

Université de Montréal

**Caractérisation moléculaire du rôle de Lhx2 dans le
développement de l'œil et du cerveau**

par

Nicolas Tétreault

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en Biologie Moléculaire

Décembre, 2010

© Nicolas Tétreault, 2010

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Caractérisation moléculaire du rôle de Lhx2 dans le développement de l'œil et du cerveau

Présentée par :
Nicolas Tétreault

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Muriel Aubry, président-rapporteur
Dr Gilbert Bernier, directeur de recherche
Dre Euridice Carmona, membre du jury
Dre Madeleine Carreau, examinateur externe
Dr Richard Bertrand, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le développement du système nerveux central (SNC) chez les vertébrés est un processus d'une extrême complexité qui nécessite une orchestration moléculaire très précise. Certains gènes exprimés très tôt lors du développement embryonnaire sont d'une importance capitale pour la formation du SNC. Parmi ces gènes, on retrouve le facteur de transcription à Lim homéodomaine *Lhx2*. Les embryons de souris mutants pour *Lhx2* (*Lhx2*^{-/-}) souffrent d'une hypoplasie du cortex cérébral, sont anophtalmiques et ont un foie de volume réduit. Ces embryons mutants meurent *in utero* au jour embryonnaire 16 (e16) dû à une déficience en érythrocytes matures. L'objectif principal de cette thèse est de caractériser le rôle moléculaire de *Lhx2* dans le développement des yeux et du cortex cérébral. *Lhx2* fait partie des facteurs de transcription à homéodomaine exprimé dans la portion antérieure de la plaque neurale avec *Rx*, *Pax6*, *Six3*. Le développement de l'oeil débute par une évagination bilatérale de cette région. Nous démontrons que l'expression de *Lhx2* est cruciale pour les premières étapes de la formation de l'oeil. En effet, en absence de *Lhx2*, l'expression de *Rx*, *Six3* et *Pax6* est retardée dans la plaque neurale antérieure. Au stade de la formation de la vésicule optique, l'absence de *Lhx2* empêche l'activation de *Six6* (un facteur de transcription également essentiel au développement de l'œil). Nous démontrons que *Lhx2* et *Pax6* coopèrent en s'associant au promoteur de *Six6* afin de promouvoir sa trans-activation. Donc, *Lhx2* est un gène essentiel pour la détermination de l'identité rétinienne au niveau de la plaque neurale. Plus tard, il collabore avec *Pax6* pour établir l'identité rétinienne définitive et promouvoir la prolifération cellulaire. De plus, *Lhx2* est fortement exprimé dans le télencéphale, région qui donnera naissance au cortex cérébral. L'absence de *Lhx2* entraîne une diminution de la prolifération des cellules progénitrices neurales dans cette région à e12.5. Nous démontrons qu'en absence de *Lhx2*, les cellules progénitrices neurales (cellules de glie radiale) se différencient prématurément en cellules progénitrices intermédiaires et en neurones post-mitotiques. Ces phénotypes sont corrélés à une baisse d'activité de la voie Notch. En absence de *Lhx2*, *DNER* (un ligand atypique de la voie Notch) est fortement surexprimé dans le télencéphale. De plus, *Lhx2* et des co-répresseurs s'associent à la chromatine de la région promotrice de *DNER*. Nous concluons que *Lhx2* permet l'activation de la voie Notch dans le cortex cérébral en développement en inhibant la transcription de *DNER*, qui est un inhibiteur de la voie Notch dans ce contexte particulier. *Lhx2* permet ainsi la maintenance et la prolifération des cellules progénitrices neurales.

Mots-clés : rétino-génèse, neuro-génèse, vésicule optique, télencéphale, cellules souches/progénitrices neurales, voie Notch, DNER, Pax6, Lhx2

Abstract

Central nervous system (CNS) development in vertebrates is an extremely complex process that requires tight molecular control. Some very early expressed genes during embryonic development are of tremendous importance for CNS development. Among those, we find the LIM homeodomain protein Lhx2. Embryos that lack Lhx2 (*Lhx2*^{-/-}) suffer from cerebral cortex hypoplasia, are anophthalmic and have smaller liver. The mutant embryos die *in utero* at embryonic day 16 (e16) due to a deficit in mature erythrocytes. The principal objective of this thesis was to characterize the molecular function of Lhx2 in eye and cerebral cortex development. Lhx2 is a part of the homeodomain transcription factors expressed in the anterior neural plate along with *Rx*, *Pax6* and *Six3*. Eye development starts by a bilateral evagination of this region. We show here that *Lhx2* expression is crucial for the first steps of eye formation. Indeed, in absence of Lhx2, *Rx*, *Six3* and *Pax6* expression is delayed in the anterior neural plate. At the optic vesicle stage, Lhx2 mutation precludes the initiation of *Six6* expression (an homeodomain transcription factor essential for eye development). We demonstrate that Lhx2 and Pax6 bind to *Six6* promoter and cooperate for its trans-activation. So, *Lhx2* is essential for retinal identity determination in the neural plate. Later on, it cooperates with Pax6 to establish definitive retinal identity and promote cell proliferation. *Lhx2* is strongly expressed in the telencephalon, the embryonic region that will give rise to cerebral cortex. *Lhx2* ablation causes a decrease in neural progenitor cells proliferation in this region. We show that the lack of Lhx2 causes a premature differentiation of the radial glia cells into intermediate progenitors and post-mitotic neurons. These phenotypes correlate with a decrease activity of the Notch pathway. In *Lhx2*^{-/-} telencephalon, the atypical Notch-ligand DNER is strongly overexpressed. Furthermore, Lhx2 and co-repressors associate at the *DNER* promoter region. We conclude that Lhx2 allows Notch pathway activation in the developing cerebral cortex. It does so by inhibiting DNER transcription, which is a Notch pathway repressor in this particular context. Thus, Lhx2 allows the maintenance and the proliferation of neural progenitor cells.

Keywords: Retinogenesis, neurogenesis, optic vesicle, telencephalon, neural stem cells/progenitors, Notch pathway, Pax6, Lhx2

Table des Matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTES DES FIGURES	VIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XII
REMERCIEMENTS.....	XX
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION: SECTION 1.....	1
EMBRYOGÉNÈSE ET CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES	1
1.1.1 LA GASTRULATION	3
1.1.2 INDUCTION NEURALE	4
1.1.3 APPARITION DE LA PLAQUE NEURALE ET NEURULATION	5
1.1.4. LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES.....	7
INTRODUCTION: SECTION 2.....	9
DÉVELOPPEMENT DU NÉOCORTEX ET CELLULES SOUCHES NEURALES	9
1.2.1 MORPHOGÉNÈSE DU TÉLENCÉPHALE.....	10
1.2.2 VOIES DE SIGNALISATIONS IMPLIQUÉES	11
1.2.3 NOMENCLATURE DES CELLULES SOUCHES NEURALES EMBRYONNAIRES.....	15
1.2.4 LES DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES SOUCHES NEURALES.....	16

1.2.5	LES CELLULES SOUCHES NEURALES ADULTES	20
1.2.6	ISOLATION ET CULTURE DES CELLULES SOUCHES NEURALES - L'ESSAI NEUROSPHÈRES	22
INTRODUCTION: SECTION 3		24
CONTRÔLE MOLÉCULAIRE DES CELLULES SOUCHES NEURALES		24
1.3.1	LA VOIE WNT, SONIC HEDGEHOG ET LA FAMILLE SOX	25
1.3.2	LE RÔLE PRIMORDIAL DE LA VOIE NOTCH DANS LE CONTRÔLE DE LA NEUROGÉNÈSE	26
1.3.3	LES MUTATIONS DE LA VOIE NOTCH	30
1.3.4	LES LIGANDS NON-CANONIQUES	32
INTRODUCTION: SECTION 4		38
DÉVELOPPEMENT DE L'OEIL ET CELLULES SOUCHES RÉTINIENNES		38
1.4.1	LA MORPHOGÉNÈSE DE L'OEIL	39
1.4.2	LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION EXPRIMÉS DANS LE CHAMP RÉTINIEN	41
1.4.3	LES CELLULES SOUCHES RÉTINIENNES	47
1.4.4	RÉGULATION DE LA BALANCE PROLIFÉRATION VERSUS DIFFÉRENCIATION	52
INTRODUCTION: SECTION 5		57
LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION À HOMÉODOMAINE ET LHX2		57
1.5.1	LES PROTÉINES AVEC LIM HOMÉODOMAINE	58
1.5.2	FONCTIONS DES PROTÉINES AVEC LIM HOMÉODOMAINE	62
1.5.3	LHX2: FONCTIONS DANS L'HÉMATOPOÏÈSE ET DANS LE DÉVELOPPEMENT DU SNC	66
INTRODUCTION: SECTION 6		72
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS		72
1.6.1	HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	73

1.6.2 OBJECTIFS DE RECHERCHE	74
CHAPITRE 2	77
ARTICLE #1	77
THE LIM HOMEBOX TRANSCRIPTION FACTOR LHX2 IS REQUIRED TO SPECIFY THE RETINA FIELD AND SYNERGISTICALLY COOPERATES WITH PAX6 FOR SIX6 TRANS- ACTIVATION	77
ABSTRACT	79
INTRODUCTION	80
MATERIALS AND METHODS	84
RESULTS	89
<i>LHX2</i> DEMARCATES THE PRESUMPTIVE RETINA FIELD	89
<i>LHX2</i> IS REQUIRED TO INITIATE <i>Six3</i> , <i>Rx</i> AND <i>Pax6</i> EXPRESSION WITHIN THE RETINA FIELD	90
<i>LHX2</i> IS REQUIRED FOR <i>Six6</i> EXPRESSION IN THE OPTIC VESICLE	91
LHX2 AND PAX6 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>	92
<i>LHX2</i> IS REQUIRED FOR <i>Six6</i> EXPRESSION IN RETINAL PROGENITOR/STEM CELLS	93
<i>PAX6</i> IS REQUIRED FOR <i>Six6</i> EXPRESSION IN RETINAL PROGENITOR/STEM CELLS	96
LHX2 AND PAX6 CAN SYNERGISTICALLY ACTIVATE <i>Six6</i> EXPRESSION IN RETINAL STEM CELLS	96
DISCUSSION	98
REFERENCES	102
FIGURE LEGENDS	108
CHAPITRE 3	120
ARTICLE #2	120

LHX2 PROMOTES NOTCH ACTIVATION AND RADIAL GLIA CELL MAINTENANCE DURING CORTICAL DEVELOPMENT	120
ABSTRACT	122
INTRODUCTION	123
MATERIALS AND METHODS.....	127
RESULTS.....	132
LHX2 IS REQUIRED FOR NOTCH SIGNALING IN THE MOUSE OPTIC VESICLE	132
LHX2 REGULATES PROGENITOR CELL SELF-RENEWAL AND NOTCH SIGNALING.	134
PREMATURE NEUROGENESIS IN TELENCEPHALIC VESICLES OF LHX2 MUTANTS	135
LOSS OF RADIAL GLIA IN THE NEOCORTEX OF LHX2 MUTANTS	136
DNER IS INITIALLY EXPRESSED IN NE PROGENITORS AT E9.5	138
DNER IS OVEREXPRESSED IN THE NEOCORTEX OF LHX2 MUTANTS.....	139
LHX2 REPRESSES <i>DNER</i> EXPRESSION, WHICH NEGATIVELY MODULATES NOTCH SIGNALING	140
DISCUSSION.....	144
LHX2 IS REQUIRED FOR NORMAL NOTCH ACTIVATION IN EMBRYONIC RETINAL PROGENITORS	144
LHX2 AND THE MAINTENANCE OF RADIAL GLIA CELLS IN THE TELENCEPHALON.....	145
LHX2 CONTROLS NOTCH PATHWAY ACTIVATION	147
REFERENCES	149
FIGURE LEGENDS	156
CHAPITRE 4.....	169
DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS.....	169
LHX2 ET RX SONT LES PREMIERS DÉTERMINANTS DU FUTUR CHAMP RÉTINIEN.	171
INTERRELATION ENTRE LES DÉTERMINANTS DU CHAMP RÉTINIEN.	172
COLLABORATION ENTRE LHX2 ET PAX6 POUR LA TRANS-ACTIVATION DE <i>Six6</i>.	174

LHX2 ET LE CONTRÔLE DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES SOUCHES/PROGÉNITRICES	
RÉTINIENNES EMBRYONNAIRES.....	175
LHX2 EST REQUIS POUR L'ACTIVATION NORMALE DE LA VOIE NOTCH DANS LES PROGÉNITEURS	
RÉTINIENS.....	179
LHX2 CONTRÔLE LE MAINTIEN DES CELLULES DE GLIE RADIALE DANS LE TELENCÉPHALE.....	181
LHX2 CONTRÔLE L'ACTIVATION DE LA VOIE NOTCH EN INHIBANT L'EXPRESSION DU LIGAND	
ATYPIQUE DNER.....	184
RÔLE DE DNER DANS LE NÉOCORTEX.....	186
CONCLUSION.....	189
RÉFÉRENCES.....	191
ANNEXE 1.....	225

Liste des tableaux

Tableau I.I	Tableau descriptif des phénotypes neuronaux associés aux différents gènes mutés de la voie Notch	72
Tableau I.II	Tableau des principales molécules impliquées dans la formation de l'oeil embryonnaire	73
Tableau II.I	Comparative gene expression between WT and $Lhx2^{-/-}$ e9.0 forebrain..	109
Tableau III.I	Large scale comparative gene expression analysis of WT and $Lhx2^{-/-}$ embryos	158

Listes des figures

- Fig 1.1** Représentation schématique des premières étapes du développement embryonnaire menant à la gastrulation3
- Fig 1.2** Représentation graphique de la formation de la plaque neurale qui mènera à la formation du tube neural6
- Fig 1.3** Cartographie de la plaque neurale d'un embryon de poulet au stade embryonnaire de 4-6 somites et de 7-8 somites11
- Fig 1.4** Les facteurs impliqués dans la régionalisation dorso-ventrale du télencéphale13
- Fig 1.5** Les divisions dorso-ventrale du télencéphale et les facteurs délimitants ces régions14
- Fig 1.6** Représentation schématique des différents progéniteurs neuraux présents dans le télencéphale17
- Fig 1.7** Diagramme illustrant les différentes divisions des cellules souches neurales et de leur destiné au cours du développement du SNC19

Fig 1.8	Les origines possibles des cellules souches neurales périventriculaires adultes	21
Fig 1.9	Modèle illustrant la lignée des cellules souches neurales de l'embryon à l'adulte	22
Fig 1.10	La voie de signalisation Notch chez les mammifères	28
Fig 1.11	Mécanisme de base de la voie Notch canonique versus la voie Notch non-canonique	33
Fig 1.12	Représentation schématique de l'homologie structurelle existant entre DNER et Delta1, Jagged1 et Notch1	35
Fig 1.13	Représentation graphique des différentes étapes du développement de l'oeil chez les vertébrés	40
Fig 1.14	Composition de la rétine mature des mammifères	48
Fig 1.15	Intégration des signaux intrinsèques et extrinsèques lors de la division cellulaire	55
Fig 1.16	Classification phylogénétique des différentes protéines à LIM homéodomaine	60

Fig 1.17	Représentation des différents co-facteurs connus s'associant avec les protéines à LIM homéodomaine	61
Fig 1.18	Analyse morphométrique comparative de la région du cerveau antérieur des embryons de type sauvage et <i>Lhx2</i> mutants	69
Fig 2.1	<i>Lhx2</i> is expressed in the visual system and demarcates the retina field...	110
Fig 2.2	<i>Lhx2</i> is required for <i>Six3</i> , <i>Rx</i> and <i>Pax6</i> expression in the retina field, as revealed by <i>in situ</i> hybridization	111
Fig 2.3	<i>Lhx2</i> is required for <i>Six6</i> expression in the optic vesicle	112
Fig 2.4	<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>	113
Fig 2.5	<i>Lhx2</i> is required for <i>Six6</i> expression in retinal progenitor/stem cells.....	114
Fig 2.6	<i>Pax6</i> is required for <i>Six6</i> expression in retinal progenitor/stem cells.....	115
Fig 2.7	<i>Lhx2</i> and <i>Pax6</i> can synergistically activate <i>Six6</i> expression in retinal progenitor/stem cells	117
Fig 3.1	<i>Lhx2</i> is required for normal <i>Notch1</i> and <i>Musashi</i> expression in the optic vesicle	159

- Fig 3.2** Lhx2 mutation affects Notch pathway in vitro and causes a loss of self-renewal potential and neural stem cell markers160
- Fig 3.3** Lhx2 mutation causes precocious neurogenesis in the telecephalic vesicle of e10.5 embryos161
- Fig 3.4** The balance between normal proliferation and neurogenesis is disrupted in the e12.5 telencephalon in absence of Lhx2162
- Fig 3.5** DNER is expressed in the embryonic neocortex and enriched in the CNS in the newborn mouse163
- Fig 3.6** Lhx2 controls the proliferation of progenitors/stem cells of the CNS by modulating DNER expression164
- Fig 3.7** Lhx2 repress DNER transcription and is an activator of the Notch pathway in neural progenitors165

Liste des sigles et abréviations

Abréviation	Signification
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AP1	Adaptor Complex Protein 1
Aph1	Anterior Pharynx Defective
ARN	Acide Ribonucléique
ASC	Achaete-scute
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
Blbp	Brain Lipid Binding Protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	Bromodeoxyuridine
C	Cornea
C/I	Ciliary body and Iris
CBF1	Centromere Binding Factor 1
CD133	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin Dependant Kinase
CDKI	Cyclin Dependant Kinase Inhibitor
Cdt1	Chromatin Licensing and DNA Replication Factor 1
CGR	Cellule de Glie Radiale

ChIP	Chromatine Immunoprecipitation
Chx10	Ceh-10 homeodomain containing homolog
CNS	Central Nervous System
CRP	Cysteine Rich Protein
CSE	Cellule Souche Embryonnaire
CSL	CBF1/RBP-jk, Su(H), Lag-1
Cux	Cut-like homeobox
Dlk	Delta-like homolog
Dll	Delta-like
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNER	delta/notch-like EGF repeat containing
DOS	Dorsal Optic Stalk
DP	Dimerization Partner
DSL	Delta/Serrate/Lag-2
E(spl)m β	Enhancer of split
E2F	E2F transcription factor
EGF	Epidermal Growth Factor
Emx2	Empty spiracles homeobox 2
EPR	Epithelium Pigmenté Rétinien
FGF	Fibroblast Growth Factor
FoxA2	Forkhead box A2

FoxG1	Forkhead box G1B
GBM	Glioblastoma
GCL	Ganglion Cell Layer
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green Fluorescent Protein
Glast	Glutamate Aspartate Transporter
Gli3	Gli family zinc finger 3
gp130	GlycoProtein 130
GR	Glial Radiale
Gsh2	GS homeobox 2
HDAC	Histone Deacetylase
Herp	Hes Related repressor Protein
Hes	Hairy and Enhancer of Split
Hox	Homeobox
HP	Heterochromatin Protein
INL	Inner Nuclear Layer
IP	Intermediate Progenitors
Isl-1	Islet-1
Jag	Jagged
Ki67	Antigen Ki67
Ldb	LIM domain binding

LE	Lens Ectoderm
LF	Lens Fiber
Lgl1	Lethal giant larvae 1
LH	LIM Homeodomain
Lhx2	LIM homeobox
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LIM	Lin11, Isl-1 et Mec-3
Lin11	Abnormal cell LINEage
Lmx	LIM hox
loxP	locus of X-over P1
LP	Lens Placode
LV	Lateral Ventricule
M	Mesenchyme
MAG	Myelin-Associate Glycoprotein
MAML	Mastermind Like Protein
Mash1	Mammalian Achaete-Scute Homolog 1
Math	Mammalian atonal homolog
Mec-3	Mechanosensory abnormality
mib1	Minb bomb 1
Mitf	Microphthalmia-associated transcription factor
MLP	Muscle LIM Protein

MSP	Methylation Specific PCR
Myc	myelocytomatosis
NBT	Nitro Blue Tetrazolium Chloride
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NE	Neuroepithelium
NGF	Nerve Growth Factor
Ngn	Neurogenin
NICD	Notch1 Intracellular Domain
Nkx2.2	NK2 transcription factor related, locus 2
NR	Neural Retina
NSCL	Neuronal Stem Cell Leukemia
Numbl	Numb Like
ON	Optic Nerve
ONL	Outer Nuclear Layer
OP	Optic Pit
Otx	Orthodenticle homeobox
OV	Optic Vesicle
Pax	Paired box
PB	Progeniteur Basal
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

PEST	Protine/Glutamic acid/Serine/Threonine
PH3	Phosphorylated Histone H3
PI	Progéniteur Intermédiaire
PLE	Presumptive Lens Ectoderm
PNR	Presumptive Neural Retina
POS	Presumptive ventral Optic Stalk
POU	Pit-1/Oct-1, Oct-2/Unc-86
PS1/2	Presenilin 1/2
PTPzeta	Protein-Tyrosin Phosphatase zeta
RA	Retinoic Acid
RAM	Regulation of Amino Acid Metabolism
RBPJ	Recombination signal binding protein IG kappa J
RGC	Radial Glia Cell
RING	Really Interesting New Gene
RLIM	RING finger LIM domain-binding protein
RNA	Ribonucleic Acid
RPE	Retinal Pigmented Epithelium
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
Rx	Retinal homeobox
SCF	Stem Cell Factor
Sey	Small eye

Shh	Sonic Hedgehog
Six	Sine oculis homeobox homolog
SNC	Système Nerveux Central
Sox	SRY (sex determining region Y)-box
SSEA-1	Stage-Specific Embryonic Antigen
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SVZ	Subventricular Zone
Tbr2	T-brain gene 2
TGF β	Transforming Growth Factor beta
Vax	Ventral homeobox
VL	Ventricule latéral
VO	Vésicule Optique
VOS	Ventral Optic Stalk
VZ	Ventricular Zone
WISH	Whole Mount In Situ Hybridization
Wnt	Wingless and Int
WT	Wild Type
ZSV	Zone Subventriculaire
ZV	Zone Ventriculaire

À ma famille et mes amis

Remerciements

Tout d'abord, je désire remercier le Dr Gilbert Bernier de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir proposé un projet si motivant. De par sa patience et son sens critique, il a su diriger mes études de façon très efficace. Son esprit de synthèse et son indéniable talent pour poser des hypothèses pertinentes m'ont permis d'effectuer des études doctorales productives. Ce fut un plaisir d'être étudiant dans le laboratoire du Dr Gilbert Bernier.

Un grand merci à mes collègues, qui sont aussi devenus mes amis. Merci à Marie-Pier Champagne, qui a été d'une aide essentielle à la publication de mon premier article. Merci à Sabrina Facchino et Jida ElHajjar pour leur énergie débordante contagieuse. Merci au Dr Mohamed Abdouh pour son aide précieuse, ses conseils réfléchis et sa disponibilité constante. Merci à mon "frère" scientifique et ami Wassim Chatoou pour tous les divertissements et l'aide immense qu'il m'a apporté tout au long de mon doctorat.

De plus, j'aimerais remercier mes amis qui ont été d'un grand soutien tout au long de mes études. Ils ont été sources de distractions essentielles et bien dosé pour la réussite d'un doctorat.

Finalement, je tiens à remercier profondément ma famille pour leur soutien inconditionnel et leurs encouragements répétés et très appréciés. Vous avez toujours été là dans les moments difficiles pour me remonter le moral. Votre support a été essentiel au succès de ce doctorat. Un merci spécial à ma copine Isabelle Louarn pour sa compréhension et d'avoir accepté de me partager avec la science pendant tout ce temps!

Chapitre 1

Introduction: Section 1

Embryogénèse et cellules souches embryonnaires

Le chapitre 1 est une revue de littérature divisée en 5 sections. La première section concerne l'embryogénèse chez les eucaryotes et traite des cellules souches embryonnaires. La seconde section explique le développement du néocortex et traite des différents types de cellules souches/progénitrices neurales. La troisième section présente les principales voies moléculaires impliquées dans le contrôle des cellules souches/progénitrices neurales. La quatrième section porte sur la morphogénèse de l'oeil et décrit les cellules souches rétinienne. Finalement, la dernière section concerne les facteurs de transcription à LIM homéodomaine et plus particulièrement Lhx2.

1.1.1 La gastrulation

Lors du développement des eucaryotes, après la fertilisation qui mènera à la formation du blastocyste, se déclenche un processus d'une importance capitale nommé gastrulation. Cette étape de l'embryogénèse a pour fonction d'établir les bases pour la morphogénèse subséquente de l'embryon. Chez la souris, le début de la gastrulation est marqué par la formation d'une structure embryonnaire transitoire nommé « Primitive Streak ». Suite à l'apparition de cette structure, la polarité antéro-postérieure devient évidente (Figure 1). Ultimement, la gastrulation mènera à la formation des 3 feuillets germinaux primaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme [1].

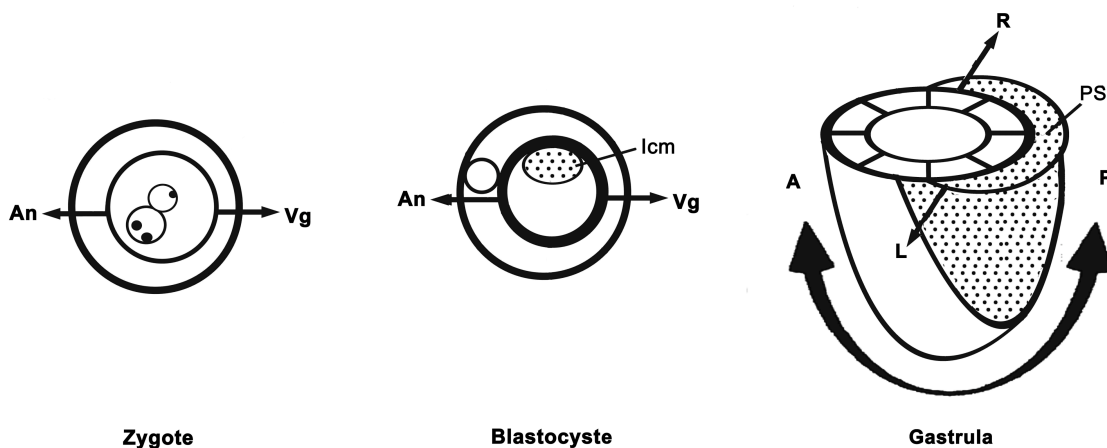


Figure 1. Représentation schématique des premières étapes du développement embryonnaire menant à la gastrulation. Suite à l'implantation, d'important changement de taille et de forme s'opère dans le blastocyste. À la fin de la gastrulation, après l'apparition du "primitive streak", l'établissement de l'axe antéro-postérieur devient évident. (An) Animal, (Vg) Végétal, (Icm) Inner cell mass, (PS) Primitive Streak. Adapté de Patrick P.L. Tam et Richard R. Behringer. (1997) *Mech Dev.* 68 : 3-25

Les différents feuillets germinaux sont formés suite au contact des épiblastes (cellules primitives initialement présentes dans le blastocyste) avec différents gradients de morphogènes présents dans le « Primitive Streak ». Bien que l'induction des feuillets germinaux ne soit pas complètement comprise, certains facteurs ont été identifiés comme étant des régulateurs critiques dans ce processus. Les voies de signalisation Wnt, Nodal et BMP y jouent un rôle primordial via leur activation ou inactivation régionale [2]. Suite à la modulation de ces différentes voies, les 3 feuillets germinaux primaires sont formés. Plus tard, au cours du développement, le mésoderme donnera naissance aux organes internes, à l'exception du système nerveux et des organes des systèmes digestif et respiratoire. L'endoderme formera la majorité du système digestifs et respiratoire. Finalement, l'ectoderme (dérivé germinal sur lequel portera le focus de notre étude) donnera naissance à la peau (dérivés épidermaux) et au système nerveux central (SNC).

1.1.2 Induction neurale

Les premières révélations de l'induction neurale dans l'ectoderme viennent des travaux pionniers de Spemann et Mangold en 1924. Ils ont démontré que lorsque la lèvre dorsale du blastopore est mise en contact avec une partie de l'ectoderme qui normalement donne naissance à la peau (ectoderme ventrale), il y a formation de tissus neuronaux. Cette région du gastrula sera plus tard nommée « organisateur de Spemann » [3]. Suite aux travaux de Spemann et Mangold, il a longtemps été considéré que l'ectoderme se développe par défaut vers la lignée épidermale. En effet, la partie ventrale de l'ectoderme qui ne reçoit habituellement pas ces signaux se transforme en peau. Toutefois, certaines

données plus récentes ont démontré que l'induction neurale est plutôt la voie par défaut [4]. En effet, ces expériences ont démontrées que lorsque les cellules d'un embryon au stade primitif sont dissociées et placées en culture pour une longue période, les cellules adoptent un phénotype de cellules neurales (présence du marqueur NCAM et morphologie neurale) [5-7]. De plus, une explication mécanistique de cette induction neurale par défaut est venue d'expériences utilisant un dominant négatif d'un récepteur de type II de l'activin. Ce dominant négatif inhibe l'action de l'activin et d'autres ligands de la famille TGF β . L'injection de ce récepteur mutant dans le pôle animal résulte en la formation de tissus neuraux [4]. Donc, l'inhibition de l'activin ou de ligands semblables permet l'induction neurale et ce, sans signaux venant de l'organisateur de Spemann. Il fut donc proposé que l'organisateur ne fournit pas de signaux instructifs, mais permet plutôt l'inhibition de la voie TGF- β , permettant ainsi la transformation de l'ectoderme en tissus neuraux [3, 8].

1.1.3 Apparition de la plaque neurale et neurulation

La formation du SNC débute donc par la spécification des cellules ectodermes dorsales vers une destinée neurale, qui donneront naissance à tout le SNC [9]. La spécification de ces cellules nécessite l'action combinée de Chordin, Noggin et Follistatin. Ces protéines sont produites par le mésoderme sous-jacent à l'ectoderme dorsal et sont nécessaires à l'inhibition de la voie TGF- β [10]. Suite à l'induction neurale, il y a formation de la plaque neurale. L'apparition de cette structure débute par l'épaississement apico-basal de l'ectoderme, qui mène à la formation d'une placode. Suit alors l'apparition des replis

neuraux (neural folds) qui vont s'élever et créer le sillon neural qui deviendra la lumière du tube neural primitif (Figure 2) une fois que les replis neuraux auront fusionnés [11].

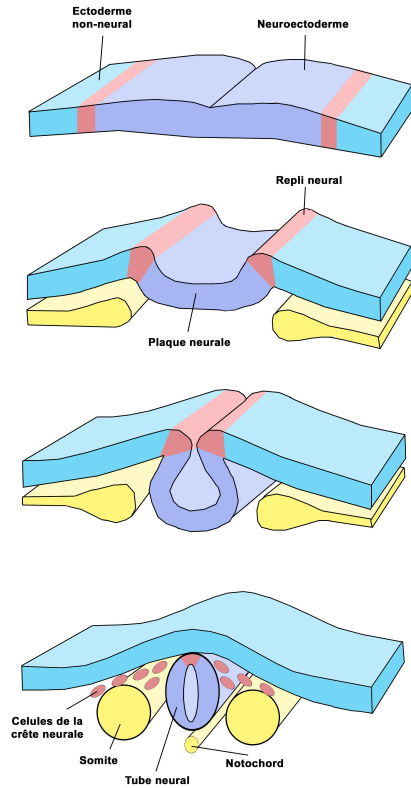


Figure 2. Lors de la neurulation, les replis neuraux (rouge) s'élèvent et se rejoignent ce qui entraîne la plaque neurale (mauve) à se replier en forme de tube. Le système nerveux central sera formé à partir de ce tube neural. Adapté de Gammill L.S. and Bronner-Fraser M. (2003) Nat Rev Neurosci 10: 795-805.

Avant la fermeture complète du tube neural, sa régionalisation est déjà amorcée. Dans la région la plus antérieure du tube neural se forme 3 vésicules primaires : le cerveau antérieur (proscéphale), le cerveau médian (mésencéphale) et le cerveau postérieur (rhombencéphale) [9].

1.1.4. Les cellules souches embryonnaires

La compréhension du phénomène de gastrulation et l'identification des voies de signalisations impliquées dans ce processus ont été facilitées par la manipulation *in vitro* des cellules souches embryonnaires (CSE). Étant donné que les CSE sont des cellules primitives de l'embryon, les événements menant à l'apparition des différents feuillettes embryonnaires devraient être les mêmes que ceux *in vitro*. Les découvertes ainsi faites ont pu être directement transposées à l'embryogénèse. Les premières lignées de cellules SE de souris ont été établies en 1981 par 2 groupes indépendants [12, 13]. Les CSE sont isolées à partir de la masse interne du blastocyste. Elles sont dites pluripotentes ; elles peuvent générer tous les tissus de l'organisme, mis à part les composantes extra-embryonnaires telles le placenta, généré par le trophoctoderme. De plus, les CSE ont la capacité d'effectuer des divisions cellulaires sans se différencier et peuvent générer des cellules filles pluripotentes identiques à la cellule mère. Cette propriété est nommée auto-renouvellement [14, 15]. Les CSE ont été initialement cultivées sur une monocouche de cellules nourricières (fibroblastes) dans un milieu contenant du sérum [13]. Des expériences subséquentes ont démontré qu'il est possible de maintenir ces cellules dans un état pluripotent en utilisant un milieu sans sérum supplémenté, entre autres, avec du LIF (Leukemia Inhibitory Factor) et des protéines de la famille BMP (Bone Morphogenetic Proteins). Le LIF signale via le récepteur gp130 pour recruter l'activateur transcriptionnel STAT3 qui va permettre la transcription de Myc, qui est essentiel pour l'auto-renouvellement des CSEs. Les BMPs activent la transcription des protéines Id qui inhibent la différenciation [16, 17]. Suite à l'isolation et à la culture des cellules souches embryonnaires murines, les efforts afin d'établir des lignées stables humaines portèrent

fruit. En 1998, Thompson et al. réussirent à établir 5 lignées de cellules souches embryonnaires humaines [18]. L'établissement de lignées de CSE humaines ouvrait ainsi la porte aux possibilités de thérapies par transplantation cellulaire. Aussi, l'isolation de CSE humaines était très importante afin d'étudier le développement humain d'un point de vue purement scientifique. Bien que similaires sur plusieurs points, les CSE murines diffèrent tout de même à certains niveaux. Premièrement, les CSE humaines ne sont pas dépendantes du LIF pour leur prolifération et le maintien de leur pluripotence [19]. Deuxièmement, les CSEs humaines, contrairement aux CSEs murines, sont capables de se transformer en trophoblastes [18]. Finalement, des différences dans la biologie des télomérases existent entre les 2 espèces [20]. Donc, pour ces raisons, il faut être prudent dans l'extrapolation des données accumulées avec les CSEs murines [21]. Toutefois, les barrières éthiques et l'accessibilité réduite des lignées de CSE humaines font des CSE murines un modèle de choix pour l'étude de la biologie du développement et de la mise au point des techniques de thérapie cellulaire.

Chapitre 1

Introduction: Section 2

Développement du néocortex et cellules souches neurales

1.2.1 Morphogénèse du télencéphale

Suite à l'induction neurale et à la neurulation, le prosencéphale apparaît. Plus tard au cours du développement, cette structure va se diviser en 2 principales structures embryonnaires: le télencéphale et le diencéphale. Notre attention sera portée ici sur le télencéphale. Cette structure est formée de deux vésicules résultant de l'évagination du cerveau antérieur et constitue la structure la plus complexe et la plus divergente chez les mammifères. Les principales structures du télencéphale sont le pallium (le cortex cérébral chez les mammifères) et le sub-pallium (les noyaux gris centraux). Chez les humains, les composantes de cette structure sont le siège de la conscience, du langage, du contrôle moteur et des émotions [22]. Le télencéphale dérive des cellules placées à la marge rostrale de la plaque neurale. Bien que certaines différences soient apparentes dans la cartographie de la plaque neurale de différentes espèces, les précurseurs télencéphaliques sont généralement placés de façon rostrale et latérale aux futurs yeux (Figure 3A). Cette position anatomique place le futur télencéphale à la marge de la portion antérieure de la plaque neurale. Les précurseurs télencéphaliques sont donc soumis à des voies de signalisation qui régulent le patron antéro-postérieur et dorso-ventral du tissu neural [22].

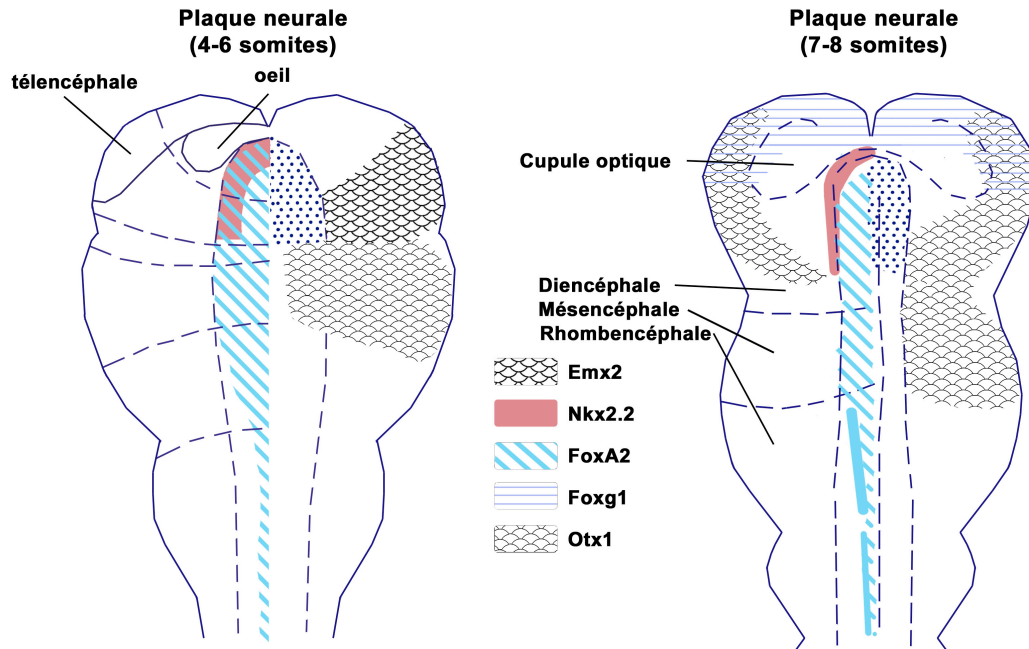


Figure 3. Cartographie de la plaque neurale d'un embryon de poulet au stade embryonnaire de 4-6 somites et de 7-8 somites. Les régions donnant naissance à l'oeil et au télencéphale sont indiquées ainsi que les facteurs de transcription jouant un rôle critique dans la formation du télencéphale. Adapté de John L. R. Rubenstein (1998) *Annu. Rev. Neurosci.* 21:445–77.

1.2.2 Voies de signalisations impliquées

Malgré l'immense complexité du cerveau des mammifères supérieurs, la formation du télencéphale débute par un simple feuillet de cellules neuroépithéliales dans la portion antérieure de la plaque neurale. Suite à la spécification de ces cellules, le primordium du télencéphale est établi. Chez la souris, cet événement se produit vers le stade embryonnaire e8.5 et est déterminé par l'initiation de l'expression du facteur de transcription à « forkhead » *FoxG1* [23]. Immédiatement après l'induction de *FoxG1*, le

télocéphale est subdivisé en régions distinctes. Le premier événement qui distinguera la région dorsale de la région ventrale du télencéphale est l'expression de *Gli3* et *Shh*. *Gli3* encode un facteur de transcription à doigt de zinc exprimé initialement dans tout le primordium du télencéphale et dont l'expression diminue progressivement dans la région ventrale (figure 4) [24, 25]. En absence de *Gli3*, la formation du télencéphale dorsale est compromise ; le plexus choroïde, le ourlet cortical (cortical hem) et l'hippocampe ne se forment pas [26, 27].

Sonic Hedgehog (*Shh*) est une protéine sécrétée exprimée au niveau de la ligne médiane de la plaque neurale [28]. Les embryons *Shh*^{-/-} présentent un télencéphale réduit en volume et les types cellulaires ventraux sont perdus [29]. Il fut démontré que *Shh* restreint l'expression de *gli3* et contrôle le positionnement de la frontière dorso-ventrale du télencéphale. En effet, on observe un sauvetage des types cellulaires ventraux chez les doubles mutants *Shh*^{-/-} et *Gli3*^{-/-} [30]. *Shh* promeut donc la ventralisation du télencéphale en inhibant la dorsalisation pouvant être créée par *Gli3* [25].

Le fait que les cellules ventrales acquièrent leur identité dans la double mutation *Shh*^{-/-} et *Gli3*^{-/-} indique que des facteurs autres que *Shh* peuvent conférer cette identité ventrale. Parmi les autres facteurs, *FoxG1* est probablement la source principale de régulateur positif pour l'identité cellulaire ventrale. Pour ce faire, *FoxG1* régule la signalisation impliquant les Fibroblast Growth Factors (*Fgf*). *FoxG1* contrôle l'expression de *Fgf8* et une boucle de rétroaction positive existe entre les deux [31].

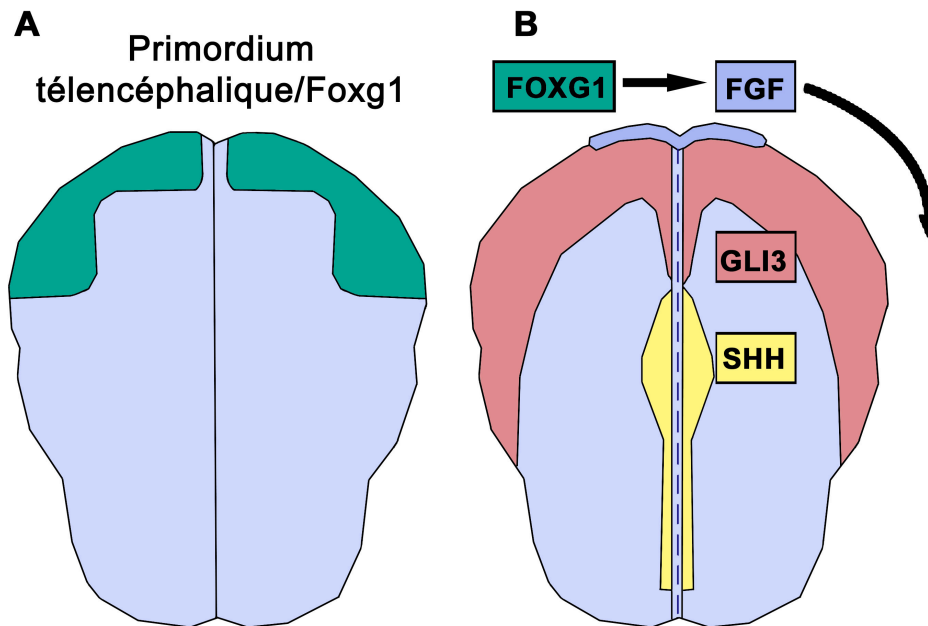


Figure 4. Les facteurs impliqués dans la régionalisation dorso-ventrale du télencéphale chez l'embryon de souris. La région qui deviendra le télencéphale est définie par l'expression du facteur *Foxg1* (vert). La régionalisation par la suite implique FGF (bleu), GLI3 (rouge) et SHH (jaune). Adapté de Jean M. Hébert et Gord Fishell (2008). Nature Review. Volume 9:678-685.

