

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**Les cibles transcriptionnelles du polycomb
Rae28 lors du développement de l'œil :
l'hypothèse du locus Ink4a/Arf**

par

Pierre-Olivier Émond

Département de biologie moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en biologie moléculaire

Mai, 2008

© Pierre-Olivier Émond, 2008



Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

**Les cibles transcriptionnelles du polycomb
Rae28 lors du développement de l'œil :
l'hypothèse du locus Ink4a/Arf**

présenté par
Pierre-Olivier Émond

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. El Bachir Affar
président-rapporteur

Dr. Gilbert Bernier
directeur de recherche

Dr. Michel Cayouette
membre du jury

Résumé

Le gène *Rae28* code pour une protéine de la famille des polycombs qui forment des hétérocomplexes de répression transcriptionnelle avec des protéines de la même famille telles que *Bmi1*. Les gènes de cette famille sont connus comme influençant le développement embryonnaire par la répression transcriptionnelle de certains gènes. Les embryons de souris *Rae28*^{-/-} présentent des phénotypes d'anophtalmie et de microphtalmie. L'objectif principal de ce projet est de déterminer si ces phénotypes sont dus à un défaut de prolifération et d'auto-renouvellement des progéniteurs neuroépithéliaux de la vésicule optique. L'étude du développement des embryons *Rae28*^{-/-} démontre que ce polycomb permet la répression transcriptionnelle du gène homéobox *Vax2* au tout début du développement de la vésicule optique. Ce défaut d'expression chez le mutant serait à la base d'une mauvaise segmentation de l'œil en développement et donc d'un phénotype d'anophtalmie. De plus, les résultats démontrent que *Rae28* réprime l'expression des gènes du locus *Ink4a/Arf*, *p16*^{Ink4a} et *p19*^{Arf}, impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Cet effet est observé non seulement chez les progéniteurs neuroépithéliaux mais aussi chez les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) en culture. Les MEFs *Rae28*^{-/-} ont un défaut de prolifération et rentrent en sénescence plus rapidement que ceux de type sauvage. Finalement, les défauts transcriptionnels observés chez les progéniteurs neuroépithéliaux *Rae28*^{-/-} pourraient expliquer les défauts de formation de l'œil de l'embryon mutant.

Mots-Clés : Apoptose, fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs), *p16*^{Ink4a}, *p19*^{Arf}, *Pax6*, progéniteur rétinien, sénescence, *Vax2*.

Abstract

The Rae28 gene code for a protein of the polycomb family who form multimerics complex that can repress other locus directly on the chromatin. The genes of this family are considered as influencing embryonic development by repression of other genes. The Rae28^{-/-} knockout mice present many phenotypes including anophthalmia and microphthalmia. The main goal of this study is to find if these phenotypes are associated to self-renewal and proliferation defects of the neural stem cells from the optic cup. To analyze the effects of the mutation on eye's development, Rae28^{-/-} mice embryos were used. The first results showed that this polycomb repress homeobox gene Vax2 at the early beginning of the optic cup formation. Other results also showed that Rae28 polycomb repress p16^{Ink4a} and p19^{Arf} genes. These genes of the Ink4a/Arf locus are known to regulate cell cycle. Also, studies using Rae28^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) demonstrated a proliferation defect and a higher rate of senescent cells comparatively to the wild type. Finally, we propose that these transcriptionnals defects of the neural stem cells could explain the phenotypes observed on Rae28^{-/-} eyes.

Keywords: Apoptosis, mouse embryonic fibroblasts (MEFs), p16^{Ink4a}, p19^{Arf}, Pax6, retinoic progenitor, senescence, Vax2.

Table des matières

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. LE DÉVELOPPEMENT DE L'ŒIL	1
1.1.1. Le développement de l'œil chez la drosophile.....	3
1.1.2. Le développement de l'œil chez les vertébrés	4
1.1.3. Les gènes associés au développement de l'œil	6
1.1.4. Le développement de la rétine chez les vertébrés	8
1.2. LES PROTÉINES DU GROUPE POLYCOMB	10
1.2.1. Historique de la découverte des polycombs.....	11
1.2.2. Les interactions entre les polycombs.....	12
1.2.3. L'association des polycombs à leurs cibles	17
1.2.4. Les mécanismes d'action des polycombs	19
1.2.5. Les cibles fonctionnelles des polycombs.....	20
1.3. LE LOCUS INK4A/ARF COMME CIBLE DES POLYCOMBS	21
1.4. LA PROTÉINE RAE28/MPH1/PHC1	23
1.5. PROBLÉMATIQUE.....	28
1.5.1. Les gènes homéobox comme cibles de Rae28.....	28
1.5.2. Le locus Ink4a/Arf comme cible de Rae28.....	29
2. MÉTHODOLOGIE	30
2.1. LES SOURIS	30
2.2. GÉNOTYPAGE.....	30
2.3. CULTURES CELLULAIRES DE PROGÉNITEURS NEUROÉPITHÉLIAUX : ESSAIS NEUROSPHÈRES	31
2.4. RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL	32
2.5. HYBRIDATION IN SITU WHOLE MOUNT	33
2.6. IMMUNOFLUORESCENCE (IF)	34
2.7. IMMUNOHISTOCHEMIE (IHC).....	35
2.8. CULTURES DE FIBROBLASTES EMBRYONNAIRES MURINS (MEFs).....	35
2.8.1. Calcul de prolifération des MEFs.....	36
2.8.2. Essais β -GAL	37
2.8.3. Analyses statistiques	37
3. RÉSULTATS.....	38
3.1. SPÉCIFICITÉ DE L'ANTICORPS RAE28.....	38
3.2. EFFET DE LA MUTATION RAE28 ^{-/-} SUR L'AUTO-RENOUVELLEMENT ET LA PROLIFÉRATION DES PROGÉNITEURS NEUROÉPITHÉLIAUX	39
3.3. EFFET DU GÈNE RAE28 SUR L'EXPRESSION DES GÈNES HOMEBOX	42
3.3.1. Effet de la mutation Rae28 ^{-/-} sur l'expression de Vax2 et de Pax6 chez les progéniteurs neuroépithéliaux.....	42
3.3.2. Effet de la mutation Rae28 ^{-/-} sur l'expression de Vax2 et de Pax6 dans le procéscéphale des embryons	44
3.3.3. Effet de la mutation Rae28 ^{-/-} sur la localisation de l'ARNm Vax2 dans la vésicule optique des embryons	47

3.4.	EFFET DU GÈNE RAE28 SUR L'EXPRESSION DES GÈNES DU LOCUS INK4A/ARF....	49
3.4.1.	Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur les cultures de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs).....	49
3.4.2.	Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur l'expression des gènes du locus chez les progéniteurs neuroépithéliaux.....	54
3.4.3.	Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur l'expression des gènes du locus <i>Ink4a/Arf</i> dans le prosencéphale des embryons.....	55
3.4.4.	Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur la prolifération des cellules dans l'œil en développement.....	56
3.4.5.	Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur l'apoptose des cellules dans l'œil en développement.....	58
4.	DISCUSSION	61
4.1.	LES GÈNES HOMÉOBOX COMME CIBLES TRANSCRIPTIONNELLES DE RAE28	61
4.2.	LE LOCUS INK4A/ARF, UNE CIBLE TRANSCRIPTIONNELLE DE RAE28 ?.....	63
4.3.	LOCUS INK4A/ARF ET VAX2 : DES MODÈLES COMPLÉMENTAIRES.....	66
4.4.	CONCLUSION.....	68
5.	RÉFÉRENCES	69

Liste des tableaux

Tableau I : Liste des principaux gènes polycombs et trithorax chez la drosophile.....	13
Tableau II : Séquences des oligos utilisés pour les RT-PCR	33

Liste des figures

Figure 1 : L'œil composé de la drosophile et structure de l'ommatidie	3
Figure 2 : Développement de l'œil chez les vertébrés.....	4
Figure 3 : Les lignées cellulaires contribuant au développement de l'œil.....	5
Figure 4 : Composition de la rétine chez les vertébrés.....	9
Figure 5 : Modèle décrivant le mécanisme d'action des complexes polycombs	20
Figure 6 : Mécanismes d'induction du locus Ink4a/Arf	22
Figure 7 : Hybridation <i>In situ</i> sur coupes d'embryons avec une sonde Rae28	24
Figure 8 : Création du mutant Rae28 ^{-/-} par insertion d'une cassette NEO ^r	25
Figure 9 : Hybridation <i>In situ</i> sur coupes d'embryons Rae28 ^{-/-} avec une sonde Hoxa3	26
Figure 10 : Coupes histologiques du cœur de nouveaux-nés WT et Rae28 ^{-/-}	26
Figure 11 : Hypoplasie de la rate de souris Rae28 ^{-/-} par rapport au WT	26
Figure 12 : B) Images d'embryons de souris Rae28 ^{-/-} au stade E15,5	27
Figure 13 : Principe de génotypage des souris Rae28	31
Figure 14 : Immunohistochimie sur des yeux d'embryons Rae28 ^{-/-} au stade E9,5 avec l'anticorps α-Rae28.....	38
Figure 15 : Culture de neurosphères Rae28 ^{-/-} et WT au passage 3.....	39
Figure 16 : Nombre de neurosphères répertoriées pour 1000 progéniteurs mis en culture .	40
Figure 17 : Grosseur des neurosphères répertoriées en fonction des génotypes	41
Figure 18 : Taux d'ARNm des gènes Vax2 et Pax6 retrouvés dans les neurosphères	43
Figure 19 : Taux d'ARNm de certains gènes retrouvés dans le prosencéphale	44
Figure 20 : Taux d'ARNm du gène Vax2 retrouvés dans les prosencéphales.....	46
Figure 21 : Localisation de l'ARNm du gène Vax2 dans les embryons Rae28 ^{-/-} et WT par Hybridation <i>In Situ</i> Whole Mount.	47
Figure 22 : Agrandissement des images d'hybridation <i>In Situ</i> Whole Mount.....	48
Figure 29 : Présence de l'ARNm Rae28 dans les cultures de MEFs.....	49
Figure 30 : Taux d'ARNm des gènes p16 ^{Ink4a} , p19 ^{Arf} et p21 ^{Cip1} retrouvés dans les MEFs.	50
Figure 31 : Niveaux de doublement de population des MEFs en fonction des passages et des génotypes.....	51
Figure 32 : Essais β-Gal sur des cultures de MEFs Rae28 ^{-/-} et WT au passage 3.....	52
Figure 33 : Pourcentage des fibroblastes en sénescence.....	53
Figure 23 : Taux d'ARNm des gènes p16 ^{Ink4a} , p19 ^{Arf} et p21 ^{Cip1} retrouvés dans les neurosphères.	54
Figure 24 : Taux d'ARNm des gènes p16 ^{Ink4a} , p19 ^{Arf} et p21 ^{Cip1} retrouvés dans le prosenéphale d'embryons au stade E13,5.....	55
Figure 25 : IHC sur des yeux au stade embryonnaire E13,5 avec un anticorps α-PH3	56
Figure 26 : Pourcentage de cellules marquées par l'anticorps α-PH3.....	57
Figure 27 : IF sur des yeux d'embryons au stade embryonnaire E13,5 avec un anticorps α- Caspases-3-activé.....	59
Figure 28 : Pourcentage de cellules marquées par l'anticorps α-caspases-3-activé.....	60

Liste des abréviations

ADN	Acides DésoxyriboNucléiques
ARN/ARNm	Acides RiboNucléiques/ ARN messagers
Cellules ES	Cellules Souches Embryonnaires
Cellules HSC	Cellules Souches Hématopoïétiques
Cellules NSC	Cellules Souches Neurales
Chip	CHromatinImmunoPrécipitation
Gène E(Z)	Enhancer of Zeste
Gène Esc/Esc-L	Extra sex comb/Extra sex comb-Like
Gène Hox	Homéotique
Gène Pc/Pc-L	Polycomb/Polycomb-Like
Gène Ph	Polyhoméotique
Gène Psc	Posterior sex comb
Gène Scm	Sex comb in midleg
Gène Su(Z)12	Suppresseur of Zeste 12
HDAC	HistoneDéACéthylase
HMTase	HistoneMéthylTransférase
IF	ImmunoFluorescence
IHC	ImmunoHistoChimie
MEFs	Fibroblates Embryonnaires Murins
PcG	Groupe Polycomb
PCR	Réaction Polymérase en Chaîne
PDL	Population Doubling Level
Polarité T-N	Polarité Temporale-Nasale
Polarité V-D	Polarité Ventrale-Dorsale
PRC	Complexe Polycomb de Répression
PRE	Polycomb Response Element
RT-PCR	PCR de Transcritase Inverse (Reverse)
TBP	Tata-box Binding Proteine
Trx/TrG	Trythorax/Groupe Trythorax
WT	Type sauvage

Remerciements

Je tiens à remercier Gilbert Bernier, mon directeur, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et surtout, de m'avoir permis de travailler de manière autonome sur le projet tout en me donnant un support adéquat pour l'avancement des recherches vers un objectif concret. Il a su démontrer beaucoup de patience face à l'avancement de mon projet et a toujours su répondre à mes interrogations. Cela m'a permis de satisfaire ma curiosité scientifique tout en développant mes compétences en laboratoire ainsi que mon esprit critique face aux multiples sources d'information scientifique.

Je tiens à remercier les membres de mon jury, Dr. El Bachir Affar et Dr. Michel Cayouette, pour le temps passé à lire et à corriger mon travail mais surtout pour les nombreuses améliorations apportées à ce mémoire.

Je veux remercier les membres du laboratoire, tout particulièrement Dr. Mohamed Abdouh, pour l'aide qu'il m'a apporté et les réponses inestimables qu'il a données à mes nombreuses questions. Je tiens aussi à remercier les membres du centre de recherche HMR, en particulier Dr. Éliot Drobetsky, pour les discussions que nous avons eues ensemble, ainsi que toute l'aide qu'il m'a fourni pour certains travaux et problèmes auxquels j'ai eût à faire face.

Je souhaite finalement remercier tous les gens qui furent près de moi pendant ces deux années, qui ont démontré de la curiosité face à mon travail, souvent sans trop comprendre en quoi il consistait, et qui m'ont donné la motivation, l'énergie et l'espoir de continuer et de me rendre où j'en suis aujourd'hui.

Merci à vous.

À notre petit bébé, qui sera sans aucun doute aussi curieux que ses parents.

1. Introduction

Le but de ce mémoire est d'étudier les cibles transcriptionnelles de la protéine Rae28/Mph1, du groupe polycomb, dans le contexte du développement de l'œil chez la souris. Cette étude a été effectuée à l'aide d'un mutant $Rae28^{-/-}$ en comparaison avec des souris de type sauvage (WT). L'objectif primaire de cette recherche était de déterminer les causes du phénotype de microphthalmie et d'anophtalmie observé chez ce mutant.

Dans cette introduction, il sera d'abord question de discuter des étapes et des facteurs nécessaires au développement de l'œil chez la drosophile et la souris. Ensuite, il s'agira d'aborder en détail tout ce qui attrait à la grande famille des polycombs : leurs classes, leurs mécanismes d'action, leurs antagonistes ainsi que leurs cibles transcriptionnelles. Finalement, la dernière partie fera une revue de la littérature concernant le gène Rae28 ainsi que sur le modèle murin utilisé et de ses phénotypes.

1.1. Le développement de l'œil

En science tout comme dans la mythologie, de par sa capacité de détection et de formation de l'image, l'oeil a toujours fait parti d'un domaine très excitant. Plusieurs questions restent encore aujourd'hui ouvertes et sans réponse, et ce plus particulièrement sur l'aspect évolutif de ce miraculeux organe sensoriel. Charles Darwin, dans sa théorie de l'origine des espèces en avait d'ailleurs consacré tout un chapitre. Il était sans aucun doute difficile de croire en ces temps que la sélection naturelle était à l'origine d'un organe si parfait. La création de l'œil, un organe capable de faire une mise au point selon les distances, de se fermer et de s'ouvrir afin de laisser passer une quantité plus ou moins importante de lumière et ayant la capacité de corriger des aberrations sphériques, et ce seulement par sélection naturelle, bien sûr cela pouvait paraître bien absurde !

Darwin proposa donc un prototype d'œil à son plus simple aspect : deux cellules seulement, une cellule pigmentée servant de protection, tout en laissant passer la lumière, associée à une cellule réceptrice, le photorécepteur. Ainsi, à partir de cet œil primitif retrouvé chez certains métazoaires, l'évolution convergente aurait permis, par mutations et sélections successives, l'élaboration d'un organe complet avec lentille et outils de réfraction. Le dilemme de Darwin demeurait dans l'apparition de ce premier prototype d'œil détectant la lumière, de la même manière que le principe de la création de la vie sur terre.

Il a été proposé que l'évolution de l'œil soit d'origine monophylétique, découlant donc d'un commun organisme ancestral [1]. Cela supporterait une fois de plus la théorie de Darwin, où la création hasardeuse de la première cellule détectrice de lumière doit être un événement infiniment rare, tellement qu'elle ne pourrait arriver qu'une seule fois dans toute l'histoire de la vie. Ainsi, on observe chez la plupart des animaux vivants ou fossilisés un organe sensible à la lumière, du très petit ne contenant que quelques photorécepteurs jusqu'aux yeux totalement développés comme celui de l'Homme. Finalement, tous les systèmes visuels d'une multitude d'organismes, aussi divers que les insectes, les céphalopodes et les vertébrés, contiennent des molécules similaires de détection de la lumière appelées opsines [1, 2]. Ces récepteurs à sept domaines transmembranaires sont responsables de l'absorption des photons. Ce processus est donc relié à une cascade signalitique associée aux protéines G, un mécanisme très répandu et retrouvé dans de nombreuses voies physiologiques [3].

Les structures de l'œil de la souris et de la drosophile sont de très bons exemples illustrant les différentes solutions obtenues au fil du temps afin de recevoir et d'interpréter un signal lumineux.

1.1.1. Le développement de l'œil chez la drosophile

La détection de la lumière chez la drosophile repose sur deux yeux composés ainsi que de trois ocellis dorsaux. Chacun des yeux est formé de près de 800 unités individuelles, nommées ommatidies, elles-mêmes contenant chacune 8 photorécepteurs, 12 cellules adaptatrices, des cellules sécrétrices et un brin mécanique [2].

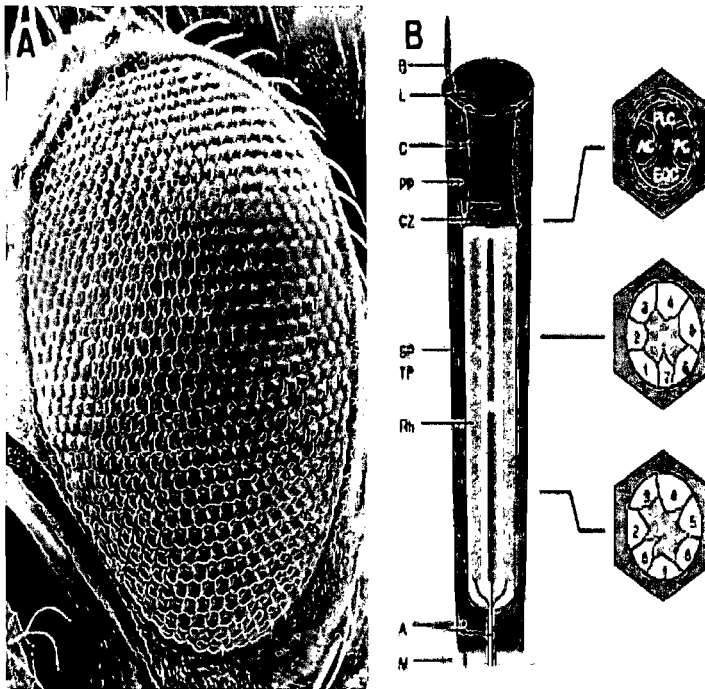


Figure 1 : A) L'œil composé de la drosophile. B) Structure de l'ommatidie : partant du brin mécanosensoriel (B), la lentille (L) suivie des pseudocônes (C), entourés de cellules pigmentaires primaires (PP), et des cônes (CZ). Ensuite, les photorécepteurs (R1-R8) et les rhabdomères (Rh) et finalement la membrane basale (M) d'où sortent les axones des photorécepteurs (A). Le tout est entouré d'une deuxième et troisième couche de cellules pigmentaires (SP et TP). (Hafen, E. et Basler, K. [4])

Le développement de l'œil débute au stade de larve à partir de la monocouche épithéliale appelée disque imaginal de l'œil. Les premiers photorécepteurs se différencient à partir de la marge postérieure du disque imaginal. Cette étape de différenciation se fera en vague sur une période de 2 jours. Le mouvement antérieur à celle-ci, nommée le sillon morphogénétique, initiera le processus de différenciation qui progressera de la partie postérieure vers la partie antérieure du disque imaginal. Ainsi, la couche antérieure au sillon sera formée de progéniteurs en division cellulaire, la couche derrière le sillon sera composée de cellules en différenciation, et finalement, les cellules ayant déjà acquis leur état de différenciation final combleront la partie postérieure du disque [4].

1.1.2. Le développement de l'œil chez les vertébrés

Chez les vertébrés, la formation de l'œil est un processus très complexe qui implique plusieurs étapes distinctes. D'abord, il y a la spécification et la compartimentation des cellules composant le futur environnement de l'œil, leur induction, leur arrangement autour des axes de polarité selon des mouvements morphologiques très distincts, suivi d'étapes de prolifération et de différenciation cellulaires qui mèneront finalement à l'étape de connexion neuronale [5].

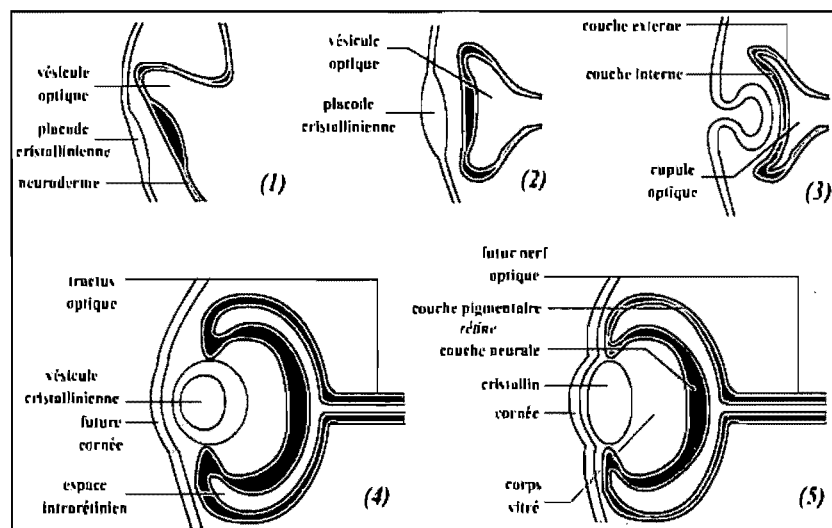


Figure 2 : Développement de l'œil chez les vertébrés. (Gilles Furelaud, Gabrielle Bonnet, Académie de Toulouse)

La morphogénèse de l'œil a lieu de façon similaire chez la plupart des vertébrés. Le développement de l'œil (Figure 2, ci-dessus) s'initie à la fin de l'étape de la neurula par l'évagination de la vésicule optique à partir de la partie ventro-latérale du diencephale (1). La vésicule se colle ensuite sur l'ectoderme de surface pour induire la formation de la placode cristalliniennne (2). La vésicule optique s'enfonce alors pour former les deux couches de la cupule optique (3). La placode cristalliniennne s'invagine à son tour pour former la vésicule cristalliniennne qui elle-même se détache pour se loger dans la cavité de la cupule optique, représentant le futur cristallin, tandis que l'ectoderme de surface formera la cornée (4).

Pendant ce temps, la couche externe de la cupule optique se différenciera en épithélium pigmentée, tandis que la surface interne, plus proche de la lentille, donnera la rétine (4-5). D'autre part, la partie proximale de la cupule optique continuera de s'allonger pour former le pédoncule ou le tractus optique. La fissure optique, située sur la surface interne de la cupule et du pédoncule optiques, fournira aux vaisseaux sanguins un accès direct vers l'intérieur de l'œil. Cette structure se refermera un peu plus tard au cours du développement, c'est alors que le pédoncule, maintenant tubulaire, permettra le passage des axones des cellules ganglionnaires de la rétine. Les vaisseaux sanguins se placeront au centre, tandis que de nombreuses cellules se différencieront en astrocytes autour des axones, afin de former le futur nerf optique. Les différents tissus oculaires se formeront à partir de cellules mésenchymateuses dérivées du mésoderme. De plus, le système d'irrigation sanguin complet mis en place pendant le développement embryonnaire des yeux sera presque totalement dégénéré avant la naissance [5, 6].

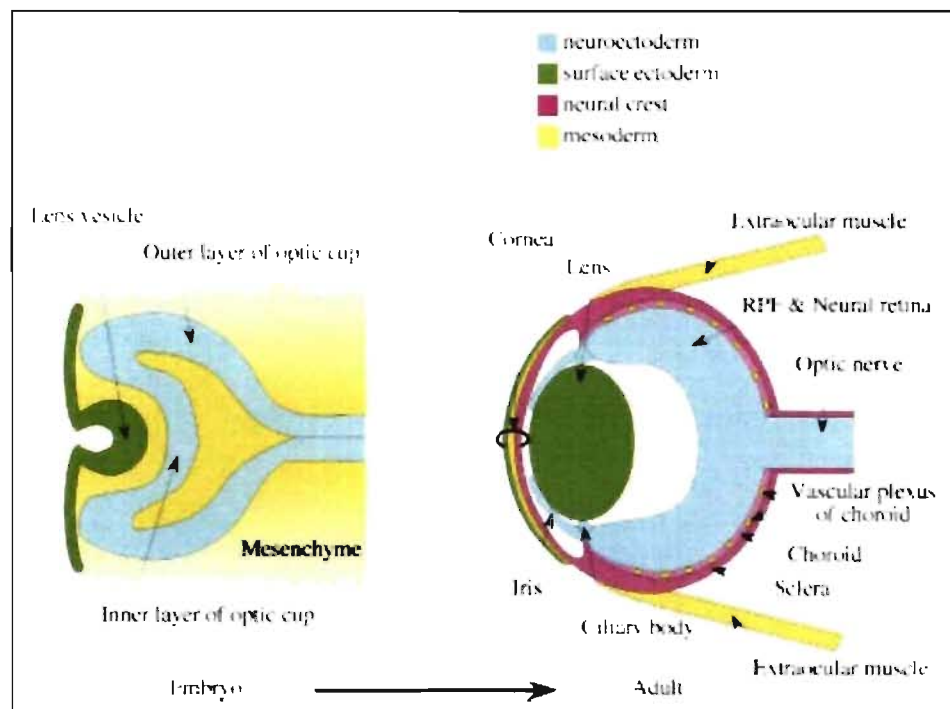


Figure 3 : Les lignées cellulaires contribuant au développement de l'œil : neuroectoderme en bleu; ectoderme de surface en vert; mésoderme en jaune; crête neurale en rose. (Harada T., Genes & Dev. 2007 [6])

Ainsi, les composantes du système oculaire dérivent de quatre sources embryonnaires : la rétine, l'iris et les nerfs optiques se forment à partir du neuroectoderme; la lentille et l'épithélium cornéen à partir de l'ectoderme de surface; les muscles extra-oculaires et les couches fibreuses et vasculaires de l'œil proviennent du mésoderme; et finalement, la sclère et l'endothélium cornéen à partir de la crête neurale [6].

