

/
Université de Montréal

**Régulation de l'expression du gène Six6 par les facteurs
de transcription Lhx2 et Pax6 dans le contexte des
cellules souches rétiniennes**

par
Marie-Pier Champagne

Département de biologie moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences
en biologie moléculaire

août, 2008

©Marie-Pier Champagne, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation de l'expression du gène Six6 par les facteurs de transcription Lhx2 et Pax6 dans
le contexte des cellules souches rétinienne

présenté par :
Marie-Pier Champagne

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dindial Ramotar, président-rapporteur
Gilbert Bernier, directeur de recherche
Sylvain Guérin, membre du jury

Résumé

La rétino-génèse des vertébrés est la culmination de processus biologiques complexes parfaitement exécutés. Cette délicate orchestration est principalement contrôlée par les facteurs de transcription qui permettent aux progéniteurs rétiniens de proliférer, de s'auto-renouveler et de se différencier de façon appropriée. Les facteurs de transcription à homéodomaine sont les protéines qui sont responsables de la démarcation du site du primordium optique et participeront même à la différenciation tardive des différents types cellulaires de la rétine. Le contrôle génétique concernant l'activation de l'expression de facteurs de transcription est peu connu. Nous avons étudié les séquences génomique avoisinant le gène Six6 afin d'identifier et mieux comprendre son promoteur. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine et des essais luciférase ont confirmé la liaison et la transactivation synergique du promoteur potentiel de Six6 par Lhx2 et Pax6 *in vitro*. Cette présente étude confirme et précise également le rôle de Lhx2 au niveau du développement précoce de l'œil. La compréhension détaillée des réseaux génétiques régulant les progéniteurs rétiniens à former une rétine fonctionnelle est essentielle. En effet, lorsque ces connaissances seront acquises, nous serons en mesure d'appliquer les thérapies cellulaires pour rétablir les fonctions rétiniennes lors de pathologies dégénératives.

Mots-clés : rétine, développement, progéniteurs rétiniens, vésicules optiques, facteur de transcription, homéodomaine, Pax6, Lhx2, Six6

Abstract

Vertebrate eye development is the result of multiple perfectly executed biological processes. This tight orchestration is principally controlled by transcription factors. Homeobox-containing transcription factors are expressed in the presumptive eye field and are required to initiate eye development and for final retinal cell differentiation. The genetic control of these transcription factors is poorly understood. We analysed *Six6*'s nearby genomic sequence to characterise potential promoter regions. Chromatin immunoprecipitations and luciferase assays confirmed the binding and the *in vitro* synergistic trans-activation of *Six6* potential promoter by Lhx2 and Pax6. This study also demonstrates the contribution of Lhx2 for the establishment of the presumptive retina field at the neural plate stage. The detailed knowledge of genetic networks regulating the formation of a functional retina by retinal progenitor is crucial. Indeed, when these mechanisms will be elucidated, we will be able to establish regenerative retinal cell therapy.

Keywords : retina, development, homeobox, transcription factor, optic vesicle, Lhx2, Pax6, Six6

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
Liste des Tableaux	VI
RÉSUTAT.....	VI
ANNEXE II.....	VI
Liste des Figures	VII
INTRODUCTION.....	VII
RÉSULTATS.....	VII
REMERCIEMENTS.....	VIII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1. LES PATHOLOGIES RÉTINIENNES	1
CHAPITRE 2. EMBRYOGENÈSE DE L’OEIL	4
2.1 IMPLICATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION.....	11
2.1.1 Implication des gènes <i>bHLH</i> dans le développement de la rétine.....	13
2.1.2 Fonction des facteurs de transcription à homéodomaine.....	15
CHAPITRE 3: LES LHX	19
3.1: LHX2.....	19
3.1.1: LE COFACTEUR LDB1	22
CHAPITRE 4: LES PROTÉINES PAX	24
4.1 PAX6.....	24
CHAPITRE 5: LES GÈNES DE LA FAMILLE SIX	28
5.1: LA SOUS-FAMILLE SIX3/SIX6.....	30
5.2 LE RÉSEAU SIX/EYA.....	33
HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	35
RÉSULTATS	36

ARTICLE: THE LIM HOMEODOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR LHX2 IS REQUIRED TO SPECIFY THE RETINA FIELD AND SYNERGISTICALLY COOPERATES WITH PAX6 FOR SIX6 TRANS-ACTIVATION.....	36
MISE EN CONTEXTE	36
SUMMARY	38
INTRODUCTION	39
MATERIALS AND METHODS	42
<i>Animals</i>	42
<i>In situ hybridization</i>	42
<i>RT-PCR and Quantitative Real-Time PCR</i>	42
<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>	43
<i>Luciferase Assay</i>	43
<i>Cell culture</i>	44
<i>Immunofluorescence</i>	44
<i>DNA micro-array</i>	44
<i>DNA electroporation</i>	45
<i>Statistical analysis</i>	45
RESULTS	46
<i>Lhx2 demarcates the presumptive retina field</i>	46
<i>Lhx2 is required to initiate Six3, Rx and Pax6 expression within the retina field</i>	46
<i>Lhx2 is required for Six6 expression in the optic vesicle</i>	47
<i>Lhx2 and Pax6 can bind to the chromatin at the Six6 loci in vivo and trans-activate Six6 regulatory elements in vitro</i>	48
<i>Lhx2 and Pax6 are required for Six6 expression in retinal stem cells</i>	49
<i>Lhx2 and Pax6 can synergistically activate Six6 expression in retinal stem cells</i>	51
DISCUSSION	53
REFERENCES	57
FIGURE LEGENDS	61
DISCUSSION	76
PERSPECTIVES	79
CONCLUSION	81

ANNEXE I: ACCORD DES COAUTEURS I

ANNEXE II: ANALYSE BIOINFORMATIQUE..... II

Liste des tableaux

Résutat

Tableau I. Comparative gene expression analysis between WT and Lhx2^{-/-} embryos.

Annexe II

Tableau II. Résultats d'analyse bioinformatique des sites potentiels de liaison de facteurs de transcription contenus dans la première sequence conservée entre l'humain et la souris en amont du gene *Six6* à l'aide du logiciel MattInspector de Genomatix.II

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Spécialisation des cellules souches embryonnaires	2
Figure 2. Types cellulaires engendrés par la gastrulation	4
Figure 3. Stade embryonnaire du développement de l'œil	6
Figure 4. Tissus embryonnaires responsables de la structure anatomique de l'œil mature ..	8
Figure 5. Histologie et types cellulaires composant la rétine mature des mammifères.....	10
Figure 6. Facteurs de transcription à homéodomaine principaux exprimés au stade de la vésicule optique.	17
Figure 7. Implication des facteurs de transcription dans la rétino-génèse	18
Figure 8. Embryons E13,5 de type sauvage, hétérozygote et mutant pour <i>Lhx2</i>	21
Figure 9. Profil d'expression et organisation en paquet des gènes <i>Six</i> chez l'embryon de souris à E10,5.....	29
Figure 10. Profil d'expression de <i>Six6</i> au jour E8,25 (A) et E9,5 (B,C) de la souris.	32

Résultat

Figure 1. <i>Lhx2</i> is expressed in the visual system and demarcates the retina field	58
Figure 2. <i>Lhx2</i> is required for <i>Six3</i> , <i>Rx</i> and <i>Pax6</i> expression in the retina field	60
Figure 3. <i>Lhx2</i> is required for <i>Six6</i> expression in the optic vesicle.....	62
Figure 4. <i>Lhx2</i> and <i>Pax6</i> can bind to the chromatin at the <i>Six6</i> loci <i>in vivo</i> and trans-activate <i>Six6</i> regulatory elements <i>in vitro</i>	64
Figure 5. <i>Lhx2</i> and <i>Pax6</i> are required for <i>Six6</i> expression in retinal stem cells.....	66
Figure 6. <i>Lhx2</i> and <i>Pax6</i> can synergistically activate <i>Six6</i> expression in retinal stem cells.	68

Remerciements

Je voudrais remercier ma mère, Nicole Savoie, pour son support incommensurable tout au long de ma vie. Je suis également très reconnaissante à l'aide apporté par Nicolas Tétreault. Il m'a permis de voir le soleil lors des jours de pluie à travers la petite fenêtre du sous-sol du laboratoire. Merci aux membres du laboratoire qui ont sut faire de mon environnement de travail un endroit vivant et stimulant.

Merci à Gilbert Bernier de m'avoir confié un projet intéressant et prometteur. Finalement, merci à Nadia Comenaci qui nous a tous prouvé que la perfection était un objectif pouvant être atteint.

Introduction

Chapitre 1. Les pathologies rétiniennes

Les maladies dégénératives de la rétine affectent une grande portion de la population mondiale. La perte graduelle de l'acuité visuelle, associée à ces maladies, est causée par l'atteinte irréversible des cellules de la rétine. Dans le cas de la dégénérescence maculaire reliée à l'âge, première cause de cécité irréversible des pays industrialisés, une accumulation de dépôts sera responsable de l'atteinte des cellules rétiniennes [1]. Ces dépôts, nommés drusens, causent une atrophie de l'épithélium pigmentaire et secondairement une destruction irrévocable et progressive des photorécepteurs [2]. Les prévisions indiquent que l'incidence et la prévalence de la maladie dans les pays développés augmenteront de 50% d'ici 2020, avec le vieillissement de la population [3, 4]. D'autres pathologies peuvent affecter la rétine, et ce, à un âge précoce. C'est le cas de la rétinite pigmentaire, terme regroupant une classe de désordres héréditaires hétérogènes qui affecte l'intégrité de la vision dès les premières décades de la vie [5]. Les causes biochimiques exactes de la maladie sont encore mal comprises. Il est tout de même clair que c'est le métabolisme des bâtonnets qui serait responsable de l'atteinte générale touchant également les cônes et l'épithélium pigmentaire rétinien.

Une multitude de désordres affectent l'intégrité de la rétine. En fait, il en existe tant que plusieurs sont considérés orphelins, signifiant qu'une multitude de causes peuvent être responsables de ces pathologies. Il est donc peu probable que des études visant leur prévention soient déployées étant donné l'infime partie de la population concernée. De plus, l'homme, contrairement à d'autres vertébrés, est incapable de produire les cellules nerveuses rétiniennes tout au long de sa vie. Il lui est donc impossible de réparer les dommages causés à la rétine [6-8]. Les maladies dégénératives étant la plus grande cause de cécité, il va de soit que la thérapie cellulaire à l'aide de cellules souches est plus qu'appropriée afin de régénérer les neurones atteints et ainsi restaurer la vision [9].

Les cellules souches embryonnaires (CSE) représentent le type cellulaire le plus primitif chez tous les eucaryotes supérieurs. Ces cellules sont totipotentes, donc en mesure d'engendrer tous les types cellulaires nécessaires au développement complet de l'organisme en question en plus des cellules placentaire. Ce potentiel absolu de différenciation en fait un outil thérapeutique prometteur [10]. De plus, il a maintenant été démontré chez l'humain qu'il est possible de reprogrammer des fibroblastes adultes afin de leur rendre des caractéristiques propres aux cellules souches embryonnaires [11]. Le raffinement et l'application de cette technique de reprogrammation nous permettra d'éviter les conflits éthiques causés par l'utilisation d'embryons humains [12]. De plus, cette technologie permettra de réaliser des greffes cellulaires autologues, ce qui éliminerait les risques de rejet. Par contre, le grand potentiel prolifératif et de multipotence des CSE est une arme à double tranchant puisqu'elles sont difficiles à contrôler.

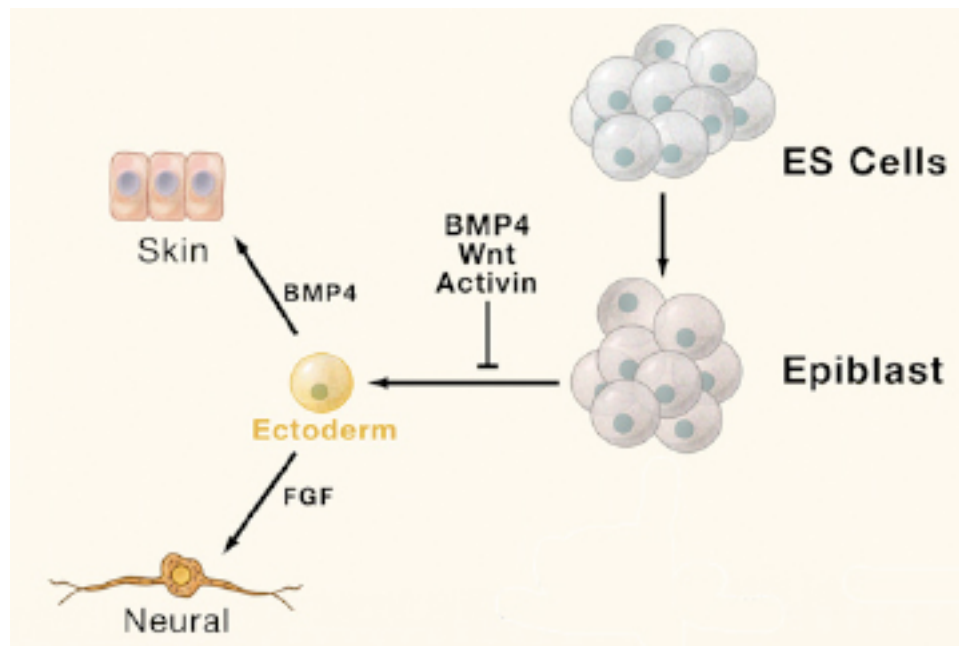


Figure 1. Spécialisation des cellules souches embryonnaires [10]

À plus court terme pour des fins de thérapies cellulaires, il est possible d'isoler des cellules souches rétiniennes du corps ciliaire d'humain et de souris adultes [13]. Le nombre de cellules souches présentes est toutefois très limité. Il a aussi été démontré chez le rat que les cellules pigmentées de l'iris présentent des antigènes neuronaux. Ces cellules sont incapables de se différencier d'elles-mêmes en neurone. Par contre, l'induction de l'expression du facteur de transcription à homéodomaine Crx les entraîne à devenir des bâtonnets, un type de photorécepteur. Ces types cellulaires pourraient faire l'objet de greffes autologues. Une iridectomie ou une technique d'extraction de cellules du corps ciliaire d'un patient combiné à une différenciation de ces cellules pourrait donc permettre ces greffes [14].

Les cellules gliales de Müller possèdent aussi un potentiel régénérateur intrinsèque. En effet, il fut démontré chez le rat dont la rétine fut endommagée par un agent toxique que ces cellules sont en mesure d'engendrer des cellules bipolaires et des bâtonnets [15]. Les neurones ainsi produits sont en nombre très limité. Cette contingence peut être résolue par l'emploi d'acide rétinoïque qui favorise la production de ces neurones, tout comme une surexpression de certains facteurs de transcription à homéodomaine et de type hélice-boucle-hélice basiques (bHLH). Ces surexpressions, qui entraînent une augmentation du nombre de neurones générés, permettent aussi l'obtention d'autres types de neurones rétiniens [15].

La rétine constitue la portion photosensible du système nerveux central (SNC). Son accessibilité, le niveau de connaissance de son organisation neuronale ainsi que des technologies de pointe en font l'organe pionnier de choix afin d'établir des thérapies de restauration du SNC [16]. Pour être en mesure d'appliquer ces thérapies, il est crucial de connaître et comprendre toutes les subtilités qui mènent les cellules souches à devenir des neurones fonctionnels intégrés à la topographie complexe de la rétine. En plus d'être un organe neuronal de choix pour l'établissement de thérapies cellulaires, la rétine permet d'établir des modèles pour le développement moléculaire du SNC [17].

Chapitre 2. Embryogenèse de l'oeil

Lorsque les gamètes mâles et femelles fusionnent lors de la fécondation, il s'en suit l'apparition des CSE. Ces cellules se diviseront pour produire un blastocyste lors du stade de la segmentation. Ensuite, la gastrulation se produit pour permettre aux cellules de se spécialiser pour former les 3 feuillets embryonnaires primitifs; le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. L'ectoderme se forme suite à l'inhibition de certaines voies de signalisation comme BMP, Wnt et Activin (voir figure 1) [10]. Ce tissu est responsable de la formation des cellules formant le système nerveux central, donc des neurones de la rétine. La gastrula subit ensuite la neurulation, qui consiste à l'établissement des ébauches neurales (voir figure 2). Un épaissement de l'ectoderme dans la région dorsale moyenne est à l'origine de la plaque neurale. Celle-ci se creuse et s'invagine afin de former la gouttière neurale. Les plis neuraux, qui constituent les bords de la gouttière, s'élèveront pour permettre leur fusion. Cette fusion, qui se produit au niveau dorsal, donne ainsi naissance au tube neural.

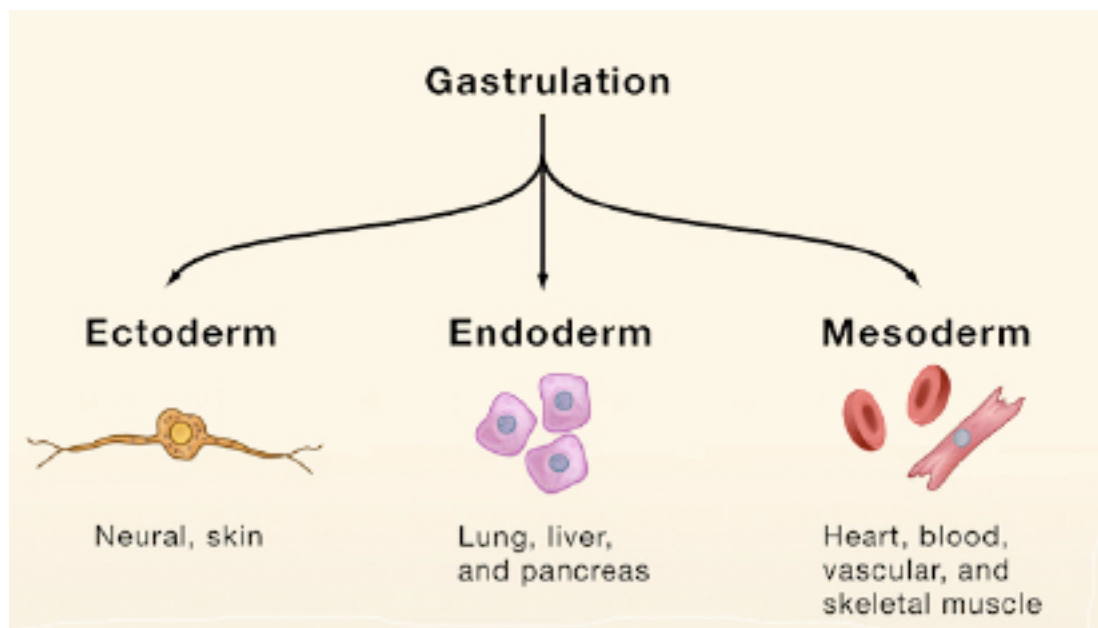


Figure 2. Types cellulaires engendrés par la gastrulation [10].

Les yeux forment un organe bilatéral dont le développement s'effectue à partir d'un site précis localisé au niveau de la portion antérieure de la plaque neurale [18]. Cette zone, nommée champ oculaire, est entourée de cellules précurseurs de l'hypothalamus et du télencéphale [19-21]. Le dédoublement du champ oculaire unique s'effectue grâce à la participation du morphogène Sonic Hedgehog, Shh [22]. Chez la souris, la formation des structures primitives de l'œil débute au jour embryonnaire 8,25 (E8,5) lorsque le tube neural s'évagine, de façon bilatérale et symétrique pour ainsi former deux vésicules optiques. Grâce à la pression du liquide contenu dans le tube neural, l'évagination évolue à travers le mésenchyme [23]. Ces vésicules optiques, qui sont en fait une continuité du tube neural, sont bien définies au jour E9,5. La portion distale et ventrale de ces vésicules engendreront, respectivement, la rétine et le nerf optique [24]. Plusieurs évidences démontrent que l'élaboration de la topographie complexe de la neurorétine débiterait au niveau des vésicules optiques [25]. À ce stade, il y a contact entre l'ectoderme de surface et le neuroectoderme de la vésicule optique. Ce contact essentiel engendre des changements structuraux complexes au niveau des deux tissus [26]. Ce qui permet à l'ectoderme de proliférer et d'épaissir afin de devenir la placode cristallienne puis, à la vésicule optique d'évoluer au stade de la cupule optique au jour E10 (voir figure 3) [27].

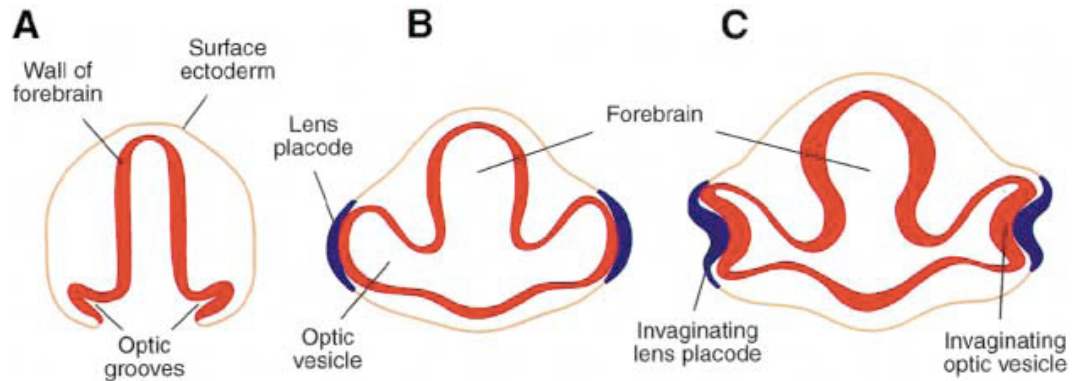


Figure 3. Stade embryonnaire du développement de l'œil [27] A) Déformation du tube neural qui permettra par la suite de former les vésicules optiques. B) Stade embryonnaire des vésicules optiques. C) Invagination des vésicules optiques permettant la génèse des cupules optiques.

La morphogénèse que subit la vésicule optique pour devenir la cupule optique est un événement clef très sensible à une altération de l'expression génique et aux influences micro-environnementales [28-30]. Cette morphogénèse est en fait une invagination du neuroectoderme et de la placode cristallienne. Ces événements sont précisément coordonnés [23]. Au niveau cellulaire, la formation de la cupule optique implique une augmentation du nombre de microtubules et de microfilaments permettant des modifications de forme [31, 32].

La portion ventrale et dorsale des cupules optiques possède des identités propres. Ils expriment de façon différentielle certains facteurs de transcription tel Vax2 et Pax2, les enzymes de synthèse d'acide rétinoïque, les récepteurs d'éphrine, les molécules de la famille BMPs (Bone Morphogenic Protein) et répondent avec divergence aux molécules de signalisation [33-40]. Soulignons la participation des molécules de signalisation telle Shh qui, en plus d'être responsable de la division du champ oculaire unique, confère et permet le maintien de l'identité du compartiment ventral [41]. BMP4 agit de façon antagoniste et intervient au niveau de la portion dorsale de la cupule optique [42, 43]. Par ailleurs, la portion dorsale de la cupule optique se développe plus rapidement. De plus, ce n'est que la

portion ventrale qui donne naissance à la fissure choroïde [44]. Mentionnons également que la cupule optique donne naissance à la rétine neurale ainsi qu'aux fibres nerveuses du nerf optique. Le neuroépithélium avoisinant la cupule est responsable de la maturation du chiasma optique, de l'épithélium pigmentaire ainsi que des feuillets myélinisés qui protègent les fibres du nerf optique [45]. L'organisation et le développement des structures neurales des mammifères impliquent la différenciation des progéniteurs en type cellulaire précis dans le neuroépithélium [46].

Le neuroectoderme permet donc la formation du nerf optique et des neurones de la rétine. En ce qui concerne les autres composantes principales de la structure complexe de l'œil mature, elles proviennent de trois autres lignées tissulaires (voir figure 4). L'ectoderme de surface donne naissance à la lentille et à l'épithélium cornéen. La crête neurale est responsable de la formation de la sclère et du stroma cornéen. Finalement, les cellules du mésoderme forment les muscles extra-oculaires ainsi que le manteau vasculaire et fibreux [47].

