HAL
open science

Étude génomique des fonctions du facteur de transcription Otx2 dans la rétine de souris adulte

Alexander Samuel

To cite this version:

Alexander Samuel. Étude génomique des fonctions du facteur de transcription Otx2 dans la rétine de souris adulte. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4125 . tel-00933785

HAL Id: tel-00933785

https://theses.hal.science/tel-00933785v1

Submitted on 21 Jan 2014

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

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

Université de Nice – Sophia Antipolis – UFR Sciences
Ecole Doctorale de Sciences de la Vie et de la Santé
Institut de Biologie Valrose

THESE

Pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences de l'Université de Nice –Sophia Antipolis
Discipline : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Etude génomique des fonctions du facteur de transcription Otx2 dans la rétine de souris adulte

Présentée par :
Alexander SAMUEL

Thèse dirigée par :
Pr. Thomas LAMONERIE

Devant un jury composé de :

Madame Christine BRUN (Dr.)	Rapportrice
Monsieur Olivier POCH (Dr.)	Rapporteur
Monsieur Laurent COUNILLON (Pr.)	Président du jury
Monsieur Thomas LAMONERIE (Pr.)	Directeur de Thèse

Soutenue publiquement le Vendredi 20 Décembre 2013 à 14h

REMERCIEMENTS

Dans le présent travail, je souhaite remercier tout particulièrement mon directeur de recherche Thomas Lamonerie. Sans sa grande culture scientifique et sa curiosité intellectuelle, il n'aurait pas été possible de produire un travail alliant rigueur scientifique et ouverture d'esprit. Sa patience et sa disponibilité quelles que soient les circonstances ont été d'un grand secours. Ces qualités transparaissent également dans la vie quotidienne, lorsque nos discussions sur nos recherches finissaient sur des notes (de musique) plus légères!

Je remercie Michaël Housset, qui a été mon "grand frère de thèse". Son dynamisme et son enthousiasme, surtout lors de nos travaux en binome, ont été contagieux et m'ont toujours tiré vers l'avant. Son sens du contact et sa redoutable efficacité ont été un atout majeur pour nous permettre de développer nos collaborations : Michael Clarckson, postdoctorant dans l'équipe d'Andreas Schedl (Institut de Biologie de Valrose, Nice), pour le ChIP-seq, Mohammed Ettaiche (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Sophia-Antipolis) pour les ERG, Alexis Bemelmans (Institut de la Vision, Paris) pour les infections lentivirales.

Je tiens également à mentionner les échanges extrêmement ouverts et intéressants que j'ai pu avoir avec Michel Cayouette et Pierre Mattar de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe Neurodéveloppement :
Coralie Le Greneur pour son expérience et ses conseils avisés lorsque mes prévisions paraissaient un peu trop optimistes, Bruno Fant pour nos discussions enrichissantes et l'ambiance détendue qu'il pouvait propager dans le laboratoire, Michaël Delhorbe pour son soutien technique efficace et sa réactivité, Nathalie Billon pour son esprit critique et ses réflexions perspicaces, Fabien D'Autréaux pour les perspectives et les idées qu'il a su m'apporter, Salsabiel El Nagar et Almahdi Chakroun, qui commencent une thèse que je leur souhaite d'être passionnante et fructueuse.

Ceux des autres équipes :
Les Braendlettes et les Furettes, toujours prêtes à mettre l'ambiance, Anne-Amandine Chassot, Marie-Christine Chaboissier et Alexandra Mauri lorsqu'il a fallu chercher infructueusement Otx2 dans l'appareil reproducteur, Jean-Baptiste Coutelis avec lequel nous avons initié le PHD Club de l'institut, et tous les autres !

Et bien sûr tous ceux qui ont du me supporter et m'aider durant ces quatre années :
Ma famille qui m'a apporté un soutien indéfectible, et mes amis de Fhoi Myore, Tony, Raf et Nico, qui ont su se montrer compréhensifs lorsque je n'étais plus aussi assidu aux répétitions !

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 2

SOMMAIRE 3

ABREVIATIONS 6

RESUME 7

ABSTRACT 8

INTRODUCTION 9

I) Otx2 : un facteur de transcription aux fonctions multiples 10

A) Présentation de la famille Otx 10

B) Biologie moléculaire du gène Otx2 12

C) Rôles multiples du facteur de transcription Otx2 14

1) Gastrulation et établissement de l'axe antéro-postérieur 14

2) Régionalisation et maturation du cerveau antérieur 16

3) Identité du mésencéphale 17

4) Cervelet 19

5) Développement des organes sensoriels 21

6) Autres fonctions connues 22

7) Pathologies associées 23

II) La rétine de souris adulte 27

A) Structure de la rétine de souris 28

1) La rétine neurale 28

2) La rétine pigmentée 30

B) Développement de la rétine de souris 31

1) Spécification de la rétine pigmentée 33

2) Spécification de la rétine neurale 34

3) Développement 35

C) Otx2 dans la rétine 37

1) La rétine pigmentée 37
2) Les photorécepteurs 38
3) Les cellules bipolaires 39
4) La rétine adulte 40
III) Apport des Techniques d'études Genomiques à la compréhension mécanistique des facteurs de transcription 44
A) Connaissances mécanistiques des fonctions d'Otx2 44
1) Les gènes cibles 44
2) Les partenaires protéiques 45
B) Apports de la génomique 48
1) Transcriptome 48
2) Séquençage de masse : RNA-seq et ChIP-seq 50
3) Interactome 53
OBJECTIFS 57
RESULTATS 58
I) Mécanisme de dégénérescence des photorécepteurs dans le modèle de souris self-knockout Otx2 59
II) Fonctionnement d'Otx2 dans la rétine neurale et dans la rétine pigmentée 76
III) Production d'outils permettant d'identifier l'interactome d'Otx2 107
A) Matériel et Méthodes 108
1) Cellules Embryonnaires Souches 108
2) Purification de complexes protéiques 108
3) Souris Otx2-TAP-tag 109
B) Production d'une souris Otx2-TAP-tag 110
C) Purifications protéiques 111
DISCUSSION 113
I) Rôle du facteur de transcription Otx2 dans la rétine de souris adulte 113
A) Fonctions D'Otx2 dans la rétine de souris adulte 113
B) Sites de liaison d'Otx2 dans le génome de souris adulte 114
C) La lignée self-knockout : un modèle de pathologies rétiniennes 116

II) Bases moléculaires de l'action d'Otx2 dans la rétine de souris adulte.....118

A) Un mécanisme cellule non-autonome 118

B) Chromatine et Interactome 119

III) Vers une vision intégrative de la régulation génique.....121

A) Pertinence des gènes à proximité des sites de liaison d'Otx2.....121

B) Plasticité des cellules de la rétine 123

C) Perspectives de chronomique.....125

CONCLUSION 128

BIBLIOGRAPHIE.....130

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

AVE : endoderme viscéral antérieur

BC : Cellule bipolaire

ChIP-seq : Immunoprécipitation de la chromatine - Séquençage massif

DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

E : Jour embryonnaire

EGL couche granulaire externe (External Granule cell Layer)

ES : Embryonnaires souches (Cellules)

ERG : Electrorétinogramme

GCL : Couche de cellules ganglionnaires

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

HD : homéodomaine

IGL couche granulaire interne (Internal Granule cell Layer)

INL : Couche nucléaire interne

NR :Rétine neurale

ON : Nerf optique

ONL : Couche nucléaire externe

pb : paire de bases

P : jour postnatal

RNA-seq : Séquençage massif de l'ARN rétrotranscrit

RPE : Rétine pigmentaire

RT-PCR : Transcription reverse – Réaction de polymérisation en chaine

SE : Ectoderme de surface

SNC : Système nerveux central

UTR : Région non traduite

RESUME

L'organisme utilise de façon itérative les mêmes voies de signalisation et les mêmes facteurs de transcription pour construire de multiples structures et organes au cours de son développement. Les travaux du laboratoire cherchent à élucider comment un si petit nombre d'acteurs moléculaires exerce des rôles aussi variés lors du développement en se focalisant sur l'un de ces acteurs : le facteur de transcription Otx2. Chez l'homme, *OTX2* est impliqué dans des pathologies de l'œil comme l'anophtalmie, la microphtalmie et la rétinite pigmentaire. Il est aussi associé au médulloblastome, principal cancer neural infantile. Les modèles de souris knockout constitutif ou conditionnel ont démontré son implication dans la gastrulation, le développement de l'œil, du système olfactif, de la glande pinéale, du thalamus et dans le développement cranio-facial.

Ici, l'analyse des fonctions du facteur Otx2 a été étendue à la rétine adulte. Dans cet organe, *Otx2* est exprimé dans deux tissus distincts : l'épithélium pigmenté rétinien (RPE) et la rétine neurale, contenant les photorécepteurs. L'ablation du gène *Otx2* entraîne la dégénérescence exclusive des photorécepteurs. Pour décrypter les bases moléculaires de cette dégénérescence, une analyse du transcriptome a été réalisée au décours de l'ablation. Les gènes directement contrôlés par le facteur Otx2 apparaissent surtout liés à des fonctions du RPE, suggérant un mécanisme de dégénérescence non autonome cellulaire. Deux expériences confirment ce mécanisme : l'ablation du gène *Otx2* restreinte au RPE récapitule la dégénérescence des photorécepteurs tandis que son expression dirigée dans le RPE de rétine knockout permet leur maintien. *Otx2* exerce donc une fonction essentielle dans le RPE. Par contraste, *Otx2* n'apparaît pas indispensable dans la rétine neurale adulte, bien qu'il y soit exprimé. Deux hypothèses non exclusives sont envisagées : i) Otx2 joue un rôle très différent dans la rétine neurale. ii) l'activité d'un facteur apparenté compense le déficit de protéine Otx2 dans ce tissu. Le gène *Crx*, paralogue d'*Otx2* exprimé dans la rétine neurale, est un candidat majeur pour tenir ce rôle.