La signalisation avec les Fgf est essentielle, tout comme Shh, pour la génération des cellules ventrales du télencéphale [32] [33]. En effet, chez les embryons *Fgf8* hypomorphes et mutants homozygotes, les précurseurs ventraux sont déplétés et la taille du néocortex est diminuée [32]. Donc, la voie de signalisation Fgf, comme dans d'autres tissus, joue un rôle d'organisateur dans le SNC [34].

La limite dorso-ventrale (pallium-subpallium) est bien établie dans le télencéphale. À l'origine de cette démarcation, on retrouve le facteur de transcription à « paired box » Pax6. Ce facteur de transcription est originalement exprimé dans toute l'ébauche

télocéphalique au stade de la plaque neurale. Au stade du tube neural, son expression est diminuée dans la partie ventrale. On voit alors l'expression de Nkx2.1 augmenter dans cette région. Vers le stade e9.5, la région exprimant Pax6 et Nkx2.1 devient séparée par une région exprimant Gsh2 (Figure 5). Nkx2.1 et Gsh2 sont deux protéines comprenant un homeodomaine et jouent un rôle essentiel dans le patterning du télencéphale [35]. Le résultat est donc une séparation nette du pallium et du sub-pallium par l'intersection entre Pax6 et Gsh2. De plus, Pax6 joue un rôle dans la dorsalisation du télencéphale en collaborant avec un Gli3, via un autre facteur de transcription à homéodomaine. Ce facteur, Emx2, serait génétiquement en aval de Gli3 [36].

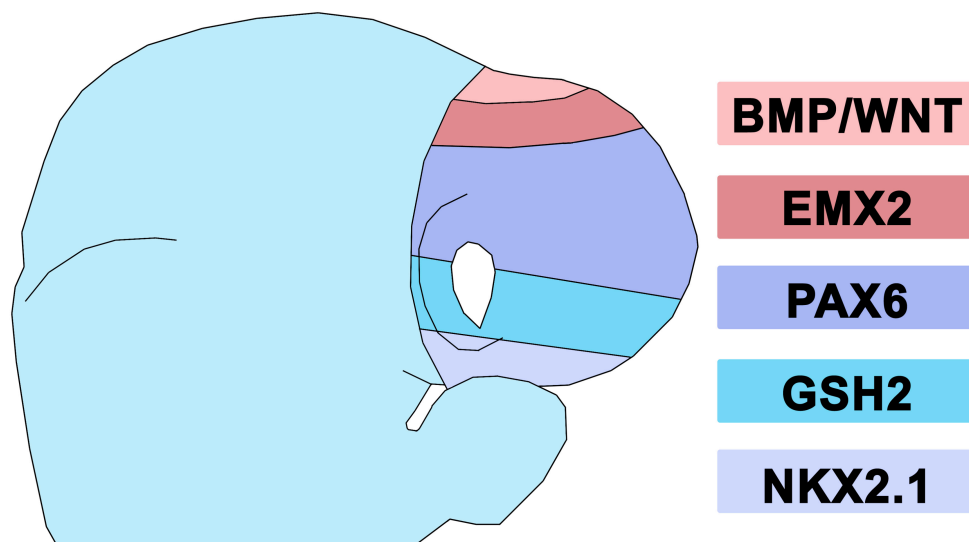


Figure 5. Les divisions dorso-ventrale du télencéphale et les facteurs délimitants ces régions. Au stade e9.5-e10, le télencéphale dorsal et ventral se sépare en 4 domaines distincts définis par l'expression des protéines représentées. Adapté de Jean M. Hébert et Gord Fishell (2008). Nature Review. Volume 9:678-685

Donc, tous les facteurs présentés ici sont centraux à la morphogénèse normale du télencéphale. La complexité et l'importance de ces interactions mettent en évidence la plus grande complexité sous-jacente du développement télencéphalique. La morphogénèse doit se faire de concert avec la spécification et la prolifération des précurseurs télencéphaliques. Ces cellules proviennent d'une population de cellules souches neurales primitives nommées cellules neuroépithéliales. Ces cellules suivent une évolution très précise et ordonnée qui mènera à l'extrême diversité et complexité du néocortex.

1.2.3 Nomenclature des cellules souches neurales embryonnaires

Lors du développement, les cellules souches neurales donneront naissance à tous les neurones du SNC. Elles sont aussi la source de deux types de cellules macrogliales du SNC : les astrocytes et les oligodendrocytes [37]. Les cellules souches neurales se distinguent des CSEs par leur potentiel plus restreint. En effet, ces cellules sont multipotentes ; elles ne peuvent donner naissance qu'aux neurones, astrocytes et oligodendrocytes [38]. Ces cellules peuvent effectuer l'auto-renouvellement de façon symétrique (la division de la cellule mère donne naissance à deux cellules filles identiques) ou asymétrique (la division donne naissance à une cellule fille identique à la cellule mère et à une cellule différente) [39]. À noter qu'un certain débat entoure la nomenclature des cellules souches neurales. En effet, certains auteurs rejettent le terme « cellules souches neurales » et contestent l'existence de cellules souches dans le SNC [40, 41]. En argumentant que ces cellules sont capables d'auto-renouvellement pour

seulement un nombre limité de passages, ces auteurs les qualifient de cellules souches/progénitrices neurales [42]. Toutefois, nous considérerons ici les deux termes comme équivalents et utiliserons la nomenclature choisie par les différents auteurs cités.

1.2.4 Les différents types de cellules souches neurales

Les cellules neuroépithéliales

Les cellules souches neurales les plus primitives sont les cellules neuroépithéliales (NE). Ces cellules composent le neuroépithélium dont sont faits la plaque neurale et le tube neural. Ce neuroépithélium pseudostratifié est situé en bordure des ventricules latéraux du néocortex en développement et est polarisé de façon apico-basale. Un phénomène de migration nucléaire interkinétique caractérise ces cellules (Figure 6). En effet, le noyau des cellules NE migre le long de l'axe apico-basal lors du cycle cellulaire. Le noyau se retrouve à la surface basale lors de la phase G1 et à la surface apicale lors de la phase G2 et c'est à cette surface que la mitose se produit exclusivement. Avant le début de la neurogénèse, cette couche de cellules NE forme la zone ventriculaire (ZV) [43]. À cette période, les cellules NE ont un mode de division symétrique prolifératif (la cellule mère donne naissance à deux cellules NE identiques) [44]. Après le début de la neurogénèse, le mode de division devient préférentiellement asymétrique, ce qui génère une cellule NE et une cellule plus différenciée (cellule progénitrice ou neurone). Les cellules NE peuvent être notamment identifiées par les marqueurs moléculaires Nestin [45] et prominin-1 (CD133) [46].

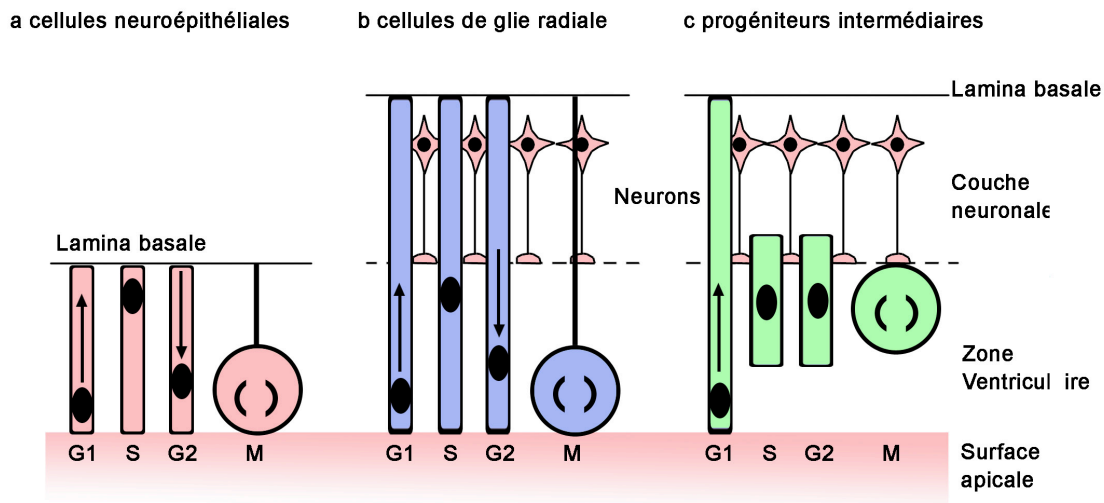


Figure 6. Représentation schématique des différents progéniteurs neuraux présents dans le télencéphale. Les cellules neuroépithéliales, les cellules de glie radiale et les progéniteurs intermédiaires sont organisées de façon polaire. Les progéniteurs intermédiaires se distinguent par le fait que la mitose se fait dans la partie basale de la zone ventriculaire. Adapté de Magdalena Götz et Wieland B. Huttner (2005). *Nat Reviews Molecular Cell Biology* 6, 777-788.

Les cellules de glie radiale

Avec le début de la neurogénèse, le neuroépithélium change et devient un tissu comportant plusieurs couches cellulaires. Les cellules NE se transforment en cellules de glie radiale (CGR), qui ont une destinée cellulaire plus restreinte que les cellules NE [47, 48]. La couche de cellules la plus apicale qui bordent le ventriculaire forme toujours la ZV. Cette région contient la majorité du corps cellulaire des progéniteurs [42]. Les CGR ont des caractéristiques résiduelles des cellules NE (expression de Nestin et Vimentin et polarité apico-basale), mais présentent également des caractéristiques astrogliales tel que

l'expression de GFAP (seulement dans le cortex des primates), BLBP et GLAST [49, 50]. De plus, les CGR démontrent également une migration nucléaire interkinétique, bien qu'étant plus restreinte que les cellules NE. Les CGR possèdent une morphologie bipolaire caractéristique : le corps cellulaire touche à la partie apicale et une croissance radiale s'étend jusqu'à la surface piaie. Les jonctions adhérentes à la portion apicale des CGR sont essentielles au maintien de l'intégrité de la ZV et de la polarité des CGR. Ces jonctions sont dépendantes de l'action de Numb et Numbl, qui maintiennent l'intégrité des complexes de cadherins [51]. Les CGR ont initialement été considérées comme servant d'échafaudage à la migration des neurones nouvellement formés [52]. Toutefois, on sait aujourd'hui que ces cellules sont mitotiquement actives et qu'elles représentent une population de cellules souches neurales [53, 54]. Chez la souris, la transition cellules NE vers CGR a lieu entre les jours embryonnaires 10 (E10) et E12. Les CGR s'auto-renouvellent de façon asymétrique et génère ainsi une cellule fille identique et une cellule plus différenciée ou un neurone [55]. La majorité des neurones dans le cerveau dérivent directement ou indirectement des CGR [56, 57]. Notons que les deux types cellulaires discutés ici sont groupés sous le terme « progéniteurs apicaux » dû au fait qu'ils ne se divisent que lorsque le noyau atteint la surface apicale [43].

Les progéniteurs basaux ou intermédiaires

Après le début de la neurogénèse, suite à la division asymétrique de CGR, apparaît un type cellulaire à la destinée plus restreinte: les progéniteurs intermédiaires (PI) ou basaux (PB). Ces cellules délaminent de la membrane apicale, transloquent leur noyau dans la

région basale de la ZV et rétractent leur extension apicale et basale. Plus tard, au cours de la phase neurogénique, ces cellules forment la zone subventriculaire (ZSV) [58] et sont présentes en très grand nombre dans le télencéphale [59]. La ZSV est considérée comme un site important de neurogénèse. En effet, durant la phase de neurogénèse active, les PI de la ZSV se divisent majoritairement de façon symétrique et produisent ainsi deux cellules neuronales [60]. De plus, les PB sont aussi capable de division symétrique proliférative, ce qui permet d'accroître le pool de PI dans la ZSV (Figure 7). On estime la fréquence de ce type de division à 10% des divisions des PB [58, 59]. Les PI sont caractérisés par l'expression des régulateurs transcriptionnels Tbr2 [61], Cux1 et Cux2 [62].

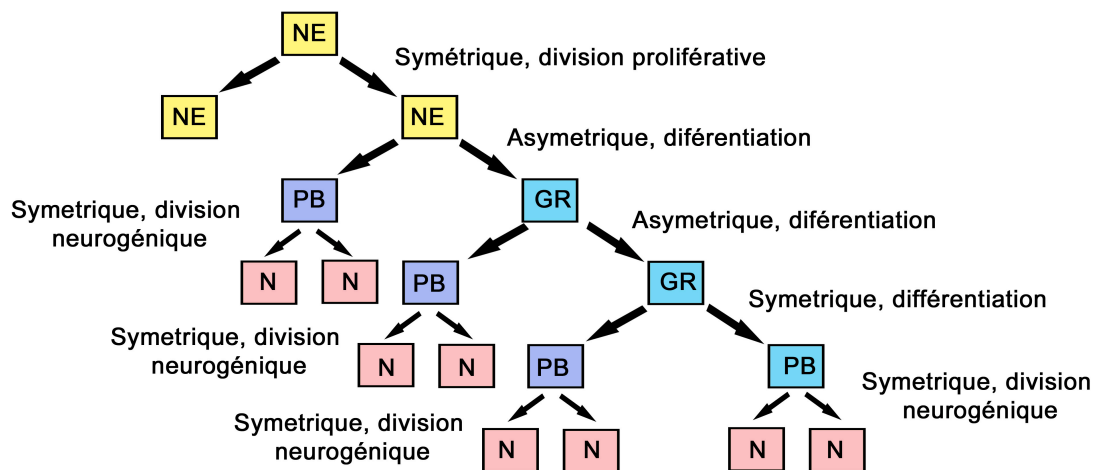


Figure 7. Diagramme illustrant les différentes divisions des cellules souches neurales et de leur destinée au cours du développement du SNC. (NE) Neuroépithéliales, PB (Progéniteurs Basaux), GR (Glie Radiale), (N) Neurone. Adapté de Magdalena Götz et Wieland B. Huttner (2005). *Nat Reviews Molecular Cell Biology* 6, 777-788.

1.2.5 Les cellules souches neurales adultes

Dans le SNC en développement, les deux zones germinales que sont la ZV et la ZSV vont générer la majorité des neurones et des cellules macrogliales. Plus le développement procède, plus la ZV diminue de taille au profit de la ZSV qui devient le site principal de la neurogénèse [63, 64]. Il est généralement admis que chez le mammifère adulte, la ZV devient un épithélium non-prolifératif composé de cellules épendymaires alors que la ZSV demeure une zone mitotiquement active [65]. L'idée de l'existence de cellules souches neurales multipotentes dans le cerveau des mammifères adultes date d'il y a longtemps [66]. Toutefois, il a fallu attendre la démonstration que ces cellules possèdent les caractéristiques classiques des cellules souches *in vitro* (multipotentialité et auto-renouvellement) pour que cette idée soit finalement acceptée [67]. Ces cellules souches neurales résident dans au moins deux différentes niches : la zone périventriculaire et la zone sub-granulaire de l'hippocampe du cerveau antérieur adulte des mammifères. Les cellules de la zone périventriculaire donnent naissance aux cellules gliales [68] et aux neuroblastes qui migrent et deviennent des interneurones dans le bulbe olfactif [69] et les cellules de la zone sub-granulaire deviennent des neurones qui s'intègrent à la couche granulaire de l'hippocampe [70]. Déterminer si les cellules souches neurales adultes proviennent de la ZSV ou de la ZV des ventricules du cerveau antérieur adulte (Figure 8) fut le départ d'une controverse concernant leur origine et leur identité [65].

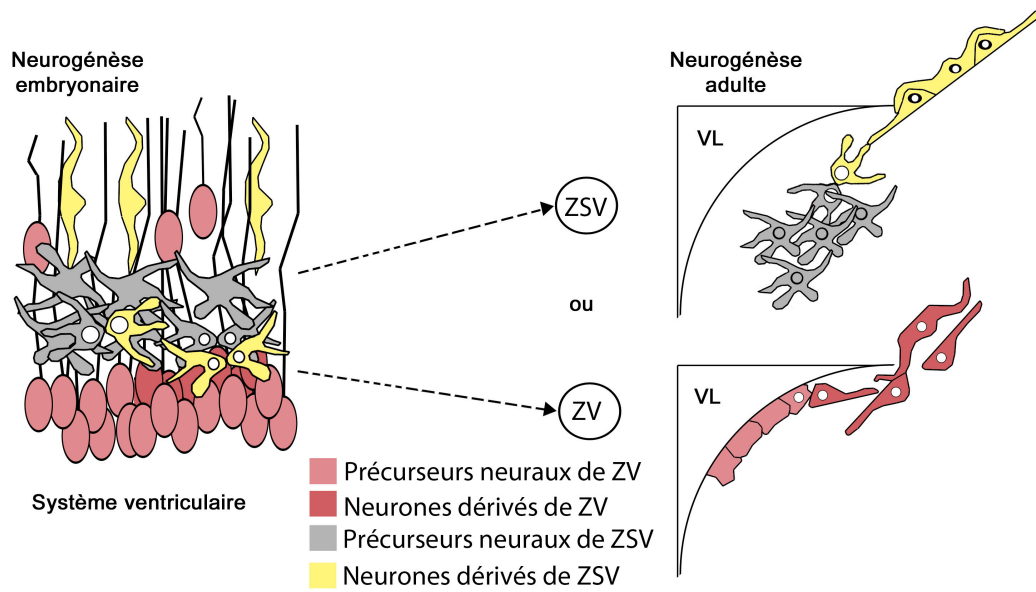


Figure 8. Les origines possibles des cellules souches neurales périventriculaires adultes. Les cellules souches neurales adultes pourraient provenir des précurseurs de la zone ventriculaire ou de la zone subventriculaire. (ZSV) Zone subventriculaire, (ZV) Zone ventriculaire, (VL) Ventricule latéral. Adapté de Andrew K. Chojnacki, Gloria K. Mak and Samuel Weiss (2009). *Nature Reviews Neuroscience*. Volume 10, 153-163.

Initialement, il fut suggéré que les cellules souches neurales adultes périventriculaires étaient des cellules de la ZSV [69, 71]. Toutefois, une étude ultérieure suggéra que ces cellules étaient en fait des cellules épendymaires de la ZV [72]. Ces cellules rencontraient toutes les caractéristiques des cellules souches et furent donc identifiées comme étant les cellules souches du SNC adulte. Toutefois, une étude plus convaincante révéla que ces cellules étaient en fait des cellules de la ZSV exprimant GFAP [73]. Il est donc aujourd'hui généralement accepté de parler des astrocytes (GFAP+) de la ZSV comme étant des cellules souches neurales périventriculaires adultes (Figure 9) pouvant générer

de nouvelles cellules qui migrent jusqu'au bulbe olfactif et qui se différencient en neurones [65].

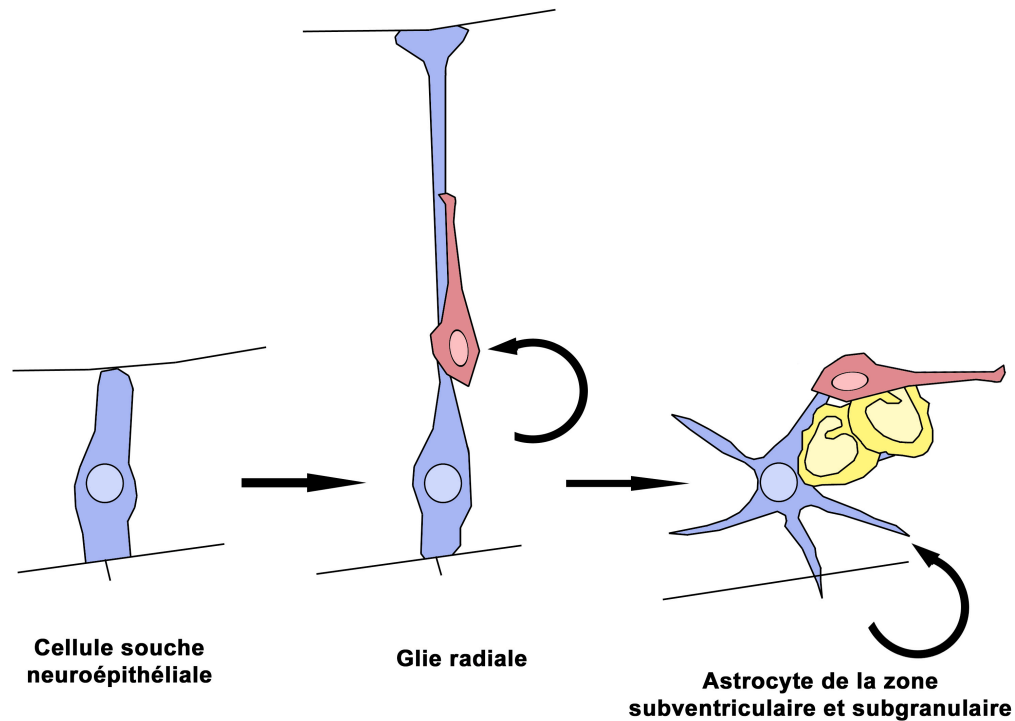


Figure 9. Modèle illustrant la lignée des cellules souches neurales de l'embryon à l'adulte. Les cellules neuroépithéliales se transforment en cellules de glies radiales qui peuvent devenir des cellules souches neurales adultes qui ont des caractéristiques astrocytaires. Adapté de Fiona Doetsch (2003). *Nature Neuroscience* Volume 6, 1127-1134.

1.2.6 Isolation et culture des cellules souches neurales - L'essai neurosphères

L'étude des cellules souches neurales embryonnaires et adultes requiert l'utilisation de techniques *in vitro* permettant l'isolement, la purification et l'expansion de ces cellules [74]. Décrite pour la première fois en 1992 par Reynolds et Weiss, l'essai neurosphères permet l'isolation des cellules souches du SNC embryonnaire et adulte [67, 75]. L'idée

derrière l'essai neurosphère est que chaque cellule capable de former une neurosphère est une cellule souche neurale. En effet, chaque cellule à l'intérieur de la neurosphère peut subir un passage (auto-renouvellement) et peut se différencier en astrocytes, oligodendrocytes et neurones (multipotence). La structure sphéroïde appelée neurosphère est un amas de cellules produisant leur propre molécules de matrice extra-cellulaire et leur propre facteur de croissance [76]. La structure tri-dimensionnelle des neurosphères permet de recréer une niche, ce qui permet aux cellules de se retrouver dans un environnement plus physiologique. Cet essai a définitivement été d'une importance capitale dans l'investigation de la présence de cellules souches neurales embryonnaires et adultes [77, 78]. Toutefois, certaines précautions doivent être prises lors de l'étude des cellules souches neurales à l'aide de cette méthode. Bien que l'activité d'une cellule souche neurale peut être détecté via cette méthode, l'investigateur doit être conscient que la formation d'une neurosphère n'égale pas nécessairement la présence d'une cellule souche. En effet, les conditions de culture peuvent aussi permettre la prolifération des progéniteurs. Donc, la discrimination cellule souche neurale versus progéniteur neural doit se faire sur les bases de la taille des colonies, de la multipotence et du nombre de passages effectués [79].

Chapitre 1

Introduction: Section 3

Contrôle moléculaire des cellules souches neurales

1.3.1 La voie Wnt, Sonic Hedgehog et la famille Sox

Afin de générer le nombre impressionnant de neurones et cellules gliales dans le SNC mature (estimé à 100-200 milliards de neurones et 10 fois plus de cellules gliales [60]), la prolifération et le maintien de l'état non-différencié des cellules souches neurales doivent être rigoureusement balancés avec leur engagement dans la voie de différenciation. La voie de signalisation Wnt est en partie responsable de ce contrôle. L'utilisation de souris transgéniques conditionnelles pour β -Catenin (le composant central de la voie Wnt canonique) démontre que cette voie contrôle la prolifération des cellules souches neurales en influençant la décision de proliférer ou de se différencier. En effet, la masse de la moelle épinière et du cerveau est diminuée en absence de β -Catenin. De plus, chez les souris exprimant une forme constitutivement active de β -Catenin, la masse de la moelle épinière et du cerveau est augmenté [80].

Une autre voie moléculaire qui influence les cellules souches neurales est la voie impliquant Sonic Hedgehog (Shh). En plus de son rôle dans la morphogénèse du télencéphale discuté plus haut, Shh joue un rôle important dans le contrôle du comportement des cellules souches neurales du télencéphale en développement. Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la surexpression de Shh chez l'embryon de souris résulte en une hypertrophie de la région télencéphalique, soulignant donc son implication dans la balance prolifération versus neurogénèse [81-84].

Les gènes de la famille Sox (Sox1, Sox2 et Sox3) exercent également un contrôle sur les cellules souches du SNC. Parmi cette famille, Sox2 est l'un des premiers facteurs de transcription à être exprimé dans le cerveau en développement [85]. L'expression

constitutive de Sox2 inhibe la différenciation neuronale et permet le maintien des caractéristiques de cellules souches neurales, alors que son inhibition mène à une neurogénèse prématurée [86, 87]. De plus, la délétion conditionnelle de *Sox2* dans les cellules souches neurales à l'aide de souris exprimant la Cre-Recombinase sous le contrôle du promoteur nestin permet d'observer dans ces embryons une perte des cellules souches neurales et un élargissement des ventricules latéraux. L'important rôle de Sox2 dans le maintien des cellules souches neurales du cerveau en développement est donc sans ambiguïté [88].

1.3.2 Le rôle primordial de la voie Notch dans le contrôle de la neurogénèse

De toutes les voies moléculaires contrôlant les cellules souches neurales embryonnaires identifiées, la mieux caractérisée est la voie de signalisation Notch. Le rôle de cette voie de signalisation a été initialement étudié chez la drosophile où plusieurs études ont démontré son rôle dans l'inhibition de la différenciation via une signalisation latérale [89, 90]. Chez les mammifères, la voie Notch a été efficacement étudiée à l'aide de mutants pour les différentes protéines impliquées dans cette voie, incluant les récepteurs, les ligands, les modulateurs et les effecteurs. Généralement, ces pertes de fonctions ont résulté en une augmentation de la différenciation neuronale et une perte du pool de cellules souches neurales, ce qui a mené à la théorie que la voie Notch maintient l'état de cellules souches [91].

Fortement active dans le SNC en développement, cette voie moléculaire permet la communication sur une courte distance entre les cellules. En effet, la transmission du

signal requiert le contact physique entre les cellules dans la très grande majorité des cas. L'activation de la voie Notch débute lorsqu'une cellule en différenciation exprimant les ligands canoniques Delta ou Jagged contacte une cellule souche exprimant des récepteurs Notch. Les ligands canoniques sont encodés par les gènes de la famille Delta/Serrate/Jag-2 (DSL) [92]. Les récepteurs Notch et les ligands de la famille DSL sont, pour la grande majorité, des protéines transmembranaires à passage unique de type I avec un domaine extracellulaire consistant en répétition EGF-like en tandem pouvant aller jusqu'à un nombre de 36 [93, 94]. Suite à cette interaction et à un clivage protéolytique impliquant des métalloprotéases et des complexes γ -sécrétase contenant Presenilin 1, Presenilin 2, Nicastrin et Aph1 [95], la partie intracellulaire du récepteurs Notch (NICD) est relâchée de la membrane et est transloquée au noyau où elle convertit le complexe répresseur CBF1 (aussi appelé CSL ou RBP-J) en un complexe activateur [91]. Une importante régulation post-transcriptionnelle impliquant les protéines Musashi1 et Numb permet de moduler cette étape [96]. Musashi1 est une protéine liant l'ARN et qui est fortement exprimée dans les cellules souches neurales [97]. Son expression diminue plus la différenciation neuronale progresse [98]. Musashi1 régule la translocation nucléaire de NICD. En effet, Musashi1 s'associe à la partie 3' non-transcrite de l'ARNm de Numb, ce qui réprime sa transcription [96] et empêche son activité d'ubiquitination sur NICD [99]. En empêchant l'action de Numb, Musashi1 permet donc le maintien de la multipotence et de la prolifération des cellules souches neurales [100].

Des études de microscopie électronique à balayage ont démontré que la liaison Delta-Notch est extrêmement forte comparativement aux autres interactions ligand-récepteur. Il est postulé que ce fait aide à générer la force physique nécessaire pour dissocier et activer

le récepteur Notch [101]. Le complexe activateur CBF1/NICD permet une augmentation de la transcription de gènes cibles tels les *Hes* et les *Herp*, qui sont des régulateurs transcriptionnels de la famille des hélice-tour-hélice basique [102, 103]. Ces effecteurs de la voie Notch vont exercer leurs effets en antagonisant les gènes proneuraux tel *Mash1* et les neurogenins [104] (Figure 10). Ce mécanisme antagoniste bloque l'expression initiale des gènes neuronaux et est central à l'inhibition de la différenciation neuronale [91].

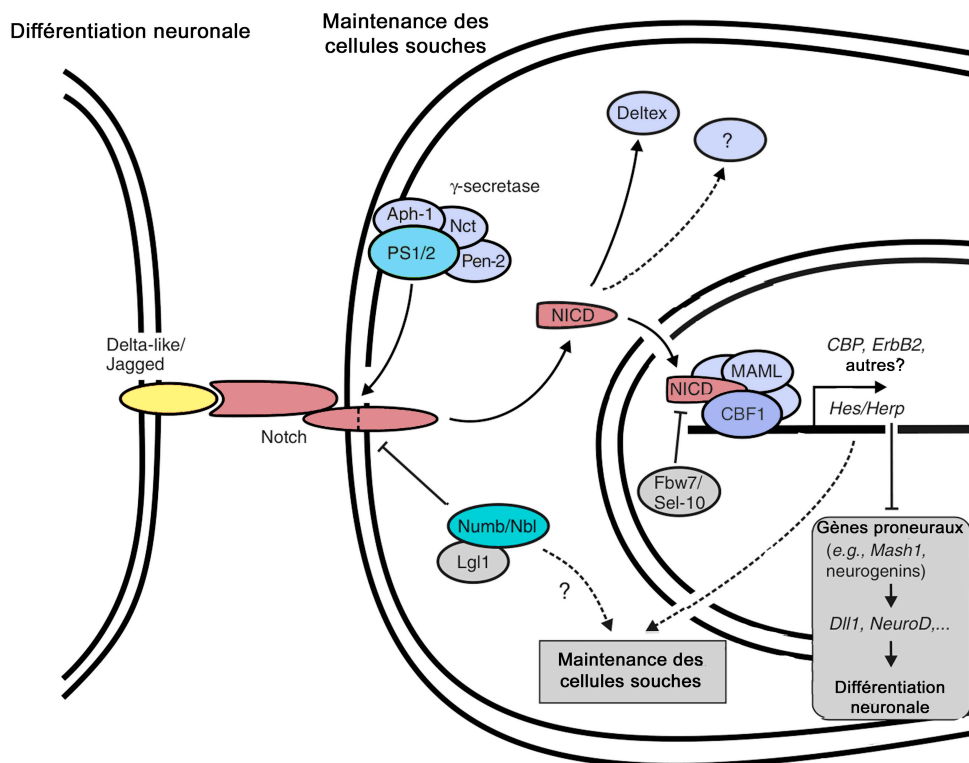


Figure 10. La voie de signalisation Notch chez les mammifères. Suite au contact entre un ligand (Delta-like/Jagged) et le récepteur Notch, une série de réactions protéolytiques libère le fragment intracellulaire du récepteur Notch qui sera transloqué au noyau et activera la transcription des gènes cibles permettant l'inhibition de la neurogénèse. Adapté de Keejung Yoon et Nicholas Gaiano (2005). Nature Neuroscience Volume 8, 709-715.

Le concept d'inhibition latérale est critique à la compréhension de l'activité biologique de la voie Notch. Selon ce modèle, il advient initialement, de manière stochastique, une différence minime dans les niveaux de ligands et récepteurs dans deux cellules adjacentes. Une boucle de rétroaction crée ensuite une amplification de cette différence et déclenche alors la différenciation d'une des 2 cellules alors que la cellule adjacente demeure non-différenciée. Les premières évidences de ce mécanisme sont venues d'expériences où un neuroblaste d'embryon de sauterelle a subi une ablation au laser. Suite à la mort du neuroblaste, la cellule adjacente, qui normalement devait demeurer une cellule épidermale, se différencia en neuroblaste substitut [105]. Toutefois, ce modèle de différence initiale stochastique a été récemment mis en doute [106]. En effet, des études d'imagerie en temps réel ont permis de déterminer que le gène effecteur *Hes1*, le gène proneural *Ngn2* et le ligand *Dll1* sont exprimés de façon oscillatoire dans les cellules souches neurales du cerveau en développement [107]. Ce type d'expression permettrait une prolifération efficace des cellules souches neurales et impliquerait une régulation dynamique de la voie Notch lors du développement. L'inhibition latérale soutenue ne serait donc pas le mécanisme de choix pour créer la diversité entre cellules voisines [106]. Toutefois, d'autres expériences seront nécessaires pour confirmer cette théorie. Donc, via l'inhibition latérale soutenue ou l'expression oscillatoire, la voie de signalisation Notch permet à des cellules adjacentes d'adopter un destin cellulaire différent.

1.3.3 Les mutations de la voie Notch

L'étude des mutations des principaux composants de la voie Notch a grandement contribué à la compréhension de la fonction de cette voie dans la neurogénèse. Un des premiers gènes de cette voie à avoir été délété par recombinaison homologue fut le récepteur Notch1 [108, 109]. L'étude détaillée des phénotypes neuraux révéla que les marqueurs de différenciation neuronaux précoces étaient surexprimés (*Math4A*, *NeuroD*, *NSCL-1*). Une observation surprenante fut que bien que l'expression de *Hes5* soit réduite en l'absence de Notch1, l'expression de *Hes1* n'est pas affectée [110]. Ce résultat était intrigant étant donné que plusieurs études avaient antérieurement identifié *Hes1* comme étant une cible transcriptionnelle principale de la voie Notch dans le SNC [102, 111]. On retrouve un résultat semblable dans les souris *CBF1^{-/-}* [110] suggérant que bien qu'étant part essentielle de la réponse à l'activation de la voie Notch, *Hes1* peut également être activé par d'autres cascades moléculaires impliquant les protéines NGF, FGF2, EGF et Sonic Hedgehog [112, 113]. Étant donné que la mutation Notch est létale chez l'embryon à e11, l'étude de la mutation dans différentes structures du cerveau a requis l'utilisation de mutants conditionnels. La délétion conditionnelle de Notch1 dans le pool de cellules souches neurales (Notch^{LoxP} et Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de Nestin) a permis de confirmer un phénomène de différenciation neuronale précoce [114]. De plus, l'inactivation conditionnelle dans le télencéphale (Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de FoxG1) mène à un niveau réduit de neurones plus tard au cours du développement dû à une différenciation neuronale prématurée du pool primitif de cellules souches neurales [115]. Donc, les résultats de délétions complètes et conditionnelles

supportent la vision selon laquelle la voie de signalisation Notch inhibe la différenciation neuronale et maintient le pool de cellules souches neurales.

Tel que mentionné plus haut, les cibles transcriptionnelles les mieux caractérisées de la voie Notch sont les gènes de la famille *Hes* et *Herp*. Bien que 7 gènes *Hes* soient connus, les études dans le SNC concernent majoritairement *Hes1* et *Hes5* [91]. Les souris *Hes1*^{-/-} souffrent de sévères défauts développementaux au niveau du SNC et subissent une différenciation neuronale précoce, tel que suggéré par l'expression hâtive de marqueurs neuronaux *Mash1*, *Nscl* et *Neurofilament* [111]. *Hes1* et *Hes5* semblent avoir une fonction redondante dans le contrôle des cellules souches neurales. En effet, la double mutation *Hes1*^{-/-} et *Hes5*^{-/-} présente des phénotypes beaucoup plus sévères que les mutations simples [116], et une augmentation de *Hes5* est observé dans le SNC des souris *Hes1*^{-/-} [111]. Outre le fait de souligner l'importance de ces effecteurs de la voie Notch dans le contrôle de la neurogénèse dans le cerveau embryonnaire, ces faits mettent en évidence la présence de phénomènes de redondance fonctionnelle dans cette voie. D'autres mutations de protéines impliquées dans la voie Notch causent d'importants phénotypes neuraux. Le **Tableau I** (voir p.72) résume certaines des plus importantes.

1.3.4 Les ligands non-canoniques

La voie Notch est nécessaire à un grand nombre de tissus et est largement utilisée par tous les métazoaires. Le petit nombre de ligands canoniques DSL (Delta1, Delta3, Delta4, Jagged1 et Jagged2) ne semble pas refléter les effets pléiotropiques de cette voie. La présence de ligands non-canoniques pourrait apporter une explication moléculaire à ce paradoxe. En effet, un nombre grandissant de ligands non-canoniques a été démontré comme possédant la capacité d'activer cette voie [117]. Ces ligands ont aussi la capacité d'activer la voie Notch dite non-canonique. Par opposition à la voie canonique, qui active la transcription des gènes cibles via la liaison de la partie intracellulaire de Notch (NICD) avec le complexe CBF1, la voie non-canonique permet la transcription de différents gènes. La protéine Deltex-1 est impliquée dans cette voie (Figure 11). Deltex-1 comporte un domaine RING-finger et possède une activité de ligase d'ubiquitin [118, 119]. Dans les progéniteurs neuraux *in vitro*, Deltex-1 s'associe à p300 et à NICD et peut inhiber la transcription de gènes proneuraux tels que Mash1 de façon CBF1 et Hes1/Hes5 indépendante [120]. De plus, Deltex-1 peut changer la spécificité de la liaison à l'ADN de CBF1, ce qui a pour effet de permettre au complexe CBF1/NICD/Deltex-1 d'activer la transcription d'autres gènes cibles comme MAG qui entraîne la maturation et la myélinisation des oligodendrocytes [121].

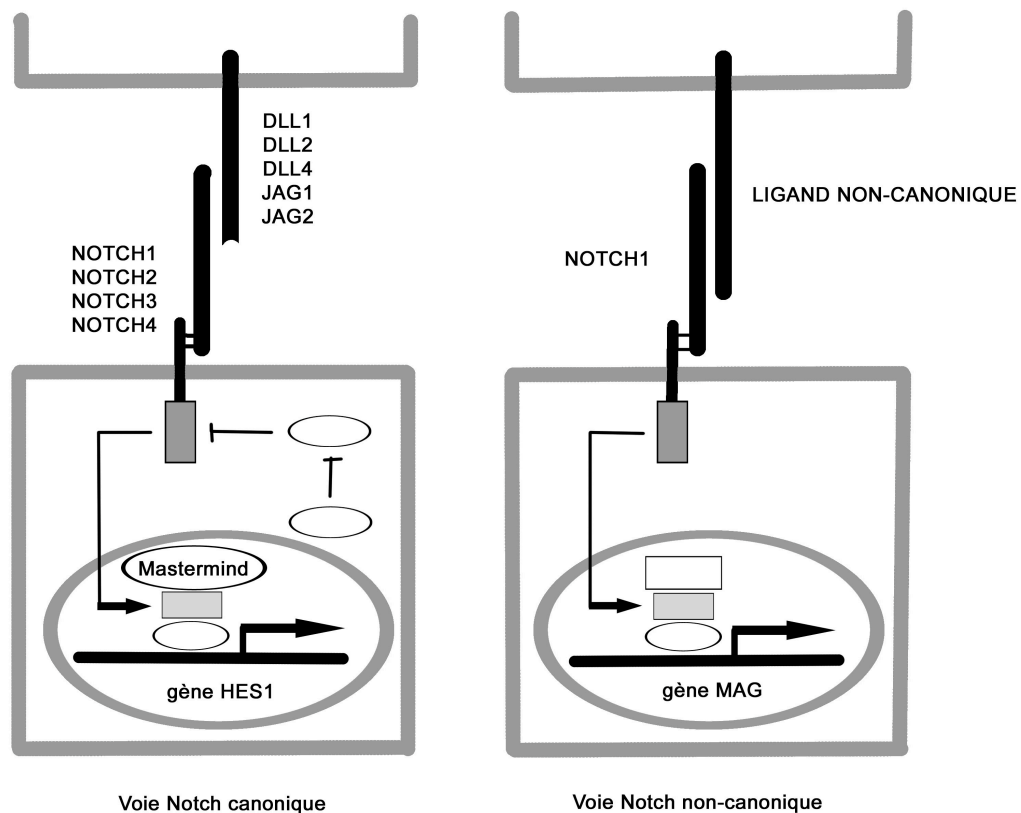


Figure 11. Mécanisme de base de la voie Notch canonique versus la voie Notch non-canonique. La liaison de ligands non-canoniques sans domaine DSL entraîne la transcription de gènes cibles différents de la voie canonique tel MAG. Adapté de Masuko Katoh et Masaru Katoh (2007). *International journal of oncology*, 30: 247-251.

Un des premiers ligands non-canoniques décrit fut Delta-like homolog 1 (Dlk-1) [122, 123]. Mis à part le manque d'un domaine DSL, Dlk-1 est structurellement similaire aux autres protéines Delta. En effet, cette protéine membranaire possède des répétitions en tandem EGF-like dans son domaine extracellulaire [117]. Dlk-1 serait un antagoniste de la voie Notch. En effet, des hauts niveaux d'expression de DLk-1 sont associés avec une

perte d'expression de la cible transcriptionnelle Hes1 (chez la souris) et E(spl)m β (chez la drosophile) [124-126]. Cet effet inhibiteur pourrait se faire via un mécanisme d'inhibition en cis. En effet, les évidences supportent le fait que la liaison de Dlk-1 à Notch ne se fait qu'à la surface de la même cellule (interaction en cis) chez la drosophile. Contrairement aux interactions en trans qui activent la voie Notch, les interactions en cis entre ligands et récepteurs Notch ont un effet répresseur [127]. Les bases moléculaires de l'inhibition en cis par les ligands canoniques et non-canoniques de la voie Notch sont encore mal comprises. Toutefois, il apparaît évident que ce mécanisme est un élément essentiel des événements régulés par la voie Notch lors du développement [128, 129]. Un mécanisme possible serait une compétition entre les interactions en cis et en trans si les sites de cis-liaisons et de trans-liaisons à Notch se chevauchent. En accord avec ce mécanisme, les cellules co-exprimant Dll1 et Notch1 ne peuvent lier la forme soluble de ligands DSL [117].