1.1.3. Les gènes associés au développement de l'œil

La coordination de cette séquence d'événements morphologiques nécessite l'activation précoce de processus moléculaires. Ainsi, déjà à la fin de l'étape de la gastrulation (passage de la blastula (2^{ième}) vers la gastrula (3^{ième}) chez l'embryon), des signaux sont envoyés afin d'activer la morphogénèse, qui débutera à la fin de l'étape de neurulation. Cette signalisation implique deux étapes distinctes : premièrement, l'établissement dans la partie antérieure de la plaque neurale d'une région nécessaire à la formation de l'œil; et deuxièmement, sa subdivision en deux parties bilatérales [7]. Des gènes essentiels au développement de l'œil se trouvent alors exprimés dans cette région dès le tout début de sa définition, c'est le cas entre autres de *Pax6* [8]. Ce gène de la famille des Paired Class Homeobox est exprimé au tout début de l'étape de la neurulation. Des homologues de ce gène furent isolés chez plusieurs espèces dont la drosophile, la souris, l'homme, le poisson zèbre, le poulet, la caille, l'oursin de mer, le xénopus, etc. Il a même été proposé que ce gène hautement conservé soit à la tête de la cascade moléculaire régulant le développement de l'œil [9-11]. Le gène *Pax6* est responsable du phénotype *Small eye* chez les mammifères. Des études morphologiques ont permis de mettre en évidence qu'une vésicule optique était formée chez les embryons mutants *Pax6*^{-/-} mais que celle-ci se dégénérait par la suite. En co-culture avec une vésicule optique mutante, l'ectoderme de type sauvage se différencie normalement, par contre, à l'inverse, la co-culture avec une vésicule de type sauvage ne permet pas le développement normal de l'ectoderme mutant.

Ainsi, on émet l'hypothèse que certains signaux sont essentiels à l'induction de la différenciation, par exemple le signal de Pax6 provenant de l'ectoderme permettrait la différenciation de la vésicule. Ces résultats proposent aussi que des signaux permettent aux tissus d'acquérir la capacité de répondre à un ordre d'induction, par exemple le signal de Pax6 permettrait à l'ectoderme de répondre aux signaux d'induction provenant de la vésicule optique.

Finalement, plusieurs autres gènes conservés sont nécessaires au développement de l'œil (chez la drosophile : *sine oculis (SO)*, *dachshund (DAC)*, *eye absent (EYA)*), et même plusieurs autres peuvent induire la formation de yeux ectopiques lorsque surexprimés (EY, TOY, EYA et DAC) [12]. Aussi Pax2, un autre gène de la famille des Paired Class Homeobox, interviendrait dans le développement de l'œil, plus particulièrement dans la fermeture de la fissure optique [13]. À partir d'études plus approfondies sur ces deux gènes, on découvrit aussi l'action du gène *Sonic hedgehog (Shh)*, qui permettrait de façon directe ou indirecte, l'activation de Pax2 et la répression de Pax6 dans les régions de l'œil où il est exprimé [14, 15].

D'autres mutations de gènes *homeobox*, comme *Otx1* et *Otx2* [16] ou *Chx10* et *Six3* chez la souris ont permis d'en apprendre davantage sur le fonctionnement de la cascade moléculaire régulant le développement de l'œil. Ainsi, les knockout de certains gènes peuvent causer des phénotypes divers : du retard oculaire lorsque ces gènes sont impliqués dans la prolifération des progéniteurs rétiniens (ex: *Chx10* [17, 18]) à la microphthalmie lorsqu'il y a défaut d'induction (ex: *Otx2* [16]).

Un nombre significatif de gènes sont connus comme régulant autant le développement du cerveau que celui de l'œil, des gènes qui sont pour la plupart très conservés à travers les espèces [19, 20]. Les plus importants font soit partie de la classe des homéobox : *Lhx2*, *Otx2*, *Pax6*, *Rx*, *Six3*; soit de la classe avec motifs basic hélice-tour-hélice (bHLH) : *Math5*, *NeuroD1*, *NeuroG2*.

Certains sont impliqués spécifiquement dans le développement de la lentille (Foxe3, Mab21Like1, C-Maf, Pitx3, Sox1 et Hsf4) ou de la rétine (Chx10, Mab21Like2, Six6, Vax1 et Vax2) [21, 22]. Tandis qu'il a été démontré que certains gènes AP-2 α , Rb et E2F régulent autant la différenciation de la lentille que celle de la rétine [23-25]. Finalement, d'autres gènes sont d'abord essentiels à plusieurs étapes du développement embryonnaire tout en étant requis ensuite pour le développement de l'œil (Brg1, Snf2H, Sox2, Geminin) [26-32].

1.1.4. Le développement de la rétine chez les vertébrés

La rétine des vertébrés est quant à elle composée de six types de neurones et un type de glie (glie de Müller) divisée en trois couches : les cellules ganglionnaires de la rétine sont dans la première couche, ensuite viennent les cellules horizontales, les amacrines, les bipolaires et les cellules gliales de Müller dans la couche nucléaire interne et finalement les deux types de photorécepteurs (cônes et bâtonnets) dans la couche nucléaire externe (Figure 4, page 9).

La différenciation des progéniteurs rétiniens en ces sept types cellulaires se fait normalement de façon conservée chez les vertébrés [33-35]. Ces progéniteurs se trouvant dans la couche nucléaire interne de la cupule optique doivent passer par quatre étapes importantes : (1) proliférer par divisions cellulaires, (2) sortir du cycle cellulaire, (3) se faire assigner un destin cellulaire et (4) exécuter le processus de différenciation vers ce type cellulaire. Ces progéniteurs sont donc multipotents et peuvent générer différents types cellulaires jusqu'à leur dernière étape de différenciation.

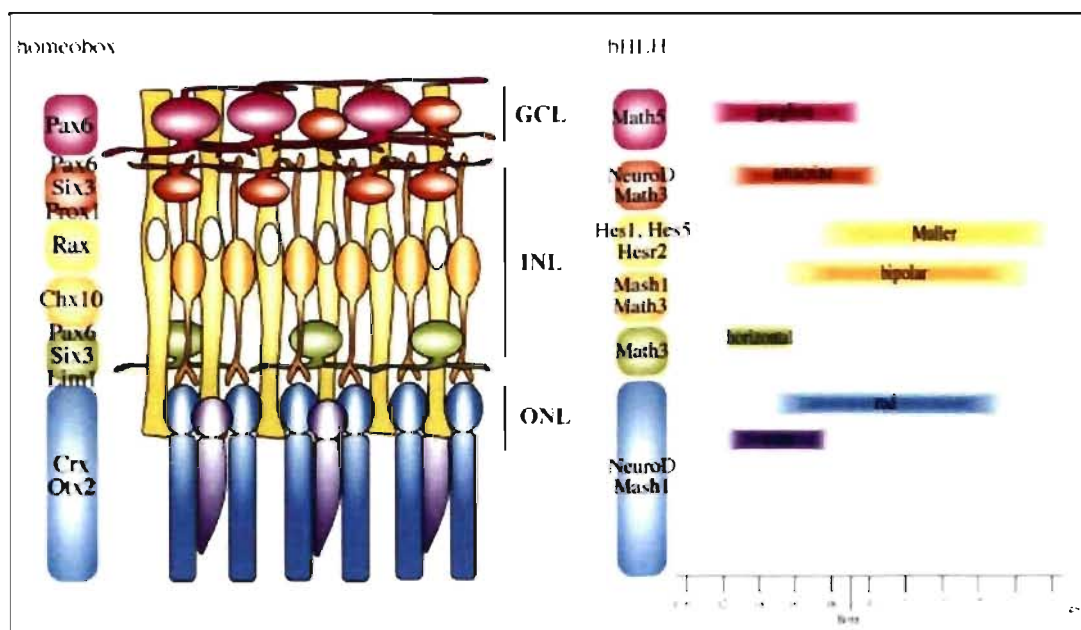


Figure 4 : Composition de la rétine chez les vertébrés. Trois couches majeures : cellules ganglionnaires (GCL); nucléaire interne (INL); nucléaire externe (ONL). Les facteurs de transcription homéodomaine et bHLH agissent en régulateurs intrinsèques afin de définir le destin des cellules rétinienne. Droite : étapes approximatives de l'apparition des cellules rétinienne chez la souris. (Harada T., Genes. Dev. [6]).

Plusieurs knockout ont permis de mettre à jour une liste d'effecteurs nécessaires à la bonne différenciation de ces progéniteurs. La plupart de ces facteurs de transcription font aussi partie de la famille des *homéobox* et de la classe de protéines avec motif *basic Hélice-Tour-Hélice (bHLH)*. L'activation de différents groupes de ces facteurs vont donc diriger la cellule vers le type cellulaire auquel elle est destinée (Figure 4, ci-dessus). Le premier type cellulaire apparaissant sera les cellules ganglionnaires et le dernier, les cellules gliales de Müller. Par exemple, *Hes1* inhibe la différenciation neuronale et maintient l'état indifférencié des progéniteurs rétinien. Les cellules exprimant *Hes1* durant toutes les étapes du développement neuronal opteront pour le dernier type cellulaire possible, donc les cellules gliales de Müller. Finalement, un seul défaut dans l'expression de ces différents facteurs de transcription bloquera le développement normal de la rétine.

Les progéniteurs rétiniens sont soumis à un contrôle génétique supplémentaire qui dépend de leur position en fonction de la polarité rétinienne. Ainsi, plusieurs facteurs sont aussi nécessaires à l'établissement de la polarité d'abord temporale-nasale (T-N) et ensuite ventrale-dorsale (V-D) [36, 37]. Très tôt dans le développement de la rétine, les protéines BF-1 et BF-2 vont respectivement marquer la rétine nasale et la rétine temporale [38].

Les gènes homéobox *Soho1* et *GH6* seront exprimés dans la partie nasale tandis que *Epha5* et *Epha6* le seront dans la rétine temporale. Ensuite apparaîtra rapidement la polarité V-D par l'expression dorsale de *Bmp4* et ventrale de *Sonic HedgeHog (Shh)* et *Ventropine* [39]. Ainsi, *Bmp4* activera l'expression de *Tbx5*, *ephrin-B1* et *ephrin-B2* et réprimera celle de *Vax2*, *ephB2* et *ephB3* [40]. De la même façon, *Shh* inhibera *Bmp4* et *Tbx5* et activera *Vax2*. Ainsi, il y aura formation de gradients d'expression des protéines afin de créer la polarité rétinienne. Chez les souris *Vax2^{-/-}*, on observe plusieurs défauts liés à cette polarité V-D de la rétine suite à un mauvais gradient *ephrin-B1* et *ephrin-B2* [41].

1.2. Les protéines du groupe polycomb

Durant toutes les étapes du développement de l'œil, les cellules sont hautement régulées et organisées en fonction de leur spécificité cellulaire, nécessitant alors l'activation et la répression de plusieurs séries de gènes, tels que vus dans le chapitre précédent. De plus, les progéniteurs rétiniens ne cessent de proliférer durant plusieurs de ces étapes du développement, sans toutefois perdre leur identité cellulaire. Le profil d'expression propre à chaque type cellulaire doit donc être transmis de façon stable de la cellule mère à la cellule fille. Plusieurs complexes protéiques s'associant à la chromatine ont été identifiés comme étant impliqués dans le maintien de la spécificité cellulaire. Le groupe des polycombs (*PcG*), très conservé à travers les espèces, du ver de terre jusqu'à l'Homme, en fait partie.

1.2.1. Historique de la découverte des polycombs

Polycomb est une protéine qui fut identifiée pour la première fois par Pamela Lewis en 1947 chez *Drosophila melanogaster*. Le groupe des polycombs fut ensuite catégorisé comme étant un ensemble de gènes nécessaires au maintien d'un état de répression des gènes *homéotiques* (*Hox*) [42, 43]. Les gènes de la famille des *Hox* sont exprimés différemment dans les multiples segments du corps pendant l'embryogenèse et ils sont impliqués dans la segmentation et la mise en place de l'axe antéro-postérieur. La plupart des knockout de polycombs chez la drosophile démontrent une expression initiale normale des gènes *Hox* [44, 45]. Par contre, à un stade plus avancé du développement, ces modèles démontrent une expression ectopique de certains gènes *Hox* à l'extérieur des limites d'expression normale, résultant en des déformations majeures du squelette et du système nerveux [46-53].

Chez la drosophile, le contrôle des gènes homéotiques par les protéines polycombs commence au stade de 3 heures embryonnaires, tout de suite après l'activation des premiers gènes homéotiques. Ces derniers sont alors exprimés de façon segmentée en fonction de l'action d'une batterie d'activateurs et de répresseurs, nommés gènes de segmentation. L'effet des polycombs commence à se déceler à l'étape de la gastrulation. Les PcG permettent alors de maintenir la répression des gènes homéotiques lorsque les premiers répresseurs de segmentation commencent à cesser leur activité. Les polycombs agissent comme régulateurs épigénétiques sur la chromatine afin de maintenir un état de répression sur des locus spécifiques, et ce, aux travers des divisions cellulaires. Les fonctions et activités spécifiques des polycombs sont dépendantes des différentes phases du cycle cellulaire et sont corrélées avec leur état de phosphorylation [54, 55]. Par exemple, durant la phase M du cycle cellulaire, la plus grande partie des polycombs se dissocie de la chromatine et demeure dans la partie cytoplasmique de la cellule.

Par contre, une plus petite quantité des protéines polycombs demeure accroché à la chromatine, plus particulièrement à l'hétérochromatine, de la même façon que certains domaines de l'ARN Polymérase II [56].

Les polycombs étant impliqués dans la répression transcriptionnelle, un second groupe de protéines détient un rôle antagoniste, celui d'activation des gènes. Cette seconde classe de protéines nommée trithorax (Trx) ou groupe trithorax (*TrG*) vient compléter le rôle des polycombs en favorisant le maintien ou la réactivation de l'expression des gènes homéotiques [57, 58]. Autant les polycombs marquent les gènes qui n'ont jamais été activés, les trithorax marquent ceux qui l'ont déjà été. Ainsi dans un segment spécifique, un gène cible peut se faire activer dans un stade plus avancé du développement s'il a déjà été activé auparavant puisqu'il sera marqué par des protéines Trx.

1.2.2. Les interactions entre les polycombs

Des analyses biochimiques ont démontré que les polycombs forment de larges complexes multimériques (Polycomb Repressive Complex: PRC) de protéines qui interagissent localement avec la structure de la chromatine afin de maintenir un état de répression sur leurs cibles géniques. Il existe plusieurs complexes de polycombs différents par leur composition leur donnant une spécificité pour différentes cibles et des fonctions biologiques distinctes. La composition de ces complexes demeure donc hautement régulée durant toutes les étapes du développement, par rapport au type cellulaire et aussi en fonction des différentes phases du cycle cellulaire [59].

Les multiples interactions protéines-protéines qui ont lieu dans un même complexe polycomb vont moduler sa structure et du même fait son affinité pour ses cibles spécifiques. Il faut aussi comprendre qu'il peut y avoir beaucoup plus qu'une seule copie de chaque polycomb dans un même complexe.

La plupart des modèles de gènes polycombs mutés démontrent divers phénotypes. Il arrive dans certains cas que des mutations indépendantes sur différents polycombs donnent des phénotypes similaires. Ainsi, $M33^{-/-}$, $Bmi1^{-/-}$, $mel18^{-/-}$ et $Rae28^{-/-}$ donnent tous des phénotypes de transformations homéotiques du squelette. Souvent, lorsque deux gènes polycombs différents sont mutés dans le même organisme, l'effet devient additif [49, 60, 61]. Dans certains cas, on peut associer cet effet à un facteur de compensation, où un polycomb arrive à remplacer la fonction d'un second manquant.

Tableau I : Liste des principaux gènes polycombs et trithorax chez la drosophile ainsi que leurs homologues chez la souris. (Schwartz B. et Pirrotta V., Nature 2007 [62])

<i>Drosophila</i> protein	Complex	Protein domains	Biochemical activity	Mouse protein homologues
Polycomb group				
PC	PRC1	Chromodomain	Binding to trimethyl H3K27	NPCD, M33 (CBX2), CBX4, CBX6, CBX7, CBX8
PH	PRC1	SAM	?	PHC1, PHC2, PHC3
PSC	PRC1	RING	Cofactor for SCE	BMI1, MEL18
SCE (RING)	PRC1	RING	E3 ubiquitin ligase specific to H2AK119	RING1A, RING1B
SCM	PRC1?	SAM, MBT, Zn-finger	?	SCMH1, SCML2
E(Z)	PRC2	SET	Methylation of H3K9, H3K27	EZH2, EZH1
ESC	PRC2	WD40	Cofactor for E(Z)	EED
ESCL	PRC2	WD40	Cofactor for E(Z)	EED
SU(Z)12	PRC2	Zn-finger	?	SUZ12
PCL	PRC2	PHD, Tudor	?	PHF19, MTF2 (M96)
PHO	PhoRC	Zn-finger	DNA binding	YY1, YY2,
PHOL	?	Zn-finger	DNA binding	YY1, YY2
CG16975 (SFMBT)	PhoRC	MBT, SAM	Binding to mono- and dimethyl H3K9, H4K20	L3MBTL2, MBTD1
SU(Z)2	?	RING,	?	
SXC	?	?	?	?
ASX	?	PHD	?	ASXL1, ASXL2,
MXC	?	LA, RRM	?	Q9CUQ5
E(PC)	?	?	?	EPC1, EPC2
Trithorax group				
TRX	TAC1	PHD, SET,	Methylation of H3K4	WBP7, MLL1
ASH1	?	SET, PHD, BAH	Methylation of H3K4, H3K9, H4K20	ASH1L
ASH2	?	PHD, SPRY	?	ASH2L
BRM	SWI/SNF	SNF2, HELICc, Bromo	ATP-dependent nucleosome sliding	SMARCA4
MOR	SWI/SNF	SWIRM, SAINT	Cofactor for BRM	SMARCC1, SMARCC2
OSA	SWI/SNF?	BRIGHT	?	ARID1B

Ce concept est d'autant plus plausible lorsqu'on sait que certains domaines fonctionnels sont communs aux polycombs (ex: domaine Ring Finger sur les polycombs Ring1 et Bmi1) [63-65]. Donc, si le phénotype d'une première mutation peut être diminué dû à un effet compensatoire, ce phénotype sera d'autant plus important lorsqu'il y aura une double mutation de deux

polycombs redondants. Par des études en co-immunoprécipitation, il a été démontré que certains polycombs se trouvent sur un même chromosome sans toutefois se fixer sur les mêmes loci [66, 67]. Donc, certains complexes se chevauchent sur les chromosomes, ayant chacun leur affinité pour différents locus. Il arrive donc qu'on retrouve dans des mutations individuelles, telles que $M33^{-/-}$, $Bmi1^{-/-}$ et $mel18^{-/-}$, les mêmes gènes *Hox* exprimés de façon ectopique (*HoxA5*, *HoxC8*, etc), tandis que d'autres gènes sont surexprimés de façon spécifique à chaque mutation (*HoxC5* et *HoxC6* pour $Bmi1^{-/-}$, *HoxA7* et *HoxD4* pour $mel18^{-/-}$, etc.). De plus, on retrouve des effets de dosage : les phénotypes sont différents chez les souris $M33^{-/-}/Bmi1^{-/-}$, $M33^{-/-}/Bmi1^{+/-}$ et $M33^{-/-}$ [68].

Le nombre possible de complexes différents chez les mammifères est plus élevé que chez la drosophile. En effet, il existe plusieurs homologues *PcG* chez les vertébrés pour chacun retrouvé chez la drosophile. Par exemple, Ph chez la drosophile a deux homologues chez l'homme, (HPH1 et HPH2 [69]), et aussi trois chez la souris (*Rae28/Mph1/Phc1*, *Mph2/Phc2* et *Phc3*) [62, 70-72]. Chez la souris, *Bmi-1* forme une paire avec *mel-18* ayant plus de 95% d'homologie [73]. On retrouve deux *Ring* chez l'humain et la souris, *Ring1A* et *Ring1B* [63, 74, 75]. On pourrait alors parler de redondance évolutive, mais il a été démontré que les différents homologues ne sont pas exprimés de façon identiques selon les lignées cellulaires, ainsi que selon les différents segments et stades de développement [69]. Il a aussi été démontré que des gènes jumeaux n'interagissent pas de la même manière avec les autres polycombs. Des études d'interactions protéines-protéines ont démontré que *Ring1B* et *Mph2* peuvent interagir ensemble grâce à un domaine C-terminal non conservé chez *Ring1A*. Par contre, aucune interaction n'a été démontrée pour *Mph1* avec *Ring1A* ni même avec *Ring1B* [71, 76].

Finalement, ces nombreuses possibilités démontrent bien toute l'étendue de la multitude de complexes polycombs possibles chez les vertébrés. Leur système de répression *PcG* serait donc à la fois plus complexe et plus flexible que son homologue chez la drosophile.

- **Le complexe PRC2**

La littérature fait état de plusieurs classes de complexes protéiques PcG dépendant des modèles étudiés, les plus fréquentes étant PRC1 et PRC2. Commençons avec celle phylogénétiquement la plus ancienne de toutes : PRC2. Ce complexe est le seul retrouvé chez *C.Elegans* et chez les plantes [62, 77]. Chez ces dernières, PRC2 contient différents PcG tels que *Curly Leaf (CLF)*, *Swinger (SWN)* et *Medea (MEA)* ainsi que des homologues de la protéine *Suppressor of Zeste 12 (Su(Z)12)* et *Extra Sex Comb (Esc)* [78-80]. Chez les plantes comme chez les animaux, ce complexe PRC2 provoque l'hyperméthylation des histones H3 autour du promoteur des gènes ciblés.

Chez la drosophile, ce complexe est formé de *Su(Z)12*, *Esc*, *Esc-L* et de la protéine *Enhancer of Zeste (E(Z))* [81, 82]. *Su(Z)12*, détenant un domaine en doigt de Zinc, permet au complexe de se lier à son gène cible sur l'ADN. *E(Z)* contient un domaine SET qui agit comme HistoneMéthylTransférase. Lorsque *E(Z)* est dans le complexe PRC2, il méthyle les histones H3 sur leurs lysines 9 et 27, tandis qu'en complémentarité avec les *Trx*, il méthyle les mêmes histones sur les lysines 4 [83, 84]. *Esc* et *Esc-L*, deux protéines avec motif WD40, sont connues comme cofacteurs de *E(Z)* et permettent d'interagir avec des HistoneDéacéthylases (HDAC). Le complexe se lie à sa cible et peut alors modifier la chromatine en méthylant et déacétylant les histones [85-89].

Chez la souris, l'équivalent du complexe PRC2 demeure sensiblement le même, bien que les constituants aient quelques fois plusieurs homologues. Ce complexe contient en plus des protéines de liaison aux histones *RbAp46* et *RbAp48* [90]. Comme chez la drosophile, ce complexe est responsable de la di- et triméthylation des histones [91]. Le gène *Eed*, homologue de *Esc*, code pour un seul ARNm qui donnera à lui seul quatre isoformes : *Eed1/2/3/4*. Ceux-ci permettent alors de départager divers complexes retrouvés chez la souris : *PRC2/3/4*, ayant tous des activités spécifiques [82, 92-94].

- **Le complexe PRC1**

La seconde classe de complexe de répression, PRC1, est toujours constituée d'un groupe central incluant les protéines Polycomb (PC), Polyhomeotic (PH), Posterior sex combs (PSC), Sex comb on midleg (SCM) et RING1 [95, 96]. Ensuite, d'autres protéines viennent s'y lier, dépendamment des situations, comme par exemple Zeste, MI2, Sin3A, Smrter ou les facteurs associés à la TBP (TATA-box binding protein) : TafII250, TafII110, TafII85 et TafII62 [96].

Dans la littérature, on fait état d'un effet de complémentarité entre les différentes composantes du complexe PRC1. Ainsi, dans le knockout murin *Rae28^{-/-}*, on observe une surexpression de M33, *Bmi1* et *Mel18*. Un effet similaire se produit chez la drosophile *Pc^{-/-}*, où *Ph* et *Psc* sont surexprimés. L'effet de dosage est aussi un facteur très important pour la spécificité du complexe. Ainsi, un changement stœchiométrique d'un des composants peut bouleverser complètement le système, provoquant des phénotypes variés, de la microphtalmie à la mort de l'embryon.

Plusieurs rôles du complexe PRC1 ont été répertoriés dans la littérature. D'abord *Pc*, par son chromodomaine, permet la liaison spécifique de PRC1 sur l'histone H3K27 triméthylée [97]. Certaines protéines avec domaine RING (*Ring1*, *Ring1A/B*) ont une activité E3UbiquitineLigase qui mono-ubiquitine l'histone H2A sur sa lysine 119 [98-100]. D'autres PcG avec domaine RING (*Psc*, *Bmi-1*) ont comme but de catalyser cette action d'ubiquitination [101, 102]. C'est entre autres par l'entremise de *Scm* que ce complexe peut bloquer le système SWI/SNF qui permet le remodelage de la chromatine et l'activation de la transcription [95, 103]. PRC1 interagit aussi avec des composantes de l'ARN Polymérase II, à l'aide de certaines protéines TBP-TAF [96, 104]. Ces interactions sont nécessaires à la fonction de répression du complexe [105]. Finalement, il a aussi été démontré que ce complexe contrôle la prolifération cellulaire et l'entrée en sénescence en régulant négativement le locus *Ink4a/Arf*.

