) The transcription factor regulatory factor X1 increases the expression of neuronal glutamate transporter type 3. *J Biol Chem* 281:21250-21255.
- Marszalek JR, Weiner JA, Farlow SJ, Chun J, Goldstein LS (1999) Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B. *J Cell Biol* 145:469-479.
- Masternak K, Barras E, Zufferey M, Conrad B, Corthals G, Aebersold R, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Mach B, Reith W (1998) A gene encoding a novel RFX-associated transactivator is mutated in the majority of MHC class II deficiency patients. *Nat Genet* 20:273-277.
- Mastick GS, Davis NM, Andrew GL, Easter SS, Jr. (1997) Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain. *Development* 124:1985-1997.
- May SR, Ashique AM, Karlen M, Wang B, Shen Y, Zarbali K, Reiter J, Ericson J, Peterson AS (2005) Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev Biol* 287:378-389.
- McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueckner M (2003) Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* 114:61-73.
- McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ (2003) Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 53:1-114.
- Meindl A, Dry K, Herrmann K, Manson F, Ciccociola A, Edgar A, Carvalho MR, Achatz H, Hellebrand H, Lennon A, Migliaccio C, Porter K, Zrenner E, Bird A, Jay M, Lorenz B, Wittwer B, D'Urso M, Meitinger T, Wright A (1996) A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nat Genet* 13:35-42.
- Miller MS, Esparza JM, Lippa AM, Lux FG, 3rd, Cole DG, Dutcher SK (2005) Mutant kinesin-2 motor subunits increase chromosome loss. *Mol Biol Cell* 16:3810-3820.
- Million K, Larcher J, Laoukili J, Bourguignon D, Marano F, Tournier F (1999) Polyglutamylation and polyglycylation of alpha- and beta-tubulins during in vitro ciliated cell differentiation of human respiratory epithelial cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 23):4357-4366.
- Millonig JH, Millen KJ, Hatten ME (2000) The mouse Dreher gene *Lmx1a* controls formation of the roof plate in the vertebrate CNS. *Nature* 403:764-769.

- Monuki ES, Porter FD, Walsh CA (2001) Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway. *Neuron* 32:591-604.
- Moore A, Escudier E, Roger G, Tamalet A, Pelosse B, Marlin S, Clement A, Geremek M, Delaisi B, Bridoux AM, Coste A, Witt M, Duriez B, Amselem S (2006) RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *J Med Genet* 43:326-333.
- Morotomi-Yano K, Yano K, Saito H, Sun Z, Iwama A, Miki Y (2002) Human regulatory factor X 4 (RFX4) is a testis-specific dimeric DNA-binding protein that cooperates with other human RFX members. *J Biol Chem* 277:836-842.
- Morris RL, Scholey JM (1997) Heterotrimeric kinesin-II is required for the assembly of motile 9+2 ciliary axonemes on sea urchin embryos. *J Cell Biol* 138:1009-1022.
- Mueller J, Perrone CA, Bower R, Cole DG, Porter ME (2005) The FLA3 KAP subunit is required for localization of kinesin-2 to the site of flagellar assembly and processive anterograde intraflagellar transport. *Mol Biol Cell* 16:1341-1354.
- Murayama T, Toh Y, Ohshima Y, Koga M (2005) The dyf-3 gene encodes a novel protein required for sensory cilium formation in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 346:677-687.
- Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ (1999) Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex. *Curr Biol* 9:76-84.
- Nakayama A, Murakami H, Maeyama N, Yamashiro N, Sakakibara A, Mori N, Takahashi M (2003) Role for RFX transcription factors in non-neuronal cell-specific inactivation of the microtubule-associated protein MAP1A promoter. *J Biol Chem* 278:233-240.
- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J (2003) Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33:129-137.
- Niquille M, Garel S, Mann F, Hornung J, Otsmane B, Parras C, Guillemot F, Gaspar P, Yanagawa Y, Obata K, Lebrand C (2008) Transient neuronal populations are necessary for the formation of the Corpus Callosum. review at *Nature Neuroscience*.
- Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H (2002) Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418:96-99.
- Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M, Hirokawa N (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95:829-837.
- Ohkubo Y, Chiang C, Rubenstein JL (2002) Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* 111:1-17.