Une autre protéine ayant attirée récemment l'attention comme étant un ligand non-canonique de la voie Notch est DNER (Delta/Notch like EGF-related Receptor). Cette protéine fut initialement identifiée comme partenaire de AP-1 dans les dendrites et le corps cellulaire des neurones en développement et matures du SNC [130, 131]. DNER est spécifiquement exprimé dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, dans les cellules de Purkinje dans le cervelet et dans les neurones pyramidaux du néocortex [132]. DNER possède 10 EGF-like répétitions qui sont grandement homologues avec le récepteur Notch et le ligand Delta [130] et tout comme Dlk-1, il ne possède pas de domaine DSL (Figure 12).

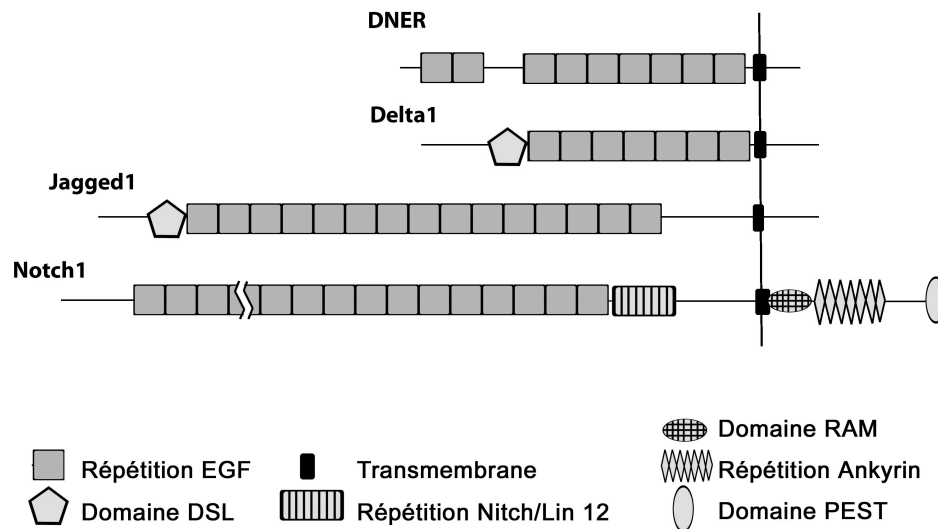


Figure 12. Représentation schématique de l'homologie structurelle existant entre DNER et Delta1, Jagged1 et Notch1. Adapté de Mototsuga Eiraku et al. (2005). *Nature neuroscience*. Volume 8, 873-880.

Tous les ligands classiques possèdent le domaine DSL et il était initialement convenu qu'il doit être présent sur le ligand afin de se lier à Notch [133]. Toutefois, des études ont démontré que la première et la deuxième répétition EGF-like sur le domaine extracellulaire de DNER peuvent lier directement Notch1 [134]. Ce ligand atypique peut également activer la voie Notch de façon CBF1 dépendante ou Deltex-dépendante *in vitro* dans des myoblastes (C2C12) et uniquement de façon Deltex-dépendante *in vivo* dans les cellules gliales de Bergmann via le contact avec les cellules de Purkinje exprimant DNER. Cette activation CBF1 indépendante de la voie Notch par DNER régule la morphogénèse de la glie de Bergmann lors du développement normal du cervelet [134]. L'analyse des souris *DNER*^{-/-} a permis de mieux caractériser les défauts au niveau du développement du

cervelet. En effet, ces souris manquent de coordination et il fut démontré que l'absence de DNER cause une désorganisation de la couche de cellules de Purkinje et un défaut de maturation de ces cellules jusqu'à la 2e semaine post-natale [135]. Donc, en plus d'affecter la maturation des cellules gliales de Bergmann, DNER pourrait exercer un signal "rétrograde" dans les cellules de Purkinje. Toutefois, ces phénotypes observés s'amointrissent à l'âge adulte, dû à un mécanisme encore inconnu [134]. Des études plus récentes ont démontré que DNER est impliqué dans la neuritogénèse via l'interaction avec PTPzeta (une protéine tyrosine phosphatase) qui peut réguler l'endocytose de ce ligand [136]. Ce mécanisme impliquerait l'endocytose clathrin-indépendante, ce qui permettrait le ciblage polarisé de DNER vers la membrane somato-dendritique [137].

Récemment, il fut démontré que DNER peut jouer un rôle de suppresseur de tumeurs dans des cellules souches neurales dérivées de GBM (Glioblastomes), un type de cancer du cerveau très agressif [138]. Les auteurs de l'étude ont utilisé des inhibiteurs d'histone déacétylases (HDACI) afin de déterminer leurs effets sur les capacités tumorales des GBM. Les HDACI ont pour effet d'inhiber la croissance des neurosphères dérivées des GBM, d'induire l'apoptose des cellules des neurosphères, de causer la différenciation des cellules et d'inhiber la formation de tumeurs lors de xéno greffes de cellules provenant des neurosphères dérivées des GBM. Ces effets biologiques sont médiés par l'augmentation de l'expression de DNER. En effet, des expériences de gain et de perte de fonctions ont confirmé que la signalisation par DNER module la croissance, la différenciation, la propagation et la maintenance des tumeurs de cellules "stem-like" dérivées des GBM. Ces effets se font via la voie Notch non-canonique: l'expression de DNER dans ces cellules n'induit pas l'expression Deltex1 indépendante de Hes-1. DNER active plutôt la

transcription de MAG, qui est Deltex1 dépendante [120, 139]. Donc, en plus de jouer un rôle dans la gliogénèse et la neuritogénèse, DNER a également un effet négatif sur les cellules néoplastiques dérivées de cancer du cerveau [138].

Chapitre 1

Introduction: Section 4

Développement de l'oeil et cellules souches rétiniennes

1.4.1 La morphogénèse de l'oeil

Lors de la formation du cerveau, une extension hautement spécialisée fait son apparition: l'oeil. Le premier signe morphologique du développement de cette structure très complexe apparaît à e8.25-e8.5 avec l'évagination bilatérale du diencephale qui suit la division du prosencéphale [140]. Se crée alors le sulcus optique (Figure 13A). Cette évagination va se poursuivre jusqu'à l'apparition d'une structure nommée vésicule optique (VO) (Figure 13B). Cette structure va s'étendre jusqu'à l'ectoderme de surface où un échange de signaux instructifs critiques pour la formation de la placode cristalline va se produire [140]. Des études de microscopie électronique à transmission ont déterminé qu'à ce moment, un réseau dense de fibres de collagène et des elongations du cytoplasme lient la vésicule optique et l'ectoderme de surface [141]. On voit à ce stade les premiers signes d'apparition de la lentille: l'épaississement de l'ectoderme de surface en contact avec la vésicule optique et le début de l'expression des protéines de la famille Crystallin. Par la suite, l'invagination coordonnée de la placode cristalline et de la vésicule optique résulte en la formation d'une structure nommée cupule optique (Figure 13C). La couche interne de la cupule optique donnera naissance à la rétine neurale alors que la couche externe donnera naissance à l'épithélium pigmenté rétinien (EPR) (Figure 13D) [140].

Donc, la formation de la vésicule optique est considérée comme étant le premier signe visible de l'apparition de l'œil chez les vertébrés. Toutefois, bien avant l'apparition de cette structure, le champ rétinien est spécifié.

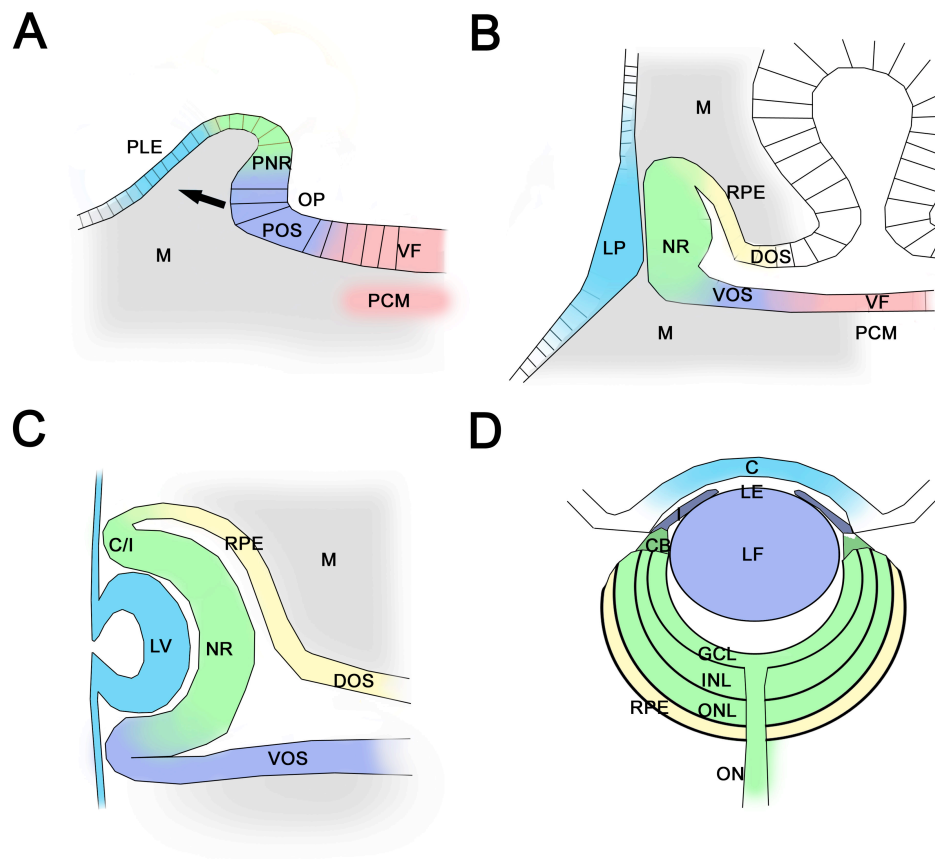


Figure 13. Représentation graphique des différentes étapes du développement de l'oeil chez les vertébrés. Suite à l'apparition du sulcus optique (A), vient la formation de la vésicule optique (B). L'invagination de la vésicule optique formera la cupule optique (C). La couche interne donnera la rétine et la couche externe formera l'épithélium pigmenté (D). ((PLE) Presumptive Lens Ectoderm, (PNR) Presumptive Neural Retina, (OP) Optic Pit, (POS) Presumptive optic stalk, (LP) Lens placode, (NR) Neural retina, (DOS) Dorsal optic stalk, (VOS) Ventral optic stalk, (C/I) Ciliary body/Iris, (LV) Lens vesicle, (NR) Neural retina, (RPE) Retinal Pigmented Epithelium. Adapté de Robert L Chow and Richard A. Lang (2001). *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17: 255-296.

Cette région contenant les cellules primordiales de l'oeil doit intégrer des signaux provenant des tissus environnants pour permettre le développement normal [142].

L'induction et la régionalisation de la plaque neurale [143, 144] va mener à l'apparition de ce champ rétinien, situé dans la partie antérieure [145, 146]. Dans cette région, le champ rétinien est entouré de précurseurs télencéphaliques et de cellules qui vont donner naissance à l'hippocampus [147]. Plusieurs molécules sont nécessaires pour la mise en place d'une "barrière" afin que les cellules du champ rétinien soient bien spécifiées. Les signaux extracellulaires et les facteurs de transcription ont un rôle très important à jouer.

Des interactions entre la voie non-canonique Wnt et BMP semblent influencer l'établissement d'une "barrière" entre le télencéphale et le champ rétinien [147]. Les cellules du champ rétinien primitif vont également recevoir des signaux extracellulaires provenant, entre autres, du mésoderme et de l'ectoderme. Par exemple, la séparation bilatérale du champ rétinien requiert la sécrétion de molécules comme SHH et Cyclops qui originent du mésoderme pré-chordale [148]. Les molécules sécrétées impliquées dans la régulation du développement de l'oeil appartiennent à un nombre surprenamment restreint de groupe de gènes [147]. Le **tableau I.II** (voir p.73) présente les différentes molécules impliquées lors des différents événements menant à la structuration de la vésicule optique jusqu'à la cupule optique.

1.4.2 Les facteurs de transcription exprimés dans le champ rétinien

Outre les molécules sécrétées, un nombre limité de facteurs de transcription est essentiel pour la spécification du champ rétinien et le développement ultérieur de l'oeil. Ce groupe de facteurs de transcription comprend *Pax6*, *Lhx2*, *Six3*, *Six6* et *Rx* [145]. Plusieurs évidences génétiques démontrent clairement le rôle de ces facteurs de transcription dans

le développement de l'œil. Chez l'humain, certaines mutations dans *PAX6*, *SIX3* et *SIX6* peuvent mener à des malformations affectant les yeux [149]. Chez la souris, la délétion de *Rx*, *Pax6*, *Six3*, *Six6* et *Lhx2* entraîne une malformation de l'oeil ou une anophtalmie [150-155]. Ces facteurs de transcription sont donc d'une importance capitale pour le développement de l'oeil. Voyons, plus en détail, chacun de ses gènes. Notons que le rôle de *Lhx2* sera discuté dans une autre section.

Pax6

Pax6 est un gène possédant un "paired box" et un "paired-like homeobox" extrêmement conservés à travers l'évolution [156]. Chez la souris, l'expression de *Pax6* débute à e8.0 dans l'ectoderme de surface et dans l'ectoderme neural qui donnera naissance à la vésicule optique [157]. Ce facteur de transcription à homéodomaine est considéré comme étant le gène maître régulateur du développement de l'œil chez les métazoaires. En support à cette hypothèse: la surexpression de *Pax6* chez la drosophile ou l'embryon de xénope entraîne la formation de yeux ectopiques [158, 159]. L'haploinsuffisance de *Pax6* résulte en un phénotype nommé *Small eye (sey)* chez le rat et chez la souris [150, 160] et une aniridie chez l'humain [161, 162]. Les embryons *Pax6^{-/-}* n'ont pas d'yeux ni de cavité nasale et meurent à la naissance. Toutefois, bien que la formation de l'oeil soit compromise, les embryons homozygotes développent une vésicule optique, mais le développement s'arrête à ce stade, tout juste avant la formation de la cupule optique [163]. Il fut démontré que *Pax6* est requis de façon cellule-autonome pour la formation de la placode de la lentille [164], pour l'adhésion cellulaire homophile de la vésicule optique et pour son contact avec l'ectoderme de surface [164]. Des études ont révélé que chez les embryons *Pax6^{-/-}*, l'expression des facteurs de transcription essentiels au développement précoce de l'oeil

n'est pas affectée (expression normal de *Rx*, *Lhx2*, *Otx2* et *Six3*), révélant ainsi que l'oeil est initialement spécifié [165]. La mutation conditionnelle de *Pax6* dans la rétine à e10.5 révèle que *Pax6* est requis pour la neurogénèse normale dans la rétine. En effet, les progéniteurs rétiniens prolifèrent moins et donnent naissance seulement à des neurones amacrine dû à un défaut dans la spécification de l'expression des gènes pro-neuraux [166]. Récemment, il a été démontré que *Pax6* est requis pour la prolifération normale des progéniteurs rétiniens situés dans la vésicule optique [167]. *Pax6* agit de façon cellule-autonome pour réprimer la prolifération des progéniteurs rétiniens en se liant directement au promoteur de *p27^{Kip1}* et en permettant la transcription de ce régulateur négatif du cycle cellulaire [167]. *Pax6* joue aussi un rôle au niveau du cytosquelette dans le SNC via le contrôle transcriptionnel de delta-Catenin, une protéine localisée au niveau des jonctions adhérentes [168]. Mis à part son rôle dans la formation de l'oeil, *Pax6* est requis pour le développement de l'épithélium nasal [169], le cerveau [170] et le pancréas [171].

Six3/Six6

Six3 et *Six6* sont des gènes de la famille des protéines avec un "Six-homeodomain". Des analyses phylogénétiques démontrent que *Six3* et *Six6* appartiennent à un groupe distinct de gènes avec homeobox ayant une grande ressemblance à *optix* chez la drosophile [172]. Chez la souris, *Six3* est initialement exprimé dans la partie antérieure de la plaque neurale à e7.5. Plus tard, *Six3* est exprimé dans le neuroectoderme antérieur, le futur champ rétiniens, la partie ventrale du cerveau antérieur, la vésicule optique et la cupule optique [165, 173]. *Six6* quant à lui possède un patron d'expression plus restreint. En effet, on retrouve son expression dès le stade e8 dans la portion ventrale du diencéphale, qui est la région qui donnera naissance à l'hypothalamus et à la neurohypophyse [172, 174]. À

e8,25 on remarque une faible expression bilatérale à la ligne médiane du diencéphale. Ce signal serait le premier signe génétique détectable de l'apparition de la tige optique dans l'oeil en développement. On retrouve également les transcrits de *Six6* dans l'hypophyse et dans l'hypothalamus [172]. Son expression est forte dans la vésicule optique à e9.5, atteint un sommet dans la rétine à e13.5 et diminue progressivement par la suite [152]. Les patrons d'expression et les manipulations génétiques de *Six3* et *Six6* démontrent un rôle important pour ces facteurs de transcription dans le développement normal de l'oeil. L'expression ectopique de *Six3* chez l'embryon de médaka dans le cerveau médian et dans le futur cervelet entraîne la formation d'une structure semblable à une cupule optique contenant de l'ERP et une expression ectopique de *Pax6*, *Rx* et *Six3* endogène [175]. De plus, chez la souris, l'expression ectopique de *Six3* dans la même région entraîne la formation d'une structure ressemblant à une vésicule optique [176]. Toujours chez la souris, l'inactivation de *Six3* cause une perte totale des structures du cerveau antérieur causée par une expansion antérieure anormale de l'effet postériorisante de l'activité *Wnt* [151], rendant le rôle précis de ce gène dans le développement de l'œil difficile à déterminer de cette façon. L'utilisation de mutants conditionnels permettant l'ablation de l'expression de *Six3* à e9.0 dans le tissu qui donnera naissance à la future lentille (*Six3*^{Δ/w};Le-Cre) a permis de déterminer le rôle essentiel de *Six3* dans la formation de cette structure et d'établir que l'expression de *Pax6* et *Sox2* est dépendante de *Six3* dans ce contexte [177]. Une élégante étude initiée par la recherche de partenaires d'interactions de *Six3* a permis de mettre à jour le mécanisme d'action de *Six3* dans le développement de l'oeil. Effectuée chez le Medaka, cette étude a permis d'identifier Geminin comme partenaire de *Six3* [178]. Geminin est un régulateur négatif de la progression du cycle cellulaire, il inhibe

l'initiation de la réplication de l'ADN en liant Cdt1, ce qui empêche ce dernier de se lier à l'origine de réplication, entraînant ainsi un blocage du cycle cellulaire [179]. Tôt dans le développement de l'oeil, *Six3* est fortement exprimé. Il lie Geminin, ce qui inhibe son activité répressive et prévient ainsi la différenciation neuronale et permet la prolifération. Plus tard, l'expression de *Geminin* est maintenue dans la partie centrale de la rétine alors que *Six3* est absent, ce qui permet la sortie du cycle cellulaire et la différenciation neuronale [178]. *Six3* et Geminin ont donc une activité antagoniste et contribuent au maintien de la délicate balance entre la prolifération et la différenciation lors du développement de l'œil [178].

Le rôle de *Six6* dans le développement de l'œil est aussi mis en évidence de plusieurs façons. Chez l'embryon de poulet, l'expression ectopique de *Six6* dans l'ERP entraîne l'expression de *Chx10* et *visinin*, deux marqueurs de rétine neurale normalement exclus de l'ERP [180]. Lorsque surexprimé dans le champ rétinien du Xénope, *Six6* cause un fort grossissement de la taille de l'oeil, ce qui suggère que *Six6* pourrait contrôler la prolifération des cellules rétiniennes [181]. L'ablation génétique de *Six6* chez la souris a permis de mieux définir le rôle de *Six6* dans la rétinogénèse. Bien que non-essentielle à la survie, l'absence de *Six6* cause une hypoplasie de l'hypophyse, un degré variable d'hypoplasie rétinienne et une absence du chiasma optique et du nerf optique [152]. Le contrôle exercé par *Six6* sur la prolifération des cellules de l'hypophyse et de la rétine se ferait via la répression de p27^{Kip1}. En effet, *Six6* forme un complexe avec Dach et se lie directement au promoteur de p27^{Kip1}, permettant ainsi la progression dans le cycle cellulaire [152]. Donc, *Six3* et *Six6* sont essentiels pour le maintien de l'équilibre prolifération versus différenciation tout au long de la rétinogénèse.

Rx

Rx (Retinal homeobox) est un gène faisant partie d'une petite famille de gènes contenant un "paired-like" homéobox. Le rôle essentiel de *Rx* dans le développement de l'œil a été établi en fonction de son patron d'expression et d'expériences de gain et de perte de fonctions. L'expression de *Rx* débute très tôt à e7.5 dans la partie antérieure de la plaque neurale. Par la suite, *Rx* est retrouvé dans la plaque neurale à e8.5 et à e9.5 son expression est restreinte aux vésicules optiques, à la tige optique et à la partie ventrale du diencéphale [182]. Par la suite, l'expression de *Rx* est graduellement restreinte dans toutes les structures excepté la rétine où l'expression se poursuit jusqu'au jour post-natal 13.5 et n'est plus détectable par la suite [182]. L'expression ectopique de *Rx* chez le xénopus et le poisson zèbre résulte en une extension des tissus rétiniens ainsi qu'une hyperprolifération de la rétine neurale [153, 183], ce qui suggère un rôle important dans la spécification initiale des cellules rétiniennes et dans leur prolifération [140]. Chez la souris, l'ablation de *Rx* entraîne une disparition des structures de l'œil [153]. Le défaut de morphogénèse survient à e8.5 avec l'absence de formation du sulcus optique (Figure 13A). Au niveau moléculaire, les études ont permis de déterminer que l'expression initiale de *Otx2*, *Pax6* et *Six3* au niveau de la portion antérieure de la plaque neurale se fait normalement dans les embryons *Rx*^{-/-}, mais que l'augmentation subséquente de leur expression ne se fait pas dans la portion qui donnera naissance aux tissus rétiniens. Inversement, dans les embryons *Pax6*^{-/-}, l'activation de *Rx* se fait normalement dans la plaque neurale et son expression devient forte par la suite dans les cellules souches rétiniennes [184]. Ces données démontrent que *Rx* joue un rôle unique dans le développement de l'œil et

suggèrent que l'expression normale de *Pax6* et la prolifération normale des cellules souches rétiniennes seraient dépendantes de ce facteur de transcription [184, 185].

1.4.3 Les cellules souches rétiniennes

La finalité du développement de l'oeil est l'obtention d'une rétine mature fonctionnelle. La composition cellulaire de cette étonnante structure est contrôlée de façon très précise. La rétine adulte est composée de six types de neurones et d'un type de cellules gliales qui sont générées dans un ordre précis: les cellules ganglionnaires apparaissent en premier. Viennent ensuite les cellules horizontales, les cônes et les cellules amacrines. Les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules gliales de Müller sont produites en dernier [186] (Figure 14). Cet ordre précis suit le modèle de compétence des cellules progénitrices rétiniennes. Ce modèle propose que toute cellule passe par un stade de compétence qui devient plus restreint plus le développement progresse [186-188].

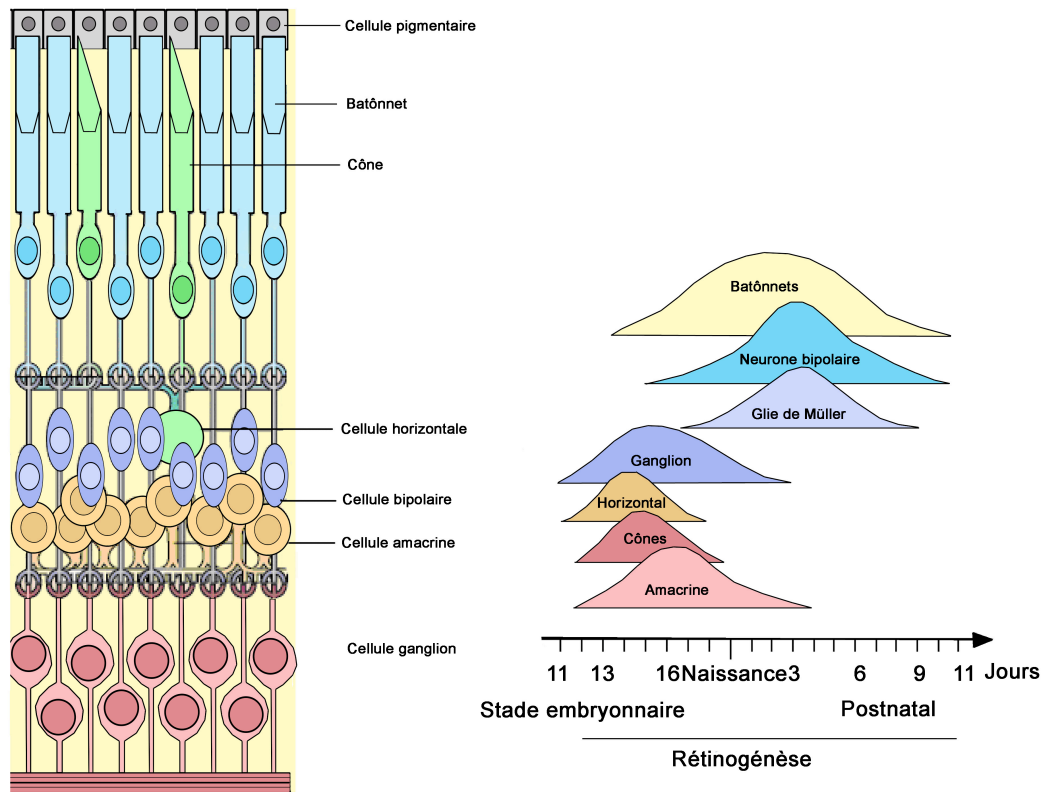


Figure 14. Composition de la rétine mature des mammifères. La rétine adulte est composée de 6 types de neurones et d'un type de cellules gliales. Ces cellules rétinienne apparaissent selon un ordre précis: les cellules ganglionnaires et horizontales se différencient en premier. Viennent ensuite les cônes, les cellules amacrines, les bâtonnets, les cellules amacrines pour terminer avec les cellules gliales de Müller. Adapté de Livesey et Cepko. *Nature Reviews neuroscience* 2001. Volume 2, 109-118.

Afin d'en arriver à cette étonnante structure qu'est la rétine mature, des progéniteurs rétinienne doivent initialement proliférer afin de permettre une expansion du bassin de cellules qui permettront de former cette structure. Chez la souris, au moins deux populations distinctes de cellules progénitrices ont été identifiées dans la rétine en développement: les "cellules souches" pigmentées rétinienne du corps ciliaire (à partir

du stade e14.5) et les progéniteurs situés dans la rétine neurale [189]. Au niveau de la rétine neurale en développement, deux types distincts de progéniteurs seraient présents et pourraient être discriminés par l'expression de l'antigène de surface SSEA-1 [190]. SSEA-1 est exprimé par les progéniteurs situés à la marge ciliaire de la rétine immature et n'est pas exprimé par les progéniteurs plus matures situés dans la rétine centrale embryonnaire et dans la rétine aux stades post-nataux [190]. Ce qui fait de SSEA-1 un bon marqueur pour identifier les progéniteurs rétiniens les plus primitifs.

De plus, une population de cellules souches/progénitrices rétiniennes embryonnaires encore plus primitive fut identifiée chez la souris dans la vésicule optique au stade e9.5 [167]. *In vitro*, ces cellules sont capables de prolifération à long terme et sont multipotentes (peuvent donner naissance à tous les types cellulaires présents dans la rétine mature) [167]. Ces cellules expriment des marqueurs de progéniteurs NE (Sox1, Sox2, Bmi1, Nestin, CD133, Pax6) et de glie radiale (Blbp, Pax6) et des gènes impliqués dans le développement primitif de l'oeil (Pax6, Six3, Six6, Lhx2, Otx2, Mitf) [167]. Elles peuvent former des neurosphères lorsque cultivées en conditions clonales en présence de FGF2 et/ou EGF et peuvent être maintenues pour un maximum de 8 à 9 passages. La découverte de cette population cellulaire amène à se questionner à savoir si ces cellules sont en relation directe avec les cellules progénitrices rétiniennes identifiées à des stades plus tardifs de développement. La vésicule optique, qui apparaît au jour e9.5 est composée de ces cellules NE [191]. Les cellules NE représentent, dans tout le SNC, les cellules souches neurales les plus primitives et des analyses embryologiques ont révélés que la rétine neurale et le corps ciliaire originent de la VO [192]. Donc, tous les progéniteurs trouvés dans la rétine neurale et le corps ciliaire devraient provenir de la

vésicule optique [167]. Toutefois, le fait que l'essai neurosphère impose une sélection stringente des cellules souches/progénitrices amène à la réflexion que cette population pourrait différer de celles retrouvées plus tard au cours du développement [167]. Tout de même, cette population de cellules souches/progénitrices rétiniennes embryonnaires (en plus d'être moins hétérogène que les autres populations identifiées précédemment) est un excellent modèle expérimental pour mieux comprendre le comportement et la génétique de ces cellules.

En plus de la signalisation impliquant les récepteurs tyrosines kinase médiée par EGF\FGF2, les cellules souches rétiniennes recrutent plusieurs voies de signalisation afin de maintenir la prolifération et l'état non-différencié: Wnt, Sonic Hedgehog, SCF-c-Kit et Notch [191]. La voie de signalisation Notch joue un rôle particulièrement important dans ce processus. Plusieurs études de pertes ou gains de fonction ont démontrées son importance [193-195]. Par exemple, la délétion de Rbp-J (CBF1) (un intégrateur critique de plusieurs signalisations provenant de la voie Notch) dans la rétine pré-natale entraîne une diminution de la prolifération des cellules souches/progénitrices rétiniennes, une différenciation neuronale prématurée et une augmentation de l'apoptose [196]. Le récepteur Notch1 est évidemment un acteur critique à la régulation de la prolifération et de l'état non-différencié des cellules souches rétiniennes embryonnaires. Chez l'embryon de poulet, des niveaux réduits de ce récepteur augmente la production du premier type cellulaire produit normalement: les cellules ganglionnaires rétiniennes [197]. Des études complémentaires ont aussi démontré que l'activation constitutive de la voie Notch force les cellules progénitrices à adopter un état non-différencié [198]. Aussi, des allèles nulles des effecteurs Hes1 et Hes5 furent générés chez la souris et analysées pour de potentiels

défauts rétiniens. Les rétines des souris *Hes5*^{-/-} sont de taille et de morphologie normale, mais démontre une réduction de l'ordre de 30-40% dans la production de cellules gliales de Muller [199]. La rétine des embryons *Hes1*^{-/-} présente des défauts plus importants. En effet, l'absence de Hes1 dans la rétine cause une importante réduction de la taille et entraîne la formation de rosettes anormales [200]. Dans ces rétines, la destinée cellulaire est lourdement affectée. En effet, les types cellulaires apparaissant les premiers sont présents en trop grand nombre et le dernier type cellulaire normalement formé (les cellules gliales de Muller) est présent en plus petit nombre [201]. En résumé, les expériences de perte de fonction suggèrent que la signalisation Notch-Hes est critique pour la maintenance du bassin de cellules progénitrices et l'acquisition de la destinée gliale [202].

Les données accumulées jusqu'à maintenant sur le rôle de la voie de signalisation Notch supportent un modèle disant que Notch1 est exprimé dans les cellules souches/progénitrices rétiniennes de chaque état de compétence. Cette signalisation permet aux cellules de continuer à proliférer et de demeurer non-différenciée. Les cellules souches/progénitrices régulent à la baisse l'activité Notch afin de devenir post-mitotiques pour ensuite se transformer en neurones [202]. Cette hypothèse mène, chez la souris, à la surprenante découverte que Notch1 est requis pour inhiber la production de photorécepteurs. En effet, l'inhibition de Notch1 à différent stade de compétence entraîne la surproduction de cônes et bâtonnets [202]. Ces résultats démontrent qu'en plus de maintenir l'état non-différencié des cellules souches/progénitrices, l'activité Notch biaise sélectivement vers la production d'un type cellulaire versus un autre [202].

1.4.4 Régulation de la balance prolifération versus différenciation

Étant donné que les cellules souches rétiniennes donnent naissance aux cellules neuronales et gliales dans un ordre précis, il est évident que la balance prolifération versus différenciation doit être régulé de façon très précise. En effet, s'il n'y avait pas assez de cellules souches restantes à la fin de l'histogénèse de la rétine parce qu'elles auraient fait une sortie prématurée du cycle cellulaire, les derniers types cellulaires formés seraient en nombre insuffisant [203]. Inversement, une sortie trop tardive du cycle cellulaire peut mener à la formation d'un surplus de cellules formés en dernier et créer un phénomène de dysplasie qui peut mener dans certains cas à la formation de tumeurs [203, 204]. Il est maintenant évident que le contrôle de la prolifération des cellules souches du SNC est régulée par de complexes interactions entre des facteurs extrinsèques et intrinsèques. Durant le développement, des facteurs solubles ou membranaires produits par les cellules influences la machinerie du cycle cellulaire afin de favoriser la prolifération ou la différenciation [89, 205]. Nous avons vu auparavant certains de ces facteurs, nous nous attarderons ici au cycle cellulaire, plus particulièrement aux acteurs critiques de la régulation de la fin de la phase M, à la transition G1/S et au point G0 où les cellules se différencient.

Après la phase M, si une cellule souche/progénitrice procédera à une autre cycle de division, la protéine Rb (Retinoblastoma) est phosphorylé par un complexe Cyclin-CDK (Cyclin-Dependant kinase) ce qui l'empêche de lier le complexe E2F/DP. Le facteur de transcription E2F peut alors permettre la transcription de ces gènes cibles qui favoriseront

la transition G1/S [206, 207] Si la cellule doit se différencier, cette phosphorylation est bloquée. Divers mécanismes peuvent être responsable de ce blocage. Les complexes Cyclin-CDK peuvent être dégradés et les gènes encodant ces protéines peuvent réguler à la baisse [208]. Aussi, les protéines Cyclin Dependant Kinase Inhibitors (CKIs) peuvent bloquer l'activité du complexe Cyclin-CDK ou l'activité de la kinase peut être régulée directement par phosphorylation [209].

Parmi les CKIs impliqués dans le contrôle de la prolifération dans la rétine en développement, on retrouve p27^{Kip1} [203]. Chez la souris, p27 est exprimé dans la zone proliférative de la rétine tout au long de la rétinogénèse [210, 211]. Son expression est augmentée lors de la fin de la phase G2 ou au début de G1 dans les cellules qui sortent du cycle cellulaire [211]. Les souris déficientes en p27^{Kip1} démontrent une augmentation dans la proportion de cellules mitotiques à tous les stades de développement où la protéine est normalement exprimée [203]. p27^{Kip1} est donc un régulateur critique de la balance prolifération versus différenciation.

Un autre exemple de protéine régulatrice du cycle cellulaire dans la rétine en développement est p57^{Kip2}. Cette protéine est exprimée durant une brève période dans une sous-population de cellules qui sortent du cycle cellulaire (entre e14.5 et e17.5) [212]. L'augmentation de p57^{Kip2} se fait dans une phase du cycle cellulaire distincte de p27^{Kip1}, soit en fin de phase G1 ou en G0. En plus de ne pas être exprimé aux mêmes périodes, il semble que l'expression de p27^{Kip1} et p57^{Kip2} soit mutuellement exclusive dans certaines populations de cellules souches rétinienne [204, 210]. Ces faits indiquent que la sortie du cycle cellulaire se fait selon différents signaux à différents temps, démontrant clairement une hétérogénéité dans la population de cellules souches

rétiniennes embryonnaires, reflétant leur habilité à produire différents types cellulaires [212].

Lors de la progression dans le cycle cellulaire, les cellules souches rétiniennes doivent intégrer des informations provenant de l'environnement qui influenceront les déterminants intrinsèques. Les cellules prennent alors la décision de se diviser selon un mode symétrique ou d'effectuer une division asymétrique, générant ainsi une cellule fille différenciée. Si une signalisation non permissive est active (telle la voie Notch), la cellule continue alors sa progression dans le cycle cellulaire et passera éventuellement à un autre niveau de compétence, ce qui permettra d'engendrer un autre type cellulaire le moment venu [186]. Prenons un exemple de division asymétrique d'une cellule souche rétinienne compétente à produire une cellule ganglionnaire (Figure 15). Lors de la progression du cycle cellulaire, une décision est prise concernant le sort mitotique de la cellule fille (Figure 15-étape 1). La cellule intègre des signaux extrinsèques positifs et négatifs qui détermineront si cette cellule se différencie en un type cellulaire déterminé selon les facteurs intrinsèques suivant le modèle de compétence (Figure 15-étape 2). En G2/M, les déterminants concernant la destinée mitotique de la cellule fille sont organisés (figure 15-étape 3). Ensuite, la synthèse de p27^{Kip1} est initiée et est maintenue dans la cellule qui sortira du cycle cellulaire pour devenir une cellule ganglionnaire (Figure 15-étape 4). Finalement, la signalisation Notch est critique à ce processus. Les niveaux d'activation de cette voie sont évalués tout au long du cycle. Des niveaux réduits de signalisation Notch pourraient entraîner une stabilisation des gènes exprimés dans la cellule compétente. Ce phénomène a été observé chez la drosophile. Dans les précurseurs des organes sensoriels, les niveaux de achaete-scute (ASC) augmentent, du à un manque de signaux négatifs des

Donc, les cellules souches rétiniennes peuvent contrôler la balance prolifération versus différenciation ainsi que la destinée cellulaire via l'intégration des signaux extrinsèques (tel la voie Notch). La progression du cycle cellulaire s'en trouve influencé selon les déterminants intrinsèques propre à la cellule dans un état de compétence donné. Au niveau moléculaire, plusieurs données mettent en évidence l'importance des déterminants intrinsèques dans ce processus de différenciation. Par exemple, dans les mutants *Math5*, la quantité de cellules ganglionnaires rétiniennes est fortement réduite, alors que les cellules amacrines sont présentes en plus grand nombre [215, 216]. Aussi, dans les doubles mutants *Math3/NeuroD*, une perte de cellules amacrines et de bâtonnets est observé et le nombre de cellules ganglionnaires est augmenté [217]. Ces deux exemples illustrent bien l'importance d'un programme interne bien régulé afin de contrôler l'histogénèse dans la rétine.

Chapitre 1

Introduction: Section 5

Les facteurs de transcription à homéodomaine et Lhx2

1.5.1 Les protéines avec LIM homéodomaine

Les gènes avec "homéobox" forment une classe de gènes impliqués dans pratiquement tous les aspects du développement des métazoaires. Du "patterning" à l'établissement de la polarité, en passant par la détermination de l'identité cellulaire, les protéines à homéodomaine sont absolument requises afin d'assurer un développement normal [218]. Parmi ces gènes, un sous-groupe est de grand intérêt lorsqu'il est question de la formation du SNC: les gènes avec "LIM homeobox". Les protéines encodées par ces gènes sont caractérisées par la présence de deux domaines en doigt de zinc nommé domaine LIM (Lin11, Isl-1 et Mec-3) situés en N-terminal de l'homéodomaine [219]. En se basant sur leur structure et leur spécificité pour la liaison des protéines, les domaines LIM des protéines LIM homéodomaine (LIM-HD) peuvent être distingués des autres protéines avec domaine LIM tel zyxin, CRP et MLP [220, 221]. La présence du domaine LIM place les protéines LIM-HD à part des autres facteurs de transcription à homéodomaine. Mis à part les gènes faisant partie du groupe HOX qui contiennent un court motif d'interaction protéiques permettant la liaison de co-facteurs [222], la plupart des protéines comportant un homéodomaine ne possèdent habituellement pas d'autre domaine conservé. Dans celles en qui en ont, comme les facteurs de transcription POU-HD ou Paired homeodomaine, le deuxième motif domaine conservé sert à la liaison à l'ADN et non à d'autres protéines [219]. Donc, de par leur domaine LIM, les protéines LIM-HD ont probablement acquis une capacité unique à interagir avec d'autres régulateurs transcriptionnels de façon homomérique ou hétéromérique, permettant à ces protéines de contrôler la transcription de façon tissus-spécifiques [219]. À ce jour, douze gènes chez

les mammifères, cinq gènes chez la drosophile et sept gènes chez le nématode (*C. elegans*) sont connus pour encodé des protéines avec LIM-HD [219]. L'analyse phylogénétique permet de séparer tous ces gènes en 6 groupes et de déterminer qu'une importante pression sélective a contribué à préserver ces gènes tout au long de l'évolution (Figure 16).

In vitro, les protéines avec LIM-HD semblent posséder un très fort potentiel discriminatoire pour la liaison à l'ADN. Par exemple, Isl-1 chez le rat, Lhx2 chez la souris et Lmx1a chez le hamster ont été cloné comme des protéines se liant à des "enhancer" avec une séquence spécifique [223-225]. Malgré leur spécificité intrinsèque, la liaison à l'ADN *in vivo* des protéines avec LIM-HD est modulé par les interactions avec d'autres régulateurs transcriptionnels.