1.2.3. L'association des polycombs à leurs cibles

Des analyses fonctionnelles des régions régulatrices de plusieurs cibles des polycombs ont permis l'identification d'éléments spécifiques nécessaires et suffisants à la répression polycombs dépendante chez la drosophile. L'ensemble des complexes PcG se lie à ces séquences régulatrices nommées Polycomb Response Elements (PREs) [106-109]. Bon nombre de ces PREs ont été répertoriées comme séquences de répression des gènes *Hox*. Ces séquences sont utilisées dans des constructions de gènes rapporteurs afin de suivre le profil d'expression endogène des gènes *Hox* ou d'autres cibles connues des polycombs. *In vivo*, il est possible d'insérer par transposon des sites PREs ectopiques auxquels vont être recrutés les PcG. Un autre aspect intéressant de ses insertions est que la répression des gènes devient plus importante lorsque deux sites PREs sont rapprochés. Cet effet est nommé *pairing-sensitive silencing* [110]. Dans certaines circonstances, plusieurs copies de séquences PREs peuvent établir des interactions de longue distance dans le noyau, amenant des locus différents à se rapprocher dans un même environnement chromatique [111]. Ces interactions, nécessitant des locus avec séquences homologues, demeurent stables tout au long du développement.

Les séquences PREs, formées de plusieurs centaines de paires de bases, contiennent plusieurs petits motifs conservés qui sont reconnus par des protéines de liaison à l'ADN (Gaf, Psq, Sp1/Klf, Dsp1) [112, 113]. Les PREs contiennent des sites de liaisons des protéines Pho et Pho-L, mais aussi des sites de liaison Zeste ainsi que des motifs hypersensibles à la DNase I. La recherche de nouvelles séquences PREs à l'aide d'un algorithme contenant les motifs Gaf, Pho et Zeste, a permis de prédire plus d'une centaine de sites PREs dans le génome de la drosophile [114]. Les résultats de ces analyses furent éloquentes : une grande majorité des sites prédits ne permettaient pas la liaison des polycombs. De plus, seulement 20% des sites de liaisons des polycombs déjà connues et obtenues en ChromatineImmunoPrécipitation

(ChIP) ont été répertoriés à l'aide de cet algorithme. Ces études ont apporté de nouvelles ouvertures : Gaf, Pho et Zeste ne sont peut-être pas les seules protéines de liaisons associées aux PREs. D'ailleurs, aucune séquence PRE chez les mammifères n'a été identifiée jusqu'à ce jour, même s'il est connu que plusieurs gènes sont contrôlés par les PcG et que ces derniers sont recrutés de façon spécifique. Deux possibilités sont donc ouvertes pour ce qui est des mammifères : soit que les séquences PREs existent mais sont davantage diversifiées et étendues, donc plus difficilement repérables, soit que les polycombs sont recrutés par un tout autre mécanisme que chez la drosophile.

Un de ces mécanismes consisterait en des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation des PcG. La sous-unité CDK7 de TFIIH est impliquée non seulement dans la phosphorylation du domaine C-terminal de la grande sous-unité de l'ARN Polymérase II mais aussi dans celle de Mbl. Selon la littérature, cette dernière interagit avec Ring1B dans le complexe E2F-6 [54, 115, 116]. C'est pourquoi il a été suggéré que la liaison des PcG sur la chromatine soit régulée par des mécanismes moléculaires semblables à ceux requis pour la régulation de l'ARN Polymérase II durant la phase M, comme la phosphorylation. Cette régulation permettrait au système PcG d'atteindre un niveau de spécificité supérieur. Par exemple, Ring1B se dissocie plus rapidement de la chromatine condensée que le fait Rae28, la distribution de ces deux polycombs est donc distincte lors des diverses phases du cycle cellulaire. En 1999, Voncken démontra que les résidus tyrosine de Ring1B étaient davantage phosphorylés tandis que surtout les résidus sérine/thréonine de Rae28 l'étaient [55]. Ces différences permettraient alors d'obtenir une spécificité accrue des polycombs pour leurs cibles, assurant ainsi une meilleure mémoire épigénétique.

1.2.4. Les mécanismes d'action des polycombs

Le modèle hiérarchique de liaison des polycombs proposé par Wang en 2004 est le plus crédible jusqu'à ce jour [117]. Reposant sur des études sur la drosophile, son modèle débute par la liaison des protéines Pho, à l'aide de leur motif en doigt de Zinc, sur les séquences PREs. Ces polycombs recrutent alors le complexe PRC2. Ce complexe permet la venue des HDAC comme RPD3 et SIR2 [93] qui compactent la chromatine en procédant à certaines déacétylations. E(z), avec son domaine SET, triméthyle alors les histones H3K27 de part et d'autre du site PRE. Le complexe PRC1 est ainsi recruté sur le site grâce à l'affinité du chromodomaine de PC pour ces histones méthylées [66, 81, 118]. Ensuite, une coopération entre les complexes PRC2 et PRC1 permet la formation d'une large boucle d'ADN étendue du site PRE jusqu'au promoteur, voir même jusqu'au gène cible (Figure 5, page 19). Cela a pour effet de propager la méthylation des histones sur une grande région de près de 150 Kb. Ces multiples méthylations permettent le recrutement de protéines Pc. Cette boucle surchargée de Pc entourant le promoteur du gène cible prévient l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle et donc la répression est partiellement établie. Par la suite, les complexes polycombs restent liés à la séquence PRE et permettent les étapes nécessaires au maintien de cette répression. Il y a ensuite des cycles de modifications chromatiques, par déacétylations et méthylations ainsi que l'ubiquitination de H2A sur la lysine 119 par Scm/Ring [98]. De plus, il y a l'inhibition du système SWI/SNF par l'interaction du polycomb Scm avec Geminin [95, 103, 119]. Finalement, les protéines polycombs interagissent directement avec la machinerie transcriptionnelle par la TBP (TATA-box binding protein) et la sous-unité TFIIB de l'ARN Pol II afin de maintenir l'état de répression.

Tous ces mécanismes ont été étudiés et observés dans des cadres précis de répression par les polycombs. Chacun de ces mécanismes étant spécifiques à des types cellulaires ou des stades de développement, ils n'ont pas tous nécessairement lieu aux mêmes moments et aux mêmes endroits.

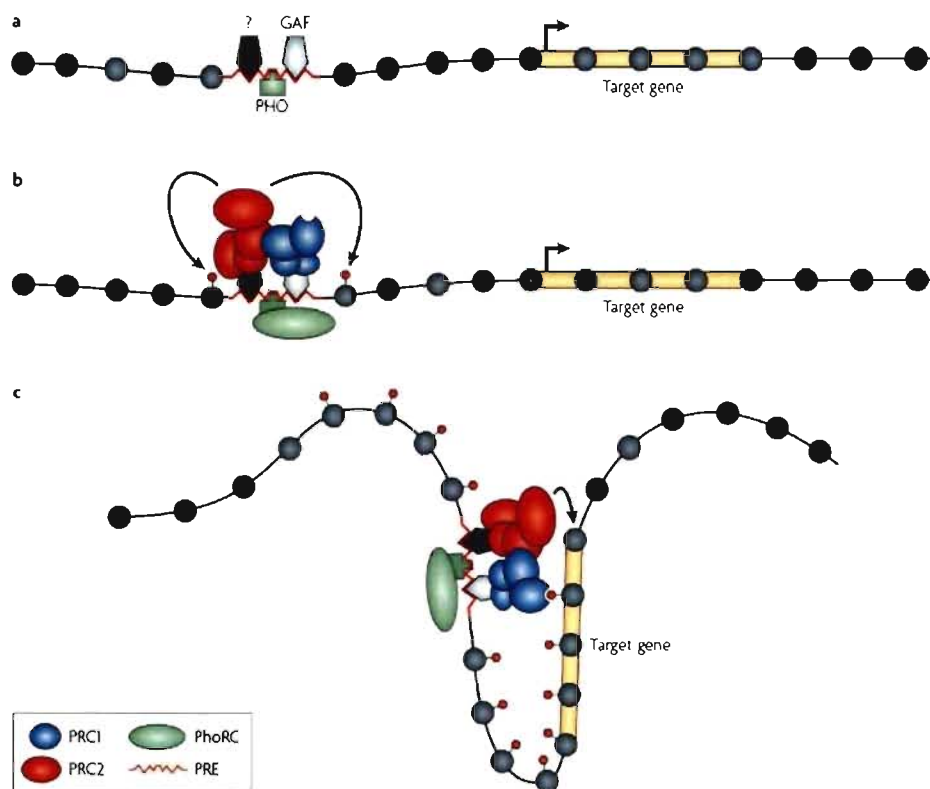


Figure 5 : Modèle décrivant le mécanisme de recrutement des complexes polycombs, de la méthylation des histones ainsi que de la formation d'une boucle d'ADN autour du site PRE. (Schwartz B. & Pirrotta V., Nature 2007 [62]).

1.2.5. Les cibles fonctionnelles des polycombs

Il fut démontré au cours des dernières années que les cibles PcG étaient beaucoup plus nombreuses et diverses mais surtout qu'elles ne se limitaient pas seulement à la famille des gènes *Hox*. Ainsi, le mécanisme des polycombs est requis pour différentes fonctions biologiques : le contrôle du cycle cellulaire [62, 120], la prolifération et l'autorenouvellement des cellules souches et des progéniteurs neuraux et hématopoïétiques [121-123], le développement du système nerveux, la spermatogenèse [124], etc. Finalement, les polycombs sont associés au contrôle de nombreux gènes dont une grande proportion code pour des régulateurs de la transcription, des récepteurs et des protéines de signalisation qui sont souvent impliqués dans

les processus du développement [62]. Ainsi, dans chacun des types cellulaires presque tous les programmes génétiques sont réprimés par le système des PcG à l'exception d'un sous-groupe de gènes spécifiques. Lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires, certains locus sont libérés et leurs gènes transcrits, il s'agit de dérepression [125-128]. Par exemple, les cellules souches embryonnaires (ES) mutantes *Eed*^{-/-} se différencient plus spontanément que les cellules ES de type sauvage (WT) [126]. Finalement, les polycombs interagissent aussi avec les principaux facteurs de transcription nécessaires à l'auto-renouvellement et au maintien de la pluripotence des cellules ES, soit Oct4, Sox2 et Nanog [125, 128].

1.3. Le locus *Ink4a/Arf* comme cible des polycombs

Une autre classe de cibles des polycombs n'a été que très rapidement abordée jusqu'à présent dans cette introduction, il s'agit des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. En 1991, Haupt et Lohuizen classèrent le gène *Bmi1* parmi les oncogènes, suite à la découverte de sa coopération avec *c-myc* [129, 130]. Depuis ce temps, beaucoup de polycombs furent associés à ces classes pro ou anti-oncogènes puisque la plupart des mutations polycombs mènent à des transformations cellulaires. Chaque mutation donne toutefois des effets différents : la surexpression de *Bmi1* mène à l'immortalisation de cultures de fibroblastes murins [65, 131], tandis que l'effet inverse est observé pour le gène *mel18*. En effet, il faut au contraire inhiber l'expression de *mel18* pour arriver au même résultat que la surexpression de *Bmi1* dans ce type cellulaire. *Bmi1* est donc un oncogène et *mel18* un suppresseur de tumeurs, quoiqu'ils soient tous deux non seulement dans la même famille des polycombs, mais aussi des homologues murins de Psc chez la drosophile [65, 73, 131, 132].

En 2003, Itahana démontra que le complexe PRC1 a un impact sur le contrôle de la prolifération et de la sénescence via la régulation du locus Ink4a/Arf [133]. La sénescence correspond à un état d'arrêt de croissance irréversible de la cellule, souvent associé à des stress cellulaires tels qu'un dommage à l'ADN, un stress oxydatif, à l'activation d'oncogène ou à la réduction des télomères [134]. L'activation du locus Ink4a/Arf correspond à l'expression des gènes $p16^{\text{Ink4a}}$ et $p19^{\text{Arf}}$ chez la souris (Figure 6, ci-dessous). Leur expression résulte respectivement en l'activation de la cascade $p53/p21^{\text{Cip1}}$ et Rb qui mène à l'arrêt temporaire ou permanent (sénescence) du cycle cellulaire et/ou à la mort cellulaire programmée (apoptose), tout dépendant de la force du signal.

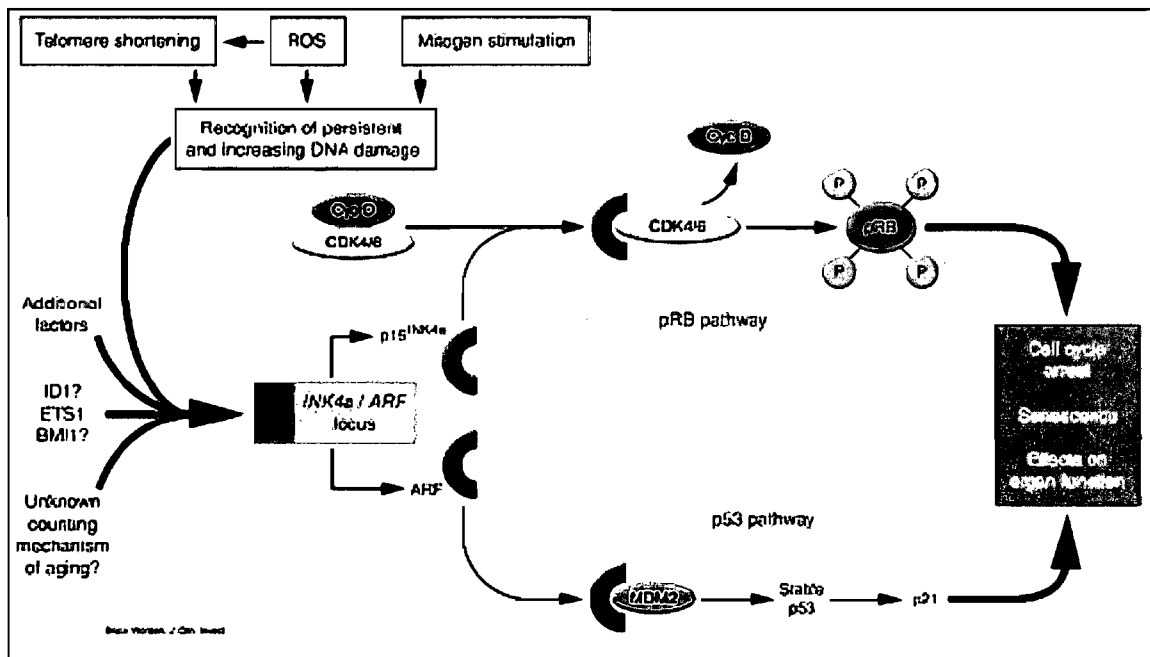


Figure 6 : Mécanismes d'induction du locus Ink4a/Arf. L'accumulation de dommages à l'ADN, des stress oxydatifs, des toxines et des mauvaises actions signalétiques vont mener à l'activation de ce locus. Son expression activera les voies pRb et p53 qui résulteront en l'arrêt du cycle cellulaire et à la sénescence des cellules. (Worden, B. J. Clin. Invest. [135])

Il fut démontré que dans les cellules en grandes proliférations, comme les progéniteurs rétinien, le système de répression des polycombs régule de façon négative le locus Ink4a/Arf. Par contre, lorsque la cellule subit un stress

trop important ou lorsqu'elle vieillit, les complexes polycombs se dissocient du locus, ce qui permet l'ouverture de la chromatine et l'expression des gènes associés. Des études sur des cultures de fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) ont démontré que dans les derniers passages, lorsque les cellules approchent de la sénescence, le taux d'expression du gène *Ezh2* se trouve diminué [136]. Sur le locus *Ink4a/Arf*, cette diminution corrèle avec l'absence du complexe PRC2 et des méthylations H3K27 ainsi qu'à la dissociation du complexe PRC1. Le bas niveau d'expression de *Ezh2* ne permettant plus au complexe PRC2 de se former et de méthyler les histones. La cascade moléculaire des polycombs ne peut donc plus se compléter, les gènes $p16^{\text{Ink4a}}$ et $p19^{\text{Arf}}$ sont alors exprimés.

1.4. La protéine Rae28/Mph1/Phc1

Le gène d'intérêt de cette étude se nomme *Rae28* et fait partie de la famille des polycombs. Celui-ci fut le premier homologue de *Ph* découvert chez la souris. Ce gène de quelques 3 300 paires de bases code pour une protéine de 125 KDa faisant partie du complexe PRC1 avec *Bmi1*, *Mel18*, *Scm*, *M33* et *Ring1*. Cette protéine contient un domaine en doigt de Zinc lui permettant de se lier directement à l'ADN [137]. Elle contient aussi un domaine SAM qui permet de faire des liaisons protéines-protéines avec d'autres PcG comme *Bmi1* [138]. Ainsi, *Rae28* peut lier sa cible et recruter une autre protéine polycomb par son domaine SAM afin de méthyler ou ubiquitiner les histones [77, 138, 139]. Ce domaine SAM permet sa liaison à l'ARN, possiblement afin de cibler des gènes spécifiques, comme c'est le cas pour son homologue *SOP-2* chez *C-Elegans* [140]. Du même fait, ce domaine SAM permet la sumoylation de *Rae28*, afin de réguler sa localisation nucléaire [141].

Il n'y a que très peu d'articles scientifiques qui portent sur le gène *Rae28*. Il n'y a pas non plus d'anticorps commercial permettant de localiser la protéine ou de voir sa présence en Western Blot. Un article sur le sujet fut publié en 2000 par le groupe de Tomotsune [142]. Cet article démontre la présence de l'ARN *Rae28*, par hybridation *In situ*, lors du développement du système nerveux chez la souris (Figure 7, ci-dessous).



Figure 7 : Hybridation *In situ* sur coupes frontales (A et B) et sagittales (C) d'embryons WT avec une sonde contre l'ARN *Rae28*. On voit la présence de l'ARN *Rae28* dans la vésicule optique (OV) au stade embryonnaire E9,5 (A). (Tomotsune D., *Mech. Dev.* 2000 [142]).

Le groupe du Dr. Takihara créa en 1997 la première souris *Rae28*^{-/-} (Figure 8, page 25) et c'est à partir de l'étude de ce modèle qu'il proposa plusieurs rôles à ce polycomb [137]. D'abord, les phénotypes sont nombreux et correspondent en grande partie à ceux observés chez les humains atteints du syndrome CATCH-22 : anomalies cardiaques, anomalies faciales et oculaires, hypoplasie du thymus, fissure du palais, défaut des glandes parathyroïdes, etc. [143]. Les embryons homozygotes *Rae28*^{-/-} sont plus petits que les WT et presque tous meurent avant la naissance.

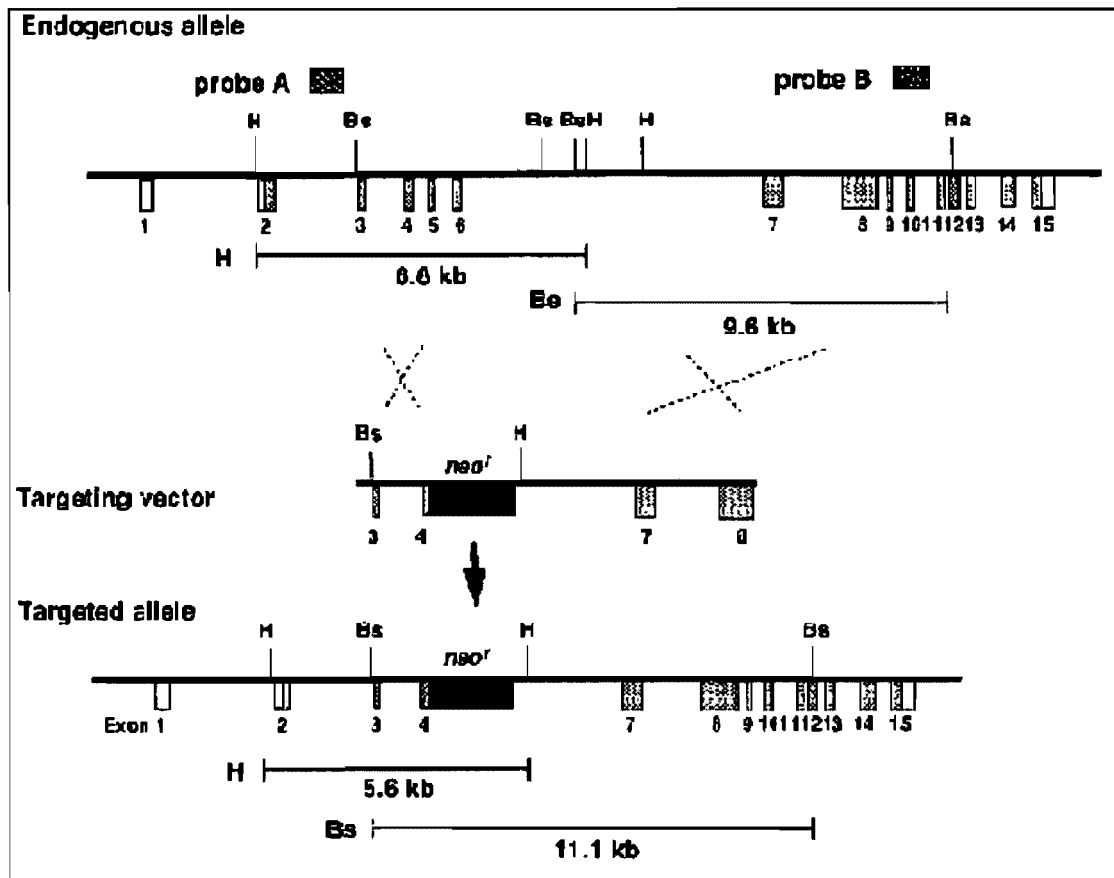


Figure 8 : Création du mutant $Rae28^{-/-}$ par insertion d'une cassette NEO^r après l'exon 4, bloquant ainsi la transcription du gène. Il est possible de vérifier par PCR avec des oligos *Rae28* (sens et α -sens) et *Néo* (α -sens), si les souris sont de type sauvage, hétérozygotes ou homozygotes. (Takahara Y., *Develop.* 1997 [137]).

Ce polycomb semble être primordial pour le développement du système nerveux central et périphérique. Son expression est assez uniforme dans le cortex cérébral à partir du stade E7,5 jusqu'au stade E14,5 [142]. *Rae28* a plusieurs cibles transcriptionnelles reliées au développement du système nerveux, dont des gènes *Hox*, tels que *Hoxa3/4/5*, *Hoxb3/4* et *Nkx2,5*. Certaines de celles-ci sont aussi des cibles communes à d'autres polycombs comme *Bmi1* et *Mel18* [144, 145]. L'expression ectopique des gènes *Hox* résulte en des défauts du squelette et de la segmentation de l'axe antéro-postérieur de la crête neurale (Figure 9, page 26).

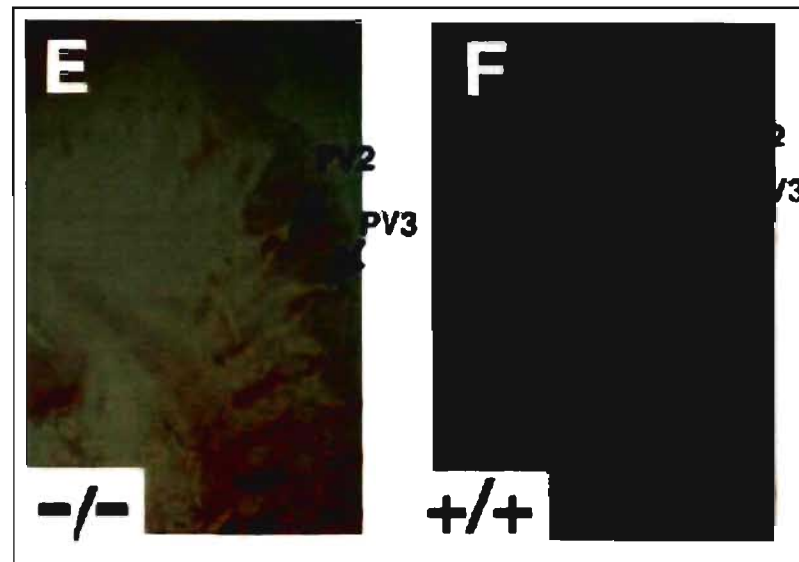
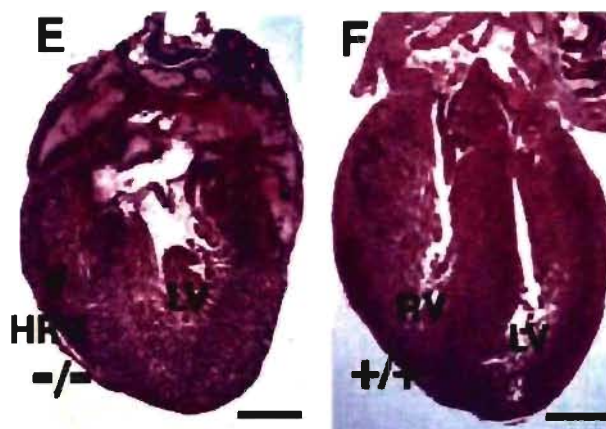


Figure 9 : Hybridation *In situ* sur coupes sagittales d'embryons WT et $Rae28^{-/-}$ avec une sonde contre *Hoxa3*. On remarque, chez le mutant, l'expression ectopique du gène *Hox* au niveau de la seconde prévertèbre (PV2). (Takahara Y., *Develop.* 1997 [137]).



Le mutant $Rae28^{-/-}$ a un phénotype de malformations cardiaques lié à une surexpression du gène *Nkx2,5*, un des plus importants effecteurs du développement cardiaque [146].