- Olbrich H, Fliegauf M, Hoefele J, Kispert A, Otto E, Volz A, Wolf MT, Sasmaz G, Trauer U, Reinhardt R, Sudbrak R, Antignac C, Gretz N, Walz G, Schermer B, Benzing T, Hildebrandt F, Omran H (2003) Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat Genet* 34:455-459.
- Olbrich H, Haffner K, Kispert A, Volkel A, Volz A, Sasmaz G, Reinhardt R, Hennig S, Lehrach H, Konietzko N, Zariwala M, Noone PG, Knowles M, Mitchison HM, Meeks M, Chung EM, Hildebrandt F, Sudbrak R, Omran H (2002) Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat Genet* 30:143-144.

- Otto E, Hoefele J, Ruf R, Mueller AM, Hiller KS, Wolf MT, Schuermann MJ, Becker A, Birkenhager R, Sudbrak R, Hennies HC, Nurnberg P, Hildebrandt F (2002) A gene mutated in nephronophthisis and retinitis pigmentosa encodes a novel protein, nephroretinin, conserved in evolution. *Am J Hum Genet* 71:1161-1167.
- Otto EA, Schermer B, Obara T, O'Toole JF, Hiller KS, Mueller AM, Ruf RG, Hoefele J, Beekmann F, Landau D, Foreman JW, Goodship JA, Strachan T, Kispert A, Wolf MT, Gagnadoux MF, Nivet H, Antignac C, Walz G, Drummond IA, Benzing T, Hildebrandt F (2003) Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet* 34:413-420.
- Otto EA, Loeys B, Khanna H, Hellemans J, Sudbrak R, Fan S, Muerb U, O'Toole JF, Helou J, Attanasio M, Utsch B, Sayer JA, Lillo C, Jimeno D, Coucke P, De Paepe A, Reinhardt R, Klages S, Tsuda M, Kawakami I, Kusakabe T, Omran H, Imm A, Tippens M, Raymond PA, Hill J, Beales P, He S, Kispert A, Margolis B, Williams DS, Swaroop A, Hildebrandt F (2005) Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin. *Nat Genet* 37:282-288.
- Parisi MA, Bennett CL, Eckert ML, Dobyns WB, Gleeson JG, Shaw DW, McDonald R, Eddy A, Chance PF, Glass IA (2004) The NPHP1 gene deletion associated with juvenile nephronophthisis is present in a subset of individuals with Joubert syndrome. *Am J Hum Genet* 75:82-91.
- Patel-King RS, Gorbatyuk O, Takebe S, King SM (2004) Flagellar radial spokes contain a Ca²⁺-stimulated nucleoside diphosphate kinase. *Mol Biol Cell* 15:3891-3902.
- Paul LK, Brown WS, Adolphs R, Tyszka JM, Richards LJ, Mukherjee P, Sherr EH (2007) Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci* 8:287-299.
- Pazour GJ, Dickert BL, Witman GB (1999) The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J Cell Biol* 144:473-481.
- Pechart I, Kann ML, Levilliers N, Bre MH, Fouquet JP (1999) Composition and organization of tubulin isoforms reveals a variety of axonemal models. *Biol Cell* 91:685-697.
- Pennarun G, Escudier E, Chapelin C, Bridoux AM, Cacheux V, Roger G, Clement A, Goossens M, Amselem S, Duriez B (1999) Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 65:1508-1519.
- Perrone CA, Tritschler D, Taulman P, Bower R, Yoder BK, Porter ME (2003) A novel dynein light intermediate chain colocalizes with the retrograde motor for intraflagellar transport at sites of axoneme assembly in *Chlamydomonas* and Mammalian cells. *Mol Biol Cell* 14:2041-2056.
- Pfister KK, Shah PR, Hummerich H, Russ A, Cotton J, Annuar AA, King SM, Fisher EM (2006) Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genet* 2:e1.
- Piperno G, Mead K (1997) Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of *Chlamydomonas* flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4457-4462.
- Porter ME, Bower R, Knott JA, Byrd P, Dentler W (1999) Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell* 10:693-712.

- Puelles L, Rubenstein JL (1993) Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* 16:472-479.
- Puelles L, Rubenstein JL (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci* 26:469-476.