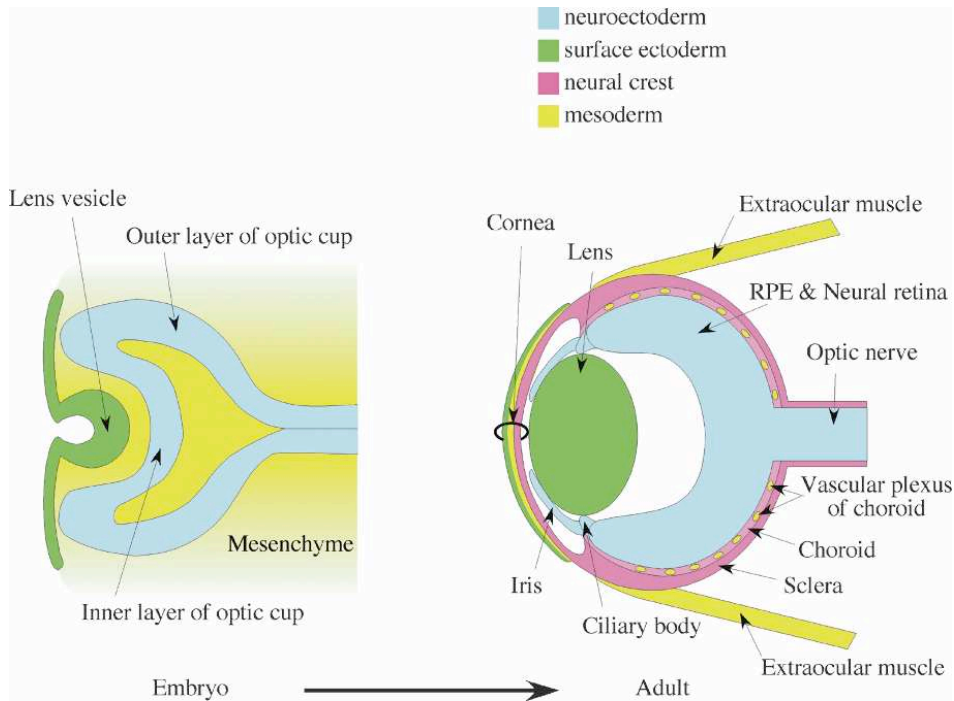


Figure 4. Tissus embryonnaires responsables de la structure anatomique de l'œil mature [47].

La rétine est protégée par une barrière hématorétinienne externe formée par l'épithélium pigmentaire. Cet épithélium, qui recouvre la couche de photorécepteur, est constitué d'une mono-couche de cellules pigmentées qui transmet les nutriments des tissus vasculaires de la choroïde vers les différentes couches de la rétine (voir figure 5). La rétine neurale mature comporte sept types cellulaires disposés dans trois structures laminaires distinctes: ganglionnaire, interne et externe (voir figure 4 et 6) [17]. Six de ces types cellulaires sont des neurones et un correspond aux cellules gliales de Müller. Chacune de ces cellules est morphologiquement et fonctionnellement distincte. Elles possèdent également une localisation ainsi qu'une orientation bien précise au niveau des structures laminaires de la rétine (voir figure 5). Les photons sont d'abord captés par les différents pigments des photorécepteurs. Les cônes et les bâtonnets, qui constituent les deux types de photorécepteurs de la rétine, transmettent les signaux aux interneurones, qui vont moduler

l'influx (cellules bipolaires, horizontales et amacrines). Ensuite, l'information rejoint les cellules ganglionnaires qui relayent le tout au cerveau via le nerf optique [48]. L'interprétation des stimulus visuels est effectuée dans l'aire visuelle du cerveau des vertébrés.

Donc, les photorécepteurs, les cellules bipolaires, horizontales, ganglionnaires, amacrines et gliales de Müller sont générés par des progéniteurs communs [49]. En effet, les cellules souches rétinienne embryonnaires (CSRE), qui ont la capacité de générer ces types cellulaires, sont contenues dans le neuroectoderme de la vésicule optique. Une différenciation successive et ordonnée permet à ces cellules souches de former une rétine organisée et fonctionnelle [50]. Cette production continue de neurones est supportée par un approvisionnement constant de progéniteurs rétinien. Chez la souris, la formation des neurones rétinien débute au jour E10,5. Les différents types cellulaires sont générés dans un ordre temporel conservé à travers plusieurs espèces. Les cellules ganglionnaires sont formées les premières et les gliales de Müller les dernières. Plus précisément, les cellules ganglionnaires, amacrines, les cônes et les cellules horizontales se différencient à des stades précoces au niveau de l'embryogenèse. Les bâtonnets et les cellules bipolaires sont, quant à eux, majoritairement produits après la naissance (voir figure 7). L'expansion de la population de progéniteurs rétinien se poursuit donc après la naissance. Leur juste prolifération est cruciale à la différenciation du bon nombre et du bon type de neurones dans la rétine. C'est l'expression différentielle de protéines appelées facteurs de transcription qui permettra aux progéniteurs d'adopter une certaine identité cellulaire [17].

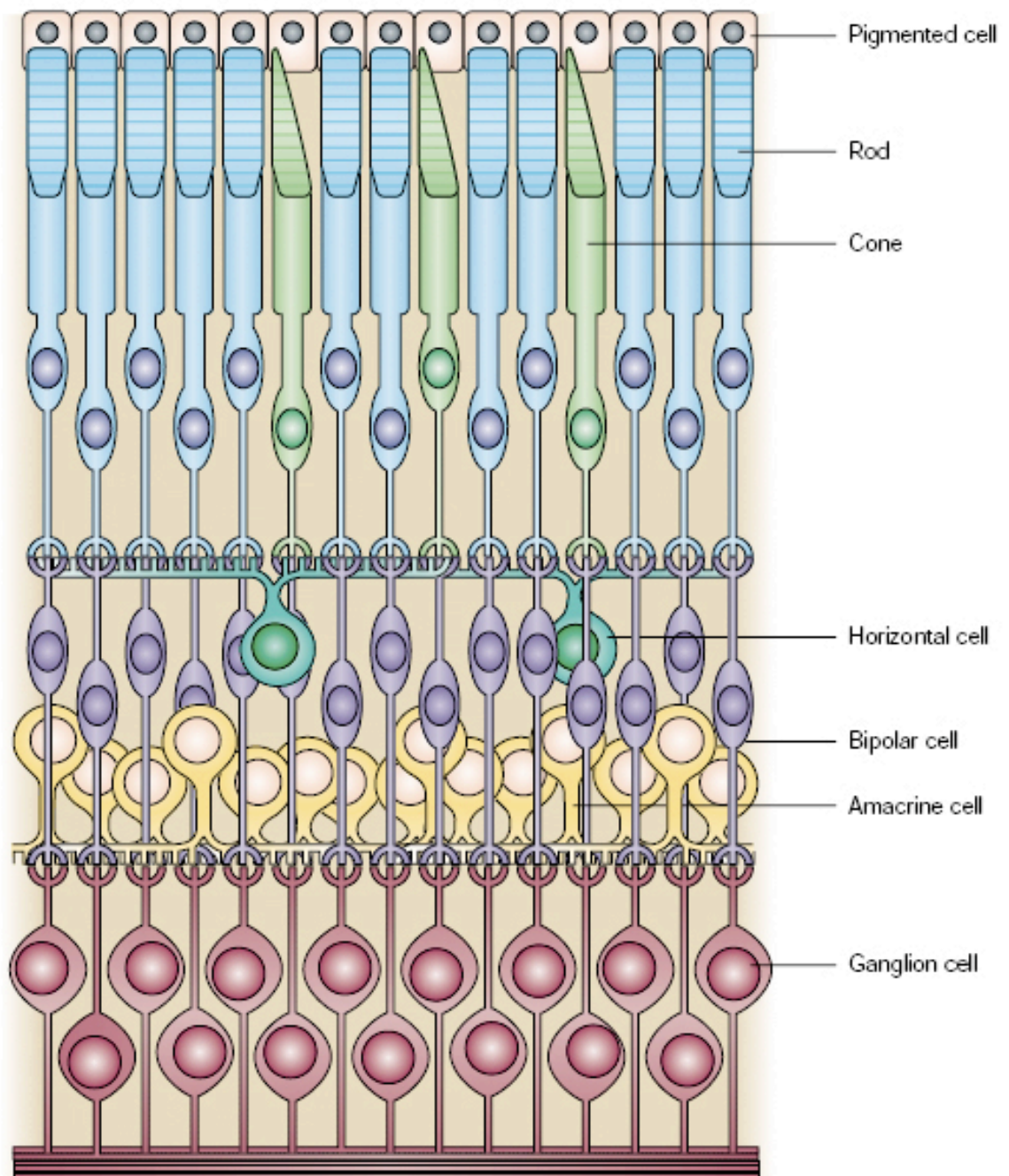


Figure 5. Histologie et types cellulaires composant la rétine mature des mammifères [51].

2.1 Implication des facteurs de transcription

Il existe plusieurs similarités fonctionnelles et moléculaires au niveau du système visuel des différentes espèces animales, et ce, malgré des différences morphologiques importantes [52]. Parmi ces similarités, notons la participation des facteurs de transcription qui possèdent un rôle crucial dans le développement de l'œil de plusieurs espèces. Les facteurs de transcription sont des protéines qui, grâce à des domaines de liaison à l'ADN, vont moduler de façon soit positive ou négative la transcription de gènes cibles.

L'expression coordonnée, tant au niveau du temps que de l'espace, des facteurs de transcription *Rx*, *Pax6*, *Six6*, *Six3*, *Lhx2*, *ET* et *tll* permet la spécification du champ morphogénétique oculaire. Donc, les facteurs de transcription permettent aux cellules de cette région de la plaque neurale de posséder, déjà à ce stade, des caractéristiques identitaires associées à l'œil. La plaque neurale précède l'apparition des vésicules optiques et est essentielle à leur formation [53]. Ces facteurs de transcription sont non seulement indispensables à la formation de l'œil, mais certains d'entre eux sont suffisant pour la création d'œil ectopique. La surexpression individuelle des facteurs de transcription à homéodomaine *Six3*, *Six6*, *Rx* et *Pax6* permet la formation d'yeux et de rétines ectopiques ou l'élargissement de certaines structures oculaires [54-58]. À noter, la participation essentielle dans le développement précoce de l'oeil de facteurs de transcription tels *Hes1* et *Otx2* qui, malgré le fait qu'ils ne soient pas exprimés au niveau des deux champs oculaires bilatéraux, vont intervenir indirectement en régulant la formation du cerveau antérieur [59-61]. À noter qu'en plus de la fonction essentielle des facteurs de transcription, il y a l'action importante des molécules de signalisation sur la régulation du développement oculaire. Par exemple, notons la participation d'un nombre réduit de familles de molécules de signalisation: HedgeHog tel que mentionné précédemment, *Wnt*, *Fgf*, *BMP* et *Tgfb* [61-63]. Ces molécules de signalisation permettent d'activer des cascades intracellulaires ayant un impact sur la transcription de gènes cibles. C'est donc une coopération de facteurs de

transcription et de molécules signalisatrices qui mène à l'activation appropriée de la transcription du bon gène au bon moment [19].

Les cellules neuroépithéliales des vésicules optiques précoces coexpriment Rx, Pax6, Lhx2, Six3, Six6, Otx2, Hes1. Ce profil d'expression comprend des membres de deux familles de facteurs de transcription nécessaire au développement de l'œil: les bHLH et les homéoprotéines. Cette signature transcriptionnelle caractéristique démontre également la multipotence des cellules neuroépithéliales quant à leur capacité à se différencier en cellules du pédicule optique, de la rétine neurale et de l'épithélium pigmentaire rétinien [60, 64]. Par la suite, les différentes cellules neuroépithéliales se distingueront par une expression différentielle des différents facteurs de transcription qui permet aux cellules de s'engager vers différentes voies de différenciation rétinienne. Chaque identité cellulaire correspond à un profil d'expression génique unique. Par exemple, les cellules alignées vers la voie des cellules du pédicule optique expriment les facteurs de transcription à homéodomaine Pax2 et Vax. Pour les cellules de la future neurorétine, Pax6, Lhx2, Rx et Chx10 sont les facteurs exprimés caractéristiques. Les précurseurs des cellules qui formeront l'épithélium pigmentaire rétinien expriment Pax6, Otx2 et Mitf.

Donc, une multitude de facteurs de transcription régulent la multitude de mécanismes prolifératifs et de différenciation menant les progéniteurs rétiniens à se différencier dans les bonnes proportions en neurones fonctionnels intégrés de façon à respecter l'organisation muti-laminaire d'une rétine mature saine. Malgré la présence de certains forkhead, de récepteurs nucléaires ou encore de facteur de transcription basique à fermeture leucine « leucine zipper », deux familles principales de facteurs de transcription se partagent la quasi-totalité des processus de genèse rétinienne : les bHLH et facteurs à homéodomaine [17, 65, 66]. À noter que ces différentes familles se transactivent et coopèrent entre eux. Il est donc difficile de les dissocier lors d'explication de mécanismes de genèse.

2.1.1 Implication des gènes bHLH dans le développement de la rétine

Plusieurs facteurs intrinsèques importants dans la différenciation des cellules du système nerveux sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des bHLH. Les membres de cette famille de gènes sont les homologues de *achaete-scute* et *atonal* chez la drosophile [48].

À des stades précoces, on retrouve l'expression de deux membres de la famille des BHLH. *Hes1* et *Hes5*, deux effecteurs principaux de la voie Notch. Ce sont des régulateurs importants de la prolifération des progéniteurs rétiniens [17, 67]. La voie Notch, lorsqu'activée, maintient les cellules dans un état non différencié sans pour autant affecter l'identité temporelle des progéniteurs rétiniens. Ce processus permet de conserver un bassin de progéniteurs adéquat [68, 69]. L'expression de *Hes1* et *Hes5* qui permet donc aux progéniteurs de demeurer dans un état non différencié, diminue graduellement au cours de la différenciation neuronale. La prolifération cellulaire au niveau de la rétine et d'autres structures du système nerveux central est sévèrement affectée par l'inactivation de *Hes1* et *Hes5* [70, 71]. L'embryon murin double mutant présente une absence de vésicule optique démontrant l'existence d'une coopération lors du développement de la rétine [72].

Par la suite, ce sont les facteurs BHLH proneuraux qui permettent aux progéniteurs de se différencier (voir figure 7, droite). Tout d'abord *Math5*, dont l'expression débute au jour E11 dans la rétine primitive et dont la fonction est déterminante au niveau des cellules ganglionnaires de la rétine [73]. En effet, les souris *Math5* *lacZ/+*, présentent une localisation de la β -galactosidase exclusivement au niveau des cellules ganglionnaires rétiniennes [74]. De plus, les embryons *Math5*^{-/-} présentent une perte de 80% de leurs cellules ganglionnaires [75]. Il est important de considérer que d'autres facteurs sont essentiels à la génération des cellules ganglionnaires chez les mammifères [17].

Pour ce qui est des cellules bipolaires, Math3 et Mash1 sont les bHLH responsables de la régulation de leur genèse. La rétine des doubles mutants démontre en effet une absence complète de ces interneurons. Il semble que les cellules soient dirigées vers la gliogenèse [76]. Des expériences réalisées à l'aide d'explants de rétine *Mash1*^{-/-} ont révélé l'existence d'un délai de différenciation des neurones majoritairement formés après la naissance (cellules bipolaires, bâtonnets et horizontales). De plus, le nombre de cellules bipolaires de ces rétines est considérablement réduit puisqu'il semble que les cellules soient détournées vers le destin de bâtonnets [77].

Les cellules horizontales sont produites grâce à la coopération de trois types de facteurs de transcription: un bHLH (*ptf1a*), un forkhead (*Foxn4*) et un facteur de transcription à homéodomaine (*Prox1*). Si un de ces gènes se retrouve muté, la formation des cellules horizontales est compromise [66, 78, 79].

La génération de cellules amacrines requiert la participation de plusieurs classes de facteurs de transcription. *NeuroD* et *Math3* sont les bHLH qui sont exprimés au niveau des progéniteurs rétiniens permettant à ceux-ci de se spécifier en cellules amacrines. Les doubles mutants démontrent une absence complète de cellules amacrines. Le destin cellulaire des cellules double mutant semble être détourné vers d'autres directions. À noter que la surexpression des deux facteurs de transcription n'est pas suffisante à la genèse de cellules amacrines [80]. D'autres facteurs bHLH exprimés plus tardivement, *bHLHb5* et *barhl2* sont nécessaires à la maturation complète des cellules amacrines afin de leur conférer le profil GABAnergique ou glycinergique, deux sous-types majeurs de cellules amacrines.

Les bHLH exprimés au cours de l'embryogenèse sont impliqués dans la spécification du destin cellulaire tandis que ceux exprimés durant les stades plus tardifs participent à la maturation neuronale [17]. Les bHLH proneuraux ont tendance à s'activer transcrittonnellement les uns les autres, suggérant l'existence d'un réseau transcriptionnel complexe [81]. Les bHLH coopère largement avec une autre classe de facteurs de

transcription caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN de type homéodomaine comme le démontre la genèse de cellules bipolaires, amacrines et horizontales. L'action des deux familles de facteurs de transcription est essentielle à une différenciation conforme des progéniteurs rétiniens.

2.1.2 Fonction des facteurs de transcription à homéodomaine

Les gènes à homéoboîte codent pour des protéines avec homéodomains possédant un motif structurel analogue à l'hélice-tour-hélice contenue dans les régulateurs transcriptionnels des procaryotes [82, 83]. Cet homéodomaine interagit directement avec l'ADN suite à la reconnaissance d'une séquence cible spécifique [84]. La spécificité de reconnaissance de l'homéodomaine dépend aussi d'autres séquences situées à l'extérieur de celui-ci [85]. Ces facteurs sont cruciaux au développement de la rétine (voir figure 7, droite).

L'expression de Rx est indépendante et en amont des autres facteurs de transcription impliqués dans le développement de la rétine [86]. En effet, l'expression de la forme murine débute au jour E7,5 dans la portion antérieure de la plaque neurale [59]. En fait, l'expression de Rx jumelé à celle de Otx2 et de Pax6 permet les mouvements morphogéniques rassemblant les cellules de la plaque neurale de façon à organiser le développement des différentes structures du cerveau antérieur (voir figure 6) [87, 88]. Rx possède un équivalent chez la drosophile, mais celui-ci ne semble pas participer à la morphogénèse de l'œil [89]. Sa surexpression chez les vertébrés entraîne un élargissement de la rétine ainsi qu'une surprolifération des cellules rétiniennes mais pas l'apparition d'œil ectopique complet tandis que son invalidation empêche la formation de la vésicule optique et même du sulci optique [59, 90]. En effet, Rx joue un rôle crucial dans l'évagination du tube neural en empêchant l'épithélialisation de ses cellules. Ce phénomène permet la création de régions malléables du tube neural. Celles-ci peuvent être déplacées afin de créer l'évagination et ainsi, les vésicules optiques [91]. Rx est aussi exprimé au niveau des

progéniteurs rétiniens. En effet, il a été démontré qu'une surexpression de Rx chez les progéniteurs rétiniens favorise la formation des cellules gliales de Müller. De plus, Rx activerait les promoteurs responsables de la transcription d'un récepteur et d'un gène cible de la voie Notch: Notch1 et Hes1 [92]. En bref, ces protéines favorisent la présence d'un bassin de cellules souches en préservant leur état non différencié [93]. Des évidences récentes relatent aussi l'implication du facteur de transcription à homéodomaine Sox2 dans la régulation de la transcription de Notch et donc, dans le maintien de l'état non différencié des progéniteurs [94].

L'homéoprotéine chx10, qui est exprimée au niveau des progéniteurs rétiniens en division, est requise pour la genèse des cellules bipolaires. Une invalidation de Chx10 mène, comme dans le cas des bHLH, à une absence de cellules bipolaires [95]. Une surexpression de Chx10 et des bHLH Mash1 et Math3 augmente considérablement la population de cellules bipolaires matures. Une expression simultanée de ces trois facteurs de transcription chez des progéniteurs rétiniens permet la production efficace de cellules bipolaires. C'est donc une coopération de facteurs de transcription à homéodomaine et bHLH qui permet la genèse des cellules bipolaires. En fait, chx10 prodigue aux cellules les caractéristiques de la couche nucléaire interne (INL) tandis que les bHLH forcent les cellules à adopter un caractère neuronal plutôt que glial (voir figure 7, droite) [76].

Ce phénomène coopératif se reproduit aussi au niveau de la formation des cellules amacrine. Comme mentionné précédemment, les bHLH sont essentiels, mais pas suffisants à la formation de cellules amacrine. Par contre, lorsque Pax6 ou Six3, deux facteurs de transcription à homéodomaine, sont surexprimés avec NeuroD et Math3, une augmentation significative du nombre de cellules amacrine est observée [80]. L'inactivation conditionnelle de Pax6 dans la rétine restreint le destin spécifique des progéniteurs rétiniens à celui de cellule amacrine. De plus, on observe *in vivo* une perte d'expression de plusieurs facteurs de transcription bHLH tels que Neurogenin2, Math3 et Mash5 [96].

Les gènes *Otx* sont requis pour la maturation de la neurorétine et la spécification des photorécepteurs [97]. Par exemple, *Otx2* transactive *Crx*, ces deux protéines possédant un homéodomaine jouant un rôle essentiel dans la détermination de l'identité cellulaire des photorécepteurs [98-100]. La participation des bHLH dans la production des photorécepteurs n'est pas exclue, mais encore mal définie. *NeuroD* serait un candidat pour une coopération avec les deux facteurs à homéodomaine dans ce contexte de genèse [80, 81].

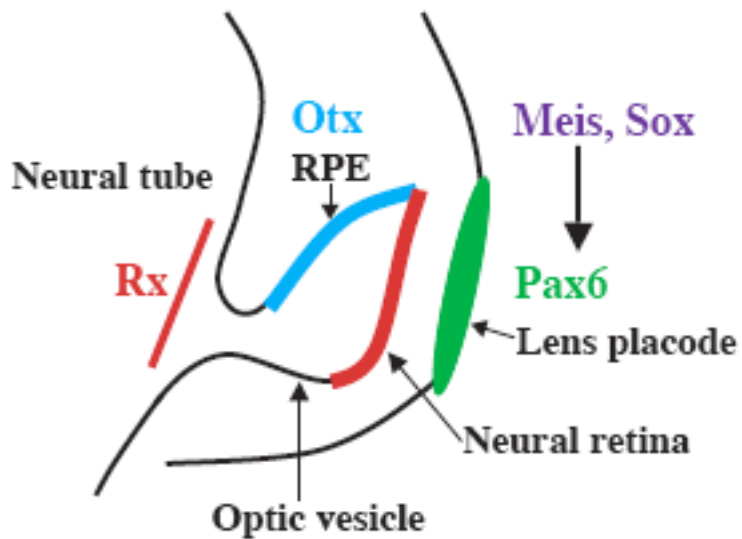


Figure 6. Facteurs de transcription à homéodomaine principaux exprimés au stade de la vésicule optique [52].