Pour tester la première hypothèse, le répertoire global des gènes potentiellement régulés par le facteur Otx2 a été recherché : les sites de liaison du facteur Otx2 à l'ADN ont été identifiés à l'échelle du génome dans chacun des tissus de la rétine par la technique de ChIP-Seq. Un pattern d'occupation génomique très différent est observé dans le RPE et la rétine neurale, suggérant des fonctions distinctes du facteur de transcription Otx2 dans les deux tissus. Pour tester l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle, l'occupation génomique des facteurs Otx2 et Crx a été comparée. Un très fort recouvrement des sites de fixation au génome des deux facteurs est observé dans la rétine neurale mais ce n'est pas le cas dans le RPE. Une activité différente de celle exercée dans le RPE et une redondance fonctionnelle entre Crx et Otx2 semblent donc être à l'origine de l'absence de phénotype visible associé à la perte d'*Otx2* dans la rétine neurale.

Le fait qu'un même facteur de transcription exerce des fonctions variées et occupe le génome d'une façon très distincte entre tissus proches requiert l'existence d'éléments additionnels pour définir la sélectivité du répertoire de gènes qu'il contrôle. L'hypothèse d'une combinatoire de partenaires protéiques différents permettrait d'expliquer cette diversité d'action. Pour identifier les protéines partenaires du facteur Otx2 dans de multiples situations de développement ou chez l'adulte et les corréler à ses multiples fonctions, la création d'une lignée de souris exprimant une protéine Otx2 optimisée pour la purification de complexes natifs a été entreprise. Un allèle *Otx2* exprimant une protéine de fusion Otx2-TAP-tag à un niveau physiologique a été créé par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires de souris. La lignée de souris correspondante a été établie. Cet outil permettra la purification des complexes protéiques où entre Otx2 *in vivo* et leur identification par analyse protéomique.

ABSTRACT

An organism uses the same signaling pathways and transcription factors to develop its organs and tissues. Our work tends to clarify how a small number of molecules can achieve such various functions during development, focusing on one of the most important actors: transcription factor Otx2. In humans, *OTX2* is related to eye diseases, such as anophtalmia, microphtalmia or retinitis pigmentosa. It is also related to the main form of childhood brain cancer, medulloblastoma. Mice constitutive and conditionnal knockout experiments demonstrated its implication first in gastrulation and antero-posterior axis establishment, then later in the development of numerous organs such as the eye, the olfactory bulb, the pineal gland and even in the cranio-facial development.

In the present study, Otx2's functional analysis is extended to the mature retina where *Otx2* is still expressed in two distinct tissues: retinal pigmented epithelium (RPE) and neuroretina, the latter including photoreceptors. *Otx2* ablation triggers exclusive photoreceptor degeneration.

To decipher molecular bases of this degeneration, time-lapse transcriptomic analysis was performed in the first days after *Otx2* ablation. Otx2 direct target genes showed to be linked to RPE specific functions, suggesting a non cell-autonomous event. RPE restricted ablation of Otx2 was sufficient to recapitulate the photoreceptor degeneration, and RPE specific rescue after whole retina knockout was sufficient to save the photoreceptors. Its function is essential only in the RPE. *Otx2* does not play a vital role in the neuroretina although it is expressed in those cells. Two hypothesis could explain this result : i) Otx2 has a very different function in the neuroretina, ii) the depleted neuroretina expresses a related protein which compensates and masks the potential disorders due to the lack of Otx2. Crx, which is a paralogue, could be a very good candidate for this second hypothesis.

The first hypothesis was tested by identifying Otx2's genome occupancy specifically in each tissue by ChIP-seq method. A very different binding pattern was observed in RPE and neuroretina, suggesting that Otx2 has distinct functions in both tissues. The functional redundancy was tested by comparing Otx2 and Crx genome occupancy. A high overlap of bound regions by both transcription factors was observed in the neuroretina, and not in the RPE. A different activity than the one observed in the RPE combined with a functional redundancy in the neuroretina seem to be responsible for the lack of visible phenotypes associated with neuroretina specific loss of *Otx2*.

The fact that a same single transcription factor plays various functions and occupies the genome in a distinct manner in closely related tissues requires the existence of additional elements to define the target genes selectivity of Otx2. A differential combination of protein partners in those tissues can be hypothesized. To identify Otx2's partner proteins in multiple developmental processes until adult stage, and to correlate them to a specific targetome, a new mouse was produced. One *Otx2* allele expressing a Tandem Affinity Purification tagged Otx2 protein at physiological level was inserted into mouse embryonic stem cells. The corresponding mouse line was established. This tool will allow protein complex purification *in vivo*, and their analysis by mass spectrometry.

INTRODUCTION

La question générale posée par la biologie du développement est de comprendre comment à partir d'un zygote transmettant une information génétique identique à toutes ses cellules-filles, un organisme parvient à se développer dans toute sa complexité avec des cellules, des tissus et des organes spécialisés. Pour ce faire, chaque cellule va exprimer un répertoire spécifique de gènes, lui permettant d'acquérir une identité propre. Ce lien entre identité et gènes exprimés est si fort qu'on définit un type cellulaire par les différents marqueurs qu'il exprime spécifiquement par rapport à d'autres types cellulaires. Dans les situations pathologiques, les gènes s'exprimant à tort sont particulièrement intéressants car ils constituent un moyen d'identifier et de corriger ou de détruire les cellules qui dysfonctionnent.

Nous savons aujourd'hui que l'expression des gènes résulte de l'action combinée de deux types de facteurs :

- Les facteurs extrinsèques, qui sont les molécules de signalisation et tout autre signal perçu par la cellule et auquel celle-ci est sensible
- Les facteurs intrinsèques, qui sont l'ensemble des protéines que la cellule exprime, responsables de la réponse de celle-ci : récepteurs, voies de signalisation, facteurs de transcription ; mais aussi l'état de la chromatine.

Ce sont les facteurs de transcription qui interviennent en bout de chaîne, et qui sont donc les éléments décisifs sur lesquels nous devons porter une attention particulière. Ils ont souvent une multiplicité de rôles connus et identifiés. Parmi ceux-ci, les homéogènes sont sans doute les effecteurs les plus impressionnants car ils sont les chefs d'orchestre qui coordonnent des programmes de développement complets amenant à la formation des organes. Après une étude détaillée du rôle de ces acteurs à l'échelle phénotypique, nous sommes entrés dans l'ère moléculaire où les gènes cibles précis ainsi que la combinatoire d'un facteur de transcription deviennent accessibles.

Le facteur de transcription homéotique Otx2 contrôle des fonctions essentielles au cours du développement et, étonnamment pour une protéine ayant un rôle aussi développemental, continue à être exprimé à l'âge adulte, notamment au niveau de la rétine.

Le fonctionnement de ce facteur de transcription au niveau de la rétine de souris adulte est étudié dans le présent travail à différents niveaux :

- caractérisation des fonctions précises de ce facteur de transcription par une approche de puces à ADN en condition de knockout conditionnel inductible,
- identification des sites de liaison de ce facteur de transcription par une approche d'immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage de masse,
- développement d'outils permettant l'identification des partenaires protéiques de ce facteur de transcription *in vivo*.

I) OTX2 : UN FACTEUR DE TRANSCRIPTION AUX FONCTIONS MULTIPLES

A) PRESENTATION DE LA FAMILLE OTX

La famille Otx est composée d'au moins trois paralogues chez les gnathostomes, principal groupe des vertébrés : *Otx1, Otx2* et *Otx5/Crx*. Ceux-ci sont les plus fréquemment retrouvés et conservés à travers les espèces, bien que certains poissons puissent avoir plus de 6 membres de cette famille génique. Les premiers représentants de cette famille ont été identifiés il y a plus de 20 ans (Simeone et al. 1992). Il y a une forte conservation entre espèces (figure 1) dans cette famille génique qui joue un rôle majeur dans le développement des structures antérieures dans divers organismes. Celle-ci est telle qu'il est possible d'échanger différents représentants de la famille génique originaires d'espèces différentes pour assurer les fonctions essentielles : c'est le cas des gènes humains *OTX1* et *OTX2* prenant le relais chez la drosophile dont le gène *otd* est mutant (Leuzinger et al. 1998). La réciproque est également vraie : *otd* peut corriger une grande partie des défauts chez les souris knockout *Otx1* (Acampora et al. 1998a) et enfin *Otx2* peut remplacer *Otx1* (Acampora et al. 1998b).

Tous les membres de la famille Otx ont un homéodomaine extrêmement conservé des facteurs de transcription paired-like du type bicoïd, possédant une Lysine en 50ème position, qui est le 9ème acide aminé de la troisième hélice alpha (Galliot et al. 1999). Cet homéodomaine de 61 acides aminés ne diffère que de quelques acides aminés (moins d'une douzaine) entre les espèces dans lesquelles sa séquence est connue. Il se lie à l'ADN en ciblant spécifiquement la séquence 5'-TAATCC-3' (Chatelain et al. 2006).