- Qin H, Wang Z, Diener D, Rosenbaum J (2007) Intraflagellar transport protein 27 is a small G protein involved in cell-cycle control. *Curr Biol* 17:193-202.
- Rallu M, Machold R, Gaiano N, Corbin JG, McMahon AP, Fishell G (2002) Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both Gli3 and Hedgehog signaling. *Development* 129:4963-4974.
- Ramos C, Fernandez-Llebrez P, Bach A, Robert B, Soriano E (2004) Msx1 disruption leads to diencephalon defects and hydrocephalus. *Dev Dyn* 230:446-460.
- Rash BG, Richards LJ (2001) A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum. *J Comp Neurol* 434:147-157.
- Rash BG, Grove EA (2007) Patterning the dorsal telencephalon: a role for sonic hedgehog? *J Neurosci* 27:11595-11603.
- Reinhold W, Emens L, Itkes A, Blake M, Ichinose I, Zajac-Kaye M (1995) The myc intron-binding polypeptide associates with RFX1 in vivo and binds to the major histocompatibility complex class II promoter region, to the hepatitis B virus enhancer, and to regulatory regions of several distinct viral genes. *Mol Cell Biol* 15:3041-3048.
- Richards LJ, Plachez C, Ren T (2004) Mechanisms regulating the development of the corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin Genet* 66:276-289.
- Romio L, Fry AM, Winyard PJ, Malcolm S, Woolf AS, Feather SA (2004) OFD1 is a centrosomal/basal body protein expressed during mesenchymal-epithelial transition in human nephrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 15:2556-2568.
- Rompolas P, Pedersen LB, Patel-King RS, King SM (2007) Chlamydomonas FAP133 is a dynein intermediate chain associated with the retrograde intraflagellar transport motor. *J Cell Sci* 120:3653-3665.
- Ross AJ, May-Simera H, Eichers ER, Kai M, Hill J, Jagger DJ, Leitch CC, Chapple JP, Munro PM, Fisher S, Tan PL, Phillips HM, Leroux MR, Henderson DJ, Murdoch JN, Copp AJ, Eliot MM, Lupski JR, Kemp DT, Dollfus H, Tada M, Katsanis N, Forge A, Beales PL (2005) Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37:1135-1140.
- Rubenstein JL, Martinez S, Shimamura K, Puelles L (1994) The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* 266:578-580.
- Saar K, Al-Gazali L, Sztriha L, Rueschendorf F, Nur EKM, Reis A, Bayoumi R (1999) Homozygosity mapping in families with Joubert syndrome identifies a locus on chromosome 9q34.3 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 65:1666-1671.
- San Millan JL, Viribay M, Peral B, Martinez I, Weissenbach J, Moreno F (1995) Refining the localization of the PKD2 locus on chromosome 4q by linkage analysis in Spanish families with autosomal dominant polycystic kidney disease type 2. *Am J Hum Genet* 56:248-253.
- Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H (1999) Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126:3915-3924.
- Satir P (1995) Landmarks in cilia research from Leeuwenhoek to us. *Cell Motil Cytoskeleton* 32:90-94.

- Saunders JW, Jr., Gasseling MT, Errick JE (1976) Inductive activity and enduring cellular constitution of a supernumerary apical ectodermal ridge grafted to the limb bud of the chick embryo. *Dev Biol* 50:16-25.
- Saunier S, Calado J, Heilig R, Silbermann F, Benessy F, Morin G, Konrad M, Broyer M, Gubler MC, Weissenbach J, Antignac C (1997) A novel gene that encodes a protein with a putative src homology 3 domain is a candidate gene for familial juvenile nephronophthisis. *Hum Mol Genet* 6:2317-2323.
- Sayer JA, Otto EA, O'Toole JF, Nurnberg G, Kennedy MA, Becker C, Hennies HC, Helou J, Attanasio M, Fausett BV, Utsch B, Khanna H, Liu Y, Drummond I, Kawakami I, Kusakabe T, Tsuda M, Ma L, Lee H, Larson RG, Allen SJ, Wilkinson CJ, Nigg EA, Shou C, Lillo C, Williams DS, Hoppe B, Kemper MJ, Neuhaus T, Parisi MA, Glass IA, Petry M, Kispert A, Gloy J, Ganner A, Walz G, Zhu X, Goldman D, Nurnberg P, Swaroop A, Leroux MR, Hildebrandt F (2006) The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet* 38:674-681.