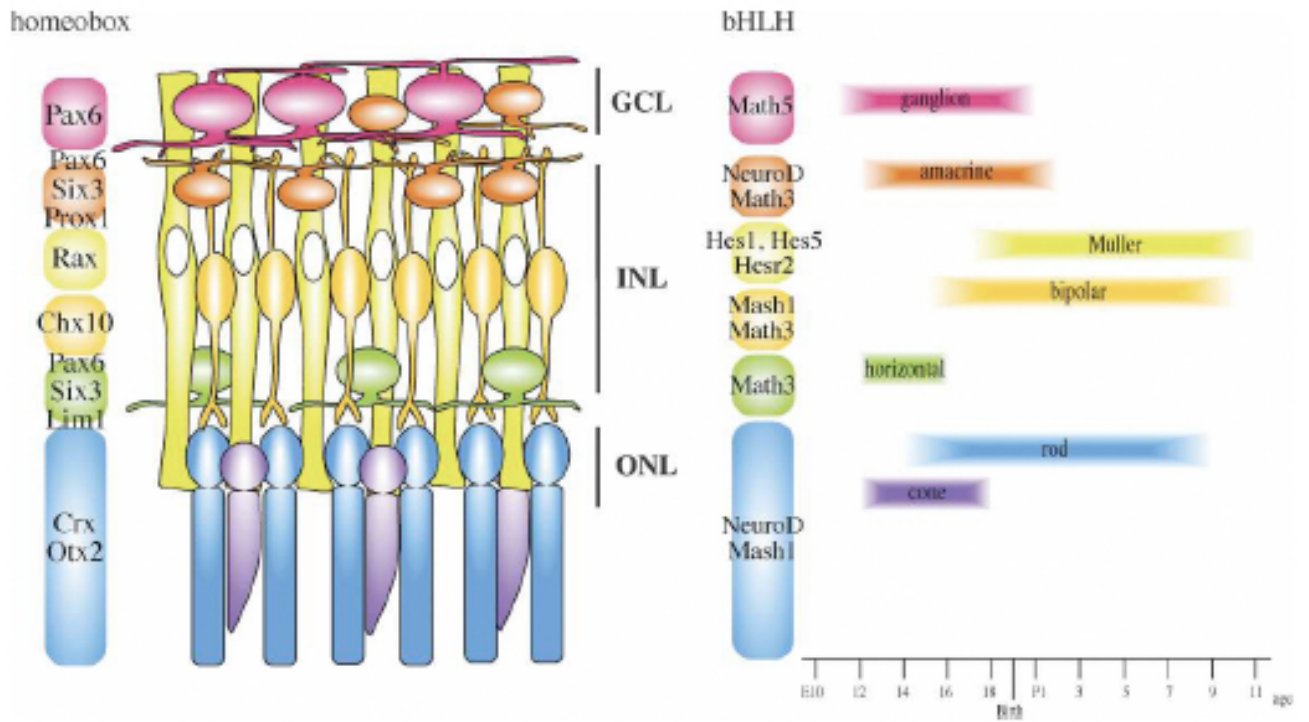


Figure 7. Implication des facteurs de transcription dans la rétino-génèse [47]. (Gauche) Premièrement, les facteurs homéobox dispersés dans les 3 couches de la rétine. (Droite) Expression des facteurs bHLH et apparition chronologique des différents types cellulaires de la rétine du jour E10 au jour P11.

Chapitre 3: Les Lhx

La famille des Lhx « LIM homeobox genes » joue un rôle fondamental dans l'organogénèse de plusieurs structures embryonnaires [101, 102]. Ces gènes sont exprimés à large échelle dans le système nerveux central de l'embryon et sont nécessaires à la spécification des neurones chez les mammifères [103, 104]. Plusieurs facteurs Lhx peuvent être exprimés simultanément au niveau de la même structure embryonnaire. C'est ce qui se produit au niveau du cerveau antérieur et de l'hypophyse [104-106]. La structure primaire des Lhx fut remarquablement conservée au cours de l'évolution. Une certaine similarité avec les facteurs de transcription GATA a permis de révéler la vraie nature des Lhx [107].

La liaison des protéines « Lim homéobox » à l'ADN est assurée par l'homéodomaine « homeobox » qui est un motif hautement conservé. Les Lhx contiennent deux domaines LIM en doigt de zinc en tandem, responsables des interactions protéine/protéine [108]. Les domaines LIM sont largement répandus au niveau des protéines exprimées lors de l'embryogenèse. Ces domaines riches en cystéine lient les molécules de zinc et par le fait même, sont en mesure de moduler l'activité de l'homéodomaine [109, 110]. Les interactions protéine/protéine des Lhx peuvent donc avoir des effets importants sur leur fonction de facteur de transcription. Il est en effet établi que les domaines LIM ont un effet sur la liaison de leur homéodomaine.

3.1: Lhx2

Lhx2 fut d'abord cloné suite à la soustraction d'une banque de cellules pre-B à une banque de cellules de lymphocyte B [111]. L'embryon *Lhx2*^{-/-} est anophtalmique (voir figure 8). En effet, le développement de l'œil est bloqué au stade de la vésicule optique c'est-à-dire au jour E9,5. Lhx2 est essentiel à la transition morphologique de la vésicule

optique vers la cupule optique. Lhx2 est également impliqué dans la maturation des neurones olfactifs [112]. L'expression normale de Lhx2 débute au jour E8,5 et demeure importante dans l'œil embryonnaire. Il possède sa plus forte expression au jour E9,5 au stade la vésicule optique. Dans l'œil, après la naissance, l'expression de Lhx2 est confinée au niveau de la couche nucléaire interne de la rétine et dans le corps ciliaire.

L'activité de Lhx2 est essentielle au niveau de l'érythropoïèse définitive et au développement normal de l'œil, du cerveau antérieur. Les embryons *Lhx2*^{-/-} décèdent *in utero* au jour E15 suite à une anémie sévère causée par les déficiences de l'érythropoïèse définitive [106]. L'érythropoïèse chez l'embryon murin se produit en deux étapes. Au jour embryonnaire 7, l'érythropoïèse primitive se produit au niveau du sac vitellin. Au jour embryonnaire 12, l'érythropoïèse se produit principalement au niveau des cellules souches hématopoïétiques du foie foetal. L'érythropoïèse définitive désigne cette étape de maturation des érythrocytes dans le foie foetal [113]. La maturation des érythrocytes chez l'embryon *Lhx2*^{-/-} est normale jusqu'au jour embryonnaire 12. Le défaut est extrinsèque à la cellule et concerne plutôt un problème de l'environnement moléculaire du foie foetal des embryons [106]. Lhx2 interviendrait au niveau de la transcription d'un gène ayant une action extra cellulaire sur l'environnement foetal hépatique. L'embryon mutant à E13,5 possède un foie foetal de volume considérablement réduit comparativement à l'embryon sauvage et hétérozygote (voir figure 8). L'action importante de Lhx2 au niveau du système hématopoïétique fut aussi confirmée par des expériences de surexpressions géniques. En effet, une surexpression de Lhx2 chez des progéniteurs et cellules souches hématopoïétiques a provoqué l'immortalisation des cellules en question, même si à la base, ces cellules n'expriment pas Lhx2 [114].

L'embryon *Lhx2*^{-/-} est aussi caractérisé par une absence de protubérance au niveau du cerveau antérieur (voir figure 8). Plus précisément, ce manque de volume est en partie causé par un défaut de la voie thalamo-corticale. À noter, l'haploinsuffisance de Lhx2 ne crée aucun phénotype.

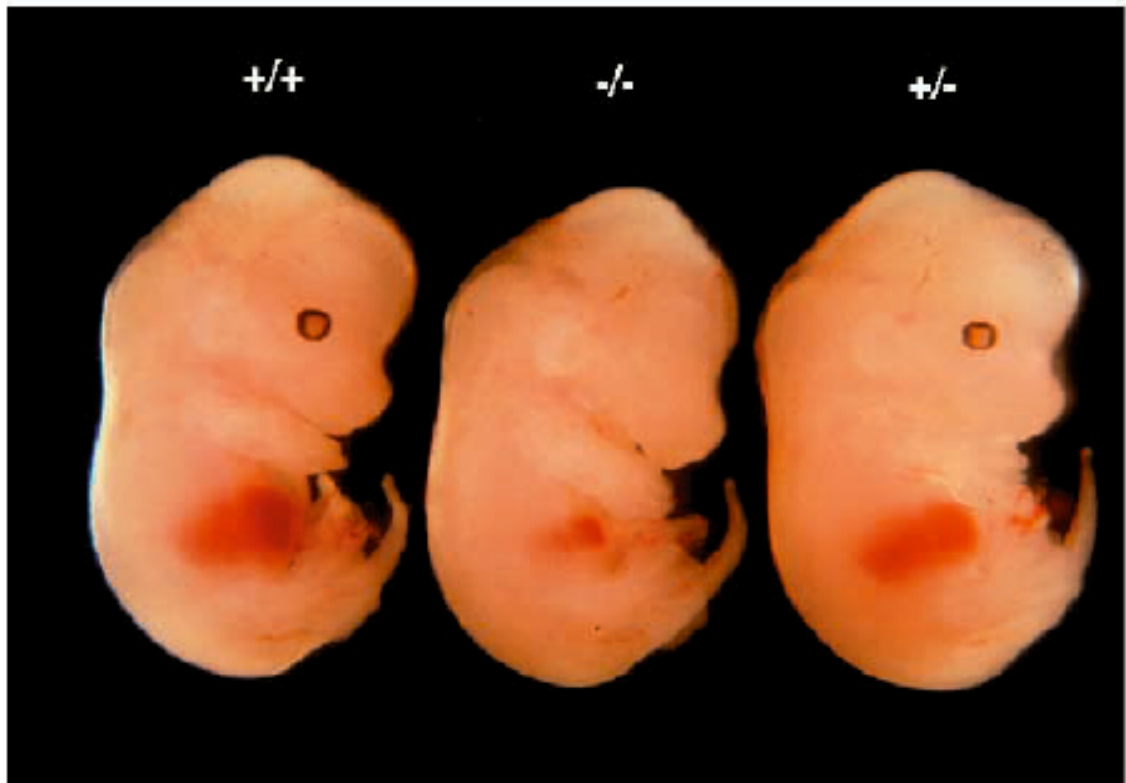


Figure 8. Embryons E13,5 de type sauvage, hétérozygote et mutant pour Lhx2 [106]. La partie rougâtre correspond au foie fœtal et le cerveau antérieur se situe au niveau du front des embryons.

Apterous (*ap*), l'orthologue de Lhx2 chez la drosophile, fut le premier gène LIM-homéodomaine à être identifié chez la drosophile. Il possède un rôle essentiel au développement des ailes de cette mouche et participe à l'établissement des caractéristiques dorsales [115-117]. Mais, malgré qu'*ap* soit exprimé dans l'œil, il ne semble pas essentiel au développement de cette structure puisque les embryons de mouches mutants ne présentent pas de phénotypes oculaires [118]. Les embryons mutants présentent une absence de certains muscles spécifiques ainsi que des défauts neuronaux menant à une contraction musculaire incontrôlée. De plus, les mouches *ap*^{-/-} meurent quelques jours après

leur éclosion du puparium [119]. La forme humaine de Lhx2 est en mesure de restaurer le phénotype causé par l'absence d'*ap* [120].

Les cibles transcriptionnelles de Lhx2 ne sont pas connues en grand nombre. Au niveau des cellules de l'hypophyse, Lhx2, en complexe avec son cofacteur ldb1 et la protéine Ssbp3, est en mesure d'activer la transcription de *Cga*, un gène qui encode pour la sous-unité alpha des hormones de type glycoprotéine. Au niveau de sa fonction dans le développement du système olfactif, il est connu que Lhx2 lie le promoteur du récepteur olfactif M71. Par contre, les cibles transcriptionnelles de Lhx2 au niveau du développement de l'œil et du microenvironnement hépatique foetal semblent être encore un mystère. L'importance de Lhx2 dans le développement de plusieurs systèmes et structures biologiques laisse entrevoir la découverte d'un grand nombre de cibles potentielles.

3.1.1: Le cofacteur Ldb1

Les protéines « LIM-domain binding protein » (Ldb) sont présentes du *Caenorhabditis Elegans* aux mammifères supérieurs comme l'homme. La drosophile et le Xénotopus en possèdent une copie tandis que les mammifères en disposent de deux. De plus, conformément avec la théorie de duplication du génome, le poisson-zèbre contient quatre gènes ldb [121]. Toutes les protéines Ldb possèdent un domaine de localisation nucléaire et se retrouvent majoritairement dans cette structure cellulaire [122]. Les comparaisons séquentielles inter-espèce ont permis de révéler l'existence de deux sites conservés, soit un domaine d'homodimérisation en N-terminal ainsi qu'un site LID en c-terminal interagissant avec les domaines LIM. Les Ldb sont divisés en deux groupes basés sur leur homologie séquentielle: Ldb1 et Ldb2.

La protéine Ldb1 fut, à la base, isolée grâce à sa capacité de lier directement les facteurs de transcription à LIM-homéodomaine et les protéines LMOs « LIM-only proteins » [123, 124]. Aussi connu sous le nom de CLIM2 et NLI, Ldb1 est en fait un

adapteur nucléaire ubiquitaire [121]. Elle ne possède aucune activité enzymatique et n'est pas en mesure de lier l'ADN.

Par rapport à son activité de cofacteur, Ldb1 médierait la régulation transcriptionnelle via des complexes protéiques contenant différents types de facteurs de transcription tels les Lhx, GATA, BHLH, Otx [124-126]. Ldb1 possède plusieurs partenaires de liaisons possibles. Il a été démontré, au niveau de la drosophile, que Chip, l'orthologue de Ldb1, interagit avec apterous, l'orthologue de Lhx2 chez la drosophile, afin de réguler la spécification neuronale [127]. Cette relation semble conservée chez les mammifères supérieurs puisqu'il a été démontré, à l'aide du système double hybride chez la levure, que les formes porcines de Ldb1 et Lhx2 interagissent ensemble. À noter que la séquence d'acides aminés de Ldb1 est hautement conservée entre le porc, l'humain et la souris [128]. De plus, l'action de Ldb1 sur Lhx2 s'est révélée être de nature répressive. En effet, ces observations ont été effectuées par rapport à la transcription du gène α GSU au niveau de culture de cellules anté-hypophysaires de souris et d'ovaire de hamster chinois [128]. D'autres situations où Ldb1 agit à titre de corépresseur ont été identifiées. Tel est le cas de l'activation du promoteur du gène de l'insuline I du rat, pris en charge par un complexe de facteurs de transcription, qui devient réprimée par le recrutement de Ldb1 [129].

Son rôle de cofacteur peut aussi être associé à celui d'un coactivateur. En effet, l'interaction de Ldb1 avec Otx2 permet l'activation de la transcription du gène homéobox *gsc* [130].

L'inactivation de Ldb1 chez des embryons de types murins a permis de révéler le rôle crucial de la protéine au niveau de l'établissement de l'axe antéro-postérieur primaire. Tous les embryons mutants présentent une perturbation du développement antérieur incluant une absence d'intestin antérieur, de cœur ainsi qu'une atrophie des structures du

cerveau antérieur. De plus, l'embryon mutant subit une duplication de son axe postérieur [131]. Il semble que la fonction de Ldb1 soit affectée par l'effet de dosage.

Chapitre 4: Les protéines Pax

Les gènes Pax sont impliqués dans une multitude de processus biologique au niveau du développement embryonnaire. Ils sont entre autres considérés, en dehors de leurs contextes normaux *in vivo*, comme des proto-oncogènes. De plus, des translocations impliquant les gènes Pax humains peuvent contribuer à la tumorigénèse [132]. Les mécanismes de régulation transcriptionnelle impliquant les gènes Pax ont été conservés au cours de l'évolution animale [133]. Pax6 est le parfait exemple de conservation entre les espèces. Il est exprimé du vers planaire aux vertébrés en passant entre autres par l'oursin et la drosophile [134-138]. Pax6 est exprimé dans l'œil, en plus du pancréas, de l'intestin, du système nerveux central embryonnaire, des placodes nasales et d'autres organes chimiosensibles [139, 140].

4.1 Pax6

Le gène *pax6* code pour une protéine hautement conservée à travers les espèces, et ce, tant au niveau séquentiel qu'au niveau du patron d'expression [141]. Pax6 fut d'abord isolé à partir d'une banque d'ADN génomique de la souris à l'aide de sonde établie selon les séquences d'autres gènes Pax préalablement découverts [142]. Les mutations homéotiques de la drosophile ont permis d'identifier *eyeless*, l'orthologue de Pax6 comme le chef d'orchestre du développement de l'œil [134, 143]. En effet, il a été démontré que sa surexpression cause la formation d'œil ectopique fonctionnel chez la drosophile et le Xénotopus [56, 144]. Sa surexpression, en coopération avec celle de bHLH, parvient à amplifier le potentiel prolifératif et de multipotence des cellules gliales de Müller chez le rat. Son expression normale entraîne une cascade transcriptionnelle impliquant des milliers de gènes participant à la morphogénèse de l'œil [139].

En ce qui concerne l'œil et son développement, l'expression de Pax6 est détectée au niveau de la portion antérieure de la plaque neurale qui donnera naissance à la vésicule optique et au niveau de l'ectoderme délimitant le champ du futur cristallin [29, 145]. De plus, Pax6 est également exprimé au niveau des progéniteurs rétiniens qui donneront naissance aux cellules ganglionnaires, amacrines et horizontales. Comme démontré par l'expérience d'ablation conditionnelle et discuté précédemment, Pax6 permet de maintenir l'état de multipotence des progéniteurs rétiniens en prolifération [96]. En absence de Pax6, ces cellules maintiennent leurs caractéristiques associées à la rétine. Elles continuent en effet d'exprimer des facteurs de transcription rétiniens importants tels Rx, Six3, Six6 et Lhx2. Par contre, leur destin différenciatif est confiné à celui d'une cellule amacrine [146].

Les embryons homozygotes mutants pour Pax6 meurent quelques minutes après la naissance due à une incapacité respiratoire causée par des défauts neuronaux majeurs [147]. Le développement du système visuel des embryons *Pax6*^{-/-} se poursuit jusqu'au stade de la vésicule optique. L'évagination des vésicules à partir du tube neural se produit normalement, mais la maturation des vésicules optiques aux cupules optiques ne s'effectue point [29]. Les cellules des vésicules optiques du mutant Pax6 prolifère moins et s'engage vers le destin identitaire d'une cellule amacrine. De plus, l'utilisation d'un morpholino dirigé contre Pax6 chez des embryons de poule a révélé une augmentation de la mort cellulaire au niveau de la vésicule optique de l'embryon [148]. Plusieurs expérimentations ont démontré que la formation du cristallin est indépendante de la présence de Pax6 au niveau des vésicules optiques. Par contre, l'expression de Pax6 est essentielle au niveau de l'ectoderme de surface [149, 150]. En effet, la présence cellule-autonome de Pax6 permet la spécialisation de l'ectoderme cristallien et la formation de la placode cristallienne [151, 152].

Pax6 est un facteur de transcription à homéodomaine. Il possède aussi un domaine de type « paired » capable de lier l'ADN [153, 154]. Différentes portions de Pax6 peuvent démontrer tant une fonction d'activateur que de répresseur transcriptionnel [155, 156]. Les

homologues de Pax6 chez la drosophile, *eyeless* et *twins of eyeless*, possèdent des domaines de liaison à l'ADN conservés à 90% pour l'homéodomaine et à 95% pour le domaine « paired » [139]. De plus, le domaine « paired » fut hautement conservé à travers des millions d'années d'évolution [157]. Comme l'homéodomaine, le domaine paired interagit avec l'ADN par reconnaissance de séquences cibles spécifiques. C'est un motif de 128 acides aminés qui ne partage pas d'homologie de séquence avec d'autres domaines protéiques [137]. Des mutations faux-sens du domaine paired des gènes Pax sont associées à divers désordres tant chez la souris que chez l'humain [158-160]. Il a été suggéré que les protéines contenant un domaine « paired » en plus d'un homéodomaine possédaient une spécificité de reconnaissance différente de celle conférée par chacun des deux domaines [161]. En plus de ses deux domaines de liaisons à l'ADN, Pax6 possède un domaine d'activation transcriptionnelle conféré par sa portion C-terminale riche en proline, sérine et thréonine [137, 162, 163].

La séquence d'acides aminés composant Pax6 est identique chez la souris et l'humain. Ces éminents degrés d'homologies entre l'insecte et les mammifères ont permis d'apporter d'importantes précisions quant à l'histoire évolutive de l'œil, émanant la possibilité de considérer une origine monophylétique. Son expression dans l'ébauche de la vésicule optique débute au jour embryonnaire 8. Tel que mentionné plus tôt l'organisation rétinienne débute au niveau de la vésicule optique. L'expression de Pax6 au niveau de la vésicule optique permet l'établissement et la maintenance des caractéristiques dorsales et nasotemporales [25].

Plusieurs mutations spontanées de Pax6 se sont révélées comme étant la cause d'aniridie chez l'humain [164-166]. Ces mutations hétérozygotes peuvent aussi être la cause de cataractes et de l'anomalie de Peters [167, 168]. Les souris et rats hétérozygotes pour Pax6 présentent, quant à eux, un phénotype de « petits yeux » [169, 170]. Les cas d'anophtalmie reliés à une expression déficiente de Pax6 peuvent être provoqués par une

surexpression ou une diminution de son expression, ce qui laisse supposer un effet de dosage considérable [171].

Pax6 étant le chef d'orchestre de l'embryogenèse de l'œil, il est responsable de l'activation et la répression d'une multitude de gènes. Son action essentielle au niveau de cette organogénèse permet d'entrevoir la découverte d'autres cibles transcriptionnelles impliquées dans le développement de l'œil.

Chapitre 5: Les gènes de la famille six

Tout comme Pax6, la structure et fonction des gènes six (sine oculis homeobox) sont hautement conservées au cours de l'évolution de l'œil [139, 172]. Les gènes de la famille six codent pour des facteurs de transcription possédant en commun deux domaines protéiques conservés participant à la reconnaissance de séquence spécifique d'ADN. Tels Lhx2 et Pax6, les membres de la famille Six possèdent un homéodomaine capable de lier l'ADN. De plus, ils possèdent un domaine Six responsable d'interaction protéine/protéine avec différents cofacteurs [173]. Ces deux domaines sont essentiels à la reconnaissance spécifique de séquence cible par les facteurs de transcription de la famille six [174, 175]. Le domaine Six interagit entre autres avec les protéines Eya, des coactivateur, ainsi qu'avec Groucho, un corepresseur.

Aujourd'hui, six gènes font partie de la famille Six chez les vertébrés contrairement au poisson zèbre qui en possède huit [176, 177]. Ils sont organisés en clusters et divisés, chez la drosophile comme chez les mammifères supérieurs, en trois sous-familles établies selon leur homologie de séquence (drosophile : Sine Oculis, Optix et D-six4; mammifère: Six1/2, Six3/6 et Six4/5).

Le premier membre de la famille six fut d'abord cloné chez la drosophile et fut nommé sine oculis (So) en raison de son importante participation au développement de l'œil [133]. So est en effet requis pour le développement des structures oculaires de la drosophile tels, l'ocelle, l'œil à facettes, le lobe optique et l'organe de Bolwig qui correspond aux photorécepteurs. L'absence de So dans les disques imaginaux oculaires déclenche une progression anormale du développement de l'œil de la mouche [178, 179]. Par la suite, grâce à leur homologie séquentielle à So, Six1, Six2 et Six3 ont été identifiés et ainsi une nouvelle famille de facteurs de transcription chez les vertébrés a vu le jour [180, 181]. Six4 et Six5 furent ensuite découverts chez la souris [174, 175].

De ces cinq gènes Six chez la souris, seul Six3 est exprimé au niveau du primordium oculaire. Paradoxalement, Six3 est le gène partageant l'homologie d'acides aminés la moins forte avec So, et ce, malgré le fait qu'ils partagent d'importantes fonctions au niveau du développement de l'oeil. Cette problématique a permis d'étudier plus profondément l'origine phylogénétique de Six3. Ces études ont démontré que malgré l'homologie fonctionnelle de Six3 envers So, Six3 serait en fait l'orthologue d'optix chez la drosophile. Cette affirmation s'appuie sur l'homologie retrouvée au niveau de leur séquence en acides aminés [182]. En effet, l'homéodomaine d'optix et Six3 sont similaires à 95% [183]. La découverte subséquente de deux gènes homologues à la forme murine de Six3 exprimée dans le primordium optique du Xénopus, a permis l'identification de Six6/Optx2 chez la souris [184].