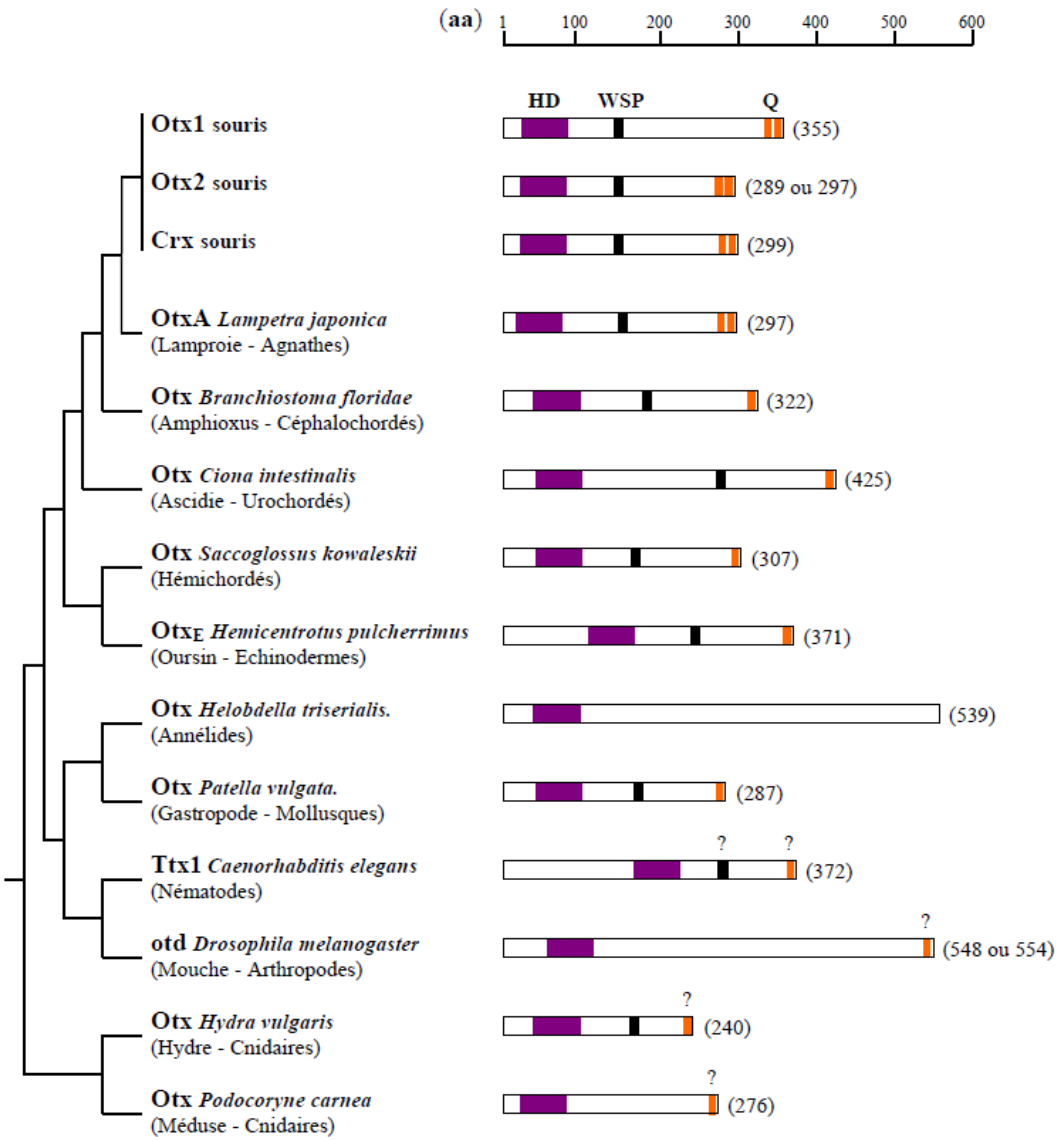


Figure 1 : Structure et domaines conservés des protéines Otx chez les métazoaires

La position évolutive est indiquée. L'homéodomaine (HD), le domaine WSP (WSP) et les motifs «queues Otx» (Q) sont représentés par des rectangles colorés respectivement violet, noir et orange. L'échelle indique en nombre d'acides aminés (aa), la longueur de la protéine et de ses différents domaines. Le nombre total d'acides aminés composant une protéine est indiqué entre parenthèses à l'extrémité C-terminale de celle-ci. Les points d'interrogations (?) mentionnent une homologie partielle ou réduite du domaine conservé. En ce qui concerne la protéine Ttx1 de Caenorhabditis elegans, plusieurs formes sont référencées dans les banques. Seule est représentée la plus longue. Adapté de Acampora et al. (2005)

De même, la plupart des membres de cette famille possèdent une queue Otx, un motif de 12 à 13 acides aminés (Furukawa et al. 1997). C'est le cas de tous les deutérostomiens, et il se voit dupliqué chez les craniates (Germot et al. 2001). Il n'est pas impliqué dans le mécanisme de liaison à l'ADN (Chen et al. 2002) ni dans celui de localisation nucléaire (Fei and Hughes 2000), mais il l'est dans l'activité transactivatrice du facteur de transcription (Zhang et al. 2002). Un domaine WSP (Tryptophane, Sérine, Proline) est retrouvé en C-terminal de l'homéodomaine. Celui-ci semble également avoir dans certains cas une fonction transactivatrice (Chau et al. 2000). Une séquence PEST située après l'homéodomaine semble également être présente dans toutes les protéines de cette famille Otx, celle-ci ayant un rôle de dégradation rapide des protéines (Williams and Holland 1998).

Parmi les membres de cette famille Otx, nous pouvons distinguer chez la souris *Otx1*, *Otx2* et *Otx5/Crx*. Le premier est impliqué dans le développement du cortex cérébral et un mutant homozygote du gène *Otx1* présente des défauts tels que : épilepsie, défauts du cortex cérébral, de l'oreille, de l'œil, et un mésencéphale élargi (Acampora et al. 1995; Simeone et al. 2002). Les mutants *Crx* présentent des défauts au niveau de l'œil et notamment des photorécepteurs qui ne développent pas de segments externes (Furukawa et al. 1999). C'est cependant l'absence d'*Otx2* qui entraîne les phénotypes les plus marquants car les embryons qui en sont déplétés ne parviennent pas à se développer à leur terme, avec absence d'établissement d'axe antéro-postérieur (Acampora et al. 1995; Rhinn et al. 1998).

C'est donc ce dernier membre de la famille Otx qui a été le plus ardu à étudier, et pour lequel des techniques d'invalidations conditionnelles ont dû être développées pour comprendre pleinement son fonctionnement.

B) BIOLOGIE MOLECULAIRE DU GENE OTX2

Le gène *Otx2* murin possède une organisation semblable à celle du gène *OTX2* humain, avec 8 exons dont les 3 derniers codent les deux isoformes connues de protéines Otx2 et $Otx2_L$ (Courtois et al. 2003) (figure 2A). Il possède également 3 promoteurs alternatifs. Le promoteur A, le plus en amont du gène, est exprimé principalement chez l'adulte, au niveau de l'œil, tandis que le plus proche du gène, le promoteur C, s'exprime plutôt dans les stades embryonnaires précoces (Fossat et al. 2005). Des souris mutantes pour le site d'épissage 5' de l'exon 1 permettent en théorie d'obtenir des souris n'exprimant la protéine Otx2 que par le biais du promoteur C. Celles-ci ne présentent pas les défauts les plus précoces liés à

l'invalidation du gène*Otx2*, mais leur développement embryonnaire est caractérisé par une réduction importante du développement de la tête (Acampora et al. 2001).

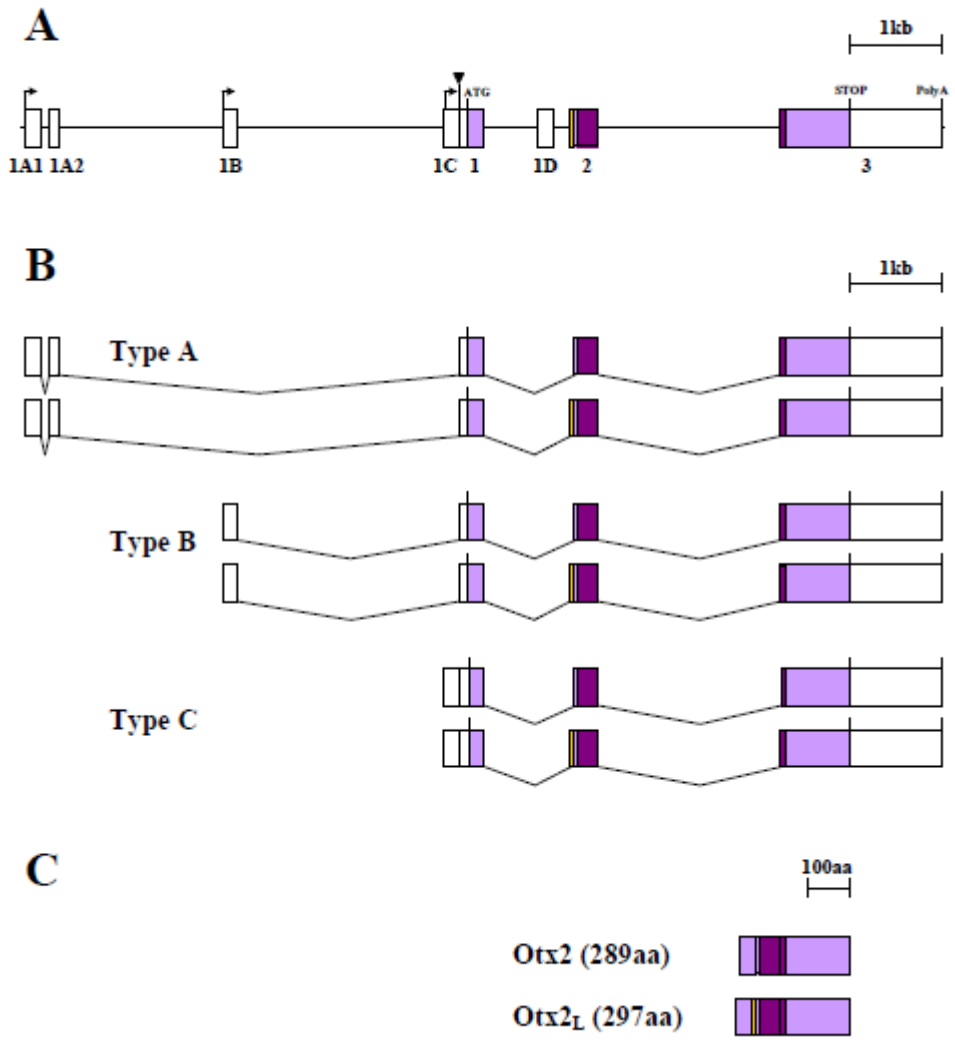


Figure 2 : Organisation et expression du locus *Otx2* chez la souris

A. Structure du locus *Otx2* de souris. Les exons sont représentés par des rectangles. Les rectangles colorés correspondent aux régions codantes. En jaune est indiquée la position des 24pb codant les 8aa supplémentaires de la protéine Otx2L. Les régions codant l'homéodomaine sont en violet foncé. Les sites d'initiation de la transcription (flèches), les numéros des exons, le site 5' d'épissage de l'exon 1 (triangle), les sites d'initiation (ATG) et d'arrêt (STOP) de la traduction, le site de polyadénylation (polyA) ainsi que l'échelle (en kilobases) sont indiqués.
B. Trois types majoritaires d'ARNm produit à partir du locus Otx2. Même légende que la partie A.
C. Protéines Otx2 et Otx2L produites à partir du locus Otx2. Le code couleur est conservé et permet de voir la correspondance avec les régions indiquées dans la partie A et B. L'échelle (en nombre d'acides aminés) est indiquée.
Adapté de Courtois et al. (2003).