Figure 10 : Coupes histologiques du cœur de nouveaux-nés WT et $Rae28^{-/-}$. Phénotype d'hypoplasie du ventricule droit (HRV) chez le mutant homozygote. (Takahara Y. *Develop.* 1997 [137])

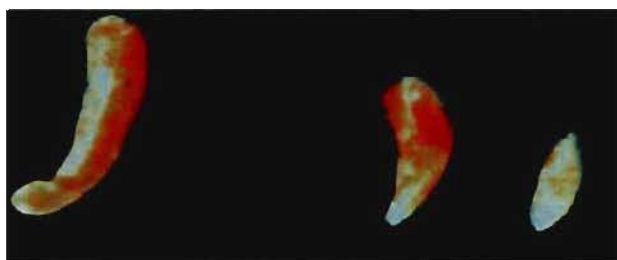


Figure 11 : Hypoplasie de la rate de souris $Rae28^{-/-}$ par rapport au WT (Ohta H., *J. Exp. Med.* 2002 [147]).

Le gène *Rae28* serait aussi impliqué dans la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches. Il est d'ailleurs fortement exprimé dans ces cellules primitives (ES, HSC, NSC). Chez le mutant *Rae28^{-/-}*, on observe un défaut de prolifération et d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques [147]. Comme phénotype associé, on parle d'hypoplasie de la rate chez le mutant *Rae28^{-/-}*, un des organes hématopoïétiques majeurs du nouveau-né (Figure 11, page 26). La cause de décès la plus probable chez les embryons *Rae28^{-/-}* serait d'ailleurs due à un défaut hématopoïétique [137]. De plus, le même groupe de chercheurs a observé des anomalies du système lymphopoïétique comme l'arrêt de maturation des pro-lymphocytes B vers les pré-lymphocytes B [148]. Il est intéressant de savoir que plusieurs polycombs du complexe PRC1, comme *Bmi1*, *M33* et *Mel18*, sont aussi impliqués dans les mécanismes lymphopoïétique [72, 137, 144, 148-151].

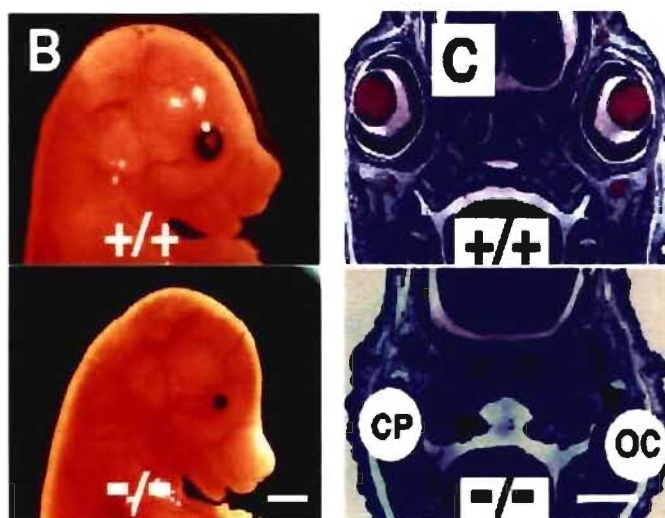


Figure 12 : B) Images d'embryons de souris au stade E15,5 démontrant un phénotype de microphthalmie chez le mutant *Rae28^{-/-}*. C) Coupes histologiques de la tête d'embryons au stade E17,5 démontrant le défaut de développement chez le mutant *Rae28^{-/-}* : formation d'une cupule optique (OC) défectueuse à gauche et l'absence totale de développement du côté droit. (Takahara Y., Dev. 1997 [137]).

Finalement, les phénotypes qui nous préoccupent davantage sont sans aucun doute ceux en lien avec le développement de l'œil. Les mutants *Rae28^{-/-}* ont des phénotypes de microphthalmie et d'anophtalmie. Un certain effet de dosage est observable puisque dans bien des cas, l'embryon mutant n'a pas les mêmes phénotypes aux deux yeux (Figure 12 (C), ci-dessus). Finalement, il arrive aussi que ces phénotypes apparaissent chez l'embryon hétérozygote *Rae28^{+/-}*.

1.5. Problématique

Bien que la littérature démontre que la protéine Rae28 influence le développement de l'œil, rien n'indique par quels mécanismes la protéine conduit ces interactions. Ce manque d'information approfondie sur les processus de formation de l'œil nuit à la compréhension des maladies y étant associées ainsi qu'à l'élaboration et à l'amélioration des techniques de thérapies cellulaires. Afin de mieux comprendre les mécanismes de développement de l'œil, il est primordial de mettre à jour les cibles transcriptionnelles du polycomb Rae28 qui pourraient influencer le développement chez la souris. L'expression de quels gènes cibles est modifiée par l'absence de Rae28 lors du développement ? Ces cibles influencent-elles la prolifération et l'auto-renouvellement des progéniteurs rétiniens ? Les réponses à ces questions permettront de mieux comprendre par quels mécanismes la protéine Rae28 agit sur le développement de l'œil. L'intégration des résultats avec ceux de la littérature permettra de mieux comprendre les mécanismes du développement associés à la famille des polycombs.

1.5.1. Les gènes homéobox comme cibles de Rae28

La première hypothèse propose que les phénotypes de l'œil chez le mutant $Rae28^{-/-}$ soient dus à un défaut d'expression de certains facteurs de transcription de la famille des homéobox. Il faudra donc vérifier, par RT-PCR, le taux d'expression de certains facteurs afin d'établir les cibles de répression possibles de la protéine Rae28. Il faudra d'abord débiter par l'évaluation des principaux gènes associés au développement de l'œil tels que *Vax2*, *Pax6*, *Six3*, *Shh*, etc. Par la suite, suivra la vérification des hypothèses par ImmunoHistoChimie (IHC) sur des coupes histologiques à différents stades embryonnaires. Finalement, ces coupes permettront de déterminer à partir de quels stades s'initient les défauts de formation de l'œil chez le mutant $Rae28^{-/-}$ et quelles cibles en sont la cause.

1.5.2. Le locus Ink4a/Arf comme cible de Rae28

La seconde hypothèse porte sur l'expression des gènes du locus Ink4a/Arf. Étant donné qu'il a été démontré que plusieurs polycombs sont associés au contrôle de la prolifération des cellules souches (Bmi1, Rae28, etc), il est probable que les phénotypes d'anophtalmie et de microphthalmie du modèle $Rae^{-/-}$ sont dus à un défaut de prolifération des progéniteurs neuroépithéliaux. Il faudra donc vérifier les taux d'expression des gènes associés au locus Ink4a/Arf ($p16^{Ink4a}$ et $p19^{Arf}$) par transcription inverse et PCR (RT-PCR) afin de valider leur possible implication. Par ImmunoHistoChimie à l'aide de marqueurs spécifiques comme l'anticorps α -Phospho-Histone-H3, l'évaluation des taux de prolifération des cellules de l'œil en formation à différents stades sera faite. Il sera aussi question d'évaluer le taux d'apoptose des cellules de l'œil en formation en IHC à l'aide d'un anticorps α -caspase-3-activé.

Avant tout, il sera question de vérifier si le locus Ink4a/Arf est une cible possible de Rae28 par l'évaluation de l'impact du knockout sur des cultures de cellules en prolifération. Ainsi, il sera question de comparer des cultures de fibroblastes de souris embryonnaires (MEFs) $Rae28^{-/-}$ avec les WT. Ce type cellulaire étant bien détaillé dans la littérature, cela permettra de déterminer si le polycomb Rae28 est impliqué dans la prolifération, la sénescence et/ou l'apoptose de ces cellules prolifératives.

Finalement, le développement de l'œil reposant sur la différenciation d'un nombre impressionnant de progéniteurs, l'hypothèse propose qu'un défaut dans l'établissement et le maintien de ce bassin de cellules en prolifération est une cause très probable du phénotype observé chez le mutant $Rae28^{-/-}$.

2. Méthodologie

2.1. Les souris

Le projet de recherche commença par l'arrivée des souris C57B6 $Rae28^{+/-}$ au centre de recherche. En fait, ces souris proviennent du knockout fait par Takihara en 1997 [137]. Un anticorps contre Rae28 a également été reçu. Les premières étapes du projet étaient d'établir une colonie de souris $Rae28^{+/-}$, de mettre au point la méthodologie de génotypage des souris et finalement d'extraire des protéines des embryons mutants afin de vérifier l'efficacité et la spécificité de l'anticorps.

Il a fallu croiser les souris $Rae28^{+/-}$ avec des souris de type sauvage ayant la même souche génétique (C57B6) afin d'établir une colonie. Ensuite, lorsqu'il fallait obtenir des embryons $Rae28^{-/-}$, il suffisait de croiser deux souris $Rae28^{+/-}$ ensemble, de sacrifier la femelle au stade embryonnaire voulu et de génotyper les embryons utilisés.

2.2. Génotypage

L'ensemble complet d'extraction d'ADN génomique : Red Extract-N-Amp PCR-Ready-Mix (Sigma) et son protocole sont utilisés afin de génotyper les embryons. Après l'extraction, il suffit d'ajouter les oligos et d'activer la machine à PCR : 37 cycles à 59°C.

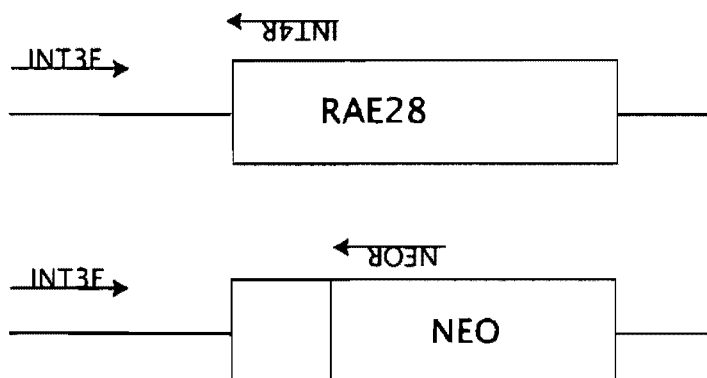


Figure 13 : Principe de génotypage des souris Rae28

Oligos utilisés (séquence 5' ⇒ 3') :

INT3-F (sens) : CTG CCT TGA TGT TCC TGG

INT4-R (anti-sens) : GGA GCT AGC CTG TCG ACT G

NEO-R (anti-sens) : GCG CTG ACA GCC GGA ACA CG

Ainsi, pour un allèle de type sauvage (WT), un segment d'ADN de 250 paires de bases est obtenu à partir des oligos INT3-F et INT4-R. Un segment de 350 paires de bases pour un allèle mutant Rae28 est obtenu avec les oligos INT3-F et NEO-R. Lorsque les deux bandes apparaissent sur le gel, c'est que l'embryon est hétérozygote $Rae28^{+/-}$, ayant un allèle muté et un WT.

2.3. Cultures cellulaires de progéniteurs neuroépithéliaux : essais neurosphères

Les vésicules optiques d'embryons au stade E13,5 sont disséquées dans du HBSS avec des aiguilles de Tungsten. Elles sont triturées à l'aide d'une seringue (aiguille 20G 10 fois suivie d'une 22G 5 fois) afin d'obtenir les cellules individuelles en suspension. Une fois centrifugées (3000g, 5 min), elles sont resuspendues dans un milieu à cellules souches neurales : DMEM/F12

(Invitrogen), 0,25 % glucose, supplément B27 1X (Gibco), 2 μ g/mL d'héparine (Sigma), 25 μ g/mL de Gentamycine (Gibco), 10ng/mL de FGF2 (Sigma) (20 ng/mL de EGF est ajouté lorsqu'on arrive au passage 2). Le milieu contenant les cellules est alors transféré dans des plaques de culture 6 puits non-adhérentes (Sarstedt). Ces plaques sont gardées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂ atmosphérique pour 8 jours. Après ce temps, les cellules sont passées de façon clonale : une neurosphère est dissociée à 37°C dans du HBSS (Invitrogen) auquel on ajoute 0,25 % de trypsine (Sigma), et ce pour un temps proportionnel à sa grosseur (valeur empirique de 1 min / 13,5 μ m de diamètre). Les cellules découlant de cette neurosphère sont triturées (20G 10 fois suivi de 22G 5 fois), centrifugées (3000g, 5 min) et lavées deux fois avec du HBSS. Les cellules en suspension sont remises en culture dans le milieu de culture de cellules souches neurales à raison de 2000 cellules/mL. L'évaluation de la viabilité cellulaire se fait par comptage à l'aide d'une solution de bleu trypan (Sigma) et d'un hémacytomètre. Le taux d'auto-renouvellement des progéniteurs est évalué en comptant le nombre de neurosphères obtenues par rapport au nombre de cellules mises en culture. Finalement, la prolifération cellulaire est évaluée en fonction du nombre de cellules contenues dans une neurosphère, qui est théoriquement proportionnel à sa grosseur.

2.4. RT-PCR quantitative en temps réel

L'ARN est extraite à partir des différents tissus (proscencéphales à E10,5, E13,5) ou cultures (Neurosphères, MEFs, etc.) à l'aide de Trizol (Invitrogen) selon le protocole indiqué. Ensuite, la transcription inverse est lancée à l'aide d'une RTase (Invitrogen) de 1 heure à 37°C. À partir du cDNA obtenu, des PCR quantitatives en temps réel sont lancées avec la machine *qPCR iCycler* de *BioRAD* à l'aide de la Platinum SYBR Green (Invitrogen) en respectant le protocole du fabricant. Chaque PCR d'un même cDNA est fait en triplicata et est normalisé avec le gène ubiquitaire Hprt.

Tableau II : Séquences des oligos utilisés pour les RT-PCR

Gène	Séquence	Gène	Séquence
Hprt	F : ACTGTAATGATCAGTCAACGGG R : GGCCTGTATCCAACACTTCG	Pax6	F : AACAACTGCCTATGCAACC R : ACTTGGACGGGAACTGACAC
Bmi1	F:GGAGACCAGCAAGTATTGTCCTTTTG R : CATTGCTGCTGGGCATCGTAAAG	Six3	F : TCTCAGGTCAGTCCATGGTATTC R : GCCTTGGCTATCATAATCAC
Cbx7	F : CACGCGCAGGATCGTATC R : TCCTAGTGGGCGCGACTC	Six6	F : AAGACCAGCAAATACCGGCG R : GCTTCTTCACACAGAACGCG
Rnf2	F : GCGGTTGATTCTCGAGTC R : CTTGTCTGTGCGCTGTCG	Sox2	F : CGCATGGACAGCTACGCGC R : GCGCCTAACGTACCACTAGAAC
Rae28	F : CTAGCCAGTGGAGCGTCG R : CTCTGCAGCAAAACCGATA	Vax2	F: GTACTTCCTTCACAGCAGAGCA R:TCTCTGCTCTGGTCCTTCTTGT
YY1	F : GTGTGGCAAAGCGTTCGT R : GTTGCCCTTCCTGTTACACG	p16 ^{Ink4a}	F : GAGGCGGATTTAGCTCTGCTC R:TCCGCTGCAGACAGACTGGCCAG
Hes5	F : AAGTACCGTGGCGGTGGAGATGC R : CGCTGGAAGTGGTAAAGCAGCTT	p19 ^{Arf}	F : CTTGGTCACTGTGAGGATTCAG R : GCGGCCCTCTTCTCAAGATC
Lhx2	F : ATGCACTGGGCCGGTTAAC R : TGC GTTAGCCC GACGCACA	p21 ^{Cip1}	F : TGTCTTGCCTCTGGTGTCTG R : ATCTGCGCTTGGAGTGATAGA

2.5. Hybridation *In Situ* Whole Mount

Les embryons complets sont fixés dans une solution 4% PFA/PBS toute la nuit à 4°C. Ceux-ci sont alors lavés dans du tampon phosphate-Tween20 (PBT) et blanchis dans 6% H₂O₂/PBT pendant 30 minutes. Après nettoyage au PBS, ils sont traités à la protéinase K (10µg/mL) 10 minutes (plus ou moins selon le stade embryonnaire) et ensuite immergés dans une solution 2 mg/mL glycine/PBT. Après nettoyage au PBS, ils sont fixés à nouveau pendant 20 minutes dans une solution 0,2% glutaraldéhyde / 4% PFA/PBT et nettoyés. Les sondes sont synthétisées à partir d'un plasmide contenant le cDNA de Vax2, offert par le laboratoire du Dr. Sandro Banfi [152]. Ces sondes sont synthétisées par transcription inverse (α -sens : T3 RNA Polymérase; sens : T7 RNA Polymérase (Invitrogen)) avec un marqueur à la DIG (Roche) pendant 2 heures, purifiées avec une solution d'éthanol et de LiCl (0,1M) et resuspendues dans de l'eau DEPC/DTT (0,1M) pour une concentration de 0,1 µg/µL. Les embryons sont immergés pendant 1 heure à 70°C dans une solution d'hybridation (50% Formamide / 5X SSC pH4,5 / 50 µg/mL / 1%SDS / 100 µg/mL d'ARN de levures) et ensuite toute la nuit à 70°C dans la même solution dans laquelle est ajouté 10 µg/mL de sondes. Ensuite, les embryons sont trempés dans des solutions de lavage : solution 1 (2 fois 30min à 70°C) = 50% Formamide / 2X

SSC pH4,5 / 0,1% TWEEN-20; solution 2 (2 fois 30min à 37°C) = 0,5M NaCl / 10nM Tris-HCL pH7,5 / 0,1% TWEEN-20; solution 3 (2 fois 60min à 65°C) = 50% Formamide / 2X SSC pH4,5. Ils sont alors immergés dans une solution MAB (2 fois 15min à 25°C) = 100mM acide Maléique / 150mM NaCl / pH7,5; ensuite dans du MAB / 2 % BMB (Boehringer Mannheim blocking reagent) (60min à 25°C); MAB / 2% BMB / 20 % sérum (Invitrogen) (60min à 25°C) et finalement à 4°C toute la nuit dans la même solution dans laquelle est ajouté l'anticorps α -DIG (Roche). Les embryons sont alors nettoyés quelques heures dans la solution MAB suivies de quelques heures dans le NTMT (100mM NaCl / 100mM Tris-HCl pH9,5 / 50mM Mg-Cl₂ / 1% TWEEN-20 / 2mM Levamisole). Finalement, ils sont marqués en les immergeant dans une solution NBT/BCIP (Sigma) (200 μ L dans 10mL de NTMT) selon la coloration voulue.

2.6. Immunofluorescence (IF)

Les embryons complets ou les tissus sont fixés dans une solution de PBS avec 4% de PFA pour une durée déterminée entre 15 min à 1 heure selon la grosseur. Ils sont immergés dans une solution de Cryomatrix (Shandon) et congelés à -80°C. Il faut ensuite couper (8 μ m) le tissu à l'aide d'un cryostat et les laisser sécher sur des lames pendant minimum 10 minutes. Les cultures cellulaires sont quant à elles fixées à même la lame contenant des chambres pour une durée de 10 minutes avec la solution de PFA. Il faut laver 3 fois dans du PBS avant de bloquer avec une solution d'hybridation de 1% BSA (Vector Laboratories) / 0,1% Tween 20 / PBS pendant 1 heure. Ensuite, les anticorps primaires sont dilués dans la solution d'hybridation dans laquelle les lames sont incubées toute la nuit dans une chambre humide. Le lendemain, il faut laver 3 fois avec du PBS, et faire incuber pendant une heure avec l'anticorps secondaire. Finalement, les lames sont lavées 3 fois dans du PBS et scellées. Les anticorps utilisés : α -PhosphoHistoneH3 (1/200; Upstate); α -p16^{Ink4a} (1/350; SantaCruz), α -p19^{Arf} (1/100; AbCam), Caspase-3-activée (1/200; Cell Signaling Technology).

2.7. ImmunoHistoChimie (IHC)

Les embryons sont fixés dans la formaline et envoyés au laboratoire de pathologie (HMR) afin d'être fixés dans la paraffine. Ensuite, des coupes de 5µm sont faites à l'aide du microtome. Ces coupes sont laissées à sécher pendant quelques heures. Le kit Vectastain ABC est utilisé en respectant le protocole du fabricant (Vector laboratories). Finalement, il faut déposer le DAB (Sigma), le substrat de la peroxydase, dilué dans de l'eau qui donne un marquage brun/maron. Les anticorps peuvent être utilisés 2 fois plus dilués qu'en IF.

2.8. Cultures de Fibroblastes Embryonnaires Murins (MEFs)

La souris gestante est sacrifiée au stade E13,5. Les embryons sont retirés et leur tête est coupée du reste du corps. La tête est utilisée pour le génotypage, tandis que le corps est trituré dans 5 mL de 50%Trypsine / 50%PBS (18G 10 fois, TripleX de Invitrogen). Les tubes sont laissés à 37°C pendant 10 minutes et centrifugés (1000rpm 5min). Il faut retirer le surnageant, le culot est resuspendu dans 5 mL de PBS, recentrifugé et le surnageant est retiré à nouveau. Les cellules ont resuspendues dans 3 mL de milieu de culture (10% sérum / 1X acides aminés non-essentiels / 1,5 µL/mL Gentamicine / 1 µL/mL Hapes / DMEM F-12, (tout Invitrogen)). Il faut verser les cellules dans une plaque 6 puits avec surface adhérente (Sarstedt) en les passant dans un tamis cellulaire. Les plaques sont déposées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pour la nuit. Le lendemain, le milieu est retiré de chacun des puits. 2 mL de PBS (37°C) est ajouté tranquillement pour nettoyage, il est ensuite retiré afin d'ajouter 3 mL de nouveau milieu par puit. Les plaques sont laissées dans l'incubateur jusqu'à confluence cellulaire (2-3 jours).

Une fois à confluence, un passage cellulaire est effectué. Le milieu est retiré des puits, 2 mL de PBS est ajouté et retiré pour nettoyage. 2 mL de 50%Trypsine / 50%PBS est ajouté. Les plaques sont laissées à 37°C pendant 5 minutes afin de faire décoller les cellules, le milieu est ensuite transféré dans des tubes 15 mL à l'aide de pipettes. Il faut centrifuger, retirer le surnageant, rincer avec du PBS, recentrifuger, retirer le PBS et y ajouter le milieu de culture (1-2 mL selon la quantité de cellules). Un comptage cellulaire est effectué à l'aide d'un hémacytomètre afin d'évaluer la concentration cellulaire. Les MEFs sont transférés dans des plaques 6 puits à raison de 50 000 cellules / puits pour 3 mL de milieu et sont incubés à 37°C 5% CO₂. Des MEFs sont déposés sur des lames avec chambres afin d'effectuer des marquages (ex : IHC, BGal), les proportions du nombre de cellules / surface doivent être respectées.

2.8.1. Calcul de prolifération des MEFs

Le taux de prolifération des MEFs s'évalue de façon générale en niveau de doublement de population, de l'anglais Population Doubling Level (PDL). $PDL = \frac{\log(N_f/N_i)}{\log 2}$, où N_i est le nombre de cellules mises en culture et N_f est le nombre de cellules recueillies au terme du passage. Les niveaux de doublement sont calculés et additionnés à chaque passage afin d'évaluer la prolifération de MEFs en culture au fur et à mesure des passages.

2.8.2. Essais β -GAL

Il est possible de faire cette expérience à l'aide de cellules dans de gros puits mais il est plus facile de le faire avec des cellules déposées sur des lames avec chambres. Il faut faire ces solutions qu'il faut conserver à l'obscurité :

Solution K₃ (100x) : 0,5 M K₃Fe(CN)₆ / H₂O

Solution K₄ (100x) : 0,5 M K₄Fe(CN)₆ / H₂O

X-Gal : X-Gal 1X / solution K₃ 1X / solution K₄ 1X / MgCl₂ 2mM (pH 6)

Solution de fixation : 270 μ L Formaldéhyde (37%), 80 μ L Glutaraldéhyde (50%),
20 μ L Ipegal (Sigma) (10%), 10 mL PBS 1X.

Le milieu de culture est retiré des chambres, celles-ci sont rincées au PBS. La solution de fixation est ajoutée et retirée après 1minute. Il faut ensuite laver 3 fois 15 minutes avec du PBS. La solution X-Gal est appliquée afin de couvrir toute la surface. Il faut laisser la solution réagir dans l'obscurité à 37°C pendant plusieurs heures. Il faut changer la solution X-Gal au besoin si la coloration n'est pas suffisante après 24 heures. Les lames sont rincées au PBS 3 fois et au tampon phosphate (PB) 1 fois. Les chambres sont retirées et scellées.

2.8.3. Analyses statistiques

Les statistiques sur les marquages PhosphoHistoneH3, Caspases-3-activé ou β -Galactosidase positives ont été faites en comparant le nombre de cellules marquées par rapport au nombre de cellules totales constituant cet ensemble (soit une chambre de la lamelle en culture cellulaire, soit l'œil complet sur une coupe d'embryon). Tous les résultats des graphiques sont présentés avec des barres d'erreur équivalent à la moitié de l'écart-type. Les différences statistiques ont été analysées par un T-Test de Student pour des échantillons non appariés où $n > 2$. Ces différences sont significatives lorsque la valeur de $P < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Spécificité de l'anticorps Rae28

Les essais sur l'anticorps Rae28 n'ont pas donné de résultats significatifs. Que ce soit par immunofluorescence, immunohistochimie ou même par Western Blot, l'anticorps Rae28 fourni par Takihara donna des signaux spécifiques chez le mutant $Rae28^{-/-}$ (Figure 14, ci-dessous). L'anti-corps avait peut-être été dégradé lors du transport. Quoique même sur les images des Western Blot envoyées par Dr. Takihara, des bandes non significatives sont visibles avec l' α -Rae28. À partir de celles-ci, il a été possible de conclure qu'une protéine tronquée de Rae28 est probablement exprimée dans le knockout $Rae28^{-/-}$. Celle-ci pourrait avoir une activité résiduelle, mais cela demeure très difficile à évaluer.

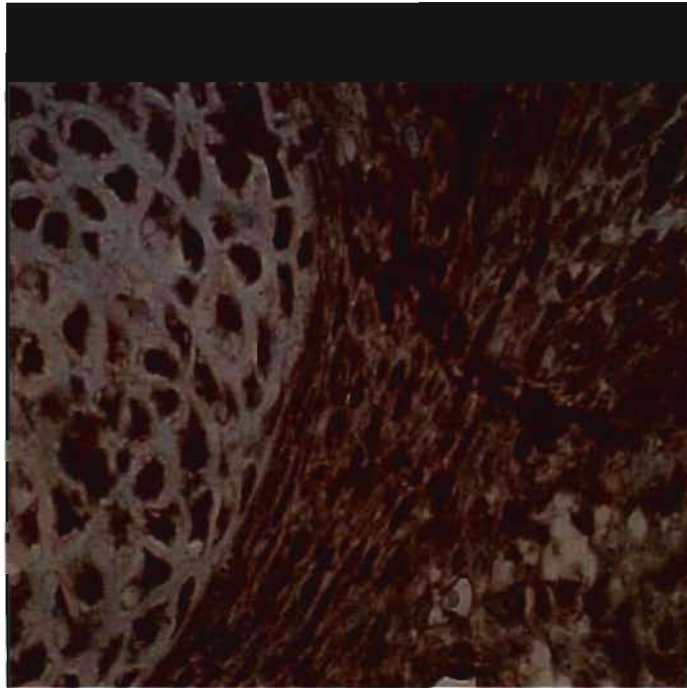


Figure 14 : Immunohistochimie sur des yeux d'embryons $Rae28^{-/-}$ au stade embryonnaire E9,5 avec l'anticorps α -Rae28. On observe certains points spécifiques, provenant certainement d'une protéine Rae28 tronquée et/ou agglomérée.

