

Université de Montréal

**Études moléculaires du rôle de *Pax6* lors du développement
de la rétine et des cellules souches rétiniennes**

par

Robert-Hugues Duparc

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc.)

Décembre 2004

© Robert-Hugues Duparc



QH

506

U54

2005

v. 014

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Études moléculaires du rôle de *Pax6* lors du développement
de la rétine et des cellules souches rétiniennes**

présenté par

Robert-Hugues Duparc

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr. Dindial Ramotar

Directeur de recherche : Dr. Gilbert Bernier

Membre du jury : Dr. Éric Rassart

Résumé

Le facteur de transcription Pax6 est requis pour la formation de l'œil aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Son inactivation dans les progéniteurs rétiniens se traduit par une réduction de la prolifération et la génération d'une rétine exclusivement composée de cellules amacrines. Nos travaux montrent que la régulation de la prolifération par Pax6 dans les cellules souches et les progéniteurs rétiniens précoces est différente de celle dans les progéniteurs plus matures. Dans les embryons Pax6^{-/-}, les cellules souches rétiniennes embryonnaires (CSRE) sont plus nombreuses que dans les embryons normaux. La mutation de Pax6 résulte en une surprolifération des cellules souches, tandis que la transduction de Pax6 réprime la prolifération. La différenciation des progéniteurs rétiniens Pax6^{-/-} en de multiples types cellulaires rétiniens et leur prolifération normale *in vitro* combinées à l'altération de la voie Notch suggèrent un mécanisme contrôle extrinsèque de la prolifération et de la multipotence des progéniteurs rétiniens par Pax6.

Mots clés :

Pax6, homéobox, développement, vésicule optique, rétine, cellule souche, progéniteur, Notch

Abstract

The transcription factor Pax6 is required for eye formation in vertebrates and invertebrates and conditional inactivation of *Pax6* in mouse retinal progenitor cells (RPCs) results in reduced proliferation and in the exclusive generation of amacrine neurons. Here we show that *Pax6* function in retinal stem cell proliferation is distinct from that in RPC. In *Pax6*^{-/-} embryos, embryonic retinal stem cells (ERSCs) were more abundant than normal. *Pax6* mutation resulted in ERSCs overproliferation, while *Pax6* transduction repressed proliferation. Notably, differentiation of *Pax6*^{-/-} RPCs into multiple retinal cell types and normal proliferation *in vitro* combined to altered *Notch* expression argues for non-cell autonomous control mechanisms of RPCs proliferation and multipotency by *Pax6*.

Keywords:

Pax6, homeobox, development, retina, stem cell, progenitor, optic vesicle, Notch.

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Table des matières.....	V
Liste des figures.....	VIII
Liste des abréviations.....	IX
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Origine, structure et composition de la rétine.....	2
1.1.1 Organogenèse oculaire.....	2
1.1.2 Structure et cellules rétiniennes.....	7
1.2 Les cellules rétiniennes.....	10
1.2.1 Les cellules souches.....	10
1.2.2 L'origine des différents types cellulaires rétiniens.....	11
1.3 Le rôle de <i>Pax6</i> au cours de l'organogenèse oculaire.....	12
1.3.1 Identification du gène <i>Pax6</i>	12
1.3.2 Structure et fonction de <i>Pax6</i>	12
1.3.3 Cibles transcriptionnelles de <i>Pax6</i>	13
1.3.4 Expression de <i>Pax6</i>	16
1.4 Études fonctionnelles de <i>Pax6</i>	18
1.5 L'équilibre entre la prolifération et la différenciation.....	20

Chapitre 2 : Article	23
2.1 Abstract.....	25
2.2 Introduction.....	26
2.3 Materials and methods.....	28
2.3.1 Animals.....	28
2.3.2 Differentiation.....	28
2.3.3 Cell cycle analysis.....	29
2.3.4 Primary cultures.....	29
2.3.5 Cell culture.....	30
2.3.6 Immunofluorescence.....	30
2.4 Results.....	32
2.4.1 Long-term self-renewing neural stem cells in the mouse optic vesicle.....	32
2.4.2 Neural spheres from the optic vesicle have a retinal identity and are multipotent.....	33
2.4.3 Pax6 is expressed by but is not required for the generation of ERSCs.....	34
2.4.4 Pax6 negatively regulates retinal sphere proliferation.....	36
2.4.5 <i>Pax6</i> deficiency distinguishes retinal stem from committed RPCs.....	39
2.4.6 <i>Pax6</i> -null retinal spheres can generate amacrine, cone photoreceptor and Müller glial cells <i>in vitro</i>	41

2.5 Discussion.....	49
2.5.1 <i>Pax6</i> is a negative regulator of retinal cells proliferation.....	49
2.5.2 <i>Pax6</i> coordinates retinal progenitor cells proliferation and differentiation.....	52
2.6 References.....	54
Chapitre 3 : Discussion et conclusion.....	57
3.1 Discussion.....	58
3.2 Conclusion.....	72
Références.....	73

Listes des figures

Introduction

Figure 1.1	Représentation schématique de l'évolution des vésicules céphaliques au cours de l'embryogenèse.....	4
Figure 1.2	Formation de l'œil.....	6
Figure 1.3	Structure de la rétine.....	8
Figure 1.4	Gènes dont l'expression dépend de Pax6 au cours du développement de la rétine.....	15
Figure 1.5	Expression de <i>Pax6</i>	17
Figure 1.6	La voie Notch assure la répression de la différenciation.....	21

Article

Figure 2.1	Differentiation of retinal progenitor cells.....	44
Figure 2.2	Expansion of the retinal stem cells pool.....	45
Figure 2.3	Proliferation of retinal progenitor cell.....	46
Figure 2.4	Multipotency of <i>Pax6</i> ^{-/-} retinal progenitor cells.....	47
Figure 2.5	Alteration of the Notch signaling pathway.....	48

Discussion

Figure 3.1	Coopération entre les bHLH et la voie Notch.....	70
------------	--	----

Liste des abréviations

bHLH : basic helix-loop-helix

BrdU : 5-bromo-2 -deoxyuridine

CSRE : cellule souche rétinienne embryonnaire

FACS : Flow accelerated cell sorting

HD : homeodomain

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PD : paired domain

PH3 : Phospho-histone H3

PI : iodure de propidium

RPC : retinal progenitor cell

SNC : système nerveux central

TUNEL : Terminal deoxynucleodityl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling

WT : Wild type

ZV : Zone ventriculaire

Chapitre I : Introduction

La biologie du développement est étroitement liée à la génétique qui étudie le fonctionnement des gènes, et à la biologie moléculaire qui s'intéresse aux cellules et à leur devenir. Dans le cas de la formation de l'œil, le gène *Pax6* est le maître régulateur agissant au sommet de la cascade génétique contrôlant le développement de l'œil. L'introduction de ce mémoire est une revue de la littérature sur le développement oculaire et sur le gène *Pax6*.

1.1 Origine, structure et composition de la rétine

1.1.1 Organogenèse oculaire

Les yeux sont une émanation du cerveau. Il ne s'agit pas d'un organe comme le foie ou le rein, mais d'une expansion du cerveau cherchant à explorer son environnement. Cette origine neurologique se retrouve dans l'embryologie.

Le système nerveux des vertébrés se met en place lors du développement embryonnaire. Il dérive du feuillet embryonnaire externe dorsal : le neuroderme. Ce dernier, au cours de la neurulation, subit d'importants mouvements morphogénétiques, aboutissant à la formation d'un tube neural dorsal. Ce tube neural est à l'origine du système nerveux central (encéphale et moelle épinière des vertébrés) (Furelaud et Delarue, 2004).

La partie antérieure du tube neural présente un renflement, correspondant à une vésicule unique. Il s'agit de l'ébauche du système nerveux céphalique. Pendant l'organogenèse, cette vésicule se divise dans un premier temps en trois vésicules, puis en cinq vésicules (par subdivision de deux des trois vésicules) aboutissant chacune à la formation de structures bien précises du système nerveux des vertébrés (Figure 1.1) (Furelaud et Delarue, 2004).

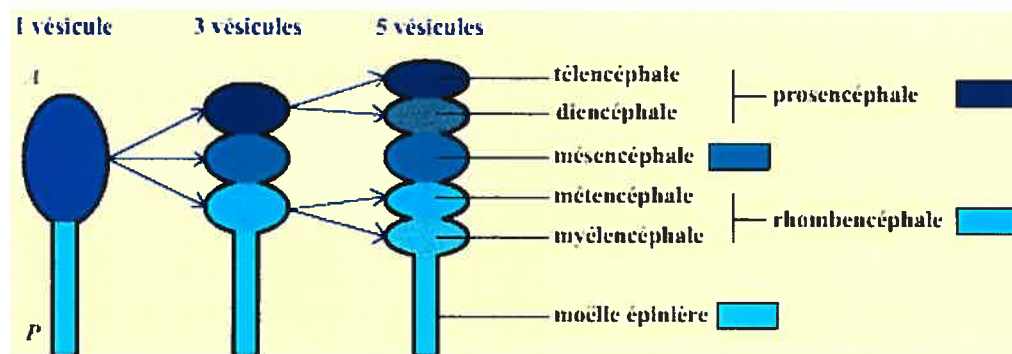


Figure 1.1. Représentation schématique de l'évolution des vésicules céphaliques au cours de l'embryogenèse. Le tube neural est représenté selon l'axe antéro-postérieur (A-P). La vésicule initiale donne naissance à trois vésicules : le proscéphale (antérieur), le mésencéphale (moyen), et le rhombencéphale (postérieur). Le proscéphale se divise ensuite en un télencéphale (antérieur) et un diencéphale, alors que le rhombencéphale donne le métencéphale et le myélocéphale (postérieur) : à ce stade, la partie antérieure du tube neural est composée de cinq vésicules. La partie postérieure du tube neural donne la moëlle épinière (Furelaud et Delarue, 2004).

Au niveau céphalique, et plus précisément au niveau du diencéphale, apparaissent deux expansions latérales à l'origine de la formation des yeux : les vésicules optiques qui s'avancent vers l'ectoderme de surface. L'ectoderme situé à leur contact s'épaissit, se différenciant en une placode cristallinienne, qui s'invagine en vésicule cristalline. Dans le même temps, la vésicule optique se replie en une coupe optique, qui se referme progressivement en une sphère creuse rattachée au cerveau par les pédoncules optiques (futurs nerfs optiques). L'ectoderme à proximité des coupes va s'épaissir pour former les deux placodes optiques (futurs cristallins). Ces placodes vont s'invaginer pour donner les vésicules cristallines creuses et positionnées dans les coupes optiques et se transformer progressivement en cristallin (Figure 1.2) (Cabana, 2004).

L'ectoderme induit dans la zone de la coupe optique qui est en son contact (zone invaginée), la transformation en neurorétine (la rétine sensorielle) tandis que les cellules de la zone de la coupe non invaginée (postérieures et qui ne contactent pas l'ectoderme) sont au contact des vaisseaux et vont se pigmenter pour donner l'épithélium pigmenté de la rétine. Le mésenchyme péri-oculaire va se condenser pour former les muscles extrinsèques de l'œil (Cabana, 2004).

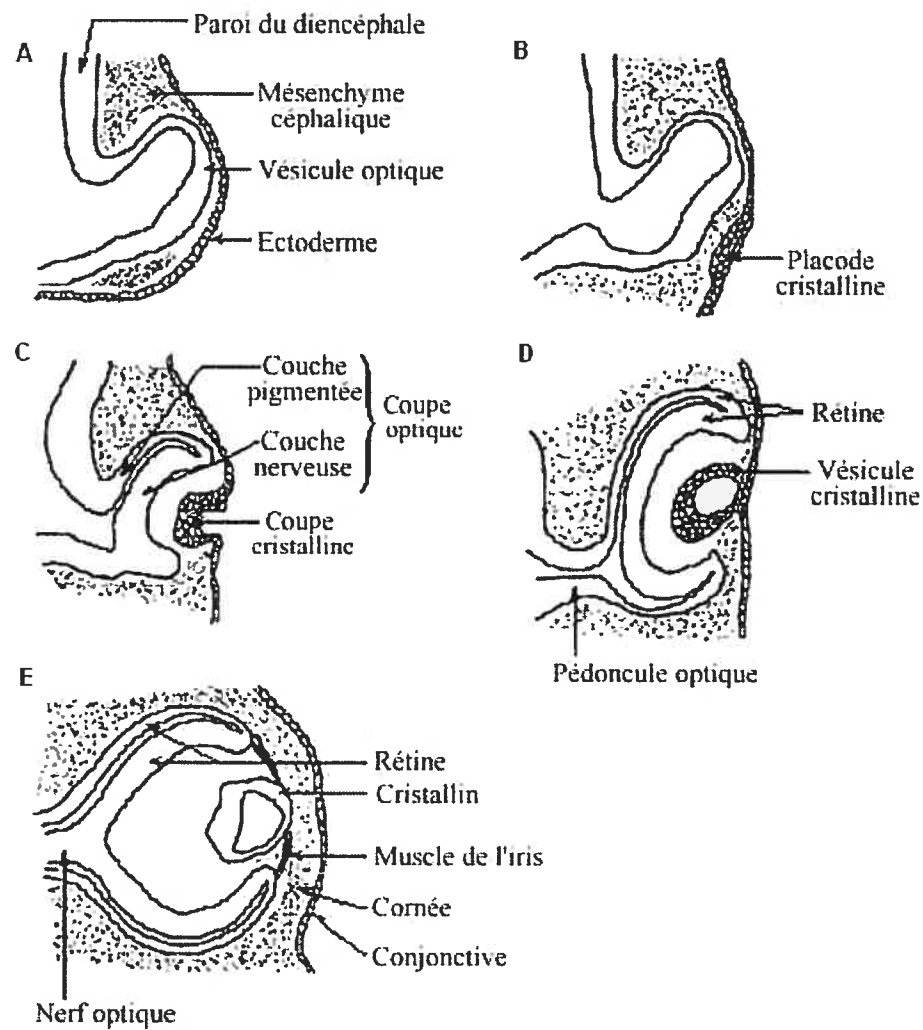


Figure 1.2. Formation de l'œil. A) Formation, au niveau du diencephale, des expansions latérales appelées les vésicules optiques qui s'avancent vers l'ectoderme de surface. B) Formation d'une placode cristalline par épaissement et différenciation de l'ectoderme de surface. C) Invagination de la placode cristalline en vésicule cristalline et repliement de la vésicule optique en coupe optique, qui se referme progressivement en une sphère creuse rattachée au cerveau par les pédoncules optiques. Transformation en neurorétine de la zone de la coupe optique en contact avec la coupe cristalline. Les cellules de la zone de la coupe non invaginée (postérieures et qui ne contactent pas l'ectoderme) sont au contact des vaisseaux et vont se pigmenter pour donner l'épithélium pigmenté de la rétine. D) La coupe cristalline se referme en une vésicule cristalline. E) Le mésenchyme péri-oculaire va se condenser pour former les muscles extrinsèques de l'œil (Adapté de Cabana, 2004).