Ainsi, les promoteurs A et B interviennent dans les phases plus tardives de développement. La régulation de l'expression du gène *Otx2* dépend de séquences très distales, au-delà de 90 kb en amont et 115 kb en aval du site d'initiation de la traduction (Kurokawa et al. 2004a; Kurokawa et al. 2004b). Cependant, quel que soit le promoteur ou le tissu, seules deux isoformes de la protéine sont produites (figure 2B et 2C). Ces deux isoformes sont très proches car elles ne diffèrent que de 8 acides aminés (GPWASCPA) codés par 24 paires de bases ajoutées au niveau de l'exon 2 dans la forme longue de la protéine Otx2, notée $Otx2_L$. Cette forme longue est minoritaire, mais l'élongation se trouvant juste en amont de l'homéodomaine elle pourrait modifier les propriétés de liaison à l'ADN. Son rôle reste encore à élucider. *In vitro*, les deux formes de protéines Otx2 présentent la même activité transactivatrice. L'analyse en western-blot de chaque isoforme montre la présence de 2 espèces, d'un poids moléculaire apparent supérieur à la valeur théorique, suggérant que les protéines Otx2 et $Otx2_L$ subissent des modifications post-traductionnelles (nos données non publiées). Cependant, jusqu'à aujourd'hui, aucun site de phosphorylation ou de modification post-traductionnelle n'est encore décrit pour ces protéines.

C) ROLES MULTIPLES DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION OTX2

Pourtant, malgré le peu de variation structurelle de ce facteur de transcription, il a été possible de montrer son implication dans des processus développementaux extrêmement diversifiés, allant des stades les plus précoces et essentiels à des rôles très fins et précis dans des tissus spécialisés.

1) GASTRULATION ET ETABLISSEMENT DE L'AXE ANTERO-POSTERIEUR

Le gène codant pour le facteur de transcription Otx2 est exprimé très précocement dans le développement puisque des ARNm sont détectés dès 3,5 jours après fécondation (Kimura et al. 2001). Son expression est retrouvée deux jours plus tard dans l'endoderme viscéral et l'épiblaste de l'embryon. L'expression du gène *Otx2* est plus forte du côté distal de cet endoderme avant gastrulation. Ces cellules vont migrer vers le jour embryonnaire 6 pour former l'endoderme viscéral antérieur, établissant ainsi l'axe antéro-postérieur (Kimura et al. 2000).

Dans le cas de souris mutantes *Otx2*$^{-/-}$, la migration de l'endoderme viscéral distal n'a pas lieu. La réexpression d'un ADNc *Otx2* dans ce tissu la rétablit. Cette migration dépend donc strictement de l'expression du gène *Otx2* dans l'endoderme viscéral distal (Kimura et al.

2000). En conséquence, chez les embryons mutants *Otx2*$^{-/-}$, la gastrulation n'a pas lieu correctement. Observés 8,5 jours après fécondation, les embryons homozygotes mutants ont une taille extrêmement réduite comparée à des hétérozygotes ou des homozygotes sauvages (Acampora et al. 1995) (figure 3). Ils sont incapables d'établir un axe antéro-postérieur complet. L'absence totale de protéine Otx2 conduit à l'absence de prosencéphale et de mésencéphale, ainsi que de la région antérieure du rhombencéphale, le premier rhombomère (marqué par *Pax2*) ne pouvant se former. Pour mieux comprendre la fonction du gène *Otx2* dans ces stades développementaux précoces, des souris chimères composées de cellules sauvages et de cellules homozygotes mutantes pour le gène *Otx2* ont été produites (Rhinn et al. 1998). En rétablissant une expression partielle du gène *Otx2* dans ces souris chimères, il a été possible de rétablir la formation d'une plaque neurale. Ce rétablissement présente une caractéristique impressionnante puisqu'il suffit que les cellules de l'endoderme viscéral antérieur expriment *Otx2* pour que le neuro-ectoderme soit induit correctement, même avec tout l'épiblaste *Otx2*$^{-/-}$. L'expression du facteur de transcription Otx2 dans l'endoderme viscéral antérieur est donc nécessaire et suffisante pour réprimer les signaux postériorisants de l'épiblaste, les cellules mutantes pouvant participer à la formation de cette plaque (Rhinn et al. 1998). Mais très rapidement, une autre fonction du gène *Otx2* intervient : cette plaque neurale ne pourra pas se différencier correctement en son absence. Les chimères n'exprimeront pas ou peu certains marqueurs du cerveau antérieur tels que *Six3, Hesx1, Rpx* ou encore *Pax2* qui marque la limite entre mésencéphale et métencéphale.

La protéine Otx2 intervient donc d'une façon cellulaire non-autonome à partir de l'endoderme viscéral antérieur ou AVE, où il permet notamment d'activer les gènes *Dkk1, Lefty1* et *Cer1* qui codent pour des molécules sécrétées (Rhinn et al. 1998; Yamamoto et al. 2003). Lorsqu'ils sont mutés, l'embryon présente des défauts de restriction de signaux postériorisants (Perea-Gomez et al. 2001). De plus, la protéine Otx2 agit également de façon cellulaire autonome, car elle régule des gènes impliqués dans la forme, la mobilité ou encore l'adhésion des cellules au niveau de cet endoderme viscéral. Elle agit aussi de façon cellulaire autonome au sein du neuro-ectoderme, une fois celui-ci induit, en permettant l'expression de gènes essentiels à son maintien et à son développement. Ceci indique que ce même facteur de transcription est à la fois impliqué dans le processus de gastrulation et de répression de signaux postériorisants, permettant ainsi l'établissement correct de l'axe antéro-postérieur, par deux mécanismes distincts.

Le gène *Otx2* est donc impliqué dans le contrôle précoce de la migration des cellules de l'AVE, dans l'induction, au sein de cet AVE, de gènes nécessaires à la répression de signaux postériorisants et donc à la gastrulation, et dans le maintien du neuroectoderme antérieur.

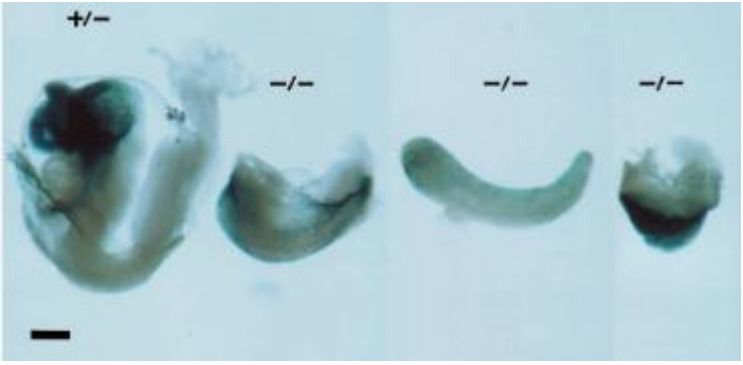


Figure 3 : Défauts de développement chez les embryons de souris mutants *Otx2.*

Morphologie observée chez des embryons de souris de E8,5. Les parties antérieures et moyennes du cerveau, marquées chez l'hétérozygote, sont absentes chez le mutant. Adapté de Acampora et al. (1995).

2) REGIONALISATION ET MATURATION DU CERVEAU ANTERIEUR

A partir du jour embryonnaire E6,5, l'expression du gène *Otx2* va se restreindre de plus en plus à la partie antérieure de l'embryon. Elle est présente dans pratiquement toutes les cellules des régions antérieure et moyenne du cerveau, avec une limite postérieure franche au niveau du métencéphale dès le jour embryonnaire 9,5 (E9,5) (Acampora et al. 1995). Le jour suivant, son expression est détectée dorsalement du télencéphale au mésencéphale, et ventralement dans le diencéphale et dans le mésencéphale, la limite antérieure étant le chiasma optique (Simeone et al. 1992). Une expression plus postérieure apparaît dorsalement, au niveau de la lèvre rhombique qui est la région du métencéphale destinée à former une partie du cervelet (Fossat et al. 2007).

Dans le télencéphale, l'expression va rapidement se limiter et subsister uniquement dans l'éminence ganglionnaire antérieure, le septum adjacent au diencéphale, le striatum, l'hippocampe et la partie ventrale du bulbe olfactif, ces structures constituant la base non corticale du télencéphale, dès E11. Au niveau du diencéphale, le gène *Otx2* est exprimé à E12,5 dans les régions qui donneront la neurohypophyse, l'épiphyse, le thalamus dorsal, l'aire préoptique et la région mammilaire postérieure de l'hypothalamus. Après une expression homogène dans tout le mésencéphale jusqu'au stade E11,5, l'ARNm *Otx2* va ensuite se restreindre aux couches marginales du tectum avant de ne persister à E16,5 que dans la zone ventriculaire des futurs colliculi inférieurs et dans la zone marginale des futurs colliculi supérieurs (Mallamaci et al. 1996; Simeone et al. 1993).

Dans les différentes structures dans lesquelles il est exprimé, le gène *Otx2* joue ou peut jouer un rôle important pour former les tissus définitifs, comme l'ont montré l'étude de mutants hétérozygotes (Matsuo et al. 1995). Sa seule suppression n'est cependant pas toujours suffisante pour provoquer les phénotypes observés : il agit conjointement avec des gènes codant d'autres facteurs de transcription tels *qu'Otx1, Emx2* ou *Pax6* (Kimura et al. 2005). Des mutants conditionnels ont permis d'améliorer encore nos connaissances quant aux multiples fonctions du gène *Otx2*, ainsi au niveau de l'hypothalamus, il est responsable de la sécrétion de l'hormone GnRH (Diaczok et al. 2011; Kelley et al. 2000), son absence entraîne des défauts au niveau du système reproducteur, notamment chez la souris femelle.