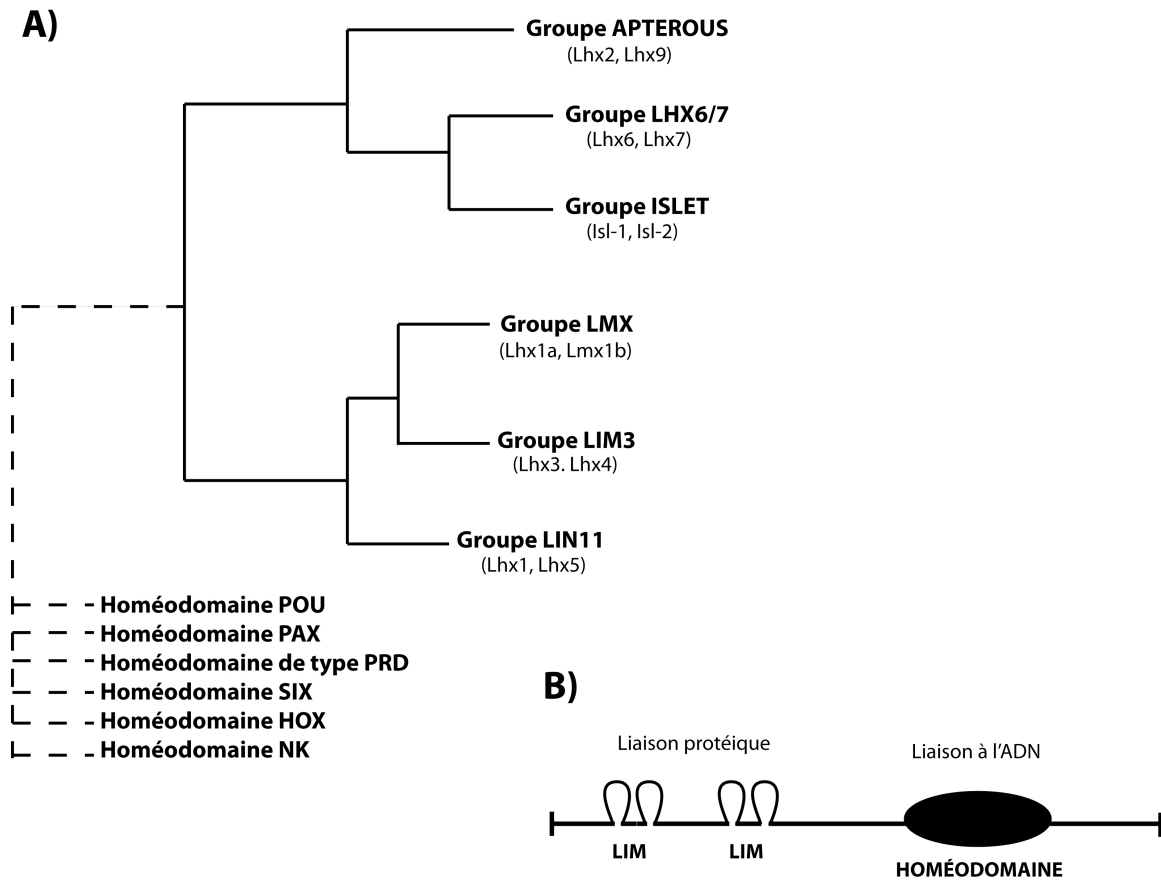


Figure 16. A) Classification phylogénétique des différentes protéines à LIM homéodomaine. Les lignes pointillées montrent la divergence des LIM homéodomaine par rapport aux autres protéines avec homéodomaine. Les protéines avec LIM homéodomaine sont séparées en 6 groupes selon l'homologie entre les homéodomaines. B) Structure des protéines avec LIM homéodomaine. Adapté de Hobert O et Westphal H. Trends Genet. 16: 75-83.

Ces interactions peuvent être de différents types. La protéine avec LIM-HD peut interagir directement avec un autre facteur de transcription (Figure 17a) ou indirectement via des membres de la famille de cofacteur de la famille Ldb (Figure 17b,c). Les protéines Ldb

peuvent former des dimères, permettant ainsi l'interaction avec différents régulateurs transcriptionnel, tel Otx [226] ou la formation de complexes homodimères et hétérodimères avec d'autres protéines avec LIM-HD [227].

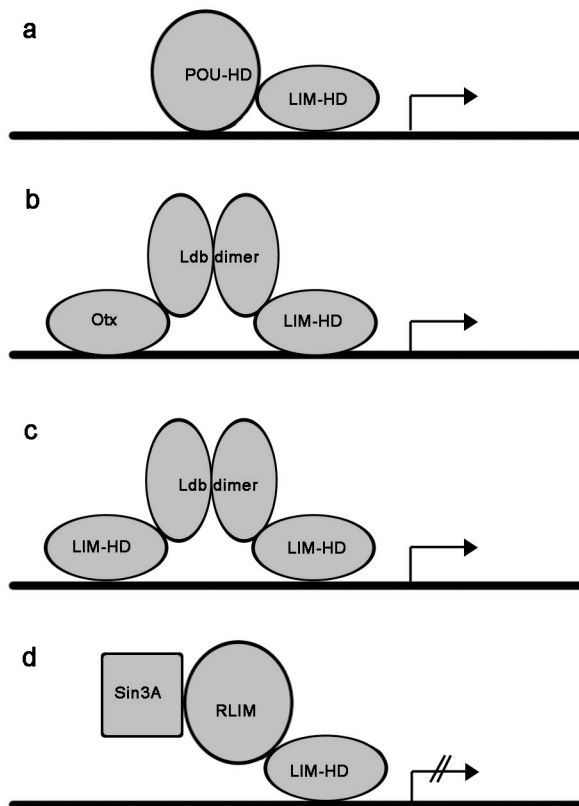


Figure 17. Représentation des différents co-facteurs connus s'associant avec les protéines à LIM homéodomaine. Adapté de Hobert O et Westphal H. Trends Genet. 16: 75-83.

Les 3 types d'interaction précédentes ont pour conséquence l'activation de la transcription des gènes cibles des protéines à LIM-HD. Toutefois, il a été démontré que le domaine LIM peut aussi recruter RLIM (RING finger LIM domain-binding protein), un cofacteur largement exprimé qui lie tout le domaine LIM de toutes les protéines avec LIM-HD testé

et qui permet de recruter le complexe répresseur Sin3a (histone acétylase) (Figure 17d) [228]. Donc, dépendamment du cofacteur présent, les protéines avec LIM-HD peuvent jouer un rôle d'activateur ou de répresseur et ce, de façon tissu spécifique.

1.5.2 Fonctions des protéines avec LIM homéodomaine

Toutes les protéines avec LIM-HD de toutes les espèces analysées possèdent des domaines d'expression dans le SNC. Les études de gains et de pertes de fonction ont permis d'en apprendre beaucoup sur les différentes protéines des 6 différentes classes de protéines avec LIM-HD.

Le groupe LIN-11 (*Lhx1* et *Lhx5*)

Dans le groupe LIN-11, des expériences en gain de fonction chez les embryons de *Xénope* ont permis de déterminer que le gène de mammifère *Lhx1* est un inducteur neural [229]. De plus, chez la souris, l'ablation de ce gène entraîne de graves défauts de formation de la tête [230]. Toutefois, la mort de l'embryon à la mi-gestation empêche une analyse à des stades de développement du SNC plus avancés. L'ablation de *Lhx5*, l'autre gène de mammifère appartenant à cette famille, démontre son importance dans la formation de l'hippocampe chez la souris. Les cellules précurseurs de l'ébauche embryonnaire de cette structure prolifèrent et se spécifient, mais plusieurs sont incapables de se différencier terminalement. Les cellules qui y arrivent sont incapables de migrer

aux endroits appropriés [231]. Donc, *Lhx5* est essentiel pour la prolifération et la migration des précurseurs neuraux de l'hippocampe.

Le groupe LIM-3 (*Lhx3* et *Lhx4*)

Chez les vertébrés, les études d'ablation de *Lhx3* et *Lhx4* ont permis de déterminer leur rôle essentiel lors du développement de l'hypophyse. *Lhx3* et *Lhx4* contrôlent la formation définitive de la poche de Rathke (qui deviendra l'adéno-hypophyse) de façon redondante. Les homéodomaines de *Lhx3* et *Lhx4* sont identiques à 95%. Ces deux protéines peuvent se remplacer l'une l'autre dans certains, mais pas tous les contextes. Les différences de fonctions pourraient être dûes à une association différente de co-facteurs [232-234]. *Lhx3* et *Lhx4* sont aussi impliqués dans le développement des neurones moteurs. Chez les souris chez lesquelles ces deux gènes sont absents, les neurones moteurs ventraux se développent. Toutefois, un changement d'identité survient et les axones de ces neurones sont projetés dans une direction erronée (dorsal) [235]. Donc, *Lhx3* et *Lhx4* sont impliqués dans la spécification des projections axonales, contribuant ainsi à la diversification des connexions des neurones moteurs.

Le groupe Islet (*Isl-1* et *Isl-2*)

Des études de pertes de fonction chez la souris ont permis de déterminer l'importance de *Isl-1* dans le développement des neurones moteurs et du pancréas. Dans les souris *Isl-1*^{-/-},

les cellules destinées à devenir des neurones moteurs meurent par apoptose [236]. De plus, la perte des neurones moteurs affecte la différenciation de certaines populations d'inter-neurones qui ne peuvent se différencier en absence de neurones moteurs exprimant *Isl-1*. Cette protéine est aussi essentielle pour l'induction du pancréas et la génération subséquente des îlots de cellules endocrines [237]. *Isl-2*, qui appartient également à ce groupe, n'est pas très bien caractérisé. Ce gène pourrait être impliqué dans la détermination de l'identité du bassin de neurones moteurs dans la moelle épinière [238] et dans la maturation des photorécepteurs de la rétine [239].

Le groupe Lhx6/Lhx8 (*Lhx6* et *Lhx8*)

Les deux représentants de ce groupe chez les vertébrés, *Lhx6* et *Lhx8* (aussi nommé *Lhx7*) sont exprimé dans le premier arc brachial et dans le cerveau antérieur [240, 241]. Les souris mutantes pour *Lhx6* n'ont aucun défaut cranio-facial alors que 70% des souris mutantes pour *Lhx8* présentent une fissure palatine [242]. De plus, les souris *Lhx6*^{-/-}/*Lhx8*^{-/-} démontrent que les activités redondantes de ces deux protéines sont critiques pour le développement cranio-facial et de la dentition [243].

Le groupe Lmx (*Lmx1a* et *Lmx1b*)

Lmx1a et son paralogue *Lmx1b* sont deux gènes de mammifères impliqués dans une variété d'évènements développementaux. Entre autres, il fut démontré que *Lmx1a* est

essentiel pour la différenciation des progéniteurs neuroépithéliaux en neurones dopaminergiques du diencéphale [244] et que *Lmx1b* est un marqueur pour un sous-type spécifique d'interneurones de la moelle épinière [245].

Le groupe apterous (*Lhx2* et *Lhx9*)

Ce groupe de protéines avec LIM-HD comporte deux membres chez les vertébrés: *Lhx9* et *Lhx2*. *Lhx9* est fortement exprimé dans les interneurones D1 dans la moelle épinière de poulet [246, 247]. Son expression est également forte dans le diencéphale, les vésicules télencéphaliques et le mésencéphale dorsal du cerveau en développement. Persistante tout au long de l'embryogénèse à partir de e10.5 dans le diencéphale et les vésicules télencéphaliques, son expression est transitoire dans le futur cortex (télencéphale) [248]. Le patron d'expression de *Lhx9* et les caractéristiques structurales de cette protéine laissent supposer que ce facteur de transcription serait impliqué dans le contrôle de la différenciation de plusieurs types de neurones [248]. L'ablation de *Lhx9* cause une agénésie des gonades [249]. Bien qu'étant exprimé dans le SNC embryonnaire, aucune anomalie développementale n'est observée dans cette structure, ce qui suppose une activité redondante entre *Lhx9* et le très similaire autre membre du groupe Apterous: *Lhx2* [248, 250]. Dans le SNC, *Lhx9* et *Lhx2* possèdent des patrons d'expression se chevauchant majoritairement à part quelques exceptions: *Lhx2* est exprimé dans les éminences ganglionnaires, les yeux et la tige optique, alors que *Lhx9* ne l'est pas [248]. Donc, ces deux gènes sont compatibles pour remplir des rôles redondants et complémentaires lors de la régionalisation du cerveau et la neurogénèse. Les phénotypes

des souris mutantes pour *Lhx2* démontrent la fonction de ce gène dans le développement du cerveau, des yeux et du sang [154].

1.5.3 *Lhx2*: fonctions dans l'hématopoïèse et dans le développement du SNC

Lhx2 (aussi connu sous le nom de LH2 ou LH2A) est l'orthologue mammifère d'*apterous* chez la drosophile. Initialement cloné à partir d'une librairie de lymphocytes B immatures contre une librairie de lymphocytes B matures [251], il fut également cloné de façon indépendante comme étant un facteur liant la sous-unité α des hormones glycoprotéiques [225]. *Lhx2* possède des fonctions et des patrons d'expression qui ont été fortement conservé durant l'évolution chez les différentes espèces étudiées. En effet, des études d'expression ectopique et de sauvetage ont démontré que la protéine *Lhx2* d'origine humaine peut remplacer *apterous* [252]. *Apterous* et *Lhx2* sont exprimé chez l'embryon dans le SNC, la moelle épinière, dans l'épithélium olfactif et dans les membres de leur espèce respective [219]. Ces importantes similarités illustrent bien comment des organismes phylogénétiquement éloignés utilisent des mécanismes et des protéines similaires afin de contrôler des processus développementaux de base. L'analyse de la souris *Lhx2*^{-/-} a permis de déterminer que *Lhx2* est nécessaire pour le développement des érythrocytes, des yeux et du cerveau antérieur [154]. Au niveau de l'érythropoïèse, le défaut survient entre e13 et e15, soit dans la phase d'érythropoïèse définitive dans le foie fœtal. À cette période de développement, une baisse de l'hématocrite est observée. Le volume du foie des embryons *Lhx2*^{-/-} étant réduit, ceci suggère un défaut dans la production d'érythrocyte. La baisse de progéniteurs érythrocytaires observée confirme

que l'anémie chez les mutants homozygotes est due à une production anormale plutôt qu'à une augmentation de la destruction des érythrocytes. À e15.5, la grande majorité des érythrocytes présents sont de types matures. Toutefois, leur nombre est significativement réduit, ce qui indique que l'érythropoïèse est inefficace plutôt que complètement bloquée [154]. Il fut également démontré que le défaut d'érythropoïèse n'est pas cellule-autonome, mais bien dû à un environnement hépatique déficient où se développe une fibrose spontanée et progressive [253]. L'anémie cause la mort des embryons aux environs du jour 16 [154]. Mentionnons également que l'expression ectopique de *Lhx2* peut immortaliser les cellules souches/progénitrices hématopoïétique dérivées de la moelle osseuse [254] et peut promouvoir l'auto-renouvellement de cellules progénitrices hématopoïétique dérivées de cellules souches embryonnaires [255]. *Lhx2* semble également jouer un rôle dans la spécification et la maintenance des cellules souches des follicules pileux chez la souris [256]. *Lhx2* est requis pour maintenir l'état non différencié et la croissance des cellules souches épithéliales destinées à devenir des poils [256].

Au niveau du SNC, l'étude des souris *Lhx2*^{-/-} a permis de déterminer que ce gène est nécessaire au développement des yeux [154]. Les études à ce jour ont déterminé que l'expression de *Lhx2* est détectée dès e8.5 dans l'ébauche de ce qui deviendra la vésicule optique et est forte dans la rétine neurale tout au long du développement embryonnaire. Après la naissance, son expression dans la rétine est restreinte au niveau de la couche interne nucléaire. Le développement des yeux chez les embryons mutants homozygotes est normal jusqu'à la spécification de la vésicule optique. Toutefois, le développement s'arrête avant la formation de la cupule optique. *Lhx2* est donc nécessaire pour l'invagination de la vésicule optique pour former la cupule optique [154]. Étant donné

que les embryons *Pax6*^{-/-} présente également un arrêt de la croissance de l'oeil suite à la formation de la vésicule optique, il fut postulé que *Lhx2* pouvait peut-être réguler l'expression de *Pax6* et que ce dernier pourrait être absent à ce stade. Toutefois, il fut démontré que l'expression de *Pax6* est maintenue dans cette structure chez les mutants *Lhx2*. Inversement, l'expression de *Lhx2* est normale dans les souris mutantes *Pax6*. Ces résultats suggèrent donc que *Lhx2* et *Pax6* sont requis indépendamment pour le développement normal des yeux chez la souris [154]. Par contre, dans l'ectoderme de surface, l'expression de *Pax6* est perdue chez les souris *Lhx2*^{-/-}. Ce qui laisse suggérer que *Lhx2* serait requis pour l'initiation ou la maintenance de l'expression de *Pax6* dans l'ectoderme qui formera éventuellement la lentille [154].

L'étude des souris *Lhx2*^{-/-} a également permis de révéler des fonctions critiques dans la formation du cerveau antérieur embryonnaire. Dans cette structure, *Lhx2* est plus particulièrement exprimé dans le néocortex, l'archicortex, les ganglions de la base, le thalamus dorsal et l'hypothalamus. Son expression est également présente dans le cerveau médian dorsal et le cerveau postérieur rostral. Dans le cortex cérébral, les transcrits de *Lhx2* sont détectés dans la ZV et dans la zone de mantle alors qu'ils sont seulement présents dans les couches externes du cerveau médian et postérieur [154]. Les embryons mutants pour *Lhx2* présentent une réduction importante dans la taille du néocortex et une absence d'archicortex (région comprenant l'ébauche de l'hippocampe) alors que le diencephale n'est pas affecté (Figure 18) [154].

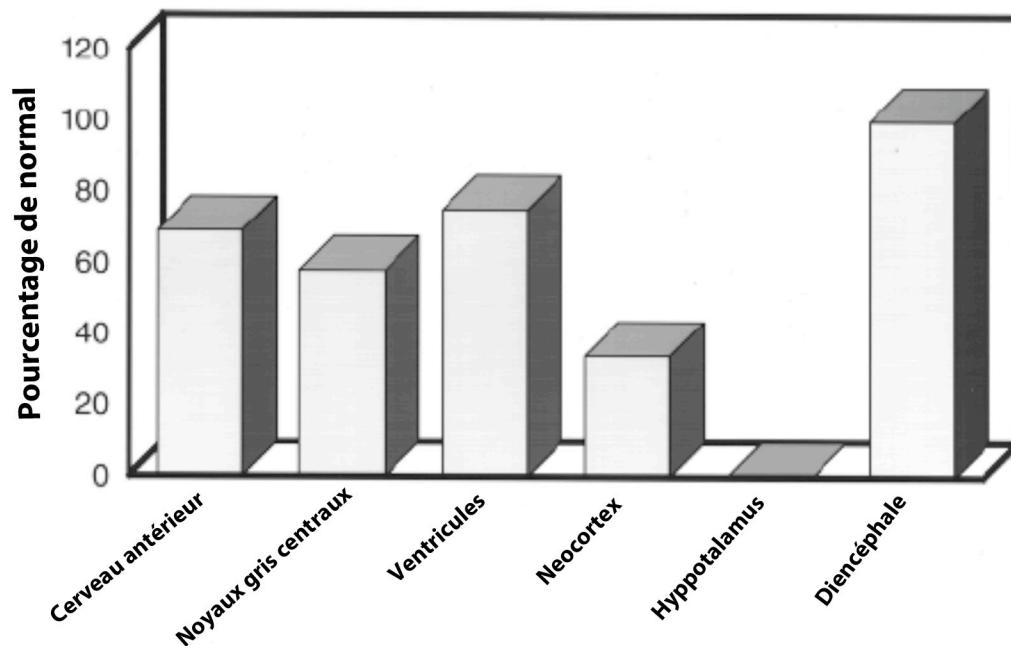


Figure 18. Analyse morphométrique comparative de la région du cerveau antérieur des embryons de type sauvage et *Lhx2* mutants à e12.5. Cette analyse démontre l'absence d'hippocampe et la diminution du volume du cerveau antérieur, des noyaux gris centraux et du néocortex. Le diencephale et les ventricules ne sont pas significativement affectés. Adapté de Porter et al. (1997). *Development* 124: 2935-2944.

Des tests d'incorporation de BrdU (prolifération) et des essais TUNEL (mort cellulaire) ont démontré que cette diminution de taille était due à une baisse de prolifération plutôt qu'une augmentation de la mort cellulaire. Le fait que le néocortex et l'archicortex ne soient pas affectés de la même façon par l'absence de *Lhx2* pourrait soit indiquer la présence d'une protéine qui compense pour la perte d'activité de *Lhx2* dans le néocortex, soit signifier que sa fonction diffère selon les tissus. Ces données laissent supposer que l'absence de *Lhx2* entraîne un blocage de prolifération des précurseurs neuronaux. De plus, le fait que *Lhx2* soit également exprimé dans la couche extérieure de cortex cérébral

en développement peut indiquer que cette protéine joue aussi un rôle dans le contrôle de la différenciation neuronale [154]. Le rôle de *Lhx2* dans le néocortex (qui est le composant majeur du télencéphale dorsal) a particulièrement été étudié. Cette région est composée principalement de neurones pyramidaux qui sont générés dans la zone proliférative ventriculaire corticale et d'interneurones qui proviennent des éminences ventrales [34]. Il fut démontré qu'au niveau de la ligne médiane dorsale (l'autre composant du télencéphale dorsal) la mutation *Lhx2* entraîne une perte du cortex au profit d'une expansion du plexus choroïde et du ourlet cortical (cortical hem) [257]. Des études utilisant des chimères et des mosaïques génétiques ont démontrés que *Lhx2* joue un rôle de gène sélecteur afin d'imprégner aux cellules progénitrices neurales une destinée corticale et d'inhiber les destinées alternatives (hem et anti-hem) [258]. De plus, *Lhx2* fut identifié comme un gène déterminant dans le choix de la spécification des progéniteurs télencéphaliques pour devenir des cellules du néocortex ou du cortex olfactif [259]. En effet, lorsque *Lhx2* est inactivé spécifiquement dans les cellules progénitrices de la ZV du télencéphale dorsal (cellules exprimant *Emx1*) à e10.5, on assiste à la génération d'un cortex olfactif à la place du néocortex latéral. L'ablation de *Lhx2* dans ces progéniteurs à e11.5 ne génère pas de cortex olfactif ectopique, ce qui indique que *Lhx2* régule cette destinée cellulaire régionale sur une période de temps précise qui se termine lorsque les cellules neuroépithéliales se différencient en glie radiale [259]. Le développement embryonnaire du système olfactif est également perturbé par l'absence de *Lhx2*. En effet, on retrouve une augmentation de l'apoptose des neurones olfactifs et leur différenciation est incomplète. De plus le nerf olfactif se développe incorrectement et ne rejoint pas le télencéphale rostral [260, 261]. Il fut également démontré que *Lhx2* est requis pour la

morphogénèse du bulbe olfactif et pour les projections initiales des axones des neurones olfactifs qui formeront la voie olfactive latérale [262]. Finalement, *Lhx2* joue également un rôle majeur dans le développement de l'hypophyse. Il a été démontré que cette protéine est fortement exprimée dans le diencephale ventral, incluant l'infundibulum (région d'où dérive la portion postérieure de l'hypophyse). L'absence de *Lhx2* empêche l'évagination du neuroectoderme de la partie ventrale du diencephale, ce qui cause un défaut important dans la formation de l'hypophyse postérieure [263].

Chapitre 1

Introduction: Section 6

Hypothèse et objectifs

1.6.1 Hypothèse de recherche

Lhx2 est un gène exprimé très tôt et fortement dans le système nerveux central en développement. Son ablation génétique chez la souris résulte en un arrêt de la croissance de l'oeil au stade de la vésicule optique et en une importante réduction du volume du télencéphale [154]. La sévérité des phénotypes mutants observés laisse croire que l'action de Lhx2 est critique à partir d'un stade très primitif du développement de ces organes.

L'expression de Lhx2 est très forte au niveau de cellules qui donneront naissance aux yeux et au télencéphale. Lors du développement de l'oeil, un nombre restreint de facteurs de transcription sont nécessaires pour mener à la formation d'un oeil mature. Parmi ce groupe Lhx2 est un des premiers à être exprimé dans la région qui donnera naissance à l'oeil. De plus, Lhx2 est aussi fortement exprimé dans le cerveau antérieur qui donnera naissance au télencéphale. Il est donc raisonnable de spéculer que ce facteur de transcription aurait un rôle majeur à jouer dans la formation de ces organes. Toutefois, aucun mécanisme moléculaire impliquant Lhx2 dans ce contexte développemental n'a été identifié à ce jour.

La formation du système nerveux central dépend initialement de la prolifération contrôlée des cellules souches neurales. Le maintien de l'état non-différencié et du potentiel prolifératif de ces cellules sont responsables de la formation normale des yeux et du télencéphale. En absence de Lhx2, le volume du télencéphale est réduit de façon importante et la formation de l'oeil s'arrête à un stade très primitif. Lhx2 pourrait donc avoir un rôle important à jouer dans la prolifération normale des cellules souches du système nerveux central.

Nous posons donc l'hypothèse que le facteur de transcription Lhx2 est requis pour les premières étapes du développement de l'oeil et du télencéphale en contrôlant l'expression de gènes essentiels à la formation de ces organes et à la prolifération des cellules souches neurales embryonnaires.

1.6.2 Objectifs de recherche

Cette thèse avait 3 objectifs principaux. Premièrement, nous voulions déterminer le mécanisme moléculaire par lequel Lhx2 exerce son contrôle sur le développement de l'oeil. Deuxièmement, nous voulions caractériser les effets d'une absence de Lhx2 sur le télencéphale en développement et déterminer le mécanisme moléculaire par lequel ce facteur de transcription exerce son action. Finalement cette étude avait aussi pour objectif de déterminer si Lhx2 est requis pour la prolifération et le maintien de l'état non-différencié des cellules souches neurales embryonnaires.

Tableau I

Description des phénotypes neuronaux associés aux différents gènes mutés de la voie Notch

Gènes	Phénotypes neuraux
Notch1	Différenciation neuronale précoce, Hes5↓, Mash1↑, NeuroD↑ Fréquence de formation de neurosphères réduites à e10.5
Notch2	Mort de cellules neuronales à grande échelle à e10
Dll1	Production préférentielle de types neuronaux précoces dans le télencéphale ↑neurogénèse et ↓cellules gliales dans les neurosphères en différenciation
CBF1	Différenciation neuronale précoce Hes5↓, Mash1↑, NeuroD↑, Dll1↑ Pas de formation de neurosphères à e8.5
Hes1	Différenciation neuronale précoce Hes5↑
Hes1, Hes3 Hes5	Différenciation neuronale précoce sévère
PS1	Différenciation neuronale précoce, Hes5↓, Dll1↑ Diminution de la fréquence de formation de neurosphères à e14.5

Tableau I.II

Molécules impliquées dans la formation de l'oeil embryonnaire

Évènement lors du développement de l'oeil	Molécules impliquées
Spécification du champ rétinien	FGFs; Wnts; BMPs
Séparation du champ rétinien et structuration proximo-distal de la vésicule optique (VO)	Cyclops; SHH
Structuration de la VO	SHH; FGFs; Activin; BMP6; RA
Invagination de la VO en cupule optique (CO)	RA
Structuration antéro-postérieur et dorso-ventral de la (CO)	Nodal; FGFs; SHH; BMPs; RA; DAN Ventroptin; Follistatin; Chordin; Noggin

Chapitre 2

Article #1

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,*}

Publié online le 12 Decembre 2008

Developmental Biology 327 (2009) 541–550

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:

Le chapitre 2 est un article où nous démontrons le rôle essentiel de Lhx2 dans les premières étapes de la spécification du champ rétinien qui mèneront à la formation de l'oeil mature. Nous révélons également que Lhx2 et Pax6 collaborent pour permettre l'activation synergique du gène *Six6*, qui est essentiel au développement de l'oeil.

Marie-Pier Champagne, ancienne étudiante à la maîtrise a participé aux expériences d'immunoprécipitation de chromatine et aux essais luciférase. J'ai contribué à toutes les étapes de la réalisation de cet article.

Abstract

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 progenitor/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.

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 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 (NE) 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 showed 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 immortalized 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 progenitor/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 allowing initiation of retinal-determinant genes

expression, and how later *Lhx2* cooperates with *Pax6* to establish definitive retinal identity and promote cellular 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) and *Lhx2* mutant mice from Heiner Westphal (National Institute of Health, Bethesda). 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 µg 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 $\mu\text{g/ml}$; SIGMA), Gentamycin (25 $\mu\text{g/ml}$; 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 $\mu\text{g/ml}$. 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 and immunohistochemistry

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). For immunohistochemistry labeling, 4% PFA/PBS fixed retinal spheres were equilibrated in sucrose and embed in OCT compound. Frozen sections were analyzed by using the Vectastain[®] ABC kit (Vector) according to the manufacturer instructions. Peroxidase substrates used is the Vector[®] DAB (Sigma). Observations were made under microscope (Leica DMRE, Leica Microsystems) and images were captured with a digital camera (Retiga EX; QIMAGING; with OpenLab, ver.3.1.1 software; Open-Lab, Canada). Primary antibody used is the rabbit anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling).

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 EF1a-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.

Virus

Mouse *Six6* cDNA (Jean et al., 1999) was cloned into EF.V.CMV.GFP (L. Cheng, Johns Hopkins University) and transfected in 293T cells with helper vectors (F. Boudreau, Sherbrooke University) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Viral supernatants were ultra-centrifuged and exposed to single cell suspensions O/N. Aggregates were dissociated to single cells and plated at 2 000 cells/ml in NSC media for 1 week. GFP positive retinal spheres were visualized using a fluorescence-mounted inverted microscope (LEICA).

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 *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* overlap-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 *b-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 assay 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* is required for *Six6* expression in retinal progenitor/stem cells**

We previously reported on the isolation and characterization of 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 reduce 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. 5B and data not shown). To identify the underlying cellular defect, we first measured the mitotic index (PH3⁺/DAPI⁺ cells) in WT and *Lhx2*^{-/-} colonies. No significant differences were found between both genotypes (data not shown). The Ki67 antigen is expressed at all phases of the cell cycle, but not in G0, and is used as a marker for progenitors (Scholzen and Gerdes, 2000; Endl et al., 2001). To analyze the cell cycle, spheres from both genotypes were pulse with Bromodeoxy-Uridine (BrdU) for 60 min and analyzed on sections with antibodies against BrdU and Ki67 (Chenn and Walsh, 2002; Klezovitch et al., 2004). 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). We also measure the frequency of apoptotic cells (activated caspase-3⁺/DAPI⁺ cells) and found a significant increase in the number of apoptotic cells in *Lhx2*^{-/-} retinal spheres (Fig. 5H).

To test if this system was relevant to study gene regulation, we performed Real-time PCR analysis on WT and *Lhx2*^{-/-} 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 could 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 (Gestri et al., 2005; Li et al., 2002). We compared cyclin-dependent kinase inhibitors (i.e. *p21^{Cip1}*, *p27^{Kip1}* and *p57^{Kip2}*) expression in WT and *Lhx2^{-/-}* retinal colonies, micro-dissected e9.25 forebrains, and micro-dissected e9.0 optic vesicles by Real-time PCR. We found that the expression of all 3 cyclin-dependent kinase inhibitors was increased in *Lhx2^{-/-}* samples *in vitro* and *in vivo*, with the most dramatic and consistent up-regulation observed for *p27^{Kip1}* (Fig. 5F and G).

Over-expression of Six3 or Six6 in Medaka or *Xenopus* embryos resulted in increased retinal progenitor cells proliferation and ectopic retinal tissue formation (Bernier et al., 2000; Loosli et al., 1999; Zuber et al., 1999). We rationalized that reduced expression of *Six6* and *Six3* in *Lhx2^{-/-}* retinal colonies may explain the proliferation defect. To test this, we over-expressed Six6/GFP or GFP alone in WT and *Lhx2^{-/-}* retinal colonies using lentiviruses. We observed that cells infected with multiple Six6/GFP viral copies entered into apoptosis within 48 hours. Similar results were obtained with a Six3/GFP lentivirus. However, using lower viral concentrations, we could achieve conditions where the Six6/GFP virus was non-toxic. In clonal dissociation assays, we found that *Lhx2^{-/-}* retinal colonies infected with the Six6/GFP virus were larger than those infected with the GFP virus after 1 or 2 passages (GFP virus: 194 +/- 14µm; Six6/GFP virus: 230 +/- 24µm, $P = 0.02$). These results suggest that restoring *Six6* expression in *Lhx2^{-/-}* retinal colonies can partially rescue the growth defect, and reveal that Six3/Six6 gene-dosage is extremely sensitive in this particular cellular context. Collectively, our data show that *Lhx2^{-/-}* retinal

progenitor/stem cells generate smaller colonies due to a proliferation defect and elevated apoptosis, and suggest that the reduced proliferation phenotype is link to *Six6* and *Six3* down-regulation and increased cyclin-dependent kinase inhibitors activity.

***Pax6* is required for *Six6* expression in retinal progenitor/stem cells**

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. 6A). 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. 6B). These results reveal that *Pax6* is genetically required for *Six6* expression in retinal progenitor/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. 7). 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. 7). 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. 7). 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). Similarly, *Six6* expression is apparently normal in the optic vesicle of *Pax6*-mutants (Jean et al., 1999). In contrast, expression of *Pax6*, *Rx*, *Six3* and *Six6* is absent or delayed in the retina field and highly reduced in the optic vesicle of *Lhx2* mutants. *Six3* expression is also reduced in the telencephalic vesicles of *Lhx2* mutants (see Fig. 3B). In this context, it is noteworthy that an inverse genetic relationship has been proposed in the zebrafish forebrain, where *Six3* apparently regulates *Lhx2* expression and where *Lhx2* over-expression could overcome *Six3* knockdown (Ando et al. 2005). However, this genetic relationship is most unlikely in the mouse visual system. Hence, while *Six3* is expressed earlier than *Lhx2* in the anterior neural plate (Oliver et al. 1995), its expression in the presumptive retina field occurs 6-12 hours after that of *Lhx2* and *Rx*.

At first glance, our results suggest that *Lhx2* may activate directly *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, over-expression of *Lhx2* alone in retinal

stem cells, while inducing *Six6* expression, had little impact on *Six3* or *Pax6* expression. Furthermore, there is no report of eye-inducing activities of *Lhx2* in other model organisms. Thus, *Lhx2* may not be sufficient to activate the expression of “upstream regulators” by its own in gain-of-function experiments, but is clearly required for gene expression initiation in the retina field.

One possible alternative interpretation of these observations 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 evaluate.

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 cell 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).

One of the most striking phenotype of *Lhx2* mutants is the reduced optic vesicle and forebrain size owing to reduced cell proliferation (Porter et al. 1997). In *Lhx2*-null retinal progenitor/stem cell cultures, we found that proliferation was highly reduced and that progenitors were stalled at the G1 phase of the cell cycle at higher frequencies than normal. Apoptosis was also elevated compare to WT controls. The observed cell cycle phenotype correlated with reduced *Six3* and *Six6* expression and increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in retinal progenitor/stem colonies, e9.25 forebrains and e9.0 optic vesicles of *Lhx2* mutants. These observations indirectly support the hypothesis that *Six3* and *Six6* can repress cyclin-dependent kinase inhibitors expression (Gestri et al., 2005; Li et al., 2002). They also highlight the unanticipated opposite function of *Pax6* in repressing retinal progenitor/stem cells proliferation through

activation of cyclin-dependent kinase inhibitors expression (Duparc et al. 2007). The complexity of the system is further revealed by the simultaneous requirement for *Pax6* in the maintenance of *Six6* expression in retinal colonies (this study). The biological significance of the apparent genetic antagonism between *Lhx2* and *Pax6* in optic vesicle growth is unclear at the moment but could allow the establishment of equilibrium in NE progenitors cell cycle kinetics.

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.

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.

Ando, H., Kobayashi, M., Tsubokawa, T., Uyemura, K., Furuta, T. and Okamoto, H., 2005. Lhx2 mediates the activity of Six3 in zebrafish forebrain growth. *Dev. Biol.* 287, 456-68.

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.

Chenn, A., Walsh, C.A., 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297, 365-9.

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.* 300, 647-655.

Endl, E., Hollmann, C., Gerdes, J., 2001. Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. *Methods Cell Biol.* 63, 399-418.

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.

Klezovitch, O., Fernandez, T.E., Tapscott, S.J., Vasioukhin, V., 2004. Loss of cell polarity causes severe brain dysplasia in *Lgl1* knockout mice. *Genes Dev.* 18, 559-71.

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.

Lien, W.H., Klezovitch, O., Fernandez, T.E., Delrow, J., Vasioukhin, V., 2006. alphaE-catenin controls cerebral cortical size by regulating the hedgehog signaling pathway. *Science* 311, 1609-12.

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.

Scholzen, T., Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311-22.

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). Non-specific background signal is observed in the ocular mesenchyme in (D). (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 (E), which was set to 1. **, $P < 0.01$.

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 b-globin (bMajor) 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* is required for *Six6* expression in retinal progenitor/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* and *Six6* (F), and *p21*^{Cip1}, *p27*^{Kip1} and *p57*^{Kip2} expression levels in *Lhx2*^{-/-} (n = 5) and WT (n = 5) retinal spheres (F), *Lhx2*^{-/-} (n = 2) and WT (n = 2) e9.0 optic vesicles (O.V.), and *Lhx2*^{-/-} (n = 2) and WT (n = 2) e9.25 forebrains (n = 2) (G). Immunohistochemistry on *Lhx2*^{-/-} and WT retinal sphere sections using an anti-activated caspase-3 antibody. Sections were mounted with DAPI to calculate the number of caspase-3⁺ cells over the total number of DAPI⁺ cells/section (H). *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01.

Fig. 6. *Pax6* is required for *Six6* expression in retinal progenitor/stem cells. 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 (A). 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 the internal control (ctl) for normalization (B). *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01.

Fig. 7. *Lhx2* and *Pax6* can synergistically activate *Six6* expression in retinal progenitor/stem cells. An experimental system was designed to electroporate plasmid DNA into cell suspensions of dissociated retinal spheres (A). After 36 hours of culture on matrigel, cells were sorted for GFP expression by fluorescence activated cell sorting (FACS) and RNA was isolated from the GFP- and GFP+ cell populations (n = 2). Quantification of *Lhx2*, *Pax6*, *Six3* and *Six6* expression in FACS purified cells using Real-time PCR. *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 (B). 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).

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

Table 1. Comparative gene expression between WT and *Lhx2*^{-/-} e9.0 forebrain. Six embryos of each genotype were analysed for each gene using Illumina BeadArray™ technology. $P < 0,05$. In bold are well know eye development regulators affected by the *Lhx2* mutation.