1.1.2 Structure et cellules rétiniennes

La rétine est le lieu de traduction du message lumineux venant de l'extérieur en influx nerveux envoyés au cerveau. Il s'agit d'un tissu neuronal très fin, organisé en couches successives de cellules (lamination). Celles-ci comprennent l'épithélium pigmentaire, la couche des photorécepteurs, la membrane limitante, la couche granuleuse et les couches plexiformes externe et interne, la couche des cellules ganglionnaires, la couche des axones des cellules ganglionnaires et finalement la membrane limitante interne (Figure 1.3).

La plus profonde, par rapport à l'arrivée de la lumière est, paradoxalement, la couche de photorécepteurs. La lumière doit donc traverser la rétine avant d'atteindre les photorécepteurs. Il en existe deux types : les bâtonnets responsables de la vision aux faibles intensités lumineuses, et les cônes, responsables de la vision diurne et capables de discriminer les couleurs.

La couche granuleuse interne comporte une variété de neurones rétiniens, les cellules bipolaires (qui constituent la voie directe de transmission du message nerveux), les cellules horizontales et les cellules amacrines.

La couche des cellules ganglionnaires, la dernière couche nerveuse de la rétine, constitue l'étage de sortie vers le cerveau. Les axones de ces cellules se rejoignent au niveau de la papille pour former le nerf optique, relié au cerveau. Les cellules

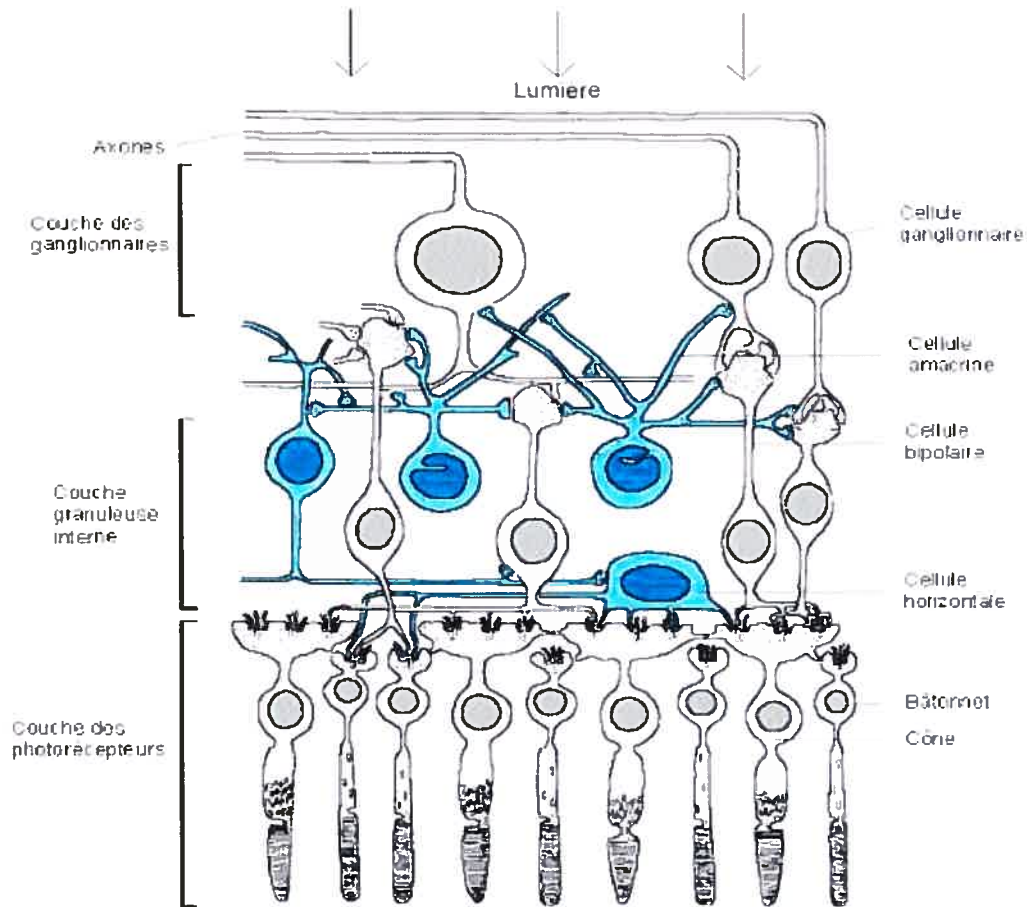


Figure 1.3. Structure de la rétine. La rétine est le lieu de traduction du message lumineux venant de l'extérieur en signaux nerveux envoyés au cerveau. Il s'agit d'un tissu neuronal très fin, organisé en couches successives de cellules. Celles-ci comprennent l'épithélium pigmentaire, la couche des photorécepteurs, la membrane limitante, la couche granuleuse et les couches plexiformes externe et interne, la couche des cellules ganglionnaires, la couche des axones des cellules ganglionnaires et finalement la membrane limitante interne. La plus profonde, par rapport à l'arrivée de la lumière est la couche des photorécepteurs (bâtonnets et cônes) La couche granuleuse interne, comporte une variété de neurones rétiniens, les cellules bipolaires (qui constituent la voie directe de transmission du message nerveux), les cellules horizontales et les cellules amacrines. La couche des cellules ganglionnaires, la dernière couche nerveuse de la rétine, constitue l'étage de sortie vers le cerveau. Les axones de ces cellules se rejoignent au niveau de la papille pour former le nerf optique, relié au cerveau. (Bajeux *et al.*, 2004).

ganglionnaires envoient vers les centres cérébraux de la vision les résultats de l'élaboration du message visuel.

Ce message visuel est déjà relativement épuré puisqu'il subit un traitement assez important dans la rétine, par le jeu d'une circulation latérale et parfois centrifuge (dans la direction cellules ganglionnaires → photorécepteurs) du signal nerveux. Cette circulation a lieu dans des réseaux complexes où les cellules horizontales et les cellules amacrines jouent un rôle important. Par conséquent, la rétine est un véritable réseau nerveux.

Le support structural ainsi que l'apport nourricier des cellules rétiniennes sont assurés par les cellules gliales de Müller qui s'étendent à travers toute la rétine. Il s'agit du seul type de cellules gliales de la rétine même si l'on peut aussi retrouver des astrocytes. Ces derniers sont relativement rares et ne sont pas de vraies cellules rétiniennes puisqu'ils proviennent en fait du cerveau et arrivent dans la rétine en développement par le nerf optique (Watanabe et Raff, 1988).

1.2 Les cellules rétiniennes

1.2.1 Les cellules souches

Les cellules rétiniennes, comme toutes les cellules spécialisées, originent de cellules primitives, en l'occurrence, les progéniteurs rétiniens (RPC : retinal progenitor cell) qui, eux-mêmes, originent de cellules encore plus primitives, les cellules souches. Les cellules souches sont des cellules indifférenciées ayant une capacité d'auto-renouvellement à long terme, un grand potentiel de prolifération et une capacité de générer des cellules filles pouvant se différencier en un ou plusieurs types cellulaires (Gage, 2000). Si au début d'une organogenèse l'expansion des cellules souches résulte de divisions symétriques (à la suite d'une division, deux cellules souches filles sont générées), le maintien de ces caractéristiques est par la suite assuré par la division asymétrique qui permet à une cellule souche de générer d'une part, des progéniteurs multipotents qui généreront des précurseurs puis des cellules différenciées et, d'autre part, des copies d'elle-même. Bien que les cellules souches soient présentes durant toute l'ontogenèse et la vie de l'organisme, au fur et à mesure que les cellules matures se forment, leur nombre diminue jusqu'à ne se retrouver que peu nombreuses et localisées dans une petite structure appelée niche.

Dans l'œil adulte, les cellules souches sont localisées dans le corps ciliaire (la niche dans l'œil adulte) (Tropepe *et al.*, 2000). Ces cellules souches adultes peuvent proliférer et former une neurosphère constituée de cellules pouvant se différencier en

des types cellulaires spécifiques à la rétine (bâtonnets, cellules bipolaires, cellules gliales de Müller) (Tropepe *et al.*, 2000).

1.2.2 L'origine des différents types cellulaires réiniens

La rétinogénèse implique donc initialement la prolifération des progéniteurs suivie d'un processus de différenciation couplé à la sortie du cycle cellulaire. La coordination entre la prolifération et la différenciation est cruciale dans le contrôle de la taille, la forme et l'histogénèse de la rétine.

Durant la rétinogénèse, les sept types cellulaires réiniens générés proviennent d'un même pool de progéniteurs multipotents. Une caractéristique de la rétinogénèse est l'ordre chronologique de génération des cellules : (Prada *et al.*, 1991). Ainsi, sont d'abord générés les cellules ganglionnaires et les cellules horizontales, puis les cônes, les cellules amacrines, les bâtonnets et les cellules bipolaires et, finalement, les cellules gliales de Müller (Prada *et al.*, 1991). La compétence des progéniteurs varie en fonction du temps. Ceci résulte de l'action de régulateurs extrinsèques (tels que des facteurs neurotrophiques) ou intrinsèques (tels que des facteurs de transcription).

1.3 Le rôle de *Pax6* au cours de l'organogenèse oculaire

1.3.1 Identification du gène *Pax6*

On connaissait depuis de nombreuses années des mutations affectant le développement de l'œil chez les Mammifères. En 1991, le gène associé au phénotype *small eye* de la souris (Hill *et al.*, 1991) et le gène de l'aniridie humaine (Ton *et al.*, 1991) ont été isolés et analysés. *Pax6* est exprimé au cours du développement de l'œil mais aussi du système nerveux central (SNC), du nez et du pancréas (Walther et Gruss, 1991 ; Ton *et al.*, 1991 ; St-Onge *et al.*, 1997).

Un gène homologue de *Pax6* a été isolé chez la drosophile. Il a été démontré que ce dernier est affecté par les mutations *eyeless*. Les gènes *Pax6* (souris, homme) et *eyeless (ey)*(*Drosophila Melanogaster*) sont des gènes homologues. Ainsi, l'œil des mammifères et celui des insectes, bien que structuralement différents, requièrent pour leur développement le même gène homéotique (conservation des caractères génétiques au cours de l'évolution).

1.3.2 Structure et fonction de *Pax6*

Pax6 code pour un facteur de transcription hautement conservé à travers les espèces. Il s'agit d'un membre de la famille des facteurs contenant deux domaines de

liaison à l'ADN : paired (PD) et homeobox (HD) en hélice-tour-hélice (HTH). Ces domaines peuvent lier l'ADN indépendamment l'un de l'autre (Jun et Desplan, 1996). Pax6 étant un facteur de transcription, il possède également un domaine de transactivation en C terminal.

Il n'y a pas que la séquence de *Pax6* qui ait été conservée au cours de l'évolution, mais aussi sa fonction. Ainsi, l'activation ectopique de *Pax6*, aussi bien chez la drosophile que chez un vertébré (xénope) conduit au développement d'yeux complètement formés au niveau, respectivement, des pattes ou des antennes et du tube neural (Halder *et al.*, 1995 ; Chow *et al.*, 1999). Il en résulte que, chez les métazoaires (du ver plat à l'homme), *Pax6*, agit au sommet de la cascade génétique contrôlant le développement des yeux.

1.3.3 Cibles transcriptionnelles de *Pax6*

Certains gènes dont l'expression est régulée par Pax6 au cours du développement oculaire ont été identifiés dans plusieurs espèces. Par exemple, chez la drosophile, le gène *sine oculis* (*so*) (un gène homéobox) est directement régulé par *eyeless* (Niimi *et al.*, 1999) Chez les vertébrés, *Six3* est également exprimé durant le développement de l'œil (dans l'ectoderme de surface et la placode cristalline) et des expériences suggèrent que ce gène serait aussi sous le contrôle de *Pax6* (Chow *et al.*, 1999).

Un autre facteur de transcription dont l'expression est régulée par Pax6 durant le développement de l'œil chez les vertébrés est Maf, un membre de la famille d'oncogènes v-Maf, jouant un rôle dans la différenciation cellulaire du cristallin (Sakai *et al.*, 2001). Dans la rétine, Pax6 régule également l'expression de Necab2 (Neuronal Ca²⁺ binding protein), une protéine de liaison du calcium dans la vésicule optique (Bernier *et al.*, 2001). De plus, Pax6 contrôle directement la transcription des facteurs de transcription pro-neuraux Mash1 ainsi que Math5 et Neurogenine2 (impliqués dans la différenciation respectivement des cellules bipolaires et des cellules ganglionnaires) en se liant directement aux séquences de leurs enhancers (Figure 1.4). Ces facteurs de transcription pro-neuraux appartiennent à la famille des basic helix-loop-helix (bHLH) comprenant également NeuroD (différenciation des cellules amacrines) (Marquardt *et al.*, 2001) mais aussi Myf5 ou MyoD impliqués dans la myogenèse (Bergstrom et Tapscott, 2001). Les protéines bHLH sont reconnues pour leur rôle crucial dans l'établissement de nombreux lignages cellulaires durant le développement embryonnaire. Les bHLH pro-neuraux sont les médiateurs de l'effet de Pax6 sur le potentiel de multiple RPC (Marquardt *et al.*, 2001).

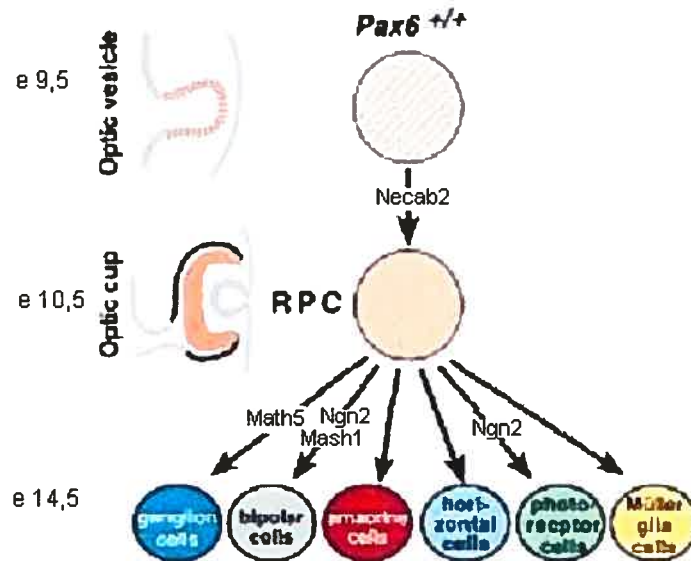


Figure 1.4. Gènes dont l'expression dépend de *Pax6* au cours du développement de la rétine. *Pax6* régule l'expression de *Necab2* dans la vésicule optique. *Pax6* contrôle directement la transcription des facteurs de transcription bHLH *Mash1*, *Math5* et *Neurogenine2*. Les protéines bHLH sont reconnues pour leur rôle crucial durant le développement embryonnaire et sont les médiateurs de l'effet de *Pax6* sur la différenciation cellulaire des RPC (Adapté de Marquardt *et al.*, 2001).