L'expression du gène *Otx2* dans le cerveau en formation apparaît donc très dynamique avec un profil large au début qui se restreint progressivement à des domaines précis du cerveau antérieur, moyen et postérieur.

3) IDENTITE DU MESENCEPHALE

Un centre organisateur essentiel pour spécifier l'identité des régions adjacentes se trouve au niveau de la barrière mésencéphalo-métencéphalique (Simeone 2000) (figure 4). C'est une répression mutuelle entre les domaines d'expression des gènes *Gbx2* et *Otx2* qui permet d'établir celle-ci. Elle est à l'origine d'un organisateur isthmique dont l'un des principaux morphogènes est *Fgf8* (Martinez 2001). Le domaine d'expression du gène *Otx2* se trouve du côté antérieur de cet organisateur et y induit l'expression de *Wnt1*, tandis que le gène *Gbx2* induit l'expression de *Fgf8* du côté postérieur. L'absence de protéine Otx2 dans un contexte mutant pour le gène *Otx1* a pour conséquence le changement d'identité du mésencéphale et d'une partie du diencéphale en métencéphale (Acampora et al. 1997). Il est à noter qu'une dose globale de facteurs de transcription de la famille Otx semble être nécessaire au bon positionnement de cet isthme (Kurokawa et al. 2004a), indiquant une action conjointe des protéines Otx1 et Otx2 du côté antérieur de l'isthme. De plus, en induisant l'expression du gène *Otx2* sous le contrôle du promoteur du gène *Engrailed 1 (En1*) (Broccoli et al. 1999) ou celle du gène *Gbx2* sous le contrôle du promoteur du gène *Wnt1* (Millet et al. 1999), il a été possible de déplacer le positionnement de cet isthme respectivement vers l'arrière (en induisant l'expression du gène *Otx2* plus postérieurement) ou vers l'avant (en induisant l'expression du gène *Gbx2* plus antérieurement).

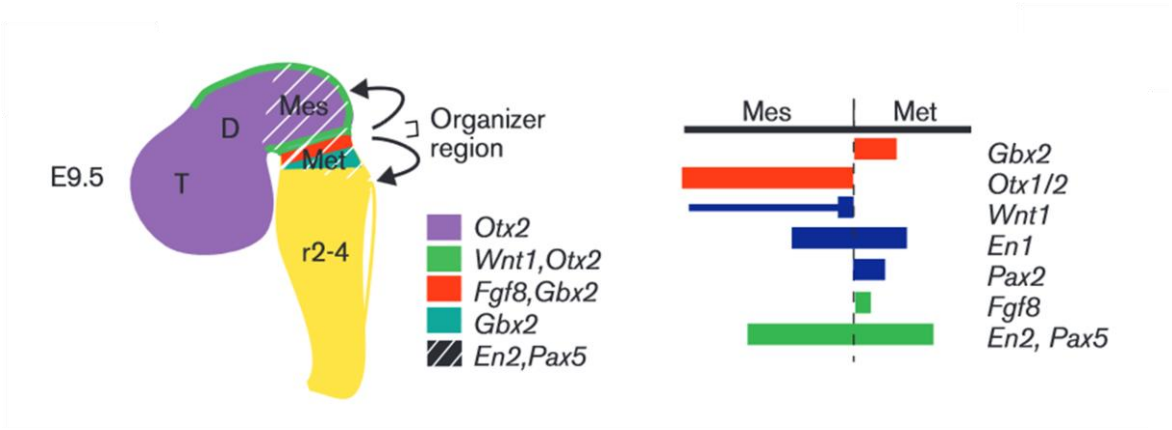


Figure 4 : La limite mésencéphale-métencéphale de la souris

Représentation schématique des patrons d'expression des gènes au niveau du tube neural antérieur d'un embryon de souris en vue latérale à E9.5. La partie antérieure est orientée vers la gauche. Les domaines d'expression de différents gènes sont représentés. T : télencéphale, D : diencéphale, Mes : mésencéphale, Met : métencéphale, r2-4 ; rhombomères 2 à 4. Adapté de Joyner et al. (2000).

La délétion conditionnelle du gène *Otx2* dans le mésencéphale a été obtenue grâce a trois systèmes inductibles : [*En1*$^{+/Cre}$; *Otx2*$^{flox/flox}$; *Otx1*$^{-/-}$] (Puelles et al. 2004), [*Otx1*$^{+/Cre}$; *Otx2*$^{flox/-}$] (Puelles et al. 2003) et [*Nestin-Cre*; *Otx2*$^{flox/flox}$] (Vernay et al. 2005). Elle a pour conséquence une antériorisation de l'isthme. Dans tous ces cas, la partie ventrale du mésencéphale n'est pas affectée. La protéine Otx2 n'a une importance que dans la région dorsale du mésencéphale. En effet, ce facteur de transcription permet, conjointement avec le facteur Otx1, l'établissement de la polarité dorso-ventrale dans ce tissu. Le gène *Shh* est induit par le gène *FoxA2*, tous deux sont exprimés selon un gradient ventro-dorsal décroissant, complémentaire d'un gradient dorso-ventral décroissant d'expression de la protéine Otx1. L'expression de la protéine Otx2 est constante tout le long de l'axe dorso-ventral (Puelles et al. 2004). Cependant, l'inactivation conditionnelle du gène *Otx2* dans le mésencéphale supprime le gradient FoxA2/Shh. Des marqueurs de l'activité Shh (*Ptch*, *Gli1*), normalement exprimés uniquement dans la partie ventrale, sont alors exprimés également plus dorsalement. Les gènes *Gli3*, *Dbx1* et *Pax3*, réprimés par les signaux Shh et présents uniquement dans la partie dorsale, se trouvent alors exprimés ventralement.

L'expression du co-répresseur *Grg4* est nécessaire pour permettre à la protéine Otx2, en se liant à ce dernier, d'inactiver l'expression du facteur Fgf8 pour maintenir l'identité du mésencéphale (Heimbucher et al. 2007). Au stade 13-16 somites (E8,5), une fois la barrière mésencéphalo-métencéphalique formée, le facteur de transcription à homéodomaine Meis2 commence à être exprimé et va entrer en compétition avec le répresseur Grg4 pour lier la protéine Otx2. Il permet ainsi la formation du tectum, le toit du mésencéphale qui est le siège des réflexes auditifs et visuels (Agoston and Schulte 2009).

L'expression du gène *Otx2* dans le mésencéphale est donc requise pour la mise en place de l'organisateur isthmique. Elle agit également pour établir la polarité dorso-ventrale du diencéphale et du mésencéphale.

4) CERVELET

Le cervelet est le centre de la coordination motrice, regroupant la moitié des neurones d'un individu alors qu'il n'occupe que 10% de sa boîte crânienne. De caractère folié, il possède 10 lobes principaux chez les mammifères (Sillitoe and Joyner 2007). Histologiquement, il est constitué, de l'intérieur vers l'extérieur, de la substance blanche contenant les noyaux profonds, et d'un cortex constitué de trois couches cellulaires : la couche granulaire interne, la monocouche des cellules dites de Purkinje, et la couche moléculaire. Tous les types neuronaux de ces différentes couches interagissent en un réseau d'activations/inhibitions permettant d'interpréter les signaux entrant par les fibres moussues issues des noyaux du système pré-cérébelleux et par les fibres grimpantes issues du noyau de l'olive inférieure (Wang and Zoghbi 2001) (figure 5).

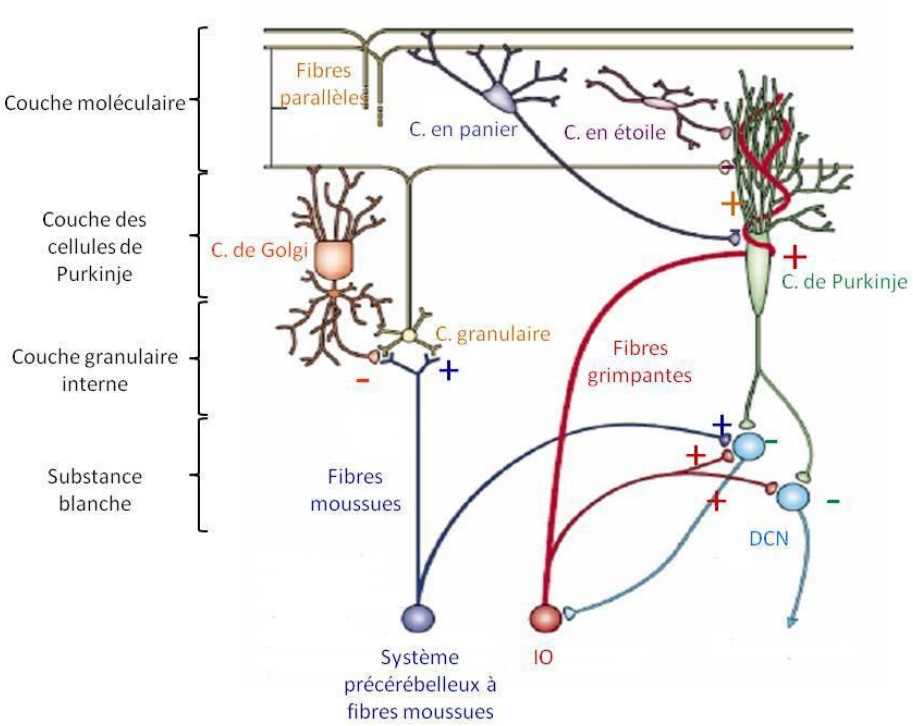


Figure 5 : Organisation cellulaire du microcircuit du cervelet

De l'intérieur vers l'extérieur, les couches contenant tous les types cellulaires du cervelet sont représentés, avec les interactions activatrices (+) ou inhibitrices (-).DCN : noyaux profonds, IO : noyaux de l'olive inférieure. Adapté de Wang and Zoghbi (2001).