- Schafer JC, Haycraft CJ, Thomas JH, Yoder BK, Swoboda P (2003) XBX-1 encodes a dynein light intermediate chain required for retrograde intraflagellar transport and cilia assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 14:2057-2070.
- Schmitt EK, Bunse A, Janus D, Hoff B, Friedlin E, Kurnsteiner H, Kuck U (2004) Winged helix transcription factor CPCR1 is involved in regulation of beta-lactam biosynthesis in the fungus *Acremonium chrysogenum*. *Eukaryot Cell* 3:121-134.
- Schwabe GC, Hoffmann K, Loges NT, Birker D, Rossier C, de Santi MM, Olbrich H, Fliegau M, Faily M, Liebers U, Collura M, Gaedicke G, Mundlos S, Wahn U, Blouin JL, Niggemann B, Omran H, Antonarakis SE, Bartoloni L (2008) Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by DNAH11 mutations. *Hum Mutat* 29:289-298.
- Sengupta P, Xu Y, Wang L, Widom R, Smith BD (2005) Collagen alpha1(I) gene (COL1A1) is repressed by RFX family. *J Biol Chem* 280:21004-21014.
- Sengupta PK, Fargo J, Smith BD (2002) The RFX family interacts at the collagen (COL1A2) start site and represses transcription. *J Biol Chem* 277:24926-24937.
- Sheth R, Bastida MF, Ros M (2007) Hoxd and Gli3 interactions modulate digit number in the amniote limb. *Dev Biol* 310:430-441.
- Shimamura K, Rubenstein JL (1997) Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124:2709-2718.
- Shimamura K, Hirano S, McMahon AP, Takeichi M (1994) Wnt-1-dependent regulation of local E-cadherin and alpha N-catenin expression in the embryonic mouse brain. *Development* 120:2225-2234.
- Shu T, Richards LJ (2001) Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum. *J Neurosci* 21:2749-2758.
- Shu T, Puche AC, Richards LJ (2003a) Development of midline glial populations at the corticoseptal boundary. *J Neurobiol* 57:81-94.
- Shu T, Sundaresan V, McCarthy MM, Richards LJ (2003b) Slit2 guides both precrossing and postcrossing callosal axons at the midline in vivo. *J Neurosci* 23:8176-8184.
- Shu T, Li Y, Keller A, Richards LJ (2003c) The glial sling is a migratory population of developing neurons. *Development* 130:2929-2937.
- Signor D, Wedaman KP, Orozco JT, Dwyer ND, Bargmann CI, Rose LS, Scholey JM (1999) Role of a class DHC1b dynein in retrograde transport of IFT motors and IFT raft particles along cilia, but not dendrites, in chemosensory neurons of living *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 147:519-530.

- Silver J, Ogawa MY (1983) Postnatally induced formation of the corpus callosum in acallosal mice on glia-coated cellulose bridges. *Science* 220:1067-1069.
- Silver J, Lorenz SE, Wahlsten D, Coughlin J (1982) Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways. *J Comp Neurol* 210:10-29.
- Simons M, Gloy J, Ganner A, Bullerkotte A, Bashkurov M, Kronig C, Schermer B, Benzing T, Cabello OA, Jenny A, Mlodzik M, Polok B, Driever W, Obara T, Walz G (2005) Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet* 37:537-543.
- Smith KM, Ohkubo Y, Maragnoli ME, Rasin MR, Schwartz ML, Sestan N, Vaccarino FM (2006) Midline radial glia translocation and corpus callosum formation require FGF signaling. *Nat Neurosci* 9:787-797.
- Snow JJ, Ou G, Gunnarson AL, Walker MR, Zhou HM, Brust-Mascher I, Scholey JM (2004) Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on *C. elegans* neurons. *Nat Cell Biol* 6:1109-1113.
- Spassky N, Han YG, Aguilar A, Strehl L, Besse L, Laclef C, Ros MR, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Dev Biol* 317:246-259.