Table 1

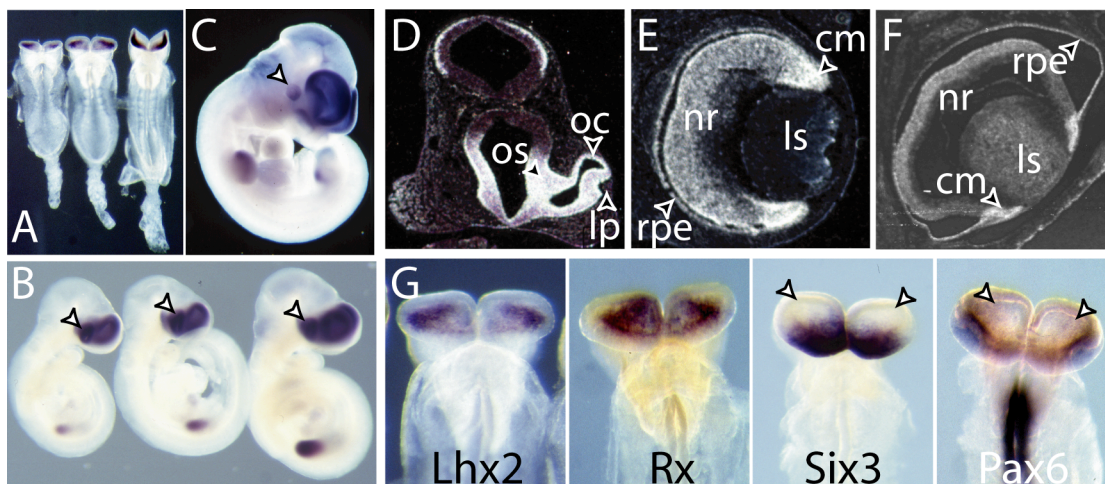


Figure 1

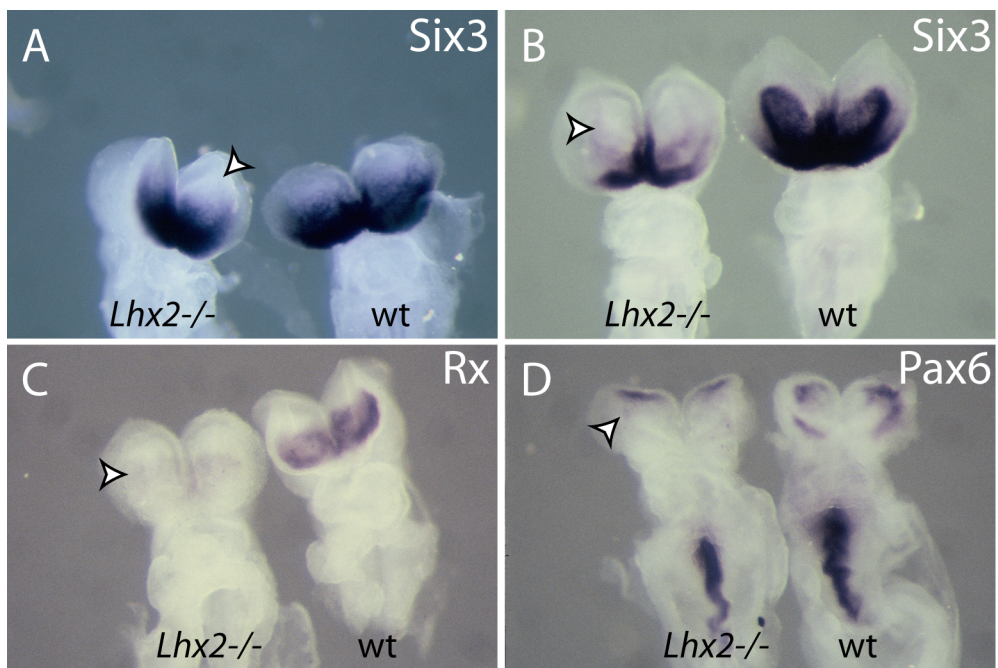


Figure 2

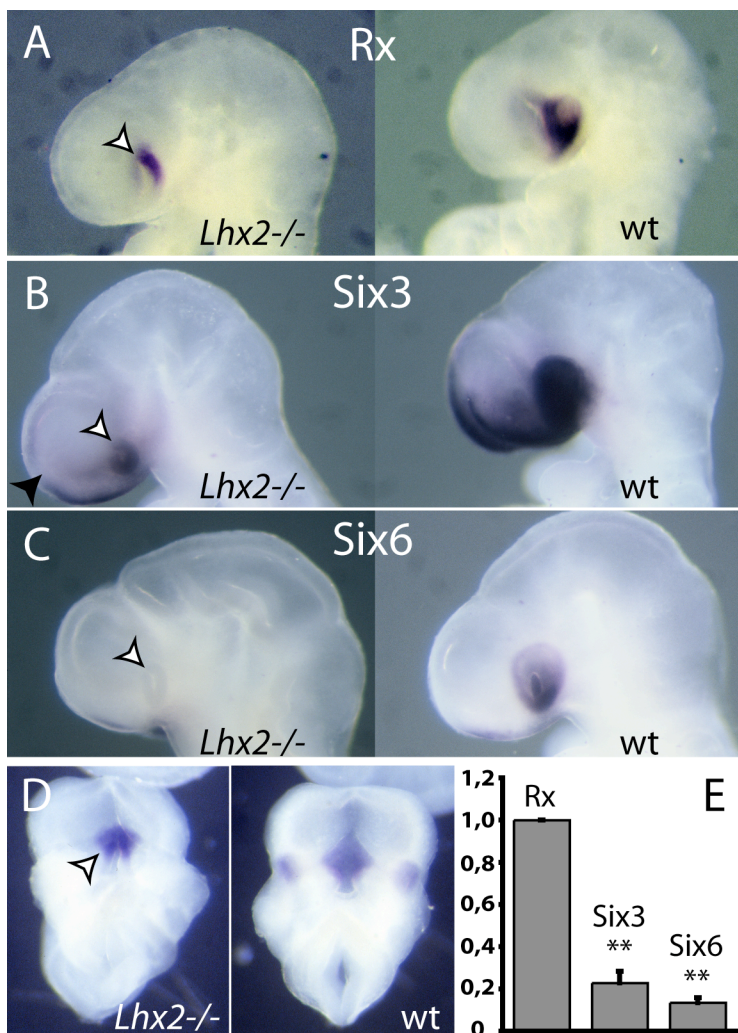


Figure 3

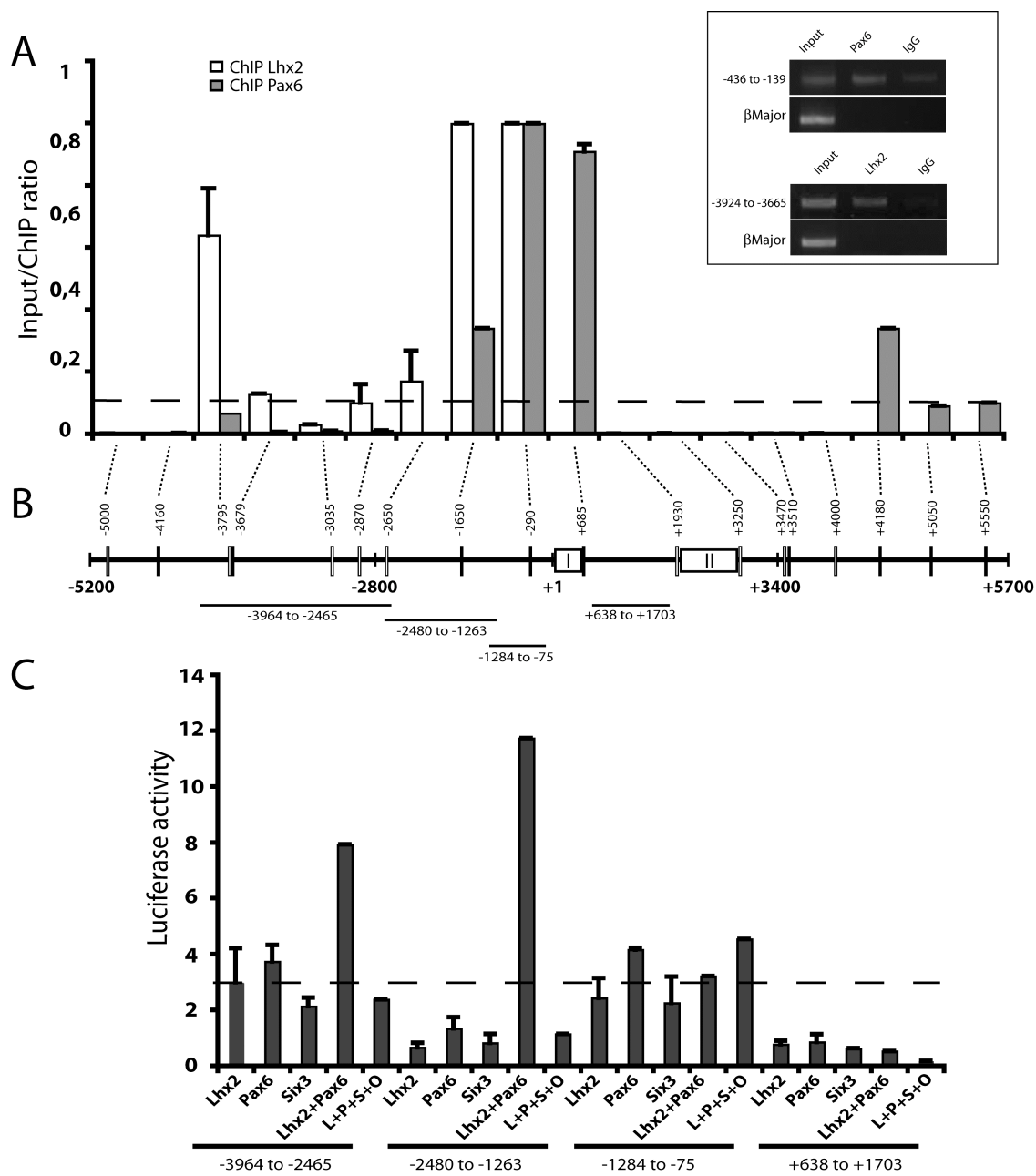


Figure 4

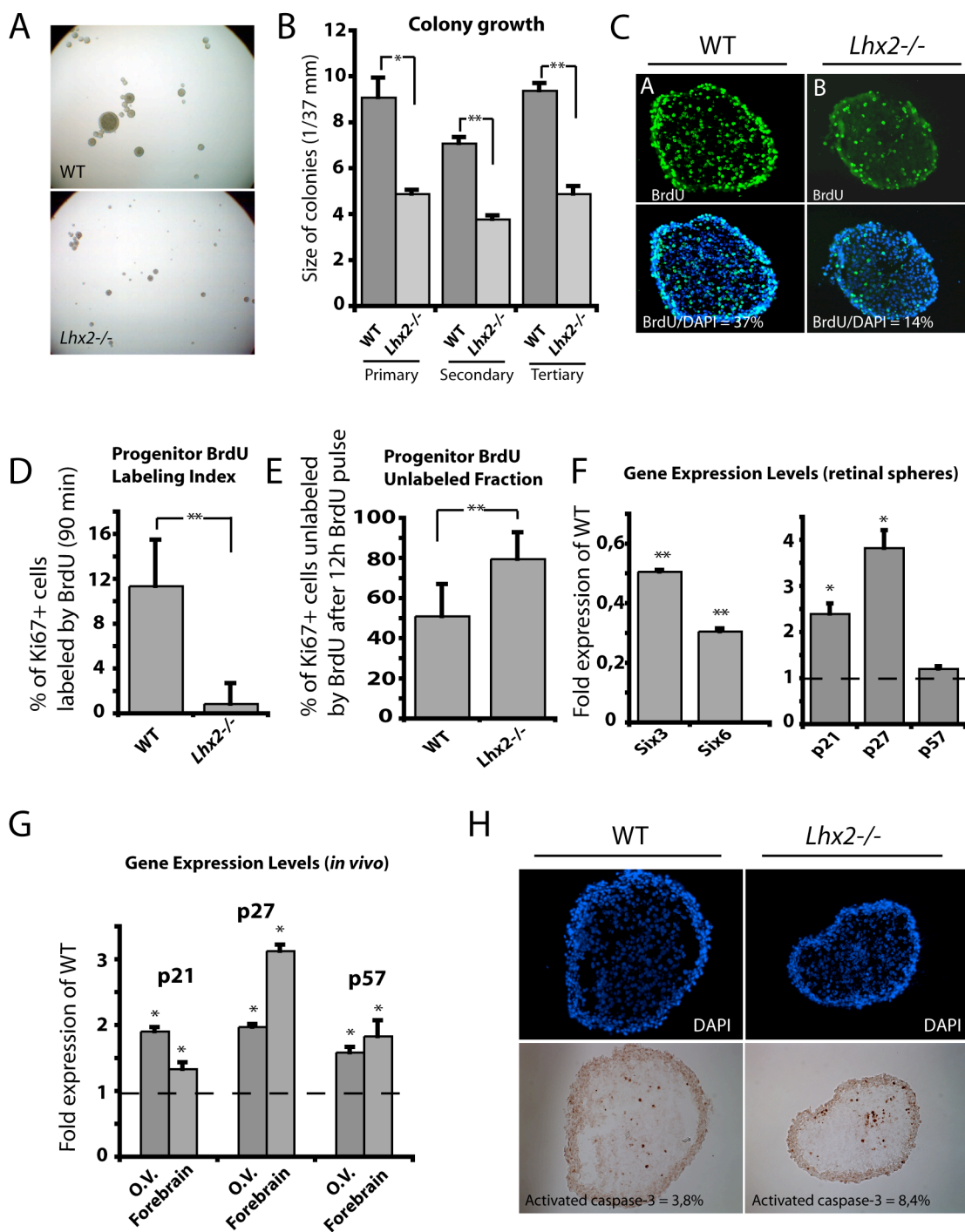


Figure 5

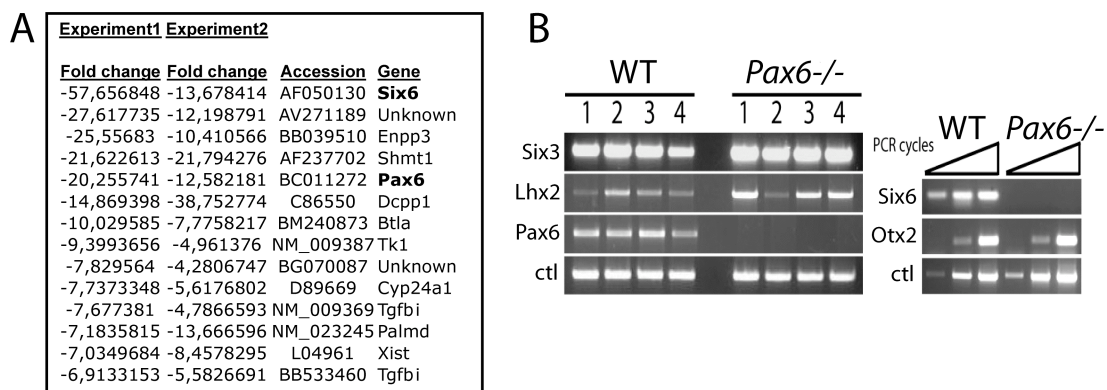


Figure 6

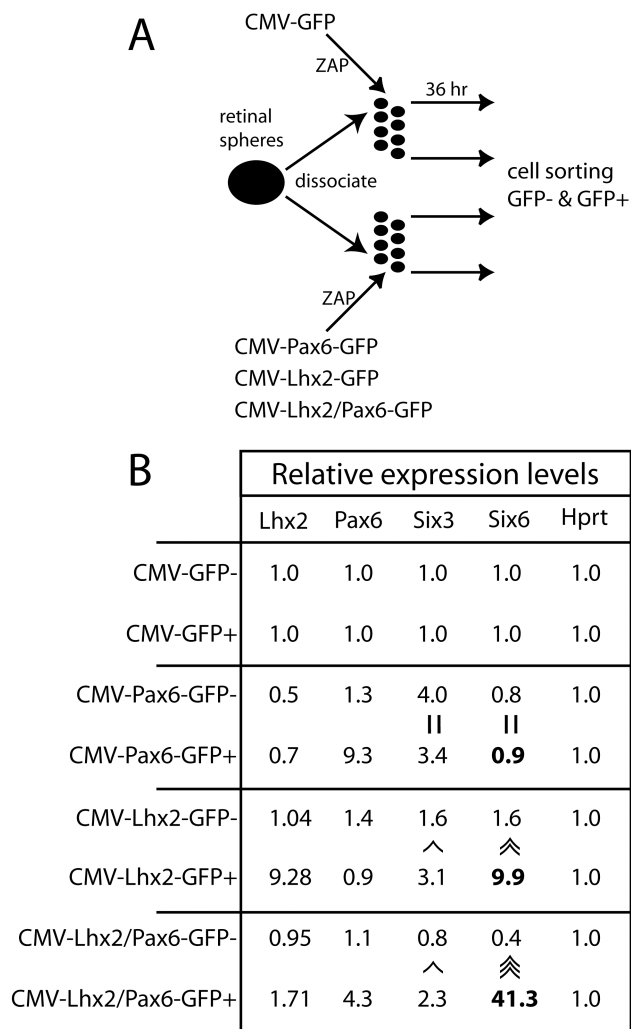


Figure 7

Chapitre 3

Article #2

Lhx2 promotes Notch activation and radial glia cell maintenance during cortical development

Nicolas Tétreault¹, Wassim Chatoo¹, and Gilbert Bernier^{1,2,*}

en préparation

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

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

*Corresponding author:

Le chapitre 3 contient un article démontrant le rôle de Lhx2 dans le contrôle de l'état non différencié des cellules progénitrices neurales et de la neurogénèse dans le néocortex. Les observations faites dans cet article révèlent pour la première fois l'implication de Lhx2 dans le contrôle de la voie de signalisation Notch. Ce contrôle se ferait via la répression transcriptionnelle de DNER, un ligand atypique de la voie Notch.

Wassim Chato, ancien étudiant au doctorat a participé aux expériences d'immunoprécipitation de chromatine révélant la liaison de Lhx2 au promoteur de DNER. J'ai contribué à toutes les étapes de ce manuscrit allant de la réalisation des expériences jusqu'à la rédaction du manuscrit.

Abstract

Targeted deletion of the *Lhx2* gene, encoding a LIM-homeobox transcription factor, results in developmental growth arrest of the eye primordium and in severe hypoplasia of the neocortex. Although the function of *Lhx2* in patterning the cortical heme has been extensively studied, the molecular mechanism by which *Lhx2* regulates neuroepithelial progenitors fate in the CNS is poorly understood. Herein, we report that *Lhx2*-deficient neuroepithelial progenitors of the eye primordium show increased neurogenesis, reduced self-renewal, and altered Notch-related signaling. In the neocortex, the radial glia cell phenotype is lost at the expense of neuronal and intermediate progenitor cell fates. These abnormalities were linked to the ectopic expression of the atypical Notch-ligand DNER in radial glia cells. Hence, DNER over-expression reduces Notch signaling and neuroepithelial progenitors self-renewal. This work uncovers a novel mechanism linking *Lhx2* deficiency to Notch signaling and radial glia cell maintenance during mouse development.

Introduction

The mammalian telencephalon originates from the anterior forebrain and constitutes the most complex and divergent of all the structures in the vertebrate central nervous system (CNS) (1). Initially, the telencephalon is composed of only a single cell layer, termed the neuroepithelium (NE) (2). Following the early patterning events (reviewed elsewhere (1,3,4), the telencephalon is partitioned into dorsal and ventral territories. The dorsal part gives rise to the cortical proliferative ventricular zone (VZ) from which the neocortex originates (2). Early in corticogenesis, the VZ is composed of NE cells that divide symmetrically to produce two identical proliferative daughter cells. Later, these NE cells will differentiate into BLBP+ radial glia cells (RGC) that divide asymmetrically and generate one proliferative RG cell and a more differentiated basal progenitor or a cortical neuron (5,6). To achieve the great level of complexity of the developing brain, neural stem cells proliferation and differentiation must be tightly regulated. However, the mechanisms underlying these processes are still not completely understood.

Lhx2 is strongly expressed in the cortical VZ in a graded manner (high-medial, low-lateral) (7). This LIM homeodomain-containing transcription factor can activate or repress gene transcription by binding directly to DNA via the homeodomain. The modulation of its effect on transcription is mediated by association with co-activators or co-repressors through the LIM domain (8). Targeted disruption of *Lhx2* had shown that it is necessary for proper development of the blood, eye and telencephalon (9). *Lhx2*^{-/-} embryos lack definitive erythropoiesis and forced Lhx2 expression can immortalize multipotent hematopoietic progenitor/stem cells (10). We recently elucidated the function of Lhx2 in the earliest steps of eye development (11). We showed that Lhx2 is required

for the initial specification of the retinal field. *Lhx2* also cooperates with *Pax6* to promote the transcription of *Six6* in retinal progenitor/stem cells (11). In the telencephalon, *Lhx2* is essential for the specification of the cortical hem. It does so by acting as a selector gene that specifies cortical cell identity (12). Furthermore, it has been shown that *Lhx2* regulates fate decision among the cortical progenitors of the *Emx1* lineage and is necessary for progenitors of the neocortex to acquire a definitive neocortical identity (13). So, the roles of *Lhx2* in patterning of the brain and cell fate determination begin to be well understood, but how *Lhx2* regulates neural stem cells functions at the molecular level remains elusive.

Recently, a link between *Lhx2* and “stemness” has emerged. An elegant study showed that overexpression of *Lhx2* in epithelial compartments of the epidermis and hair follicle suppressed cell differentiation, suggesting that *Lhx2* is required to maintain epidermal cells undifferentiated (14). Furthermore, expression of *Lhx2* under the control of a tet-on system in embryonic stem cells directly induces self-renewal of a distinct population of hematopoietic progenitor cells (15). In the CNS, *Lhx2*-deficient embryos displayed reduced proliferation of the neural stem/progenitor cells in the VZ of the lateral ventricle without affecting the cell viability (9). Additionally, it was previously hypothesized that *Lhx2* may participate in neuronal differentiation since its expression is also seen in the outer layer of the developing cortex (16). Thus, *Lhx2* seems to be a key player in the control of the proliferation and maintenance of neural stem/progenitor cells of the cortical VZ. However, the underlying molecular mechanisms remain elusive.

Notch signalling is critical for neural stem/progenitor cells maintenance in the developing CNS (17-18). Following Notch activation by one of its ligands (e.g. *Delta1*), the Notch

intracellular domain (NICD) translocate to the nucleus where it forms an activator complex with Rbpj (CBF1). This complex induces the expression of transcription factors, such as Hes1 and Hes5, which repress proneural gene transcription, thus inhibiting neuronal differentiation. It is now clear that Notch activation maintains neural stem-progenitor cells, whereas inhibition of Notch signaling causes a depletion of the neural stem/progenitor cell pool (19,20). A striking example of the importance of this pathway is revealed in the triple *Hes1*^{-/-}; *Hes3*^{-/-}; *Hes5*^{-/-} knock-out (KO) mice, which display a near complete loss of neuroepithelial progenitors in all region of the developing CNS (21). In these mice many RGCs were maintained and proliferate almost normally in the telencephalon. On the other hand, using Rbpj conditional KO mice, it was recently showed that Notch signaling is necessary for the maintenance of telencephalic RG cells (22). Furthermore, in addition to the well-characterized canonical Notch ligands, this pathway can be modulated by non-canonical (atypical) Notch ligands.

Among these proteins, DNER (Delta/Notch like EGF-related Receptor) is strongly express in CNS (hippocampal and neocortex pyramidal neurons and in cerebellar purkinje cells) (23). DNER possesses ten EGF-like repetitions highly homologous to Notch1 and Delta1. In contrast to the classical Notch ligands, DNER lacks the Notch binding motif and instead binds Notch by the first and second EGF-like repeats. Following its binding to Notch, DNER can activate Notch pathways in a Deltex-dependant manner in Bergmann glia cells in the cerebellum (24). In another cellular context, following HDAC inhibitor treatment on glioblastoma-derived neurospheres, DNER is upregulated and acts as a tumor suppressor gene. It induces differentiation and inhibits neurospheres formation and tumors growth in xenografts (25). Here we show that

Lhx2 controls the maintenance of neural stem/progenitors cells of the developing neocortex via direct transcriptional repression of the atypical Notch ligand DNER. Furthermore, we show that DNER is highly expressed in the neocortex and act as a repressor of Notch signaling in this context. These results are the first to document a molecular mechanism for Lhx2 in the developing CNS and confer a new role for DNER in neural stem/progenitor cells.

Materials and methods

Mice

Adult mice from the albinos CD1 or 129sv strains were purchased from Charles River (St-Constant, Qc., Canada). *Lhx2* mutant mice are a gift from Heiner Westphal (National Institute of Health, Bethesda). Embryos stage was determined according to the time of vaginal plug and somites counting.

Immunofluorescence

Tissues were fixed in 4% PFA/PBS, pH 7.4, cryoprotected in PBS/30% sucrose, and frozen in CRYOMATRIX embedding medium (CEM) (Fisher Scientific). 8 µm thick sections were mounted on Super-Frost glass slides (Fisher Scientific) and processed for immunofluorescence. Sections were incubated overnight with primary antibodies at 4°C, and then with secondary antibodies for 1 hour. Slides were mounted in DAPI-containing mounting medium (Vector Laboratories). Observations were made under a fluorescence microscope (Leica DMRE, Leica Microsystems) and images were captured with a digital camera (Retiga EX; QIMAGING; with OpenLab, ver.3.1.1 software; Open-Lab, Canada). Primary Antibodies used: rabbit anti-P-H3 (1:200 Upstate), mouse anti-Ki67 (1:1000 Abcam), mouse anti-Nestin (1:1000 BD Transduction Laboratory), mouse anti-β3-tubulin (1:100 chemicon), rabbit anti-MAP2 (1:500 Abcam), mouse anti-pan-cadherin (1:200 Sigma), goat anti-Notch1 M20 (1:50 Santa Cruz), rabbit anti-NICD (1:50 Cell Signaling), mouse anti-Musashi (1:100 Abcam), mouse anti-CD133 (1:100 Abcam), rabbit anti-Blbp (1:200 Abcam), rabbit anti-GFAP

(1:200 Dako), rabbit anti-Tbr2/Eomes (1:150 Millipore), goat anti-DNER (1:50 R and D Systems), rabbit anti-Lhx2 (1:100 abcam). Secondary antibodies used: FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG, FITC-conjugated rabbit anti-goat and rhodamine-conjugated donkey anti-rabbit (1:300, Chemicon).

Western Blotting

Total protein extracts were prepared in the Complete Mini protease inhibitor cocktail solution (Roche Diagnostics). Protein contents were quantified using the Bradford reagent. Proteins were resolved in Laemmli buffer by SDS-PAGE and transferred to a Nitrocellulose Blotting Membrane (Pall) that was exposed to the primary antibody rabbit anti-DNER (1:500 R and D Systems) and mouse anti-actin (1:500 abcam). Membranes were treated with corresponding horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies (Sigma) and developed using the Immobilon Western (Millipore).

***In situ* Hybridization**

Embryos were dissected in PBS, fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C and stored in 100% Methanol at -20°C. Dig-RNA probes were synthesized using SP6, T3 or T7 RNA polymerase. Whole embryos 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. Hes5 probe-containing plasmid was a gift of Dr Young-Yun Kong (Seoul National University).

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 µg of total RNA and the MML-V reverse transcriptase (Invitrogen). PCR amplification was performed using the HotStar TAQ polymerase (Invitrogen) using an Applied Biosystems thermal cycler. Real-time PCR was performed using the Platinum SYBRGreen SuperMix (Invitrogen) and a Real-Time PCR apparatus (BioRad). All experiments were performed in triplicates. Primer sequences are available upon request.

Fluorescence-Activated Cell Sorting

For cell membrane epitope analyses, cells were labeled with a mouse anti-SSEA-1 (1:300 gift from Dr S. Watanabe laboratory (60)). The primary antibodies were visualized using phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse immunoglobulin M (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Sorting was done using a FACSVantage flow cytometer (Becton-Dickinson, Mississauga, Canada).

Cell culture

Optic vesicles of e9.5 embryos were dissected-out with tungsten needles in HBSS, as described (28). 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 µg/ml; SIGMA), Gentamycin (25 µg/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. 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.

Chromatine Immunoprecipitation (ChIP)

ChIP was performed using the ChIP Assay Kit (Upstate). Briefly, $1-1.5 \times 10^6$ fixed cells were sonicated to shear the chromatin and immunoprecipitated using rabbit anti-Lhx2 (Abcam), rabbit anti-mSin3a (Abcam), rabbit anti-HDAC1, rabbit anti-HDAC3 and anti-mouse IgG (upstate) antibodies. A ChIP scan was performed using a 19 pairs of primers as determined by bioinformatic analysis of DNER promoter sequence. β -major (F) 5'-GGCTGTCATCACTTAGACCTC-3' and (R) 5'-GGTTGCTAGTGAACACAGTTG-3'. β -major was used as an internal standard for data calibration. Primer sequences for all putative and actual Lhx2 binding sites are available upon request.

Microarray analyses

Total RNA was prepared using TRIzol reagent (Invitrogen) and purified by the RNeasy MiniElute kit (Qiagen) for 6 WT and 6 *Lhx2*^{-/-} e9.0-9.25 forebrains. Microarray analysis using BeadChip Mouse Genome (Illumina) was performed at the Centre d'innovation at Genome Quebec (McGill university, Montreal, QC). Data were analyzed using the FlexArray software.

Virus

Mouse *Lhx2* and *DNER* cDNA were cloned into EF.V.CMV.GFP (L. Cheng, Johns Hopkins University) and transfected in 293T cells with helper vectors (F. Boudreau, Sherbrooke University) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Viral supernatants were ultra-centrifuged and exposed to single cell suspensions O/N. Aggregates were dissociated to single cells and plated at 2 000 cells/ml in NSC media for 1 week. GFP positive neural progenitor cells were selected for passage using fluorescence activated cell sorting.

Notch reporter activation assay

Reporter vectors Hes1-d4Venus-N1 and Hes1pAmBm-dVenus were a kind gift from Dr Hideyuki Okano (Keio University, Tokyo, Japan). Neuroepithelial cells were transfected with 2 µg of the reporter construct and 2 µg of the cDNA insert in an expression vector using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). pEF-Bos NICD expression vector was a gift of Dr Yukiko Goth (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo). Cells were grown on BDTM matrigel for 48 hours than recovered using BDTM cell recovery solution. Mean of fluorescence was calculated using the flow cytometer BDTM LSRII.

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 is required for Notch signaling in the mouse optic vesicle

Eye development in *Lhx2* mutant embryos arrest at the optic vesicle (OV) stage around e9.0. We have previously shown that this developmental arrest is in part due the failure of the tissue specific activation of the retinal determinant *Six6* in this structure (11). In a search for other control mechanisms involving Lhx2 in eye development, we first analyzed the status of the cadherin proteins family. These proteins mediate calcium-dependent cell-cell adhesion and are critical for normal tissue development (26). It is known that *Lhx2*^{-/-} neuroepithelial cells of the OV cannot interact with the overlying surface ectoderm (9), a step that is critical for the rest of eye development (27). Thus, we hypothesized that cell adhesion was disrupted in the mutant OV. Using an anti pan-cadherin, we observed that despite its abnormal structure, *Lhx2*^{-/-} OV contained normal amount of cadherin molecules compared to WT (Fig.1 A-B)). NE cells represent the most primitive progenitors population in the developing CNS and these cells are present in the OV (28). Using an antibody against the NE progenitors marker Nestin, we found that this population is not disturbed by the absence of Lhx2 in the OV (Fig.1 C-D). We then assessed the number of mitotic figures to verify if there was any difference in absence of Lhx2. A staining with an anti-PH3 antibody revealed that the ventricular zone of the WT and *Lhx2*^{-/-} OV contains a comparable number of cells in G2/M transition (Fig.1 E-F). Furthermore, as revealed by an anti-Ki67 staining, there is no difference in the number of cycling progenitors in both genotypes. Thus, cell-cell adhesion and cell cycle seem to be normal in NE progenitors in the absence of Lhx2. We then look for others developmental

molecular pathways that could be affected by the *Lhx2* mutation. We first look at the Notch pathway since it has been shown that *Hes1*;*Hes5* double mutant embryos have no OV and show precocious neuronal differentiation in the region that should normally give rise to OV (21). We assessed the expression of the main receptor Notch1. We first used an antibody that recognizes Notch1 full length. The level of Notch1 in the mutant OV was dramatically reduced (Fig.1 J) when compared to WT littermate (Fig.1 I). This result prompted us to examine the cleaved form of Notch1. Normally, NICD is apically localized and in a rather restricted manner (Fig.1 K). As expected, the amount of NICD was reduced in *Lhx2* mutant OV (Fig.1 L). Furthermore, we noticed that the distribution of the cleaved fragment was abnormal (Fig.1 L arrowhead). Since it has been demonstrated that the RNA-binding Musashi (*Msi1*) regulates NICD translocation (29) and that it is strongly expressed in CNS stem cells (30) and enriched in an immature retinal progenitor cells (RPC) population (31), we decided to monitor *Msi1* expression in the absence of *Lhx2*. We observed a virtually complete loss of *Msi1* expression in the ventricular zone of the *Lhx2*^{-/-} OV compared to WT (Fig.1 M-N). We then performed *in situ* hybridization on whole embryos (WISH) to characterize the Notch effectors *Hes1* and *Hes5* expression pattern in the OV. As expected, we found that *Hes1* and *Hes5* were downregulated at e9.25 and e9.5 in the mutant embryo OV, respectively (Fig.1 O-P). It is known that *Hes1* repress the transcription of the pro-neural bHLH *Mash1* by directly binding to its promoter (32) and inactivation of *Hes1* result in the upregulation of *Mash1* (33). Accordingly, a WISH performed at e9.5 allowed us to determine that *Mash1* is upregulated in the mutant dorsal OV and also in the lateral telencephalon (Fig1. Q,Q',Q"). With such phenotypes, we would have expected to observe an accelerated neuronal

differentiation in the OV. However, no such precocious neurogenesis was seen in these mutants (data not shown). These results show that an absence of *Lhx2* causes a disruption of normal Notch pathway activation that results in a diminution of *Hes1* and *Hes5* and an upregulation of the proneural *Mash1* in the OV.

Lhx2 regulates progenitor cell self-renewal and Notch signaling.

We previously reported on the isolation and characterization of a population of NE retinal progenitors present in the mouse OV (28). These NE progenitors display all the characteristics of retinal stem cells and can be grown as neurosphere in a serum-free neural stem cell medium (28). Using this neurosphere assay, we tested the self-renewal ability of these NE progenitors in absence of *Lhx2*. Secondary and tertiary neurospheres number counting (as primary culture gives not enough colonies for experimental procedures), showed reduced self-renewal capacities in *Lhx2*^{-/-} colonies (Fig.2 A). To test genes expression in these retinal progenitors, we performed comparative semi-quantitative (Fig.2 B) and quantitative (Fig.2 B') PCR on WT and *Lhx2*^{-/-} neurospheres extract. Notch pathway's major transcripts were downregulated in *Lhx2*^{-/-} NE retinal progenitors (Fig. 2B). We also measured the relative expression of different neural stem cell markers. *Nestin* and *Sox2* are unaffected (Fig2. B'), *Bmi1* is upregulated and *Musashi1* is downregulated. At the protein level, immunofluorescence assay were performed on neurospheres slices (Fig.2 C-N). As expected from the previous quantitative results (Fig.2 B'), no abnormalities are detected in *Nestin* protein level in the absence of *Lhx2* in those colonies (Fig.2 C-D). We also analyzed the expression of the

cell surface NSC marker Prominin/CD133 which is known to be expressed in NE retinal cells (28). We found that the level of this protein is greatly reduced in absence of Lhx2 (Fig2. E-F). Furthermore, the radial glia marker Blbp is strikingly affected in *Lhx2*^{-/-} colonies. Indeed, while it was ubiquitously expressed in WT neurospheres (Fig2. G), its expression was restricted to cells located at the periphery of *Lhx2*^{-/-} neurospheres (Fig. 2H). It has been postulated that an evolution along the glial lineage may characterize neural stem cell/progenitor (neuroepithelial → radial glia → astrocyte) [264]. This prompted us to test the number of GFAP+ cells present in neurospheres of both genotypes. Immunostaining for GFAP revealed a strong diminution in the number of GFAP+ astrocytes-like (Fig.2 I-J). Notably, decreased number of Blbp+ and GFAP+ cells in *Lhx2*^{-/-} neurospheres may not be due to increased apoptosis levels. In fact, apoptosis level in *Lhx2*^{-/-} neurospheres is only 8% in average (11). These results suggest that loss of Lhx2 inhibits Notch signaling *in vitro* and lead to a depletion of RGC. We then examine if this depletion is due to premature neurogenesis. Immunostaining against β3-tubulin did not revealed any difference between both genotypes (Fig.2 K-L). However, an antibody against the axonal protein MAP2 revealed a clear augmentation of neurons in *Lhx2*^{-/-} colonies (Fig.2 M-N). Taken together, our results reveal that Lhx2 is required for normal Notch pathway activation and NE retinal progenitors cell maintenance *in vitro*.

Premature neurogenesis in telencephalic vesicles of Lhx2 mutants

Lhx2 is strongly expressed in the developing brain (11). Given that *Lhx2*^{-/-} embryos show cerebral cortex hypoplasia (9) and based on our results seen in the developing eyes, we

hypothesized that Lhx2 deletion in the developing brain can result in an *in vivo* precocious neurogenesis, which lead to a neural progenitor cells depletion. We first analyzed the telencephalon at e10.5, which is considered to be the very beginning of cortical neurogenesis (35). Immunostaining against Nestin did not reveal any difference in the number of NE progenitors in the cerebral wall at this stage (Fig.3 A-B). However, the number of mitotic cells (PH3+ cells) in the VZ was slightly reduced in the absence of Lhx2 (Fig.3 C-D) ($P < 0.05$), which suggest that the effect of Lhx2 loss on NE progenitors start to be seen at this early development stage. To verify the neurogenesis status in *Lhx2*^{-/-} telencephalic vesicles, we performed immunostaining analysis for β 3-tubulin. We noticed that the number of β 3-tubulin+ positif neurons is reduced in the pial region of the developing telencephalon (Fig.3 F) when compared to WT (Fig.3 E). In contrast, we observed an increased of MAP2+ mature neurons in mutant telencephalon (Fig.3 G-J). Taken together, these results indicate that Lhx2 is necessary for normal cell cycle progression of the VZ NE progenitors at the earliest stage of neurogenesis and that its absence results in a premature apparition of mature MAP2+ neurons in the dorsal telencephalon.

Loss of radial glia in the neocortex of Lhx2 mutants

To assess the effect of Lhx2 inactivation during neurogenesis progression, we performed immunostaining analysis on e12.5 rostral neocortical slices. At this developmental stage, the number of mitotic figures (PH3+ cells) is severely reduced in the *Lhx2*^{-/-} VZ (Fig.4 A-B). Also, Nestin immunostaining showed an almost total absence of NE progenitors in

the absence of *Lhx2* (Fig.4 D), while normally these cells constitute most of the cerebral wall (Fig.4 C). *Blbp* expression starts at the embryonic stage e10, and reaches its maximum at e12.5 in the telencephalon [57]. In e12.5 telencephalic vesicle, we observed that the deletion of *Lhx2* resulted in a dramatic diminution of *Blbp*⁺ RGCs in all region of the neocortex (Fig4 E-F). It is known that *Blbp* is a direct target of Notch signaling in radial glia. When looking for *Notch1* expression in the same region, we found that it was severely disrupted in *Lhx2*^{-/-} telencephalon as compared to its expression in the WT littermate (Fig.4 G,G'). These results suggest that the loss of *Lhx2* inhibits Notch signaling and lead to a depletion of neural progenitors *in vivo*. Our observations are in accordance with other data showing a decreased proliferation (*BrdU*⁺ cells) and mitotic figures (*PH3*⁺ cells) in the ventricular region of these mutants at the same developmental stage (9). Furthermore, the same study showed no difference in cell death between both genotypes, confirming that apoptosis is not the cause of RGC depletion. The phenotypes observed were correlated with an important increase of the third population of neurogenic progenitors, namely the intermediate progenitors (IPs), as revealed by a *Tbr2* immunostaining (Fig4. I-J). IP cells are generated from RGC, proliferate for one or two mitotic cycles, and produce mostly neurons (10% of the divisions are symmetric proliferative) (6,37). We next assessed if this augmentation of *Tbr2*⁺ Ips was correlated with a premature neurogenesis. Using antibodies against β -tubulin (Fig4. K-L) and *MAP2* (Fig4. M-N), we observed a marked increase in neurons in the cerebral walls of the mutant telencephalon. These results suggest that *Lhx2* inactivation leads to premature differentiation of RGC into neurons (direct neurogenesis) or into Ips, which in turn generate neurons prematurely (indirect neurogenesis).

DNER is initially expressed in NE progenitors at e9.5

Developmental defects in *Lhx2*^{-/-} embryos are not seen morphologically prior to e9.25-e9, allowing global differential gene analysis on comparable structure at this stage and earlier. To get better knowledge on the functions of Lhx2 in neocortical development, we performed comparative cDNA microarray analysis on WT and *Lhx2*^{-/-} forebrains. These analysis revealed that among over 47 000 transcripts analyzed, DNER is the most overexpressed gene (Table 1). To date, DNER is known to be enriched in the CNS starting at e14.5 (38). We performed immunofluorescence analysis to verify whether DNER is expressed earlier in the forebrain (i.e. at e9.0) and to determine in which cells it is expressed. We found that DNER is expressed at e9.5 in the NE cells, along with Lhx2 (Fig.5 A). At this stage, DNER distribution seems to be restricted in the ventricular zone where the nucleus of mitotic NE cells are located and in domain where cleaved Notch1 (NICD) is present (Fig. 5B). However, we could observe a shift in the domain of expression of DNER at e10.5 (Fig.5 C). Indeed, while NICD is still restricted to the apical domain, DNER is present in the basal portion of the VZ (the dashed white lines delimit NICD⁺ cells). These results show that DNER is initially express in proliferating NE cells. At the onset of neurogenesis (e10.5), DNER domain expression shift and is restricted to the basal region of the developing telencephalon. We also found that DNER was present in the Tbr2⁺ cells, namely the IPs. (Fig.5 D;D') and in β 3-tubulin⁺ (Fig.5 F;F') and MAP2⁺ (Fig.5 H,H') newborn neurons. Later during neocortical development (i.e. e12.5), the same pattern of expression is seen in the future cortical plate (Fig.5 E;E',G;G',I;I'). Quantitative PCR on different tissues extract of newborn pups was conduct to better characterize DNER expression pattern. As seen in previous study (38),

DNER mRNA is strongly enriched in the CNS (with the highest expression level in the forebrain and the midbrain) and practically absent in other organs (Fig.5 J). In the developing eye, the stage-specific embryonic antigen 1 (SSEA-1) is predominantly expressed by immature retinal progenitor cells (31). Using fluorescence activated cell sorting (FACS), we sorted e18.5 retinal progenitor cells according to their level of SSEA-1 expression (SSEA-1^{high}, SSEA-1^{med}, SSEA-1^{low}). We then measured the expression of DNER in these populations relatively to SSEA-1^{neg} cell population (Fig.5 K). We found that DNER is enriched in the SSEA-1^{low} and that it reaches a peak in the SSEA-1^{med} population compared to the SSEA-1^{neg} cells. In the SSEA-1^{high} population, DNER level is comparable to what is seen in the negative population. This could mean that DNER is preferably expressed in retinal progenitors that begin to have restricted cell fate.

DNER is overexpressed in the neocortex of *Lhx2* mutants

In order to confirm the results seen in the microarray (Table 1), we compared the expression of DNER in WT and *Lhx2* mutant forebrain at different developmental stages. At e9.5, a strong overexpression of DNER is seen in NE cells of the *Lhx2*^{-/-} prosencephalon (Fig.6 B) compared to WT (Fig.6 A). In the mutant e10.5 telencephalon, DNER expression spans across almost all the cortical wall (Fig.6 D) when its normal distribution is restricted to the preplate (Fig.6 C). Finally, at e12.5 DNER expression is normally only seen in discrete layer in the sub-pial region of the dorso-lateral telencephalon (Fig.6 E). In the mutant brain DNER is strikingly overexpressed in this region and is also ectopically localized throughout the subventricular zone (SVZ)

(Fig.6 F). Taken together, these results show that DNER is initially express in primitive neural progenitors (NE) and later in more restricted progenitors (IPs) and/or in sub-pial neurons. Our data also suggests that Lhx2 inhibits *DNER* expression. In absence of Lhx2, DNER is overexpressed in the forebrain starting at e9.5 and spread abnormally throughout the dorso-lateral telencephalon at e12.5. In (Fig. 6G), a model of normal DNER expression in the developing neocortex shows its presence at e9.5 in some NE progenitors lining the ventricular zone. At e10.5, some RGC express DNER along their radial process and at the preplate, DNER is present in IPs and newborn neurons (Cajal-Retzius). At e12.5, DNER is no longer present on RGC. At this stage, only a subset of IP and neurons express DNER in the cortical plate. In (Fig. 6H), the absence of Lhx2 causes a strong overexpression of DNER in the majority of NE progenitors. At e10.5, DNER is ectopically localized throughout the dorso-ventral mutant telencephalon. Overexpression is also seen at the preplate in prematurely born. Later on, at e12.5, the remaining RGCs still abnormally express DNER along their radial process. Furthermore, the more numerous IPs and neurons express DNER at higher level than in the WT telencephalon. Taken together, our observations reveal that the dynamic pattern of expression of DNER is disturbed in absence of Lhx2. DNER persist in the RGC and is present at higher levels in IPs and newborn neurons.

Lhx2 represses *DNER* expression, which negatively modulates Notch signaling

Our results suggested that Lhx2 possibly negatively modulates DNER expression in the developing telencephalon. To directly test this possibility, we used lentiviral

constructs expressing the green fluorescent protein (GFP) or Lhx2 and GFP to infect cultured e9.5 telencephalic progenitors. After 72 hr, GFP+ cells were isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) for mRNA and protein extraction. Quantitative PCR analysis revealed that Lhx2 mRNA was increased 7 times compared to control cells (Fig.7 A left column) and that Lhx2 overexpression resulted in downregulation of *DNER* by 50% (Fig.6 right column). The inhibitory effect of Lhx2 was also seen at the protein level, where DNER was reduced by 60%, as evaluated by Western blot analysis (Fig.7 B).

In a second experimental setting, Lhx2- and control-virus infected telencephalic progenitors were plated at low cell density (2000 cells/mL) in neural stem cell media to generate neurospheres. After 6 days, pure GFP+ neurosphere clones were analyzed. We observed that colonies infected with the Lhx2 virus were larger than control colonies, at both passage 1 and 2 (Fig.7 C). Using the same strategy, we overexpressed the entire *DNER* cDNA in telencephalic progenitors. Notably, neural colonies infected with the *DNER* virus were smaller than control colonies (Fig.7 D).