Le cervelet se développe à partir du jour embryonnaire E12,5 en position immédiatement postérieure à la barrière mésencéphalo-métencéphalique précédemment décrite, dans la région dorsale du premier rhombomère (Gavalas et al. 1997), qui correspond au domaine d'expression des gènes *Gbx2/Fgf8*. Les précurseurs des cellules du cervelet sont issus de deux centres germinatifs :

- la zone ventriculaire, épithélium germinatif du 4ème ventricule du tube neural, qui donne naissance aux cellules GABAergiques : cellules de la couche moléculaire, cellules de Golgi, cellules de Purkinje (Goldowitz and Hamre 1998; Wang and Zoghbi 2001).

- la lèvre rhombique antérieure qui borde la plaque du toit de ce ventricule et donne naissance aux précurseurs des cellules granulaires (Wingate and Hatten 1999). Ceux-ci vont être produits à la surface du cervelet et migrer tangentiellement pour former la couche granulaire externe (EGL). L'EGL est un épithélium prolifératif secondaire complètement formé à la naissance. Il est le siège d'une prolifération intense entre les jours postnataux 1 et 15 (P1-P15). Les cellules de l'EGL effectuent ensuite une migration radiale en direction interne, traversant la couche des cellules de Purkinje pour aller former la couche granulaire interne (IGL).

Le facteur de transcription Otx2 est exprimé au niveau de l'EGL et de l'IGL. Il est requis comme nous l'avons vu précédemment pour déterminer la limite antérieure du cervelet (Vernay et al. 2005), mais un mutant conditionnel déclenché plus tardivement, à E12,5, ne présente plus aucune expansion antérieure (Fossat et al. 2006). Cette fonction est donc requise uniquement dans une fenêtre de temps restreinte, lorsque l'isthme est formé. Le cervelet postérieur est affecté lors d'invalidations plus tardives (E16,5) du gène *Otx2* (figure 6). Des études préliminaires semblent également indiquer qu'une invalidation plus tardive entraîne des défauts de prolifération conduisant à la formation d'un cervelet de taille réduite (nos données non publiées).

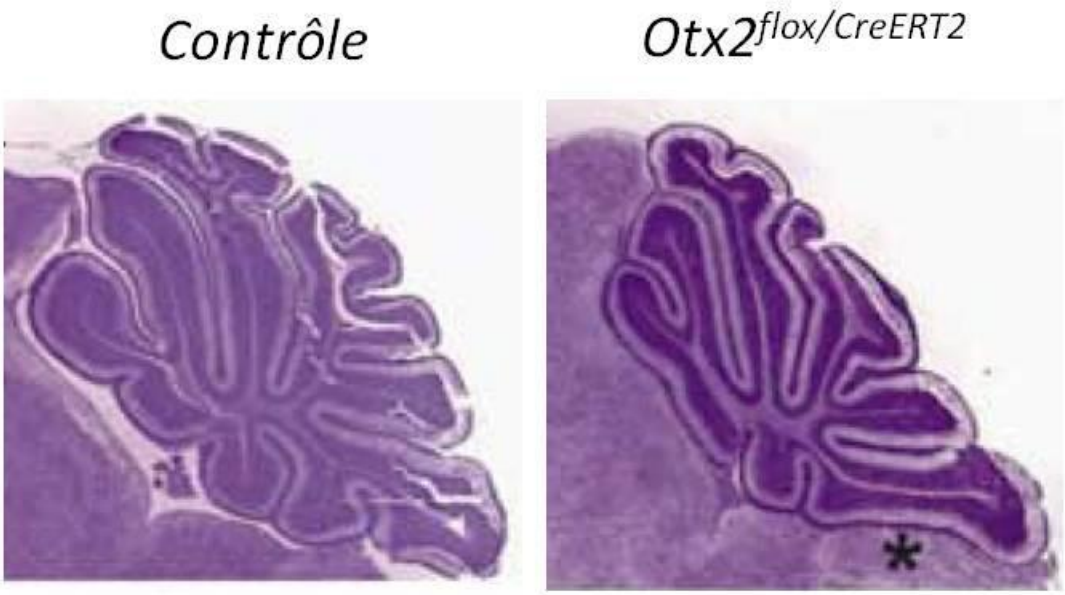


Figure 6 : Morphologie du cervelet à P10 après inactivation du gène *Otx2* à E16.5

L'élimination d'Otx2 spécifiquement dans les cellules où le gène est exprimé à E16,5 entraîne un phénotype visible au niveau du cervelet à P10. La taille globale du cervelet est réduite, et il manque une foliation secondaire au niveau du lobe IX (astérisque). Adapté de Fossat et al. (2006).

5) DEVELOPPEMENT DES ORGANES SENSORIELS

Le facteur de transcription Otx2 est présent dans l'oreille et l'oreille interne. Cette dernière se développe à partir de la placode otique dans laquelle est également exprimé le facteur Gbx2 de façon à former un gradient complémentaire (Lin et al. 2005; Steventon et al. 2012). Conjointement avec la protéine Otx1, ce facteur de transcription va permettre le développement du canal semi-circulaire latéral, de l'utricule, du saccule et de la cochlée, qui sont réduits ou absents en l'absence des membres de la famille Otx (Morsli et al. 1998).

La glande pinéale ou épiphyse est sensible au photopériodisme, elle synthétise et libère la mélatonine avec un rythme journalier et saisonnier. Cette glande ne peut se développer en l'absence d'*Otx2* (Furukawa et al. 2002; Nishida et al. 2003). Il est à noter que le gène *Otx2b* de xénope est impliqué dans le contrôle de l'activité du gène *Clock* (Green et al. 2001), qui est un acteur clé dans le contrôle du rythme circadien.

Otx2 est exprimé dans la placode olfactive dès E10,5 (Simeone et al. 1993), puis se trouvera au niveau des cellules de soutien, les cellules sensorielles ciliées portant les récepteurs olfactifs, l'organe voméronasal impliqué dans la détection des phéromones, et du

mésenchyme alentour. Dans le cas de mutants hétérozygotes pour *Otx2*, ces différents types cellulaires sont affectés (Matsuo et al. 1995), mais il est possible que cet effet soit principalement dû aux défauts de développement cranio-facial également visible chez ces mutants.

Chez le Xénope, *Otx2* est exprimé dans la glande adhésive de l'embryon, équivalent du primordium du menton chez les mammifères (Sauka-Spengler et al. 2002). Une expression ectopique dans cette région permet le développement d'autres glandes adhésives et l'expression d'une forme dominante négative d'*Otx2* inhibe la formation de cette glande (Gammill and Sive 1997).

Enfin *Otx2* a un rôle essentiel au niveau de l'œil et de la vision, détaillé dans le chapitre suivant. Ce facteur de transcription, au-delà de ses fonctions développementales précoces indispensables à des organes centraux et majeurs de l'organisme tels que le cerveau et le cervelet, participe donc à la formation de nombreux organes sensoriels, y compris les plus spécialisés.

6) AUTRES FONCTIONS CONNUES

A E9,5, les cellules des crêtes neurales du mésenchyme céphalique de la région du mésencéphale et du premier arc pharyngien (ou arc mandibulaire) ainsi que la région fronto-nasale de l'embryon expriment le gène *Otx2*. C'est d'elles que dérivent certains os du crâne (Kuratani et al. 1997; Matsuo et al. 1995). Des défauts de développement cranio-facial apparaissent dans le cas de mutants hétérozygotes $Otx2^{+/-}$, décrits sous le terme d'otocéphalie (Hide et al. 2002).

Le gène *Otx2* intervient dans la différenciation des types neuronaux du mésencéphale ventral en contrôlant les domaines d'expression des facteurs Shh, Nkx2.2 et Nkx6.1. En son absence, le domaine Shh à l'origine des neurones dopaminergiques est étendu au détriment du domaine Nkx (Puelles et al. 2004). De plus, Otx2 contrôle directement la neurogenèse de sous-types neuronaux de l'aire tegmentaire ventrale exprimant l'aldéhyde déshydrogénase *Ahd2* et/ou la Calbindine *D28K* dans cette région (Di Giovannantonio et al. 2013).

Les gènes de la famille Otx sont exprimés plus fortement au niveau des voies de passage des fibres lors de l'établissement des tracés nerveux vers E10,5. L'organisation de ces dernières est perturbée chez des mutants hétérozygotes $Otx2^{+/-}$ (Suda et al. 1996). Une

régulation très fine de son niveau d'expression est requise, lui permettant notamment de modifier le niveau d'expression de molécules d'adhésion (Nguyen Ba-Charvet et al. 1999). De même, des molécules de guidage axonal telles que l'éphrine A2 ne sont pas exprimées par les cellules mutantes pour le gène *Otx2* dans des embryons chimères (Rhinn et al. 1999).

Les plexus choroïdes expriment également le gène *Otx2* de façon importante, y compris à l'âge adulte (Courtois et al. 2003). Leur fonction est de réguler la composition du fluide cérébrospinal qui contient également des molécules signal importantes pour le développement du cerveau. La mutation conditionnelle du gène *Otx2* a des effets importants sur le développement des plexus choroïde à E9 et pour son maintien dès E15, altérant également la composition du fluide cérébrospinal (Johansson et al. 2013). Dans le cortex cérébral, la voie Wnt se trouve alors suractivée et oriente les cellules vers un auto-renouvellement et une prolifération de cellules souches plutôt que vers une différenciation.

En conclusion, le gène *Otx2* exerce de multiples fonctions moléculaires qui s'étagent tout le long du développement de structures nerveuses et sensorielles très diverses : migration cellulaire, induction de signalisation, contrôle de l'identité de territoires et de types neuronaux, maturation de cellules différenciées et maintien à long terme de structures et réseaux du système nerveux central.

7) PATHOLOGIES ASSOCIEES

Les fonctions développementales du gène *Otx2* semblent très conservées entre les différentes espèces, et des pathologies cohérentes avec celles-ci ont pu être liées à des disfonctionnements du gène *OTX2* humain. Deux grands types d'anomalies sont rencontrés :

- une perte partielle d'expression ou de fonction associée à des défauts oculaires et des anomalies cérébrales (figure 7)
- une surexpression dans un pourcentage élevé de médulloblastomes, tumeurs dérivées de la région formant le cervelet (Beby et al., 2013).