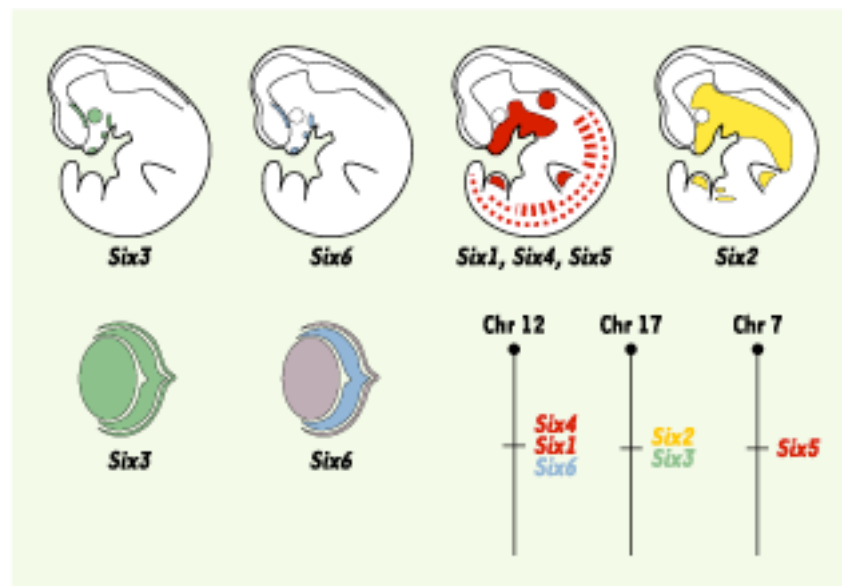


Figure 9. Profil d'expression et organisation en paquet des gènes Six chez l'embryon de souris à E10,5. L'utilisation de couleur correspond au profil d'expression du gène associé: vert = Six3, bleu = Six6, rouge = Six1,4 et 5.

5.1: La sous-famille Six3/Six6

La sous-famille Six3/Six6 est orthologue à Optix chez la drosophile [173]. Il est situé à proximité du gène So sur le chromosome 2 [182]. Tel So, Optix possède un homéodomaine ainsi qu'un domaine Six [24]. De plus, ils possèdent un profil d'expression qui se superpose au niveau du disque marginal de l'œil. Par contre, ils semblent avoir des fonctions différentes au niveau du développement de l'œil.

Il a été démontré chez le medaka qu'une surexpression de Six3 engendre la formation de lentilles et de tissus rétiniens ectopiques [58, 180, 185]. Chez l'embryon murin, l'expression ectopique de Six3 engendre, dans la région du mésencéphale et du rhombencéphale, la formation de structure similaire aux vésicules optiques [186].

L'expression de Six3 s'effectue à E7,5 ce qui est légèrement plus tôt que celle de Six6. Ils sont principalement exprimés au stade embryonnaire de la neurula au niveau de la portion antérieure de la plaque neurale. À E10,5, cette expression se produit au niveau de la placode optique et du cerveau antérieur (voir figure 9). Par la suite, leur expression se maintient dans les dérivés développementaux: œil, hypothalamus, hypophyse et placodes olfactives [180, 187-190]. L'expression de Six6 dans l'œil se situe principalement dans la rétine en différenciation. Tandis que celle de Six3 s'étend aussi à l'épithélium pigmentaire et au cristallin. L'activité de Six3 et Six6 peut être modulée par des cofacteurs de la famille goucho [191].

Six6 est exprimé dès E8, au stade de la gastrulation, de l'embryon murin au niveau de la portion diencéphalique du futur cerveau antérieur. Cette région est responsable de l'établissement de l'hypothalamus et de la neurohypophyse. et démarque le site présomptif du pédicule optique. À E8,25 jours, une expression plus intense de Six est observée au niveau de la ligne médiane se poursuivant de façon bilatérale au niveau de la portion ventrale du diencéphale (voir figure 10A). Ces extensions bilatérales sont les premières

traces génétiques menant à la formation du pédicule optique [173]. L'expression de Six6 au jour E8,25 se situe tant au niveau du neuroectoderme que de l'ectoderme de surface [192]. Six6 est ensuite présent, au jour E9/9,5 dans la portion ventrale de la vésicule optique qui donnera naissance à la rétine neurale (voir figure 10C). L'expression de Six6 est restreinte aux futurs sites des pédicules optiques à la portion ventrale des vésicules optiques. Cette portion ventrale donnera naissance à la neurorétine (voir figure 10B et C) [173]. Ce profil se distingue de celui de six3 qui s'étend de façon globale dans l'entièreté de la vésicule optique et du primordium du pédicule optique. Au jour embryonnaire 10,5, l'expression de Six6 peut être détectée au niveau du cerveau antérieur ventral sous-jacent à l'ectoderme buccal et au niveau de la poche de Rathke. Ces deux régions permettent la maturation de la neurohypophyse et de l'adénohypophyse, respectivement [193]. À E13,5 jours, Six6 est présent dans le pédicule, le chiasma optique et dans la totalité de la neurorétine, quoique plus intense au centre de celle-ci, et ce, jusqu'au jour embryonnaire 17,5 [192]. L'expression de Six6 chez la souris n'est pas détectée dans la placode cristallienne contrairement à ce qui est observé chez la poule [24].

L'expression de Six6 est élevée dans la vésicule optique, au jour E9,5 et est à son sommet dans la rétine au jour E13,5 pour ensuite diminuer graduellement. Son expression n'est pas essentielle à la survie contrairement à Six3. Les embryons *Six6*^{-/-} sont dépourvus de glande hypophyse et présentent différents degrés d'hypoplasie rétinienne souvent accompagnée d'une absence de nerf et de chiasma optique. L'expression de Six3 et Pax6 n'est pas altérée par l'absence de Six6 [194]. Ces particularités biologiques sont retrouvées chez des humains possédant une délétion chromosomique du locus de Six6 [195]. Ces hypoplasies sont causées par une prolifération insuffisante des progéniteurs rétiniens. Six6 peut être un répresseur transcriptionnel, aidé de son cofacteur dachshund. En effet, il réprime normalement la transcription de p27kip [196]. p27kip est un inhibiteur de CDK, il empêche donc la progression de la phase G1 à la phase S dans le cycle cellulaire [197]. Ainsi, Six6 octroie aux progéniteurs rétiniens la capacité de proliférer en leur permettant de demeurer dans le cycle cellulaire.

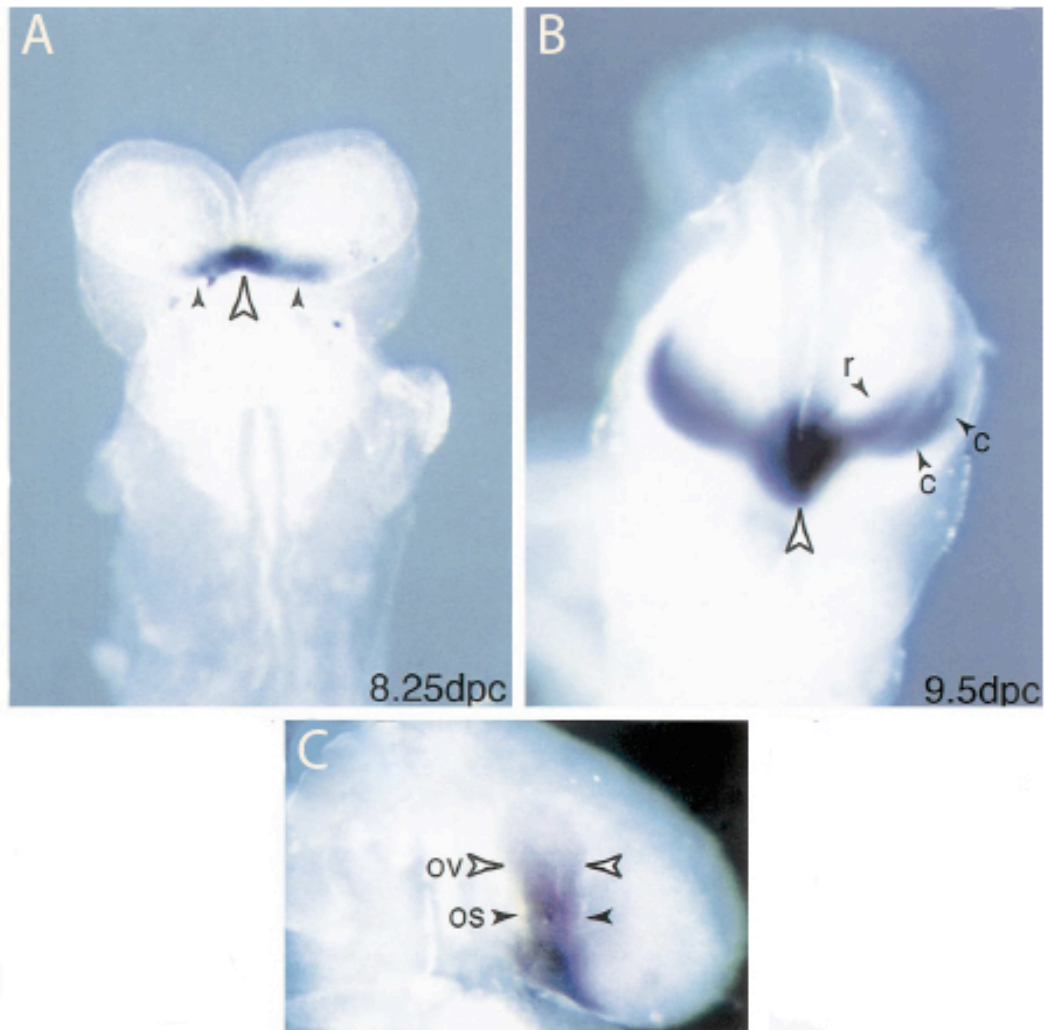


Figure 10. Profil d'expression de Six6 au jour E8,25 (A) et E9,5 (B,C) de la souris [173]. Au jour 8,25, l'expression se situe au niveau de la portion ventrale du diencephale. Au jour 9,25, l'expression se situe au niveau de la portion ventrale des vésicules optiques. OV = vésicule optique; OS = sulcus optique; r = rostral; c = caudal.

5.2 Le réseau Six/eya

À travers les origines et les organismes, l'activité des gènes Six est intimement liée à celle des gènes Pax, Eya (eye absent) et Dach (dachshund), car comme mentionné précédemment, Sine Oculis agit en partenariat. Ces quatre gènes participent au stade précoce de la détermination oculaire. De plus, leur action synergique permet la constitution de yeux ectopiques lorsqu'il y a co-surexpression des 4 gènes dans les disques imaginaux des antennes et des pattes [198-200].

Au niveau du modèle classique du développement de l'œil de la drosophile, *eyeless* (Pax) active la transcription de *sine oculus* (*six*) qui, à l'aide de son coactivateur *eye absent* (Eya) va permettre une boucle de rétroaction positive sur la transcription de *pax6*. Ensemble, ils activent la transcription des gènes cibles essentiels. À noter, la participation de Groucho qui est le corépresseur de So [133]. Ces gènes ont tous été identifiés chez tous les animaux de recherche étudiés, du vers planaire à l'homme. Pax6 agit donc en coopération synergique avec le réseau génétique Six/Eya pour permettre l'activation de la transcription des facteurs bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) requis pour la différenciation normale des progéniteurs rétiniens. Six3, Six6 sont aussi en plus de Pax6, des effecteurs importants du réseau lors de la morphogénèse de l'œil du vertébré [146].

Certaines études tendent à démontrer que cette coopération est non seulement conservée à travers les espèces, mais existerait aussi au niveau d'autres types d'organogénèse. En effet, un réseau de régulation impliquant la même combinaison de régulateurs transcriptionnels est retrouvée au niveau de la myogénèse, le développement des fibres musculaires [201].

Twin of *eyeless* et *eyeless* sont responsables de l'activation de So [202]. Les connaissances quant à la transcription d'*optix* et *Six6* sont très limitées chez la drosophile et les mammifères. Chez la drosophile, il a été démontré que la participation de *Eyeless*

(Pax6) n'est pas essentielle à l'activation transcriptionnelle d'optix (*six3*, *six6*) [182]. Chez la souris, il est connu que Pax6 contrôle l'expression de *Six3* dans l'ectoderme placodal [186]. Par contre, l'ablation conditionnelle de Pax6 dans une rétine n'affecte la transcription de *Six3* [96].

Hypothèse de Recherche

Depuis la publication du premier article sur *Lhx2* en 1997, un seul article fut publié concernant son rôle au niveau du développement de l'œil [106]. Étant donné le fait que l'orthologue de *Lhx2* chez la drosophile, *apterous*, n'est pas essentiel au développement de l'œil, nous ne pouvons donc pas extrapoler les fonctions de *Lhx2* dans la formation de l'œil à partir de ce modèle [120]. Les ressemblances structurelles entre *Lhx2* et *apterous* ne sont pas synonymes d'homologie fonctionnelle *in vivo*. Il est donc logique d'effectuer des études chez les mammifères afin de comprendre la fonction de *Lhx2* dans le développement de l'œil. Les embryons murins *Lhx2*^{-/-} au jour E9,5 possèdent deux vésicules optiques de taille réduite. L'absence de *Lhx2* semble donc induire un problème au niveau de la prolifération des progéniteurs rétiniens.

En ce qui concerne *Pax6*, il est déjà établi dans la littérature que celui-ci contrôle le taux de prolifération des progéniteurs neuroépithéliaux de la vésicule optique. Puisque les progéniteurs *Pax6* mutants ont un cycle cellulaire altéré et démontrent des taux anormalement réduits de p27kip[45], nous nous sommes donc intéressés à l'action de *Pax6* sur la transcription de *Six6*. De plus, une expérience de micropuces d'ADN sur des cultures de progéniteurs rétiniens de type sauvage et *Pax6* mutant ont permis d'identifier *Six6* comme le gène le plus affecté à la baisse par l'absence de *Pax6*.

Peu d'information existe sur le contrôle transcriptionnel de *Six6*. *Six6* a un impact important sur la progression du cycle cellulaire via, entre autres, la répression transcriptionnelle de p27kip. *Lhx2* et *Pax6* possèdent leur plus forte expression au niveau de la vésicule optique au jour E9,5. Ce stade correspond également au sommet de l'expression de *Six6* dans la vésicule optique. Ces données nous permettent de poser l'hypothèse où *Lhx2* et *Pax6* agiraient de concert pour contrôler la transcription de *Six6* au niveau des progéniteurs rétiniens de la vésicule optique.

Résultats

Article: The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation.

Mise en contexte

La régulation de la prolifération des progéniteurs rétiniens est un mécanisme mal caractérisé. Le manque de connaissance associé à ce phénomène est un des problèmes rencontrés dans l'établissement de thérapies régénératrices de la rétine à l'aide de cellules souches. Donc, l'identification de nouveaux réseaux de transactivation génétique et de coopération protéique impliqués dans la prolifération des progéniteurs rétiniens nous aidera à mieux comprendre la façon d'utiliser ces cellules dans un but thérapeutique.

L'étude ici présente identifie Pax6 et Lhx2 comme deux facteurs de transcription étant en mesure de lier la séquence promotrice et de transactiver le gène Six6. Ces résultats sont les premières informations concernant l'activation de la transcription de *Six6* chez les mammifères.

Cet article a été soumis au journal « Development » le 22 août 2008

Contributions des auteurs :

MPC : analyses bioinformatiques, culture cellulaire, essai luciférase, immunoprécipitation de la chromatine, RT-PCR semi-quantitative, clonage, manipulation de la ligné murine Pax6 -/-.

NT : culture cellulaire, hybridation in situ, PCR quantitatif, immunofluorescence, électroporation de l'ADN, manipulation de la ligné murine Lhx2-/-

GB : Micropuce d'ADN, supervision et écriture du manuscrit

The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation

Nicolas Tétreault[‡], Marie-Pier Champagne[‡], 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

[‡] These authors contributed equally to this work

*Corresponding author:

Tel: 514-252-3400 ext. 4648

Fax: 514-252-3569

E-mail: gbernier.hmr@ssss.gouv.qc.ca

SUMMARY

In mammals, a limited set of homeobox-containing transcription factors are expressed in the presumptive eye field and required to initiate eye development. How these factors interact together at the genetic and molecular level to coordinate this developmental process is poorly understood. We found that the *Lhx2* and *Pax6* transcription factors operate in a concerted manner during retinal development to promote transcriptional activation of the *Six6* homeobox-gene in primitive and mature retinal progenitors. *Lhx2* demarcates the presumptive retina field at the neural plate stage and *Lhx2* inactivation delays initiation of *Rx*, *Six3* and *Pax6* expression in this domain. The later expressed *Six6* is properly activated in the pituitary/hypothalamic axis of *Lhx2*^{-/-} embryos, but expression fails to be initiated in the optic vesicle. *Lhx2* and *Pax6* associate with the chromatin at several regions of *Six6* *in vivo* and cooperate for trans-activation of *Six6* regulatory elements *in vitro*. In retinal stem cells, both *Lhx2* and *Pax6* are genetically required for proper *Six6* expression and forced co-expression of *Lhx2* and *Pax6* can synergistically trans-activate the *Six6* locus. Our work reveals how two master regulators of eye development coordinate their action to sequentially promote tissue-specific transcriptional initiation and full activation of a retinal determinant gene.

Word count: 200

INTRODUCTION

The optic vesicle of vertebrates originates from the neural tube and is first detected between embryonic stages (e) 8.25 and e8.5 as a bilateral evagination of the anterior neural plate, named the optic sulcus (Marquardt, 2003; Oliver and Gruss, 1997). Around e9.5, the intimate contact between the optic vesicle and the eye surface ectoderm induces the transformation of the ectoderm into a lens placode, which is revealed by the proliferation and thickening of the ectoderm (Oliver and Gruss, 1997). In turn, the lens placode induces the evagination of the optic vesicle into an optic cup around e10.0. The optic cup ultimately gives rise to the fully mature neural retina. How retinal specification is established at the neural plate stage and how definitive retinal identity is promoted and maintained in retinal progenitors remain important issues in developmental biology. The homeobox-containing transcription factors Pax6, Rx, Six3 and Lhx2 are genetically required for eye formation and over-expression of Pax6, Rx or Six3/Six6 can induce ectopic retinal tissues in frog and fish embryos (Bernier et al., 2000; Carl et al., 2002; Chow et al., 1999; Hill et al., 1991; Loosli et al., 1999; Mathers et al., 1997; Porter et al., 1997; Zuber et al., 1999). Although the genetic function of these factors has been highly studied, the molecular mechanisms by which they coordinate retinal development and establish definitive retinal identity remain poorly understood.

Pax6 is a member of the paired-box and homeobox-containing gene family (PAX) of transcription factors and has been used as a prototype to study eye development in several model organisms (Gehring and Kazuho, 1999; Gehring, 2002). In mice, *Pax6* is expressed starting at e8.0 in the eye surface ectoderm, and in the eye neural ectoderm, which gives rise to the optic vesicle (Walther and Gruss, 1991). Despite being anophthalmic at a later stage of development, *Pax6*-null embryos form an optic vesicle that arrests in development prior to the optic cup stage (Grindley et al., 1995; Hogan et al., 1986). In the optic vesicle

of *Pax6* mutants, neuroepithelial progenitors over-proliferate and display an abnormal cell cycle kinetic, possibly owing to downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (Duparc et al., 2007). Conditional mutagenesis of *Pax6* in the e11.0 distal retina revealed that *Pax6* is required at the time of retinogenesis to maintain progenitor cells proliferation and generate retinal cell types diversity, in part through transcriptional activation of pro-neural genes (Marquardt et al., 2001). Although *Pax6* is being considered to operate at the apex of the genetic cascade governing eye and retinal development, expression of *Lhx2*, *Rx*, *Otx2*, *Six3* and *Six6* in the optic vesicle of *Pax6* mutants is unaffected, revealing that early retinal specification does occur in the absence of *Pax6* (Bernier et al., 2001; Jean et al., 1999).

Lhx2 is a transcription factor that plays an essential role in mammalian's eye development and that is conserved in lower vertebrate species (Porter et al., 1997; Zuber et al., 2003). *Lhx2* encodes a member of the LIM homeobox-containing transcription factors family (*LHX*). *LHX* proteins can activate or repress gene transcription by direct DNA binding and association with co-activators or co-repressors through their LIM domain (Agulnick et al., 1996). In mice, *Lhx2* is required for the development of numerous organs, including the eye, the telencephalon and blood system (Porter et al., 1997). While little is known about how *Lhx2* operates, experiments have shown that red blood cell defects in *Lhx2*-null mice are non-cell autonomous and mediated by abnormalities that lie within the liver (Porter et al., 1997). In contrast, most abnormalities present in the CNS appear to be cell autonomous, as revealed by chimera aggregation studies (Porter et al., 1997). *Lhx2* is also expressed by immature B and T lymphocytes, but not by hematopoietic stem cells (Wu et al., 1996). Notably, some chromosomal translocations involved in human leukemia's appear to include the *LHX2* locus, and *Lhx2* over-expression can immortalize human hematopoietic stem cells (Wu et al., 1996). Recent genetic studies have also revealed that *Lhx2* is required for the self-renewal of epithelial stem cells, but the underlying molecular mechanism remains elusive (Rhee et al., 2006).

Herein we report on the characterization of *Lhx2* function during the earliest steps of retinal development. We found that *Lhx2* represents the first retinal determinant gene with *Rx* within the presumptive retina field, and that *Lhx2* mutation results in delayed induction of *Six3*, *Rx* and *Pax6* expression in this domain. Later on, *Lhx2* is also required for *Six6* expression initiation in the optic vesicle. In retinal tissue, *Lhx2* and *Pax6* proteins are bound to the chromatin at the *Six6* locus, and can cooperate to trans-activate *Six6* regulatory elements *in vitro*. In retinal stem cells, *Lhx2* and *Pax6* are genetically required for *Six6* expression and can cooperate to synergistically trans-activate the *Six6* gene. Our work reveals that *Lhx2* is required to establish primitive retinal identity at the neural plate stage by promoting initiation of retinal-determinant genes expression, and how later *Lhx2* cooperates with *Pax6* to establish definitive retinal identity and promote progenitor/stem cells proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult mice from the albinos CD1 or 129sv strains were purchased from Charles River (St-Constant, Qc., Canada). *Pax6* mutant mice are a gift from Peter Gruss (Max-Planck Institute, Goettingen, Allemagne) and *Lhx2* mutant mice from Heiner Westphal (National Institute of Health, Bethesda, Md, États-Unis). Embryos stage was determined according to the time of vaginal plug.

***In situ* hybridization**

Embryos were dissected in PBS, fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C and embedded in Paraplast (Monoject Scientific). Sections (10 µm) were cut and dried onto super-frost glass slides (Fisher Scientific). ³⁵S-labelled RNA probes using SP6, T3 or T7 RNA polymerase were done with Boehringer enzyme according to the directive of the company. Exposure time for the radioactive RNA *in situ* hybridization was 15 days. For *in situ* hybridizations on whole embryos, preparations were hybridized with digoxigenin-labelled RNA probes and visualized with alkaline phosphatase-coupled anti-digoxigenin antibody (1/2000) (Boehringer) and NBT/BCIP substrate (Boehringer) at pH 9.5. For cryosection, embryos were cryoprotected in 30% sucrose/PBS overnight at 4°C, embedded in cryomatrix solution and snap-frozen in liquid nitrogen. Specimens were cut using a cryostat (Leica) at 10 µm and used for non-radioactive *in situ* hybridization.

RT-PCR and Quantitative Real-Time PCR

All primers were designed to flank individual exons and tested by PCR in RT+ and RT-control extracts. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen). Reverse

transcription (RT) was performed using 1 μ g of total RNA and the MML-V reverse transcriptase (Invitrogen). PCR amplification was performed using the HotStar TAQ polymerase (Invitrogen). PCR was run as follow; 94°C for 10 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94°C, annealing at 57°C and extension at 72°C in an Applied Biosystems thermal cycler. Real-time PCR was performed using the Platinum SYBRGreen SuperMix (Invitrogen) and a Real-Time PCR apparatus (BioRad).

Chromatin Immunoprecipitation

ChIP was performed using the ChIP Assay kit (Upstate) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 0.5×10^6 cells were sonicated to shear the chromatin. Chromatin-associated proteins were precipitated using goat anti-Lhx2 (Santa Cruz), rabbit anti-Pax6 (US Biological) or rabbit anti-IgG (Upstate) antibodies. Samples were heated to reverse the protein–DNA crosslinks and the DNA recovered by phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction. Genomic DNA was used as template for PCR amplification using primers to the *Six6* loci.

Luciferase Assay

Four distinct genomic DNA fragments from the *Six6* locus (-3964 to -2465, -2480 to -1263, -1284 to -75 and +638 to +1703) were cloned into the pGL3 Luciferase Reporter Vector (Promega). *Pax6*, *Lhx2*, *Six3* and *Otx2* cDNAs were cloned into the expression vector pCS2+. Reporter vectors were transfected with either one expression vector or a combination using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 48 hours post-transfection, cells were lysed using Passive Lysis Buffer (Promega). Cells lysates were analyzed using the Dual Glow Luciferase Assay System (Promega).