Our results suggest that Lhx2 may bind to the *DNER* promoter to repress its transcription. To test this, we analyzed *DNER* regulatory regions for putative Lhx2 binding sites using the MatInspector software (Genomatix™) (39). Several putative Lhx2 binding sites were detected in the 5' region and in the introns of *DNER*. To test for a possible association of Lhx2 with the chromatin at these regions, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments on neurospheres generated from telencephalic progenitors. Based on the location of putative DNA binding sites for Lhx2, we scan 19 chromatin regions each covering a maximum of 300 base pairs

of genomic DNA. 5 actual Lhx2 binding sites were found (-3900, -2100, -1350, +900, +2800) (Fig.7 E). We also assess whether Lhx2 association at these regions was possibly accompanied by the presence of co-repressors. HDAC3/N-CoR and HDAC1/Sin3a co-repressor complexes have been described in a variety of systems (40,41). We found that HDAC1, HDAC3 and Sin3a were enriched at *DNER* promoter (Fig.7 E). Control CHIP with an anti-IgG or amplification at the β -globin promoter confirms that these associations were specific.

Because our results suggest that Lhx2 may promote Notch-pathway activation in neuroepithelial progenitors and radial glia cells, possibly through repression of *DNER* expression, we tested if Lhx2 could directly activate the Notch pathway. For this, we used an RBPJ-dependent live reporter system, which is activated upon Notch activation (42). We co-transfected the reporter vector Hes1p-dVenus along with vectors expressing Lhx2, *DNER*, NICD or Jagged1 in cultured telencephalic progenitors. NICD and Jagged1 were used as positive controls as they are predicted to both activate the transcription of Notch target genes. Cells were grown on BD matrigel for 48 hours after transfection, and mean fluorescence was measured using flow cytometer BD LSRII. A negative control consisting of the reporter vector with mutated RBPJ binding sites was used to confirm the specificity of the assay. When using Lhx2, we observed a 3 fold increased in the activity of the Hes1p-dVenus reporter when compared to the empty vector (Fig.7 F). Inversely, *DNER* expression resulted in a repression of Hes1p-dVenus reporter activity (Fig.7 F). As expected, NICD and Jagged1 could induce Hes1p-dVenus reporter activation. These results suggest that Lhx2 is a relatively strong activator of Notch signaling in neural

progenitors, even when compared to Jagged1 or Notch1 intracellular domain (NICD). Thus Lhx2 could activate Notch pathway by direct DNER transcriptional repression along with the action of co-repressors. DNER has a repressive effect on Notch pathway, thus inhibiting the self-renewal of neural progenitors such as RGCs (See model in Fig.7 G).

Discussion

Lhx2 was previously shown to control eye and cortical development and to regulate progenitor cells proliferation (9). However, a large part of the molecular mechanism involved in this process has remained elusive. Here, we show that Lhx2 is required and sufficient for Notch pathway activation in ocular and telencephalic neuroepithelial progenitors. In the neocortex of Lhx2-mutants, the radial glia phenotype is lost at the expense of neuronal and intermediate progenitor cell fates. This coincides with ectopic DNER expression in prospective radial glia cells. Gain- and loss-of-function experiments as well as ChIP analysis suggest that Lhx2 represses DNER transcription in telencephalic progenitors, and that DNER negatively modulates Notch activity. Our study uncovers a new regulatory mechanism linking Lhx2 activity to the maintenance of radial glia cells undifferentiated state during mouse CNS development.

Lhx2 is required for normal Notch activation in embryonic retinal progenitors

We found that in the absence of Lhx2, NE progenitors of the optic vesicle have reduced self-renewal capacity and display precocious neurogenesis. Mutant neurospheres exhibit a dramatic reduction of the RGC marker Blbp, all together with a loss of GFAP expression. These phenotypes correlates with the observations that several Notch pathway-related genes are highly downregulated in *Lhx2*^{-/-} optic vesicles and neurospheres. Interestingly, we observed reduce *Hes1* transcript levels in the optic vesicle of Lhx2 mutants along with an upregulation of the pro-neural gene *Mash1*. These

observations are consistent with the fact that Hes1 normally binds to *Mash1* promoter to repress its expression (43). It is worth notifying that *Hes1*^{-/-} e9.5 embryos display an ectopic expression of *Mash1* in the dorsal optic vesicles and a premature neurogenesis throughout this structure (44). Surprisingly, we did not see any accelerated differentiation in the mutant optic vesicle whereas we can see a strong augmentation of neuronal cells (MAP2+) in the mutant neurospheres. This situation can be explained by the fact that the neurosphere assay is a very stringent procedure that selects only a small fraction of the total cell population present in the optic vesicle. These cells represent the most immature progenitors in this structure (28). Thus, Lhx2 function could be of capital importance for the maintenance of this cellular population, which represents the large majority of cells present in these colonies. These observations suggest that Lhx2 plays a crucial role in NE progenitor cells maintenance, and that it may also control Notch pathway activation.

Lhx2 and the maintenance of radial glia cells in the telencephalon

Normally, neurogenesis in the telencephalon starts at e10-e10.5 when the first type of neurons is produced (the Cajal-Retzius cells) and populates the preplate (45). We show here that Lhx2 deficiency leads to accelerate production of neurons starting at the onset of normal neurogenesis. Later on, at e12.5, we observed a strong augmentation in the number of intermediate progenitors and neurons at the expense of RGCs. Notably, the NE progenitor phenotype, labeled by Nestin, is apparently unaffected by the Lhx2 mutation. This may indicate that Lhx2 is required to prevent the differentiation of RGCs into intermediate progenitors at the onset of neurogenesis, but is dispensable at earlier

stages for NE progenitors maintenance. The depletion of RGCs could be due to premature differentiation of RGCs into Cajal-Retzius neurons (accelerated direct neurogenesis) or into intermediate progenitors (accelerated indirect neurogenesis), which will later differentiate into post-mitotic neurons. Indeed RGC and intermediate progenitors both have the potential to give birth to neurons (46-47). The pool of intermediate progenitors has been shown to be essential to control brain size (48). Precocious differentiation of RGCs into intermediate progenitors could ultimately result in exhaustion of the intermediate progenitors pool at later stage of development, thus causing a reduction in brain volume.

It is well established that RGC and adult neural stem cell maintenance required Notch signaling (49-50). Notably, the expression of Notch1 is severely reduced in the telencephalic VZ of *Lhx2* mutants. These findings are reminiscent of conditional deletion of Notch1 in the developing telencephalon using Nestin-Cre or FoxG1-Cre drivers, both resulting in precocious neuronal differentiation and progenitor pool depletion (50-51). Other evidences suggest that Notch1 promotes radial glia fate *in vivo* as showed by the fact that forebrain progenitors that express the constitutively activated form of Notch1 become radial glia (49). RGCs and IPs can be distinguished on the basis on their RBPJ activity. Indeed, RGCs signal through the canonical Notch effector RBPJ, whereas IPs have attenuated RBPJ signaling (18). Furthermore, a conditional deletion of RBPJ under a Nestin-Cre driver promoter results in precocious differentiation of RGCs into IPs (52). We propose that *Lhx2* is essential for the maintenance of RGCs in the telencephalon at the onset of neurogenesis and onward through promotion of Notch signaling. Hence, *Notch1* or *Numb* mutants develop relatively normally until the onset of neurogenesis (53).

Lhx2 controls Notch pathway activation

A microarray analysis performed prior to the onset on neurogenesis allowed us to find that DNER is upregulated ~3 fold in *Lhx2*^{-/-} forebrain. Studies have shown that DNER is strongly expressed in the CNS starting at e14.5 and in neurons of the cerebellum, hippocampus and neocortex at P7 up to P20 (38). No studies have yet report expression of this atypical-Notch ligand prior to e14.5. We provide here evidences that DNER is present in the forebrain as soon as e9.5 at the apical side of the NE cells layer in the forebrain. At the onset of neurogenesis, DNER expression shift into the preplate where IPs and neurons are located. In *Lhx2*^{-/-} e9.5 forebrain, localization of DNER is normal, but its expression is strongly increased. Later on, DNER overexpression persists at the preplate. Furthermore, DNER is ectopically expressed across the entire dorso-lateral telencephalon in what could be radial processes of the remaining radial glia cells at e10.5. Recently, Mind bomb-1 (*mib1*), an essential component for Notch ligand, was shown to promote Notch activation in RGCs. Using a Nestin and GFAP-Cre driver, the authors elegantly showed that *mib1* ablation in the telencephalon causes a depletion of RGC and an expansion of IPs and post-mitotic neurons. This suggests that in addition to newborn neurons, IPs are also possibly Notch-ligand presenting cells that maintain RGCs undifferentiated state. (54). The phenotype observed in the telencephalon of *mib1*^{-/-} mice is thus highly reminiscent of what we reported here for *Lhx2*^{-/-} mice. We propose that aberrant expression of DNER in NE progenitors and RGCs causes an inhibition of Notch signaling that leads to premature differentiation of RGCs.

We determined that overexpression of *Lhx2* in forebrain progenitors can reduce DNER expression at both mRNA and protein levels. We also found using telencephalic

progenitor extracts that Lhx2 is bound to the chromatin at the DNER promoter and that co-repressors are enriched in the same region, thus suggesting that Lhx2 is a direct repressor of DNER transcription. Using an RBPJ-dependant reporter system, we also observed that Lhx2 is a potent activator of Notch signaling (Fig.7 F). These observations suggest that Lhx2 may also activate Notch signaling through DNER-independent mechanisms. Finally, we also showed that DNER inhibits RBPJ dependant signaling. This observation contrasts with previous reports suggesting that DNER activates Notch signaling (24,38). This discrepancy could be explained by the cellular context. Indeed, most of the reported observations were obtained using myoblasts and post-mitotic neurons of the cerebellum. In contrast, our results are in accordance with a recent study showing that DNER over-expression results in suppression of glioma stem cells self-renewal (25). How DNER inhibits Notch signaling remains to be characterized. DNER could act similarly as Dlk-1, another atypical-Notch ligand, which also lacks the DSL binding motif (55). Dlk1 can exert a repressive action of Notch signaling via a mechanism named cis-inhibition (56,57). In conclusion, we showed here that in the developing telencephalon, Lhx2 prevents ectopic DNER expression in RGCs via direct transcriptional repression. This allows the maintenance of RGC phenotype through sustained Notch signaling. This novel mechanism linking Lhx2 to Notch signaling in RGCs may apply to other organs where Lhx2 has been shown to control stem cell maintenance (14,15,58,59).

References

1. Wilson, S.W. and J.L. Rubenstein, *Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon*. Neuron, 2000. **28**(3): p. 641-51.
2. Hebert, J.M. and G. Fishell, *The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(9): p. 678-85.
3. Beddington, R.S. and E.J. Robertson, *Anterior patterning in mouse*. Trends Genet, 1998. **14**(7): p. 277-84.
4. Rallu, M., J.G. Corbin, and G. Fishell, *Parsing the prosencephalon*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(12): p. 943-51.
5. Gotz, M. and W.B. Huttner, *The cell biology of neurogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 777-88.
6. Noctor, S.C., et al., *Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases*. Nat Neurosci, 2004. **7**(2): p. 136-44.
7. Monuki, E.S., F.D. Porter, and C.A. Walsh, *Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway*. Neuron, 2001. **32**(4): p. 591-604.
8. Agulnick, A.D., et al., *Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins*. Nature, 1996. **384**(6606): p. 270-2.
9. 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.

10. 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.
11. Tetreault, N., M.P. Champagne, and G. Bernier, *The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation*. *Dev Biol*, 2009. **327**(2): p. 541-50.
12. Mangale, V.S., et al., *Lhx2 selector activity specifies cortical identity and suppresses hippocampal organizer fate*. *Science*, 2008. **319**(5861): p. 304-9.
13. Chou, S.J., et al., *Lhx2 specifies regional fate in Emx1 lineage of telencephalic progenitors generating cerebral cortex*. *Nat Neurosci*, 2009. **12**(11): p. 1381-9.
14. Rhee, H., L. Polak, and E. Fuchs, *Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles*. *Science*, 2006. **312**(5782): p. 1946-9.
15. Dahl, L., et al., *Lhx2 expression promotes self-renewal of a distinct multipotential hematopoietic progenitor cell in embryonic stem cell-derived embryoid bodies*. *PLoS One*, 2008. **3**(4): p. e2025.
16. 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.
17. Androutsellis-Theotokis, A., et al., *Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo*. *Nature*, 2006. **442**(7104): p. 823-6.
18. Mizutani, K., et al., *Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors*. *Nature*, 2007. **449**(7160): p. 351-5.

19. Bertrand, N., D.S. Castro, and F. Guillemot, *Proneural genes and the specification of neural cell types*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(7): p. 517-30.
20. Yoon, K. and N. Gaiano, *Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 709-15.
21. 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.
22. Imayoshi, I., et al., *Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains*. J Neurosci. **30**(9): p. 3489-98.
23. Saito, S.Y. and H. Takeshima, *DNER as key molecule for cerebellar maturation*. Cerebellum, 2006. **5**(3): p. 227-31.
24. Eiraku, M., et al., *DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development*. Nat Neurosci, 2005. **8**(7): p. 873-80.
25. Sun, P., et al., *DNER, an epigenetically modulated gene, regulates glioblastoma-derived neurosphere cell differentiation and tumor propagation*. Stem Cells, 2009. **27**(7): p. 1473-86.
26. Wheelock, M.J. and K.R. Johnson, *Cadherin-mediated cellular signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(5): p. 509-14.
27. Grainger, R.M., *Embryonic lens induction: shedding light on vertebrate tissue determination*. Trends Genet, 1992. **8**(10): p. 349-55.
28. 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.

29. Imai, T., et al., *The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3888-900.
30. Kaneko, Y., et al., *Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells*. Dev Neurosci, 2000. **22**(1-2): p. 139-53.
31. Chatoo, W., et al., *Bmi1 distinguishes immature retinal progenitor/stem cells from the main progenitor cell population and is required for normal retinal development*. Stem Cells. **28**(8): p. 1412-23.
32. Chen, H., et al., *Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5355-60.
33. de la Pompa, J.L., et al., *Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis*. Development, 1997. **124**(6): p. 1139-48.
34. Doetsch, F., *The glial identity of neural stem cells*. Nat Neurosci, 2003. **6**(11): p. 1127-34.
35. Zhong, W., et al., *Mouse numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6844-9.
36. Anthony, T.E., et al., *Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system*. Neuron, 2004. **41**(6): p. 881-90.

37. Haubensak, W., et al., *Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3196-201.
38. Eiraku, M., et al., *Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25400-7.
39. Cartharius, K., et al., *MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites*. Bioinformatics, 2005. **21**(13): p. 2933-42.
40. Jepsen, K. and M.G. Rosenfeld, *Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 4): p. 689-98.
41. Karagianni, P. and J. Wong, *HDAC3: taking the SMRT-N-CoRrect road to repression*. Oncogene, 2007. **26**(37): p. 5439-49.
42. Kohyama, J., et al., *Visualization of spatiotemporal activation of Notch signaling: live monitoring and significance in neural development*. Dev Biol, 2005. **286**(1): p. 311-25.
43. Fischer, A. and M. Gessler, *Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(14): p. 4583-96.
44. Lee, H.Y., et al., *Multiple requirements for Hes 1 during early eye formation*. Dev Biol, 2005. **284**(2): p. 464-78.
45. Marin-Padilla, M., *Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex*. Trends Neurosci, 1998. **21**(2): p. 64-71.

46. Englund, C., et al., *Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex.* J Neurosci, 2005. **25**(1): p. 247-51.
47. Guillemot, F., *Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon.* Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 639-47.
48. Merkle, F.T. and A. Alvarez-Buylla, *Neural stem cells in mammalian development.* Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(6): p. 704-9.
49. 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.
50. Yoon, K., et al., *Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors.* J Neurosci, 2004. **24**(43): p. 9497-506.
51. Yang, X., et al., *Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway.* Dev Biol, 2004. **269**(1): p. 81-94.
52. Gao, F., et al., *Transcription factor RBP-J-mediated signaling represses the differentiation of neural stem cells into intermediate neural progenitors.* Mol Cell Neurosci, 2009. **40**(4): p. 442-50.
53. Fishell, G. and A.R. Kriegstein, *Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance.* Curr Opin Neurobiol, 2003. **13**(1): p. 34-41.
54. Yoon, K.J., et al., *Mind bomb 1-expressing intermediate progenitors generate notch signaling to maintain radial glial cells.* Neuron, 2008. **58**(4): p. 519-31.

55. Nueda, M.L., et al., *The EGF-like protein dlk1 inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells*. J Mol Biol, 2007. **367**(5): p. 1281-93.
56. Glittenberg, M., et al., *Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis*. EMBO J, 2006. **25**(20): p. 4697-706.
57. Bray, S.J., et al., *The atypical mammalian ligand Delta-like homologue 1 (Dlk1) can regulate Notch signalling in Drosophila*. BMC Dev Biol, 2008. **8**: p. 11.
58. Wandzioch, E., et al., *Lhx2^{-/-} mice develop liver fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16549-54.
59. Kolterud, A., et al., *The Lim homeobox gene Lhx2 is required for olfactory sensory neuron identity*. Development, 2004. **131**(21): p. 5319-26.
60. Koso, H., et al., *SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signaling pathway*. Dev Biol, 2006. **292**(1): p. 265-76.

Figure legends

Figure 1. Lhx2 is required for normal Notch1 and Musashi expression in the optic vesicle. (A-N) Immunofluorescence on e9.25-e9.5 WT (A,C,E,G,I,K,M) and Lhx2^{-/-} (B,D,F,H,J,L,N) embryos. (A-D) Cell adhesion molecule Pan-Cadherin (A,B) and neuroectoderm marker Nestin (C,D) are normally expressed in Lhx2^{-/-} optic vesicles. (E-H) Staining of H3 phosphorylated (PH3) (E,F) and expression of Ki67 (G,H) reveal an apparent normal cell cycle in Lhx2^{-/-} neuroepithelial cells of the optic vesicles. (I,J) Notch Full Length expression is down in Lhx2^{-/-} optic vesicle. (K,L) The cleaved form of Notch1 (NICD) is abnormally distributed in the apical region of Lhx2^{-/-} optic vesicle. (M,N) Musashi expression is severely affected in Lhx2^{-/-} optic vesicle. (O-Q) Wholemount *in situ* hybridization on e9.25-e9.5 embryos showing reduced *Hes1* (O) and *Hes5* (P) expression in the optic vesicle (arrowhead) of Lhx2^{-/-} embryos. (Q) *Mash1* is overexpressed in the same region in Lhx2^{-/-} embryos. (Q') Higher magnification of WT embryo seen in (Q). (Q'') Higher magnification of the Lhx2^{-/-} embryo seen in (Q).

Figure 2. Lhx2 mutation affects Notch pathway *in vitro* and causes a loss of self-renewal potential and neural stem cell markers. (A) Self-renewal assay showing a marked decrease in self-renewal in Lhx2^{-/-} retinal spheres. (B) Semi-quantitative PCR revealing a general perturbation in the principal Notch pathway genes of Lhx2^{-/-} retinal spheres and (B') real-time PCR data showing the relative expression of different neural stem cell markers. (C-N) Immunofluorescence on WT (C,E,G,I,K,M) and Lhx2^{-/-} (D, F, H, J, L,

N) retinal spheres using neural stem cells/progenitors markers (C-J) and neurogenesis markers (K-N). (C,D) Nestin staining showing equivalent expression. (E,F) Prominin expression is down in *Lhx2*^{-/-} retinal spheres. (G,H) The radial glia marker *Blbp* severely affected in *Lhx2*^{-/-} retinal spheres. (I,J) GFAP expression is reduced in absence of *Lhx2*. (K,L) Beta3-Tubulin expression is normal in the absence of *Lhx2*. (M-N) An upregulation of *Map2* in retinal spheres shows an in vitro precocious neurogenesis in absence of *Lhx2*. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Figure 3. *Lhx2* mutation causes precocious neurogenesis in the telencephalic vesicle of e10.5 embryos. (A-J) Immunofluorescence on e10.5 telencephalic vesicle slices WT (A,C,E,G,I) and *Lhx2*^{-/-} (B,D,F,H,J). (A-B) Nestin expression is not affected in the absence of *Lhx2*. (C-D) The number of PH3⁺ cells is normal in the telencephalic vesicle in absence of *Lhx2* (no statistically significant difference). (E-F) The number of Beta3-Tubulin positive cells seem to be reduced in *Lhx2*^{-/-} telencephalic vesicle and the number of MAP2⁺ cell is higher (G-J) suggesting a precocious shift from immature to mature neurons in the absence of *Lhx2*. Arrows in (I,J) indicate the MAP2 specific staining.

Figure 4. The balance between normal proliferation and neurogenesis is disrupted in the e12.5 telencephalon in absence of *Lhx2*. (A-N) Immunofluorescence on WT (A,C,E,G,I,K,M) and *Lhx2*^{-/-} (B,D,F,H,J,L,N) e12.5 brain slices. (A,B) The number of PH3⁺ cells is reduced in the telencephalic ventricular zone of *Lhx2*^{-/-} embryos. (C,F) The expression of the neuroectoderm marker Nestin (C,D) and the radial glia cell *Blbp*

(E,F) is severely reduced in the same region in the absence of Lhx2. (G,H) Less Notch1 Full Length proteins are present in the entire telencephalon in absence of Lhx2. (G',H') Higher magnification of the Notch1 Full Length signal seen in the ventricular zone of images G and H. (I,J) More basal progenitors (Tbr2+ cell) are present when Lhx2 is absent. (K,L) B3-tubulin+ cells and MAP2+ cells (M,N) are more numerous in the Lhx2 mutant, suggesting a precocious neurogenesis in e12.5 telencephalic vesicles.

Figure 5. DNER is expressed in the embryonic neocortex and enriched in the CNS in the newborn mouse. (A-C) Immunofluorescence on WT e9.5 forebrain and e10.5 telencephalic vesicle comparing the expression of DNER and Lhx2 (A) and NICD at e9.5 (B) and e10.5 (C). (A',B') Higher magnification of the images seen in (A) and (B) respectively. Dash lines in (B) and (C) delimit NICD expression domain. (D-I) Immunofluorescence on WT e10.5 (D,F,H) and e12.5 (E,G,I) telencephalon slices. Comparative analysis of IPs marker Tbr2 (D,E), immature neurons maker BetaIII-tubulin (F,G) and mature neuron marker MAP2 (H,I) with DNER. (D'-I') Higher magnification of their respective images. (J) Real-time PCR analysis of DNER expression in different organ's mRNA of a newborn mouse. All the values are relative to the expression level of DNER in the intestin. (K) Real-Time PCR analysis of e18.5 retinal stem cells mRNA. DNER expression is mesure in differents retinal stem cells populations according to their SSEA-1 level of expression after cell sorting.

Figure 6. Lhx2 controls the proliferation of progenitors/stem cells of the CNS by modulating DNER expression. (A-F) Immunofluorescence revealing the expression of DNER on WT (A,C,E) and Lhx2^{-/-} (B,D,F) e9.5 forebrain (A,B), e10.5 (C,D) and e12.5 (E,F) telencephalic vesicle. Arrowheads showing ectopic and overexpression of DNER in Lhx2 mutants telencephalon. (G,H) Schematic representation of DNER localization in WT (G) and Lhx2^{-/-} (H) telencephalon at e9.5, e10.5 and e12.5. Green color represent DNER expression. bVZ, basal ventricular zone; VZ, ventricular zone; PP preplate; CP, cortical plate; SVZ, subventricular zone.

Figure 7. Lhx2 repress DNER transcription and is an activator of the Notch pathway in neural progenitors. (A) Real-Time PCR on mRNA extract of retinal stem cells stably overexpressing Lhx2 showing reduced level of DNER mRNA compare to cells tranfected with an empty vector. (B) Western blot on proteins extract of the same cells showing that forced Lhx2 expression also downregulates DNER protein level. (C-D) Size analysis of retinal stem cells colonies (neurospheres) stably overexpressing DNER (C) and Lhx2 (D) at differents passages revealing the DNER decrease the size of the colonies whereas Lhx2 causes an increase in size. (E) Chromatin Immunoprecipitation on e9.5 forebrain progenitors using anti-Lhx2, anti-HDAC1, anti-HDAC3, anti-mSin3a and anti-IgG. Quantatives analysis of ChIP/IgG ratio show and enrichment of Lhx2 and co-repressors on DNER promoter. (F) RBP-Jk dependant Notch activation reporter assay using a Hes1 promoter driven venus fluorescent protein on forebrain neuroepithelial progenitor showing that Lhx2 strongly activates Notch pathway and DNER inhibits this pathway.

(G) Model showing the mechanism of action of Lhx2 in neural progenitor/stem cells maintenance. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Table 1. Large scale comparative gene expression analysis of WT and *Lhx2*^{-/-} embryos.

Analysis of WT and *Lhx2*^{-/-} forebrain (six from each genotype) using microarray Lumina BeadArray™ technology. Of all the transcripts analyzed (over 47 000), *DNER* is the most upregulated. Results are expressed in binary logarithm (Log2).

Fold Change	Gene Name	Gene Bank
1.663771	Dner	NM_152915.1
1.159692	Rit2	NM_009065.2
1.145517	Lu	AK054001
1.112215	2610028F08Rik	NM_172815.1
1.074112	LOC194642	XM_110710.3
1.001227	Phf19	NM_028716.1
0.9895089		AK032039.1
0.9842775	1700007K13Rik	XM_130125.3
0.9797121	Cul2	AK028589
0.9750485	Ccdc3	XM_129987.2
0.9738986	Etnk2	NM_175443
0.9539332	5730601F06Rik	XM_486197
0.9466789	Krt1-19	NM_008471.1
0.9385281	Siat7d	NM_011373.1
0.9371657	Bmp5	NM_007555.1
0.9347729	Plec1	NM_011117
0.9291562	Ube3a	NM_173010.1
0.9266865	Lrpb7	NM_013588.1
0.8897188	2410081M15Rik	NM_028603.1
0.887866	Tpt1h	NM_153597.1
0.881423	6330530A05Rik	NM_172383.1
0.864167	C130098C10Rik	
0.8611649	5430414B19Rik	NM_183100.1
0.8299896	Pcdh10	NM_011043.2
0.8298782	Gdf10	NM_145741.2
0.8261549	Thsd2	NM_028351.1
0.8258812	Pmaip1	NM_021451.1
0.8193547	Trp63	NM_011641.1
0.8152833	Rspo3	NM_028351.2
0.8124695	Pcdh10	NM_011043.2
0.8100872	Khdrbs2	NM_133235.2
0.808526	Gdnf	NM_010275.1
0.787297	LOC230805	XM_144090.1
0.786927	Ly6h	NM_011837.1
0.7863662	Ly6h	NM_011837.1
0.7862523	Mftc	NM_172402.1
0.7838929	Ly6h	NM_011837.1

Table I

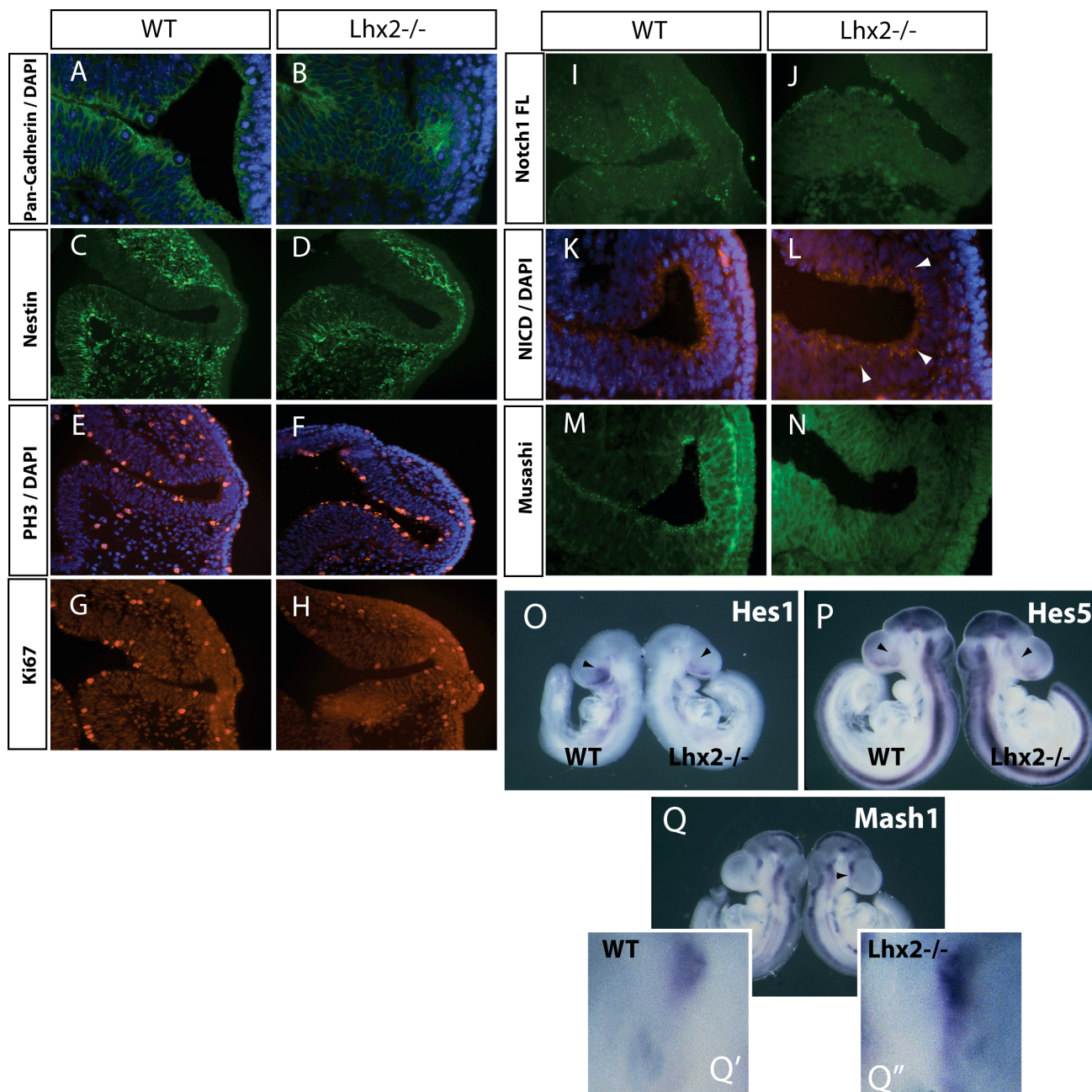


Figure 1

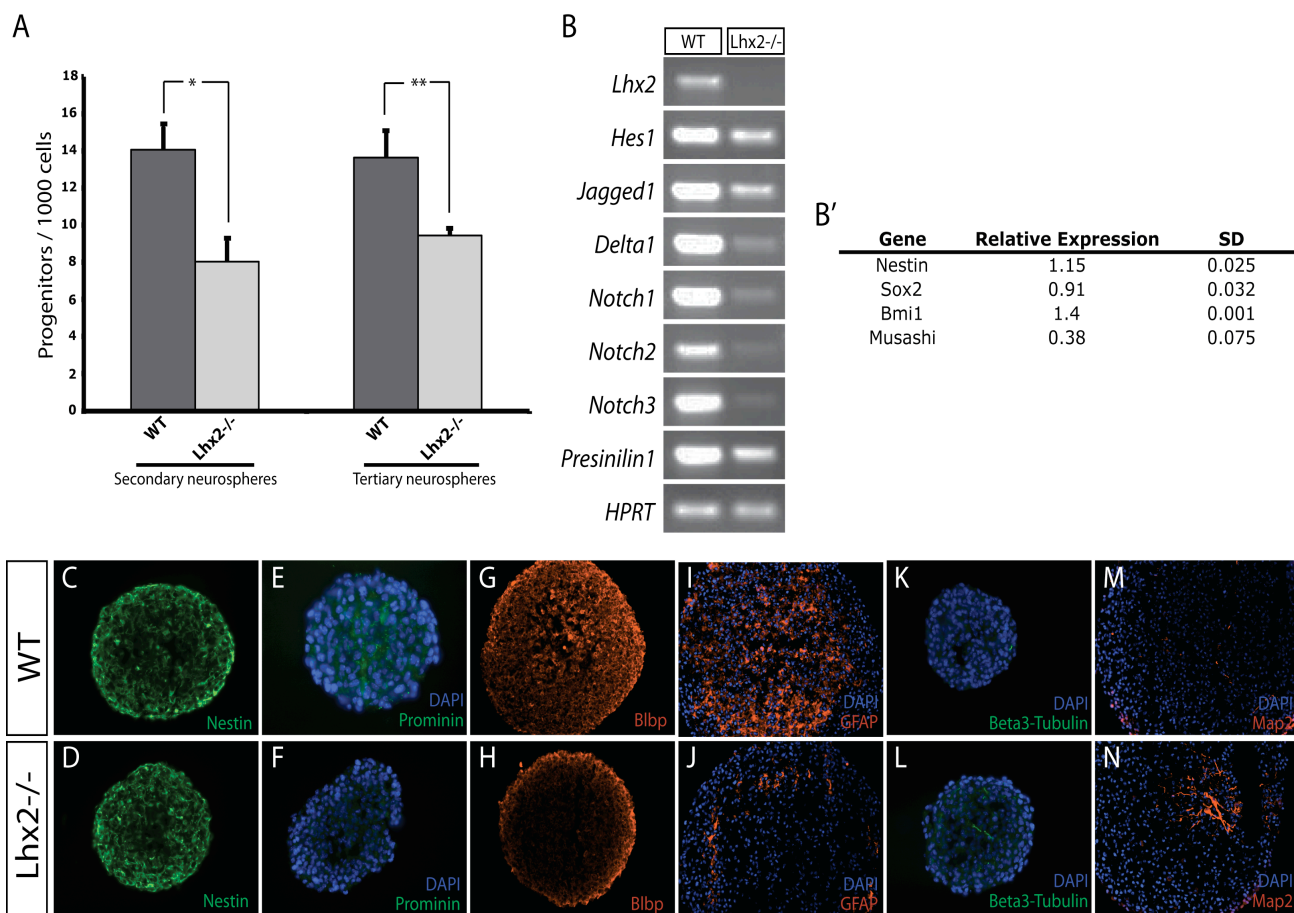
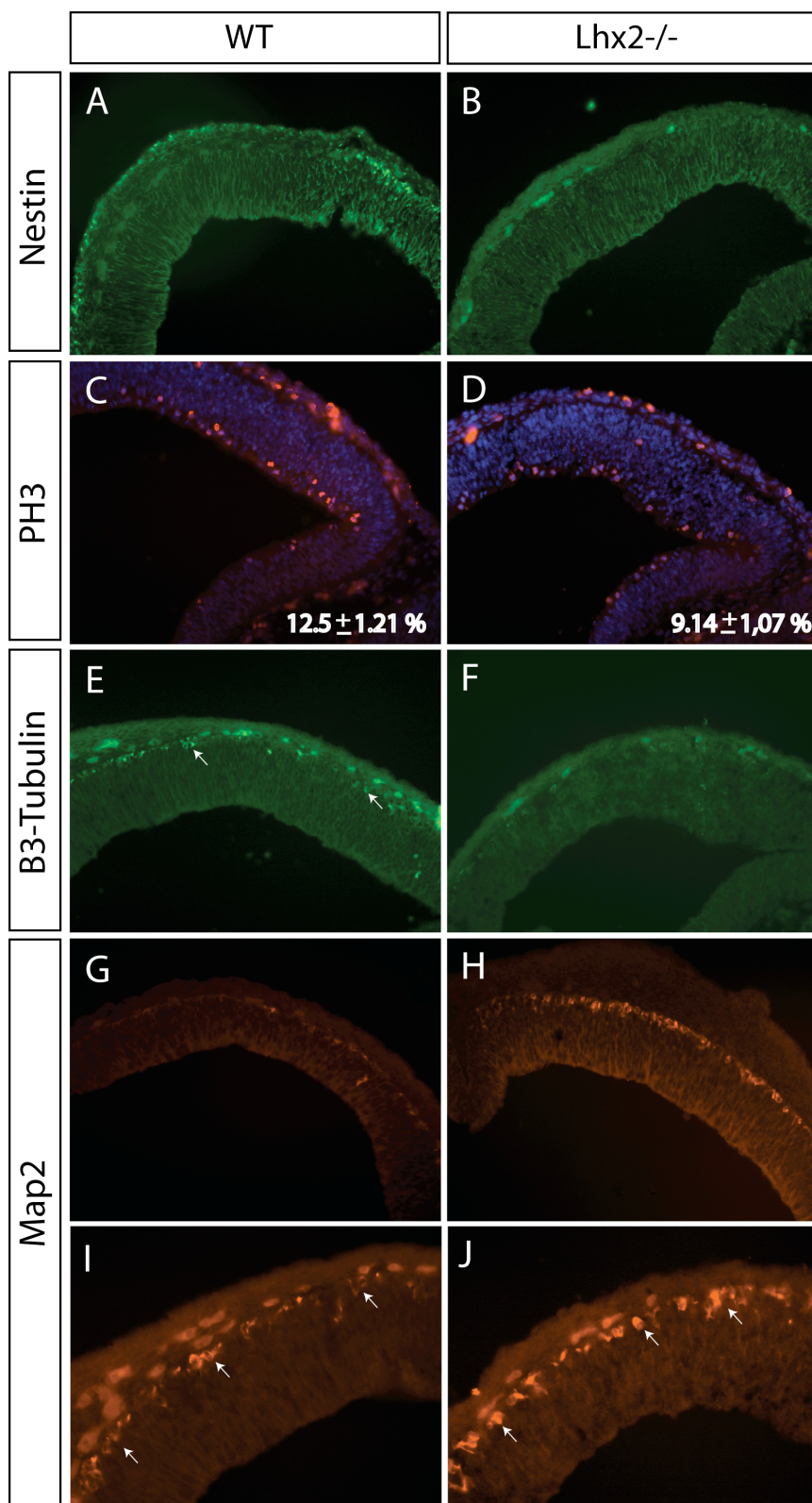
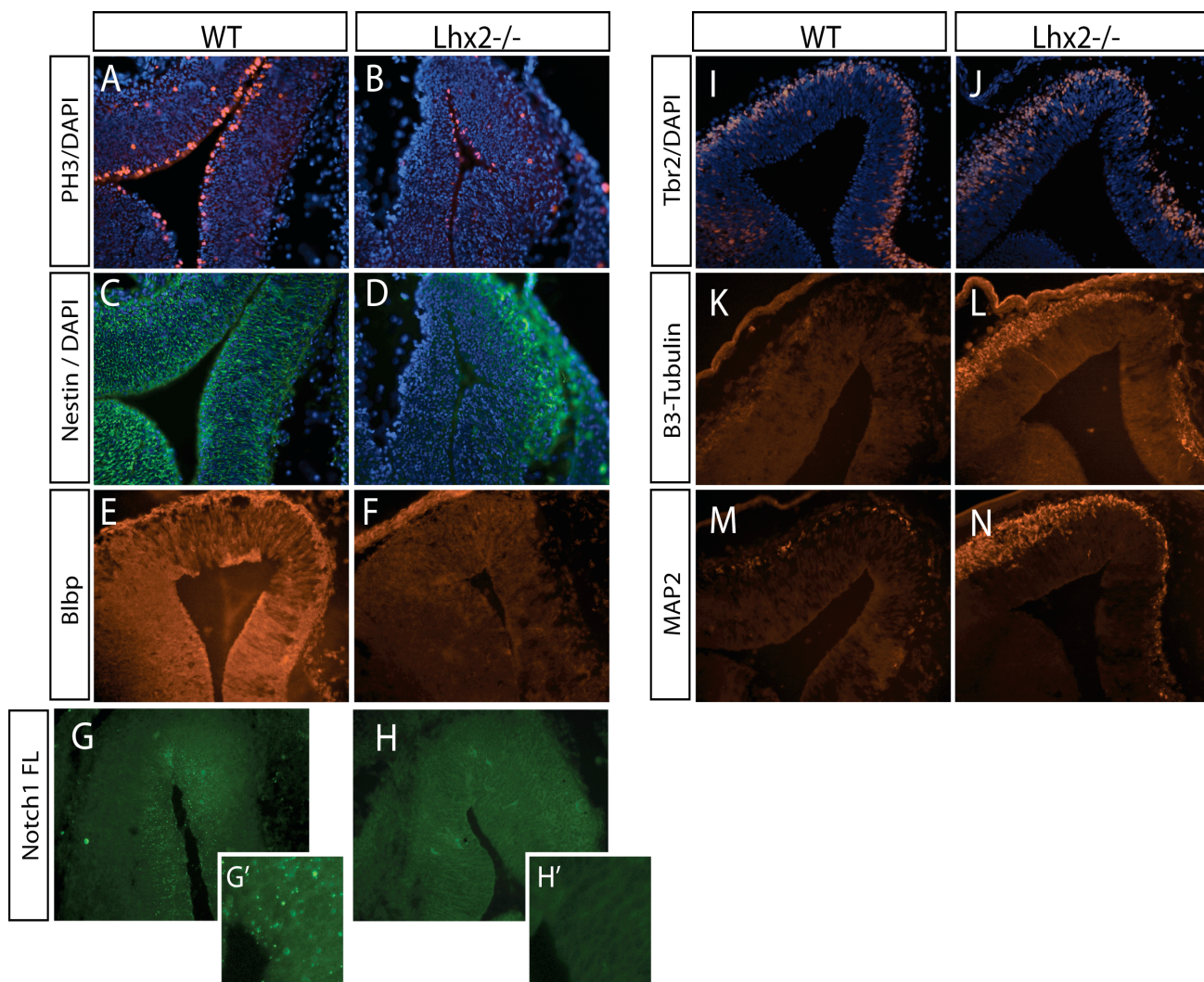