3.2. Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur l'auto-renouvellement et la prolifération des progéniteurs neuroépithéliaux

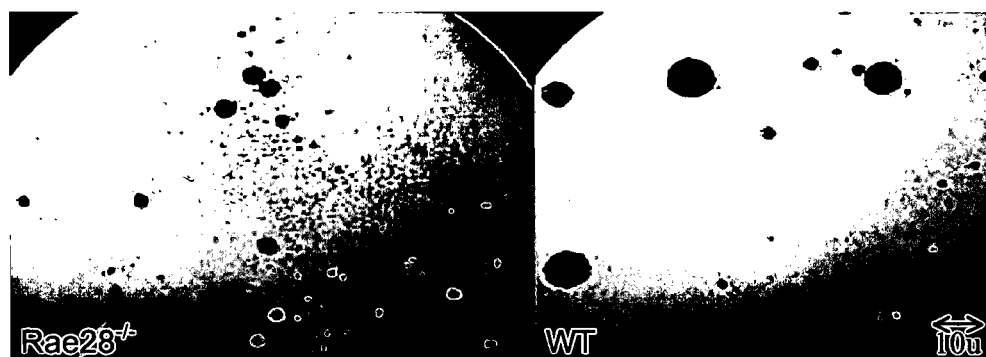


Figure 15 : Culture de neurosphères $Rae28^{-/-}$ et WT au passage 3 après 5 jours d'incubation dans le milieu de culture à 37°C.

Les premières expériences du projet consistaient à faire des cultures de neurosphères, c'est-à-dire de progéniteurs neuroépithéliaux de l'œil qui sont isolés à partir de la vésicule optique de souris [153]. Ces cellules sont isolées à partir d'embryons au stade E9,5, un stade pour lequel les progéniteurs sont encore peu différenciés et multipotents. À chaque passage, il faut évaluer, par le nombre de neurosphères formées, le taux d'auto-renouvellement des progéniteurs. Chacun des progéniteurs, une fois isolé par trituration, proliférera pour donner une neurosphère à lui seul. Par contre, les progéniteurs davantage différenciés n'arriveront pas à proliférer suffisamment pour former une neurosphère puisque ceux-ci adhéreront à la plaque et avanceront dans leurs stades de différenciation. Deux cultures de neurosphères ont été réussites et maintenues jusqu'au passage 5.

La mutation $Rae28^{-/-}$ n'altère pas l'auto-renouvellement des progéniteurs en culture

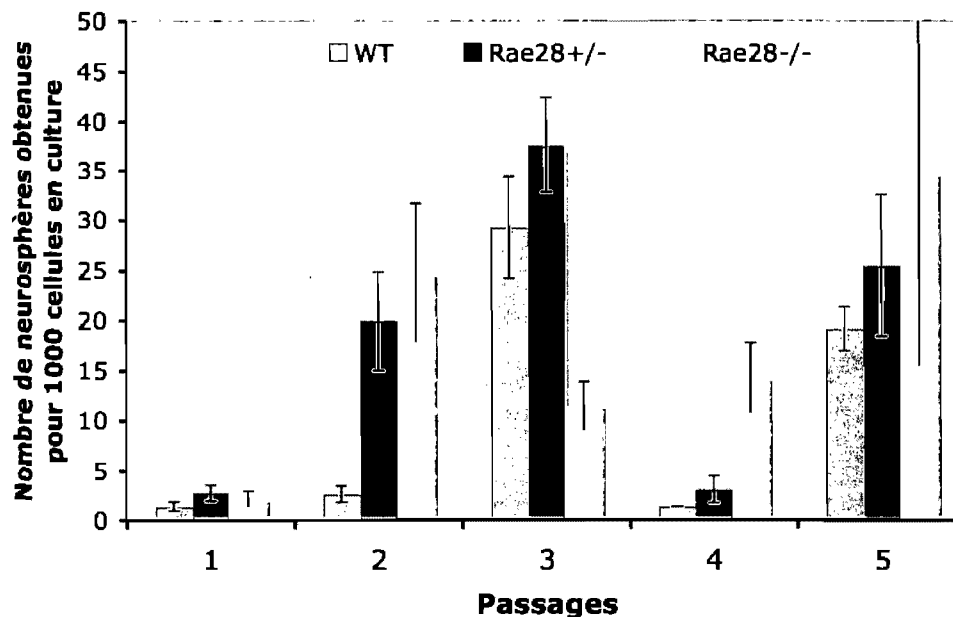


Figure 16 : Nombre de neurosphères répertoriées pour 1000 progéniteurs mis en culture en fonction des génotypes ($Rae28^{-/-}$, $Rae28^{+/-}$, WT). Le comptage se fait à chaque passage, qui ont lieu à tous les 8 jours. (N=2)

Puisque le knockout $Rae28^{-/-}$ démontre une diminution de l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires, neurales et hématopoïétiques, la première hypothèse proposait que la mutation aurait pratiquement le même effet sur les progéniteurs neuroépithéliaux. De plus, le knockout $Bmi1^{-/-}$, un autre polycomb, a comme phénotype de ne pouvoir former de neurosphères, probablement dû à la diminution de l'auto-renouvellement des progéniteurs.

Comme l'histogramme le démontre (Figure 16, ci-dessus), le nombre de neurosphères $Rae28^{-/-}$ obtenues par rapport à celles de type sauvage ne démontre pas de différence significative comme c'est le cas pour $Bmi1^{-/-}$. Par contre, le taux représentant le nombre de neurophères obtenues par 1000 cellules mises en cultures démontre beaucoup de fluctuations en fonction des différents passages, que ce soit pour les WT, les hétérozygotes ou les

homozygotes. Cela pourrait indiquer que la mutation du gène *Rae28* dérégule l'auto-renouvellement des progéniteurs, quoique qu'il aurait fallu davantage d'essais pour démontrer un résultat significatif (N=2).

À l'aide des cultures de neurosphères, le taux de prolifération des progéniteurs de l'œil fut évalué. Il faut savoir que plus une neurosphère est grosse au passage, plus elle contient de cellules, donc plus la prolifération de celles-ci est élevée par rapport à son taux de mort et de différenciation cellulaire.

La mutation *Rae28*^{-/-} n'altère pas la croissance des progéniteurs en culture

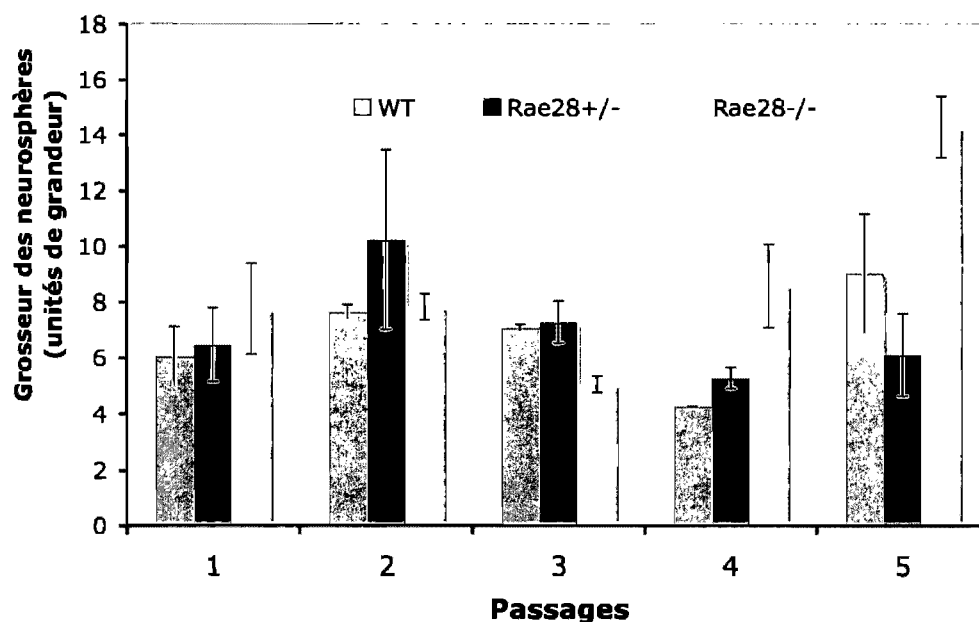


Figure 17 : Grosseur des neurosphères répertoriées en fonction des génotypes (*Rae28*^{-/-}, *Rae28*^{+/-}, WT). Le comptage se fait à chaque passage, tous les 8 jours. La valeur est indiquée en unités de grandeur établies de façon arbitraire (1unité = 13,5 µm). (N=2)

Les cultures de neurosphères n'ont pas permis de mettre à jour une différence significative pour ce qui est de la prolifération des progéniteurs de l'œil (N=2). Tout comme pour l'auto-renouvellement, l'hypothèse proposait une différence importante de prolifération entre les progéniteurs *Rae28*^{-/-} et ceux de type sauvage. Il est possible de remarquer sur l'histogramme (Figure 17, ci-dessus)

que la grosseur des neurosphères fluctue un peu moins que le nombre de neurosphères obtenues (Figure 16, page 40). Une différence est tout de même observable aux passages plus élevés (4 et 5) et pourrait indiquer que les progéniteurs ont plus de facilité à s'adapter à certains stress provenant de la mise en culture (oxydation, lumière, différence de température, trituration). Autant pour ces résultats que ceux précédemment, il aurait fallu un nombre plus élevé de cultures pour permettre de valider des résultats négatifs comme positifs.

3.3. Effet du gène *Rae28* sur l'expression des gènes homeobox

Cette section comporte tous les résultats obtenus lors des expériences portant sur la recherche de nouvelles cibles homéobox possiblement impliquées dans le développement de l'œil.

3.3.1. Effet de la mutation *Rae28*^{-/-} sur l'expression de *Vax2* et de *Pax6* chez les progéniteurs neuroépithéliaux

Les cultures de neurosphères ont permis d'extraire de l'ARN afin d'évaluer, par PCR quantitatives en temps-réel (RT-PCR), la transcription de certains gènes. Il fut possible de comparer les quantités d'ARNm de certains gènes retrouvées dans les cultures de progéniteurs de type sauvage et mutants *Rae28*^{-/-}. Les taux d'ARNm des gènes homéobox associés au développement de l'œil furent analysés, ne donnant pas de résultats significatifs, sauf pour ce qui est de *Pax6* et *Vax2* (Figure 18, page 43)

Ce qu'on peut observer est que la quantité d'ARNm *Vax2* dans les cultures de mutant est 700 fois plus élevée que chez les WT. Bien que le gène *Vax2* soit transcrit chez les progéniteurs pendant le développement de l'œil, il semblerait que la quantité d'ARNm *Vax2* soit minime, dépendamment du stade de développement. Il serait donc difficile de repérer une quantité minimale d'ARNm

Vax2 chez le WT. Il se peut que la transcription de ce gène ou la conservation de l'ARNm soit diminuée par le fait que ces progéniteurs sont en culture.

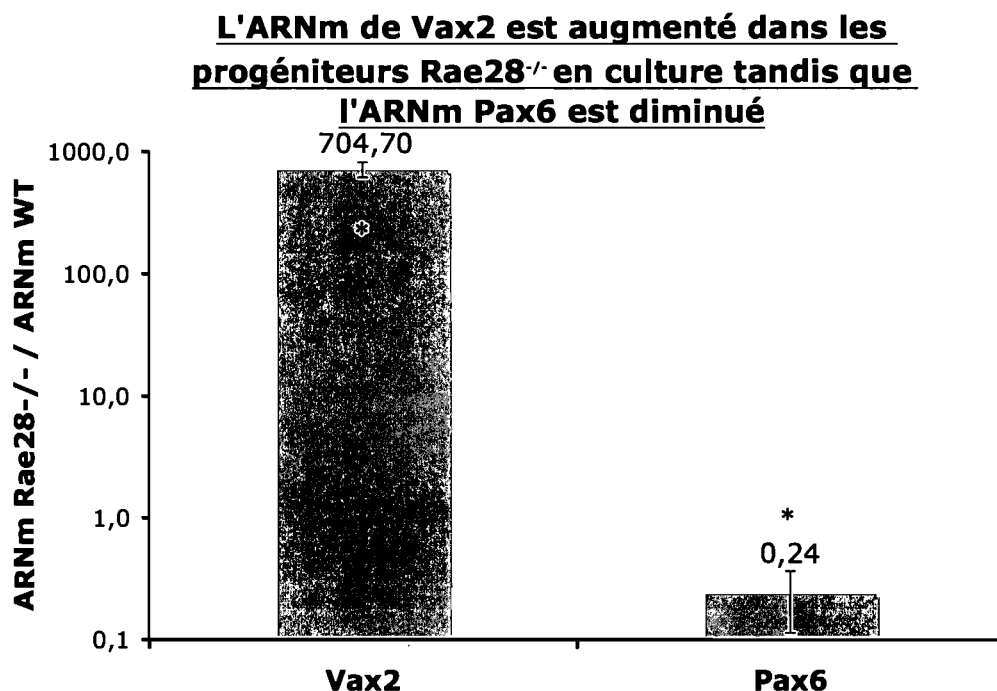


Figure 18 : Taux d'ARNm des gènes Vax2 et Pax6 retrouvés dans les neurosphères en culture. Lorsque la valeur s'approche de 1, cela indique que la quantité d'ARNm est presque identique entre le mutant Rae28^{-/-} et celui de type sauvage. Les extraits de cDNA sont calibrés en fonction de l'ARNm du gène ubiquitaire Hprt (N=3 T-Test : P < 0,05).

Ce qui est remarquable c'est que dans les échantillons d'ARNm provenant des cultures de progéniteurs Rae28^{-/-}, ayant les mêmes conditions que les WT, la quantité d'ARNm de Vax2 est beaucoup plus élevée, donc plus facilement observable en RT-PCR. N'ayant donc aucun ou très peu de signaux pour le WT et un signal très élevé pour le mutant, le ratio des taux d'ARNm donne une valeur relativement impressionnante. Ce genre de résultat, souvent retrouvé dans la littérature, indique que l'ARNm de Vax2 est davantage présent dans le mutant Rae28^{-/-}, ce gène serait donc surexprimé par rapport au WT, chez lequel Vax2 ne serait que très peu exprimé.

Une deuxième observation fut faite à l'aide de ces RT-PCR (Figure 18, page 43), cette fois pour l'ARNm Pax6 qui semble être 4 fois moins présent chez le mutant $Rae28^{-/-}$ que chez le WT. Cette valeur semble être dans des proportions normales, étant donné qu'un signal fut toujours obtenu autant pour le WT que pour le mutant. Ce gène semble réprimé, contrairement à Vax2, chez le mutant $Rae28^{-/-}$ puisque son ARNm est diminué de façon significative par un facteur de 4 par rapport au WT.

3.3.2. Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur l'expression de Vax2 et de Pax6 dans le proencéphale des embryons

Taux d'ARNm de gènes homéobox et polycombs dans le proencéphale d'embryons $Rae28^{-/-}$ par rapport au WT

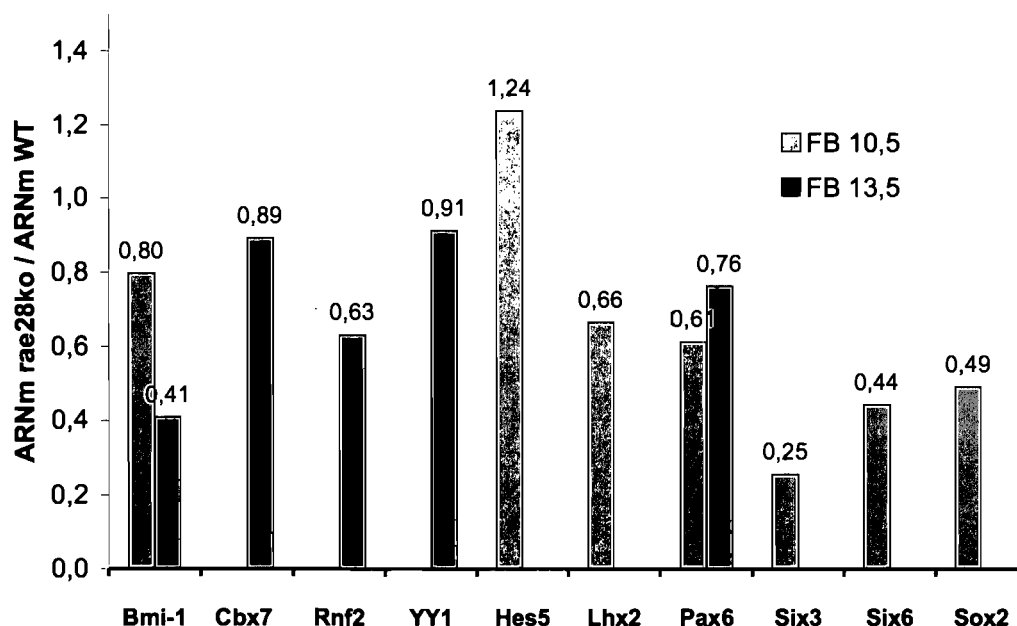


Figure 19 : Taux d'ARNm de certains gènes polycombs et homéobox associés au développement de l'œil et retrouvés dans le proencéphale aux stades E10,5 et E13,5. Lorsque la valeur s'approche de 1, cela indique que la quantité d'ARNm est presque identique entre le mutant $Rae28^{-/-}$ et celui de type sauvage. Les extraits de cDNA sont calibrés en fonction de l'ARNm du gène ubiquitaire Hprt (N=1).

Afin de vérifier In Vivo s'il y a une différence d'expression de certains gènes, l'ARNm de prosencéphales d'embryons WT et *Rae28^{-/-}* fut extrait. Cette partie de la tête correspond à la partie antéro-supérieure de l'encéphale et comprend aussi les yeux en développement. À partir de prosencéphales obtenus à différents stades embryonnaires, des extraits d'ARN furent utilisés afin de comparer l'activation de certains gènes chez le mutant *Rae28^{-/-}* par rapport à celui de type sauvage. Plusieurs gènes polycombs furent analysés afin de voir s'il y avait un effet de compensation du gène manquant.

L'expression de quelques gènes homéobox impliqués dans le développement de l'œil fut analysée (Figure 19, page 44). Comme expliqué précédemment, l'hypothèse de travail proposait de rechercher la surexpression de certains gènes chez le mutant, puisque le polycomb *Rae28* est un répresseur transcriptionnel. Aux résultats préliminaires, aucun des gènes analysés ne pouvait être considéré comme cible directe potentielle de *Rae28*. Dans les extraits de prosencéphale *Rae28^{-/-}*, la totalité des ARNm des gènes polycombs évalués étaient diminués, tout comme les gènes homéobox, excepté *Hes5* qui, quant à lui, démontrait une augmentation non significative avec un taux de 1,24 fois l'ARNm observé chez le WT. Par contre, une observation reflétait les résultats obtenus avec les cultures de progéniteurs, la quantité d'ARNm *Pax6* était diminuée chez le mutant *Rae28^{-/-}* une fois comparée au WT, avec un taux de plus de 1,5 fois moins.

Au même stade embryonnaire (E10,5) où la diminution de *Pax6* est observée, une augmentation de l'ARNm de *Vax2* est aussi visible (figure 20, page 46). Le taux d'ARNm de *Vax2* chez le mutant *Rae28^{-/-}* est 1,42 fois plus élevé par rapport à celui de type sauvage. Par contre, l'augmentation de l'ARNm de *Vax2* chez le mutant *Rae28^{-/-}* semble plus importante à un stade précoce du développement de l'œil (E9-E9,5). Le taux d'ARNm de 1 million fois plus, encore un peu exagéré, pourrait s'expliquer par le fait que la transcription de *Vax2* n'est pas encore totalement initiée dans le prosencéphale WT à ce stade. C'est d'ailleurs à ce stade que l'expression de *Vax2* est initiée normalement.

Ces résultats proposent donc que chez le mutant $Rae28^{-/-}$ l'activation du gène *Vax2* se fasse plus tôt, c'est pourquoi l'ARNm *Vax2* des progéniteurs en culture et dans le proencéphale au stade E9-E9,5 serait plus important comparé aux WT. La surexpression de *Vax2* chez le mutant serait conservée jusqu'au stade E10,5, mais donnerait un résultat en RT-PCR plus modéré dû au début de transcription de *Vax2* chez le WT à partir du stade E9,5.

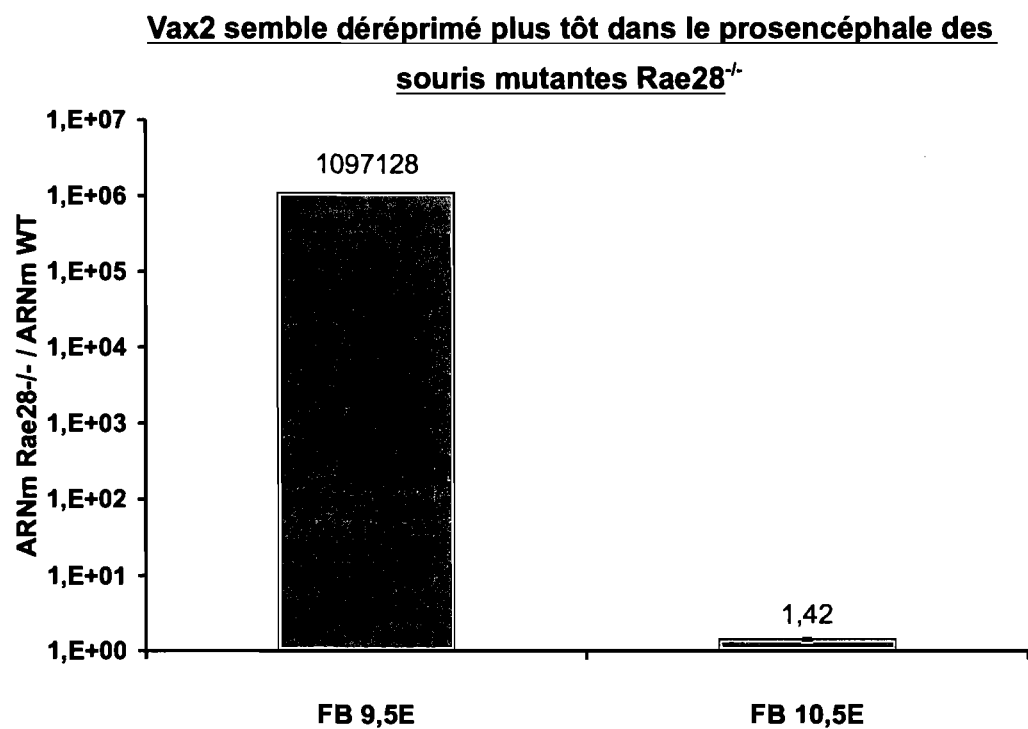
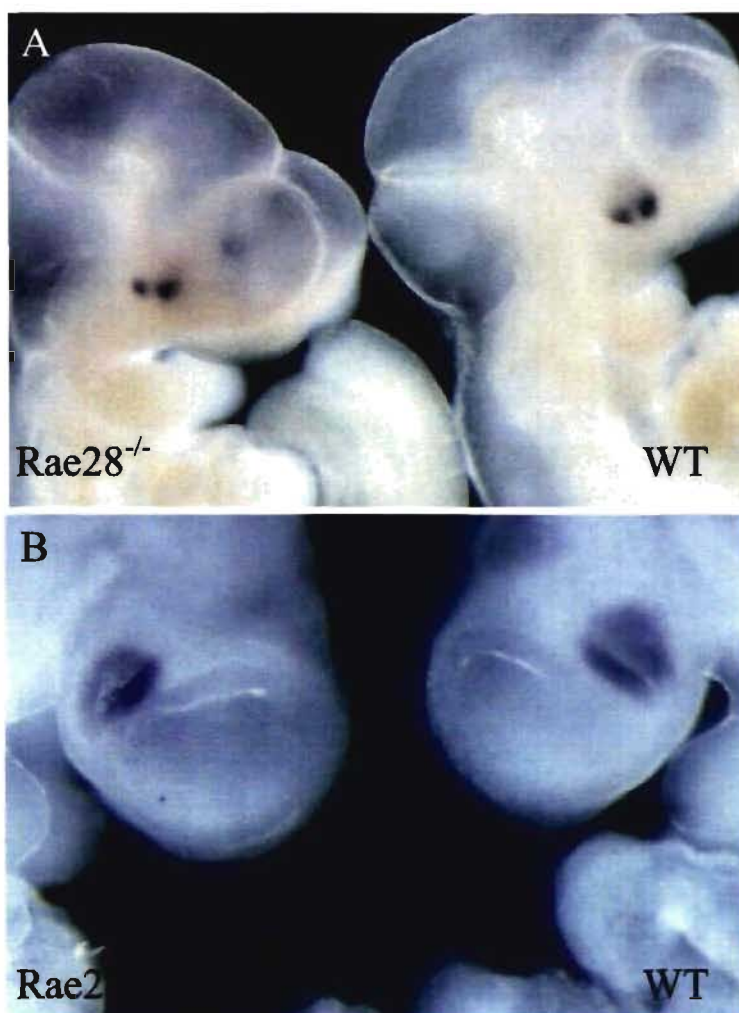


Figure 20 : Taux d'ARNm du gène *Vax2* retrouvés dans les proencéphales aux stades E9,5 et E10,5. Lorsque la valeur s'approche de 1, cela indique que la quantité d'ARNm est presque identique entre le mutant $Rae28^{-/-}$ et celui de type sauvage. Les extraits de cDNA sont calibrés en fonction de l'ARNm du gène ubiquitaire *Hprt* (N=1).