- Steimle V, Durand B, Barras E, Zufferey M, Hadam MR, Mach B, Reith W (1995) A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome). *Genes Dev* 9:1021-1032.
- Storm EE, Rubenstein JL, Martin GR (2003) Dosage of *Fgf8* determines whether cell survival is positively or negatively regulated in the developing forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1757-1762.
- Storm EE, Garel S, Borello U, Hebert JM, Martinez S, McConnell SK, Martin GR, Rubenstein JL (2006) Dose-dependent functions of *Fgf8* in regulating telencephalic patterning centers. *Development* 133:1831-1844.
- Sturgess JM, Chao J, Wong J, Aspin N, Turner JA (1979) Cilia with defective radial spokes: a cause of human respiratory disease. *N Engl J Med* 300:53-56.
- Sturrock RR (1979) A morphological study of the development of the mouse choroid plexus. *J Anat* 129:777-793.
- Swoboda P, Adler HT, Thomas JH (2000) The RFX-type transcription factor DAF-19 regulates sensory neuron cilium formation in *C. elegans*. *Mol Cell* 5:411-421.
- Takeda S, Yonekawa Y, Tanaka Y, Okada Y, Nonaka S, Hirokawa N (1999) Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by *kif3A*^{-/-} mice analysis. *J Cell Biol* 145:825-836.
- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467:60-79.
- Tanaka Y, Okada Y, Hirokawa N (2005) FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* 435:172-177.
- te Welscher P, Fernandez-Teran M, Ros MA, Zeller R (2002) Mutual genetic antagonism involving *GLI3* and *dHAND* prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to *SHH* signaling. *Genes Dev* 16:421-426.
- Theil T, Alvarez-Bolado G, Walter A, Ruther U (1999) *Gli3* is required for *Emx* gene expression during dorsal telencephalon development. *Development* 126:3561-3571.

- Theil T, Aydin S, Koch S, Grotewold L, Ruther U (2002) Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded *Emx2* expression in the dorsal telencephalon. *Development* 129:3045-3054.
- Tickle C, Summerbell D, Wolpert L (1975) Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* 254:199-202.
- Tole S, Ragsdale CW, Grove EA (2000) Dorsoventral patterning of the telencephalon is disrupted in the mouse mutant *extra-toes(J)*. *Dev Biol* 217:254-265.
- Tole S, Gutin G, Bhatnagar L, Remedios R, Hebert JM (2006) Development of midline cell types and commissural axon tracts requires *Fgfr1* in the cerebrum. *Dev Biol* 289:141-151.
- Tribulo C, Aybar MJ, Sanchez SS, Mayor R (2004) A balance between the anti-apoptotic activity of *Slug* and the apoptotic activity of *msx1* is required for the proper development of the neural crest. *Dev Biol* 275:325-342.
- Tsujikawa M, Malicki J (2004) Intraflagellar transport genes are essential for differentiation and survival of vertebrate sensory neurons. *Neuron* 42:703-716.
- Vandaele C, Coulon-Bublex M, Couble P, Durand B (2001) *Drosophila* regulatory factor X is an embryonic type I sensory neuron marker also expressed in spermatids and in the brain of *Drosophila*. *Mech Dev* 103:159-162.
- VanWert JM, Wolfe SA, Grimes SR (2008) Binding of RFX2 and NF-Y to the testis-specific histone H1t promoter may be required for transcriptional activation in primary spermatocytes. *J Cell Biochem* 104:1087-1101.
- Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5:367-377.
- Vierkotten J, Dildrop R, Peters T, Wang B, Ruther U (2007) *Ftm* is a novel basal body protein of cilia involved in *Shh* signalling. *Development* 134:2569-2577.
- Villard J, Peretti M, Masternak K, Barras E, Caretti G, Mantovani R, Reith W (2000) A functionally essential domain of RFX5 mediates activation of major histocompatibility complex class II promoters by promoting cooperative binding between RFX and NF-Y. *Mol Cell Biol* 20:3364-3376.
- Wang B, Fallon JF, Beachy PA (2000) Hedgehog-regulated processing of *Gli3* produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100:423-434.
- Wang KR, Nemoto T, Yokota Y (2007) RFX1 mediates the serum-induced immediate early response of *Id2* gene expression. *J Biol Chem* 282:26167-26177.
- Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashthiti R, Whelan S, Bacallao R, Torra R, LaRusso NF, Torres VE, Harris PC (2003) Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* 12:2703-2710.
- Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X, Kubly V, Cunningham JM, Bacallao R, Ishibashi M, Milliner DS, Torres VE, Harris PC (2002) The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* 30:259-269.
- Wessels MW, den Hollander NS, Willems PJ (2003) Mild fetal cerebral ventriculomegaly as a prenatal sonographic marker for Kartagener syndrome. *Prenat Diagn* 23:239-242.
- Winkelbauer ME, Schafer JC, Haycraft CJ, Swoboda P, Yoder BK (2005) The *C. elegans* homologs of nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are cilia transition zone proteins involved in chemosensory perception. *J Cell Sci* 118:5575-5587.

- Witman GB, Plummer J, Sander G (1978) Chlamydomonas flagellar mutants lacking radial spokes and central tubules. Structure, composition, and function of specific axonemal components. *J Cell Biol* 76:729-747.
- Wolfe SA, Vanwert JM, Grimes SR (2008) Transcription factor RFX4 binding to the testis-specific histone H1t promoter in spermatocytes may be important for regulation of H1t gene transcription during spermatogenesis. *J Cell Biochem* 105:61-69.
- Wolfe SA, Wilkerson DC, Prado S, Grimes SR (2004) Regulatory factor X2 (RFX2) binds to the H1t/TE1 promoter element and activates transcription of the testis-specific histone H1t gene. *J Cell Biochem* 91:375-383.
- Wu SY, McLeod M (1995) The sak1+ gene of Schizosaccharomyces pombe encodes an RFX family DNA-binding protein that positively regulates cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated exit from the mitotic cell cycle. *Mol Cell Biol* 15:1479-1488.
- Xiong H, Chen Y, Yi Y, Tsuchiya K, Moeckel G, Cheung J, Liang D, Tham K, Xu X, Chen XZ, Pei Y, Zhao ZJ, Wu G (2002) A novel gene encoding a TIG multiple domain protein is a positional candidate for autosomal recessive polycystic kidney disease. *Genomics* 80:96-104.
- Xu Y, Sengupta PK, Seto E, Smith BD (2006) Regulatory factor for X-box family proteins differentially interact with histone deacetylases to repress collagen alpha2(I) gene (COL1A2) expression. *J Biol Chem* 281:9260-9270.
- Yang P, Yang C, Sale WS (2004) Flagellar radial spoke protein 2 is a calmodulin binding protein required for motility in Chlamydomonas reinhardtii. *Eukaryot Cell* 3:72-81.
- Yang P, Diener DR, Rosenbaum JL, Sale WS (2001) Localization of calmodulin and dynein light chain LC8 in flagellar radial spokes. *J Cell Biol* 153:1315-1326.
- Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA, Rosenthal A (1998) FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93:755-766.
- Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM (2002) The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13:2508-2516.
- Zaim J, Speina E, Kierzek AM (2005) Identification of new genes regulated by the Crt1 transcription factor, an effector of the DNA damage checkpoint pathway in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* 280:28-37.
- Zaki PA, Martynoga B, Delafield-Butt JT, Fotaki V, Yu T, Price DJ (2005) Loss of Gli3 enhances the viability of embryonic telencephalic cells in vitro. *Eur J Neurosci* 22:1547-1551.
- Zaki W (1981) Ultrastructure of the choroid plexus and its development in the mouse. *Z Mikrosk Anat Forsch* 95:919-935.
- Zarbališ K, May SR, Shen Y, Ekker M, Rubenstein JL, Peterson AS (2004) A focused and efficient genetic screening strategy in the mouse: identification of mutations that disrupt cortical development. *PLoS Biol* 2:E219.
- Zhang D, Stumpo DJ, Graves JP, DeGraff LM, Grissom SF, Collins JB, Li L, Zeldin DC, Blackshear PJ (2006) Identification of potential target genes for RFX4_v3, a transcription factor critical for brain development. *J Neurochem* 98:860-875.
- Zhuo L, Theis M, Alvarez-Maya I, Brenner M, Willecke K, Messing A (2001) hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis* 31:85-94.