1.3.4 Expression de *Pax6*

L'expression de *Pax6* débute vers e 8,5 dans la portion antérieure de la plaque neurale (qui donnera le télencéphale, le diencéphale et les yeux). Plus tard durant le développement, *Pax6* est exprimé dans les yeux, le cerveau et la moelle épinière (Figure 1.5B) (Walther et Gruss, 1991). Au niveau de la vésicule optique, l'absence de *Pax6* entraîne la perte de contact entre la vésicule optique et l'ectoderme de surface (causant un début de décollement et l'impossibilité des interactions nécessaires au développement de l'œil) (Figure 1.5A). On observe aussi une perte de l'expression dans l'ectoderme devant former le cristallin (*Pax6* étant requis pour maintenir sa propre transcription). Il en résulte que, en l'absence complète de *Pax6*, le développement de la rétine ne peut excéder le stade de vésicule optique, d'où l'anophtalmie observée chez les embryons *Pax6*^{-/-} (Figure 1.5B). *Pax6* est également exprimé dans la placode nasale ainsi que dans les cellules α du pancréas (cellules productrices de glucagon avec les cellules δ et γ) (Quinn *et al.*, 1996 ; St-Onge *et al.*, 1997). Par ailleurs, la perte de *Pax6* conduit à l'absence de structures nasales ainsi qu'à de graves anomalies au cerveau et une mort post natale rapide (Schmahl *et al.*, 1993).

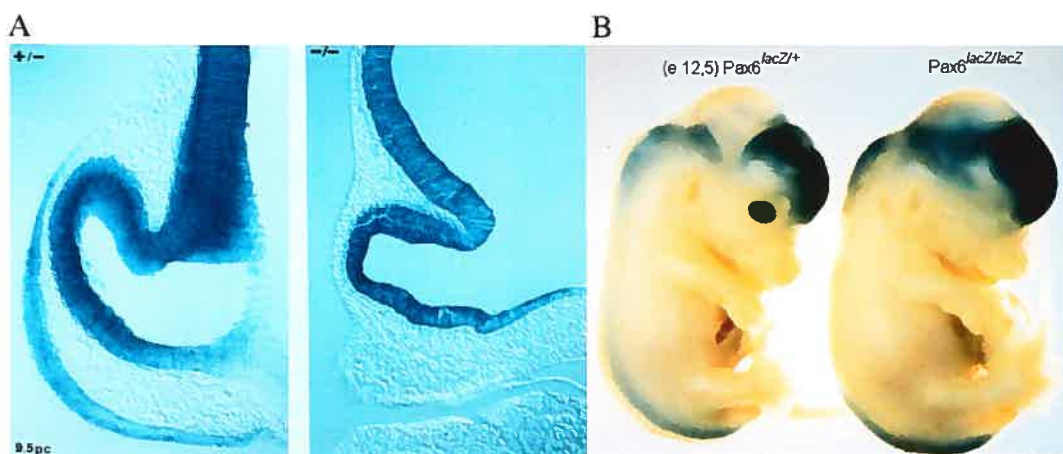


Figure 1.5. Expression de *Pax6*. Coloration X-gal sur embryons de souris *Pax6^{lacZ/+}* et *Pax6^{lacZ/lacZ}*. A) Vésicules optiques à e 9,5. Au niveau de la vésicule optique, l'absence de *Pax6* entraîne la perte de contact entre la vésicule optique et l'ectoderme de surface (causant un début de décollement et l'impossibilité des interactions nécessaires au développement de l'œil). L'expression est aussi perdue dans l'ectoderme devant former le cristallin (*Pax6* étant requis pour maintenir sa propre transcription). Il en résulte que, en l'absence complète de *Pax6*, le développement de la rétine ne peut excéder le stade de vésicule optique. B) Embryon à e 12,5 montrant l'anophtalmie observée en l'absence de *Pax6*.

1.4. Études fonctionnelles de *Pax6*

Le développement de la rétine ne pouvant excéder le stade de vésicule optique en l'absence complète de *Pax6*, les premières études fonctionnelles dans l'œil se bornaient à l'étude des anomalies de développement causées par la mutation de *Pax6*. Néanmoins, il a pu être observé qu'en l'absence de *Pax6*, la vésicule optique formée présente des anomalies morphologiques. La vésicule est plus large et il n'y a pas de constriction proximale (nécessaire pour former une coupe optique) (Grindley *et al.*, 1995). Malgré les défauts morphologiques, la spécification proximo-distale reste intacte (Grindley *et al.*, 1995). De plus, *Six6*, un marqueur rétinien précoce exprimé dans la vésicule optique et nécessaire à l'établissement des domaines de la neurorétine, ne requière pas *Pax6* pour son expression (Jean *et al.*, 1999). Cependant, il a été démontré que le gène *Pax6* a un enhancer intronique α essentiel d'une part, à l'établissement d'un gradient proximo^{bas}-distal^{haut} de son activité dans la coupe optique et, d'autre part, à l'établissement et au maintien des caractéristiques dorsales et naso-temporales dans la vésicule et la coupe optiques (Bäumer *et al.*, 2002). La sur-expression de *Pax6* résulte en une microphthalmie associée à de nombreuses malformations affectant le corps ciliaire, l'iris et la cornée (Schedl *et al.*, 1996).

Des expériences de greffes tissulaires sur explants de vésicules optiques de rats ont permis d'établir que l'expression de *Pax6* dans l'ectoderme est indispensable à la formation du cristallin (Fujiwara *et al.*, 1994). Des expériences sur des embryons

souris chimériques (formés par l'agrégation d'embryons WT et *Pax6*^{-/-}) ont révélé que *Pax6* est requis dans la vésicule optique pour le maintien du contact avec l'ectoderme de surface et induire la formation de la placode cristalline (Collinson *et al.*, 2000). D'autre part, la ségrégation des cellules normales et *Pax6*^{-/-} montre que l'expression des molécules d'adhésion est altérée en l'absence de *Pax6*. Il a d'ailleurs été montré que sans *Pax6*, les cellules à l'extrémité distale de la coupe optique n'expriment pas la N-cadhérine (Van Raamsdonk et Tilghman, 2000).

D'autres études ont été réalisées avec des mutants conditionnels. Une étude a montré que lorsque *Pax6* est inactivé spécifiquement dans l'ectoderme de surface, non seulement le cristallin ne se forme pas, mais la rétine présente des anomalies d'emplacement et de nombre (formation de plusieurs rétines dans le même œil) (Ashery-Padan *et al.*, 2000). Un mutant conditionnel de *Pax6* dans la rétine a été créé permettant l'étude du rôle de *Pax6* dans les progéniteurs rétiniens. Ainsi, lorsque *Pax6* est inactivé dans la rétine au jour 10,5, une rétine est générée mais présente une réduction de taille importante et ne contient qu'un type cellulaire, les cellules amacrines. Ceci montre que dans les RPC, l'expression de *Pax6* serait requise pour leur prolifération normale et leur multipotence (Marquardt *et al.*, 2001).

1.5 L'équilibre entre la prolifération et la différenciation

L'activité de *Pax6* dans les RPC est requise pour l'activation directe des facteurs de transcription bHLH (tels que *Math5*, *Ngn2* et *Mash1*) (Marquardt *et al.*, 2001). L'activation de ces gènes proneuraux permet l'engagement des RPC dans une voie de différenciation.

L'équilibre entre la prolifération et la différenciation est assuré par la voie Notch. Lorsque Delta (le ligand) lie le récepteur Notch, le domaine intracellulaire de ce dernier est clivé et transloqué au noyau où il se complexe à une protéine de liaison à l'ADN pour induire l'expression de *Hes1* et *Hes5*. Ces effecteurs de la voie Notch sont des répresseurs de l'activation des gènes proneuraux bHLH (Ohtsuka *et al.*, 1999)

Les récepteurs de la voie Notch sont activés par les ligands (Delta) présents à la surface des cellules adjacentes (Ohtsuka *et al.*, 1999). Il s'ensuit une inhibition latérale de la différenciation ne permettant l'activation des gènes proneuraux que dans un sous ensemble de cellules (Figure 1.6).

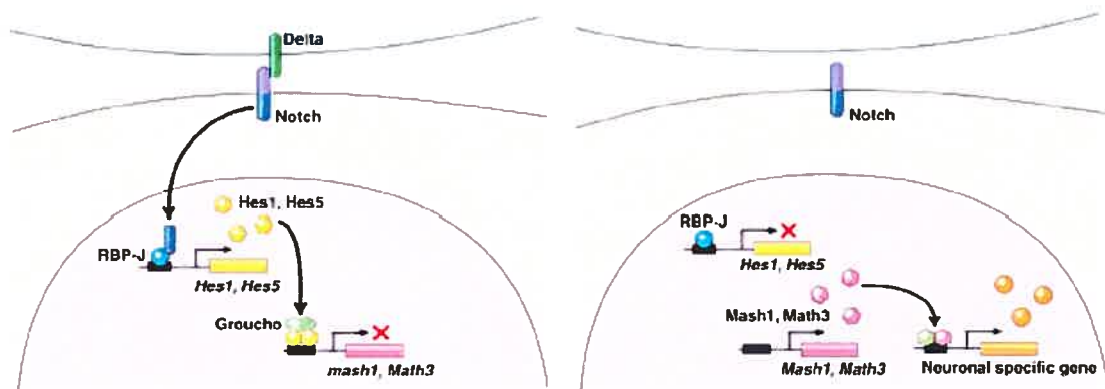


Figure 1.6. La voie Notch assure la répression de la différenciation. Lorsque Delta (le ligand) lie le récepteur Notch, le domaine intracellulaire de ce dernier est clivé et transloqué au noyau où il se complexe à une protéine de liaison à l'ADN pour induire l'expression de *Hes1* et *Hes5*. Ces effecteurs de la voie Notch sont des répresseurs de l'activation des gènes proneuraux bHLH (Hatakeyama et Kageyama, 2004).

Différentes études réalisées sur *Pax6* tentent d'élucider la fonction de ce gène au cours du développement oculaire. *Pax6* semble être impliqué dans la coordination de deux processus cruciaux pour le développement, la prolifération et la différenciation cellulaire.

Cependant, toutes les études de la fonction de *Pax6* dans les cellules primitives de l'œil se heurtent à une contrainte majeure, l'impossibilité d'obtenir ces cellules en l'absence totale de ce gène. Les études réalisées avec ces mutants conditionnels portent donc sur des cellules déjà relativement matures et ayant, pendant un certain temps, exprimé *Pax6*. Nous avons mis au point un système de culture cellulaire *in vitro* avec lequel il est possible de contourner ce problème et d'étudier le rôle de *Pax6* au stade de RPC. D'autre part, s'agissant d'un modèle *in vitro*, celui-ci permet donc de discerner le rôle de *Pax6* propre aux cellules provenant des vésicules optiques sans interférences de l'ectoderme de surface.

Chapitre II : Article

Pax6 Operates as a Negative Regulator of Retinal Stem Cell Proliferation in Mammals


**Robert-Hugues Duparc¹, Jocelyn David¹, Mohamed Abdouh¹, Mireille Lépine¹
and Gilbert Bernier^{1,2,*}**

¹ Developmental Biology Laboratory, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 Boul. l'Assomption, Montreal, Canada, H1T 2M4

² Department of Ophthalmology, University of Montreal, Montreal, Canada

*Corresponding author:

Tel: 514-252-3400 ext. 4648

Fax: 514-252-3569


2.1 Abstract

The transcription factor Pax6 is required for eye formation in vertebrates and invertebrates and conditional inactivation of *Pax6* in mouse retinal progenitor cells (RPCs) results in reduced proliferation and in the exclusive generation of amacrine neurons. Here we show that *Pax6* function in retinal stem cell proliferation is distinct from that in RPC. In *Pax6*^{-/-} embryos, embryonic retinal stem cells (ERSCs) were more abundant than normal. *Pax6* mutation resulted in ERSCs overproliferation, while *Pax6* transduction repressed proliferation. Notably, differentiation of *Pax6*^{-/-} RPCs into multiple retinal cell types and normal proliferation *in vitro* combined to altered *Notch* expression argues for non-cell autonomous control mechanisms of RPCs proliferation and multipotency by *Pax6*.

2.2 Introduction

Neurons in most regions of the mammalian CNS, including the retina, are generated over an extended period of time during development^{1,2}. The maintenance and regulation of stem cell number over the course of neurogenesis is essential to ensure that neural progenitors and neural cells are produced in correct number and diverse types^{3,4}. The underlying molecular mechanisms regulating stem cell number in the retina are poorly understood.

Pax6 is a member of the paired-box and homeobox-containing gene family (PAX) of transcription factors and is required for eye development in most multi-cellular organisms. In the developing mouse eye, Pax6 is expressed, starting at e8.0, in the eye surface ectoderm, which give rise to the solid lens, and in the eye neural-ectoderm, which give rise to the retina and retinal-pigmented epithelium⁵. Pax6 mutations are semi-dominant and result in the *small eye* phenotype in mice and in *Aniridia* in humans^{6,7}. Mice, humans and flies carrying homozygous mutations in Pax6 are eyeless, and display severe brain malformations⁸⁻¹¹. Conversely, over-expression of Pax6 in flies or frog embryos results in the formation of ectopic eyes, supporting the hypothesis that Pax6 operates as a “master regulator of eye development in multi-cellular organisms”¹²⁻¹⁵. In the mouse, Pax6 null embryos form a morphologically abnormal optic vesicle that arrests in development prior to the optic cup stage^{8,9}. Conditional mutagenesis of *Pax6* beginning at e10.5 in the embryonic retina demonstrated that *Pax6* is also required at later stages of

retinogenesis¹⁶. While normal multipotent retinal progenitor cells (RPCs) give rise sequentially to all six major cell types present in the retina, *Pax6*^{fl-Cre} mutant RPCs give rise to only amacrine neural cells, in part due to a failure to activate the basic Helix-loop-Helix (bHLH) pro-neural genes *Math5*, *Ngn2* and *Mash1*. In addition, *Pax6*^{fl-Cre} mutant RPCs show reduced proliferation, resulting into a hypocellular retina.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Animals

Adult mice from the albinos CD1 or C57BL6 strain were euthanized in a CO₂ chamber while adult Wistar rats were euthanized by decapitation (Charles River, Qc., Canada) all according to CCPA guidelines. Embryos stage was determined according to the time of vaginal plug. For *in situ* hybridization on sections, embryos or eyes were directly embedded in OCT tissue TEK compound and snap-frozen in liquid nitrogen.