3.3.3. Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur la localisation de l'ARNm $Vax2$ dans la vésicule optique des embryons

Afin de vérifier si l'ARNm de $Vax2$ est surexprimé en général dans le procenséphale $Rae28^{-/-}$ ou seulement dans certaines parties de ce dernier, des hybridations *In Situ* furent effectuées. Cela a permis d'observer à différents stades du développement, la localisation de l'ARNm $Vax2$ dans l'œil.

Les figures 21 (ci-dessous) et 22 (page 48) représentent les résultats obtenus en hybridation *In Situ*, et ce pour les deux stades étudiés, soit E9,5 et E10,5.

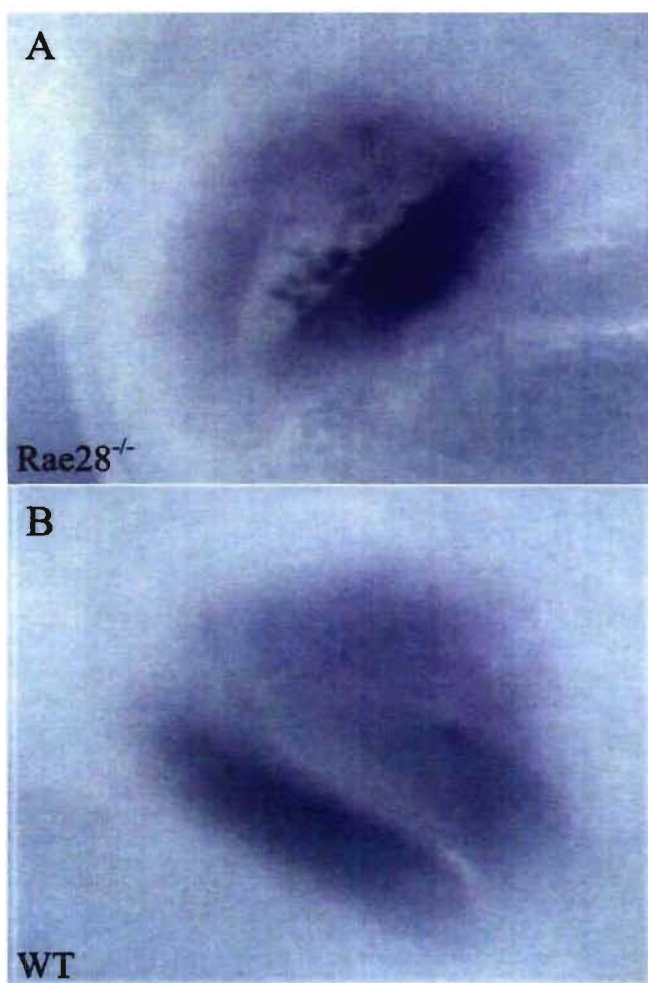


Sur la figure 21 (A), montrant les embryons de souris au stade E10,5, très peu de différences sont observables entre le mutant $Rae28^{-/-}$ et le WT. Cela représente bien les résultats obtenus en RT-PCR pour ce stade.

Les différences semblent toutefois minimales au stade E9,5. Par contre, une fois les photos agrandies, il est possible de voir que le marquage de la sonde est plus important chez le mutant (Figure 22 (A), page 48).

Figure 21 : Localisation de l'ARNm du gène $Vax2$ dans les embryons $Rae28^{-/-}$ et WT par Hybridation *In Situ* Whole Mount. (A) : stade E10,5. (B) : stade E9,5.

De gros points sont aussi observables dans la vésicule optique du mutant. Cela s'expliquerait par une augmentation de l'ARNm Vax2 dans des cellules très spécifiques, par exemple les progéniteurs neuroépithéliaux en prolifération. Il aurait été intéressant de faire la même expérience mais à un stade plus précoce, comme E8,5 ou E9, afin de vérifier si l'activation du gène Vax2 se fait



plus tôt chez l'embryon mutant Rae28^{-/-} par rapport à celui de type sauvage, comme observé en RT-PCR. Bien qu'aucune différence de l'ARNm Vax2 n'ait été observée chez l'embryon Rae28^{-/-} au stade E10,5, il faut remarquer que cet embryon ne semble pas avoir de phénotype de défaut de l'œil. Il aurait fallu faire cette expérience à plusieurs reprises avec d'autres embryons au même stade afin de vérifier avec certitude que l'ARN de Vax2 n'est pas altéré chez le mutant Rae28^{-/-}. Cela aurait aussi permis d'obtenir des résultats plus significatifs.

Figure 22 : Agrandissement des images d'hybridation *In Situ* Whole Mount montrant le marquage de l'ARNm Vax2 dans la vésicule optique des embryons Rae28^{-/-} (A) et WT (B) au stade E9,5.

3.4. Effet du gène Rae28 sur l'expression des gènes du locus Ink4a/Arf

Voici maintenant la deuxième section des résultats du projet de recherche : l'étude d'une autre cible de répression du polycomb Rae28, le locus Ink4a/Arf.

3.4.1. Effet de la mutation Rae28^{-/-} sur les cultures de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs)

Afin de valider l'hypothèse proposant le locus Ink4a/Arf comme cible du polycomb rae28, il était intéressant de vérifier *In vitro* si un effet de diminution de prolifération était observé dans des cultures de fibroblastes embryonnaires (MEFs) des souris mutantes Rae28^{-/-}. Les cultures de MEFs sont largement caractérisées dans la littérature et représentent un bon modèle *In Vitro* de cellule à grande prolifération. Ainsi, il existe plusieurs techniques permettant d'évaluer le taux de prolifération, de sénescence et d'apoptose de ces cellules. À l'inverse, la surexpression de ce gène provoque un phénotype d'immortalité chez les MEFs. L'hypothèse était donc que des effets similaires seraient observables dans les cultures de MEFs Rae28^{-/-}.

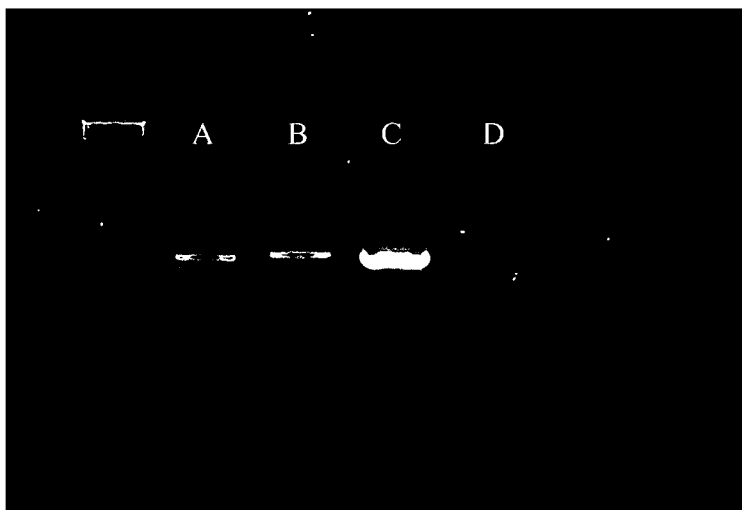


Figure 29 : Présence de l'ARNm Rae28 dans les cultures de MEFs. Analyses faites en RT-PCR. A & B : à partir de cDNA de cultures de MEFs WT passages 3 et 4 respectivement. C : contrôle positif avec cDNA de cultures de Neurosphère WT. D : contrôle négatif à partir d'un volume équivalent d'une RT- faite sur un extrait d'une culture de MEFs WT au passage 4.

Les fibroblastes ne faisant pas partie du système nerveux, il a fallu d'abord vérifier que le gène *Rae28* est transcrit dans les MEFs (Figure 29, page 49). Une fois cette vérification faite, il été possible de comparer les taux d'ARNm de $p16^{Ink4a}$, $p19^{Arf}$ (du locus *Ink4a/Arf*) et $p21^{Cip1}$ (un indicateur de l'activation de la voie p53) des fibroblastes *Rae28*^{-/-} par rapport à ceux de type sauvage, comme cela avait été fait avec les cultures de progéniteurs neuroépithéliaux en essais neurosphères pour les gènes homéobox.

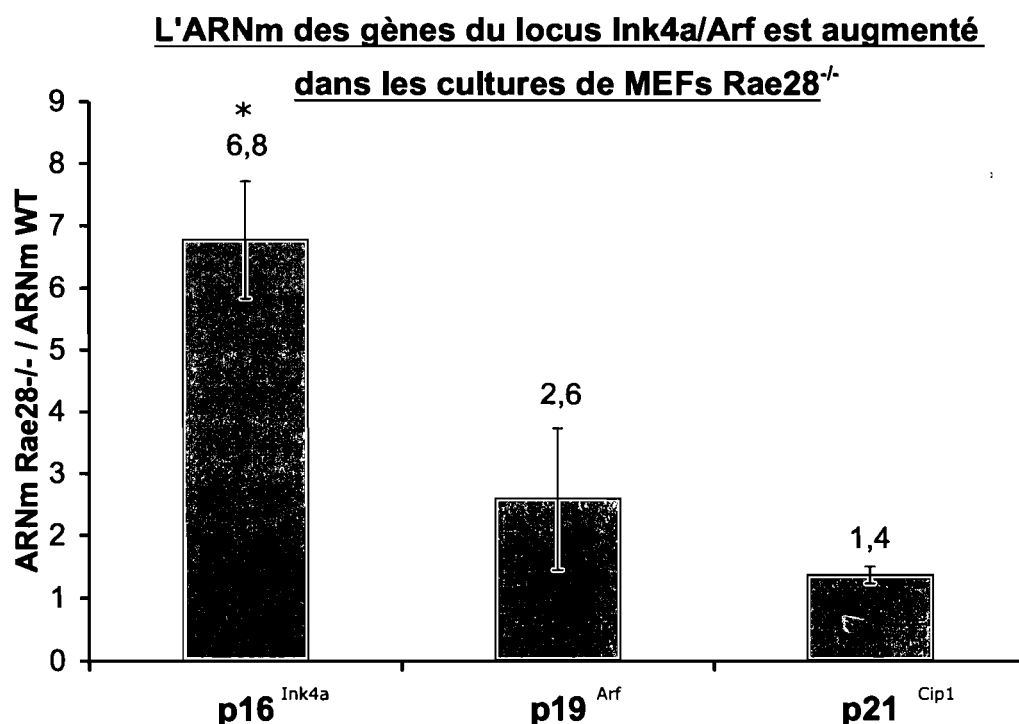


Figure 30 : Taux d'ARNm des gènes $p16^{Ink4a}$, $p19^{Arf}$ et $p21^{Cip1}$ retrouvés dans les MEFs. Lorsque la valeur s'approche de 1, cela indique que la quantité d'ARNm est presque identique entre le mutant *Rae28*^{-/-} et le WT. Les extraits de cDNA sont calibrés en fonction de l'ARNm du gène *Hprt* (N=3) *(T-Test : P < 0,05)

Les RT-PCR en temps réel ont permis d'observer une augmentation de la transcription des gènes $p16^{Ink4a}$, $p19^{Arf}$ et $p21^{Cip1}$ dans les cultures mutantes *Rae28*^{-/-}. Ces résultats démontrent une augmentation de 2,6 fois et de 1,4 fois de l'ARNm des gènes $p19^{Arf}$ et $p21^{Cip1}$, quoique statistiquement non significatifs (T-Test : P = 0,2 et P = 0,08 respectivement). Par contre, l'ARNm $p16^{Ink4a}$ est fortement augmenté (6,8 fois), et ce, de façon significative (T-Test : P = 0,006).

▪ **Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur les cultures des MEFs**

Puisque l'ARNm des gènes $p16^{Ink4a}$ et $p19^{Arf}$ est augmenté dans les mutants $Rae28^{-/-}$, il devient important de vérifier si cela a un effet sur l'état de croissance des cultures de MEFs. Les taux de prolifération des fibroblastes $Rae28^{-/-}$ et WT furent comparés par rapport à ceux de type sauvage.

Les cultures de MEFs $Rae28^{-/-}$ montrent un défaut de prolifération

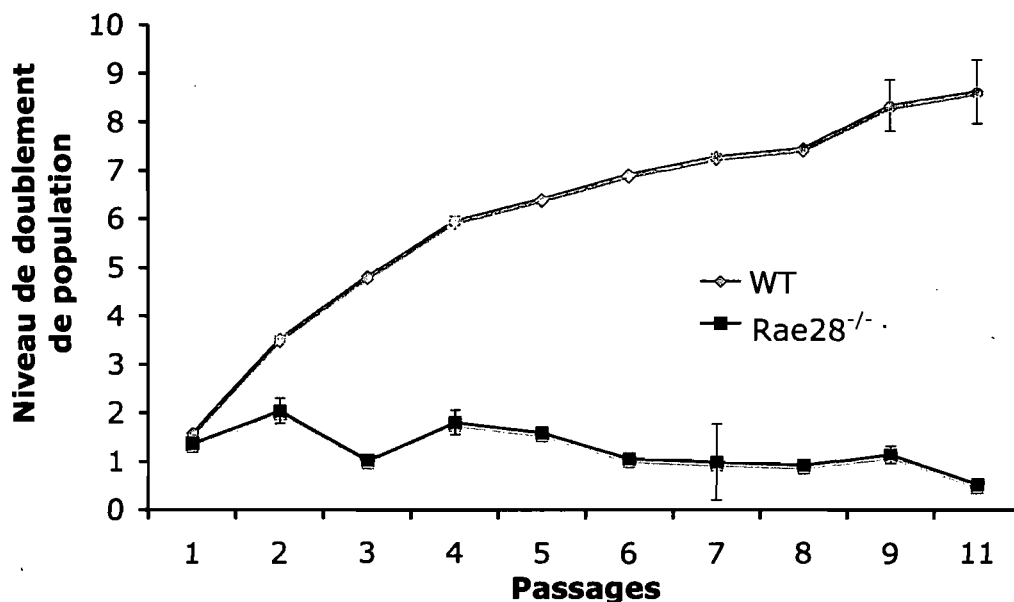


Figure 31 : Niveaux de doublement de population des MEFs en fonction des passages et des géotypes ($Rae28^{-/-}$, $Rae28^{+/+}$, WT). Les comptages sont faits à chaque passage, tous les 2 à 3 jours. La valeur est indiquée en unités de niveau de population. (N=2, T-Test : $P < 0,005$)

À chaque passage, les nombres de fibroblastes finaux (N_f) et initiaux (N_i) obtenus furent comptabilisés afin de calculer la vitesse à laquelle les MEFs WT et $Rae28^{-/-}$ arrivent à doubler leur population. La courbe de croissance (Figure 31, ci-dessus) démontre que les MEFs WT arrivent à doubler à peu près dix fois leur population avant d'atteindre un plateau de prolifération. La comparaison avec les MEFs mutants $Rae28^{-/-}$ est intéressante, ces derniers n'arrivent pas à doubler leur niveau de population, démontrant ainsi un important défaut de prolifération et de maintien de la population.

▪ **Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur la sénescence chez les MEFs**

Cette observation de diminution de population pouvant s'expliquer par plusieurs facteurs, l'évaluation des causes qui pouvaient être liées à la mutation furent analysées. Il fallait savoir, dans un premier temps, si cette diminution de population était due à un effet de sénescence associé à l'activation des gènes du locus *Ink4a/Arf*.

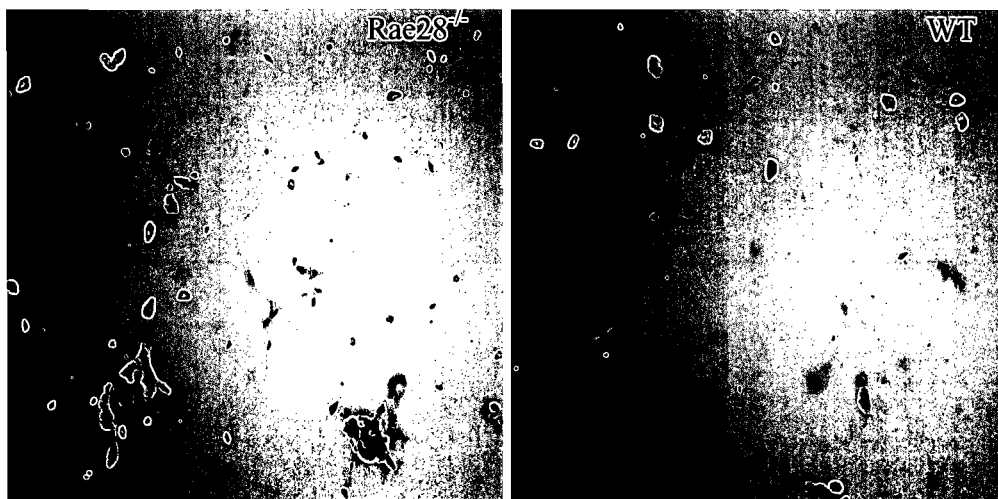


Figure 32 : Essais β -Gal sur des cultures de MEFs $Rae28^{-/-}$ et WT au passage 3. On peut observer la coloration bleue des cellules en sénescence, beaucoup plus importante en nombre et en force chez le mutant. À noter, les points noirs ne sont pas des cellules, mais des cristaux de sels, un artefact.

L'état de sénescence est un arrêt du cycle cellulaire permanent et irréversible de la cellule qui provoque des changements physiologiques des MEFs. Les fibroblastes prennent alors une conformation différente, passant d'une forme fine et allongée à une forme plus grosse et aplatie. Un second effet y est aussi associé, on parle d'une importante activité β -Galactosidase à pH acide de la cellule. Cette observation est facilement mesurable par un essai β -Gal, qui colore les cellules sénescents en bleu (Figure 32, ci-dessus).

**Les MEFs $Rae28^{-/-}$ sont plus sensibles
à la sénescence que les WT**

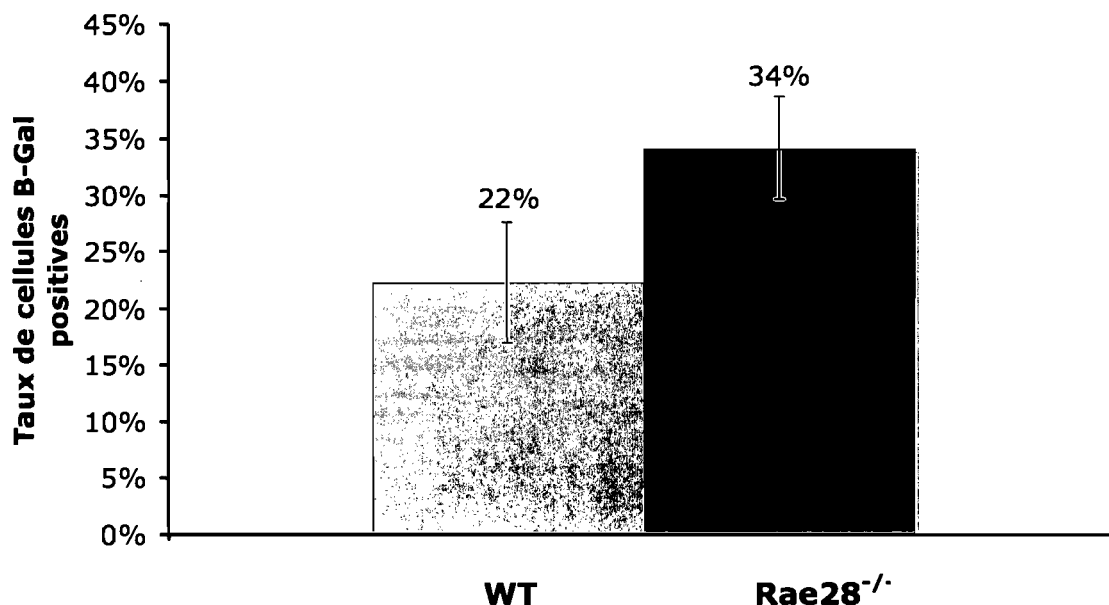


Figure 33 : Pourcentage des fibroblastes en sénescence. Taux calculés sur la moyenne de tous les résultats obtenus pour les passages 2, 6, 7, 9, 10 et 11 (N = 6; T-Test : P < 0,05)

Les résultats obtenus par essais β -Gal démontrent que le pourcentage de fibroblastes en sénescence augmente de 1,5 fois dans les cultures mutantes $Rae28^{-/-}$. Puisque la sénescence est un arrêt du cycle cellulaire, cela correspond à un arrêt de prolifération de presque 35 % des cellules mutantes. Ces résultats expliquent le défaut des MEFs mutants à établir un pool cellulaire. Bien entendu, l'augmentation de sénescence n'est peut-être pas l'unique cause à ce problème. La possible augmentation de la proportion de fibroblastes mutants $Rae28^{-/-}$ entrant en apoptose fut aussi analysée. Malheureusement, aucun résultat significatif, donc d'un marquage spécifique, ne fut obtenu à partir des marquages en IHC et IF avec l'anticorps α -caspases-3-activé, ni même par essais TUNEL sur les cultures de MEFs. Une diminution de la vitesse du cycle cellulaire des MEFs non sénescents pourrait aussi contribuer à la diminution de population.

3.4.2. Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur l'expression des gènes du locus chez les progéniteurs neuroépithéliaux

Maintenant que des résultats démontraient un effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur les cultures de cellules en prolifération (MEFs), il devenait intéressant de les vérifier *In vivo*. Les mêmes analyses de RT-PCR effectuées sur les cultures de MEFs furent utilisées afin d'évaluer les taux d'ARNm des gènes du locus *Ink4a/Arf*.

L'ARNm des gènes du locus *Ink4a/Arf* est augmenté dans les progéniteurs $Rae28^{-/-}$ en culture

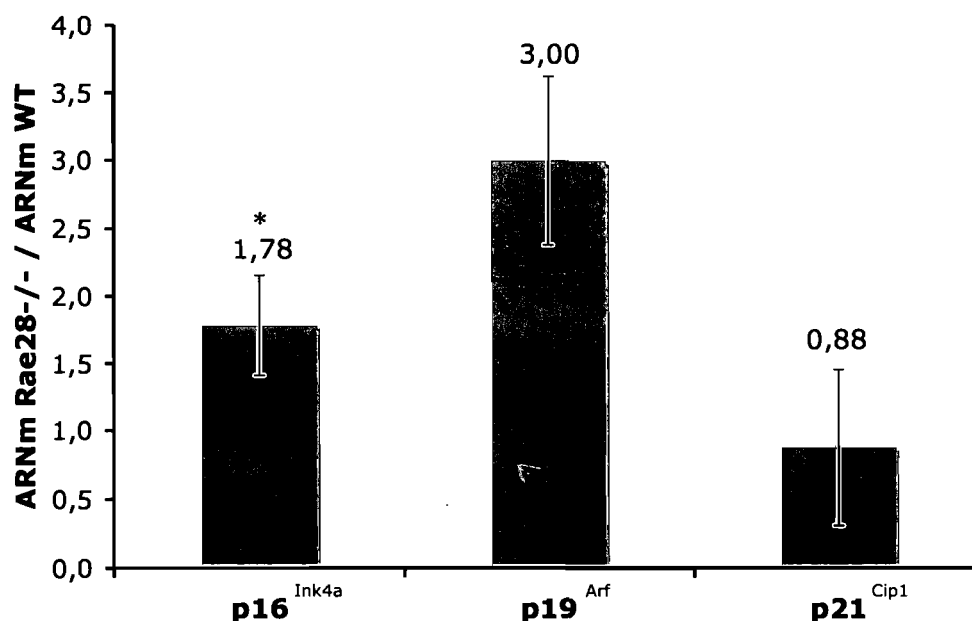


Figure 23 : Taux d'ARNm des gènes $p16^{Ink4a}$, $p19^{Arf}$ et $p21^{Cip1}$ retrouvés dans les progéniteurs neuroépithéliaux en culture (neurosphères). Lorsque la valeur s'approche de 1, cela indique que la quantité d'ARNm est presque identique entre le mutant $Rae28^{-/-}$ et le WT. Les extraits de cDNA sont calibrés en fonction de l'ARNm du gène ubiquitaire *Hprt* (N=3) *(T-Test : $P < 0,05$)

Ces résultats démontrent une augmentation significative ($P < 0,05$) de l'ARNm de $p16^{Ink4a}$ chez les progéniteurs $Rae28^{-/-}$ par rapport à ceux de type sauvage. Pour ce qui est de l'ARNm de $p19^{Arf}$, bien que les résultats démontrent un rapport de 3 fois face aux progéniteurs de type sauvage, celle-ci n'est pas

statistiquement significative ($P = 0,3$). C'est d'ailleurs peut-être pour cette raison qu'aucune différence n'est observée pour l'ARNm $p21^{Cip1}$, ce qui indiquerait que la voie $p19^{Arf}$ n'est pas davantage activée suite à la mutation $Rae28^{-/-}$.

3.4.3. Effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ sur l'expression des gènes du locus $Ink4a/Arf$ dans le prosencéphale des embryons

Des extraits d'ARN de prosencéphales d'embryon de souris au stade E13,5 furent utilisés afin d'analyser la présence de l'ARNm des gènes du locus $Ink4a/Arf$.