Figure 2

**Figure 3**

**Figure 4**

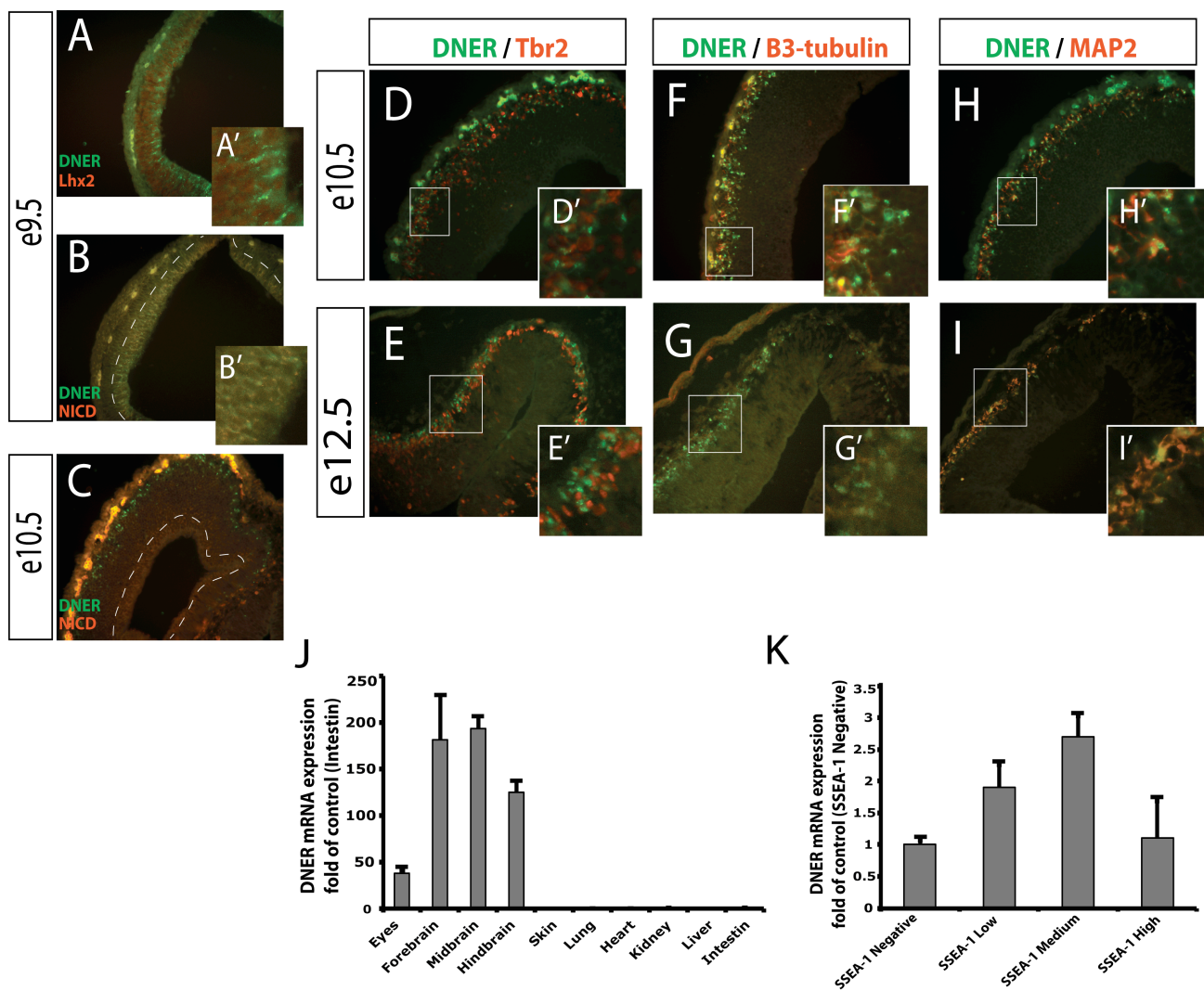


Figure 5

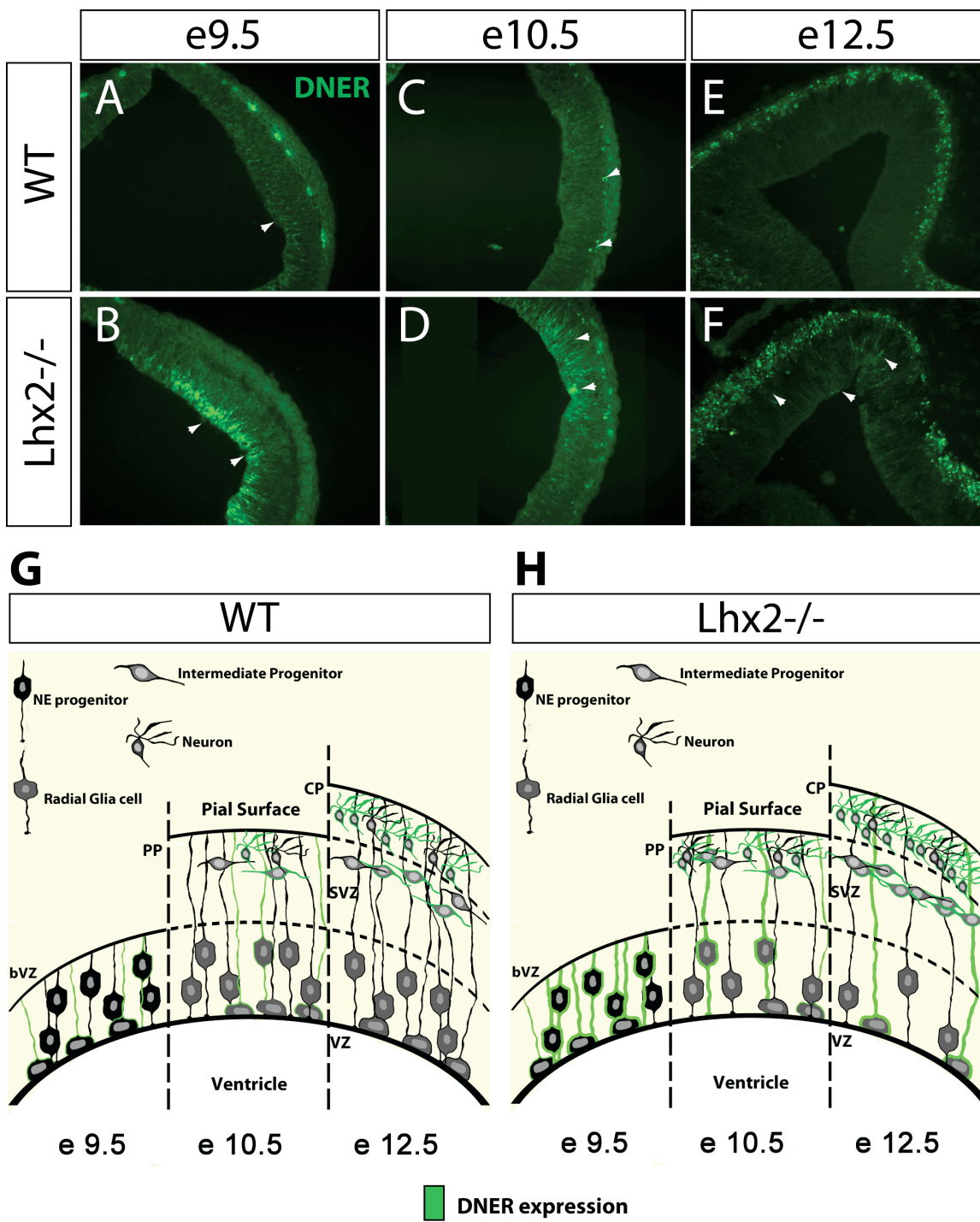


Figure 6

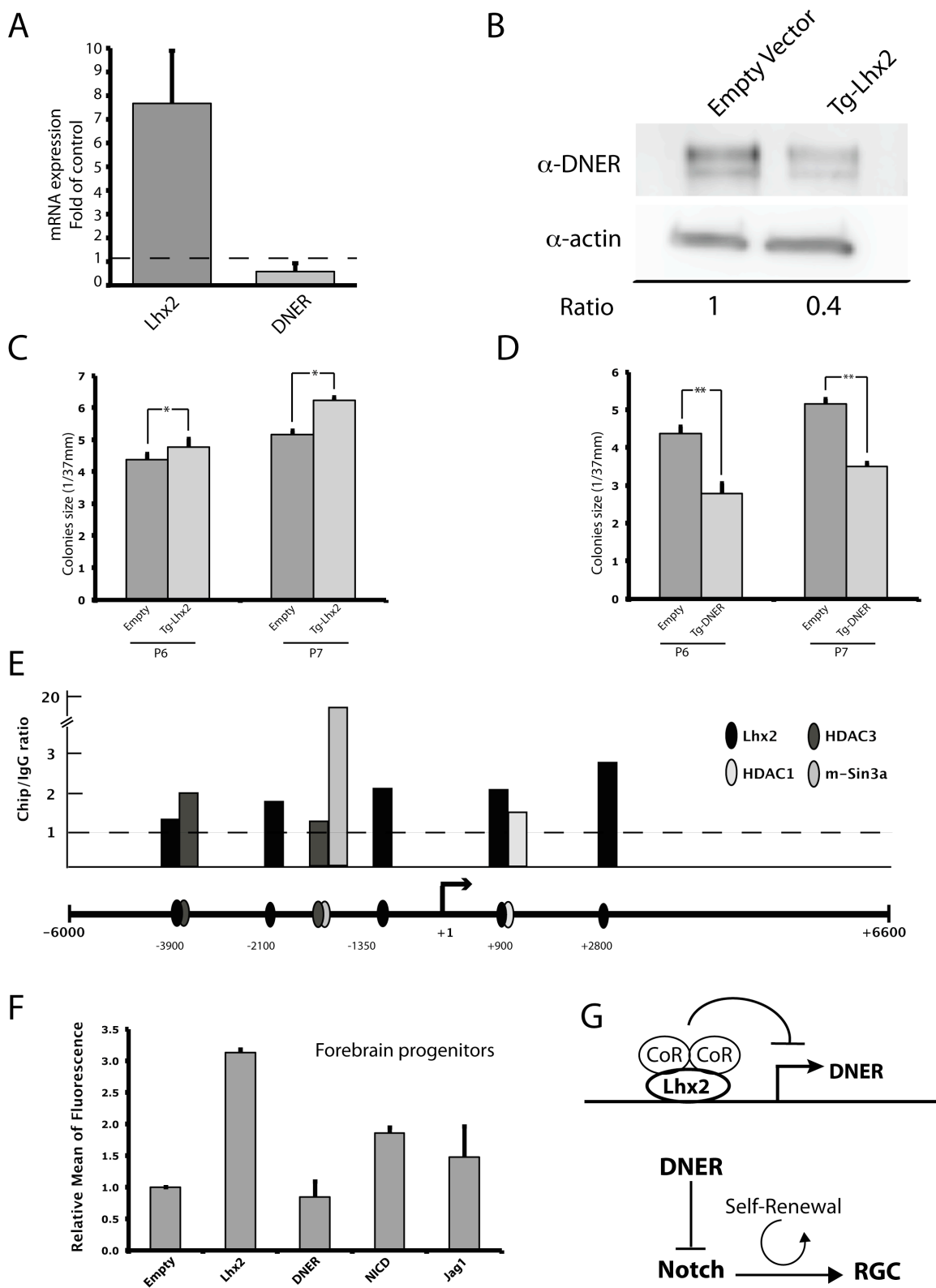


Figure 7

Chapitre 4

Discussion, perspectives et conclusions

Le chapitre 4 est une discussion sur les résultats présentés dans les 2 articles précédents. Il permet de résumer le rôle de Lhx2 dans le développement de l'oeil et du néocortex. Ce chapitre place les résultats obtenus en perspective et permet d'élaborer sur l'importance de ces découvertes.

Un nombre limité de facteurs de transcription à homéodomaine est exprimé dans la portion antérieure de la plaque neurale et est essentiel pour la spécification du champ rétinien [145]. Parmi ces gènes, on retrouve *Lhx2*. La mutation de ce facteur de transcription à LIM homéodomaine entraîne un arrêt de la formation de l'oeil au stade de la vésicule optique (e9.5) [154]. *Pax6* est considéré comme étant un maître régulateur du développement de l'oeil [158] et son ablation chez la souris entraîne un phénotype semblable à celui observé chez les mutants *Lhx2*. En effet, le défaut de formation de l'oeil survient dans les deux cas après la formation de la vésicule optique [169]. Il était donc concevable de penser que *Lhx2* pouvait contrôler la transcription de *Pax6* à ce stade. Toutefois, il fut démontré que l'expression de *Pax6* est maintenue dans la vésicule optique des embryons *Lhx2*^{-/-} [154]. La mécanistique de l'implication de *Lhx2* dans le développement de l'oeil était donc jusqu'à maintenant inconnue.

***Lhx2* et *Rx* sont les premiers déterminants du futur champ rétinien.**

À l'aide d'hybridation *in situ* sur des embryons au stade de 2 somites, nous avons démontré que *Lhx2* et *Rx* sont les deux premiers gènes à être exprimés dans la région qui deviendra le champ rétinien. En absence de *Lhx2*, l'expression des autres déterminants du champ rétinien (*Rx*, *Six3*, *Pax6*) est retardée. *Lhx2* est donc requis pour directement initier ou permettre l'activation de la transcription de ces gènes. La mutation *Lhx2* au niveau du développement de l'oeil est phénotypiquement semblable à celle de *Pax6* chez la souris et *Six3* chez le medaka (knockdown induit par morpholino). Toutefois, la perte de fonction de *Lhx2* est unique en ce qui a trait de l'effet sur l'expression des gènes

nécessaires pour déterminer l'identité rétinienne. En effet, chez les mutants *Pax6* ou *Six3*, l'initiation des gènes rétiniens n'est pas affecté au stade de la plaque neurale et de la vésicule optique [165, 265], faisant ainsi de *Lhx2* le régulateur de l'expression initiale des déterminants rétiniens. Il serait raisonnable de penser que *Rx*, qui est exprimé très tôt (e7.5 dans la plaque neurale antérieure) et dans le même domaine que *Lhx2*, peut aussi contrôler l'expression initiale des autres déterminants rétiniens. Toutefois, l'élimination de l'expression de *Rx* chez la souris démontre que ce n'est pas le cas. En effet, bien qu'étant requis pour les étapes initiales du développement de l'oeil (les embryons *Rx*^{-/-} présentent un défaut de formation du sulcus optique), *Rx* n'est pas requis pour l'expression initiale des déterminants rétiniens. L'activation de *Pax6*, *Six3* et *Otx2* est normale dans la plaque neurale des mutants *Rx*, il n'y a que l'augmentation subséquente de ces gènes dans les progéniteurs rétiniens qui soit *Rx* dépendante [185]. Donc, ces observations confirment le rôle unique de *Lhx2* comme activateur initial des déterminants du champ rétinien.

Interrelation entre les déterminants du champ rétinien.

Nous démontrons également que l'expression de *Six3* est diminuée dans le télencéphale en absence de *Lhx2* (Fig. 3B). Une étude ultérieure a démontrée que dans cette région, une relation inverse existerait entre ces deux gènes, où *Six3* serait en amont de *Lhx2* [266]. Effectuée chez le poisson zèbre, cette étude démontre que la surexpression de *Lhx2* peut sauver la réduction de taille du télencéphale engendré par l'absence de *Six3*. Toutefois, il est possible d'exclure cette relation génétique au niveau du développement du système visuel. En effet, bien qu'étant exprimé avant *Lhx2* dans la plaque neurale

antérieure [266], *Six3* est seulement présent dans le champ rétinien 6-12 heures après *Lhx2* et *Rx*. Bien que ces travaux proposent une relation inverse à ce que nous observons, ils confirment que *Lhx2* et *Six3* peuvent interagir dans la même voie de signalisation. De plus, il est tout à fait possible que le mécanisme d'action de *Lhx2* puisse différer d'un tissu à l'autre. Effectivement, la présence de domaine LIM sur ce facteur de transcription permet une variété d'interactions protéiques pouvant moduler la spécificité de la liaison avec l'ADN, faisant de *Lhx2* un régulateur tissu-spécifique [221].

Le fait que *Lhx2* soit requis pour l'expression initiale de *Rx*, *Six3* et *Pax6* laisse supposer un rôle au sommet de la cascade moléculaire déclenchée lors du développement de l'œil. Toutefois, deux faits contredisent cette idée. Premièrement, nos expériences de surexpression de *Lhx2* dans les cellules souches/progénitrices rétiniennes, bien qu'entraînant une importante augmentation de l'expression de *Six6*, n'ont que peu d'effet sur l'expression de *Six3* et *Pax6* (Fig. 7). De plus, la formation de yeux ectopiques suivant la surexpression de *Lhx2* n'a été rapporté dans aucun organisme modèle alors que celle de *Pax6*, *Rx*, *Six3* ou *Six6* peut activer ce processus [175, 181, 267-269]. *Lhx2* ne serait donc pas un initiateur suffisamment puissant de la cascade moléculaire qui doit être déclenchée pour que l'œil se développe. Toutefois, son rôle d'initiateur de l'expression initial des déterminants du champ rétinien est essentiel. Une explication possible de ces observations serait que *Lhx2* jouerait un rôle de potentiateur de transcription pour les déterminants rétiniens avec l'établissement de l'identité rétinienne. Un gène dans un état "potent" est caractérisé par une organisation de la chromatine sous la forme active [270]. Avant leur expression, un groupe de gène appartenant à une lignée spécifique peut subir une potentiation, pour en quelque sorte préparer le déclenchement d'une cascade

moléculaire [271]. Ce phénomène de potentiation fut proposé comme étant un mécanisme important avant l'expression des facteurs de transcription qui établissent l'identité définitive des cellules souches hématopoïétiques multipotentes [272]. Nous proposons donc que *Lhx2* serait essentiel pour préparer (potentiation) les autres déterminants rétiniens à être exprimé. Aucune étude n'a jusqu'à maintenant établie de relation directe entre *Lhx2* et les modifications à la chromatine. Il serait intéressant d'analyser la possibilité que *Lhx2* puisse jouer un rôle de régulateur épigénétique et ainsi influencer la conformation de la chromatine aux gènes cibles. Par exemple, il serait envisageable d'utiliser une méthode de "Methylation Specific PCR" (MSP) [273]. Cette méthode consisterait à un traitement bi-sulfite sur de l'ADN génomique WT et *Lhx2*^{-/-} pour ensuite effectuer une PCR sensible à la méthylation aux promoteurs de *Rx*, *Six3* et *Pax6*. De cette façon, nous pourrions déterminer si l'absence de *Lhx2* entraîne une hyper-méthylation aux promoteurs de ces gènes, ce qui résulterait en une déficience de leur expression.

Collaboration entre *Lhx2* et *Pax6* pour la trans-activation de *Six6*.

Un fois l'identité rétinienne définitive établie, la suite du développement de l'oeil nécessiterait l'action concertée des facteurs de transcription considérés comme étant des maîtres régulateur du développement de l'œil (*Rx*, *Six3*, *Six6*, *Lhx2*, *Pax6* et *Otx2*). En support à cette idée, les études de Zuber et al. chez le *Xénotopus* ont démontré la présence d'un réseau pouvant s'auto-réguler dans la région définie par l'expression d'*Otx2*. Ce réseau de facteurs de transcription permettrait une régulation où se produirait des phénomènes d'activation synergique et d'auto-régulation positive rétrograde [145]. Nous

avons démontré qu'un tel mécanisme implique Lhx2 en collaboration avec Pax6. En effet, Lhx2 et Pax6 collaborent ensemble en s'associant à la chromatine au locus de *Six6*. Cette association résulte en une trans-activation synergique de *Six6*. La collaboration de 2 gènes maîtres régulateurs du développement de l'oeil démontré ici ouvre la porte à l'existence possible d'autres complexes régulateurs encore non caractérisés. Chez le *Xénotopus*, il fut démontré que la surexpression combinée de Pax6, Six3 et Otx2 résulte en une plus forte induction de yeux ectopiques comparativement à la surexpression de Pax6 seul [145]. Dans l'optique de tester si ce mode de régulation transcriptionnel pouvait s'appliquer à l'induction de la transcription de *Six6*, nous avons surexprimé un cocktail de maîtres régulateurs réiniens (Six3, Pax6, Lhx2, Otx2) dans un système *in vitro* et nous avons mesuré l'activation du promoteur de *Six6*. L'action concertée de ces facteurs n'a pas été en mesure de surpasser la trans-activation réalisée à l'aide de Pax6 et Lhx2 seul (Fig. 4C). Donc, en plus d'être requis pour l'expression initiale des déterminants réiniens, l'action de Lhx2 en collaboration avec Pax6 est nécessaire pour la trans-activation plus tardive de *Six6*.

Lhx2 et le contrôle de la prolifération des cellules souches/progénitrices réiniennes embryonnaires.

Nous avons récemment caractérisé une nouvelle population de cellules NE réiniennes présente dans la vésicule optique chez la souris [167]. Nous avons pris avantage de cette expertise afin de caractériser le rôle de Lhx2 dans le contrôle du comportement des cellules NE réiniennes. Nous démontrons ici que les cellules NE réiniennes *Lhx2*^{-/-}

prolifèrent moins que les cellules de type sauvage. Cette diminution serait due à un blocage en phase G1 ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose (Fig. 5). Nous révélons également que, comme vu *in vivo*, Lhx2 contrôle l'expression de *Six3* et *Six6* *in vitro*. Des études ont démontré que *Six3* et *Six6* répriment l'activité de la cyclin dépendant kinase inhibiteur (CDKI) p27^{Kip1} [152, 274]. Conséquemment, nous observons une augmentation de l'expression de p27^{Kip1} dans les cellules NE rétinienne déficientes en Lhx2. *Six3* peut aussi contrôler la prolifération en se liant à Geminin et ainsi empêcher la séquestration de Cdt1 [178]. Il serait intéressant de déterminer si la baisse de prolifération observée dans les cellules *Lhx2*^{-/-} pourrait être aussi due à une hausse de la liaison de Geminin à Cdt1, interférant ainsi avec la formation du complexe de pré-réplication. Des expériences de sauvetage, en utilisant des small hairpin (sh) d'ARN afin de diminuer le niveau de Geminin et ainsi contrer l'effet d'une diminution de *Six3*, seraient envisageables. La preuve de la diminution de la prolifération des cellules NE rétinienne mutantes pour Lhx2 fournit donc une explication de la réduction de la taille de la vésicule optique observée chez les mutants Lhx2 [154].

Ces observations mettent aussi en évidence la fonction opposée de Pax6 dans le contrôle de la prolifération des cellules NE rétinienne. En effet, nous avons précédemment démontré que Pax6 est un répresseur de la prolifération de ces cellules, agissant via l'activation de CDKIs [167]. L'interprétation la plus simple de ces données serait que Lhx2 et Pax6 jouent des rôles contraires dans le contrôle de la prolifération des cellules souches/progénitrices rétinienne, permettant ainsi le maintien d'une délicate balance entre la prolifération et la sortie du cycle cellulaire. Toutefois, le modèle se complexifie

en prenant en considération que *Lhx2* et *Pax6* sont tout deux requis pour l'expression de *Six6* dans les colonies rétiniennes. Pour l'instant, la signification biologique de cette complexe relation entre *Lhx2* et *Pax6* est encore mal comprise. L'ablation de *Lhx2* et *Pax6* dans la vésicule optique permettrait-elle de retrouver une balance au niveau de la prolifération des cellules NE rétiniennes de la vésicule optique? La génération de doubles mutants *Lhx2*^{-/-}; *Pax6*^{-/-} permettrait de répondre à cette intrigante question.

Cette étude se place dans un contexte où les efforts de développement de thérapies cellulaires visant à contrer les effets des maladies dégénératives du SNC commencent à porter fruits. En effet, des progrès importants ont été réalisés dans le traitement de plusieurs maladies neurodégénératives tels la maladie de Parkinson, la maladie d'Huntington, la sclérose amyotrophique latérale et l'Alzheimer [275]. Une limitation majeure à ces traitements a longtemps été l'accès difficile aux cellules primitives tels les cellules souches embryonnaires. Toutefois, ce problème peut être résolu avec l'arrivée d'un nouveau type de cellules souches pluripotentes, les cellules souches pluripotentes induites (provenant de cellules somatiques adultes) [276, 277]. Suite à l'obtention d'une population cellulaire primitive apte à proliférer en quantité suffisante pour des fins de transplantation, il faut être en mesure de pouvoir moduler la destinée cellulaire de ces cellules. En effet, le stade de différenciation des cellules injectées peut avoir un impact majeur sur le succès de la transplantation. Par exemple, il fut démontré que lors de la transplantation de précurseurs post-mitotiques rétiniens, l'intégration dans la rétine se fait beaucoup plus efficacement qu'avec des cellules souches/progénitrices [278]. Éclaircir le rôle de protéines jouant un rôle déterminant dans le comportement des cellules souches/progénitrices comme *Lhx2* est donc nécessaire pour mieux contrôler ces

cellules. Il est possible d'imaginer des conditions de culture normalisées où le niveau d'expression de déterminants comme Lhx2 pourrait être modulé, ce qui permettrait d'obtenir les cellules dans l'état voulu et en nombre suffisant. La résolution des mécanismes moléculaires contrôlant le comportement des cellules souches permet d'améliorer les techniques de culture et contribue grandement à la guérison de plusieurs maladies dégénératives. Par exemple, au niveau des maladies dégénératives oculaires, les promesses de guérisons sont déjà grandes et pourront ainsi être améliorées. Dans le cas du glaucome et de la cataracte, l'utilisation des cellules souches comme sources de remplacement cellulaire est déjà monnaie courante [279]. Toutefois, ces techniques se heurtent à des problèmes d'expansion cellulaire en culture [280, 281]. Aussi, le traitement des rétinopathies héréditaires et dégénératives pourrait avantageusement bénéficier des avancements des thérapies impliquant les cellules souches. Par exemple, la dégénérescence maculaire atrophique liée à l'âge résulte en une perte des cellules épithéliales pigmentées rétiniennes (EPR) et des photorécepteurs. Cette rétinopathie est responsable de la moitié de cas de cécité légale dans tous les pays développés [282, 283]. Malheureusement, aucun traitement à ce jour n'est disponible pour cette maladie [279]. L'espoir réside donc présentement dans des traitements impliquant la transplantation de cellules EPR ou de photorécepteurs qui pourraient être obtenus de cellules souches embryonnaires ou de cellules pluripotentes induites.

Donc, la modulation du comportement de ces cellules en culture nécessite une compréhension très poussée des mécanismes moléculaires responsable de la prolifération et la différenciation de ces cellules. Cette présente étude contribue à raffiner ces connaissances.

Les facteurs de transcription à LIM homéodomaine sont connus pour jouer différents rôles dans le SNC en développement. Par exemple, *Lhx1* est un inducteur neural [229] et son ablation chez la souris résulte en de graves défauts de formation de la tête [230]. Aussi, *Lhx5* (membre de la même famille) est essentiel pour la migration et la différenciation terminale des précurseurs neuraux de l'hippocampe [231]. *Lhx2*, membre de la famille *apterous*, est fortement exprimé dans le cerveau en développement et les souris *Lhx2*^{-/-} présentent une diminution de volume du cerveau antérieur [154]. Toutefois, malgré l'importance de ce phénotype, le mécanisme impliquant *Lhx2* dans la formation du cerveau restait encore à élucider. Nos observations sur les embryons *Lhx2*^{-/-} ont démontré un phénomène de différenciation neuronale prématuré et une perte du pool de cellules souches/progénitrices neurales. Des phénotypes semblables sont caractéristiques de mutations affectant des membres de la voie de signalisation Notch. Ces données nous ont donc permis de poser l'hypothèse que *Lhx2* pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la voie Notch dans le SNC en développement

***Lhx2* est requis pour l'activation normale de la voie Notch dans les progéniteurs rétiniens.**

Nous avons précédemment démontré que *Lhx2* est nécessaire pour la prolifération normale des progéniteurs rétiniens [284]. Dans la présente étude, à l'aide de l'essai neurosphère, nous révélons que l'absence de *Lhx2* entraîne un défaut d'auto-renouvellement de ces cellules en plus d'une différenciation neuronale prématurée. Ces phénotypes sont semblable à ce qui a déjà été observé avec les cellules souches neurales

triples mutantes *Hes1;Hes3;Hes5* [285]. En effet, il est convenu que l'activation de la voie Notch entraîne le maintien des cellules souches neurales, alors que son inactivation crée une déplétion de cette population cellulaire [104, 106, 286, 287]. L'analyse comparative d'expression des gènes dans les progéniteurs rétiniens mutants pour *Lhx2* révèle que l'activation de la voie Notch est effectivement déficiente. *In vivo*, nous avons observé une diminution de *Hes1* et de la protéine Notch1 au niveau de la vésicule optique. Des neurones rétiniens ectopiques étant observés chez les embryons *Hes1*^{+/-} [195], il était logique de s'attendre à un phénomène de neurogénèse prématuré dans cette structure. Bien que nous observions une augmentation de l'expression du gène pro-neural *Mash1*, aucun neurone ectopique ne fut observé chez le mutant *Lhx2* (Fig. 1). Le fait que la mutation *Lhx2* cause ce phénomène dans les colonies rétiniennes seulement peut être expliqué par la grande stringence de la procédure d'isolement des cellules progénitrices rétiniennes. En effet, cette méthode sélectionne seulement une minorité des cellules présentes dans la vésicule optique. Les colonies de cellules progénitrices rétiniennes (neurosphères) sont donc formées d'une population clonale de cellules primitives. Donc, *Lhx2* serait essentiel pour le maintien de l'état non-différencié des cellules rétiniennes les plus primitives. Ces observations suggèrent donc que *Lhx2* a un rôle crucial à jouer dans le maintien de l'état non différencié des progéniteurs neuroépithéliaux via l'activation de la voie de signalisation Notch. On ne doit également pas écarter la possibilité d'une compensation *in vivo* de la perte de *Lhx2*, qui ne serait pas possible dans le contexte *in vitro* de l'essai neurosphère.

Lhx2 contrôle le maintien des cellules de glie radiale dans le télencéphale.

Dans le télencéphale, la neurogénèse débute vers e10-e10.5 lorsque les premiers types de neurones produits, les cellules de Cajal-Retzius, apparaissent et forment la "preplate" [288]. Nous démontrons ici que la perte d'expression de Lhx2 dans le télencéphale entraîne une production accélérée de neurones au tout début de la neurogénèse. Plus tard, au stade e12.5, cette neurogénèse prématurée est accompagnée d'une forte augmentation de la présence de progéniteurs intermédiaires (aussi nommés progéniteurs basaux). De plus, à ce stade de développement du néocortex, on peut remarquer une perte massive des cellules de glie radiale (CGR). Ces observations viennent compléter celles précédemment faites par un autre groupe qui avait mis en évidence une baisse importante de prolifération dans le néocortex *Lhx2*^{-/-} à e12.5, sans aucune augmentation de l'apoptose [154]. Il est aussi très intéressant de noter que les progéniteurs neuroépithéliaux (NE) ne semblent pas affectés par la perte de Lhx2. En effet, on n'observe aucune différence dans le nombre de cellules Nestin⁺ autant *in vitro* (Fig. 2) qu'*in vivo* (Fig. 1 et Fig. 2). Cela peut signifier que *Lhx2* est d'une importance capitale pour contrôler la différenciation des CGR en PI ou en neurones au début de la neurogénèse, mais qu'il n'est pas nécessaire pour le maintien des cellules progénitrices neurales à des stades développementaux plus primitifs. La déplétion des CGR en absence de Lhx2 peut être causée par leur différenciation prématurée en neurones de Cajal-Retzius par neurogénèse directe accélérée ou en PI, qui par la suite causera une neurogénèse indirecte accélérée. Normalement, la grande majorité des divisions des CGR sont asymétriques. Certaines divisions peuvent donner naissance à une autre CGR et un neurone post-mitotique et certaines peuvent engendrer une CGR et un progéniteur intermédiaire [59]. Les CGR sont

aussi capable de division symétrique proliférative (qui donne deux CGR) permettant ainsi un accroissement du bassin de CGR dans la zone ventriculaire [289, 290]. Une absence de *Lhx2* dans le télencéphale semble donc causer un déséquilibre dans le mode de division des CGR. Il serait intéressant de déterminer de quelle façon l'absence de *Lhx2* affecte la division des CGR. Es-ce que cette mutation entraîne une perte du bassin de CGR due à l'incapacité de ces cellules d'effectuer des divisions symétriques prolifératives? La déplétion des CGR dans la zone ventriculaire du télencéphale *Lhx2*^{-/-} serait donc due à une augmentation du mode de division asymétrique ou symétrique neurogénique. Des expériences d'imagerie en temps réel sur des coupes coronales mises en culture dans du collagène [290, 291] suivies d'un marquage permettant de discriminer les différents types cellulaires engendrés permettraient de répondre à cette question. Il fut démontré que le bassin de cellules PI est essentiel pour contrôler la taille du cerveau [292]. La différenciation précoce des CGR en PI pourrait entraîner une réduction du nombre de ces cellules plus tard au cours du développement et ainsi causer une réduction du volume du cerveau chez le mutant *Lhx2*. Justement, il fut démontré que la taille du cerveau antérieur est réduite de plus de 30% chez les *Lhx2*^{-/-} à e12.5 et que de mêmes résultats sont obtenus à e13.5 [154].

Les CGR sont dépendantes de la signalisation Notch afin de maintenir leur état non différencié et leur pouvoir prolifératif [115, 293]. Nous révélons ici que l'expression du récepteur Notch1 est fortement diminuée dans la zone ventriculaire du télencéphale des embryons *Lhx2*^{-/-} (Fig. 3). Cette observation, couplée à la neurogénèse prématurée et la perte du bassin de cellules progénitrices neurales, rappelle les phénotypes observés lors de l'ablation conditionnelle de *Notch1* dans le télencéphale en développement en utilisant

la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de *Nestin* ou *FoxG1*. En effet, on observe dans ces mutants une neurogénèse accélérée et une importante réduction du bassin de cellules progénitrices neurales [114, 115]. Parmi les autres évidences qui confirment que Notch1 promeut la genèse de CGR, notons le fait que les progéniteurs télencéphaliques soumis à la surexpression d'une forme constitutivement active de Notch1 deviennent des CGR [293]. Il est très intéressant de noter que les CGR et les PI peuvent être distingués sur la base de l'activité du complexe intégrateur de signaux Notch RBPJ. Effectivement, l'activité transcriptionnelle de RBPJ est élevée dans les CGR, alors qu'elle est atténuée dans les PI [92]. De plus, l'ablation conditionnelle de RBPJ sous le contrôle du promoteur de *Nestin* résulte en une différenciation précoce des CGR en PI [294]. Ici, nous proposons que *Lhx2* est essentiel pour le maintien des CGR dans la télencéphale au tout début de la neurogénèse et plus tard. Pour supporter cette idée, mentionnons que le développement cortical des souris mutantes pour *Notch1* et *Numb* se fait de façon relativement normale jusqu'au début de la neurogénèse [295]. En absence de *Lhx2*, la diminution de l'expression des gènes reliés à la voie Notch que nous avons observé entraîne une différenciation prématurée des CGR en PI et en neurones post-mitotiques. Mentionnons qu'un essai neurosphère sur les progéniteurs télencéphaliques à e12.5 serait utile pour mieux caractériser les différentes populations présentes en absence de *Lhx2*. Des tests d'auto-renouvellement pourraient confirmer l'augmentation de PI. En effet, une plus grande proportion de ces cellules entraînerait une diminution de la fréquence de colonies engendrées suite à un passage [294]. Toutefois, l'effet de la perte de *Lhx2* sur le mode de division des progéniteurs neuraux reste à déterminer. Les phénotypes observés peuvent être dus à une augmentation de la neurogénèse directe

(division asymétrique d'une CGR donnant naissance à un neurone) ou à une augmentation de la neurogénèse indirecte (génération de PI qui donneront naissance aux neurones par la suite. Jugeant par la sévérité et le stade primitif où elle survient, nous proposons que la déplétion soit due à une augmentation de la neurogénèse directe dans les CGR.

Lhx2 contrôle l'activation de la voie Notch en inhibant l'expression du ligand atypique DNER.

Une analyse globale d'expression différentielle des gènes faite à l'aide d'ARNm exprimés dans le cerveau antérieur d'embryons *Lhx2*^{-/-} et de type sauvage avant le début de la neurogénèse (e9.0-e9.25) fut effectué. Cela a permis de révéler une augmentation de l'expression de DNER d'environ 3 fois chez dans le télencéphale en développement des embryons mutants pour Lhx2 (Figure 5). Des études ont démontré que *DNER* est fortement exprimé dans le SNC à partir de e14.5. Du jours post-natal 7 (P7) à P20, il est exprimé dans les neurones du cervelet, de l'hippocampe et du néocortex [130]. Aucune étude n'avait précédemment rapporté l'expression de ce ligand atypique de la voie Notch avant e14.5. Dans cette étude, nous démontrons pour la première fois que *DNER* est exprimé dans le cerveau antérieur à partir de e9.5. À ce stade, la protéine semble enrichie dans la zone apicale de la couche pseudostratifiée de cellules NE Lhx2⁺ (Fig.5 A). Au début de la neurogénèse, DNER n'est plus exprimé dans la zone apicale. En effet, son domaine d'expression se retrouve restreint à la "preplate" où les PI et les neurones nouvellement formés sont situés. Dans le cerveau antérieure des mutants *Lhx2* à e9.5, la

localisation de DNER semble normale, mais son expression est fortement augmentée. Plus tard, la surexpression est toujours aussi intense et est maintenant situé à la "preplate". En plus de cette surexpression, on remarque une localisation ectopique de la protéine qui est alors présente sur toute la largeur du télencéphale dorso-latéral dans ce qui pourrait être les extensions radiales des CGR présentent chez le mutant à ce stade (e10.5).

Récemment, Mind bomb-1 (*mib1*), une E3 ubiquitin ligase essentiel pour l'endocytose des ligands de la voie Notch, a été identifié comme étant requis pour activer cette voie dans les CGR. En utilisant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de *Nestin* et *GFAP*, les auteurs ont démontrés que l'ablation de *mib1* dans le télencéphale entraîne une perte des CGR et une expansion des PI et des neurones post-mitotiques. Cela démontre qu'en plus des neurones nouvellement formés, les PI ont un rôle essentiel à jouer dans l'activation de la voie Notch en agissant comme cellule présentatrices de ligands, ce qui permet aux CGR de maintenir leur état de cellules souches/progénitrices [296]. Les phénotypes observés dans le télencéphale des embryons *mib1*^{-/-} rappellent ceux observés dans la même région chez les embryons *Lhx2*^{-/-}. Il nous est donc possible de spéculer que la surexpression de DNER dans les progéniteurs neuraux cause une baisse de l'activation de la voie Notch, ce qui mène à la différenciation prématurée des CGR. Dans des conditions normales, DNER est initialement exprimé dans les progéniteurs NE. Au début de la neurogénèse, on retrouve l'expression de DNER dans une sous-population de PI et de neurones. Donc, ces cellules exprimant DNER contrôle le niveau d'activation de la voie Notch dans les CGR permettant ainsi à ces cellules d'effectuer des divisions symétriques prolifératives ou asymétriques. En absence de *Lhx2*, la surexpression de

DNER perturbe cette balance précise ce qui mène à une diminution des CGR. Donc, dans ce contexte développemental, DNER agit comme un inhibiteur de la voie Notch.

Rôle de DNER dans le néocortex.

La surexpression de Lhx2 dans les progéniteurs neuraux du cerveau antérieur *in vitro* confirme son action répressive sur *DNER* au niveau de l'ARN et des protéines. De plus, nous avons démontré que Lhx2 lie directement la chromatine au promoteur de *DNER*. Cette liaison est accompagnée du co-recrutement de co-répresseurs dans la même région. Donc, Lhx2 pourrait être un activateur de la voie Notch dans les cellules progénitrices neurales. Ce rôle serait accompli par l'intermédiaire de son action répressive sur *DNER*. En utilisant un système rapporteur de l'activité de la voie Notch dépendante de l'intégrateur RBPJ, nous démontrons que Lhx2 est un fort activateur de la voie Notch. Comme mentionné précédemment, une activité transcriptionnelle élevée de RBPJ est nécessaire pour le maintien des CGR. La perte de ces cellules en absence de Lhx2 semble vouloir confirmer l'importance de son rôle dans le maintien de l'état non différencié via l'activation de la voie Notch dans ces progéniteurs neuraux. Il est intéressant de noter que Lhx2 est un plus fort activateur que le ligand canonique Jagged1 et que le domaine intracellulaire de Notch1 (Fig.7 F). Ces observations suggèrent que Lhx2 peut activer Notch via différentes voies moléculaires qui convergent éventuellement vers RBPJ. Finalement, nous amenons la preuve que *DNER* inhibe la signalisation Notch dépendante de l'intégrateur RBPJ. Cette observation contraste avec les études effectuées précédemment où *DNER* fut identifié comme étant un activateur de

la voie Notch [130, 134]. Dans cette étude, les auteurs démontrent que DNER peut activer la voie Notch via la voie classique RBPJ. Toutefois, l'action de DNER se fait préférentiellement via Deltex, à l'image de F3/Contactin (un ligand Notch atypique récemment identifié) qui promeut la différenciation des oligodendrocytes de façon Deltex-dépendante et Hes-indépendante [121, 297]. Les auteurs proposent que DNER aurait la capacité d'engendrer différentes réponses dépendamment du type cellulaire et de l'état de la cellule [134]. En support à ce postulat, une autre étude a récemment démontré que DNER induit la différenciation des cellules néoplasiques dérivées de tumeurs cérébrales. Nous proposons donc que l'action de DNER est contexte dépendante et qu'il joue un rôle inhibiteur de la voie Notch dans le contexte du néocortex en développement.

Les observations faites dans ce travail pourraient être utiles pour mieux comprendre la biologie des cancers du SNC. Par exemple, il fut démontré que les épendymomes (tumeur pouvant être localisée tout le long du SNC) contiennent une population rare de cellules semblables aux CGR, qui peuvent donner naissance à des tumeurs lors de transplantations orthotopiques chez la souris [298]. De plus, les épendymomes humains ont le même profil d'expression génique que les CGR embryonnaires de la zone subventriculaire du ventricule latéral et du canal rachidien chez la souris [298]. De façon intéressante, les données de notre étude révèlent que *Lhx2* est nécessaire pour le maintien des CGR. Bien que *Lhx2* n'a jamais été identifié comme étant un oncogène, il serait très intéressant d'analyser les niveaux d'expression de *Lhx2* dans ces tumeurs. En cas de forte expression de ce facteur de transcription, l'effet d'un traitement par interférence d'ARN sur des épendymomes en culture serait envisageable. Alternativement, étant donné que DNER joue un rôle de supresseur de tumeur dans les

GBM [138], sa surexpression serait aussi intéressante. Des analyses par essais clonogéniques et par essais de transplantation *in vivo* seraient faites par la suite. La diminution de Lhx2 ou la surexpression de DNER dans les cellules initiatrices de tumeurs semblables aux CGR pourrait entraîner leur déplétion et ainsi diminuer la prolifération de ces tumeurs. Dans le cas de résultats positifs, il serait envisageable d'injecter au site de la tumeur un peptide DNER soluble ou encore de procéder à des injections systémiques d'ARN d'interférence Lhx2 couplé à des nanoparticules [299] sur des modèles murins d'épendymomes [300]. Donc, cette étude pourrait avoir une implication médicale directe qui permettrait d'agir sur ce type de cancer du système nerveux central.