2.3.2 Differentiation

The neurospheres were differentiated in chamber slides (8 chambers per slide ; Lab-tek) beforehand coated with poly-D-lysine (0,5 mg/ml; SIGMA) and laminin (10 ng/ml; SIGMA). The neurospheres were placed in DMEM/F12 media (Gibco) containing 0,25% glucose, 2% B27 supplement, Insulin (25 µg/ml; SIGMA), Heparin (2 µg/ml; SIGMA), Gentamycin (25 µg/ml; Gibco) and 1% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco) and cultured 10 days in 37°C in 5% CO₂ atmosphere. After 10 days, the media is replaced by a serum free media with BDNF (10 ng/ml ; Gibco) and NGF (50 ng/ml ; Gibco) during 5 days.

2.3.3 Cell cycle analysis

The neurospheres were WT and *Pax6*^{-/-} collected 3 days after plating DMEM/f12 culture media and dissociated into single cells. The percentage of cells in G₀/G₁, S and G₂/M phases was evaluated by using a propidium iodide (PI) staining procedure for DNA content analysis in flow cytometry (FACS). Approximately 10⁶ cells were fixed overnight in 75% ethanol and incubated for 1 hour on ice with Krishan solution with propidium iodide (50 µg/ml ; Molecular Probes). Then cells were resuspended again, filtered through a 40 µm pore membrane. Then the cell cycle analysis has been made by using ModFit LT 3.0 software.

2.3.4 Primary cultures

The optic vesicle was dissected-out with tungsten needle and put in HBSS. The optical vesicles were triturated by using needles (20G-10x; 22G-5x) in order to obtain individual cells. After centrifugation, the cells were resuspended in DMEM/F12 media (Gibco) containing 0,25% glucose, 2% B27 supplement, Insulin (25 µg/ml; SIGMA), Heparin (2 µg/ml; SIGMA), Gentamycin (25 µg/ml; Gibco) and human recombinant FGF2 (10 ng/ml ; SIGMA) and cultured in a 6 well plate (Sarstedt) during 8 days at 37°C in 5% CO₂ atmosphere.

For passage, neurospheres WT and *Pax6*^{-/-} were dissociated with 0.25% trypsin (SIGMA)/culture media at 37°C during a time proportional to the size of the sphere (2 minutes/unity of size). Dissociation is inhibited by the addition of a 0.05% trypsin inhibitor (SIGMA)/culture media solution. The cells were harvested at 300 G 5 minutes and the media replaced twice. For the counting, the number of cells was calculated with a hemacytometer.

2.3.5 Cell culture

Cultured at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. When applicable, BrdU (SIGMA) was added to the culture media every day at 10ug/ml.

2.3.6 Immunofluorescence

Whole eyes were fixed in 4% PFA/PBS for 1h, washed in PBS and equilibrated o/n at 4°C in 30% sucrose/PBS. The tissues were then immersed in cryomatrix solution (Shandon, Pittsburgh) and snap frozen in liquid nitrogen. Sections were made at 7 um with a cryostat (Leica), air dried on slides for 10 min. and washed 3x with PBS. For cell culture experiments, cells were fixed with in 4% PFA/PBS for 10 min and washed with PBS. For BrdU-labelling experiments, fixed cells (100% ETOH 10 min and then 1% PFA/PBS for 1h) were also treated with DNase I/0.05% HCL for 30 min

in order to revealed BrdU epitopes. Tissue sections or cells were blocked in 1% BSA/0.1% Tween 20/PBS solution for 1 hour, and then incubated with the primary antibodies overnight at 4°C in the same solution. After washes with PBS, sections were incubated with goat anti-rabbit-Texas red conjugated (1/1000) (Mabtec) and/or anti-mouse-FITC conjugated (1:200) (CHEMICON) and/or anti-rat-FITC conjugated (BD Pharmingen) and/or anti-sheep-Texas red conjugated (1:1000) (Molecular Probes) secondary antibodies for 1 hour at RT, rinse with PBS and mounted with Vectashield solution containing DAPI (Vector laboratories). Antibodies: anti-Pax6 rabbit polyclonal from Covance (1:500); anti-Lhx2 rabbit polyclonal from Abcam (1:1000); anti-Six3 rabbit polyclonal is a gift from Guillermot Oliver (1:200); anti-nestin mouse monoclonal from BD Transduction Laboratory (1:1000); anti-BrdU-FITC conjugated mouse monoclonal from CALTAG Laboratories (1:10); anti-PCNA mouse monoclonal from DAKO (1:100); anti-FGFR1 rabbit polyclonal from SIGMA (1:100); anti-CD31/PECAM-1 rat monoclonal from BD Pharmingen (1:50); and anti-Chx10 sheep polyclonal from CEDARLANE Laboratories (1:250).

2.4 Results

2.4.1 Long-term self-renewing neural stem cells in the mouse optic vesicle

The optic vesicle neural ectoderm is derived from the ventral diencephalon and give rise to all neural and glial cells present in the mature retina. To characterize prospective retinal stem cells present in the optic vesicle, we performed dissociated cultures of mouse optic vesicles at e9.5 in serum-free media containing the neural stem cells growth factor (GF) Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) at 10 ng/ml, Epidermal Growth Factor (EGF) at 20 ng/ml, both GF or no GF¹⁷. In the presence of FGF2 or FGF2 + EGF, but not with EGF alone or no GF, an average of 22 growing neurospheres (as confirmed by Bromodeoxy-Uridine (BrdU) incorporation) were obtained per embryo after 1 week in culture (Fig. 1A and B). Average number of cells per sphere was ~5 000 after 1 week in culture. To test if these displayed the hallmark feature of stem cells i.e. self-renewal capability, single or pool of 10 spheres were dissociated to single cells (at day 10) at 2500 cells/ml and re-plated in neural stem cell media containing FGF2. On average, 70 novel growing neurospheres/10 000cells (0.7%) were obtained after the first passage. Single spheres were assayed for their ability for long-term self-renewal by serial passages. We found that after passage 1, FGF2 alone was not sufficient to promote neurospheres growth, and that FGF2 and EGF were required. EGF action on neurospheres could not be substituted by the addition of Insulin-like Growth Factor-1. Under these conditions, neurospheres could

be maintained for up to 7 passages, with a constant ratio of ~70 novel spheres/single dissociated sphere (not shown).

2.4.2 Neural spheres from the optic vesicle have a retinal identity and are multipotent

In vertebrates, a limited number of homeobox-containing transcription factors define the retina field and are required for early eye formation^{7,18-24}. Using specific antibodies, we observed that all tested (n = 20) neurospheres (as primary spheres or after passage 1) express the early retinal markers *Six3*, *Lhx2* (not shown), *Pax6* and the neural stem and progenitor cells markers *nestin* and *Sox1* (Fig. 1C and D). Because the *Six3* antibody also recognizes the highly related retinal protein *Six6*, we performed RT-PCR on single retinal spheres to detect *Six3* or *Six6* mRNA. In all spheres tested (n = 10), *Six3* and *Six6* expression was detected (not shown). As expected, *Pax6* localized to the cells nucleus and was found to be most abundant at the sphere periphery, where *BrdU* and *nestin* positive cells are located (Fig. 1). Thus, isolated spheres expressed retinal and neural stem cell markers.

In addition to long-term self-renewal, stem cells are characterized by their capacity to generate cell progenies with multiple differentiations potential (multipotent)^{3,39}. To test for this capacity, pool of 10 retinal spheres (from passage 1) were plated on Poly-L-Lysine/Laminin substrate in the presence of 1%FCS for 15 days and then switch to

serum-free media containing the neurotrophic factors NGF and BDNF for a period of 3 additional days. By indirect IF, we observed that retinal spheres could differentiate into complex networks of amacrine neural cells (5-10%), blue and red/green cone photoreceptor cells (5-10%) and Müller glial cells (5%), (Fig. 1E-J). At a rare frequency (0.01%), we could obtain rod photoreceptor cells (Fig. 1F), horizontal cells (positive with the 2H3 antibody) and more frequently PKC α positive neurons (thus possibly corresponding to bipolar neurons) (not shown). Ganglion cells were not detected under these culture conditions (using a Brn3b antibody). Occasionally, we observed the presence of mature oligodendrocytes expressing the myelin basic protein, while astrocytes and radial glial cells were commonly found (Supplementary figure 1). Similar results were also obtained upon differentiation of single spheres (Fig. 5). Taken together, our data revealed that isolated retinal spheres were multipotent and biased but not exclusively limited to produce early born neurons (i.e. cone photoreceptors and amacrine neurons).

2.4.3 Pax6 is expressed by but is not required for the generation of ERSCs

To test if *Pax6* was required for the generation of retinal stem cells, we took advantage that despite been anophthalmic at later stage of development, *Pax6*-null embryos develop an optic vesicle at e9.5 that is broader than normal⁹. Optic vesicles from wild type (WT) and *Pax6*^{LacZ/LacZ} littermate embryos were dissected and cultured as described above in a neurosphere assay²⁶. In the absence of *Pax6*, retinal spheres

did form. Notably, the number of retinal spheres obtained from $Pax6^{LucZ/LucZ}$ embryos was significantly higher ($P = 0.025$) than from WT embryos (27 versus 22) (Fig. 2A). $Pax6$ may not be required for the generation of retinal spheres at first but may be required for their self-renewal. To test for this possibility, single spheres from both genotypes were dissociated repeatedly in serial passages (for 7 generations). Upon serial passage, we found that newly generated retinal spheres were consistently more abundant in the $Pax6$ mutant background than in WT. However, because $Pax6$ -null spheres were also larger than WT (Fig. 3), normalization over the total number of cells per sphere was also performed. In all cases, this resulted in a significant difference between both genotypes (Fig. 2B). Thus, our observations suggest that in absence of $Pax6$, retinal stem cell self-renewal is increased.

$Pax6$ may be expressed in most cells of the optic vesicle neural ectoderm and in most progenitor cells present in a retinal sphere, but it may be not expressed in colony-forming cells i.e. the stem cells. To discriminate between these possibilities, WT and $Pax6^{LucZ/LucZ}$ primary retinal spheres were dissociated and sorted by **Fluorescent Activated Cell Sorting** (FACS) for single cells. Isolated cells were plated at 2 500 cells/ml in serum-free media containing FGF2 in bacterial culture dishes in the presence of the base analogue BrdU. Under these stringent conditions, only stem cells can proliferate (first cell division at 48 hr, as empirically determined) and incorporate BrdU. After 48 hr, cells were processed for indirect IF using antibodies against BrdU and Pax6 (WT cells) or β -galactosidase ($Pax6^{LucZ/LucZ}$ cells) and then spin down on

glass slides. The number of clones containing 2 cells and that were BrdU+/Pax6+ or BrdU+/Pax6- (WT) or BrdU+/LacZ+ or BrdU+/LacZ- (*Pax6*^{LacZ/LacZ}) was counted. All clones analyzed were double positive for BrdU and Pax6 (WT) or BrdU and LacZ (*Pax6*^{LacZ/LacZ}), thus showing that Pax6 is expressed in retinal stem cells (Fig. 2C and D).

2.4.4 Pax6 negatively regulates retinal sphere proliferation

Pax6-null retinal spheres were found to be larger than WT spheres in primary cultures and upon serial passages (Fig. 3A). This phenotype could result from a larger proportion of dividing progenitor cells within the spheres, from a reduced frequency of cell death and/or from a shorter cell cycle. Retinal spheres (at day 7) from WT and *Pax6*^{LacZ/LacZ} samples were analyzed for apoptosis using the TUNEL assay and no differences were observed between WT and mutant samples (not shown). Samples from both genotypes were exposed to BrdU for 90 min or 12 hr and analyzed on sections with antibodies against BrdU and Ki67. The Ki67 antigen is expressed at most phases of the cell cycle, with the exception of the G⁰ phase, and is used as a marker for cycling progenitors. Using this approach, we found a similar proportion of Ki67 positive cells/total number of cells between both genotypes, suggesting that *Pax6* mutation does not affect the relative number of cycling progenitors in the spheres. However, exposition to BrdU for 12 hr but not for 90 min resulted in a higher proportion of BrdU positive cells/total number of cells in *Pax6* mutant spheres

(BrdU-labeling index) (Fig. 3B). When these data were used to calculate the “BrdU saturation index” (BrdU and Ki67 double positive cells/total Ki67 positive cells), which is an indication of the cell cycle length, a highly significant difference was found between both genotypes ($p = 0.008$), suggesting that dividing cells in retinal spheres have a shorter cell cycle in absence of *Pax6* (Fig. 3B).

To gain further insight about the phenotype of *Pax6*-null ERSC, we analyzed the DNA content of WT and *Pax6*^{LacZ/LacZ} ERSC samples by FACS (Fig. 3C). In absence of *Pax6*, 23.53% of all cells were in the S phase of the cell cycle (compare to 12.21% in WT), 5.15% were in G2/M (compare to 2.75% in WT) and 71.8% were in G1 (compare to 86.93% in WT). Consistently with this, labeling of retinal spheres with an anti-P-H3 antibody, which labels cells that are in G2/M, revealed twice as much cells that were positive for P-H3 in *Pax6*-null compare to WT samples (Fig. 3D).

To test whether *Pax6* could repress ERSCs proliferation in gain-of-function experiments, we overexpressed *Pax6* in WT ERSCs using a lentivirus carrying *Pax6* and *GFP*, both driven by separate promoters (REF). *Pax6*-virus but not control virus transduction at high cell density (250 000 cells/ml) resulted in flattening and differentiation of cell aggregates into neuron-like cells within 16 hours (not shown). Following re-dissociation and plating at low cell density in serum-free media, *Pax6*-transduced ERSC generated retinal spheres that were smaller than control-virus infected spheres (Fig3. D). Proportion of GFP positive retinal spheres was near 90%

for both constructs. P-H3 and TUNEL labeling of single GFP+ retinal spheres revealed a 40% reduction in mitotic figures upon *Pax6* transduction but no effect on cell death (Fig3. D). *Pax6*- and control-virus infected GFP+ single spheres of comparable size were dissociated to single cells and plated at low density in serum-free media to test for self-renewal. When calculated in absolute number or relatively to the total number of cells/sphere, the number of secondary spheres generated in *Pax6*-virus infected WT spheres was significantly lower than from control-virus infected WT spheres. Taken together, these analyses revealed that *Pax6* can function as a repressor of ERSCs self-renewal and as a repressor of uncommitted RPCs proliferation.