Les ARNm de $p16^{Ink4a}$ et de $p19^{Arf}$ sont augmentés dans le prosencéphale des embryons $Rae28^{-/-}$ au stade E13,5

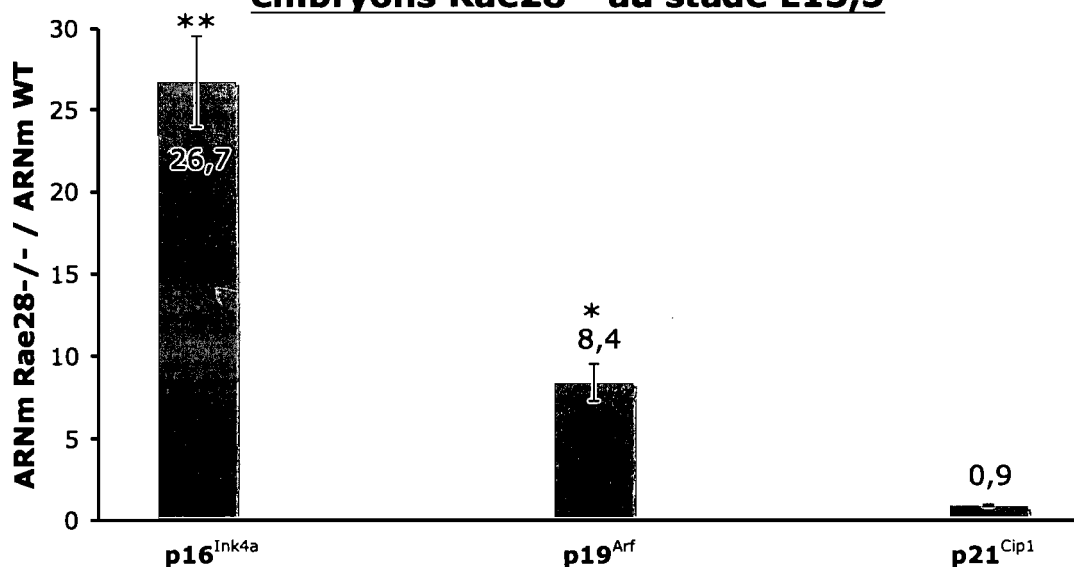


Figure 24 : Taux d'ARNm des gènes $p16^{Ink4a}$, $p19^{Arf}$ et $p21^{Cip1}$ retrouvés dans le prosencéphale d'embryons au stade E13,5. Lorsque la valeur s'approche de 1, cela indique que la quantité d'ARNm est presque identique entre le mutant $Rae28^{-/-}$ et celui de type sauvage. Les extraits de cDNA sont calibrés en fonction de l'ARNm du gène ubiquitaire $Hprt$ ($N=6$) (T-Test : * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$)

Cette expérience fut effectuée avec plusieurs extraits d'ARN différents (N=6) renforçant ainsi la valeur des résultats obtenus (Figure 24, page 55). L'ARNm de p16^{Ink4a} et de p19^{Arf} sont augmentés de façon importante et significative dans le prosencéphale des embryons de souris *Rae28*^{-/-} au stade E13,5 comparé à ceux de type sauvage. Le locus *Ink4a/Arf* serait donc surexprimé dans les mutants *Rae28*^{-/-}, démontrant que ce locus est possiblement une cible de répression du polycomb *Rae28*. Par contre, l'ARNm de p21^{Cip1} semble diminué chez le mutant, quoique cette valeur ne soit pas significative ($P > 0,05$).

3.4.4. Effet de la mutation *Rae28*^{-/-} sur la prolifération des cellules dans l'œil en développement

Afin de valider les résultats démontrant l'activation des deux voies associées au locus *Ink4a/Arf*, il était nécessaire de vérifier leur effet. Ainsi, puisque les gènes de ce locus inhibent le cycle cellulaire, il était attendu de voir une diminution de la prolifération cellulaire des progéniteurs de l'œil en développement chez le mutant *Rae28*^{-/-}. Plusieurs ImmunoHistoChimies (IHC) et ImmunoFluorescences (IF) furent effectuées afin de vérifier le taux de cellules en prolifération dans l'oeil.

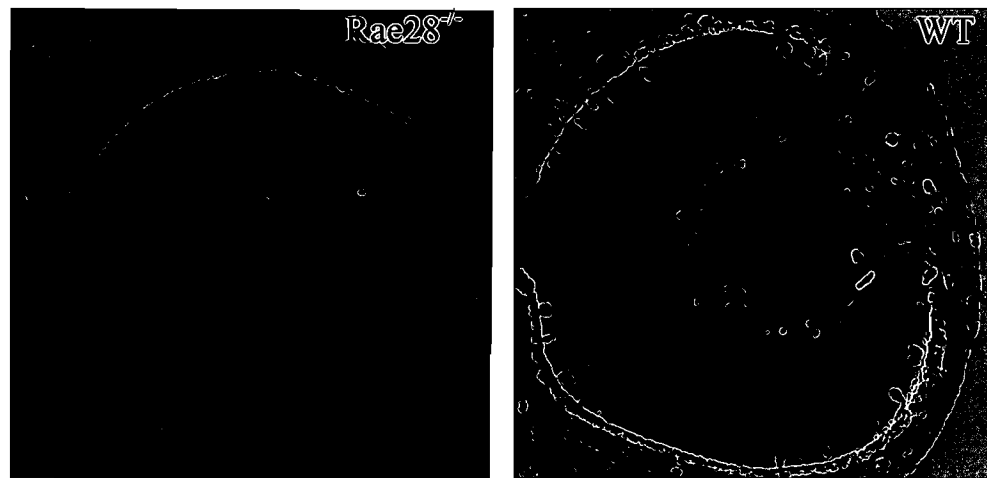


Figure 25 : IHC sur des yeux au stade embryonnaire E13,5 avec un anticorps α -Phospho-Histone-H3 qui marque les cellules en prolifération. Il faut comparer le pourcentage de cellules marquées PH3 positives en fonction du génotype de l'œil (*Rae28*^{-/-} comparé au WT).

En exemple, la figure 25 (page 56) montre une IHC effectuée sur deux yeux ($Rae28^{-/-}$ et WT) au stade E13,5, utilisant un anticorps α -Phospho-Histone-H3 (PH3) qui marque les cellules en mitose. Sur les photos, des différences sont observables entre l'œil mutant et celui de type sauvage. Premièrement, il semble y avoir un phénotype de déformation de l'œil chez le $Rae28^{-/-}$, mais en plus, il y a moins de cellules en mitose (PH3 positives marquées en foncé). Afin de mettre en chiffres ces observations, le nombre de cellules marquées (PH3) par rapport au nombre total de cellules contenues dans l'œil furent comptabilisés. C'est dans la figure 26 ci-dessous que le pourcentage de cellules PH3 positives, un index mitotique démontrant la prolifération des cellules, est comparé entre l'œil mutant $Rae28^{-/-}$ et le WT.

**Le taux de cellules en mitose est diminué dans
l'oeil du mutant $Rae28^{-/-}$ au stade E13,5**

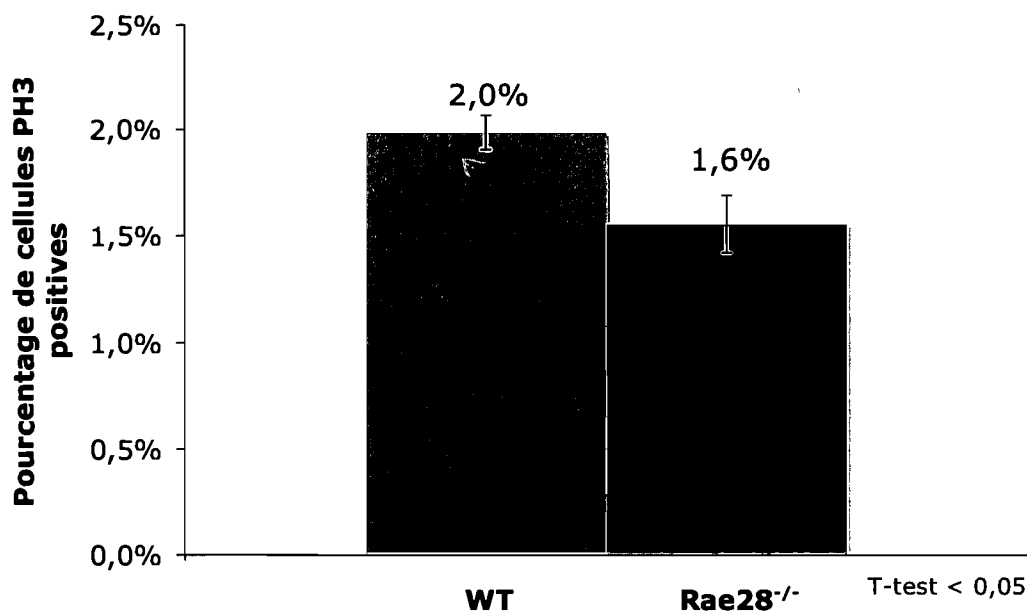


Figure 26 : Pourcentage de cellules marquées par l'anticorps α -PH3 dans l'œil en développement entre les stades E10,5 et E13,5. Cet histogramme permet de comparer le pourcentage de cellules en mitose pour chaque génotype, $Rae28^{-/-}$ et WT. (N=3; T-Test : P < 0,05)

Ces résultats démontrent que le pourcentage de cellules PH3 positives, donc les cellules en prolifération, passe de 2,0 % à 1,6 % dans les embryons de souris mutants *Rae28^{-/-}*. Ces expériences effectuées sur des embryons de stades E10,5 et E13,5 ont donné des résultats significatifs dans les deux cas (T-Test: $p < 0,05$). Ces résultats vont en ligne avec les observations sur l'augmentation de l'ARNm des gènes *p16^{Ink4a}* et *p19^{Arf}* qui proposent un ralentissement ou même l'arrêt du cycle cellulaire.

3.4.5. Effet de la mutation *Rae28^{-/-}* sur l'apoptose des cellules dans l'œil en développement

L'objectif de cette expérience était de vérifier si l'augmentation de l'ARNm des gènes du locus *Ink4a/Arf* pouvait être associée à une augmentation du nombre de cellules en apoptose (mort cellulaire programmée) dans les yeux en développement. Des IHC et des IF ont été effectuées sur des coupes de yeux de souris aux stades de développement E10,5 et E13,5, utilisant un anticorps α -caspase-3-activée. Il faut savoir que l'apoptose nécessite l'activation de plusieurs protéines dont celles de la famille des caspases. La caspase-3, une fois activée, est l'indicateur par excellence pour marquer les cellules qui rentrent en apoptose. Ainsi, lorsqu'une cellule est marquée en IF ou en IHC par l'anticorps α -caspase-3-activé, cela indique que la cellule se dirige vers la mort et donc cessera, entre autres, de contribuer à l'augmentation de la population cellulaire. Ci-dessous (Figure 27), voici deux photos montrant des IF sur des yeux au stade E13,5. Il suffit de comparer celui de type sauvage avec le mutant *Rae28^{-/-}* pour voir que beaucoup plus de cellules sont marquées chez ce dernier (rouge).

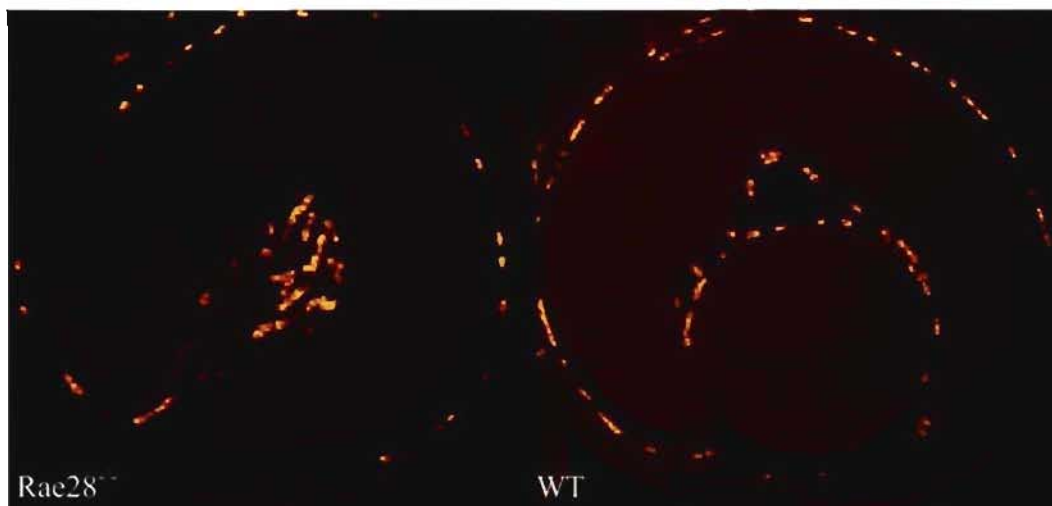


Figure 27 : IF sur des yeux d'embryons au stade embryonnaire E13,5 avec un anticorps α -Caspases-3-activé qui marque les cellules en apoptose (rouge). Un double marquage au BrDU a été fait sur ces mêmes coupes, il sert ici de contrôle négatif pour le marquage Caspase-3. Il faut comparer le taux de cellules marquées en rouge en fonction du génotype de l'œil ($Rae28^{-/-}$ comparé au WT).

Il faut savoir par contre qu'à ce stade de développement de l'œil, il n'y a généralement pas beaucoup de cellules qui rentrent en apoptose chez un embryon WT. L'œil en développement nécessite beaucoup de cellules, donc davantage de prolifération. L'histogramme suivant démontre que le taux de cellules en apoptose dans l'œil normal au stade E13,5 se situe autour de 0,15% (figure 28, page 60). Cet histogramme démontre aussi que ce pourcentage se trouve quintuplé pour ce qui est des yeux $Rae28^{-/-}$. Par contre, cette expérience n'ayant été faite qu'une seule fois, le résultat n'est donc pas significatif.

Le taux de cellules en apoptose est augmenté dans l'oeil des mutants $Rae28^{-/-}$ au stade E13,5

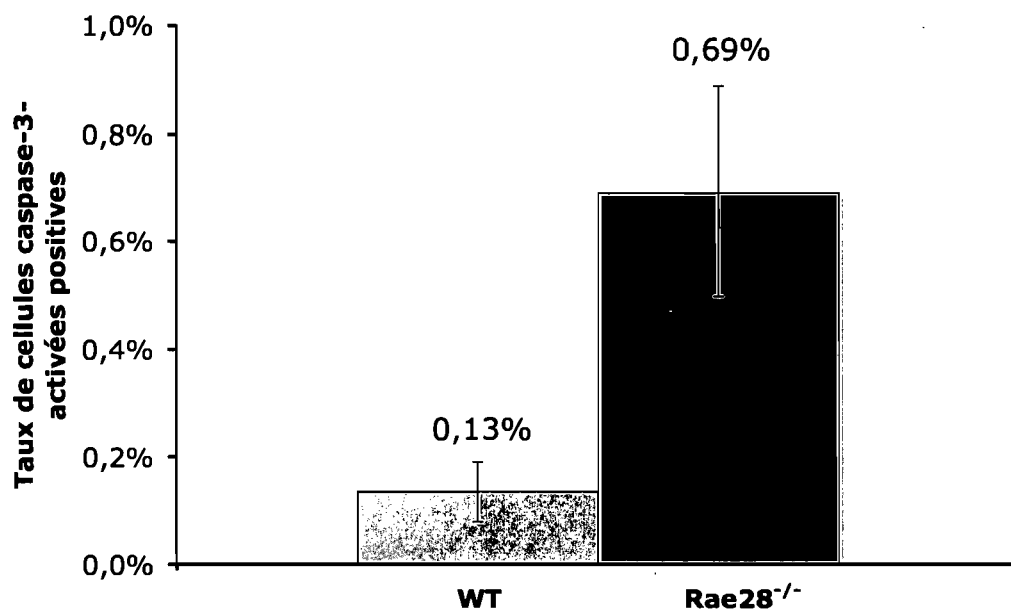


Figure 28 : Pourcentage de cellules marquées par l'anticorps α -caspases-3-activé dans l'œil en développement au stade E13,5. Cet histogramme permet de comparer le pourcentage de cellules en apoptose pour chaque génotype, $Rae28^{-/-}$ et WT. (N=3; T-Test : $P < 0,05$).

4. Discussion

4.1. Les gènes homéobox comme cibles transcriptionnelles de Rae28

La première section des résultats était axée sur l'analyse des gènes homéobox associés au développement de l'œil. Ces analyses ont permis de mettre à jour de nouvelles cibles au polycomb Rae28. L'analyse de l'ARNm contenu dans les cultures de neurosphères a donné un premier résultat significatif : l'augmentation de l'ARNm Vax2 dans les cultures mutantes Rae28^{-/-}. Cette observation, répétée par RT-PCR sur des extraits de procenséphales d'embryons de souris aux stades E9,5 et E10,5, démontre que le gène Vax2 serait une cible transcriptionnelle du polycomb Rae28.

Le premier modèle de cette étude propose que Rae28, par l'entremise des complexes polycomb, permet la répression transcriptionnelle du gène Vax2. Cette répression du gène serait de type tissu-spécifique, et ce, en fonction du stade de développement. Au tout début du développement de l'œil, c'est-à-dire avant le stade embryonnaire de 9,5 jours chez la souris, Vax2 serait totalement réprimé par les polycombs, possiblement avec l'aide d'autres facteurs. Cette inhibition serait ensuite renversée dans des sections spécifiques de l'œil, permettant l'activation du gène Vax2 à l'intérieur de celles-ci. En collaboration avec d'autres facteurs, Vax2 permettrait alors l'initiation de la différenciation des progéniteurs neuroépithéliaux. Avant ce stade de différenciation, les polycombs inhiberaient complètement Vax2 tandis qu'à des stades plus tardifs, leur action répressive serait seulement localisée dans certaines portions de l'œil. Cela explique donc la forte augmentation de l'ARNm Vax2 chez le mutant Rae28^{-/-} au tout début du développement de l'œil. Une différence qui semble moins importante à des stades plus tardifs du développement de l'œil par le fait que normalement l'action inhibitrice des polycombs diminue de façon générale.

De plus, la répression localisée de *Vax2* par les polycombs semble dérégulée chez le mutant *Rae28^{-/-}*. Ce phénotype est observable en hybridation In Situ sur des embryons mutants au stade E9,5, où on observe que l'ARNm *Vax2* semble aggloméré, ou du moins hyper concentré, dans certaines sections de la vésicule optique, et ce, de façon très localisée. Il est par contre difficile de déterminer si la différence d'expression et de localisation de *Vax2* est due à des réarrangements sectoriels des complexes polycombs suite à l'absence de *Rae28*, à un manque de spécificité ou même due à une activité résiduelle du knockout.

Ce modèle impliquant *Rae28* dans le contrôle de l'expression de *Vax2* explique aussi un autre résultat observé, celui de la diminution de l'ARNm *Pax6* chez les progéniteurs neuroépithéliaux *Rae28^{-/-}*. Puisque les polycombs sont des répresseurs, on s'attend normalement d'un tel knockout d'y observer une augmentation de l'ARNm des gènes cibles. Il semble donc plutôt improbable que le gène *Pax6* soit une cible directe du polycomb *Rae28*, puisque l'ARNm de ce gène se trouve diminué chez le mutant *Rae28^{-/-}*. Par contre, la littérature démontre que *Vax2* est non seulement impliqué dans le maintien de l'expression du gène *Pax2* dans la partie ventrale de l'œil, mais aussi que *Vax2* réprime le gène *Pax6* dans cette même région [154]. Les souris *Vax2^{-/-}* démontrent entre autres une surexpression de *Pax6*. Ainsi, lorsqu'il y a dérégulation de *Vax2* chez les progéniteurs neuroépithéliaux *Rae28^{-/-}*, il est normal de s'attendre à une répression du gène *Pax6* puisque l'augmentation de l'expression de *Vax2* mène à une diminution de l'ARNm *Pax6* dans ces progéniteurs. C'est d'ailleurs ce qui est observé en RT-PCR avec les extraits d'ARNm de prosencéphales *Rae28^{-/-}*, mais aussi, et de façon significative, sur les extraits provenant des cultures de neurosphères *Rae28^{-/-}*. Le gène *Pax6* serait donc une cible indirecte du polycomb *Rae28*, par l'entremise de *Vax2*.

Ce premier modèle propose donc que *Vax2* soit une cible transcriptionnelle du polycomb *Rae28*. *Vax2* serait réprimé totalement par la machinerie polycomb dans les premiers stades du développement de la vésicule optique. Ensuite,

cette répression deviendrait davantage sélective en fonction du type cellulaire, et permettrait le bon développement de l'œil par l'entremise de l'activation et la répression de plusieurs autres facteurs importants, comme Pax2 et Pax6. Un défaut dans l'établissement et le maintien de cette répression par les polycombs pourrait provoquer des phénotypes d'anophtalmie et de microphtalmie, tels qu'observés chez le mutant *Rae28^{-/-}*. Par contre, afin de valider scientifiquement si *Vax2* est une cible directe de *Rae28*, il serait essentiel de réaliser des analyses de ChIP.

Il faut aussi se demander si les différences d'expression du gène *Vax2* dans les différentes sections de l'œil en développement sont réellement dues à un réarrangement des complexes polycombs et donc à un changement dans leur spécificité et de leur activité. De plus, il serait intéressant d'évaluer la possible corrélation qu'il peut y avoir entre l'expression de *Vax2* dans ces différentes sections et la présence et la quantité des autres polycombs du complexe PRC1.

4.2. Le locus *Ink4a/Arf*, une cible transcriptionnelle de *Rae28* ?

Le deuxième modèle proposé porte sur les gènes du locus *Ink4a/Arf*, c'est-à-dire *p16^{Ink4a}* et *p19^{Arf}*. Les résultats, effectués en RT-PCR, ont démontré de façon significative que l'ARNm de ces gènes se trouve en quantité supérieure dans les extraits de prosencéphales *Rae28^{-/-}* comparés à ceux de type sauvage. Par contre, l'évaluation du taux d'ARNm *p21^{Cip1}*, un gène faisant partie de la cascade moléculaire menant à l'activation de p53, démontre que la voie *p19^{Arf}* n'est peut-être pas toujours activée malgré la présence élevée de l'ARNm du gène. Toutefois, les analyses In Vivo en IF et IHC ont démontré une augmentation non significative mais tout de même importante du taux de cellules qui entrent en apoptose chez le mutant *Rae28^{-/-}*. Cette augmentation est normalement attribuable à une activation de la protéine p53 par la voie *p19^{Arf}*.

D'autres expériences, entre autres par IHC, ont permis de démontrer une diminution significative du pourcentage de cellules en mitose lors du développement de l'œil chez la souris *Rae28^{-/-}*, et ce, plus précisément entre les stades E10,5 et E13,5. Ces observations permettent de dire que le cycle cellulaire de certaines des cellules *Rae28^{-/-}* est probablement ralenti, voir même arrêté définitivement, on parle dans ce cas précis de sénescence. C'est donc dire que chez la souris mutante *Rae28^{-/-}*, la prolifération des cellules composant l'œil se trouve diminuée, un phénomène pouvant être associé autant à l'activation de la voie *p16^{Ink4a}* que de la voie *p19^{Arf}*.

Ce modèle propose donc que les gènes *p16^{Ink4a}* et *p19^{Arf}* du locus *Ink4a/Arf* soient des cibles transcriptionnelles du polycomb *Rae28*. Comme pour *Vax2*, il serait nécessaire d'analyser par ChIP si ces gènes sont des cibles directes du polycomb *Rae28*. Le modèle suggère donc que ce gène, par l'entremise des complexes polycomb, permette le maintien, ou du moins le contrôle de l'état prolifératif de certaines cellules de l'œil en développement, dont, entre autres, les progéniteurs neuroépithéliaux. Ce maintien de l'état de prolifération serait effectué par la répression des gènes du locus *Ink4a/Arf*, donc par l'inhibition de leur voie respective, ce qui permettrait ainsi d'établir et de conserver un bassin de progéniteurs neuroépithéliaux fort nécessaire au développement de l'œil.

Les études de RT-PCR sur les cultures de neurosphères démontrent une augmentation importante des quantités d'ARNm *p16^{Ink4a}* et *p19^{Arf}* dans les progéniteurs neuroépithéliaux *Rae28^{-/-}* par rapport à ceux de type sauvage. Ces observations vont dans le même sens que le modèle, mais ne sont pas supportées par une diminution de la prolifération et d'auto-renouvellement des progéniteurs. Effectivement, les résultats ne démontrent aucune différence significative en ce qui attrait à la prolifération ou l'auto-renouvellement des cultures de neurosphères. Ce phénomène s'explique d'une manière conjointe avec le premier modèle proposé. Tout d'abord, il fut démontré dans la littérature que les neurosphères mutantes *Pax6^{-/-}* ont des taux de prolifération et d'auto-renouvellement supérieurs à celles de type sauvage [155].

Pax6 est un activateur de p16^{Ink4a} et de p19^{Arf}, donc selon ce modèle, un antagoniste de Rae28. Ainsi, dans les neurosphères mutantes Rae28^{-/-}, il y aurait deux voies en opposition : celle de Vax2/Pax6 et celle du locus Ink4a/Arf. Dans ces progéniteurs Rae28^{-/-}, Vax2 étant surexprimé, il y aura alors diminution de l'expression de Pax6, quoique moins déterminante que dans le knockout Pax6^{-/-}, donnant toutefois comme premier résultat une augmentation de la prolifération et de l'auto-renouvellement des cellules. D'un autre côté, les résultats démontrent que Rae28 réprime le locus Ink4a/Arf. Chez le knockout Rae28^{-/-}, il y aura donc une augmentation des gènes p16^{Ink4a} et p19^{Arf}, elle-même associée à un ralentissement du cycle cellulaire. Ainsi, la mutation Rae28^{-/-} active d'un côté (Pax6 par Vax2) et inhibe de l'autre (Ink4a/Arf) la prolifération des progéniteurs en culture, donnant en somme d'équation un effet équilibré presque nul.

Ce modèle, démontrant l'implication du polycomb Rae28 dans la répression des gènes du locus Ink4a/Arf, est aussi confirmé par les résultats des cultures de fibroblastes. Les analyses en RT-PCR ont démontrées une augmentation importantes des quantités d'ARNm p16^{Ink4a}, p19^{Arf} et p21^{Cip1} des cultures de MEFs Rae28^{-/-} par rapport à celles de type sauvage. Cette observation, étant associée à une dérèpression du locus Ink4a/Arf, expliquerait le défaut de ces cultures à proliférer. Une augmentation des gènes p16^{Ink4a} et p19^{Arf} aura comme effet de ralentir le cycle cellulaire des fibroblastes en culture ou même de les faire passer en sénescence. C'est d'ailleurs un phénotype qui est observé dans les cultures de MEFs mutants Rae28^{-/-} où le taux de cellules en sénescence passe de 22% à 35% pour celles mutantes, soit une augmentation de 1,5 fois le taux normal. L'augmentation de l'ARNm de p21^{Cip1} dans les MEFs Rae28^{-/-} par rapport à ceux de type sauvage est aussi un indicateur de l'activation de la voie p53 menant à l'arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'à l'apoptose. Bien qu'aucun résultat ne prouve une augmentation de l'apoptose des fibroblastes mutantes en culture, les courbes de croissance indiquent un problème important en ce qui attrait au maintien de cette population.