Chez l'homme, le gène *OTX2* est exprimé très tôt dans le cerveau en développement (Larsen et al. 2010), dès la 7ème semaine, au niveau du diencéphale et du mésencéphale. Il est également retrouvé plus tardivement, dans la rétine en développement (Larsen et al. 2009) dans le RPE, où son niveau maximal d'expression est détecté aux jours 48-54.

Une large délétion au niveau du chromosome 14, couvrant les gènes codant BMP4, OTX2, RTN1, SIX6, SIX1, et SIX4 est à l'origine de défauts de l'hypophyse qui présente une hypoplasie, une réduction du développement des yeux (microphtalmie) pouvant aller jusqu'à leur absence complète (anophtalmie) et des anomalies de développement de l'oreille interne (Nolen et al. 2006).

Les défauts de l'hypophyse sont retrouvés chez des patients porteurs de mutations ponctuelles à l'état hétérozygote touchant seulement le gène *OTX2* (Dateki et al. 2010; Diaczok et al. 2008; Tajima et al. 2009). Dans la plupart des cas, les mutations causent une réduction ou une perte complète des fonctions transcriptionnelles de la protéine OTX2 à partir d'un allèle, conduisant donc à une haplo-insuffisance (Chatelain et al. 2006).

Le phénotype majeur rencontré chez les personnes affectées par les mutations hétérozygotes du gène *OTX2* consiste en des anomalies oculaires sévères (microphtalmies uni ou bi-latérales) fréquemment associées à un retard mental (Henderson et al. 2007; Ragge et al. 2005; Schilter et al. 2011). Dans certains cas, les phénotypes sont plus marqués et on observe une absence complète d'un ou deux yeux (Dateki et al. 2008; You et al. 2012). Lorsque les effets des mutations sont plus sévères, des défauts associés à la rétine apparaissent, comme dans le cas d'une mutation non-sens (Henderson et al. 2009) dans laquelle une dystrophie rétinienne accompagne les défauts de l'hypophyse. Des mutations ponctuelles du gène *OTX2* sont aussi associées à des anomalies de développement du cristallin, de l'iris, de la choroïde ou de la rétine appelées colobomes (Gonzalez-Rodriguez et al. 2010; Wyatt et al. 2008). Dans les cadre du conseil génétique aux familles, des tests de détection de ces pathologies à l'aide de techniques de séquençage de nouvelle génération permettant de détecter les polymorphismes simple nucléotide sont aujourd'hui utilisées (Jimenez et al. 2011).

D'autres défauts ont également été décrits : anomalies du développement cranio-facial avec hypoplasie mandibulaire allant jusqu'à l'absence de mâchoire (agnathie) chez un mutant *OTX2* (Kamnasaran et al. 2010), associée à une réduction du crâne (otocéphalie) et à un défaut de position des oreilles (Chassaing et al. 2012). Enfin il a été montré que des défauts d'expression ou de fonction du gène *OTX2* étaient associés à des pathologies des circuits émotionnels, causant en particulier des troubles bipolaires (Sabunciyan et al. 2007).

Ainsi la plupart des structures dans le développement desquels Otx2 est impliqué chez la souris semblent affectées par des pathologies connues chez l'humain en cas de défauts d'expression et/ou de fonction du gène *OTX2*.

A l'opposé des situations précédentes correspondant à une perte partielle ou complète de fonction, il existe une affection tumorale de la rétine, le rétinoblastome, dans laquelle le facteur OTX2 a été trouvé à un niveau surabondant par rapport à celui d'une rétine normale (Glubrecht et al. 2009). Aucune corrélation n'a pour le moment été établie entre cette surproduction et la pathologie.

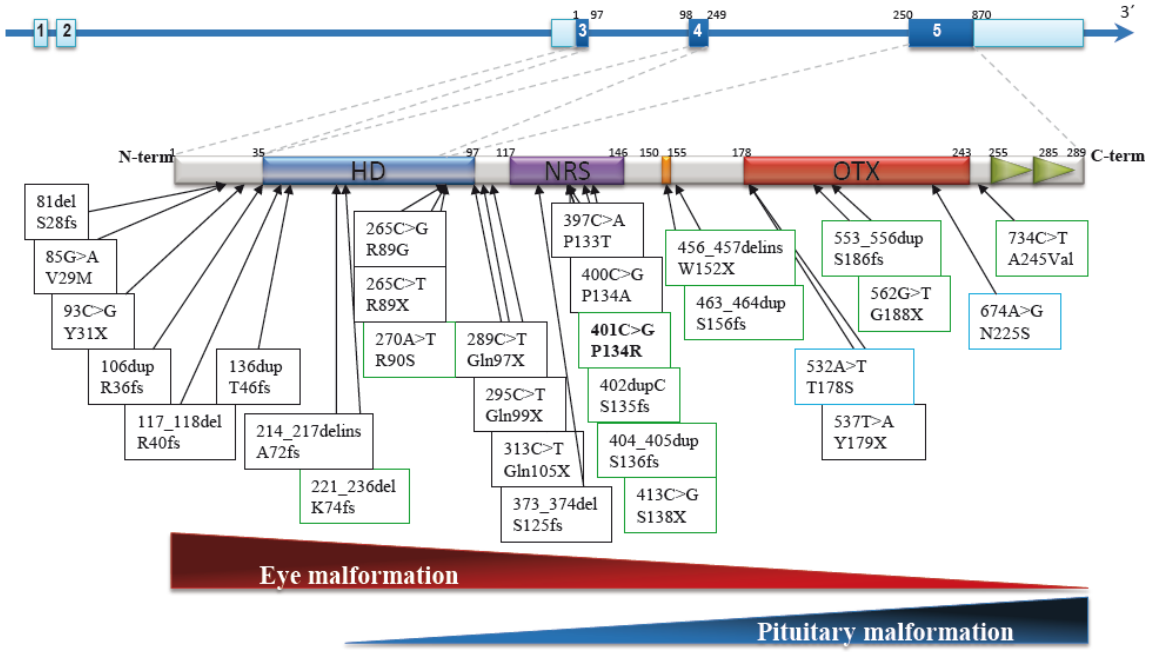


Figure 7 : Localisation des mutations à l'origine de pathologies sur la protéine *OTX2*

Chaque boîte représente une mutation répertoriée : la ligne du haut indique la position nucléotidique de la mutation sur l'ADNc, la base A du premier codon ATG correspondant au nucléotide 1, la ligne du bas indique les changements d'acides aminés selon le code à 1 lettre (fs : frame shift, X : codon stop). Les patients présentant exclusivement des défauts au niveau de l'œil sont représentés par des boîtes noires, ceux ayant des défauts de l'hypophyse par des boîtes bleues. Les patients représentés par des boîtes vertes ont les deux types de défauts.
Les triangles horizontaux représentent les gradients des phénotypes oculaires et hypophysaires décrits chez les patients présentant des mutations au locus *OTX2*.
Adapté de Gorbenko Del Blanco et al. (2012).

Une autre situation pathologique très fortement liée à une dérégulation de l'expression du gène *OTX2* concerne le médulloblastome. Cette affection tumorale représente le principal cancer infantile d'origine nerveuse. Il se développe à partir du cervelet, souvent dans la petite enfance. Un dérèglement du gène *OTX2* est très vite apparu comme une cause potentielle car les cellules issues de médulloblastomes possédaient des duplications géniques dans la région où se trouve le gène codant cette protéine (Boon et al. 2005). D'autres études sont venues confirmer son implication (Di et al. 2005) et indiquent un lien

direct avec la régulation du cycle cellulaire dans les cellules tumorales (Bunt et al. 2012). Cependant, le gène *OTX2* n'intervient pas dans tous les types de médulloblastomes, mais serait lié aux sous-groupes indépendants de la voie SHH (Adamson et al. 2010; de Haas et al. 2006).

II) LA RETINE DE SOURIS ADULTE

Parmi toutes les fonctions connues du facteur de transcription Otx2, il en est une qui revêt un intérêt particulier : celle qu'il joue dans la rétine. Le gène *Otx2* est actif depuis les stades précédant l'ébauche de cet organe et il participe à toutes les étapes de développement aboutissant à un œil fonctionnel. Plus étonnant pour un gène de développement, une fois l'œil mis en place, l'expression d'*Otx2* persiste dans plusieurs types cellulaires de la rétine et s'y maintient toute la vie, sa fonction y étant jusqu'alors méconnue.