To gain insight about the mechanism of action of *Pax6* in ERSCs, we analyzed gene expression in WT and *Pax6*-null retinal spheres using DNA microarray (Supplementary figure 2). Few genes were under-expressed in *Pax6* mutant samples and mainly encoded for transcription factors (*Pax6*, *Six6*, *FoxA1* and *FoxA2*). *Six6* encodes a homeobox transcription factor of the *Drosophila sine oculis*-related gene-family and is highly related to mammalian *Six3*^{23,27}. In mice, *Six6* is expressed in the optic vesicle neural ectoderm and its over-expression in Amphibians results in enlarged retina or ectopic eye formation²⁸⁻³⁰. Gene targeting in mice has revealed that *Six6* is not required for eye formation but regulates RPCs proliferation by repressing the Cyclin-dependent kinase inhibitor (Cdk) p27^{kip1}, p57^{Kip2} and p19^{Ink4d}. Thus, *Six6* depends on *Pax6* for its expression in ERSCs but its down-regulation is antagonist to

the over-proliferation phenotype we observed in *Pax6*-null ERSCs. We also tested in WT and *Pax6*-mutant samples the expression levels of genes involved in cell cycle regulation by semi-quantitative or real time PCR (i.e. Geminin, Check1, p18^{ink4c}, p19^{arf}, p21^{Cip1}, p16^{ink4a}, p27^{kip1}, p57^{kip2}, Cdk2, Cdk4 and p107^{Rb}) but we did not find any difference, consistently with the microarray results. However, several genes were highly upregulated in *Pax6*-null samples and these were all involved in responses to cellular stress and/or DNA damage (Ndr1, Ddit3, Ifi102, Tlk2, FosL2 and Vegfa). This suggested that retinal stem cells could have an abnormal cell cycle in the absence of *Pax6*. Abnormal regulation in the initiation and termination of DNA replication or in the G2/M checkpoint has been directly linked to genomic instability in mammalian cells³²⁻³⁷. To investigate the possibility that *Pax6* mutation in retinal stem cells results in genomic instability, we challenged ERSCs with the mitotic drug nocodazole for 48 hr (ref) and found that *Pax6*-null ERSCs responded normally to nocodazole treatment (not shown). Taken together, our analyses suggest that *Pax6* negative regulation of ERSC proliferation may operate by a transcription-independent mechanism.

2.4.5 *Pax6* deficiency distinguishes retinal stem from committed RPCs

Conditional inactivation of *Pax6* in RPCs of mouse embryos results in reduced cell proliferation. To test whether RPCs produced by *Pax6*-null ERSCs behaved similarly *in vitro*, retinal spheres from WT and *Pax6*-mutant embryos were allowed to

differentiate for 10 days in the presence of 1% FBS and laminin. DNA content analysis by FACS of the dissociated cells revealed no observable differences between both genotypes. Identical results were also obtained when factors such as FGF2 or FGF2 and EGF or serum (5% or 10%) were added to the culture media (Fig. 4A). These results reveal that *Pax6* mutation in RPCs has no obvious effect on cell proliferation in the culture conditions we used *in vitro*.

Pax6 has been previously proposed to operate as a neuron/glia switch in the cerebellar cortex³⁸. To investigate this in retinal stem cells, individual retinal spheres (n = 8) of identical size from both genotypes were allowed to differentiate for 7 days (as described above). Surprisingly, *Pax6*-null retinal spheres could generate numerous neuron-like cells in phase-contrast observations, just as WT (Fig. 4xx). Cells were double-labeled with Gfap (astrocytes) and TuJ1 (immature neurons) antibodies (Fig. 4B and C). The total number of neurons and astrocytes/clone were counted and these numbers were used to calculate the neuron/glia ratio. As showed in Fig. 4D, we did not observed any differences in the neuron/glia ratio between WT and *Pax6*^{-/-} samples or in the total number of neurons and astrocytes generated/clone. Taken together, these results show that *Pax6* deficiency distinguishes retinal stem from committed progenitor cells in the control of proliferation. Furthermore, they reveal that *in vitro*, *Pax6* deficiency does not affect neurogenesis and gliogenesis in general.

2.4.6 *Pax6*-null retinal spheres can generate amacrine, cone photoreceptor and Müller glial cells *in vitro*

In *Pax6* mutant embryos, eye development arrest at the optic vesicle stage and differentiation into mature retinal cell types does not occur^{1,2,8,9}. Instead, the optic vesicle rudiment remains as a neural ectoderm until birth (when *Pax6* mutants die). Conditional mutagenesis of *Pax6* in the retina beginning at e10.5 has revealed that *Pax6*^{flox/flox; u-Cre} retinal progenitor cells can only give rise to amacrine neurons in this context¹⁶. To test if retinal spheres null for *Pax6* were capable of differentiation into mature retinal cell types or were only capable of generating immature or non-retinal neurons as well as astrocytes, single spheres were allowed to differentiate individually *in vitro* for 15-18 days and process for IF. Unexpectedly, *Pax6*-null retinal spheres could generate amacrine neurons, cone photoreceptor cells and Müller glial cells in a comparable frequency as WT (Fig. 5A-F). Notably, some rod photoreceptor cells observed in *Pax6*-null displayed an aberrant morphology that was not seen in WT samples (Fig. 5D). To confirm these results by an independent method, we performed RT-PCR analysis on differentiated samples of both genotypes to detect markers of photoreceptor precursors (Crx) and of terminally differentiated cone photoreceptors (green cone opsin). Specific amplification products were obtained with both WT and *Pax6*^{-/-} samples for Crx and cone opsin (Fig. 5G).

Based on classical genetics, our results suggested that *Pax6* function in RPCs proliferation and differentiation may operate in part by a non-cell autonomous mechanism. To test this concept, we focus on the *Notch* pathway, which as been shown to regulate neural stem and progenitor cells proliferation, cell cycle exit and neuron/glia cell fate determination in *Drosophila* and in vertebrates by non-cell autonomous mechanisms through lateral inhibition. WT and *Pax6*-null retinal spheres were allowed to differentiate for 10 days and analyzed for the expression of *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Presenilin1*, *Presenilin2*, *Delta1*, *Jagged1*, *Jagged2*, *Hes1* and *Hes5* by RT-PCR (Fig. 5H). In *Pax6*-mutant samples, *Notch3* and *Delta1* expression was highly reduced. Expression of *Hes5* was also reduced but to a lower extent.

Reduced *Notch3*, *Delta1* and *Hes5* expression in *Pax6*-null samples may result from the absence of specific cell types that express these genes at high levels and that normally require *Pax6* for their formation. If so, transient expression of *Pax6* in the mutant cultures once differentiation has proceeded should not restore *Notch3*, *Delta1* and *Hes5* expression levels. Alternatively, restoration of gene expression levels would suggest direct or indirect *Pax6*-dependent transcriptional activation. To test this, WT and *Pax6*-null samples were allowed to differentiate for 10 days and then infected with Lenti-*Pax6*-GFP or control viruses. 16 hr post-infection, cells were directly processed for gene-expression analysis.

Taken together, our results support the notion that *Pax6* control of RPCs proliferation and multipotent state operates in part by non-cell autonomous mechanisms probably through direct or indirect regulation of the *Notch* pathway.