En conclusion, nous démontrons que Lhx2 est essentiel pour le maintien des CGR dans le télencéphale en développement. Lhx2 réprime l'action inhibitrice du ligand atypique de la voie Notch DNER en se liant directement à son promoteur en compagnie de co-répresseur. Le mécanisme exact de l'action répressive de DNER sur la voie Notch doit être mieux caractérisé. DNER pourrait agir de la même façon que Dlk-1, un autre ligand atypique de cette voie qui ne possède pas de motif DSL [125]. Des études ont démontrées que Dlk-1 exerce son action répressive sur la voie de signalisation Notch via un mécanisme d'inhibition en cis [126, 127]. Selon ce mécanisme, une grande quantité de ligands présents à la surface d'une cellule peut induire l'inhibition en cis (sur la même cellule) des ligands présent. Notons que les évidences d'un tel mécanisme sont plutôt nombreuses chez la drosophile, mais que la pertinence de l'inhibition en cis chez les mammifères restent à confirmer.

Conclusion

En résumé, nous démontrons deux nouveaux rôles pour Lhx2 dans le développement du SNC.

Premièrement, nous révélons que Lhx2 est requis pour les premières étapes de la spécification du champ rétinien. Lhx2 contrôle l'initiation des déterminants rétiniens *Pax6*, *Rx* et *Six3*. Une fois l'identité rétinienne définitive établie, Lhx2 interagit avec Pax6 afin d'induire l'expression de *Six6* dans la vésicule optique. Au niveau cellulaire, ce facteur de transcription à homéodomaine contrôle la prolifération des progéniteurs NE de la vésicule optique. En son absence, des CDKIs sont surexprimés et les cellules ont tendance à être bloqué en G1. Finalement, Lhx2 est aussi requis pour l'expression de *Six3* et *Six6* dans les cellules NE rétiniennes. Finalement, Lhx2 et Pax6 collaborent aussi ensemble à ce niveau pour induire l'activation de *Six6* de façon synergique. Cette étude définit donc le rôle de Lhx2 dans le développement primitif de l'oeil et démontre comment deux gènes maîtres régulateurs du développement de cette structure interagissent ensemble.

Deuxièmement, nous démontrons que Lhx2 est un facteur de transcription essentiel au maintien de cellules progénitrices neurales dans le néocortex en développement. Une absence de Lhx2 entraîne une différenciation neuronale prématurée et une perte du bassin de cellules progénitrices neurales *in vivo* et *in vitro*. Ces défauts corrélerent avec un défaut d'activation de la voie Notch dans la vésicule optique et le télencéphale. Conséquemment, nous révélons que la perte de Lhx2 dans le cerveau antérieure entraîne une forte augmentation du ligand atypique de la voie Notch DNER. Nos résultats confirment que

Lhx2 est requis pour sa répression en se liant directement à la chromatine de son promoteur en compagnie de co-répresseur. Des expériences utilisant un rapporteur de l'activation de la voie Notch révèle que Lhx2 est un fort activateur de la voie Notch, alors que DNER semble être un répresseur. Donc, nous concluons que Lhx2 active la voie Notch dans le télencéphale en réprimant l'inhibiteur DNER, permettant ainsi le maintien de l'état non différencié et le pouvoir prolifératif des cellules progénitrices neurales.

RÉFÉRENCES

1. Tam, P.P. and R.R. Behringer, *Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan*. Mech Dev, 1997. **68**(1-2): p. 3-25.
2. 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.
3. Chang, C. and A. Hemmati-Brivanlou, *Cell fate determination in embryonic ectoderm*. J Neurobiol, 1998. **36**(2): p. 128-51.
4. Hemmati-Brivanlou, A. and D.A. Melton, *Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in Xenopus*. Cell, 1994. **77**(2): p. 273-81.
5. Lamb, T.M., et al., *Neural induction by the secreted polypeptide noggin*. Science, 1993. **262**(5134): p. 713-8.
6. Sato, S.M. and T.D. Sargent, *Development of neural inducing capacity in dissociated Xenopus embryos*. Dev Biol, 1989. **134**(1): p. 263-6.
7. Godsave, S.F. and J.M. Slack, *Clonal analysis of mesoderm induction in Xenopus laevis*. Dev Biol, 1989. **134**(2): p. 486-90.
8. Weinstein, D.C. and A. Hemmati-Brivanlou, *Neural induction*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 411-33.
9. Vieira, C., et al., *Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers*. Int J Dev Biol. **54**(1): p. 7-20.

10. Wilson, P.A., et al., *Concentration-dependent patterning of the Xenopus ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1*. Development, 1997. **124**(16): p. 3177-84.
11. Colas, J.F. and G.C. Schoenwolf, *Towards a cellular and molecular understanding of neurulation*. Dev Dyn, 2001. **221**(2): p. 117-45.
12. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
13. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
14. Chambers, I. and A. Smith, *Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells*. Oncogene, 2004. **23**(43): p. 7150-60.
15. Gadue, P., et al., *Germ layer induction from embryonic stem cells*. Exp Hematol, 2005. **33**(9): p. 955-64.
16. Cartwright, P., et al., *LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism*. Development, 2005. **132**(5): p. 885-96.
17. Ying, Q.L., et al., *BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3*. Cell, 2003. **115**(3): p. 281-92.
18. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
19. Reubinoff, B.E., et al., *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(4): p. 399-404.

20. Forsyth, N.R., W.E. Wright, and J.W. Shay, *Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again*. *Differentiation*, 2002. **69**(4-5): p. 188-97.
21. Ginis, I., et al., *Differences between human and mouse embryonic stem cells*. *Dev Biol*, 2004. **269**(2): p. 360-80.
22. Wilson, S.W. and J.L. Rubenstein, *Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon*. *Neuron*, 2000. **28**(3): p. 641-51.
23. Shimamura, K. and J.L. Rubenstein, *Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain*. *Development*, 1997. **124**(14): p. 2709-18.
24. Hui, C.C. and A.L. Joyner, *A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene*. *Nat Genet*, 1993. **3**(3): p. 241-6.
25. Aoto, K., et al., *Mouse GLI3 regulates Fgf8 expression and apoptosis in the developing neural tube, face, and limb bud*. *Dev Biol*, 2002. **251**(2): p. 320-32.
26. Grove, E.A., et al., *The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice*. *Development*, 1998. **125**(12): p. 2315-25.
27. Tole, S., C.W. Ragsdale, and E.A. Grove, *Dorsoventral patterning of the telencephalon is disrupted in the mouse mutant extra-toes(J)*. *Dev Biol*, 2000. **217**(2): p. 254-65.

28. Echelard, Y., et al., *Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity.* Cell, 1993. **75**(7): p. 1417-30.
29. Ericson, J., et al., *Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube.* Cell, 1995. **81**(5): p. 747-56.
30. Rallu, M., et al., *Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both Gli3 and Hedgehog signaling.* Development, 2002. **129**(21): p. 4963-74.
31. Martynoga, B., et al., *Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis.* Dev Biol, 2005. **283**(1): p. 113-27.
32. Storm, E.E., et al., *Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers.* Development, 2006. **133**(9): p. 1831-44.
33. Gutin, G., et al., *FGF signalling generates ventral telencephalic cells independently of SHH.* Development, 2006. **133**(15): p. 2937-46.
34. Hebert, J.M. and G. Fishell, *The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required.* Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(9): p. 678-85.
35. Corbin, J.G., et al., *Combinatorial function of the homeodomain proteins Nkx2.1 and Gsh2 in ventral telencephalic patterning.* Development, 2003. **130**(20): p. 4895-906.

36. Theil, T., et al., *Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded Emx2 expression in the dorsal telencephalon*. *Development*, 2002. **129**(13): p. 3045-54.
37. Alvarez-Buylla, A., J.M. Garcia-Verdugo, and A.D. Tramontin, *A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. **2**(4): p. 287-93.
38. Joannides, A.J., et al., *A scaleable and defined system for generating neural stem cells from human embryonic stem cells*. *Stem Cells*, 2007. **25**(3): p. 731-7.
39. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. *Science*, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
40. Temple, S. and A. Alvarez-Buylla, *Stem cells in the adult mammalian central nervous system*. *Curr Opin Neurobiol*, 1999. **9**(1): p. 135-41.
41. Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson, *Regulatory mechanisms in stem cell biology*. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 287-98.
42. Gotz, M. and W.B. Huttner, *The cell biology of neurogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(10): p. 777-88.
43. Farkas, L.M. and W.B. Huttner, *The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(6): p. 707-15.
44. Rakic, P., *A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution*. *Trends Neurosci*, 1995. **18**(9): p. 383-8.
45. Lendahl, U., L.B. Zimmerman, and R.D. McKay, *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. *Cell*, 1990. **60**(4): p. 585-95.

46. Weigmann, A., et al., *Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12425-30.
47. Williams, B.P. and J. Price, *Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex*. Neuron, 1995. **14**(6): p. 1181-8.
48. Malatesta, P., E. Hartfuss, and M. Gotz, *Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage*. Development, 2000. **127**(24): p. 5253-63.
49. Huttner, W.B. and M. Brand, *Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells*. Curr Opin Neurobiol, 1997. **7**(1): p. 29-39.
50. Kriegstein, A.R. and M. Gotz, *Radial glia diversity: a matter of cell fate*. Glia, 2003. **43**(1): p. 37-43.
51. Rasin, M.R., et al., *Numb and Numbl are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors*. Nat Neurosci, 2007. **10**(7): p. 819-27.
52. Rakic, P., *Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex*. J Comp Neurol, 1972. **145**(1): p. 61-83.
53. Misson, J.P., et al., *Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker*. Brain Res Dev Brain Res, 1988. **44**(1): p. 95-108.

54. Gray, G.E. and J.R. Sanes, *Lineage of radial glia in the chicken optic tectum*. Development, 1992. **114**(1): p. 271-83.
55. Noctor, S.C., V. Martinez-Cerdeno, and A.R. Kriegstein, *Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis*. J Comp Neurol, 2008. **508**(1): p. 28-44.
56. Malatesta, P., et al., *Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate*. Neuron, 2003. **37**(5): p. 751-64.
57. Anthony, T.E., et al., *Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system*. Neuron, 2004. **41**(6): p. 881-90.
58. Noctor, S.C., et al., *Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases*. Nat Neurosci, 2004. **7**(2): p. 136-44.
59. Haubensak, W., et al., *Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3196-201.
60. Noctor, S.C., V. Martinez-Cerdeno, and A.R. Kriegstein, *Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis*. Arch Neurol, 2007. **64**(5): p. 639-42.
61. Englund, C., et al., *Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex*. J Neurosci, 2005. **25**(1): p. 247-51.

62. Nieto, M., et al., *Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex*. J Comp Neurol, 2004. **479**(2): p. 168-80.
63. Bonfanti, L. and P. Peretto, *Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone*. Prog Neurobiol, 2007. **83**(1): p. 24-36.
64. Brazel, C.Y., et al., *Roles of the mammalian subventricular zone in brain development*. Prog Neurobiol, 2003. **69**(1): p. 49-69.
65. Chojnacki, A.K., G.K. Mak, and S. Weiss, *Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both?* Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(2): p. 153-63.
66. Kaplan, M.S., *Proliferation of subependymal cells in the adult primate CNS: differential uptake of DNA labelled precursors*. J Hirnforsch, 1983. **24**(1): p. 23-33.
67. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. Science, 1992. **255**(5052): p. 1707-10.
68. Levison, S.W. and J.E. Goldman, *Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain*. Neuron, 1993. **10**(2): p. 201-12.
69. Lois, C. and A. Alvarez-Buylla, *Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 2074-7.

70. Miller, F.D. and A. Gauthier-Fisher, *Home at last: neural stem cell niches defined*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 507-10.
71. Morshead, C.M., et al., *Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells*. Neuron, 1994. **13**(5): p. 1071-82.
72. Johansson, C.B., et al., *Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system*. Cell, 1999. **96**(1): p. 25-34.
73. Doetsch, F., et al., *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. Cell, 1999. **97**(6): p. 703-16.
74. Ahmed, S., *The culture of neural stem cells*. J Cell Biochem, 2009. **106**(1): p. 1-6.
75. Reynolds, B.A., W. Tetzlaff, and S. Weiss, *A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes*. J Neurosci, 1992. **12**(11): p. 4565-74.
76. Lobo, M.V., et al., *Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(1): p. 89-103.
77. Gritti, A., et al., *Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS*. Neurosci Lett, 1995. **185**(3): p. 151-4.
78. Weiss, S., et al., *Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain?* Trends Neurosci, 1996. **19**(9): p. 387-93.

79. Reynolds, B.A. and R.L. Rietze, *Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship*. Nat Methods, 2005. **2**(5): p. 333-6.
80. Zechner, D., et al., *beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system*. Dev Biol, 2003. **258**(2): p. 406-18.
81. Kohtz, J.D., et al., *Regionalization within the mammalian telencephalon is mediated by changes in responsiveness to Sonic Hedgehog*. Development, 1998. **125**(24): p. 5079-89.
82. Gaiano, N., et al., *A method for rapid gain-of-function studies in the mouse embryonic nervous system*. Nat Neurosci, 1999. **2**(9): p. 812-9.
83. Rowitch, D.H., et al., *Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells*. J Neurosci, 1999. **19**(20): p. 8954-65.
84. Dahmane, N., et al., *The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis*. Development, 2001. **128**(24): p. 5201-12.
85. Gubbay, J., et al., *A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes*. Nature, 1990. **346**(6281): p. 245-50.
86. Bylund, M., et al., *Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity*. Nat Neurosci, 2003. **6**(11): p. 1162-8.
87. Graham, V., et al., *SOX2 functions to maintain neural progenitor identity*. Neuron, 2003. **39**(5): p. 749-65.
88. Miyagi, S., et al., *Consequence of the loss of Sox2 in the developing brain of the mouse*. FEBS Lett, 2008. **582**(18): p. 2811-5.

89. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. Science, 1999. **284**(5415): p. 770-6.
90. Gaiano, N. and G. Fishell, *The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates*. Annu Rev Neurosci, 2002. **25**: p. 471-90.
91. Yoon, K. and N. Gaiano, *Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 709-15.
92. Mizutani, K., et al., *Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors*. Nature, 2007. **449**(7160): p. 351-5.
93. Wharton, K.A., et al., *Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats*. Cell, 1985. **43**(3 Pt 2): p. 567-81.
94. Yochem, J. and I. Greenwald, *glp-1 and lin-12, genes implicated in distinct cell-cell interactions in C. elegans, encode similar transmembrane proteins*. Cell, 1989. **58**(3): p. 553-63.
95. Mumm, J.S., et al., *A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 197-206.
96. Imai, T., et al., *The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3888-900.

97. Kaneko, Y., et al., *Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells*. Dev Neurosci, 2000. **22**(1-2): p. 139-53.
98. Sakakibara, S., et al., *Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell*. Dev Biol, 1996. **176**(2): p. 230-42.
99. Wakamatsu, Y., et al., *NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1*. Neuron, 1999. **23**(1): p. 71-81.
100. Okano, H., T. Imai, and M. Okabe, *Musashi: a translational regulator of cell fate*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 7): p. 1355-9.
101. Ahimou, F., et al., *The adhesion force of Notch with Delta and the rate of Notch signaling*. J Cell Biol, 2004. **167**(6): p. 1217-29.
102. Kageyama, R. and T. Ohtsuka, *The Notch-Hes pathway in mammalian neural development*. Cell Res, 1999. **9**(3): p. 179-88.
103. Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori, *HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway*. J Cell Physiol, 2003. **194**(3): p. 237-55.
104. Bertrand, N., D.S. Castro, and F. Guillemot, *Proneural genes and the specification of neural cell types*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(7): p. 517-30.
105. Doe, C.Q. and C.S. Goodman, *Early events in insect neurogenesis. II. The role of cell interactions and cell lineage in the determination of neuronal precursor cells*. Dev Biol, 1985. **111**(1): p. 206-19.
106. Kageyama, R., et al., *Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition*. Nat Neurosci, 2008. **11**(11): p. 1247-51.

107. Shimojo, H., T. Ohtsuka, and R. Kageyama, *Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors*. *Neuron*, 2008. **58**(1): p. 52-64.
108. Swiatek, P.J., et al., *Notch1 is essential for postimplantation development in mice*. *Genes Dev*, 1994. **8**(6): p. 707-19.
109. Conlon, R.A., A.G. Reaume, and J. Rossant, *Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites*. *Development*, 1995. **121**(5): p. 1533-45.
110. de la Pompa, J.L., et al., *Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis*. *Development*, 1997. **124**(6): p. 1139-48.
111. Ishibashi, M., et al., *Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects*. *Genes Dev*, 1995. **9**(24): p. 3136-48.
112. Feder, J.N., L.Y. Jan, and Y.N. Jan, *A rat gene with sequence homology to the Drosophila gene hairy is rapidly induced by growth factors known to influence neuronal differentiation*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(1): p. 105-13.
113. Solecki, D.J., et al., *Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation*. *Neuron*, 2001. **31**(4): p. 557-68.
114. Yang, X., et al., *Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway*. *Dev Biol*, 2004. **269**(1): p. 81-94.
115. Yoon, K., et al., *Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors*. *J Neurosci*, 2004. **24**(43): p. 9497-506.

116. Ohtsuka, T., et al., *Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation*. EMBO J, 1999. **18**(8): p. 2196-207.
117. D'Souza, B., A. Miyamoto, and G. Weinmaster, *The many facets of Notch ligands*. Oncogene, 2008. **27**(38): p. 5148-67.
118. Matsuno, K., et al., *Involvement of a proline-rich motif and RING-H2 finger of Deltex in the regulation of Notch signaling*. Development, 2002. **129**(4): p. 1049-59.
119. Liu, W.H. and M.Z. Lai, *Deltex regulates T-cell activation by targeted degradation of active MEKK1*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(4): p. 1367-78.
120. Yamamoto, N., et al., *Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 45031-40.
121. Hu, Q.D., et al., *F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation*. Cell, 2003. **115**(2): p. 163-75.
122. Laborda, J., et al., *dlk, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line*. J Biol Chem, 1993. **268**(6): p. 3817-20.
123. Smas, C.M. and H.S. Sul, *Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation*. Cell, 1993. **73**(4): p. 725-34.
124. Baladron, V., et al., *dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats*. Exp Cell Res, 2005. **303**(2): p. 343-59.

125. Nueda, M.L., et al., *The EGF-like protein dlk1 inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells*. J Mol Biol, 2007. **367**(5): p. 1281-93.
126. Bray, S.J., et al., *The atypical mammalian ligand Delta-like homologue 1 (Dlk1) can regulate Notch signalling in Drosophila*. BMC Dev Biol, 2008. **8**: p. 11.
127. Glittenberg, M., et al., *Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis*. EMBO J, 2006. **25**(20): p. 4697-706.
128. Klein, T., K. Brennan, and A.M. Arias, *An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in Drosophila*. Dev Biol, 1997. **189**(1): p. 123-34.
129. Klein, T. and A.M. Arias, *Interactions among Delta, Serrate and Fringe modulate Notch activity during Drosophila wing development*. Development, 1998. **125**(15): p. 2951-62.
130. Eiraku, M., et al., *Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25400-7.
131. Nishizumi, H., et al., *BET, a novel neuronal transmembrane protein with multiple EGF-like motifs*. Neuroreport, 2002. **13**(6): p. 909-15.
132. Saito, S.Y. and H. Takeshima, *DNER as key molecule for cerebellar maturation*. Cerebellum, 2006. **5**(3): p. 227-31.

133. Shimizu, K., et al., *Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods.* J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32961-9.
134. Eiraku, M., et al., *DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development.* Nat Neurosci, 2005. **8**(7): p. 873-80.
135. Tohgo, A., et al., *Impaired cerebellar functions in mutant mice lacking DNER.* Mol Cell Neurosci, 2006. **31**(2): p. 326-33.
136. Fukazawa, N., et al., *Receptor type protein tyrosine phosphatase zeta-pleiotrophin signaling controls endocytic trafficking of DNER that regulates neuritogenesis.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(14): p. 4494-506.
137. Kurisu, J., et al., *Polarized targeting of DNER into dendritic plasma membrane in hippocampal neurons depends on endocytosis.* J Neurochem. **113**(6): p. 1598-610.
138. Sun, P., et al., *DNER, an epigenetically modulated gene, regulates glioblastoma-derived neurosphere cell differentiation and tumor propagation.* Stem Cells, 2009. **27**(7): p. 1473-86.
139. Cui, X.Y., et al., *NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes.* J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25858-65.
140. Chow, R.L. and R.A. Lang, *Early eye development in vertebrates.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 255-96.
141. McAvoy, J.W., *Cytoplasmic processes interconnect lens placode and optic vesicle during eye morphogenesis.* Exp Eye Res, 1980. **31**(5): p. 527-34.

142. 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.
143. Kessler, D.S. and D.A. Melton, *Vertebrate embryonic induction: mesodermal and neural patterning*. Science, 1994. **266**(5185): p. 596-604.
144. Streit, A. and C.D. Stern, *Mesoderm patterning and somite formation during node regression: differential effects of chordin and noggin*. Mech Dev, 1999. **85**(1-2): p. 85-96.
145. 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.
146. 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.
147. 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.
148. Li, H., et al., *A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate*. Development, 1997. **124**(3): p. 603-15.
149. Wawersik, S., P. Purcell, and R.L. Maas, *Pax6 and the genetic control of early eye development*. Results Probl Cell Differ, 2000. **31**: p. 15-36.
150. 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.

151. Lagutin, O.V., et al., *Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development*. *Genes Dev*, 2003. **17**(3): p. 368-79.
152. Li, X., et al., *Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation*. *Science*, 2002. **297**(5584): p. 1180-3.
153. Mathers, P.H., et al., *The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development*. *Nature*, 1997. **387**(6633): p. 603-7.
154. 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.
155. Yu, R.T., et al., *The orphan nuclear receptor Tlx regulates Pax2 and is essential for vision*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(6): p. 2621-5.
156. Callaerts, P., G. Halder, and W.J. Gehring, *PAX-6 in development and evolution*. *Annu Rev Neurosci*, 1997. **20**: p. 483-532.
157. Walther, C. and P. Gruss, *Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS*. *Development*, 1991. **113**(4): p. 1435-49.
158. 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.
159. Gehring, W.J. and K. Ikeo, *Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution*. *Trends Genet*, 1999. **15**(9): p. 371-7.

160. 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.
161. Jordan, T., et al., *The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia*. Nat Genet, 1992. **1**(5): p. 328-32.
162. 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.
163. 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.
164. 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.
165. Bernier, G., et al., *Isolation and characterization of a downstream target of Pax6 in the mammalian retinal primordium*. Development, 2001. **128**(20): p. 3987-94.
166. Marquardt, T., et al., *Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells*. Cell, 2001. **105**(1): p. 43-55.
167. 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.
168. Duparc, R.H., et al., *Pax6 is required for delta-catenin/neurojugin expression during retinal, cerebellar and cortical development in mice*. Dev Biol, 2006. **300**(2): p. 647-55.

169. 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.
170. Grindley, J.C., et al., *Disruption of PAX6 function in mice homozygous for the Pax6Sey-1Neu mutation produces abnormalities in the early development and regionalization of the diencephalon.* Mech Dev, 1997. **64**(1-2): p. 111-26.
171. St-Onge, L., et al., *Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas.* Nature, 1997. **387**(6631): p. 406-9.
172. 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.
173. 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.
174. Couly, G. and N.M. Le Douarin, *The fate map of the cephalic neural primordium at the presomitic to the 3-somite stage in the avian embryo.* Development, 1988. **103 Suppl**: p. 101-13.
175. Loosli, F., S. Winkler, and J. Wittbrodt, *Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina.* Genes Dev, 1999. **13**(6): p. 649-54.
176. 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.
177. Liu, W., et al., *Six3 activation of Pax6 expression is essential for mammalian lens induction and specification.* EMBO J, 2006. **25**(22): p. 5383-95.

178. Del Bene, F., K. Tessmar-Raible, and J. Wittbrodt, *Direct interaction of geminin and Six3 in eye development*. Nature, 2004. **427**(6976): p. 745-9.
179. Wohlschlegel, J.A., et al., *Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1*. Science, 2000. **290**(5500): p. 2309-12.
180. 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.
181. 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.
182. Furukawa, T., C.A. Kozak, and C.L. Cepko, *rax, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3088-93.
183. Chuang, J.C. and P.A. Raymond, *Zebrafish genes rx1 and rx2 help define the region of forebrain that gives rise to retina*. Dev Biol, 2001. **231**(1): p. 13-30.
184. 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.
185. Bailey, T.J., et al., *Regulation of vertebrate eye development by Rx genes*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(8-9): p. 761-70.
186. 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.

187. Cepko, C.L., et al., *Cell fate determination in the vertebrate retina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 589-95.
188. Cayouette, M., L. Poggi, and W.A. Harris, *Lineage in the vertebrate retina*. Trends Neurosci, 2006. **29**(10): p. 563-70.
189. Tropepe, V., et al., *Retinal stem cells in the adult mammalian eye*. Science, 2000. **287**(5460): p. 2032-6.
190. Koso, H., et al., *SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signaling pathway*. Dev Biol, 2006. **292**(1): p. 265-76.
191. Ahmad, I., et al., *Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(1): p. 53-62.
192. Hyer, J., *Looking at an oft-overlooked part of the eye: a new perspective on ciliary body development in chick*. Dev Neurosci, 2004. **26**(5-6): p. 456-65.
193. Bao, Z.Z. and C.L. Cepko, *The expression and function of Notch pathway genes in the developing rat eye*. J Neurosci, 1997. **17**(4): p. 1425-34.
194. Silva, A.O., C.E. Ercole, and S.C. McLoon, *Regulation of ganglion cell production by Notch signaling during retinal development*. J Neurobiol, 2003. **54**(3): p. 511-24.
195. Lee, H.Y., et al., *Multiple requirements for Hes 1 during early eye formation*. Dev Biol, 2005. **284**(2): p. 464-78.
196. Riesenberger, A.N., et al., *Rbpj cell autonomous regulation of retinal ganglion cell and cone photoreceptor fates in the mouse retina*. J Neurosci, 2009. **29**(41): p. 12865-77.

197. Austin, C.P., et al., *Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch*. *Development*, 1995. **121**(11): p. 3637-50.
198. Dorsky, R.I., D.H. Rapaport, and W.A. Harris, *Xotch inhibits cell differentiation in the Xenopus retina*. *Neuron*, 1995. **14**(3): p. 487-96.
199. Hojo, M., et al., *Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene Hes5 in mouse retina*. *Development*, 2000. **127**(12): p. 2515-22.
200. Tomita, K., et al., *Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis*. *Neuron*, 1996. **16**(4): p. 723-34.
201. Takatsuka, K., et al., *Roles of the bHLH gene Hes1 in retinal morphogenesis*. *Brain Res*, 2004. **1004**(1-2): p. 148-55.
202. Jadhav, A.P., H.A. Mason, and C.L. Cepko, *Notch 1 inhibits photoreceptor production in the developing mammalian retina*. *Development*, 2006. **133**(5): p. 913-23.
203. Dyer, M.A. and C.L. Cepko, *Regulating proliferation during retinal development*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. **2**(5): p. 333-42.
204. Dyer, M.A. and C.L. Cepko, *Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury*. *Nat Neurosci*, 2000. **3**(9): p. 873-80.
205. Lillien, L. and C. Cepko, *Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF alpha*. *Development*, 1992. **115**(1): p. 253-66.
206. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. *Science*, 1996. **274**(5293): p. 1672-7.

207. Weinberg, R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, 1995. **81**(3): p. 323-30.
208. Morgan, D.O., *Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 261-91.
209. Vidal, A. and A. Koff, *Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause*. Gene, 2000. **247**(1-2): p. 1-15.
210. Levine, E.M., et al., *p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina*. Dev Biol, 2000. **219**(2): p. 299-314.
211. Dyer, M.A. and C.L. Cepko, *p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations*. J Neurosci, 2001. **21**(12): p. 4259-71.
212. Dyer, M.A. and C.L. Cepko, *p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina*. Development, 2000. **127**(16): p. 3593-605.
213. Ellis, H.M., D.R. Spann, and J.W. Posakony, *extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in Drosophila, defines a new class of helix-loop-helix proteins*. Cell, 1990. **61**(1): p. 27-38.
214. Bang, A.G., A.M. Bailey, and J.W. Posakony, *Hairless promotes stable commitment to the sensory organ precursor cell fate by negatively regulating the activity of the Notch signaling pathway*. Dev Biol, 1995. **172**(2): p. 479-94.
215. Wang, S.W., et al., *Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells*. Genes Dev, 2001. **15**(1): p. 24-9.

216. Brown, N.L., et al., *Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation*. Development, 2001. **128**(13): p. 2497-508.
217. Inoue, T., et al., *Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina*. Development, 2002. **129**(4): p. 831-42.
218. Dawid, I.B. and A.B. Chitnis, *Lim homeobox genes and the CNS: a close relationship*. Neuron, 2001. **30**(2): p. 301-3.
219. Hobert, O. and H. Westphal, - Trends Genet, 2000. **16**(2): p. 75-83.
220. 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.
221. Jurata, L.W. and G.N. Gill, *Structure and function of LIM domains*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **228**: p. 75-113.
222. Mann, R.S., *The specificity of homeotic gene function*. Bioessays, 1995. **17**(10): p. 855-63.
223. Karlsson, O., et al., *Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain*. Nature, 1990. **344**(6269): p. 879-82.
224. German, M.S., et al., *Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex*. Genes Dev, 1992. **6**(11): p. 2165-76.
225. Roberson, M.S., et al., *Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(5): p. 2985-93.

226. 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.
227. Jurata, L.W., S.L. Pfaff, and G.N. Gill, *The nuclear LIM domain interactor NLI mediates homo- and heterodimerization of LIM domain transcription factors*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(6): p. 3152-7.
228. Bach, I., et al., *RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex*. *Nat Genet*, 1999. **22**(4): p. 394-9.
229. Taira, M., et al., *Role of the LIM class homeodomain protein Xlim-1 in neural and muscle induction by the Spemann organizer in Xenopus*. *Nature*, 1994. **372**(6507): p. 677-9.
230. Shawlot, W. and R.R. Behringer, *Requirement for Lim1 in head-organizer function*. *Nature*, 1995. **374**(6521): p. 425-30.
231. Zhao, Y., et al., *Control of hippocampal morphogenesis and neuronal differentiation by the LIM homeobox gene Lhx5*. *Science*, 1999. **284**(5417): p. 1155-8.
232. Li, H., et al., *Gsh-4 encodes a LIM-type homeodomain, is expressed in the developing central nervous system and is required for early postnatal survival*. *EMBO J*, 1994. **13**(12): p. 2876-85.
233. Sheng, H.Z., et al., *Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3*. *Science*, 1996. **272**(5264): p. 1004-7.

234. Sheng, H.Z., et al., *Multistep control of pituitary organogenesis*. Science, 1997. **278**(5344): p. 1809-12.
235. Sharma, K., et al., *LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons*. Cell, 1998. **95**(6): p. 817-28.
236. Pfaff, S.L., et al., *Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation*. Cell, 1996. **84**(2): p. 309-20.
237. Ahlgren, U., et al., *Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells*. Nature, 1997. **385**(6613): p. 257-60.
238. Tsuchida, T., et al., *Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes*. Cell, 1994. **79**(6): p. 957-70.
239. Fischer, A.J., et al., *Transient expression of LIM-domain transcription factors is coincident with delayed maturation of photoreceptors in the chicken retina*. J Comp Neurol, 2008. **506**(4): p. 584-603.
240. Matsumoto, K., et al., *L3, a novel murine LIM-homeodomain transcription factor expressed in the ventral telencephalon and the mesenchyme surrounding the oral cavity*. Neurosci Lett, 1996. **204**(1-2): p. 113-6.
241. 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.
242. Zhao, Y., et al., *Isolated cleft palate in mice with a targeted mutation of the LIM homeobox gene lhx8*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15002-6.

243. Denaxa, M., P.T. Sharpe, and V. Pachnis, *The LIM homeodomain transcription factors Lhx6 and Lhx7 are key regulators of mammalian dentition*. *Dev Biol*, 2009. **333**(2): p. 324-36.
244. Burbach, J.P. and M.P. Smidt, *Molecular programming of stem cells into mesodiencephalic dopaminergic neurons*. *Trends Neurosci*, 2006. **29**(11): p. 601-3.
245. Matisse, M.P. and A.L. Joyner, *Expression patterns of developmental control genes in normal and Engrailed-1 mutant mouse spinal cord reveal early diversity in developing interneurons*. *J Neurosci*, 1997. **17**(20): p. 7805-16.
246. Lee, K.J., M. Mendelsohn, and T.M. Jessell, *Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord*. *Genes Dev*, 1998. **12**(21): p. 3394-407.
247. Liem, K.F., Jr., G. Tremml, and T.M. Jessell, *A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord*. *Cell*, 1997. **91**(1): p. 127-38.
248. Retaux, S., et al., *Lhx9: a novel LIM-homeodomain gene expressed in the developing forebrain*. *J Neurosci*, 1999. **19**(2): p. 783-93.
249. Birk, O.S., et al., *The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation*. *Nature*, 2000. **403**(6772): p. 909-13.
250. Bertuzzi, S., et al., *Characterization of Lhx9, a novel LIM/homeobox gene expressed by the pioneer neurons in the mouse cerebral cortex*. *Mech Dev*, 1999. **81**(1-2): p. 193-8.

251. 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.
252. 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.
253. Wandzioch, E., et al., *Lhx2^{-/-} mice develop liver fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16549-54.
254. 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.
255. Dahl, L., et al., *Lhx2 expression promotes self-renewal of a distinct multipotential hematopoietic progenitor cell in embryonic stem cell-derived embryoid bodies*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2025.
256. Rhee, H., L. Polak, and E. Fuchs, *Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles*. Science, 2006. **312**(5782): p. 1946-9.
257. Monuki, E.S., F.D. Porter, and C.A. Walsh, *Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway*. Neuron, 2001. **32**(4): p. 591-604.
258. Mangale, V.S., et al., *Lhx2 selector activity specifies cortical identity and suppresses hippocampal organizer fate*. Science, 2008. **319**(5861): p. 304-9.
259. Chou, S.J., et al., *Lhx2 specifies regional fate in Emx1 lineage of telencephalic progenitors generating cerebral cortex*. Nat Neurosci, 2009. **12**(11): p. 1381-9.

260. 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.
261. Kolterud, A., et al., *The Lim homeobox gene Lhx2 is required for olfactory sensory neuron identity*. Development, 2004. **131**(21): p. 5319-26.
262. Saha, B., et al., *Dual role for LIM-homeodomain gene Lhx2 in the formation of the lateral olfactory tract*. J Neurosci, 2007. **27**(9): p. 2290-7.
263. Zhao, Y., et al., *A role of the LIM-homeobox gene Lhx2 in the regulation of pituitary development*. Dev Biol. **337**(2): p. 313-23.
264. Doetsch, F., *The glial identity of neural stem cells*. Nat Neurosci, 2003. **6**(11): p. 1127-34.
265. Carl, M., F. Loosli, and J. Wittbrodt, *Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye*. Development, 2002. **129**(17): p. 4057-63.
266. Ando, H., et al., *Lhx2 mediates the activity of Six3 in zebrafish forebrain growth*. Dev Biol, 2005. **287**(2): p. 456-68.
267. Andreazzoli, M., et al., *Role of Xrx1 in Xenopus eye and anterior brain development*. Development, 1999. **126**(11): p. 2451-60.
268. Zuber, M.E., et al., *Giant eyes in Xenopus laevis by overexpression of XOptx2*. Cell, 1999. **98**(3): p. 341-52.
269. Chow, R.L., et al., *Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate*. Development, 1999. **126**(19): p. 4213-22.

270. Jimenez, G., et al., *Activation of the beta-globin locus control region precedes commitment to the erythroid lineage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10618-22.
271. Bonifer, C., *Long-distance chromatin mechanisms controlling tissue-specific gene locus activation*. Gene, 1999. **238**(2): p. 277-89.
272. Bottardi, S., et al., *Lineage-specific transcription factors in multipotent hematopoietic progenitors: a little bit goes a long way*. Cell Cycle, 2007. **6**(9): p. 1035-9.
273. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9821-6.
274. Gestri, G., et al., *Six3 functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting Bmp4 expression*. Development, 2005. **132**(10): p. 2401-13.
275. Kim, S.U. and J. de Vellis, *Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review*. J Neurosci Res, 2009. **87**(10): p. 2183-200.
276. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
277. Meissner, A., M. Wernig, and R. Jaenisch, *Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(10): p. 1177-81.
278. MacLaren, R.E., et al., *Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors*. Nature, 2006. **444**(7116): p. 203-7.

279. Marchetti, V., et al., *Stemming vision loss with stem cells*. J Clin Invest. **120**(9): p. 3012-21.
280. Nakamura, T., et al., *The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens-Johnson syndrome*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(3): p. 909-16.
281. Liton, P.B., et al., *Genome-wide expression profile of human trabecular meshwork cultured cells, nonglaucomatous and primary open angle glaucoma tissue*. Mol Vis, 2006. **12**: p. 774-90.
282. Congdon, N., et al., *Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States*. Arch Ophthalmol, 2004. **122**(4): p. 477-85.
283. Resnikoff, S., et al., *Global data on visual impairment in the year 2002*. Bull World Health Organ, 2004. **82**(11): p. 844-51.
284. Tetreault, N., M.P. Champagne, and G. Bernier, *The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation*. Dev Biol, 2009. **327**(2): p. 541-50.
285. 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.
286. Ross, S.E., M.E. Greenberg, and C.D. Stiles, *Basic helix-loop-helix factors in cortical development*. Neuron, 2003. **39**(1): p. 13-25.
287. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 2009. **137**(2): p. 216-33.

288. Marin-Padilla, M., *Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex*. Trends Neurosci, 1998. **21**(2): p. 64-71.
289. Guillemot, F., *Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 639-47.
290. Miyata, T., et al., *Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells*. Development, 2004. **131**(13): p. 3133-45.
291. Miyata, T., et al., *Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons*. Neuron, 2001. **31**(5): p. 727-41.
292. Merkle, F.T. and A. Alvarez-Buylla, *Neural stem cells in mammalian development*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(6): p. 704-9.
293. 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.
294. Gao, F., et al., *Transcription factor RBP-J-mediated signaling represses the differentiation of neural stem cells into intermediate neural progenitors*. Mol Cell Neurosci, 2009. **40**(4): p. 442-50.
295. Fishell, G. and A.R. Kriegstein, *Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance*. Curr Opin Neurobiol, 2003. **13**(1): p. 34-41.
296. Yoon, K.J., et al., *Mind bomb 1-expressing intermediate progenitors generate notch signaling to maintain radial glial cells*. Neuron, 2008. **58**(4): p. 519-31.
297. Genoud, S., et al., *Notch1 control of oligodendrocyte differentiation in the spinal cord*. J Cell Biol, 2002. **158**(4): p. 709-18.
298. Taylor, M.D., et al., *Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma*. Cancer Cell, 2005. **8**(4): p. 323-35.

299. Chen, W., et al., *[siRNA knocks down the expression of AR gene in PC3 cell lines]*. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2007. **13**(9): p. 780-3.
300. Yu, L., et al., *A clinically relevant orthotopic xenograft model of ependymoma that maintains the genomic signature of the primary tumor and preserves cancer stem cells in vivo*. *Neuro Oncol.* **12**(6): p. 580-94.

Annexe 1

L'annexe 1 regroupe 2 articles cités dans cette thèse et 1 article non cité auxquels j'ai collaboré.

Article #1

Pax6 controls the proliferation rate of neuroepithelial progenitors from the mouse optic vesicle

Robert-Hugues Duparc, Mohamed Abdouh, Jocelyn David, Mireille Lépine, **Nicolas Tétreault**, Gilbert Bernier

Cet article, cité dans cette thèse, rapporte l'isolation d'une nouvelle population de progéniteurs neuroépithéliaux dans la vésicule optique. Ces cellules expriment des marqueurs de cellules progénitrices et des marqueurs de cellules rétiniennes. Ce travail révèle également le rôle de Pax6 dans le contrôle de la prolifération de cette population cellulaire.

Robert-Hugues Duparc, ancien étudiant à la maîtrise a participé à toutes les étapes expérimentales de cet article. Dr Mohamed Abdouh a participé aux études de cycles cellulaire et aux analyses par PCR. Dr Jocelyn David a réalisé les essais d'immunoprécipitation de chromatine. Mireille Lépine a participé à la conception des lentivirus. J'ai contribué aux marquages par immunofluorescence sur les neurosphères et les progéniteurs placés en différenciation.

Article #2

Pax6 is required for delta-catenin/neurojugin expression during retinal, cerebellar and cortical development in mice

Robert-Hugues Duparc, Djamila Boutemmine, Marie-Pier Champagne, **Nicolas Tétreault**, Gilbert Bernier

Cet article, cité dans cette thèse, démontre que Pax6 régule l'expression de δ -catenin en se liant à son promoteur. Pax6 jouerait donc un rôle dans le développement des neurites et de l'établissement des connexions synaptiques dans le système nerveux central en développement via la régulation de cette protéine du cytosquelette.

Robert-Hugues Duparc, ancien étudiant à la maîtrise a participé à toutes les étapes expérimentales de cet article. Djamila Boutemmine, ancienne étudiante au doctorat a réalisé les expériences de retard sur gel (EMSA). Marie-Pier Champagne a participé aux essais d'immunofluorescence. J'ai également participé aux marquages par immunofluorescence.

Article #3

Characterization of New Transcripts Enriched in the Mouse Retina and Identification of Candidate Retinal Disease Genes

Julie Lord-Grignon, **Nicolas Tetreault**, Alan J. Mears, Anand Swaroop and Gilbert Bernier

Cet article, non cité dans cette thèse, identifie un nouveau transcrit enrichi dans les photorécepteurs qui est impliqué dans les défauts développementaux de la rétine.

Julie Lord-Grignon a effectué les expériences d'hybridations *in situ* sur les yeux de souris adultes. Alan J. Mears et Anand Swaroop ont fourni les échantillon provenant des souris *Nrl^{-/-}*. J'ai pour ma part réalisé les expériences d'hybridation *in situ* sur les yeux adultes humains.