Cell culture

Optic vesicles of e9.5 embryos were dissected-out with tungsten needles in HBSS, as described (Duparc et al., 2007). Optic vesicles were directly triturated in HBSS using needles (20G-10x; 22G-5x), in order to obtain a suspension of single cells. After centrifugation, cells were placed in neural stem cell (NSC) media: DMEM/F12 (Invitrogen) containing 0.25% glucose, B27 supplement, Heparin (2 μ g/ml; SIGMA), Gentamycin (25 μ g/ml; Invitrogen) and human recombinant FGF2 (10 ng/ml; Preprotech). Cells were cultured in 6 well plates (Sarstedt) for 3 to 10 days at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. When applicable, BrdU (SIGMA) was added to the culture media at 10 μ g/ml. For passage, single retinal spheres were dissociated with an enzyme-free solution (CHEMICON). After trituration, the single cell suspension was harvested at 300g for 5 min and washed twice with HBSS. Cells were plated at 2 000 cells/ml in neural stem cell media. Cell viability was evaluated using a hemacytometer and trypan blue exclusion staining.

Immunofluorescence

For BrdU-labeling experiments, retinal spheres were directly frozen in liquid nitrogen and post-fixed after sectioning using 100% ETOH for 30 min and 4% PFA/PBS for 10 min. Sections or cells were treated with DNase I/0.05% HCl for 30 min in order to reveal BrdU epitopes. Samples were blocked in 1% BSA (Vector laboratories)/0.1% Tween 20/PBS solution and incubated with the primary antibodies overnight at 4°C. After washes with PBS, samples were incubated with appropriate secondary antibodies for 1 hour at RT. Antibodies used: anti-BrdU (SIGMA), anti-P-H3 (Upstate), and anti-Ki67 (Abcam).

DNA micro-array

Total RNA was prepared using TRIzol reagent (Invitrogen) and purified by the RNeasy MiniElute Cleanup kit (Qiagen) from 6 WT and 6 *Lhx2*^{-/-} e9.0 embryos or 3 WT and 3 *Pax6*^{-/-} retinal stem cell cultures at passage 2. Microarray analysis using BeadChip Mouse

Genome (Illumina) or GeneChip Mouse Expression Set 430 array, which contains ~39 000 transcripts (Affimetrix) was performed at the Centre d'innovation at Genome Quebec (McGill university, Montreal, PQ). Data were analyzed using the FlexArray software.

DNA electroporation

Mouse *Pax6* and *Lhx2* cDNAs were cloned into the EF1 α -CMV/GFP lentiviral vector (L. Cheng, Johns Hopkins University). Retinal stem cells were nucleofected with plasmids DNA using the Mouse Neural Stem Cell Nucleofector Kit according to manufacturer's instructions (Amaxa Biosystems), plated on matrigel (BD Bioscience) in NSC media for 36 hours and sorted for GFP expression by fluorescence activated cell sorting.

Statistical analysis

Statistical differences were analyzed using Student's *t*-test for unpaired samples. An analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test was used for multiple comparisons with one control group. In all cases, the criterion for significance (*P* value) was set as mentioned in the respective figures.

RESULTS

***Lhx2* demarcates the presumptive retina field**

To characterize the *Lhx2* expression pattern during mouse eye development, we performed *in situ* hybridizations on whole embryos (WISH). *Lhx2* expression was first detected in the anterior neural plate at the 2 somites stage in the region corresponding to the prospective retina field (Fig. 1A) (Furukawa et al., 1997; Mathers et al., 1997; Zuber et al., 2003). From e9.5 to e12.5, robust *Lhx2* expression was observed in the optic vesicle and eye, prospective telencephalon, and limb bud (Fig 1B and C). On embryo sections, *Lhx2* expression was detected at e10.5 in all components of the eye neuroectoderm i.e. optic stalk, optic cup and retinal-pigment epithelium (RPE), and in the ventral diencephalon (Fig. 1D). In the e12.5 and e17.5 retina, *Lhx2* expression is most intense at the retinal ciliary margin and distal RPE, with strong expression also in the outer neural retina and RPE (Fig. 1E and F). Notably, comparative expression analysis at e8.25 revealed that *Lhx2* is co-expressed with *Rx* in the anterior neural plate and that *Lhx2* overlaps with and is contained within *Rx* expression domain (Fig. 1G). In contrast, *Six3* expression is predominant in the prospective pituitary/hypothalamic axis and ventral forebrain, and nearly absent from the retina field (Fig. 1G) (Oliver et al., 1995). *Pax6* has a broader and more diffuse expression throughout the presumptive eye domain, consistent with its later expression in both epithelial and neuroepithelial derivatives (Fig. 1G) (Walther and Gruss, 1991).

***Lhx2* is required to initiate *Six3*, *Rx* and *Pax6* expression within the retina field**

Eye development in *Lhx2* mutant embryos arrest at the optic vesicle stage around e9.0, allowing gene expression analysis at this stage and earlier. To better understand *Lhx2* function in eye development, we performed comparative DNA micro-array analysis on e9.0

WT and *Lhx2*^{-/-} forebrains. These experiments revealed that several genes involved in eye/retinal development are downregulated in *Lhx2*^{-/-} forebrains, including *Mitf*, *Chx10*, *Vax2*, *Rx* (*Rax*), *Tbx5*, *Fzd5* and *Six6* (Table 1). In sharp contrast, the *Pax6* mutation is not associated with a downregulation of *Lhx2*, *Rx*, *Six3*, *Chx10*, *Otx2* and *Six6* expression in the forebrain and optic vesicle (Bernier et al., 2001; Duparc et al., 2006; Jean et al., 1999).

Based on the above result, we hypothesized that *Lhx2* may control the expression of eye genes at the earliest steps of retinal specification. To test this, we performed WISH on e8.25/e8.5 WT and *Lhx2*^{-/-} embryos, thus prior to any visible morphological abnormalities in *Lhx2* mutants. In e8.25 WT embryos, *Six3* expression was robust in the presumptive pituitary/hypothalamic axis and ventral forebrain region, but expression in the retina field was only initiated. At e8.5, *Six3* expression in the optic sulcus was well established (Fig. 2A and B). In contrast, although *Six3* expression was present in the presumptive pituitary/hypothalamic axis and ventral forebrain of *Lhx2* mutants, expression failed to be initiated in the retina field and optic sulcus (Fig. 2A and B). Similarly, *Pax6* and *Rx* expression was absent or reduced in the anterior neural plate of *Lhx2* mutants at e8.25 (Fig. 2C and D). These results show that *Lhx2* is required at the earliest stage of retina specification to initiate *Six3*, *Rx* and *Pax6* expression within the retina field.

***Lhx2* is required for *Six6* expression in the optic vesicle**

Although gene expression fails to be initiated at the neural plate stage, *Six3* expression was present (but reduced) at e9.0 in the optic vesicle of *Lhx2* mutants (Fig. 3B and E). *Six3* expression was also reduced in the prospective telencephalic vesicle of *Lhx2* mutants (Fig. 3B). In contrast to *Six3*, expression of the *Six3*-related homeobox gene *Six6* is only initiated at 3-4 somites stage in the prospective pituitary/hypothalamic axis, and later spreads to the presumptive ventral optic stalk and optic vesicle at e9.0 (Jean et al., 1999). In *Lhx2* mutants, we observed normal *Six6* expression pattern in the pituitary/hypothalamic axis at e9.0, but expression in the optic vesicle was not detected (Fig. 3C and D). To further confirm this observation, we performed WISH using *Rx* as control for expression in the

optic vesicle. *Rx* expression was reduced but present in the optic vesicle of *Lhx2*^{-/-} embryos (Fig. 3A). To quantify these observations, we performed gene expression analyses on forebrain extracts from e9.0 WT and *Lhx2* mutant embryos by Real-time PCR. Because the optic vesicle of *Lhx2* mutants is smaller even at this stage, we normalized for eye genes expression using *Rx* as standard. Even after normalization, the expression of *Six3* and *Six6* was still reduced by 75% and 85% in *Lhx2* mutant forebrains, respectively (Fig. 3E). These results suggest that *Lhx2* is required to initiate *Six6* and also possibly *Six3* expression in the optic vesicle.

Lhx2 and Pax6 can bind to the chromatin at the *Six6* loci *in vivo* and trans-activate *Six6* regulatory elements *in vitro*

Our results suggest that Lhx2 might bind to *Six6* promoter regions for expression in the developing retina. To test this, we characterized the *Six6* gene for putative Lhx2 DNA binding sites using the TRANS-FACT algorithm. Several putative sites were identified in the 5' promoter region and intron I of *Six6* (Fig. 4B). Several putative DNA binding sites were also identified for Pax6 (Fig. 4B). To test for potential association of Lhx2 or Pax6 with the chromatin at these regions *in vivo*, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments on e12.5 mouse retinas (Duparc et al., 2007). Based on the location of the putative DNA binding sites identified, we scanned 18 chromatin domains each covering ~300 base pairs of genomic DNA. Lhx2 association with the chromatin was found in genomic DNA regions corresponding to binding sites -3795, -1650 and -290 of *Six6* (Fig. 4A). Pax6 association with the chromatin was found in genomic DNA regions corresponding to binding sites -1650, -290, +685 and +4180 of *Six6*. Common and robust association of Lhx2 and Pax6 with the chromatin was found at sites -1650 and -290. Control ChIP with an anti-IgG antibody or amplification of the *β-globin* promoter suggests that this association is specific (Fig. 4A-inset, and data not shown).

Based on the bioinformatics and ChIP results, we hypothesized that Lhx2 and Pax6 directly regulate *Six6* transcription. To test this, we performed Luciferase assays in 293T cells using 4 distinct genomic DNA fragments covering the 5' promoter region (position -3964 to -75) and intron I (position +638 to +1703) of *Six6* (Fig. 4C). We found that Lhx2 alone was not sufficient to induce significant trans-activation of these DNA fragments. Pax6 alone could trans-activate fragment 1 (position -3964 to -2465) and 3 (position -1284 to -75) just above the baseline level, which was established at 3 (Fig. 4C). Notably, adding Lhx2 and Pax6 together resulted in relatively strong trans-activation of fragments 1 and 2 (position -2480 to -1263) (Fig. 4C). Robust activation of fragment 2 using both factors correlated with co-association of Lhx2 and Pax6 with the chromatin at position -1650, which is contained within fragment 2. We also tested if adding additional factors, such as Six3 and Otx2, could result in a more pronounced trans-activation of *Six6* regulatory elements (Zuber et al., 2003). Adding all factors together did not enhanced Pax6 and Lhx2 activity on *Six6* DNA fragments. In contrast, it apparently interfered with the previously observed activity on fragment 1 and 2 (Fig. 4C). These results suggest that Lhx2 and Pax6 are associated with the chromatin at the *Six6* locus *in vivo* and can trans-activate *Six6* regulatory elements *in vitro*.

***Lhx2* and *Pax6* are required for *Six6* expression in retinal stem cells**

We previously reported on the isolation and characterization of neuroepithelial (NE) retinal progenitors present in the mouse optic vesicle (Duparc et al., 2007). These NE progenitors display all the characteristics of retinal stem cells. We performed dissociated cultures of WT and *Lhx2*-mutant optic vesicles at e9.0 in serum-free media to isolate NE progenitors in a neurosphere assay (Duparc et al., 2007). Retinal colonies from *Lhx2* mutants were smaller and less abundant than from WT littermates (Fig. 5A). Considering the reduced size of the optic vesicle in *Lhx2* mutants, we performed secondary colony formation assay (self-renewal assay) from single spheres, allowing normalization of the number of cells plated

per well. Single spheres were dissociated to single cell suspensions and 2 000 cells/ml were re-plated in the same media. Under these conditions, retinal colonies were smaller and less abundant in the absence of *Lhx2* (Fig. 5A and B). To identify the underlying cellular defect, we measured the frequency of apoptotic cells (using the TUNEL assay) and the mitotic index (PH3⁺/DAPI⁺ cells) in WT and *Lhx2*^{-/-} colonies. No significant differences were found between both genotypes (data not shown). However, BrdU incorporation assays revealed a marked reduction in the number of BrdU⁺/DAPI⁺ cells (Fig. 5C) and BrdU⁺/Ki67⁺ progenitor cells (Fig. 5D) in *Lhx2*^{-/-} colonies, suggesting that *Lhx2*^{-/-} progenitors are partially arrested at the G1 phase of the cell cycle. To further test this, we evaluated the frequency of progenitors not having entered the S phase (i.e. Ki67⁺/BdrU⁻ cells) after chronic exposure to BrdU for 12 hours. We found that the frequency of unlabeled progenitors was significantly higher in *Lhx2*^{-/-} colonies, again suggesting that *Lhx2*^{-/-} progenitors have a tendency to be arrested in G1 (Fig. 5E). To test if this system was relevant to study gene regulation, we performed Real-time PCR analysis on *Lhx2*^{-/-} and WT retinal colonies. We found that *Six3* and *Six6* expression was reduced by 50% and 70% in *Lhx2*^{-/-} colonies, respectively, thus similarly as in the optic vesicle (Fig. 5F). Work performed in medaka (*Oryzias latipes*) revealed that *Six3* and *Six6* proteins promote cell cycle entry and DNA replication in part by preventing the physical interaction of Geminin with Cdt1, the main component for the assembly of the pre-replication complex (Del Bene et al., 2004). *Six3* and *Six6* may also promote cell proliferation by repressing the transcription of cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) (Gestri et al., 2005; Li et al., 2002). We compared CDKIs expression in WT and *Lhx2*^{-/-} retinal colonies. We found that *p21*^{Cip1} and *p27*^{Kip1} expression levels were increased in mutant cells, while *p57*^{Kip2} expression appeared unaffected. Collectively, these results show that *Lhx2*^{-/-} retinal stem cells generate smaller colonies due to an intrinsic proliferation defect, and suggest that this phenotype may be linked to reduced *Six6* and *Six3* expression and increased CDKIs activity.

Pax6 is not required for *Six6* expression in the optic vesicle (Jean et al., 1999). However, based on the ChIP and Luciferase assay results, we hypothesized that *Pax6* is required for *Six6* expression maintenance. We performed global gene expression analysis using DNA micro-arrays to compare WT and *Pax6*-null retinal colonies isolated from e9.5 optic vesicle (Duparc et al., 2007). These experiments revealed that in *Pax6*^{-/-} retinal colonies, *Six6* is the most down-regulated gene from the entire array (Fig. 5G). To confirm this, we performed gene expression analyses on individual WT and *Pax6*^{-/-} retinal spheres by RT-PCR. We found that in contrast with *Six3*, *Lhx2* and *Otx2*, which expression is apparently normal, expression of *Six6* is undetectable in *Pax6*^{-/-} samples (Fig. 5H). These results reveal that *Lhx2* and *Pax6* are genetically required for *Six6* expression in retinal stem cells.

Lhx2 and Pax6 can synergistically activate *Six6* expression in retinal stem cells

To further explore the relationship between *Lhx2*, *Pax6* and *Six6* gene activation, we forced *Lhx2* or *Pax6* expression in cultured retinal stem cells. Retinal colonies were dissociated to single cell suspensions and electroporated with the *Lhx2*/GFP, *Pax6*/GFP or GFP-only DNA constructs (Fig. 6). At the time of optimal GFP expression (i.e. 36 hours post-electroporation), cells were sorted by fluorescence activated cell sorting for GFP expression and analyzed by Real-time PCR. When compared together, GFP-positive and GFP-negative cells electroporated with the control plasmid displayed near identical *Six6* expression levels. However, GFP-positive cells electroporated with the *Lhx2*/GFP construct had 9-10 fold higher *Six6* expression levels and 2-3 fold higher *Six3* expression levels (Fig. 6). *Pax6*/GFP over-expression alone had no detectable effect on *Six3* or *Six6* expression. To test the possibility of cooperative activation, we electroporated a DNA mixture containing *Lhx2* and *Pax6* constructs. Notably, *Lhx2* and *Pax6* constructs could induce together a ~40 folds activation of *Six6* transcription (Fig. 6). The impact on *Six3* expression was

comparable to that of Lhx2/GFP over-expression alone. These results suggest that Lhx2 and Pax6 can synergistically activate *Six6* in retinal stem cells.

DISCUSSION

Our data indicate that *Lhx2* demarcates the presumptive retina field with *Rx* in the anterior neural plate, and that *Lhx2* is required to establish primitive retinal identity at this stage by either directly inducing or allowing initiation of retinal genes expression. Although *Lhx2* mutants develop optic vesicles, similarly as *Pax6*-null mouse or *Six3*-morphant medaka embryos, the impact of *Lhx2* loss-of-function on gene expression is unique. In both *Pax6* and *Six3* mutants, initiation of retinal gene expression (i.e. *Rx*, *Pax6*, *Lhx2*, *Otx2* and *Six3*) is normal at the neural plate and early optic vesicle stages, indicating that these factors are not required for gene expression initiation (Bernier et al., 2001; Carl et al., 2002). In contrast, expression of *Pax6*, *Rx* and *Six3* is absent or delayed in the retina field and highly reduced in the optic vesicle of *Lhx2* mutants. Similarly, *Six6* expression is not initiated in the optic vesicle of *Lhx2*-mutants, in contrast to the situation found in *Pax6*-mutants (Jean et al., 1999). At first glance, our results could suggest that *Lhx2* directly activates *Six3*, *Rx* and *Pax6* transcription in the retina field and thus operates at the upper most position in the genetic hierarchy governing retina formation. However, work performed in *Xenopus* suggest that over-expression of *Lhx2* alone is not sufficient to induce ectopic eye formation and ectopic eye gene expression, in contrast to *Pax6* or *Six3* over-expression (Zuber et al., 2003). In our experimental system, *Lhx2* over-expression in retinal stem cells could induce *Six6* expression, but had little impact on *Six3* or *Pax6* expression. Thus, *Lhx2* may not be sufficient to activate the expression of “upstream regulators” by its own in gain-of-function experiments, but this is not incompatible with a function at the upper most position, as suggested by the *Lhx2*^{-/-} phenotype reported herein.

One possible alternative is that *Lhx2* may be involved in “potentiating” the expression of early retinal determinant genes prior to the establishment of retinal identity. Gene potentiation or priming as been proposed to be an important mechanism for the developmental expression of lineage-specific transcription factors prior to the establishment

of definitive identity in multi-potent hematopoietic stem cells (Bottardi et al., 2007). Gene potentiation involves the maintenance of an accessible chromatin conformation in multi-potent stem cells, counterbalancing possible epigenetic silencing at specific loci (Bottardi et al., 2007; Szutorisz et al., 2005). Whether *Lhx2* has a function in modulating chromatin organization or accessibility for other transcription factors remains to be evaluated.

Once primitive retinal identity is established in the anterior neural plate and optic sulcus, it is predicted that “master regulators of eye development” such as *Rx*, *Pax6*, *Six3*, *Lhx2* and *Otx2* would cooperate to establish definitive retinal identity by inducing high expression levels of retinal determinant genes. The underlying mechanisms to induce high gene expression levels could involve synergistic activation and positive autoregulatory feedback loops. We found here that the concerted action of *Lhx2* and *Pax6* results in the synergistic activation of *Six6* transcription. Notably, this correlates with association of both *Pax6* and *Lhx2* with the chromatin at the *Six6* loci, sometime on the same chromatin region, suggesting the possible formation of a yet uncharacterized molecular complex. We also found that *Lhx2* is required for *Six6* expression initiation in the optic vesicle, and that *Pax6* is required for *Six6* expression maintenance in cultured retinal stem cells isolated from the optic vesicle. Interestingly, our results are in accordance with studies performed in medaka and *Xenopus* embryos. In *Xenopus*, combined over-expression of *Pax6*, *Six3* and *Otx2* results in more robust ectopic eye induction than over-expression of *Pax6* alone, suggesting either synergistic activation of retinal gene expression and/or more efficient re-programming of retinal competence in non-retinal tissues (Zuber et al., 2003). In medaka, inactivation of *Pax6* or *Six3* is associated with normal retinal gene expression at early optic vesicle stages, but gene expression is lost later on, showing that *Pax6* and *Six3* are individually required for gene expression maintenance (Carl et al., 2002).

In conclusion, our results suggest a model for early retinal specification where *Lhx2* delineates the retina field with *Rx* and allows induction of eye gene expression in this

domain, possibly by “potentiating” the chromatin. Once primitive retinal identity is established, Lhx2 cooperates with Pax6 for robust trans-activation of downstream target genes such as Six6 in order to establish and maintain definitive retinal identity. The herein proposed model likely also involves Six3, Rx and Otx2 in a much more complex molecular network, and could represent a common strategy to establish and maintain cell type identity in different regions of the developing CNS.

Acknowledgements This work was supported by grants from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, Canadian Institutes of Health Research, Foundation Fighting Blindness Canada, and Antoine-Turmel Foundation for Macular Degeneration Research. N.T. is a Scholar from the Fonds de Recherche en Ophtalmologie de l'Université de Montréal. G.B is supported by the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- Agulnick, A. D., Taira, M., Breen, J. J., Tanaka, T., Dawid, I. B. and Westphal, H.** (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* **384**, 270-2.
- Bernier, G., Panitz, F., Zhou, X., Hollemann, T., Gruss, P. and Pieler, T.** (2000). Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of *Six6* (*Optx2*) in *Xenopus* embryos. *Mech. Dev.* **93**, 59-69.
- Bernier, G., Vukovich, W., Neidhardt, L., Herrmann, B. G. and Gruss, P.** (2001). Isolation and characterization of a downstream target of *Pax6* in the mammalian retinal primordium. *Development* **138**, 3987-3994.
- Bottardi, S., Ghiam, A. F., Bergeron, F. and Milot, E.** (2007). Lineage-specific transcription factors in multipotent hematopoietic progenitors: a little bit goes a long way. *Cell Cycle* **6**, 1035-9.
- Carl, M., Loosli, F. and Wittbrodt, J.** (2002). Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye. *Development* **129**, 4057-63.
- Chow, R. L., Altmann, C. R., Lang, R. A. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* **126**, 4213-4222.
- Del Bene, F., Tessmar-Raible, K. and Wittbrodt, J.** (2004). Direct interaction of geminin and Six3 in eye development. *Nature* **427**, 745-9.
- Duparc, R. H., Abdouh, M., David, J., Lepine, M., Tetreault, N. and Bernier, G.** (2007). Pax6 controls the proliferation rate of neuroepithelial progenitors from the mouse optic vesicle. *Dev. Biol.* **301**, 374-387.
- Duparc, R. H., Boutemmine, D., Champagne, M. P., Tetreault, N. and Bernier, G.** (2006). Pax6 is required for delta-catenin/neurojugin expression during retinal, cerebellar and cortical development in mice. *Dev. Biol.*

- Furukawa, T., Kozak, C. A. and Cepko, C. L.** (1997). *rax*, a novel paired-like homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 3088-3093.
- Gehring, W. and Kazuho, I.** (1999). *Pax6* mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* **15**, 371-377.
- Gehring, W. J.** (2002). The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 65-73.
- Gestri, G., Carl, M., Appolloni, I., Wilson, S. W., Barsacchi, G. and Andreazzoli, M.** (2005). *Six3* functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting *Bmp4* expression. *Development* **132**, 2401-13.
- Grindley, J. C., Davidson, D. R. and Hill, R. E.** (1995). The role of *Pax-6* in eye and nasal development. *Development* **121**, 1433-1442.
- Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L., Ton, C. C., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D. and van Heyningen, V.** (1991). Mouse *small eye* results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* **354**, 522-525.
- Hogan, B. L., Horsburgh, G., Cohen, J., Hetherington, C. M., Fisher, G. and Lyon, M. F.** (1986). *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.* **97**, 95-110.
- Jean, D., Bernier, G. and Gruss, P.** (1999). *Six6 (Optx2)* is a novel murine *Six3*-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk. *Mech. Dev.* **84**, 31-40.
- Li, X., Perissi, V., Liu, F., Rose, D. W. and Rosenfeld, M. G.** (2002). Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science* **297**, 1180-3.
- Loosli, F., Winkler, S. and Wittbrodt, J.** (1999). *Six3* overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* **13**, 649-654.
- Marquardt, T.** (2003). Transcriptional control of neuronal diversification in the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **22**, 567-77.

- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. and Gruss, P.** (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **105**, 43-55.
- Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A. and Jamrich, M.** (1997). The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* **387**, 603-607.
- Oliver, G. and Gruss, P.** (1997). Current views on eye development. *Trends Neurosci.* **20**, 415-421.
- Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Gruss, P.** (1995). *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* **121**, 4045-4055.
- Porter, F. D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S. S., Wassif, C., Huang, S. P., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J. S., Bodine, D. et al.** (1997). Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* **124**, 2935-2944.
- Rhee, H., Polak, L. and Fuchs, E.** (2006). Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles. *Science* **312**, 1946-9.
- Szutorisz, H., Canzonetta, C., Georgiou, A., Chow, C. M., Tora, L. and Dillon, N.** (2005). Formation of an active tissue-specific chromatin domain initiated by epigenetic marking at the embryonic stem cell stage. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1804-20.
- Walther, C. and Gruss, P.** (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**, 1435-1449.
- Wu, H. K., Heng, H. H., Siderovski, D. P., Dong, W. F., Okuno, Y., Shi, X. M., Tsui, L. C. and Minden, M. D.** (1996). Identification of a human LIM-Hox gene, hLH-2, aberrantly expressed in chronic myelogenous leukaemia and located on 9q33-34.1. *Oncogene* **12**, 1205-12.

- Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G. and Harris, W. A. (2003).** Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* **130**, 5155-5167.
- Zuber, M. E., Perron, M., Philpott, A., Bang, A. and Harris, W. A. (1999).** Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of XOptx2. *Cell* **98**, 341-352.

Figure legends

Fig. 1. *Lhx2* is expressed in the visual system and demarcates the retina field (A-G). (A-C) Whole-mount *in situ* hybridization shows that *Lhx2* expression is detectable in the anterior neural plate of mouse embryos at the 2 somites stage (A), in the optic vesicle (arrowheads), telencephalic vesicle and limb from e9.0 (B), and in the eye (arrowheads), neocortex and limb bud at e12.5 (C). (D-F) On embryos sections, robust *Lhx2* expression was detected in the optic cup (oc) and optic stalk (os) at e10.5, in the retinal-pigment epithelium (rpe), central neural retina (nr) and ciliary marginal zone of the retina (cm) at e13.5 and e17.5. No expression was detectable in ectodermal derivatives such as the lens placode (lp) and lens (ls). (G) In 2 somites stage embryos, *Lhx2* and *Rx* expression demarcates a specific region of the anterior neural plate corresponding to the presumptive retina field, where *Six3* and *Pax6* are not yet expressed (arrowheads).

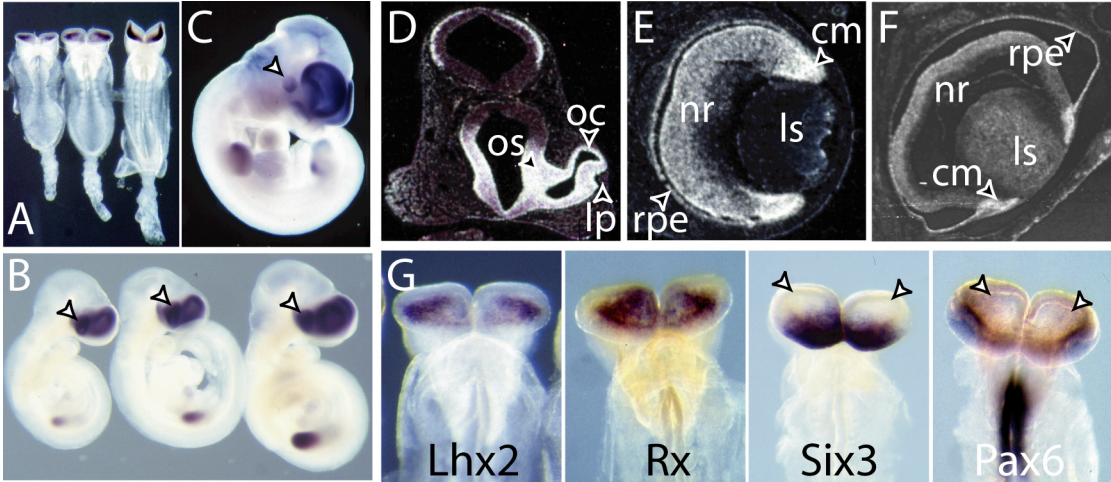


Fig. 2. *Lhx2* is required for *Six3*, *Rx* and *Pax6* expression in the retina field, as revealed by *in situ* hybridization (A-D). (A and B) In *Lhx2*^{-/-} embryos, *Six3* expression is detected in the pituitary/hypothalamic axis and ventral forebrain, but not in the retina field (arrowheads) at neural plate (A) and neural fold (B) stages. (C and D) In *Lhx2*^{-/-} embryos, *Rx* and *Pax6* expression is absent or highly reduced in the retina field (arrowheads).

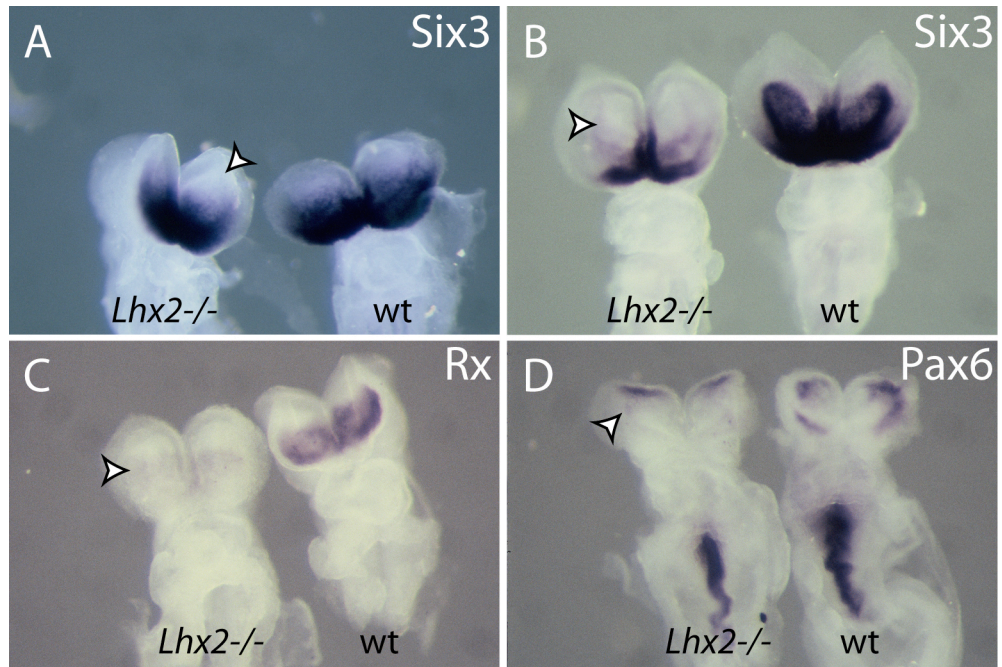


Fig. 3. *Lhx2* is required for *Six6* expression in the optic vesicle. (A-D) Whole-mount *in situ* hybridization shows that in e9.0 *Lhx2*^{-/-} embryos, *Rx* (A) and *Six3* (B) expression is present but reduced in the optic vesicle (arrowheads). *Six3* expression is also reduced in the telencephalic vesicle of *Lhx2*^{-/-} embryos (black arrowhead in B). In *Lhx2*^{-/-} embryos, *Six6* expression is detected in the pituitary/hypothalamic axis (arrowhead in D) but not in the optic vesicle (C). Real-time PCR analysis of e9.0 forebrains revealed that when compared to WT littermates (n = 4), *Six3* and *Six6* expression is highly reduced in *Lhx2* mutants (n = 3), even when normalized to *Rx* expression level, which was set to 1 (E), and where (**, *P* < 0.01).

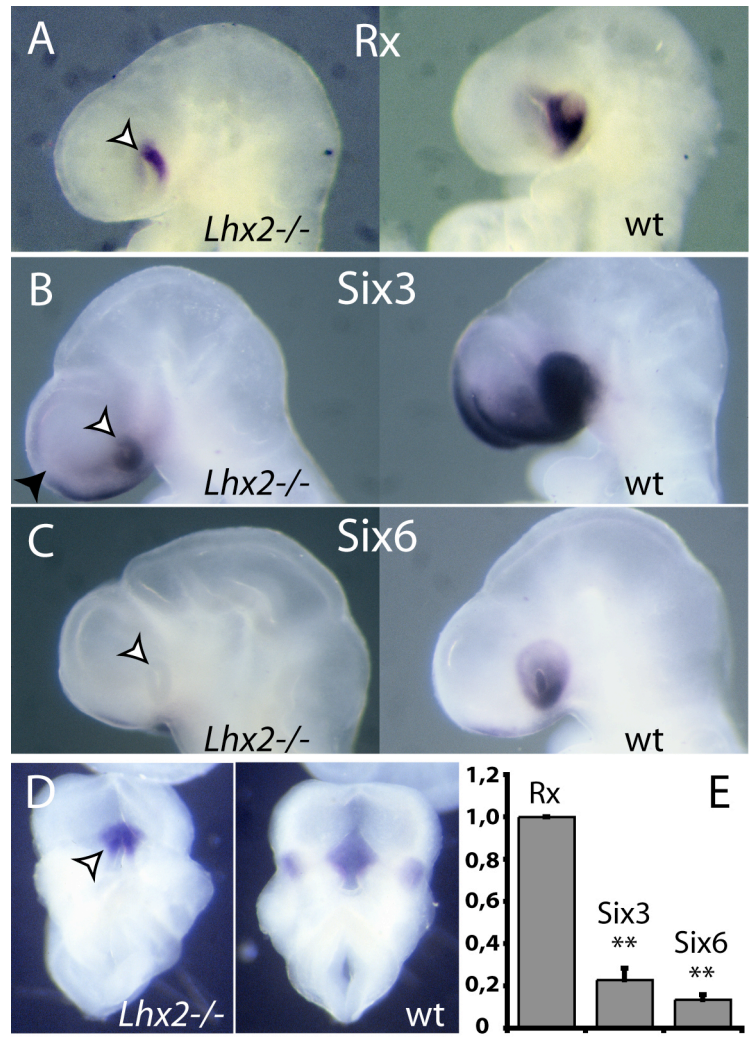


Fig. 4. Lhx2 and Pax6 can bind to the chromatin at the *Six6* loci *in vivo* and trans-activate *Six6* regulatory elements *in vitro*. (A) ChIP scanning experiment at the *Six6* loci on e12.5 mouse retinas using anti-Lhx2, anti-Pax6 and anti-IgG antibodies (n = 2). (A and B) Based on the location of several putative Lhx2 or Pax6 DNA binding sites covering about 10 kilo base pairs of genomic DNA at the *Six6* loci (B), PCR primers were designed to amplified 18 DNA fragments containing these sites. Quantitative analysis of the input/ChIP ratio for each fragment reveals an enrichment of Lhx2 or Pax6 proteins on the chromatin at different regions of *Six6* (A). ChIP enrichment was found significant when above the established arbitrary baseline level of 0.1. Control anti-IgG antibody and amplification of a fragment of the β -globin (β Major) promoter suggest that the observed associations are specific (inset). (B) Physical map of the *Six6* loci showing the 4 DNA fragments used in Luciferase assays. The white boxes correspond to exon I and II of *Six6*. (C) Luciferase assays were performed in 293T cells using 4 genomic DNA fragments (n = 3), and Luciferase activity was found significant when above the established arbitrary baseline level of 3.

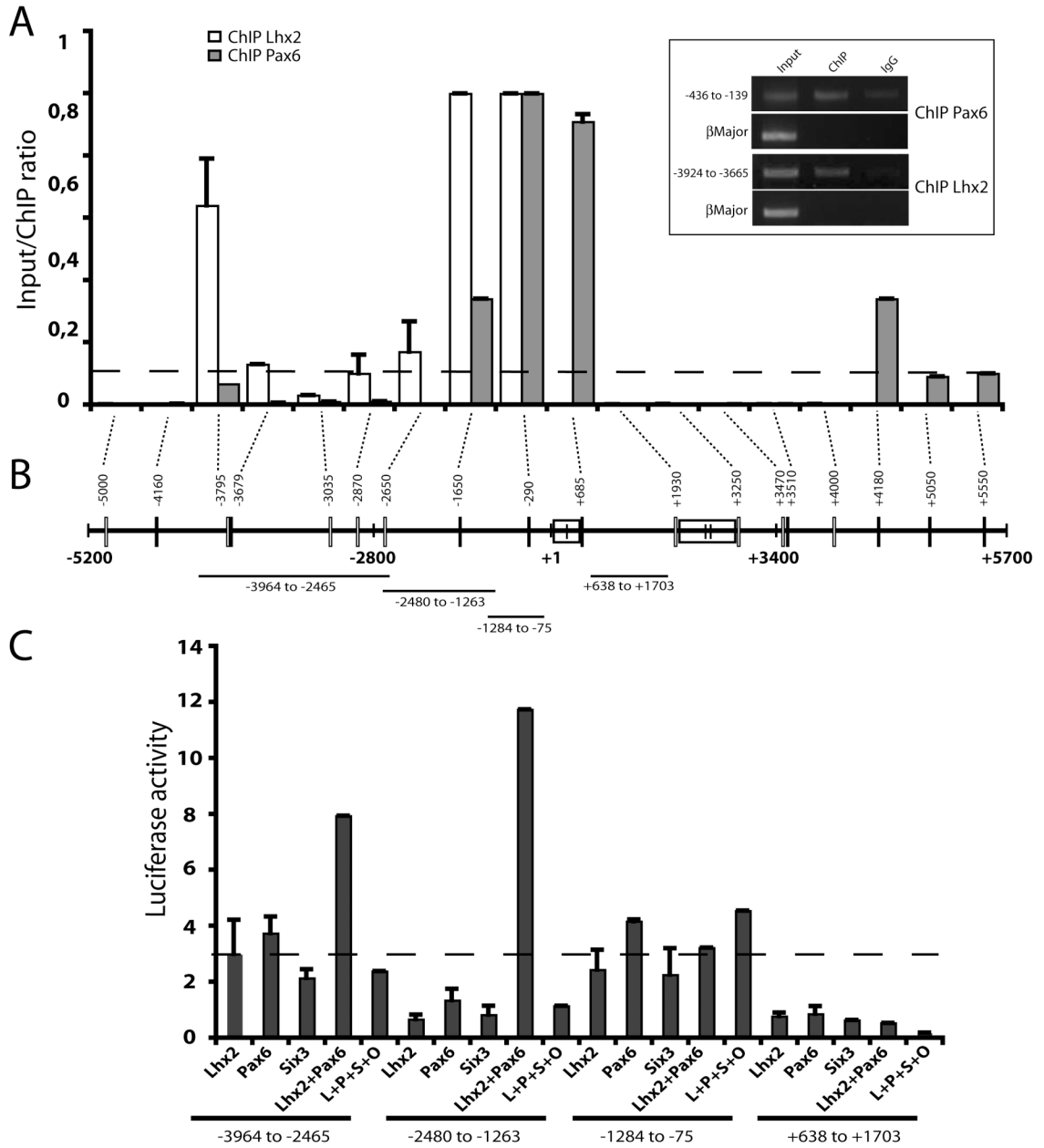


Fig. 5. *Lhx2* and *Pax6* are required for *Six6* expression in retinal stem cells. (A and B) Retinal spheres from *Lhx2*^{-/-} embryos are smaller than WT littermates in primary cultures and after serial passages of single spheres (Primary culture n=5, Secondary n=5, Tertiary n=3). (C and D) Immunofluorescence on sections of retinal spheres exposed to BrdU for 90 minutes revealed a marked reduction in BrdU incorporation in *Lhx2*^{-/-} spheres (n = 3) compared to WT (n = 3). BrdU saturation experiment reveals that most Ki67⁺ *Lhx2*^{-/-} progenitors have not yet incorporate BrdU after 12 hours of BrdU exposition (E). Real-time PCR analysis of *Six3*, *Six6*, *p21*^{Cip1}, *p27*^{Kip1} and *p57*^{Kip2} expression levels in *Lhx2*^{-/-} (n = 2) and WT retinal spheres (n = 2) (F). Comparative DNA micro-array (Affimetrix Chip) analysis of *Pax6*^{-/-} and WT retinal spheres reveals that *Six6* is the most under-expressed gene in *Pax6*^{-/-} cells (G). RT-PCR analysis on 4 individual retinal spheres from *Pax6*^{-/-} and WT genotypes reveals that *Six6* expression is not detectable in *Pax6*^{-/-} cells, in contrast to *Six3*, *Lhx2* and *Otx2*. *Gapdh* was used as normalization control (ctl) (H). *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01.

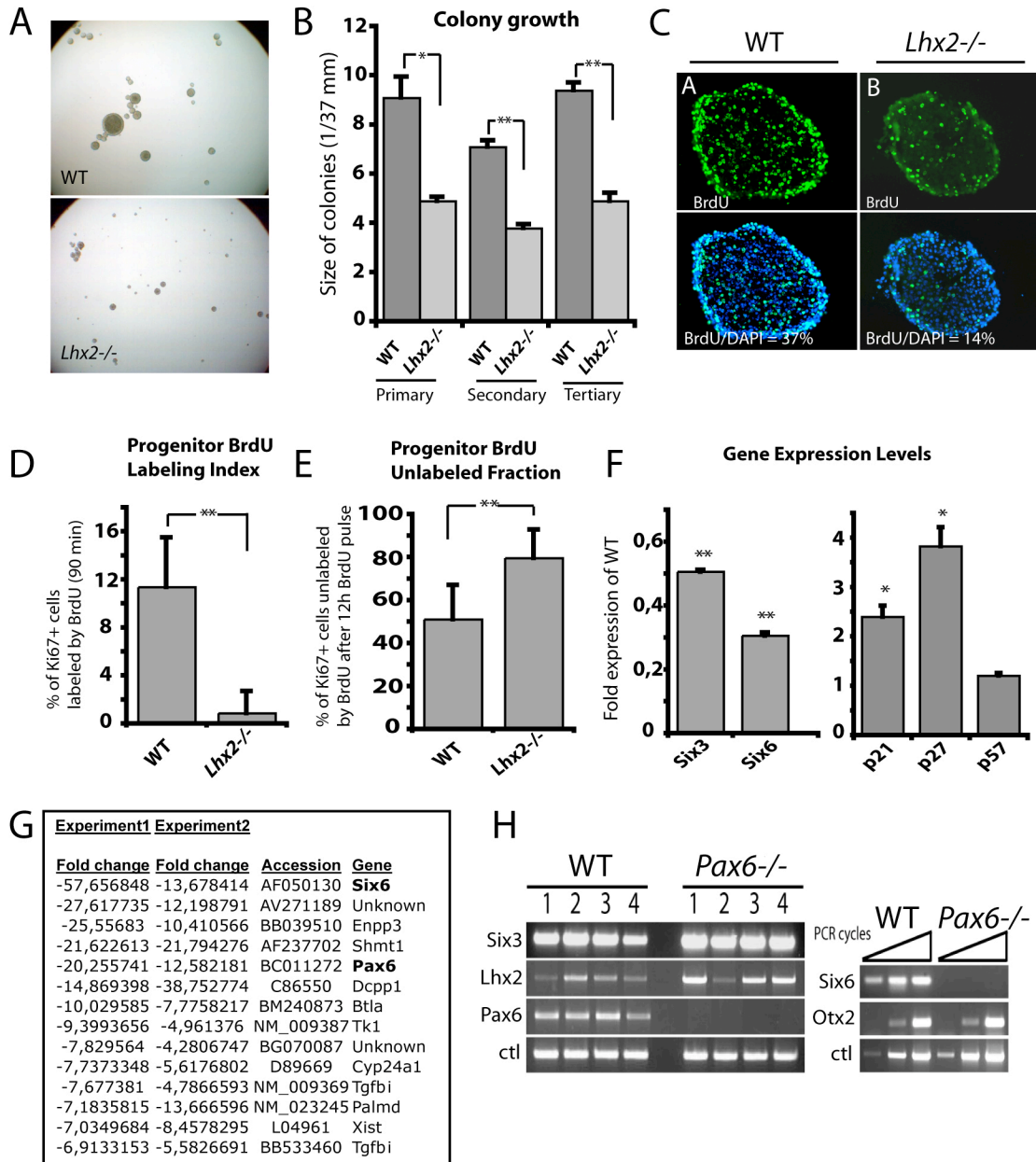
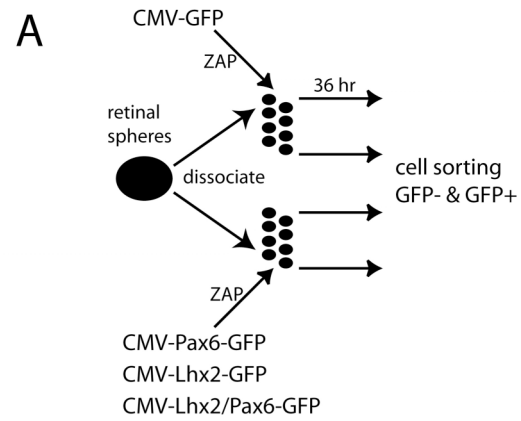


Fig. 6. Lhx2 and Pax6 can synergistically activate *Six6* expression in retinal stem cells.

(A) An experimental system was designed to electroporate plasmid DNA into cell suspensions of dissociated retinal spheres. After 36 hours of culture on matrigel, cells were sorted for GFP expression by fluorescence activated cell sorting and RNA was isolated from the GFP- and GFP+ cell populations (n = 2). (B) Real-time PCR analysis of sorted cells for *Lhx2*, *Pax6*, *Six3* and *Six6* expression (Hprt was used as internal control for normalization of samples concentrations). Cells electroporated with the GFP-only vector and sorted as GFP+ were used as standard reference (set at 1) for the Pax6/GFP+ and Lhx2/GFP+ cell populations. Cells sorted as GFP- were used as standard reference (set at 1) for the Pax6/GFP- and Lhx2/GFP- cell populations. These experiments reveal that *Six6* can be activated by Lhx2 alone, but not by Pax6 alone, or by the combination of Lhx2 and Pax6 (numbers in bold).



B

	Relative expression levels				
	Lhx2	Pax6	Six3	Six6	Hprt
CMV-GFP-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
CMV-GFP+	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
CMV-Pax6-GFP-	0.5	1.3	4.0	0.8	1.0
CMV-Pax6-GFP+	0.7	9.3	3.4	0.9	1.0
CMV-Lhx2-GFP-	1.04	1.4	1.6	1.6	1.0
CMV-Lhx2-GFP+	9.28	0.9	3.1	9.9	1.0
CMV-Lhx2/Pax6-GFP-	0.95	1.1	0.8	0.4	1.0
CMV-Lhx2/Pax6-GFP+	1.71	4.3	2.3	41.3	1.0

Table 1. Comparative gene expression analysis between WT and Lhx2^{-/-} embryos. Six forebrains from each genotypes at e9,0 were analysed using Illumina BeadArrayTM technology. Genes in bold have been involved in eye development and are downregulated in Lhx2^{-/-} embryos.