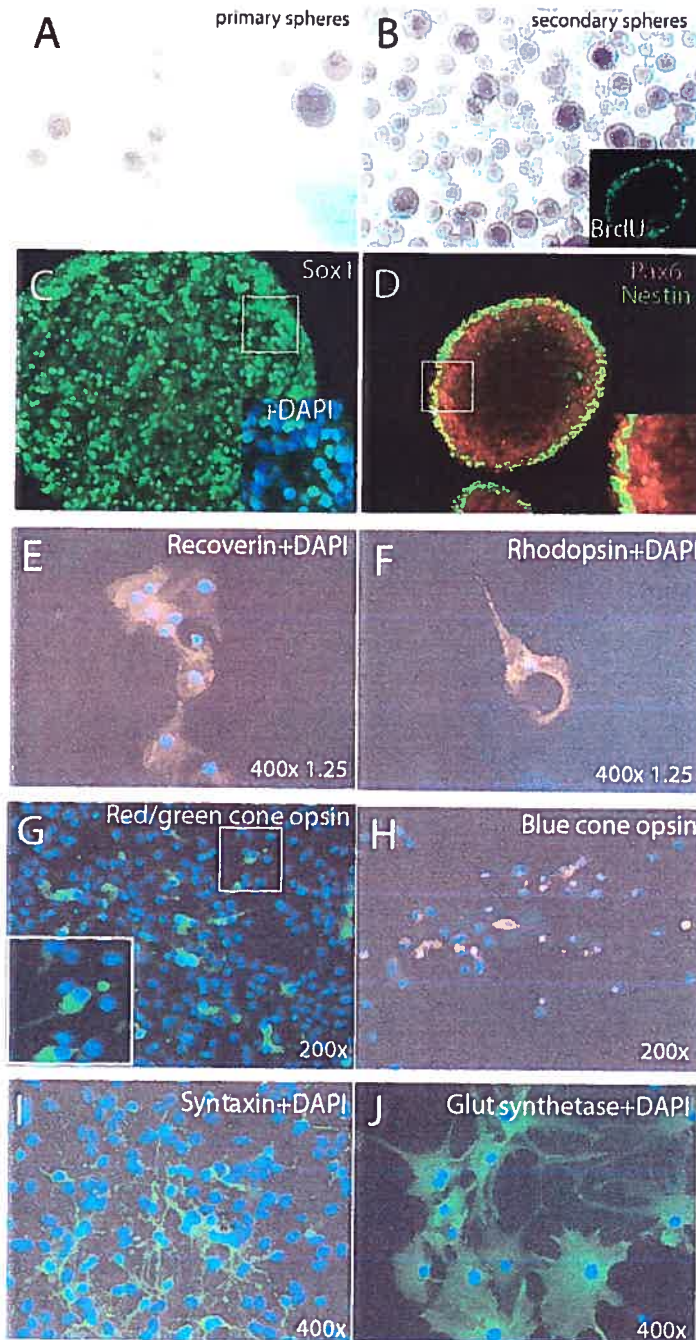


Figure 1
Duparc et al. 2005

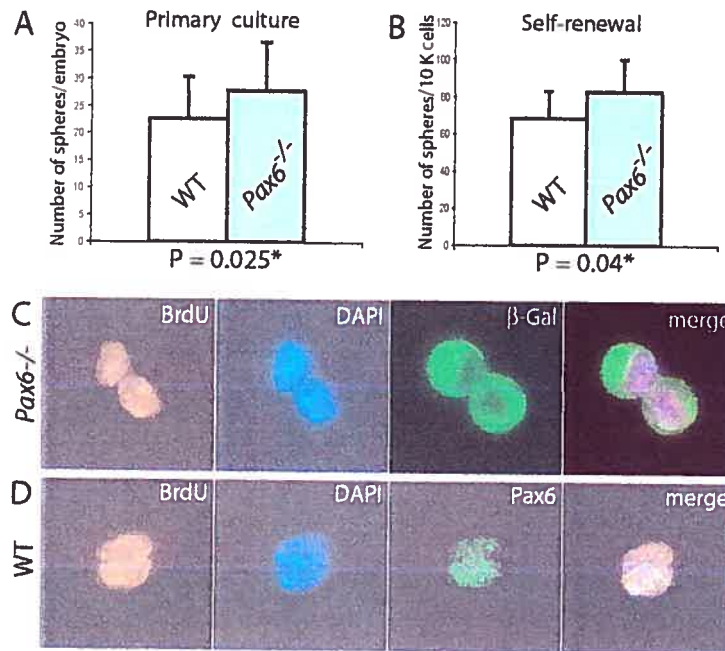


Figure 2
Duparc et al. 2005

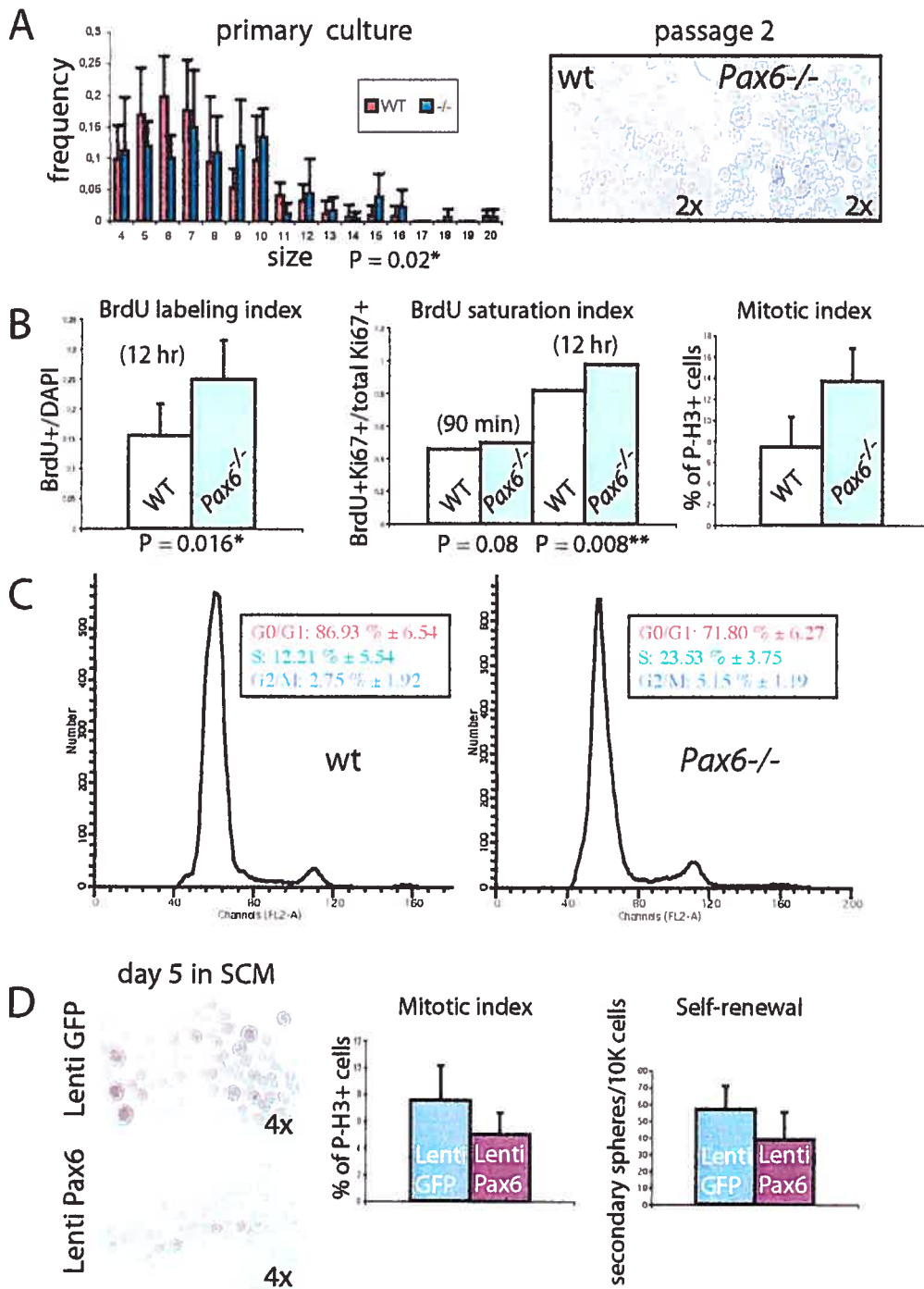


Figure 3
Duparc et al. 2005

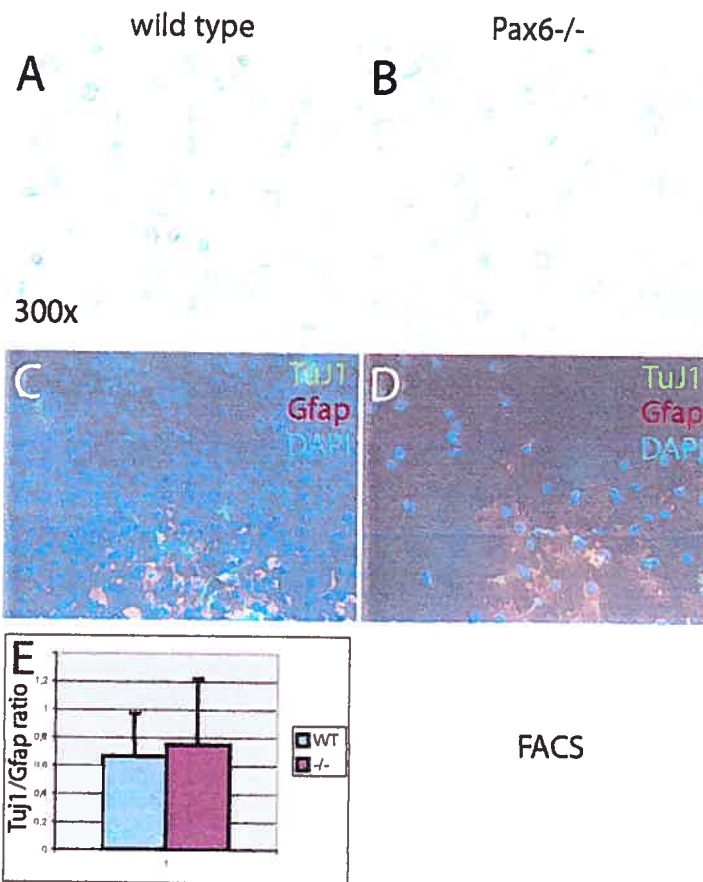


Figure 4
 Duparc et al. 2005

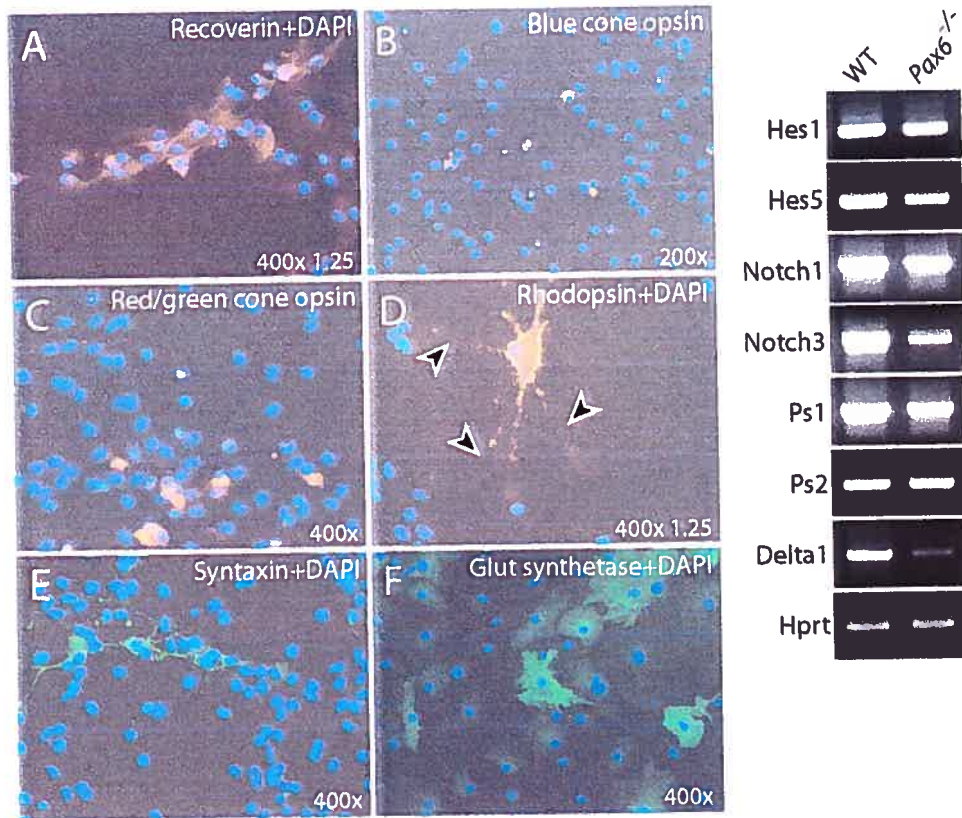


Figure 5
Duparc et al. 2005

2.5 Discussion

2.5.1 *Pax6* is a negative regulator of retinal cells proliferation

We have identified a cell population localized in the mouse optic vesicle that display retinal stem cell characteristics i.e. capable of long-term proliferation and self-renewal and with the potential to generate multiple retinal cell types. We have showed that in *Pax6*^{LacZ/LacZ} mutants, which have a deletion of the entire paired domain and thus are identical to the classical *Small eye* (Sey18) and conditional *Pax6*^{flax/flax; a-Cre}-null mutants, retinal stem cells are more abundant than normal. Notably, we demonstrated in clonal assays that Pax6 protein is expressed in retinal stem cells. We have also found that in absence of *Pax6*, retinal stem cells are more abundant than in WT in both absolute number and relatively to the total number of cells present in a retinal sphere. The opposite correlation was found upon Pax6 viral transduction in WT retinal spheres. Finally, we showed that whole retinal spheres, which are mostly composed of uncommitted RPCs, proliferate faster in the absence of *Pax6*. Thus *Pax6* negatively regulates the proliferation of uncommitted RPCs and negatively regulates the self-renewal of retinal stem cells.

Because retinal stem cells represent only a fraction of the cells present in a sphere (~0.7%), it is difficult to determine by which cellular mechanism (mode of cell division or cell cycle length) *Pax6* represses their self-renewal. However, for several

reasons, we favor an effect on the cell cycle length. First, an increase in the number of symmetrical divisions would be expected to result in an even greater relative number of stem cells when *Pax6* is mutated. Second, reduced cell cycle length is more consistent with the phenotype we observed in uncommitted RPCs. Based on this, we hypothesize that Pax6 protein is more abundant in cells that are the most primitive (the stem cells) compared to immediate daughter cells (the cycling uncommitted RPCs) and more advanced progenitors (the non-cycling uncommitted RPCs). Indeed, Pax6 labeling in retinal spheres does correlate with cells that incorporate BrdU and express Nestin at higher levels (Fig. 1D). Thus, the repressive effect of Pax6 on the cell cycle would be greater in stem cells than in uncommitted RPCs and consequently, the release of this inhibition would also lend greater effects on the cell cycle of stem cells.

Importantly, our results are not incoherent with the eye phenotype of *Pax6* mutants. 1) Previous studies have revealed that the optic vesicle of *Pax6* mutants is much broader than normal. This phenotype is inconsistent with reduced or even normal proliferation of the neural ectoderm. Accordingly, we obtained a significant higher number of retinal spheres in primary cultures of optic vesicles isolated from *Pax6*-null embryos. 2) Eye development in *Pax6* mutants arrests at the optic vesicle stage. Because *Pax6* plays multiple functions in eye development, including a cell-autonomous requirement in eye surface ectoderm specification, arrest in optic vesicle growth might be at first non-cell autonomous. Interestingly, retrospective analysis of

results obtained in the grafting experiments performed in the *Urchia* rat reveals that *Pax6*-null optic vesicles could reach the optic cup stage in the presence of a wild type surface ectoderm. Furthermore, surgical ablation of the eye surface ectoderm in Chick results in an optic vesicle growth arrest phenotype that is similar to *Pax6*^{-/-} eye phenotype. 3) In chimera aggregation studies, *Pax6*-null cells contribute less efficiently to the optic vesicle than WT cells. Again, this observation is not incoherent with our results because *Pax6*-null optic vesicle neural ectoderm displays abnormalities in autologous and heterologous cellular adhesion (as well as in proximal-distal patterning). Consequently, *Pax6*-null cells are non-competitive in this context and are segregated from WT cells.

In addition, two recent studies on *Pax6* function in cerebral cortex argue in the same sense than our observations made in the optic vesicle^(40, 41). *Pax6* is highly expressed in the progenitor/stem cells located in the ventricular zone (VZ) of the cerebral cortex. BrdU-labeling studies have revealed that VZ progenitors from *Pax6*^{-/-} embryos proliferate much faster than wild type *in vivo* at the time (e12.5) of corticogenesis⁽⁴¹⁾. *In vitro*, cortical glial cells of *Pax6*^{-/-} mutants develop into larger colonies than WT⁽⁴⁰⁾. At the opposite, radial glial cells that over-express *Pax6* develop into smaller colonies than WT⁽⁴⁰⁾. This suggests that *Pax6* might negatively regulate the rate of proliferation of neural stem cells in general. Interestingly, reduced or absent *Pax6* expression in glioblastomas, one of the most aggressive type of brain tumors,

correlates with increased tumor grade. Thus, loss of Pax6 might represent a growth advantage for some types of “cancer stem cells” in the brain.

2.5.2 Pax6 coordinates retinal progenitor cells proliferation and differentiation

In previous work, *Pax6* has been proposed to control RPCs proliferation and multipotent state through direct (and cell autonomous) transcriptional regulation of *Math5*, *Ngn2* and *Mash1*. Accordingly, *Math5* is specifically expressed in developing ganglion cells and is required for their generation in mice. However, there is yet no molecular explanation for the lack of cone and rod photoreceptor cells, horizontal and bipolar neurons and Müller glial cells in these conditional mutants. For example, the transcription factors *Otx2* and *NeuroD*, which are required for photoreceptor development in mice, are unaffected by the *Pax6* mutation. Similarly, *Pax6* is not required for the transcription of *Otx2*, *Six3* and *Lhx2* in ERSCs (Supplementary figure 2). Notably, *Mash1/Ngn2/Math3*-null embryos (although it is unknown if *Math3* is *Pax6*-dependent) lack bipolar neurons and show reduced number of horizontal cells but develop amacrine neurons, photoreceptor and Müller glial cells and show a normal retinal lamination. Furthermore, *Mash1/Ngn2/Math3* mutant-RPCs proliferate normally. Thus, additional mechanisms must account for the phenotype observed in the retina of *Pax6*^{flox/flox; a-Cre} embryos. Here we have show that some of the retinal differentiation and proliferation defect observed in *Pax6*^{flox/flox; a-Cre} embryos can be overcome *in vitro* upon *Pax6*-null retinal stem cells isolation and

RPCs differentiation. Notably, we also show that genes of the Notch pathway are downregulated in *Pax6*-null RPCs. This suggests that in addition to bHLH genes, *Pax6* also regulates genes of the Notch pathway to control RPCs proliferation and differentiation. However, care should be taken not to over interpret these results since they have all been performed *in vitro*. Further work using either retinal stem cells transplantation and/or viral transduction in living animals will be required to confirm and better understand the function of *Pax6* in this context. However, relieving these restrictions, our observations suggest that in the developing retina, *Pax6* coordinates cellular proliferation and differentiation by cell autonomous and non-cell autonomous mechanisms through direct or indirect activation of two apparently antagonist pathways (i.e. bHLH proneural genes and Notch pathway). By repressing retinal stem cells proliferation as well as coordinating committed RPCs proliferation and differentiation via multiple control mechanisms, *Pax6* operates as the “conductor” in the genetic orchestra regulating mammalian retinal development.

2.6 References

1. Turner, D.L. & Cepko, C.L. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 1987; 328:131-6.
2. Turner, D.L., Snyder, E.Y. & Cepko, C.L. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 1990; 4:833-45.
3. Temple, S. The development of neural stem cells. *Nature* 2001; 414:112-117.
4. Weissman, I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units of evolution. *Cell* 2000; 100:157-168.
5. Walther, C. & Gruss, P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 1991; 113:1435-1449.
6. Ton, C.C. et al. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 1991; 67:1059-1074.
7. Hill, R.E. et al. Mouse *small eye* results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 1991; 354:522-525.
8. Hogan, B.L. et al. Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986; 97:95-110.
9. Grindley, J.C., Davidson, D.R. & Hill, R.E. The role of *Pax-6* in eye and nasal development. *Development* 1995; 121:1433-1442.
10. Glaser, T. et al. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat. Genet.* 1994; 7:463-71.
11. Qiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. & Gehring, W.J. Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science* 1994; 265:785-9.
12. Chow, R.L., Altmann, C.R., Lang, R.A. & Hemmati-Brivanlou, A. Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 1999; 126:4213-4222.
13. Gehring, W. & Kazuho, I. *Pax6* mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* 1999; 15:371-377.
14. Gehring, W.J. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Int. J. Dev. Biol.* 2002; 46:65-73.
15. Halder, G., Callaerts, P. & Gehring, W.J. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 1995; 267:1788-92.
16. Marquardt, T. et al. Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 2001; 105:43-55.
17. Tropepe, V. et al. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev. Biol.* 1999; 208:166-188.

18. Zuber, M.E., Gestri, G., Viczian, A.S., Barsacchi, G. & Harris, W.A. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* 2003; 130:5155-5167.
19. Oliver, G. & Gruss, P. Current views on eye development. *Trends Neurosci.* 1997; 20:415-421.
20. Furukawa, T., Kozak, C.A. & Cepko, C.L. rax, a novel paired-like homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1997; 94:3088-3093.
21. Porter, F.D. et al. Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* 1997; 124:2935-2944.
22. Mathers, P.H., Grinberg, A., Mahon, K.A. & Jamrich, M. The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* 1997; 387:603-607.
23. Jean, D., Bernier, G. & Gruss, P. *Six6 (Optx2)* is a novel murine *Six3*-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk. *Mech. Dev.* 1999; 84:31-40.
24. Oliver, G. et al. *Six3*, a murine homologue of the *sine oculis* gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 1995; 121:4045-4055.
25. Zhu, C.C. et al. *Six3*-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development* 2002; 129:2835-2849.
26. St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. & Gruss, P. *Pax6* is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 1997; 387:406-409.
27. Toy, J., Yang, J.M., Leppert, G.S. & Sundin, O.H. The *Optx2* homeobox gene is expressed in early precursors of the eye and activates retina-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998; 95:10643-10648.
28. Bernier, G. et al. Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of *Six6 (Optx2)* in *Xenopus* embryos. *Mech. Dev.* 2000; 93:59-69.
29. Loosli, F., Winkler, S. & Wittbrodt, J. *Six3* overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* 1999; 13:649-654.
30. Zuber, M.E., Perron, M., Philpott, A., Bang, A. & Harris, W.A. Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of *XOptx2*. *Cell* 1999; 98:341-352.
31. Li, X., Perissi, V., Liu, F., Rose, D.W. & Rosenfeld, M.G. Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science* 2002; 297:1180-3.
32. Melixetian, M. et al. Loss of Geminin induces rereplication in the presence of functional p53. *J. Cell Biol.* 2004; 165:473-82.
33. Melixetian, M. & Helin, K. Geminin: A Major DNA Replication Safeguard in Higher Eukaryotes. *Cell Cycle* 2004; 3.
34. Lam, M.H., Liu, Q., Elledge, S.J. & Rosen, J.M. *Chk1* is haploinsufficient for multiple functions critical to tumor suppression. *Cancer Cell* 2004; 6:45-59.