L'effet de la mutation $Rae28^{-/-}$ semble beaucoup plus important pour les cultures de MEFs que dans celles de progéniteurs neuroépithéliaux. Cela peut s'expliquer par le fait qu'aucun autre système ou voie antagoniste ne viendra contrebalancer l'effet de la surexpression du locus $Ink4a/Arf$, comme c'est le cas avec les progéniteurs neuroépithéliaux $Rae28^{-/-}$ par la dépression de $Vax2$ et l'inhibition de $Pax6$. Une façon efficace de vérifier ce modèle serait de croiser des souris $Ink4a^{-/-}$ avec des souris $Rae28^{-/-}$ afin d'observer si les effets de la surexpression du locus $Ink4a$ disparaissent dans ce double knockout. De cette façon, on s'attendrait à obtenir une croissance plus importante des progéniteurs neuroépithéliaux comme observé dans les cultures $Pax6^{-/-}$. Par le même principe, ce double mutant permettrait de rétablir le défaut de croissance qu'ont les MEFs knockout $Rae28^{-/-}$.

4.3. Locus $Ink4a/Arf$ et $Vax2$: des modèles complémentaires...

Ces deux modèles démontrent de nouvelles cibles transcriptionnelles du polycomb $Rae28$. Ces cibles faisant partie de familles de gènes différentes, ces résultats confirment les multiples implications possibles des gènes polycomb lors du développement de l'oeil. De plus, ces modèles démontrent la grande variété des cibles de répression transcriptionnelle des protéines polycomb lors de l'embryogenèse. Il reste par contre beaucoup à apprendre sur la spécificité des polycombs pour leurs divers gènes cibles. Comment des polycombs se retrouvant dans les mêmes complexes protéiques peuvent-ils agir sur l'expression de gènes cibles communs tout en ayant leurs propres cibles spécifiques mais des mécanismes d'action similaires et complémentaires ? Par exemple, $Rae28$ semble inhiber le locus $Ink4a/Arf$ tout comme $Bmi1$ le fait, mais leur knockout respectif n'a pas le même effet sur la prolifération des progéniteurs neuroépithéliaux. Est-ce dû à la répression de $Vax2$ par $Rae28$? Peut-être, mais encore une fois, comment ces gènes, $Rae28$ et $Bmi1$, font-ils pour inhiber des cibles différentes tout en ayant des activités complémentaires ?

La réponse à cette énigme proviendra sans aucun doute de l'étude plus approfondie des mécanismes de régulation des polycombs et de leurs mécanismes d'actions. Bien qu'il semblerait que la diminution d'accessibilité à la chromatine est le mécanisme le plus probable de l'activité répressive des polycombs, rien n'est encore tout à fait confirmé. Certains se posent comme question : la condensation de la chromatine est-elle vraiment la cause de la répression transcriptionnelle ? ou à l'inverse, l'inactivation de la transcription résulte-t-elle en la condensation de la chromatine ?

Il demeure toujours possible que toutes ces altérations de la chromatine et la distribution des polycombs ne servent qu'à permettre la dernière étape du processus. Il se peut par exemple que cette dernière étape soit l'ubiquitination ou la méthylation de certaines protéines de la machinerie transcriptionnelle par Ring, Psc ou E(Z).

Finalement, bien qu'il reste énormément à découvrir sur le mécanisme de répression des polycombs, un point important demeure : les complexes PRC1 et PRC2 semblent toujours communiquer l'un avec l'autre. Leur interdépendance et leur flexibilité est sans aucun doute la clé qui permettra de mieux comprendre comment ce système PcG arrive à s'adapter à toutes les étapes du développement [156].

4.4. Conclusion

Les deux hypothèses avancées au début de ce mémoire se sont avérées passablement confirmées. Par ces résultats, il a été démontré que Rae28 intervient lors du développement de l'œil sur diverses cibles transcriptionnelles. Certains gènes homéobox comme Pax6 et Vax2 seraient donc influencés pendant ces étapes du développement par le polycomb Rae28. Une diminution de l'expression de ce gène provoquerait l'augmentation de l'ARNm Vax2 et par le fait même une diminution de l'ARNm Pax6. Cette diminution ferait en sorte d'augmenter le pouvoir prolifératif des progéniteurs neuroépithéliaux. Cette surprolifération serait par contre contrebalancée par l'augmentation de l'expression des gènes p16^{Ink4a} et p19^{Arf}. Il fut effectivement démontré dans ce mémoire que ces gènes sont des cibles transcriptionnelles du polycomb Rae28. La surexpression des gènes du locus Ink4a/Arf provoquerait chez les fibroblastes embryonnaires de souris Rae28^{-/-} une augmentation du niveau de cellule en sénescence et un défaut de prolifération des cultures.

Ces résultats viennent mettre à jour de nouvelles cibles transcriptionnelles du polycomb Rae28. Ces nouvelles cibles transcriptionnelles font augmenter la longue liste de gènes déjà connus qui, un jour, permettra de connaître précisément les mécanismes d'action de la grande famille des gènes polycombs.

Finalement, l'augmentation des connaissances sur le développement de l'œil et la régulation des cellules qui le composent permettra de plus en plus l'élaboration et l'amélioration des techniques de thérapies cellulaires afin de guérir certaines maladies de l'oeil chez l'Homme.

5. Références

1. Halder, G., P. Callaerts, and W.J. Gehring, *New perspectives on eye evolution*. *Curr Opin Genet Dev*, 1995. **5**(5): p. 602-9.
2. Zuker, C.S., *On the evolution of eyes: would you like it simple or compound?* *Science*, 1994. **265**(5173): p. 742-3.
3. Nilsson, D.E., *Eye ancestry: old genes for new eyes*. *Curr Biol*, 1996. **6**(1): p. 39-42.
4. Oliver, G. and P. Gruss, *Current views on eye development*. *Trends Neurosci*, 1997. **20**(9): p. 415-21.
5. Lupo, G., et al., *Homeobox genes in the genetic control of eye development*. *Int J Dev Biol*, 2000. **44**(6): p. 627-36.
6. Harada, T., C. Harada, and L.F. Parada, *Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye*. *Genes Dev*, 2007. **21**(4): p. 367-78.
7. 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.
8. Hirsch, N. and W.A. Harris, *Xenopus Pax-6 and retinal development*. *J Neurobiol*, 1997. **32**(1): p. 45-61.
9. Ton, C.C., et al., *Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region*. *Cell*, 1991. **67**(6): p. 1059-74.
10. Quiring, R., et al., *Homology of the eyeless gene of Drosophila to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans*. *Science*, 1994. **265**(5173): p. 785-9.
11. 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.
12. Desplan, C., *Eye development: governed by a dictator or a junta?* *Cell*, 1997. **91**(7): p. 861-4.
13. Torres, M., E. Gomez-Pardo, and P. Gruss, *Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory*. *Development*, 1996. **122**(11): p. 3381-91.
14. Ekker, S.C., et al., *Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain*. *Curr Biol*, 1995. **5**(8): p. 944-55.
15. Macdonald, R., et al., *Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes*. *Development*, 1995. **121**(10): p. 3267-78.
16. Simeone, A., et al., *A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo*. *Embo J*, 1993. **12**(7): p. 2735-47.
17. Burmeister, M., et al., *Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation*. *Nat Genet*, 1996. **12**(4): p. 376-84.
18. Liu, I.S., et al., *Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer*. *Neuron*, 1994. **13**(2): p. 377-93.
19. 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.

20. Lupo, G., W.A. Harris, and K.E. Lewis, *Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2006. 7(2): p. 103-14.
21. Bailey, T.J., et al., *Regulation of vertebrate eye development by Rx genes*. Int J Dev Biol, 2004. 48(8-9): p. 761-70.
22. Lang, R.A., *Pathways regulating lens induction in the mouse*. Int J Dev Biol, 2004. 48(8-9): p. 783-91.
23. Dwivedi, D.J., et al., *Targeted deletion of AP-2alpha leads to disruption in corneal epithelial cell integrity and defects in the corneal stroma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. 46(10): p. 3623-30.
24. Morgenbesser, S.D., et al., *p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens*. Nature, 1994. 371(6492): p. 72-4.
25. West-Mays, J.A., et al., *AP-2alpha transcription factor is required for early morphogenesis of the lens vesicle*. Dev Biol, 1999. 206(1): p. 46-62.
26. Bultman, S., et al., *A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes*. Mol Cell, 2000. 6(6): p. 1287-95.
27. Furuta, Y. and B.L. Hogan, *BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo*. Genes Dev, 1998. 12(23): p. 3764-75.
28. Gregg, R.G., et al., *Positional cloning of the young mutation identifies an essential role for the Brahma chromatin remodeling complex in mediating retinal cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(11): p. 6535-40.
29. Kamachi, Y., et al., *Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction*. Development, 1998. 125(13): p. 2521-32.
30. Stopka, T. and A.I. Skoultchi, *The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(24): p. 14097-102.
31. Taranova, O.V., et al., *SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence*. Genes Dev, 2006. 20(9): p. 1187-202.
32. Yang, Y., et al., *Regulation of alphaA-crystallin via Pax6, c-Maf, CREB and a broad domain of lens-specific chromatin*. Embo J, 2006. 25(10): p. 2107-18.
33. Cepko, C.L., *The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates*. Curr Opin Neurobiol, 1999. 9(1): p. 37-46.
34. Hatakeyama, J. and R. Kageyama, *Retinal cell fate determination and bHLH factors*. Semin Cell Dev Biol, 2004. 15(1): p. 83-9.
35. Marquardt, T. and P. Gruss, *Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all*. Trends Neurosci, 2002. 25(1): p. 32-8.
36. Peters, M.A. and C.L. Cepko, *The dorsal-ventral axis of the neural retina is divided into multiple domains of restricted gene expression which exhibit features of lineage compartments*. Dev Biol, 2002. 251(1): p. 59-73.
37. McLaughlin, T., R. Hindges, and D.D. O'Leary, *Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain*. Curr Opin Neurobiol, 2003. 13(1): p. 57-69.
38. Hatini, V., W. Tao, and E. Lai, *Expression of winged helix genes, BF-1 and BF-2, define adjacent domains within the developing forebrain and retina*. J Neurobiol, 1994. 25(10): p. 1293-309.
39. Zhang, X.M. and X.J. Yang, *Temporal and spatial effects of Sonic hedgehog signaling in chick eye morphogenesis*. Dev Biol, 2001. 233(2): p. 271-90.

40. Koshiba-Takeuchi, K., et al., *Tbx5 and the retinotectum projection*. Science, 2000. **287**(5450): p. 134-7.
41. Mui, S.H., et al., *The homeodomain protein Vax2 patterns the dorsoventral and nasotemporal axes of the eye*. Development, 2002. **129**(3): p. 797-804.
42. Pirrotta, V., *Chromatin-silencing mechanisms in Drosophila maintain patterns of gene expression*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 314-8.
43. Paro, R., *Propagating memory of transcriptional states*. Trends Genet, 1995. **11**(8): p. 295-7.
44. Paro, R., *Imprinting a determined state into the chromatin of Drosophila*. Trends Genet, 1990. **6**(12): p. 416-21.
45. Kennison, J.A. and J.W. Tamkun, *Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 8136-40.
46. Beachy, P.A., S.L. Helfand, and D.S. Hogness, *Segmental distribution of bithorax complex proteins during Drosophila development*. Nature, 1985. **313**(6003): p. 545-51.
47. Duncan, I.M., *Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of Drosophila melanogaster*. Genetics, 1982. **102**(1): p. 49-70.
48. Dura, J.M., et al., *A complex genetic locus, polyhomeotic, is required for segmental specification and epidermal development in D. melanogaster*. Cell, 1987. **51**(5): p. 829-39.
49. Lewis, E.B., *A gene complex controlling segmentation in Drosophila*. Nature, 1978. **276**(5688): p. 565-70.
50. Simon, H., A. Hornbruch, and A. Lumsden, *Independent assignment of antero-posterior and dorso-ventral positional values in the developing chick hindbrain*. Curr Biol, 1995. **5**(2): p. 205-14.
51. Struhl, G., *A gene product required for correct initiation of segmental determination in Drosophila*. Nature, 1981. **293**(5827): p. 36-41.
52. Struhl, G. and M. Akam, *Altered distributions of Ultrabithorax transcripts in extra sex combs mutant embryos of Drosophila*. Embo J, 1985. **4**(12): p. 3259-64.
53. Struhl, G. and R.A. White, *Regulation of the Ultrabithorax gene of Drosophila by other bithorax complex genes*. Cell, 1985. **43**(2 Pt 1): p. 507-19.
54. Akasaka, T., et al., *MBLR, a new RING finger protein resembling mammalian Polycomb gene products, is regulated by cell cycle-dependent phosphorylation*. Genes Cells, 2002. **7**(8): p. 835-50.
55. Voncken, J.W., et al., *Chromatin-association of the Polycomb group protein BMI1 is cell cycle-regulated and correlates with its phosphorylation status*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 24): p. 4627-39.
56. Saurin, A.J., et al., *The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain*. J Cell Biol, 1998. **142**(4): p. 887-98.
57. Klymenko, T. and J. Muller, *The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins*. EMBO Rep, 2004. **5**(4): p. 373-7.

58. Poux, S., et al., *The Drosophila trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing*. Development, 2002. **129**(10): p. 2483-93.
59. Struhl, G. and D. Brower, *Early role of the esc⁺ gene product in the determination of segments in Drosophila*. Cell, 1982. **31**(1): p. 285-92.
60. Paro, R. and D.S. Hogness, *The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(1): p. 263-7.
61. Campbell, R.B., et al., *Genetic interactions and dosage effects of Polycomb group genes of Drosophila*. Mol Gen Genet, 1995. **246**(3): p. 291-300.
62. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(1): p. 9-22.
63. Schoorlemmer, J., et al., *Ring1A is a transcriptional repressor that interacts with the Polycomb-M33 protein and is expressed at rhombomere boundaries in the mouse hindbrain*. Embo J, 1997. **16**(19): p. 5930-42.
64. Satijn, D.P., et al., *RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 4105-13.
65. Cohen, K.J., et al., *Transformation by the Bmi-1 oncoprotein correlates with its subnuclear localization but not its transcriptional suppression activity*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5527-35.
66. Rastelli, L., C.S. Chan, and V. Pirrotta, *Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and Polycomb group proteins in Drosophila and their dependence on Enhancer of zeste function*. Embo J, 1993. **12**(4): p. 1513-22.
67. Franke, A., et al., *Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of Drosophila melanogaster*. Embo J, 1992. **11**(8): p. 2941-50.
68. Satijn, D.P. and A.P. Otte, *Polycomb group protein complexes: do different complexes regulate distinct target genes?* Biochim Biophys Acta, 1999. **1447**(1): p. 1-16.
69. Gunster, M.J., et al., *Identification and characterization of interactions between the vertebrate polycomb-group protein BMI1 and human homologs of polyhomeotic*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(4): p. 2326-35.
70. Nomura, M., Y. Takihara, and K. Shimada, *Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: one of the early inducible clones encodes a novel protein sharing several highly homologous regions with a Drosophila polyhomeotic protein*. Differentiation, 1994. **57**(1): p. 39-50.
71. Hemenway, C.S., B.W. Halligan, and L.S. Levy, *The Bmi-1 oncoprotein interacts with dinG and MPh2: the role of RING finger domains*. Oncogene, 1998. **16**(19): p. 2541-7.
72. Alkema, M.J., et al., *Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex*. Genes Dev, 1997. **11**(2): p. 226-40.
73. Tagawa, M., et al., *Expression of novel DNA-binding protein with zinc finger structure in various tumor cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(32): p. 20021-6.
74. Lovering, R., et al., *Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2112-6.

75. Freemont, P.S., I.M. Hanson, and J. Trowsdale, *A novel cysteine-rich sequence motif*. Cell, 1991. **64**(3): p. 483-4.
76. Satijn, D.P. and A.P. Otte, *RING1 interacts with multiple Polycomb-group proteins and displays tumorigenic activity*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 57-68.
77. Zhang, H., et al., *Global regulation of Hox gene expression in C. elegans by a SAM domain protein*. Dev Cell, 2003. **4**(6): p. 903-15.
78. Goodrich, J., et al., *A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in Arabidopsis*. Nature, 1997. **386**(6620): p. 44-51.
79. Guitton, A.E. and F. Berger, *Control of reproduction by Polycomb Group complexes in animals and plants*. Int J Dev Biol, 2005. **49**(5-6): p. 707-16.
80. Hennig, L., R. Bouveret, and W. Grussem, *MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(6): p. 295-302.
81. Czermin, B., et al., *Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites*. Cell, 2002. **111**(2): p. 185-96.
82. Kuzmichev, A., et al., *Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein*. Genes Dev, 2002. **16**(22): p. 2893-905.
83. Jones, R.S. and W.M. Gelbart, *The Drosophila Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6357-66.
84. LaJeunesse, D. and A. Shearn, *E(z): a polycomb group gene or a trithorax group gene?* Development, 1996. **122**(7): p. 2189-97.
85. Laible, G., et al., *Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in Drosophila heterochromatin and at S. cerevisiae telomeres*. Embo J, 1997. **16**(11): p. 3219-32.
86. Sewalt, R.G., et al., *Characterization of interactions between the mammalian polycomb-group proteins Enx1/EZH2 and EED suggests the existence of different mammalian polycomb-group protein complexes*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(6): p. 3586-95.
87. Shumacher, A., C. Faust, and T. Magnuson, *Positional cloning of a global regulator of anterior-posterior patterning in mice*. Nature, 1996. **383**(6597): p. 250-3.
88. van der Vlag, J. and A.P. Otte, *Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation*. Nat Genet, 1999. **23**(4): p. 474-8.
89. van Lohuizen, M., et al., *Interaction of mouse polycomb-group (Pc-G) proteins Enx1 and Enx2 with Eed: indication for separate Pc-G complexes*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(6): p. 3572-9.
90. Cao, R. and Y. Zhang, *The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(2): p. 155-64.
91. Pasini, D., et al., *Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity*. Embo J, 2004. **23**(20): p. 4061-71.
92. Kuzmichev, A., et al., *Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 1859-64.

93. Kuzmichev, A., et al., *Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3*. Mol Cell, 2004. **14**(2): p. 183-93.
94. Denisenko, O., et al., *Point mutations in the WD40 domain of Eed block its interaction with Ezh2*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(10): p. 5634-42.
95. Shao, Z., et al., *Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex*. Cell, 1999. **98**(1): p. 37-46.
96. Saurin, A.J., et al., *A Drosophila Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins*. Nature, 2001. **412**(6847): p. 655-60.
97. Fischle, W., et al., *Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains*. Genes Dev, 2003. **17**(15): p. 1870-81.
98. Wang, H., et al., *Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 873-8.
99. de Napoles, M., et al., *Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation*. Dev Cell, 2004. **7**(5): p. 663-76.
100. Cao, R., Y. Tsukada, and Y. Zhang, *Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 845-54.
101. Li, Z., et al., *Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20643-9.
102. Buchwald, G., et al., *Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b*. Embo J, 2006. **25**(11): p. 2465-74.
103. Lavigne, M., et al., *Propagation of silencing; recruitment and repression of naive chromatin in trans by polycomb repressed chromatin*. Mol Cell, 2004. **13**(3): p. 415-25.
104. Breiling, A., et al., *General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins*. Nature, 2001. **412**(6847): p. 651-5.
105. King, I.F., N.J. Francis, and R.E. Kingston, *Native and recombinant polycomb group complexes establish a selective block to template accessibility to repress transcription in vitro*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): p. 7919-28.
106. Simon, J., et al., *Elements of the Drosophila bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products*. Dev Biol, 1993. **158**(1): p. 131-44.
107. Muller, J. and M. Bienz, *Long range repression conferring boundaries of Ultrabithorax expression in the Drosophila embryo*. Embo J, 1991. **10**(11): p. 3147-55.
108. Chang, Y.L., et al., *Functional reconstruction of trans regulation of the Ultrabithorax promoter by the products of two antagonistic genes, trithorax and Polycomb*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(12): p. 6601-12.
109. Chan, C.S., L. Rastelli, and V. Pirrotta, *A Polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression*. Embo J, 1994. **13**(11): p. 2553-64.
110. Kassis, J.A., *Pairing-sensitive silencing, polycomb group response elements, and transposon homing in Drosophila*. Adv Genet, 2002. **46**: p. 421-38.
111. Bantignies, F., et al., *Inheritance of Polycomb-dependent chromosomal interactions in Drosophila*. Genes Dev, 2003. **17**(19): p. 2406-20.
112. Dejardin, J., et al., *Recruitment of Drosophila Polycomb group proteins to chromatin by DSP1*. Nature, 2005. **434**(7032): p. 533-8.

113. Brown, J.L., et al., *An Sp1/KLF binding site is important for the activity of a Polycomb group response element from the Drosophila engrailed gene*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(16): p. 5181-9.
114. Ringrose, L., et al., *Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in Drosophila melanogaster*. Dev Cell, 2003. **5**(5): p. 759-71.
115. Segil, N., et al., *Mitotic regulation of TFIID: inhibition of activator-dependent transcription and changes in subcellular localization*. Genes Dev, 1996. **10**(19): p. 2389-400.
116. Akoulitchev, S. and D. Reinberg, *The molecular mechanism of mitotic inhibition of TFIID is mediated by phosphorylation of CDK7*. Genes Dev, 1998. **12**(22): p. 3541-50.
117. Wang, L., et al., *Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes*. Mol Cell, 2004. **14**(5): p. 637-46.
118. Ringrose, L., H. Ehret, and R. Paro, *Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes*. Mol Cell, 2004. **16**(4): p. 641-53.
119. Luo, L., et al., *The cell-cycle regulator geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions*. Nature, 2004. **427**(6976): p. 749-53.
120. Martinez, A.M., et al., *Polycomb group-dependent Cyclin A repression in Drosophila*. Genes Dev, 2006. **20**(4): p. 501-13.
121. Park, I.K., et al., *Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 302-5.
122. Molofsky, A.V., et al., *Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation*. Nature, 2003. **425**(6961): p. 962-7.
123. Lessard, J. and G. Sauvageau, *Polycomb group genes as epigenetic regulators of normal and leukemic hemopoiesis*. Exp Hematol, 2003. **31**(7): p. 567-85.
124. Chen, X., et al., *Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation*. Science, 2005. **310**(5749): p. 869-72.
125. Bernstein, B.E., et al., *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 315-26.
126. Boyer, L.A., et al., *Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells*. Nature, 2006. **441**(7091): p. 349-53.
127. Bracken, A.P., et al., *Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions*. Genes Dev, 2006. **20**(9): p. 1123-36.
128. Lee, T.I., et al., *Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 301-13.
129. Haupt, Y., et al., *Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice*. Cell, 1991. **65**(5): p. 753-63.
130. van Lohuizen, M., et al., *Sequence similarity between the mammalian bmi-1 proto-oncogene and the Drosophila regulatory genes Psc and Su(z)2*. Nature, 1991. **353**(6342): p. 353-5.
131. Jacobs, J.J., et al., *Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF*. Genes Dev, 1999. **13**(20): p. 2678-90.
132. Kanno, M., et al., *mel-18, a Polycomb group-related mammalian gene, encodes a transcriptional negative regulator with tumor suppressive activity*. Embo J, 1995. **14**(22): p. 5672-8.

133. Itahana, K., et al., *Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(1): p. 389-401.
134. Dimri, G.P., *What has senescence got to do with cancer?* Cancer Cell, 2005. **7**(6): p. 505-12.
135. Satyanarayana, A. and K.L. Rudolph, *p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1237-40.
136. Bracken, A.P., et al., *The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells*. Genes Dev, 2007. **21**(5): p. 525-30.
137. Takihara, Y., et al., *Targeted disruption of the mouse homologue of the Drosophila polyhomeotic gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects*. Development, 1997. **124**(19): p. 3673-82.
138. Kyba, M. and H.W. Brock, *The SAM domain of polyhomeotic, RAE28, and scm mediates specific interactions through conserved residues*. Dev Genet, 1998. **22**(1): p. 74-84.
139. Kyba, M. and H.W. Brock, *The Drosophila polycomb group protein Psc contacts ph and Pc through specific conserved domains*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2712-20.
140. Zhang, H., et al., *The C. elegans Polycomb gene SOP-2 encodes an RNA binding protein*. Mol Cell, 2004. **14**(6): p. 841-7.
141. Zhang, H., et al., *SUMO modification is required for in vivo Hox gene regulation by the Caenorhabditis elegans Polycomb group protein SOP-2*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 507-11.
142. Tomotsune, D., et al., *Regulation of Hoxb3 expression in the hindbrain and pharyngeal arches by rae28, a member of the mammalian Polycomb group of genes*. Mech Dev, 2000. **98**(1-2): p. 165-9.
143. Wilson, D.I., et al., *DiGeorge syndrome: part of CATCH 22*. J Med Genet, 1993. **30**(10): p. 852-6.
144. Core, N., et al., *Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33-deficient mice*. Development, 1997. **124**(3): p. 721-9.
145. Akasaka, T., et al., *A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during the anteroposterior specification of the axial skeleton*. Development, 1996. **122**(5): p. 1513-22.
146. Shirai, M., et al., *The Polycomb-group gene Rae28 sustains Nkx2.5/Csx expression and is essential for cardiac morphogenesis*. J Clin Invest, 2002. **110**(2): p. 177-84.
147. Ohta, H., et al., *Polycomb group gene rae28 is required for sustaining activity of hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 759-70.
148. Tokimasa, S., et al., *Lack of the Polycomb-group gene rae28 causes maturation arrest at the early B-cell developmental stage*. Exp Hematol, 2001. **29**(1): p. 93-103.
149. van der Lugt, N.M., et al., *Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene*. Genes Dev, 1994. **8**(7): p. 757-69.
150. Kimura, M., et al., *Regulation of Th2 cell differentiation by mel-18, a mammalian polycomb group gene*. Immunity, 2001. **15**(2): p. 275-87.

151. Akasaka, T., et al., *The role of mel-18, a mammalian Polycomb group gene, during IL-7-dependent proliferation of lymphocyte precursors*. *Immunity*, 1997. **7**(1): p. 135-46.
152. Barbieri, A.M., et al., *A homeobox gene, vax2, controls the patterning of the eye dorsoventral axis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(19): p. 10729-34.
153. Gotz, M. and W.B. Huttner, *The cell biology of neurogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(10): p. 777-88.
154. Mui, S.H., et al., *Vax genes ventralize the embryonic eye*. *Genes Dev*, 2005. **19**(10): p. 1249-59.
155. 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.
156. Breiling, A., et al., *Epigenome changes in active and inactive polycomb-group-controlled regions*. *EMBO Rep*, 2004. **5**(10): p. 976-82.