Accession Number	Gene	Description	Fold Change
NM_011445.1	Sox6	SRY-box containing gene 6	-0,9082012
NM_011384.2	Six6	Sine oculis-related homeobox 6 homolog	-0,9107906
NM_001085495	Arfgef2	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange	-0,9411977
NM_178192.1	Hist1h4a	Histone 1, H4a	-0,9438092
AK084437	D230046H12Rik	Unknown (Riken)	-0,964112
NM_013603.1	Mt3	Metallothionein	-0,9666558
NM_029768.2	Use1	Unconventional SNARE in the ER 1 homolog	-0,9723542
AK018697	Ldlr	Low density lipoprotein receptor	-0,9784728
NM_011921	Aldh1a7	Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7	-0,985391
AK013968	3110001N23Rik	Unknown (Riken)	-0,9872324
	9530086O07Rik	Unknown (Riken)	-1,005537
NM_176841.2	Ccdc88a	Coiled coil domain containing 88A	-1,031294
NM_001033193	Fzd5	Frizzled homolog 5	-1,044825
NM_007740.2	Col9a1	Procollagen, type IX, alpha 1	-1,053586
NM_175657	Hist1h4m	Histone 1, H4m	-1,067429
NM_199065	Slitrk1	SLIT and NTRK-like family, member 1	-1,099385
AK050619	P38ip-pending	Transcription factor (p38 interacting protein)	-1,10682
	B830012L14Rik	Unknown (Riken)	-1,128744
AK084485	D330006D04Rik	Unknown (Riken)	-1,166468
NM_009719.4	Neurog3	Neurogenin 3	-1,210941
AK032066	Osp94	Osmotic stress protein 94 kDa	-1,235535
NM_024226	Rtn4	Reticulon 4, transcript variant 5	-1,240561
AK054516	E330035H20Rik	Unknown (Riken)	-1,249095
NM_153551.1	Dennd1c	DENN/MADD domain containing 1C	-1,312396
NM_011537	Tbx5	T-box 5	-1,365941
AK084692	Stk18	Serine/threonine kinase 18	-1,373615
NM_008469.1	Krt1-15	Keratin complex 1, acidic, gene 15	-1,431559
AK013410	Rab14	RAB14, member RAS oncogene family	-1,446398
NM_145463	Shisa2	Shisa homolog 2	-1,486143
	C230053D17Rik	Unknown (Riken)	-1,491172
AK054453	E330027G05Rik	Unknown (Riken)	-1,545345
AK084661	D330026I07Rik	Unknown (Riken)	-1,546003
NM_013833	Rax	Retina and anterior neural fold homeobox	-1,692132
NM_011912.1	Vax2	Ventral anterior homeobox containing gene 2	-1,709344
NM_001083587	Tsn3	Tensin 3	-1,754061
AK042261	Sh3pxd2b	SH3 and PX domains 2B	-1,920659
NM_013467	Aldh1a1	Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	-1,928692
NM_007701.2	Chx10	C. elegans ceh-10 homeodomain containing homolog	-1,939004
NM_001009950	Slc38a8	Solute carrier family 38, member 8	-2,091195
NM_007799	Ctse	Cathepsin E	-2,144964
NM_008601	Mitf	Microphthalmia-associated transcription factor	-2,265145
XM_122498.1	Tm7sf1	Transmembrane 7 superfamily member 1	-2,624527
NM_010024	Dct	Dopachrome tautomerase	-3,262564

Discussion

Nous avons utilisé une approche informatique pour prédire des sites de liaison de Pax6 et Lhx2. Dû aux limitations causées par le manque de connaissance sur les phénomènes *in vivo* ainsi qu'au niveau des séquences consensus de liaison, nous ne pouvons conclure sur ces résultats et devons effectuer des analyses plus poussées. L'utilisation de techniques *in silico* n'avait comme objectif que de préciser nos recherches tant qu'à l'identification de régions promotrices de Six6. Ces prédictions nous ont permis d'établir les sites et régions de la séquence non-codante de Six6 qui allaient faire l'objet d'essai luciférase et d'immunoprécipitations de la chromatine. Dans un premier temps, le logiciel Blast a permis de révéler l'existence de deux régions situées en amont de l'ATG de Six6 qui possèdent une forte homologie de séquence entre la souris et l'humain. La première région, longue de 225 paires de bases et située à -1728 à -1504, partage 90% d'homologie entre les deux mammifères. Deux sites de liaison potentiels du domaine « paired » de Pax6 ont été identifiés dans cette région (voir annexe II). Ces deux sites se distinguent des sept autres trouvés pour Pax6 en amont du gène Six6, car en plus d'être contenu dans la région conservée, ils sont situés à trois nucléotides de distance, l'un sur le brin sens et l'autre sur le brin anti-sens. Les « paired » domaines sont reconnus comme interagissant avec l'ADN sous forme de dimères coopératifs [203]. De plus, cette région est précipitée par les anticorps de Pax6 et Lhx2 lors d'expériences de CHIP. Les essais luciférase utilisant un fragment contenant cette région comme promoteur démontrent un phénomène de transactivation synergique lorsqu'il y a présence de Pax6 et Lhx2. Bien que Pax6 et Lhx2 semblent lier d'autres régions du promoteur de Six6, il est possible d'extrapoler que la régulation se ferait principalement à ces sites.

Comme mentionné précédemment, nos résultats d'immunoprécipitation de la chromatine démontrent que les anticorps de Pax6 et Lhx2 sont en mesure de précipiter les mêmes régions de l'ADN en amont de la séquence codante de Six6. Cette particularité peut être expliquée par plusieurs éléments. Tout d'abord, il est possible que Lhx2 et Pax6 lient des sites à proximité afin de transactiver Six6. Il est aussi possible que Pax6 seul lie l'ADN

et qu'il serait en mesure de recruter Lhx2 à l'aide de son domaine « paired » ou de son homéodomaine.

De plus, des résultats préliminaires semblent indiquer que Ldb1 pourrait agir à titre de corépresseur de Lhx2 dans le contexte des progéniteurs rétiniens. Lhx2 interagirait avec Ldb1 via les domaines LIM et serait aussi en mesure d'interagir avec Pax6 tout en liant l'ADN. Il est donc possible qu'un complexe protéique formé, entre autre, de Lhx2 et Pax6 serait responsable de l'activation de gènes cibles comme *Six6* au cours de l'organogenèse oculaire et que Ldb1 pourrait réprimer ce complexe.

Les recherches démontrent la participation de complexes protéiques au niveau de la régulation transcriptionnelle des gènes [121]. De plus, des études ont démontré que les deux domaines de liaison à l'ADN de Pax6, l'homéodomaine et le domaine « paired » doivent aussi être considérés comme des domaines d'interactions protéine/protéine. En effet, ces domaines sont en mesure de créer des interactions intra et intermoléculaires même lorsque liés à l'ADN [204]. Il est connu que les facteurs de transcription à homéodomaine ciblent correctement les promoteurs grâce aux interactions qu'ils établissent avec d'autres protéines [205]. De plus, il a été démontré *in vitro* que Lhx2 et Pax6 interagissent ensemble de manière indépendante à leur liaison à l'ADN. Cette interaction induit un impact synergique sur la transactivation causée par Pax6 par rapport à un site minimal consensus pour la liaison du domaine « paired » [206]. Lhx2 n'est pas le seul facteur à homéodomaine en mesure d'interagir et d'augmenter le pouvoir de transactivation de Pax6. En effet, Chx10 est aussi capable de moduler l'effet de Pax6 sur la transcription de gènes cibles. Notons également l'interaction *in vitro* de Pax6 avec d'autres facteurs de transcription à homéodomaine impliqués dans la genèse de l'œil, Rx et Six3. Ces différents facteurs de transcription possèdent des patrons d'expression distincts et qui se juxtaposent. L'interaction de Pax6 avec ces différentes protéines serait en mesure d'offrir un contrôle transcriptionnel serré et précis de ses nombreux et différents gènes cibles. Ce parfait contrôle

est essentiel puisqu'il est connu que l'œil est très sensible au dosage de Pax6, comme en témoignent les souris hétérozygotes pour *Pax6* [196].

Le fait que Pax6 semble activer la transcription de *Six6* dans les cellules neuroépithéliales de la vésicule optique diffère de ce qui est connu chez la drosophile. En effet, l'expression d'*optix* ne semble pas être influencée par *eyeless* ou *twins of eyeless*. En fait, l'induction de yeux ectopiques par *optix* s'effectue indépendamment de *eyeless* [182]. Par contre, nos résultats sont similaires à ceux effectués par l'équipe de Dr Chen qui a démontré la liaison de *eyeless* sur deux sites en amont d'*optix* et ces liens suffiraient à l'activation transcriptionnelle dans un système *in vitro* [207]. Il est également connu que *eyeless* et *twins of eyeless* contrôlent la transcription de *so*. Il ne faut pas oublier que *optix* et *so* font partie de la même grande famille. Ces gènes étant très conservés entre les espèces, il est donc normal que les patrons d'activation d'expression soient similaires. Donc si *eyeless* contrôle la transcription de *So*, il n'est pas surprenant que Pax6 puisse contrôler celle de *Six6*.

Le fait que Lhx2 et Pax6 transactivent *six6* est spécifique aux progéniteurs rétiniens. En effet, il serait illogique d'extrapoler ce patron d'activation aux cellules de la voie hypophysaire. La transcription de *Six6* dans l'axe hypothalamique-hypophysaire n'est pas affectée par l'expression altérée de Lhx2. Par contre, ce mécanisme de transactivation pourrait aussi exister au niveau des cellules placodes nasales. En effet, on retrouve une expression importante et simultanée de Lhx2, Pax6 et *Six6* dans cette région [208]. Cette régulation tissu spécifique pourrait donc se retrouver ailleurs dans le système nerveux central.

Rx est connu pour être le premier facteur de transcription à homéodomaine exprimé avant le stade de la vésicule optique, lors des premiers signes morphologiques du développement de l'œil. En effet, non seulement *Rx* y est exprimé mais son invalidation empêche même la formation du sulci optique, première structure morphologique du développement de l'œil [209]. Il est établi dans la littérature que *Rx* est en amont des

autres facteurs de transcription à homéodomaine et que son expression en est indépendante. Ces expériences, effectuées avec *Six3*, *Pax6* et *Otx2*, les marqueurs primitifs du développement de l'œil, ont démontré que l'expression de *Rx* n'était pas affectée par une expression altérée des trois marqueurs. Cette présente étude met en évidence un fait nouveau. L'initiation de l'expression de *Rx* serait un phénomène indépendant des facteurs à homéodomaine, mais serait dépendante de *Lhx2* pour son expression normale dans les ébauches oculaires, ce qui confirme le rôle de *Lhx2* comme un facteurs important dans la démarcation du champ oculaire de la portion antérieur de la plaque neural et dans le développement complet de l'organe.

Perspectives

Les observations effectuées à E8,25-E8,5 au niveau de l'initiation de la transcription des gènes démarquants le champ visuel dans la partie ventrale de la plaque neurale démontrent un défaut d'induction de *Rx*, *Six3* et *Pax6*. Bien que l'expression initiale de ces gènes peut être indépendante de *Lhx2*, il est clair qu'un défaut du maintien ou de l'expansion de l'expression est observé. Ceci nous indique que *Lhx2* pourrait aussi être en partie responsable de la régulation de l'accessibilité d'autres facteurs de transcription aux promoteurs des gènes encodant ces protéines. Pour tester cette hypothèse, un séquençage bisulfite des promoteurs en question pourrait être effectué afin de déterminer le niveau de méthylation de l'ADN dans ces régions. *Lhx2* pourrait agir en complexe avec des co-répresseurs (Méthyltransférase, HDAC) ou des co-activateurs (Déméthylase, Acétyltransférase) et ainsi modifier les histones pour contrôler l'accessibilité au promoteur.

Il serait important d'identifier précisément les régions clés qui constituent le promoteur de *Six6*. Des expériences de retard sur gel conjointement à des mutations ponctuelles seront en mesure de révéler les nucléotides essentiels à la reconnaissance du promoteur minimal de *Six6*. Les deux sites potentiel discuté précédemment seraient de bon candidats de départ pour ces expériences.

Il serait important de confirmer l'action de corépresseur Ldb1 sur Lhx2. Des essais luciférase avec différents gradients de Ldb1 permettraient d'en savoir davantage sur le potentiel répressif de Ldb1 sur l'activité de Lhx2 [196]. Il faudrait également déterminer si l'action répressive de Ldb1 sur un complexe impliquant Pax6 et Lhx2 se ferait via une inhibition de la liaison à l'ADN ou par un autre mécanisme empêchant, par exemple, le recrutement de co-activateurs. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps dirigé contre Ldb1 pourraient révéler la présence ou l'absence du complexe sur l'ADN en présence de Ldb1. De plus, afin de confirmer l'existence de complexes protéiques entre Lhx2 et Pax6 dans un contexte de progéniteurs rétiniens, il serait intéressant de réaliser des expériences de coimmunoprécipitation.

Conclusion

Nos études ont permis de préciser le rôle précoce et essentiel de Lhx2 dans le développement de l'œil. Lhx2 possède un impact sur l'induction de l'expression des facteurs de transcription à homéodomaine démarquant le site du champ oculaire, soit *Rx*, *Pax6* et *Six3*. Il a également été démontré que Lhx2 et Pax6 seraient en mesure de lier des séquences en amont et en aval de la séquence codante de Six6, révélant la nature de son promoteur. Plus précisément, ces études ont aussi permis l'identification de régions potentielles qui constitueraient les sites importants pour l'activation de la transcription de Six6. Des systèmes *in vitro* ont également confirmé la transactivation synergique de la luciférase par Lhx2 et Pax6 en liaison avec une région située en amont de l'ATG de Six6. Ces expériences révèlent l'existence de divers mécanismes qui assurent un contrôle serré de la transcription des gènes cibles dans l'organogenèse de l'œil. Ces connaissances nous serviront à mieux comprendre les réseaux complexes qui permettent à des facteurs de transcription d'être exprimés à un moment et dans une région précise. Ces protéines ont des actions essentielles et puissantes sur les propriétés des cellules. Connaissant, par exemple, l'effet de l'expression des facteurs de transcription à homéodomaine sur les cellules gliales de Müller et les progéniteurs rétiniens, il est important de démystifier les réseaux transcriptionnels impliqués[15]. La compréhension de ces divers processus biologiques menant les facteurs de transcription et les cellules les exprimant à une organogenèse complète nous permettra peut-être un jour de renouveler les organes défectueux.

Références

(Harada et al., Molecular regulation of visual system development : more than meets the eye. *Genes and development*, 2007 21 :367-378)

1. Resnikoff, S., et al., *Global data on visual impairment in the year 2002*. Bull World Health Organ, 2004. **82**(11): p. 844-51.
2. Quillen, D.A. and B.A. Blodi. *Clinical retina*. [Fichier en format PDF.] 2002 [cited; 1 cédérom].
3. Friedman, D.S., et al., *Prevalence of age-related macular degeneration in the United States*. Arch Ophthalmol, 2004. **122**(4): p. 564-72.
4. Klein, R., et al., *Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study*. Ophthalmology, 2002. **109**(10): p. 1767-79.
5. Daiger, S.P., S.J. Bowne, and L.S. Sullivan, *Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa*. Arch Ophthalmol, 2007. **125**(2): p. 151-8.
6. Coulombre, J.L. and A.J. Coulombre, *Regeneration of neural retina from the pigmented epithelium in the chick embryo*. Dev Biol, 1965. **12**(1): p. 79-92.
7. Johns, P.R., A.C. Rusoff, and M.W. Dubin, *Postnatal neurogenesis in the kitten retina*. J Comp Neurol, 1979. **187**(3): p. 545-55.
8. Wetts, R., G.N. Serbedzija, and S.E. Fraser, *Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina*. Dev Biol, 1989. **136**(1): p. 254-63.
9. Lamba, D., M. Karl, and T. Reh, *Neural regeneration and cell replacement: a view from the eye*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(6): p. 538-49.
10. Murry, C.E. and G. Keller, *Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development*. Cell, 2008. **132**(4): p. 661-80.
11. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
12. Wilmut, I., *The first direct reprogramming of adult human fibroblasts*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(6): p. 593-4.
13. Tropepe, V., et al., *Retinal stem cells in the adult mammalian eye*. Science, 2000. **287**(5460): p. 2032-6.
14. Haruta, M., et al., *Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue*. Nat Neurosci, 2001. **4**(12): p. 1163-4.
15. Ooto, S., et al., *Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13654-9.
16. Vugler, A., et al., *Embryonic stem cells and retinal repair*. Mech Dev, 2007. **124**(11-12): p. 807-29.

17. Ohsawa, R. and R. Kageyama, *Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors*. Brain Res, 2008. **1192**: p. 90-8.
18. Adelmann, H.B., *The problem of cyclopia. Pt II*. The quarterly of biology, 1936. **11**(3): p. 20.
19. Esteve, P. and P. Bovolenta, *Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens*. Curr Opin Neurobiol, 2006. **16**(1): p. 13-9.
20. Inoue, T., S. Nakamura, and N. Osumi, *Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate*. Dev Biol, 2000. **219**(2): p. 373-83.
21. Eagleson, G., B. Ferreiro, and W.A. Harris, *Fate of the anterior neural ridge and the morphogenesis of the Xenopus forebrain*. J Neurobiol, 1995. **28**(2): p. 146-58.
22. Chiang, C., et al., *Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function*. Nature, 1996. **383**(6599): p. 407-13.
23. Adler, R. and M.V. Canto-Soler, *Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies*. Dev Biol, 2007. **305**(1): p. 1-13.
24. Toy, J., et al., *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**(18): p. 10643-8.
25. Baumer, N., et al., *Pax6 is required for establishing naso-temporal and dorsal characteristics of the optic vesicle*. Development, 2002. **129**(19): p. 4535-45.
26. Hyer, J., et al., *Optic cup morphogenesis requires pre-lens ectoderm but not lens differentiation*. Dev Biol, 2003. **259**(2): p. 351-63.
27. Oliver, G. and P. Gruss, *Current views on eye development*. Trends Neurosci, 1997. **20**(9): p. 415-21.
28. Mic, F.A., et al., *Raldh2 expression in optic vesicle generates a retinoic acid signal needed for invagination of retina during optic cup formation*. Dev Dyn, 2004. **231**(2): p. 270-7.
29. Grindley, J.C., D.R. Davidson, and R.E. Hill, *The role of Pax-6 in eye and nasal development*. Development, 1995. **121**(5): p. 1433-42.
30. Matt, N., et al., *Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells*. Development, 2005. **132**(21): p. 4789-800.
31. Schook, P., *Morphogenetic movements during the early development of the chick eye. An ultrastructural and spatial reconstructive study. B. Invagination of the optic vesicle and fusion of its walls*. Acta Morphol Neerl Scand, 1980. **18**(23): p. 159-80.
32. Svoboda, K.K. and K.S. O'Shea, *An analysis of cell shape and the neuroepithelial basal lamina during optic vesicle formation in the mouse embryo*. Development, 1987. **100**(2): p. 185-200.
33. Barbieri, A.M., et al., *A homeobox gene, vax2, controls the patterning of the eye dorsoventral axis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10729-34.
34. Macdonald, R., et al., *Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes*. Development, 1995. **121**(10): p. 3267-78.

35. Mey, J., P. McCaffery, and M. Klement, *Sources and sink of retinoic acid in the embryonic chick retina: distribution of aldehyde dehydrogenase activities, CRABP-I, and sites of retinoic acid inactivation*. Brain Res Dev Brain Res, 2001. **127**(2): p. 135-48.
36. Suzuki, R., et al., *Identification of RALDH-3, a novel retinaldehyde dehydrogenase, expressed in the ventral region of the retina*. Mech Dev, 2000. **98**(1-2): p. 37-50.
37. Braisted, J.E., et al., *Graded and lamina-specific distributions of ligands of EphB receptor tyrosine kinases in the developing retinotectal system*. Dev Biol, 1997. **191**(1): p. 14-28.
38. Holash, J.A. and E.B. Pasquale, *Polarized expression of the receptor protein tyrosine kinase Cdk5 in the developing avian visual system*. Dev Biol, 1995. **172**(2): p. 683-93.
39. Belecky-Adams, T. and R. Adler, *Developmental expression patterns of bone morphogenetic proteins, receptors, and binding proteins in the chick retina*. J Comp Neurol, 2001. **430**(4): p. 562-72.
40. Hyatt, G.A. and J.E. Dowling, *Retinoic acid. A key molecule for eye and photoreceptor development*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(8): p. 1471-5.
41. Zhang, X.M. and X.J. Yang, *Temporal and spatial effects of Sonic hedgehog signaling in chick eye morphogenesis*. Dev Biol, 2001. **233**(2): p. 271-90.
42. Peters, M.A. and C.L. Cepko, *The dorsal-ventral axis of the neural retina is divided into multiple domains of restricted gene expression which exhibit features of lineage compartments*. Dev Biol, 2002. **251**(1): p. 59-73.
43. Yang, X.J., *Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(1): p. 91-103.
44. Koshiba-Takeuchi, K., et al., *Tbx5 and the retinotectum projection*. Science, 2000. **287**(5450): p. 134-7.
45. Duparc, R.H., et al., *Pax6 controls the proliferation rate of neuroepithelial progenitors from the mouse optic vesicle*. Dev Biol, 2007. **301**(2): p. 374-87.
46. Bulchand, S., L. Subramanian, and S. Tole, *Dynamic spatiotemporal expression of LIM genes and cofactors in the embryonic and postnatal cerebral cortex*. Dev Dyn, 2003. **226**(3): p. 460-9.
47. Takayuki Harada, C.H., Luis F. Parada *Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye*. Genes and development, 2007. **21**: p. 367-378.
48. Yan, R.T., et al., *bHLH genes and retinal cell fate specification*. Mol Neurobiol, 2005. **32**(2): p. 157-71.
49. Turner, D.L. and C.L. Cepko, *A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development*. Nature, 1987. **328**(6126): p. 131-6.
50. Young, R.W., *Cell differentiation in the retina of the mouse*. Anat Rec, 1985. **212**(2): p. 199-205.
51. Livesey, F.J. and C.L. Cepko, *Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(2): p. 109-18.

52. Treisman, J.E., *How to make an eye*. Development, 2004. **131**(16): p. 3823-7.
53. Zuber, M.E., et al., *Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors*. Development, 2003. **130**(21): p. 5155-67.
54. Andreazzoli, M., et al., *Role of Xrx1 in Xenopus eye and anterior brain development*. Development, 1999. **126**(11): p. 2451-60.
55. Bernier, G., et al., *Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of Six6 (Optx2) in Xenopus embryos*. Mech Dev, 2000. **93**(1-2): p. 59-69.
56. Chow, R.L., et al., *Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate*. Development, 1999. **126**(19): p. 4213-22.
57. Chuang, J.C., P.H. Mathers, and P.A. Raymond, *Expression of three Rx homeobox genes in embryonic and adult zebrafish*. Mech Dev, 1999. **84**(1-2): p. 195-8.
58. Loosli, F., S. Winkler, and J. Wittbrodt, *Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina*. Genes Dev, 1999. **13**(6): p. 649-54.
59. Bailey, T.J., et al., *Regulation of vertebrate eye development by Rx genes*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(8-9): p. 761-70.
60. Chow, R.L. and R.A. Lang, *Early eye development in vertebrates*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 255-96.
61. Wilson, S.W. and C. Houart, *Early steps in the development of the forebrain*. Dev Cell, 2004. **6**(2): p. 167-81.
62. Cavodeassi, F., et al., *Early stages of zebrafish eye formation require the coordinated activity of Wnt11, Fz5, and the Wnt/beta-catenin pathway*. Neuron, 2005. **47**(1): p. 43-56.
63. Moore, K.B., et al., *Morphogenetic movements underlying eye field formation require interactions between the FGF and ephrinB1 signaling pathways*. Dev Cell, 2004. **6**(1): p. 55-67.
64. Martinez-Morales, J.R., I. Rodrigo, and P. Bovolenta, *Eye development: a view from the retina pigmented epithelium*. Bioessays, 2004. **26**(7): p. 766-77.
65. Mears, A.J., et al., *Nrl is required for rod photoreceptor development*. Nat Genet, 2001. **29**(4): p. 447-52.
66. Li, S., et al., *Foxn4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors*. Neuron, 2004. **43**(6): p. 795-807.
67. Ohtsuka, T., et al., *Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation*. EMBO J, 1999. **18**(8): p. 2196-207.
68. Gaiano, N., J.S. Nye, and G. Fishell, *Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain*. Neuron, 2000. **26**(2): p. 395-404.
69. Jadhav, A.P., S.H. Cho, and C.L. Cepko, *Notch activity permits retinal cells to progress through multiple progenitor states and acquire a stem cell property*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(50): p. 18998-9003.
70. Lee, H.Y., et al., *Multiple requirements for Hes 1 during early eye formation*. Dev Biol, 2005. **284**(2): p. 464-78.