35. Walworth, N.C. Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000; 12:697-704.
36. Bell, D.W. et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999; 286:2528-31.
37. Hernando, E. et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 2004; 430:797-802.
38. Heins, N. et al. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat. Neurosci.* 2002; 5:308-315.
39. Donovan, P.J. & Gearhart, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414:92-97.
40. Yamasaki, T. et al. Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. *Development* 2001; 128:3133-44.
41. Gotz, M., Stoykova, A. & Gruss, P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 1998; 21:1031-44.
42. Fujiwara, M., Uchida, T., Osumi-Yamashita, N. & Eto, K. Uchida rat (rSey): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant. *Differentiation* 1994; 57:31-8.

Chapitre III : Discussion et conclusion

3.1 Discussion

Grâce à un modèle d'étude *in vitro*, nous avons pu identifier une population cellulaire de la vésicule optique possédant les caractéristiques de cellules souches : capacité d'auto-renouvellement à long terme, un grand potentiel de prolifération et la capacité de générer des cellules filles pouvant se différencier en un ou plusieurs types cellulaires (Gage, 2000). Ces cellules peuvent donc être considérées comme des cellules souches rétiniennes embryonnaires (CSRE).

Avec notre modèle d'étude, le mutant $Pax6^{lacZ/lacZ}$ (délétion du domaine PD), nous avons pu également obtenir des CSRE et en nombre plus important que la normale. Nous avons montré clonalement que les CSRE expriment $Pax6$ et que dans les neurosphères mutantes obtenues en culture à partir des CSRE, l'expansion du pool de cellules souches est plus importante, aussi bien en nombre absolu que relativement au nombre de cellules constituant la sphère, que dans les neurosphères WT. L'effet inverse a été obtenu par transduction virale de $Pax6$ dans des neurosphères WT.

Enfin, les neurosphères, composées essentiellement des progéniteurs rétiniens indifférenciés, prolifèrent plus rapidement en l'absence de $Pax6$. Il s'ensuit que $Pax6$ agit comme un régulateur négatif de la prolifération des RPC et de l'auto-renouvellement des CSRE.

Le gène *Pax6* est indispensable à la formation de l'œil. En son absence, le développement de l'œil cesse au stade de vésicule optique et il est impossible d'étudier la fonction de *Pax6* aux stades plus avancés du développement. Des expériences avec des mutants conditionnels, où l'on a pu étudier la fonction de *Pax6* au-delà du stade de vésicule optique, ont été réalisées et ont montré des défauts importants au niveau de la prolifération des progéniteurs rétiniens et une perte de leur multipotence (Marquardt *et al.*, 2001). En outre, une fois ces cellules formées, *Pax6* était toujours requis dans ces cellules pour assurer une organogenèse normale de l'œil. Les résultats que nous avons obtenus ne remettent pas en cause la nécessité de *Pax6* pour une organogenèse normale. Néanmoins, le « dogme » de la nécessité absolue de *Pax6* pour la formation de ces cellules est, selon nos résultats, sérieusement ébranlé.

Nos résultats suggèrent que *Pax6* n'est pas requis pour la formation des cellules souches ni des progéniteurs rétiniens qui en résultent. En l'absence complète de ce gène, nous avons été capables d'obtenir des cellules souches rétiniennes possédant toutes les caractéristiques (auto-renouvellement, prolifération et multipotence) permettant de les considérer comme telles.

Nos résultats prouvent que le nombre de CSRE dans les vésicules optiques mutantes est plus important que dans les vésicules normales. Ce résultat peut sembler

étonnant mais est cohérent avec le fait que les vésicule optiques des embryons *Pax6*^{-/-} sont anormalement larges (Grindley *et al.*, 1995).

Les expériences de passages des neurosphères nous ont permis de déterminer que *Pax6* réduit l'expansion du pool de cellules souches et que, de ce fait, *Pax6* a un effet négatif sur l'auto-renouvellement des cellules souches rétinienne. Ce résultat corrobore notre résultat du nombre plus élevé de cellules souches dans les vésicules optiques d'embryons mutants.

L'entrée dans le cycle cellulaire des cellules souches résulte d'un auto-renouvellement ou de la génération d'un progéniteur. L'équilibre entre ces événements varie selon les circonstances. Ainsi, au cours de l'organogenèse, l'équilibre se déplace de l'expansion du pool de cellules souches vers la différenciation (lorsqu'un grand nombre de cellules spécialisées est requis). Le déplacement de cet équilibre résulte de changements dans le mode de division des cellules. L'expansion des cellules souches résulte de divisions symétriques, tandis que la génération de progéniteurs est assurée par la division asymétrique permettant à une cellule souche de générer d'une part, des progéniteurs multipotents et, d'autre part, des copies d'elle-même.

Il est connu que *Pax6* joue un rôle essentiel dans la régulation des transitions entre les modes de division symétrique et asymétrique (Estivill-Torres *et al.*, 2002).

Puisque les cellules ne représentent qu'une infime fraction des cellules des neurosphères (~0,7%) il n'est pas possible de déterminer si cet écart dans l'expansion du pool de CSRE est attribuable à un changement de mode de division ou à une différence de cinétique cellulaire. Toutefois, plusieurs éléments nous laissent supposer que c'est la longueur du cycle cellulaire qui est affectée. Tout d'abord, un changement dans le mode de division lorsque *Pax6* est muté se traduirait par une expansion bien supérieure des cellules souches. Ensuite, cette hypothèse serait plus cohérente avec le phénotype observé avec les progéniteurs primitifs.

L'entrée dans le cycle cellulaire des progéniteurs résulte de la prolifération ou de la progression dans une voie de différenciation (formation d'un précurseur puis d'une cellule différenciée). Là aussi, l'équilibre entre ces événements résulte de changements dans le mode de division des cellules. La prolifération des progéniteurs résulte de divisions symétriques, tandis que la génération de précurseurs est assurée par des divisions asymétriques permettant à un progéniteur de générer un progéniteur et une cellule qui quitte le cycle cellulaire pour s'engager dans une voie de différenciation.

La différence de taille des neurosphères ne peut pas être expliquée par une différence dans le taux d'apoptose puisque la quantification de celui-ci par la méthode TUNEL n'indique aucune différence statistiquement significative entre les cellules des

neurosphères mutantes et WT. Mais récemment, il a été démontré que cette méthode ne permettait pas une distinction absolue entre l'apoptose et la nécrose puisque de faux positifs peuvent être obtenus pour les cellules en nécrose (Garrity *et al.*, 2003). Cependant, aucune différence n'ayant été révélée par la méthode TUNEL, il n'a pas été jugé pertinent d'investiguer d'avantage cette voie.

Nos résultats de cytométrie en flux (FACS) avec marquage à l'iodure de propidium (PI) (Krishan, 1975), confirment qu'en l'absence de *Pax6*, les neurosphères prolifèrent plus rapidement. La longueur des différentes phases du cycle cellulaire étant constante dans les cellules de mammifères et la longueur du cycle cellulaire étant régulée par la durée de la phase G₁ (DiSalvo *et al.*, 1995), le nombre de cellules dans une phase du cycle (autre que G₁) par rapport au nombre de cellules en division donne une estimation de la longueur du cycle (Chenn et Walsh, 2002). Par conséquent, le fait que plus de cellules provenant de neurosphères mutantes étaient, soit en phase S, soit en phase G₂/M suggère que *Pax6* module effectivement la longueur du cycle cellulaire. Les cellules utilisées pour ce test provenaient de neurosphères dissociées trois jours après un passage afin de minimiser l'effet des cellules sortant du cycle cellulaire (au centre des neurosphères) et n'étudier que les cellules en prolifération.

Afin de vérifier la fonction biologique de *Pax6*, nous avons utilisé l'approche de la sur-expression du gène par son introduction dans des cellules au moyen d'un

rétrovirus. Mlle Mireille Lépine a réalisé la construction CMV-*Pax6*-GFP avec laquelle nous avons sur-exprimé le gène dans des cellules provenant de neurosphères WT en les infectant avec ladite construction. Le fait que beaucoup de cellules infectées sur-exprimant *Pax6* adhèrent et se différencient suggère une sortie accélérée du cycle cellulaire. De plus, nos mesures montrant une réduction de l'expansion du pool de cellules souches et de la prolifération dans les neurosphères sur-exprimant *Pax6* corroborent nos résultats concernant l'action de *Pax6* comme modulateur négatif de la prolifération.

Ce rôle de *Pax6* n'est pas totalement incohérent avec le phénotype des mutants *Pax6*.

1) Les vésicules optiques des embryons mutants *Pax6* sont plus larges que celles des embryons normaux (Grindley *et al.*, 1995), pouvant expliquer le nombre plus élevé de neurosphères formées à partir de vésicules optiques d'embryons *Pax6*^{-/-}. 2) Le développement oculaire des embryons *Pax6* mutants s'arrête au stade de vésicule optique. Cependant, *Pax6* a de multiples fonctions au cours du développement de l'œil, dont la nécessité intrinsèque de son expression pour la spécification par l'ectoderme de surface. Par conséquent, l'arrêt du développement de la vésicule optique pourrait être non intrinsèque aux cellules de la vésicule. L'analyse rétrospective des résultats obtenus avec les expériences de greffes chez le rat Uchida (Fujiwara *et al.*, 1994) révèle que les vésicules optiques *Pax6*^{-/-} peuvent atteindre le stade de coupe optique. D'autre part, l'ablation chirurgicale de l'ectoderme de surface chez le poulet résulte en un arrêt du développement similaire à ce que l'on observe en

l'absence de *Pax6* (Hyer *et al.*, 1998). 3) Bien que les études sur les embryons chimériques (Collinson *et al.*, 2000) montrent que les cellules *Pax6*^{-/-} contribuent moins efficacement à la vésicule optique que les cellules WT, ceci ne permet pas d'invalider notre hypothèse. En effet, les cellules déficientes pour *Pax6* présentent des anomalies d'adhésions homophiliques et hétérophiliques. Dans ce contexte, les cellules *Pax6*^{-/-} ne peuvent pas être compétitives faces aux cellules WT.

Le rôle de *Pax6* comme régulateur négatif de la prolifération était déjà connu dans la corticogenèse. Il a été démontré que, lors de la corticogenèse (e12,5), les progéniteurs de la zone ventriculaire (ZV) provenant d'embryons *Pax6*^{-/-} prolifèrent plus rapidement que les progéniteurs provenant d'embryons WT (Gotz *et al.*, 1998). En plus, *in vitro*, les cellules corticales de la glie radiale de mutants *Pax6* forment de plus grandes colonies. Inversement, les cellules sur-exprimant *Pax6* forment de plus petites colonies (Yamasaki *et al.*, 2001).

Les cellules corticales à e12,5 prolifèrent plus rapidement en l'absence du gène (Estivill-Torrus *et al.*, 2002). Cependant, lorsque le développement progresse, l'action de *Pax6* sur la prolifération s'inverse. Ainsi, à e15,5, la durée du cycle cellulaire est supérieure dans les cellules n'exprimant pas *Pax6* (Estivill-Torrus *et al.*, 2002). Une des hypothèses proposées pour expliquer ce phénomène est que les cellules auraient une horloge interne dont le mécanisme serait influencé par le contexte moléculaire et cellulaire qui change au cours du développement (Estivill-

Torres *et al.*, 2002). L'effet de *Pax6* sur le cycle cellulaire pourrait donc dépendre du stade de développement. Nos marquages de neurosphères montrent un gradient centrifuge croissant de l'expression de *Pax6* et de *Nestin* corrélant avec les cellules en prolifération (BrdU+). D'autres observations vont également dans ce sens. Lors de la corticogenèse (e12,5), les cellules souches et les progéniteurs de la zone ventriculaire (ZV) qui prolifèrent expriment fortement *Pax6* (Gotz *et al.*, 1998). Ceci laisse croire que l'expression de *Pax6* pourrait être plus élevée dans les cellules les plus primitives. Selon cette hypothèse, *Pax6* serait plus abondant dans les cellules souches que dans les progéniteurs primitifs et que dans les progéniteurs plus avancés (qui ont cessé de proliférer mais pas engagés dans une voie de différenciation).

D'après nos résultats, l'action de *Pax6* sur la prolifération des cellules rétinienne est la même que pour les cellules corticales. Il s'ensuit que le « dogme » selon lequel la fonction de *Pax6* était distincte selon la région du SNC, en l'occurrence le cortex et la rétine, repose sur une confusion des différents stades de développement. Lors de la corticogenèse, les neurones néo-corticaux sont générés, à partir de cellules souches neuronales proliférant dans la zone ventriculaire. Peu après leurs dernières divisions mitotiques, ces neurones migrent le long de la glie radiale pour former les différentes couches du cortex (O'Leary et Nakagawa, 2002). Il s'agit d'un développement où l'expansion est horizontale et la différenciation verticale. Ce mode de développement sous-tend le maintien durant une longue période d'un nombre important de cellules corticales dans un état primitif afin d'assurer d'une part, la prolifération et, d'autre

part, l'expansion de la ZV qui s'étend horizontalement durant la corticogenèse. Ainsi, dans le télencéphale d'un embryon de souris à e10, entre 5 et 20% des cellules sont des cellules souches (Qian *et al.*, 2000). La rétine ne présente pas ce mode de développement. La différenciation y est horizontale et centrifuge. Le nombre de cellules primitives décroît donc plus rapidement.

Dans la littérature, il y a beaucoup de confusion dans la terminologie utilisée. Souvent, notamment dans les études de prolifération, aucune distinction n'est faite entre cellules souches, progéniteurs et précurseurs. Ainsi, lorsque l'on étudie la prolifération des cellules corticales aux stades précoces du développement, il s'agit d'une population très primitive où la proportion de cellules souches est très élevée. En revanche, dans les études portant sur la rétine, les cellules sont plus matures et les cellules souches et progéniteurs primitifs y sont proportionnellement moins nombreux que dans le cortex. Il en résulte que les études de prolifération des cellules corticales et rétiniennes ne portent pas, en terme de stade de développement, sur le même type de cellules. Le phénotype de prolifération réduite des progéniteurs rétiniens dans les mutants *Pax6* conditionnels (Marquardt *et al.*, 2001) se rapproche d'avantage de la réduction de prolifération à e15,5 que de l'augmentation observée à e12,5 lors de la corticogenèse en l'absence de *Pax6* (Estivill-Torrus *et al.*, 2002). Par conséquent, nos résultats avec neurosphères (constituées de cellules très primitives) montrent que l'effet de *Pax6* sur la prolifération est le même dans le cortex et la rétine.