71. Takatsuka, K., et al., *Roles of the bHLH gene Hes1 in retinal morphogenesis*. Brain Res, 2004. **1004**(1-2): p. 148-55.
72. Hatakeyama, J., et al., *Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation*. Development, 2004. **131**(22): p. 5539-50.
73. Brown, N.L., et al., *Math5 encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis*. Development, 1998. **125**(23): p. 4821-33.
74. Brown, N.L., et al., *Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation*. Development, 2001. **128**(13): p. 2497-508.
75. Wang, S.W., et al., *Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells*. Genes Dev, 2001. **15**(1): p. 24-9.
76. Hatakeyama, J., et al., *Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type*. Development, 2001. **128**(8): p. 1313-22.
77. Tomita, K., et al., *Mash1 promotes neuronal differentiation in the retina*. Genes Cells, 1996. **1**(8): p. 765-74.
78. Fujitani, Y., et al., *Ptfla determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development*. Development, 2006. **133**(22): p. 4439-50.
79. Dyer, M.A., et al., *Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina*. Nat Genet, 2003. **34**(1): p. 53-8.
80. Inoue, T., et al., *Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina*. Development, 2002. **129**(4): p. 831-42.
81. Akagi, T., et al., *Requirement of multiple basic helix-loop-helix genes for retinal neuronal subtype specification*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28492-8.
82. Kissinger, C.R., et al., *Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions*. Cell, 1990. **63**(3): p. 579-90.
83. Wolberger, C., et al., *Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions*. Cell, 1991. **67**(3): p. 517-28.
84. Gehring, W.J., et al., *The structure of the homeodomain and its functional implications*. Trends Genet, 1990. **6**(10): p. 323-9.
85. Treisman, J., et al., *The homeodomain: a new face for the helix-turn-helix?* Bioessays, 1992. **14**(3): p. 145-50.
86. Zhang, L., P.H. Mathers, and M. Jamrich, *Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice*. Genesis, 2000. **28**(3-4): p. 135-42.
87. Chuang, J.C. and P.A. Raymond, *Embryonic origin of the eyes in teleost fish*. Bioessays, 2002. **24**(6): p. 519-29.
88. Kenyon, K.L., N. Zaghloul, and S.A. Moody, *Transcription factors of the anterior neural plate alter cell movements of epidermal progenitors to specify a retinal fate*. Dev Biol, 2001. **240**(1): p. 77-91.

89. Eggert, T., et al., *Isolation of a Drosophila homolog of the vertebrate homeobox gene Rx and its possible role in brain and eye development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2343-8.
90. Mathers, P.H., et al., *The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 603-7.
91. Loosli, F., et al., *Loss of eyes in zebrafish caused by mutation of chokh/rx3*. EMBO Rep, 2003. **4**(9): p. 894-9.
92. Furukawa, T., et al., *rax, Hes1, and notch1 promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells*. Neuron, 2000. **26**(2): p. 383-94.
93. Bray, S.J., *Notch signalling: a simple pathway becomes complex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 678-89.
94. Taranova, O.V., et al., *SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence*. Genes Dev, 2006. **20**(9): p. 1187-202.
95. Burmeister, M., et al., *Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation*. Nat Genet, 1996. **12**(4): p. 376-84.
96. Marquardt, T., et al., *Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells*. Cell, 2001. **105**(1): p. 43-55.
97. Martinez-Morales, J.R., et al., *Otx genes are required for tissue specification in the developing eye*. Development, 2001. **128**(11): p. 2019-30.
98. Furukawa, T., E.M. Morrow, and C.L. Cepko, *Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation*. Cell, 1997. **91**(4): p. 531-41.
99. Chen, S., et al., *Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes*. Neuron, 1997. **19**(5): p. 1017-30.
100. Nishida, A., et al., *Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development*. Nat Neurosci, 2003. **6**(12): p. 1255-63.
101. Shawlot, W. and R.R. Behringer, *Requirement for Lim1 in head-organizer function*. Nature, 1995. **374**(6521): p. 425-30.
102. Grigoriou, M., et al., *Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development*. Development, 1998. **125**(11): p. 2063-74.
103. Thaler, J.P., et al., *LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions*. Cell, 2002. **110**(2): p. 237-49.
104. Tajima, T., et al., *A novel missense mutation (P366T) of the LHX4 gene causes severe combined pituitary hormone deficiency with pituitary hypoplasia, ectopic posterior lobe and a poorly developed sella turcica*. Endocr J, 2007. **54**(4): p. 637-41.
105. Netchine, I., et al., *Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 182-6.

106. Porter, F.D., et al., *Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development.* Development, 1997. **124**(15): p. 2935-44.
107. Sanchez-Garcia, I. and T.H. Rabbitts, *The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins.* Trends Genet, 1994. **10**(9): p. 315-20.
108. Crawford, A.W., J.W. Michelsen, and M.C. Beckerle, *An interaction between zyxin and alpha-actinin.* J Cell Biol, 1992. **116**(6): p. 1381-93.
109. Sanchez-Garcia, I., et al., *The cysteine-rich LIM domains inhibit DNA binding by the associated homeodomain in Isl-1.* EMBO J, 1993. **12**(11): p. 4243-50.
110. Bach, I., *The LIM domain: regulation by association.* Mech Dev, 2000. **91**(1-2): p. 5-17.
111. Xu, Y., et al., *LH-2: a LIM/homeodomain gene expressed in developing lymphocytes and neural cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(1): p. 227-31.
112. Kolterud, A., et al., *The Lim homeobox gene Lhx2 is required for olfactory sensory neuron identity.* Development, 2004. **131**(21): p. 5319-26.
113. Palis, J. and M.C. Yoder, *Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man.* Exp Hematol, 2001. **29**(8): p. 927-36.
114. Pinto do, O.P., K. Richter, and L. Carlsson, *Hematopoietic progenitor/stem cells immortalized by Lhx2 generate functional hematopoietic cells in vivo.* Blood, 2002. **99**(11): p. 3939-46.
115. Blair, S.S., *Mechanisms of compartment formation: evidence that non-proliferating cells do not play a critical role in defining the D/V lineage restriction in the developing wing of Drosophila.* Development, 1993. **119**(2): p. 339-51.
116. Diaz-Benjumea, F.J. and S.M. Cohen, *Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in Drosophila.* Cell, 1993. **75**(4): p. 741-52.
117. Rodriguez-Esteban, C., et al., *Lhx2, a vertebrate homologue of apterous, regulates vertebrate limb outgrowth.* Development, 1998. **125**(20): p. 3925-34.
118. Viczian, A.S., et al., *Expression of Xenopus laevis Lhx2 during eye development and evidence for divergent expression among vertebrates.* Dev Dyn, 2006. **235**(4): p. 1133-41.
119. Cohen, B., et al., *apterous, a gene required for imaginal disc development in Drosophila encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins.* Genes Dev, 1992. **6**(5): p. 715-29.
120. Rincon-Limas, D.E., et al., *Conservation of the expression and function of apterous orthologs in Drosophila and mammals.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2165-70.
121. Matthews, J.M. and J.E. Visvader, *LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins.* EMBO Rep, 2003. **4**(12): p. 1132-7.
122. Jurata, L.W., D.A. Kenny, and G.N. Gill, *Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11693-8.

123. Agulnick, A.D., et al., *Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins*. Nature, 1996. **384**(6606): p. 270-2.
124. Bach, I., et al., *A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins*. Genes Dev, 1997. **11**(11): p. 1370-80.
125. Dawid, I.B., J.J. Breen, and R. Toyama, *LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions*. Trends Genet, 1998. **14**(4): p. 156-62.
126. Wadman, I.A., et al., *The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins*. EMBO J, 1997. **16**(11): p. 3145-57.
127. Chen, L., et al., *Ssdp proteins interact with the LIM-domain-binding protein Ldb1 to regulate development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14320-5.
128. Susa, T., et al., *Cofactor CLIM2 promotes the repressive action of LIM homeodomain transcription factor Lhx2 in the expression of porcine pituitary glycoprotein hormone alpha subunit gene*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1759**(8-9): p. 403-9.
129. Jurata, L.W. and G.N. Gill, *Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(10): p. 5688-98.
130. Mochizuki, T., et al., *Xlim-1 and LIM domain binding protein 1 cooperate with various transcription factors in the regulation of the gooseoid promoter*. Dev Biol, 2000. **224**(2): p. 470-85.
131. Mukhopadhyay, M., et al., *Functional ablation of the mouse Ldb1 gene results in severe patterning defects during gastrulation*. Development, 2003. **130**(3): p. 495-505.
132. Tremblay, P. and P. Gruss, *Pax: genes for mice and men*. Pharmacol Ther, 1994. **61**(1-2): p. 205-26.
133. Laclef, C. and P. Maire, *[Redeployment of the Six genes in evolution]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(12): p. 1085-90.
134. Gehring, W.J. and K. Ikeo, *Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution*. Trends Genet, 1999. **15**(9): p. 371-7.
135. Ton, C.C., et al., *Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1059-74.
136. Callaerts, P., et al., *Isolation and expression of a Pax-6 gene in the regenerating and intact Planarian Dugesia(G)tigrina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 558-63.
137. Czerny, T. and M. Busslinger, *DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5)*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2858-71.
138. Quiring, R., et al., *Homology of the eyeless gene of Drosophila to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans*. Science, 1994. **265**(5173): p. 785-9.

139. 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**(1): p. 65-73.
140. Schonhoff, S.E., M. Giel-Moloney, and A.B. Leiter, *Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells*. Endocrinology, 2004. **145**(6): p. 2639-44.
141. Martin, P., et al., *Characterization of a paired box- and homeobox-containing quail gene (Pax-QNR) expressed in the neuroretina*. Oncogene, 1992. **7**(9): p. 1721-8.
142. Walther, C., et al., *Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes*. Genomics, 1991. **11**(2): p. 424-34.
143. Tsonis, P.A. and E.J. Fuentes, *Focus on molecules: Pax-6, the eye master*. Exp Eye Res, 2006. **83**(2): p. 233-4.
144. Halder, G., P. Callaerts, and W.J. Gehring, *Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila*. Science, 1995. **267**(5205): p. 1788-92.
145. Hever, A.M., K.A. Williamson, and V. van Heyningen, *Developmental malformations of the eye: the role of PAX6, SOX2 and OTX2*. Clin Genet, 2006. **69**(6): p. 459-70.
146. Buckingham, M. and F. Relaix, *The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 645-73.
147. 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**: p. 95-110.
148. Canto-Soler, M.V. and R. Adler, *Optic cup and lens development requires Pax6 expression in the early optic vesicle during a narrow time window*. Dev Biol, 2006. **294**(1): p. 119-32.
149. Ashery-Padan, R., et al., *Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye*. Genes Dev, 2000. **14**(21): p. 2701-11.
150. Reza, H.M. and K. Yasuda, *The involvement of neural retina pax6 in lens fiber differentiation*. Dev Neurosci, 2004. **26**(5-6): p. 318-27.
151. Fujiwara, M., et al., *Uchida rat (rSey): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant*. Differentiation, 1994. **57**(1): p. 31-8.
152. Collinson, J.M., R.E. Hill, and J.D. West, *Different roles for Pax6 in the optic vesicle and facial epithelium mediate early morphogenesis of the murine eye*. Development, 2000. **127**(5): p. 945-56.
153. Callaerts, P., G. Halder, and W.J. Gehring, *PAX-6 in development and evolution*. Annu Rev Neurosci, 1997. **20**: p. 483-532.
154. Dahl, E., H. Koseki, and R. Balling, *Pax genes and organogenesis*. Bioessays, 1997. **19**(9): p. 755-65.
155. Relaix, F. and M. Buckingham, *From insect eye to vertebrate muscle: redeployment of a regulatory network*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3171-8.

156. Quinn, J.C., et al., *Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism*. Dev Biol, 2007. **302**(1): p. 50-65.
157. Epstein, J., et al., *Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes*. J Biol Chem, 1994. **269**(11): p. 8355-61.
158. Balling, R., U. Deutsch, and P. Gruss, *undulated, a mutation affecting the development of the mouse skeleton, has a point mutation in the paired box of Pax 1*. Cell, 1988. **55**(3): p. 531-5.
159. Tassabehji, M., et al., *Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene*. Nature, 1992. **355**(6361): p. 635-6.
160. Vogan, K.J., et al., *The splotch-delayed (Spd) mouse mutant carries a point mutation within the paired box of the Pax-3 gene*. Genomics, 1993. **17**(2): p. 364-9.
161. Treisman, J., E. Harris, and C. Desplan, *The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein*. Genes Dev, 1991. **5**(4): p. 594-604.
162. 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**(4): p. 463-71.
163. Carriere, C., et al., *Nuclear localization signals, DNA binding, and transactivation properties of quail Pax-6 (Pax-QNR) isoforms*. Cell Growth Differ, 1995. **6**(12): p. 1531-40.
164. Kang, Y., H. Yuan, and Y. Li, *[A novel mutation of the PAX6 gene identified in a northeastern Chinese family with congenital aniridia.]*. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2008. **25**(2): p. 172-5.
165. Kawano, T., et al., *Three novel mutations of the PAX6 gene in Japanese aniridia patients*. J Hum Genet, 2007. **52**(7): p. 571-4.
166. Ramirez-Miranda, A. and J.C. Zenteno, *PAX6 gene intragenic deletions in Mexican patients with congenital aniridia*. Mol Vis, 2006. **12**: p. 318-23.
167. Glaser, T., D.S. Walton, and R.L. Maas, *Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene*. Nat Genet, 1992. **2**(3): p. 232-9.
168. Hanson, I.M., et al., *Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peters' anomaly*. Nat Genet, 1994. **6**(2): p. 168-73.
169. Hill, R.E., et al., *Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene*. Nature, 1991. **354**(6354): p. 522-5.
170. Matsuo, T., et al., *A mutation in the Pax-6 gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells*. Nat Genet, 1993. **3**(4): p. 299-304.
171. Schedl, A., et al., *Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities*. Cell, 1996. **86**(1): p. 71-82.

172. Pineda, D., et al., *Searching for the prototypic eye genetic network: Sine oculis is essential for eye regeneration in planarians*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4525-9.
173. Jean, D., G. Bernier, and P. Gruss, *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**(1-2): p. 31-40.
174. Kawakami, K., et al., *Identification and expression of six family genes in mouse retina*. FEBS Lett, 1996. **393**(2-3): p. 259-63.
175. Kawakami, K., et al., *Structure, function and expression of a murine homeobox protein AREC3, a homologue of Drosophila sine oculis gene product, and implication in development*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(2): p. 303-10.
176. Drivenes, O., H.C. Seo, and A. Fjose, *Characterisation of the promoter region of the zebrafish six7 gene*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1491**(1-3): p. 240-7.
177. Seo, H.C., O. Drivenes, and A. Fjose, *A zebrafish Six4 homologue with early expression in head mesoderm*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1442**(2-3): p. 427-31.
178. Cheyette, B.N., et al., *The Drosophila sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system*. Neuron, 1994. **12**(5): p. 977-96.
179. Serikaku, M.A. and J.E. O'Tousa, *sine oculis is a homeobox gene required for Drosophila visual system development*. Genetics, 1994. **138**(4): p. 1137-50.
180. 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**(12): p. 4045-55.
181. Oliver, G., et al., *Homeobox genes and connective tissue patterning*. Development, 1995. **121**(3): p. 693-705.
182. Seimiya, M. and W.J. Gehring, *The Drosophila homeobox gene optix is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism*. Development, 2000. **127**(9): p. 1879-86.
183. Leppert, G.S., J.M. Yang, and O.H. Sundin, *Sequence and location of SIX3, a homeobox gene expressed in the human eye*. Ophthalmic Genet, 1999. **20**(1): p. 7-21.
184. Seo, H.C., et al., *Expression of two zebrafish homologues of the murine Six3 gene demarcates the initial eye primordia*. Mech Dev, 1998. **73**(1): p. 45-57.
185. Oliver, G., et al., *Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3*. Mech Dev, 1996. **60**(2): p. 233-9.
186. Lagutin, O., et al., *Six3 promotes the formation of ectopic optic vesicle-like structures in mouse embryos*. Dev Dyn, 2001. **221**(3): p. 342-9.
187. Seo, H.C., et al., *Six class homeobox genes in drosophila belong to three distinct families and are involved in head development*. Mech Dev, 1999. **83**(1-2): p. 127-39.
188. Bovolenta, P., et al., *Expression pattern of cSix3, a member of the Six/sine oculis family of transcription factors*. Mech Dev, 1998. **70**(1-2): p. 201-3.

189. Loosli, F., et al., *Six3, a medaka homologue of the Drosophila homeobox gene sine oculis is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye.* Mech Dev, 1998. **74**(1-2): p. 159-64.
190. Lopez-Rios, J., et al., *Six9 (Optx2), a new member of the six gene family of transcription factors, is expressed at early stages of vertebrate ocular and pituitary development.* Mech Dev, 1999. **83**(1-2): p. 155-9.
191. Lopez-Rios, J., et al., *Six3 and Six6 activity is modulated by members of the groucho family.* Development, 2003. **130**(1): p. 185-95.
192. Toy, J. and O.H. Sundin, *Expression of the optx2 homeobox gene during mouse development.* Mech Dev, 1999. **83**(1-2): p. 183-6.
193. Kaufman, M.H., *The atlas of mouse development.* 1992, London ; San Diego: Academic Press. xvi, 512 p.
194. Li, X., et al., *Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation.* Science, 2002. **297**(5584): p. 1180-3.
195. Gallardo, M.E., et al., *Genomic cloning and characterization of the human homeobox gene SIX6 reveals a cluster of SIX genes in chromosome 14 and associates SIX6 hemizyosity with bilateral anophthalmia and pituitary anomalies.* Genomics, 1999. **61**(1): p. 82-91.
196. Schmahl, W., et al., *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, 1993. **86**(2): p. 126-35.
197. Sherr, C.J., *The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited.* Cancer Res, 2000. **60**(14): p. 3689-95.
198. Halder, G., et al., *Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during Drosophila compound eye development.* Development, 1998. **125**(12): p. 2181-91.
199. Bonini, N.M., et al., *The Drosophila eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates.* Development, 1997. **124**(23): p. 4819-26.
200. Shen, W. and G. Mardon, *Ectopic eye development in Drosophila induced by directed dachshund expression.* Development, 1997. **124**(1): p. 45-52.
201. Heanue, T.A., et al., *Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation.* Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3231-43.
202. Weasner, B., C. Salzer, and J.P. Kumar, *Sine oculis, a member of the SIX family of transcription factors, directs eye formation.* Dev Biol, 2007. **303**(2): p. 756-71.
203. Wilson, D.S., et al., *High resolution crystal structure of a paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA.* Cell, 1995. **82**(5): p. 709-19.
204. Jun, S. and C. Desplan, *Cooperative interactions between paired domain and homeodomain.* Development, 1996. **122**(9): p. 2639-50.
205. Hayashi, S. and M.P. Scott, *What determines the specificity of action of Drosophila homeodomain proteins?* Cell, 1990. **63**(5): p. 883-94.

206. Mikkola, I., et al., *Superactivation of Pax6-mediated transactivation from paired domain-binding sites by dna-independent recruitment of different homeodomain proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4109-18.
207. Ostrin, E.J., et al., *Genome-wide identification of direct targets of the Drosophila retinal determination protein Eyeless*. Genome Res, 2006. **16**(4): p. 466-76.
208. Hirota, J. and P. Mombaerts, *The LIM-homeodomain protein Lhx2 is required for complete development of mouse olfactory sensory neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8751-5.
209. Theiler, K., *The house mouse : atlas of embryonic development*. 1989, New York: Springer-Verlag. 178 p.

Annexe I: Accord des Coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du programme

Marie-Pier Champagne

M.Sc. Biologie Moléculaire

2. Description de l'article

The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation.

Nicolas Tétreault[‡], Marie-Pier Champagne[‡], and Gilbert Bernier

[‡]Les auteurs ont contribués de façon égale à l'article

Article soumis dans la revue « Development » le 21 août 2008

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Marie-Pier Champagne** inclue cet article dans **son mémoire de maîtrise** qui a pour titre **Analyse des cibles transcriptionnelles de Lhx2 et Pax6 dans le contexte des cellules souches rétiniennes**.

Coauteur

Signature

Date

Annexe II: Analyse bioinformatique

Tableau II. Résultats d'analyse bioinformatique des sites potentiels de liaison de facteurs de transcription contenus dans la première séquence conservée entre l'humain et la souris en amont du gène *Six6* à l'aide du logiciel MattInspector de Genomatix.

Family/matrix	Further Information	Position	Str.	Core sim.	Matrix sim.	S (red: capitals:
		from - to				
V\$AP4R/LYL1_E12.0_1	LYL1-E12 heterodimeric complex	5 - 21	(-)	1.000	0.824	tttcacAGATcttc
V\$EVI1/EVI1.04	Ecotropic viral integration site 1 encoded factor, amino-terminal zinc finger domain	9 - 25	(+)	0.750	0.733	aa gatctgtgaaAA
V\$GKLF/GKLF.01	Gut-enriched Krueppel-like factor	21 - 33	(+)	1.000	0.862	aataatcAGGG
V\$NFKB/CREL.01	c-Rel	28 - 40	(+)	1.000	0.970	tcagggttTTCCg
V\$CREB/ATF2.01	Activating transcription factor 2	29 - 49	(-)	1.000	0.914	tcgttcTGACgga
V\$PERO/PPARA.01	PPAR/RXR heterodimers	46 - 66	(-)	1.000	0.718	tgagtgcagggtAA
V\$PAX6/PAX4_PD.0_1	PAX4 paired domain binding site	57 - 75	(+)	1.000	0.949	cctGCACtcagg
V\$OAZF/ROAZ.01	Rat C2H2 Zn finger protein involved in olfactory neuronal differentiation	58 - 74	(+)	1.000	0.781	ctGCACtcaggc
V\$PAX8/PAX8.01	PAX 2/5/8 binding site	61 - 73	(+)	0.850	0.924	cacTCAGgcggtg
V\$EBOX/SREBP.01	Sterol regulatory element binding protein 1 and 2	67 - 81	(-)	1.000	0.951	agaTCACaccac
V\$AP4R/TAL1BETA_E47.01	Tal-1beta/E47 heterodimer	93 - 109	(-)	1.000	0.960	tagcaCAGAtgg
V\$NEUR/NEUROG.01	Neurogenin 1 and 3 (ngn1/3) binding sites	95 - 107	(+)	1.000	0.925	caaCCATctgtgc
V\$GATA/GATA2.02	GATA-binding factor 2	103 - 115	(-)	1.000	0.910	gataGATAgcac
V\$HOXC/HOX_PBX_01	HOX/PBX binding sites	104 - 120	(-)	0.833	0.841	aggcAGATagat
V\$GATA/GATA1.03	GATA-binding factor 1	107 - 119	(-)	1.000	0.958	ggcaGATAgata
V\$HOXC/PBX_HOX_A9.01	PBX - HOXA9 binding site	119 - 135	(+)	1.000	0.817	cttcTGATtactc
V\$HOXF/HOXA9.01	Member of the vertebrate HOX - cluster of homeobox factors	120 - 136	(-)	1.000	0.871	gattgagtaAATC
V\$TEAF/HLF.01	Hepatic leukemia factor	123 - 139	(-)	1.000	0.877	acagattgaGTAA
V\$APIF/API.02	Activator protein 1	125 - 135	(-)	1.000	0.889	attGAGTaat
V\$GREF/GRE.01	Glucocorticoid receptor, C2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GREs	146 - 164	(+)	0.818	0.855	cgcatacaacgtGT
V\$MYT1/MYT1.01	MyT1 zinc finger transcription factor involved in primary neurogenesis	151 - 163	(+)	0.750	0.800	acaACGTgtactt
V\$TTF1/TTF1.01	Thyroid transcription factor-1 (TTF1) binding site	155 - 169	(-)	1.000	0.934	agtatCAAGtaca
V\$EVI1/EVI1.02	Ecotropic viral integration site 1 encoded factor, amino-terminal zinc finger domain	171 - 187	(+)	1.000	0.869	aa gaaAAGAcag
V\$PAX6/PAX6.01	Pax-6 paired domain binding site	193 - 211	(-)	1.000	0.804	ggTTCAtccctga
V\$PAX6/PAX6.01	Pax-6 paired domain binding site	196 - 214	(+)	1.000	0.795	aaTTCAGgggatg
V\$MOKF/MOK2.02	Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	197 - 217	(+)	1.000	0.982	attcagggatgaaC
V\$NR2F/COUP.01	COUP antagonizes HNF-4 by binding site competition or synergizes by direct protein - protein interaction with HNF-4	201 - 221	(-)	0.952	0.853	cagacgacaagGT