Un autre aspect de ces cellules souches que nous avons étudié est leur multipotence dans le contexte de l'absence de *Pax6*. Afin d'élucider l'effet de *Pax6* sur la capacité des cellules souches de pouvoir générer de progéniteurs multipotents, nous avons mis dans des conditions de différenciation des neurosphères WT et mutantes. Nos résultats de différenciation *in vitro* n'ont démontré aucune différence évidente entre les génotypes. Le Dr Gilbert Bernier a confirmé la multipotence de nos progéniteurs par PCR.

Ceci montre que, contrairement à ce qui était cru (Marquardt *et al.*, 2001), les cellules *Pax6*^{-/-} sont également multipotentes. Par conséquent, s'il existe une différence avec ce que l'on observe *in vivo*, celle-ci ne peut pas être intrinsèque aux cellules. Le Dr. Jocelyn David a effectué une analyse par hybridation de puces d'ADN avec des ARN extraits de neurosphères WT et *Pax6*^{-/-}. De cette analyse, il ressortait que les gènes *Six6*, *FoxA1* et *FoxA2* sont différenciellement exprimés, corroborant nos observations d'anomalies du cycle cellulaire en l'absence de *Pax6*.

Nos résultats divergents sur l'action de *Pax6* (par rapport à ce l'on observe *in vivo*) suggèrent l'implication d'un mécanisme extrinsèque, vraisemblablement la voie Notch. L'activation de cette voie nécessite un contact cellule-cellule et n'est, par conséquent, pas intrinsèque aux cellules. Les gènes de la voie Delta/Notch étaient

sous exprimés dans les cellules *Pax6*^{-/-}. Les Dr Mohammed Abdou et Gilbert Bernier ont pu confirmer cette expression différentielle par PCR quantitative.

La voie Notch est requise pour assurer, lors du développement, un équilibre entre la prolifération et la différenciation. Les récepteurs de cette voie sont activés par les ligands (Delta) exprimés à la surface des cellules adjacentes (Ohtsuka *et al.*, 1999). Il s'ensuit une inhibition latérale de la différenciation ne permettant pas l'activation des gènes proneuraux, et par conséquent la différenciation que dans un sous ensemble de cellules. Par conséquent, *in vivo*, lorsque des signaux induisent la différenciation de progéniteurs en un type cellulaire, les cellules se différenciant expriment le ligand Delta et peuvent ainsi inhiber la différenciation des cellules adjacentes en le même type cellulaire (Figure 3.1). En conséquence, cela empêche la différenciation d'un important ensemble de cellules en un même type cellulaire. Les progéniteurs qui ne se sont pas engagés dans une voie de différenciation restent donc disponibles aux influences d'autres signaux.

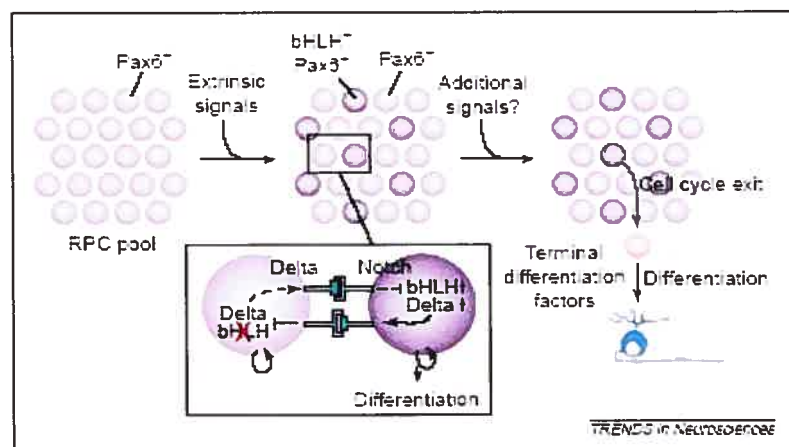


Figure 3.1. Coopération des bHLH pour la spécification des types cellulaires rétiniens et de la voie Notch inhibitrice de la différenciation neuronale pour maintenir les cellules à l'état de progéniteurs indifférenciés. (Marquardt et Gruss, 2002).

Ce phénomène d'inhibition latérale serait vraisemblablement à l'origine du phénotype que l'on observe dans les mutants *Pax6* conditionnels. Dans ces mutants où *Pax6* est inactivé à e10,5, la rétine générée est hypocellulaire et ne contient qu'un type cellulaire, les cellules amacrines (Marquardt *et al.*, 2001). Selon notre hypothèse, en l'absence de *Pax6*, les RPC s'engageant dans la voie de différenciation en cellules amacrines (chronologiquement le premier type cellulaire à apparaître ne requérant pas *Pax6* pour être généré) ne serait plus en mesure d'exercer une inhibition sur les cellules voisines par le truchement de la voie Notch. Par conséquent, il y a perturbation de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation. Les RPC s'engagent tous dans cette voie de différenciation et il y a extinction du pool de progéniteurs primitifs qui auraient normalement dû continuer à proliférer, d'où l'hypocellularité observée.

Ces observations ont permis l'élaboration de plusieurs hypothèses concernant le rôle de *Pax6* dans la prolifération et la différenciation des cellules rétiniennes. Ainsi, dans les RPC, *Pax6* avec *Hes1* et *Hes5* (effecteurs de la voie Notch) et, fort probablement, d'autres déterminants rétiniens précoces, seraient requis pour le maintien de la prolifération et de la multipotence (Furukawa *et al.*, 2000). Il s'ensuit que la voie Notch agit comme répresseur tandis que *Pax6* agit comme activateur des gènes proneuraux. En conséquence, *Pax6* semble être requis pour permettre une prolifération et une différenciation normales des progéniteurs rétiniens.

Dans le cas d'une différenciation *in vitro*, la voie Notch ne serait pas essentielle en raison, d'une part d'une différenciation aléatoire (pas spécifiquement dirigée dans une voie par des signaux du milieu) et, d'autre part, la relative rareté des contacts cellule-cellule nécessaires à son activation. Dans ce contexte, les RPC s'engageraient spontanément, et indépendamment les uns des autres dans des voies de différenciation distinctes. Il s'ensuit que, *in vitro*, la régulation de la différenciation qu'assure la voie Notch n'est pas requise pour la multipotence des RPC. Ceci expliquerait que, malgré la réduction de la voie Notch, nos PRC *Pax6*^{-/-} sont quand même multipotents.

3.2 Conclusion

En conclusion, dans la régulation de la prolifération des progéniteurs rétiniens, nos résultats suggèrent que, en plus de l'expression des gènes bHLH, *Pax6* pourrait contrôler les gènes de la voie Notch. Cependant, il faut nuancer la portée de nos résultats dans la mesure où il s'agit de résultats obtenus d'expériences *in vitro*. D'autres études devront être effectuées, incluant des transplantations de cellules souches rétiniennes ou de transductions virales *in vivo*, afin d'élucider le rôle de *Pax6* dans ce contexte. Néanmoins, nos résultats suggèrent que, lors de la rétino-genèse, *Pax6* assure la coordination de la prolifération et de la différenciation cellulaires par

des mécanismes intrinsèques et extrinsèques par le truchement de l'activation directe ou indirecte de deux voies antagonistes (gènes bHLH proneuraux et la voie Notch). Nos résultats confirment que le gène *Pax6* est le maître régulateur du développement de l'œil.

Références

Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X. et Gruss, P. 2000. Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev.* **14** : 2701-2711.

Bajeux, M., Pardoene, A., Dugardin, C. et Aublin, B. (3 novembre 2004). L'image et l'oeil.

<http://www.ifrance.com/formationimage/>

Bäumer, N., Marquardt, T., Stoykova, A., Ashery-Padan, R., Chowdhury, K. et Gruss, P. 2002. Pax6 is required for establishing naso-temporal and dorsal characteristics of the optic vesicle. *Development* **129** : 4535-4545.

Bergstrom, D.A., et Tapscott, S.J. 2001. Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family. *Mol Cell Biol.* **21** : 2404-2412.

Bernier, G., Vulkovich, W., Neidhardt, L., Herrmann, B.G. et Gruss, P. 2001. Isolation and characterization of a downstream target of Pax6 in the mammalian retinal primordium. *Development* **128** :3987-3994.

Cabana, T. (7 novembre 2004). Organogenèse : Neurulation et dérivés du neurectoderme.

<http://www.mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2460/organo1.html>

Chenn, A. et Walsh, C.A. 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* **297** : 365-369.

Chow, R.L., Altmann, C.R., Lang, R.A. et Hemmati-Brivanlou, A. 1999. Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* **126** : 4213-4222.

Collinson, J. M., Hill, R.E. et West, J. D. 2000. Different roles for Pax6 in the optic vesicle and facial epithelium mediate early morphogenesis of the murine eye. *Development* **127** : 945-956.

Disalvo, C.V., Zhang, D. et Jacobberger, J.W. 1995. Regulation of NIH-3T3 cell G1 phase transit by serum during exponential growth. *Cell Prolif.* **28** : 511-524.

Estivill-Torres, G., Pearson, H., Heyningen, V., Price, D.J. et Rashbass, P. 2002. *Pax6* is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development* **129** : 455-466.

- Furelaud, G. et Delarue, M. (7 novembre 2004). Les vésicules embryonnaires du système nerveux des Vertébrés.
http://www.snv.jussieu.fr/vie/documents/c_embryo/vesicules/vesicules_embryon.htm
- Fujiwara, M., Uchida, T., Osumi-Yamashita, N. et Eto, K. 1994. Uchida rat (*rSey*) : a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant. *Differentiation* **57** : 31-38.
- Furukawa, T., Mukherjee, S., Bao, Z.Z., Morrow, E.M. et Cepko, C.L. 2000. *rax*, *Hes1*, and *notch1* promote the formation of Müller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* **26** : 383-394.
- Gage, F.H. 2000. Mammalian neural stem cells, *Science* **287** : 1433-1438.
- Garrity, M.M., Burgart, L.J., Riehle, D.L., Hill, E.M., Sebo, T.J. et Witzig, T. 2003. Identifying and quantifying apoptosis: navigating technical pitfalls. *Mod Pathol.* **16** : 389-94.
- Gotz, M., Stoykova, A., et Gruss, P. 1998. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* **21** : 1031-1044.
- Grindley, J.C., Davidson, D.R. et Hill, R.E. 1995 The role of *Pax-6* in eye and nasal development. *Development* **121** : 1433-1442.
- Hatakeyama, J. et Kageyama, R. 2004. Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Sem. Cell Dev. Biol.* **15** : 83-89
- Halder, G., Callaerts, P. et Gehring, W.J. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* **267** : 1788-1792.
- Hatakeyama, J. et Kageyama, R. 2004. Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Seminars Cell Dev. Biol.* **15** : 83-89
- Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B.L., Ton, C.C., Saunders, G.F., Hanson, I.M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N.D. et Van Heyningen, V. 1991. Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* **354** : 522-525.
- Hogan BL, Hirst EM, Horsburgh G, Hetherington CM. 1988. Small eye (*Sey*) : a mouse model for the genetic analysis of craniofacial abnormalities. *Development* **103** : 115-119.

- Hyer, J., Mima, T., et Mikawa, T. 1998. FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain. *Development* **125** : 869-877.
- Jean, D., Bernier, G. et Gruss, P. 1999. *Six6 (Optx2)* is a novel murine *Six3*-related homéobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk. *Mech. Dev.* **84** : 31-40.
- Jun, S. et Desplan, C. 1996. Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* **122** : 2639-2650.
- Krishan, A. 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.* **66** : 188-193.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewsky, N., Scardigli, R., Guillemot, F. et Gruss, P. 2001. Pax6 is required for the multipoint state of retinal progenitor cells. *Cell* **105** : 43-55.
- Marquardt, T. et Gruss, P. 2002. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *TRENDS in Neurosciences* **25** : 32-38.
- Niimi, T., Seimiya, M., Kloter, U. Flister, S et Gehring, G.H. 1999. Direct regulatory interaction of the eyeless protein with an eye-specific enhancer in the sine oculis gene during eye induction in *Drosophila*. *Development* **126** : 2253-2260.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F. et Kageyama, R. 1999. Hes1 and Hes5 as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.* **18** : 2196-2207.
- O'Leary, D.D.M. et Nakagawa, Y. 2002. Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12** : 14-25.
- Prada, C., Puga, J., Perez-Mendez, L., Lopez, R. et Ramirez, G. 1991. Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Europ. J. Neurosci.* **3** : 559-569
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A. et Temple, S. 2000. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* **28** : 69-80.
- Sakai, M., Serria, M.S., Ikeda, H., Yoshida, K., Imaki, J. et Nishi, S. 2001. Regulation of c-maf gene expression by Pax6 in cultured cells. *Nucleic Acids Research* **29** : 1228-1237.

- Schedl, A., Ross, A., Lee, M., Engelkamp, D., Rashbass, P., Van Heyningen, V. et Hastie, N.D. 1996. Influence of *Pax6* gene dosage on development : overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* **86** : 71-82.
- Schmahl, W., Knoedlseder, M., Favor, J. et Davidson, D. 1993. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations are associated with Small eye (*Sey*) in the mouse, a point mutation at the *Pax-6*-locus. *Acta Neuropathol.* **86** :126-135.
- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. et Gruss, P. 1997. *Pax6* is required for differentiation of glucagon-producing α -cells in mouse pancreas. *Nature* **387** : 406-409.
- Ton, C.C., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M.M., Monaghan, P. Jordan, T., Van Heyningen, V., Hastie, N.D., Meijers-Heijboer, H., Drechsler, M., Royer-Pokora, B., Collins, F., Swarrop, A., Strong, L. et Saunders, G. 1991. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* **67** : 1059-1074.
- Tropepe, V., Coles, B.L.K., Chiasson, B.J., D. Horsford, D.J., Elia, A.J., McInnes, R.R. et van der Kooy, D. 2000. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* **287** : 2032-2036.
- Van Raamsdonk, C.D. et Tilghman, S.M. 2000. Dosage requirement and allelic expression of *PAX6* during lens placode formation. *Development* **127** : 5439-5448.
- Walther, C. et Gruss, P. 1991. *Pax 6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113** : 1435-1449.
- Watanabe, T. et Raff, M.C. 1988. Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* **332** : 834 – 837.
- Yamasaki, T., Kawaji, K., Ono, K., Bito, H., Hirano, T., Osumi, N., et Kengaku, M. 2001. *Pax6* regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. *Development.* **128** : 3133-3144.

7