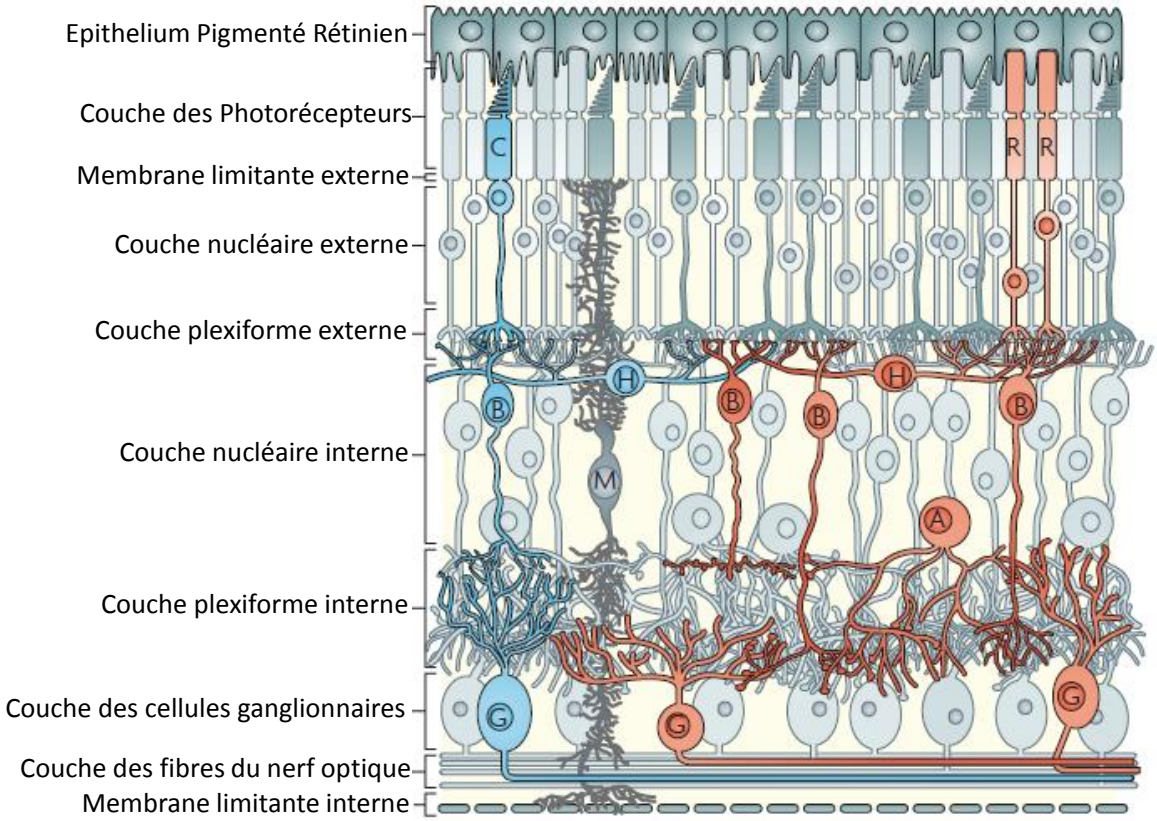


Figure 8 : Organisation de la rétine de vertébré

Les différentes couches de la rétine sont représentées avec les types cellulaires qui la composent, dans le sens de la traversée des photons, G : cellules ganglionnaires, A : cellules amacrines, B : cellules bipolaires, H : cellules horizontales, R : bâtonnets, C : cônes. Les cellules de la glie de Müller, traversant toutes ces couches, sont également représentées (M). Adapté de Swaroop et al. (2010).

A) STRUCTURE DE LA RETINE DE SOURIS

La rétine est un organe sensoriel formé par l'évagination du tube neural antérieur et dont le développement obéit à des caractéristiques très proches de celles de l'encéphale. C'est donc un « cerveau tourné vers l'extérieur » qui possède une organisation simple avec un faible nombre de types neuronaux regroupés en couches homogènes. Par son organisation très bien décrite et sa grande accessibilté, elle consititue un modèle d'étude très intéressant du système nerveux. Cette fine structure, qui mesure 200 micromètres d'épaisseur chez l'homme, tapisse le fond de l'œil entre l'humeur vitrée et la choroïde, et s'organise en deux structures principales qui sont la rétine pigmentée et la rétine neurale.

1) LA RETINE NEURALE

La rétine neurale correspond à la partie sensorielle de la rétine. Elle est constituée de couches cellulaires permettant de percevoir, intégrer et transmettre l'information visuelle au cerveau. De l'intérieur vers la périphérie, la rétine neurale comprend la couche des cellules ganglionnaires dont la réunion des axones forme le nerf optique, la couche nucléaire interne composée des cellules bipolaires, amacrines et horizontales, et la couche nucléaire externe qui renferme les noyaux des photorécepteurs (Figure 8). Ces dernières cellules possèdent un long segment externe, dérivé du cil primaire, et spécialisé dans la conversion du signal lumineux en signal chimique. La lumière va traverser toutes ces couches avant de heurter les segments externes des photorécepteurs, dans la couche la plus périphérique de cette rétine neurale. Chez les vertébrés, il en existe deux types : les cônes permettant la vision photopique précise en couleur, et les bâtonnets responsables de la vision scotopique, à basse intensité lumineuse. Le signal nerveux prend naissance au niveau du photorécepteur. Il est produit par une hyperpolarisation déclenchée par l'interaction des photons avec les photopigments insérés dans les disques des segments externes. Les cônes contiennent trois variétés de ces opsines (bleue, verte et rouge) alors que les bâtonnets ne contiennent qu'un seul pigment : la rhodopsine (sensible à 500nm). Les molécules de la famille des opsines possèdent sept domaines transmembranaires, le dernier d'entre eux étant lié au 11-cis rétinal, dérivé de la vitamine A. En absorbant un photon, le 11-cis rétinal passe en forme tout-trans qui va activer la transducine, une protéine G (Figure 9). Cette dernière active la phosphodiestérase qui hydrolyse le GMP cyclique cytoplasmique pour le convertir en GMP. La chute du taux de GMP cyclique entraîne la fermeture de canaux sodiques et l'hyperpolarisation membranaire. Il en résulte une diminution de la libération de glutamate de la part des photorécepteurs vers les cellules bipolaires qui convertissent cette information en

message nerveux. Une amplification importante favorise une très grande sensibilité de la perception lumineuse puisqu'un seul photon modifie la conformation d'une opsine, qui active une centaine de transducines et autant de phosphodiestérases, chaque phosphodiestérase hydrolysant plus d'un millier de molécules de GMP cyclique.

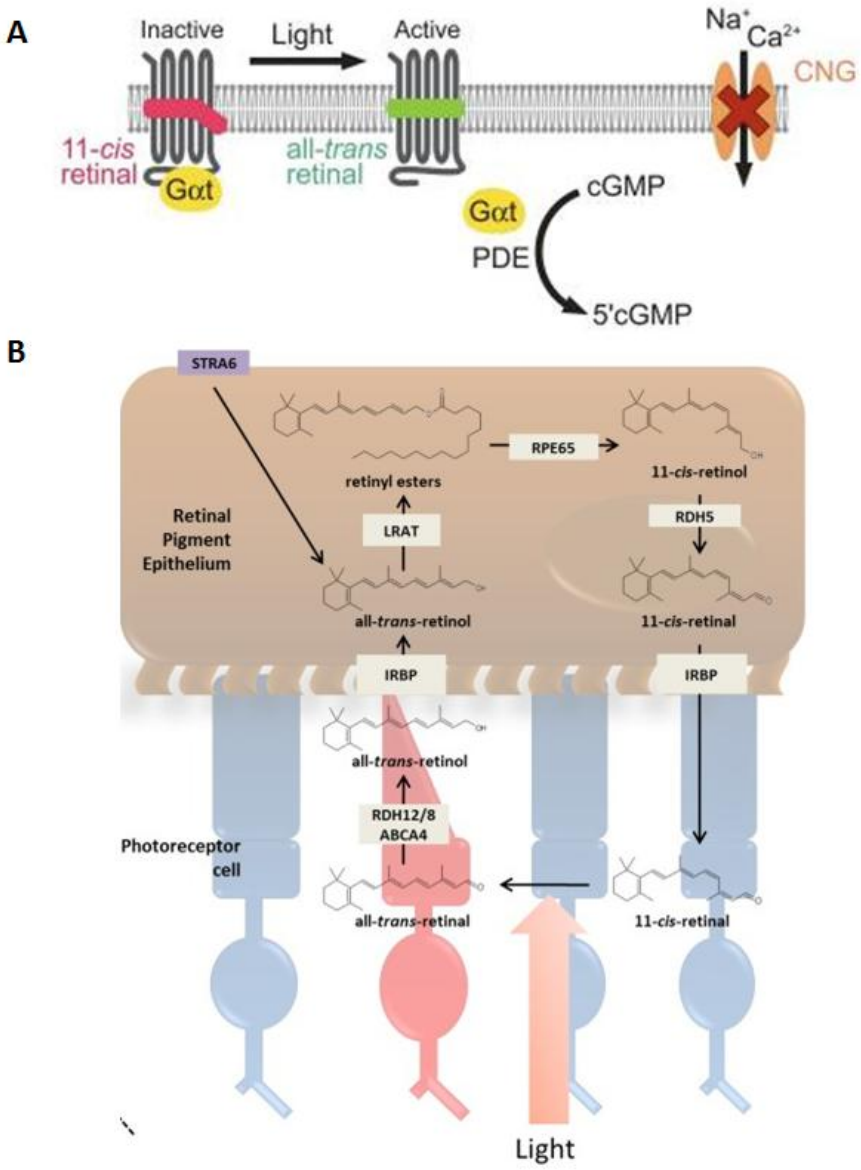


Figure 9 : Phototransduction dans la rétine de vertébré

A. Au niveau du photorécepteur, une métarhodopsine sensible à la lumière, le rétinal, déclenche l'activité de la protéine G transducine. Celle-ci active à son tour une phosphodiesthérase, hydrolysant le GMPc et induisant ainsi la fermeture de canaux ioniques de type CNG (cyclic nucleotide-gated). Ceci conduit à l'hyperpolarisation de la cellule.
B. Le rétinal passé sous forme tout trans doit être recyclé. Il est transporté hors de la cellule par le transporteur ABCA4 liant l'ATP, et réduit grâce à l'activité de RDH8 et RDH12. Il diffuse alors dans le RPE où il est esthérifié par la LRAT (lecithin retinol acyltransferase) et stocké dans le rétinosome. Une protéine spécifique du RPE de 65 kDa (RPE65) va l'isomériser avant oxydation sous l'action de RDH5. Le 11-cis-rétinal ainsi formé peut diffuser dans le photorécepteur où il se combine à l'opsine pour régénérer le pigment visuel.
IRBP, interphotoreceptor retinoid-binding protein; Stra6, stimulated by retinoic acid gene 6.
Adapté de Hatori and Panda (2010) et Perusek and Maeda (2013).

La couche nucléaire interne contient les interneurones connectés aux photorécepteurs, les synapses se trouvant au niveau de la couche plexiforme externe. Ils sont de trois types : cellules bipolaires, horizontales et amacrines. Ce sont les cellules bipolaires qui permettent la transduction du signal nerveux, et on en distingue deux types morphologiques et fonctionnels distincts. Les cellules bipolaires « OFF », expriment le récepteur au glutamate de type AMPA et/ou kaïnate au niveau des dendrites, et sont donc dépolarisées dans le noir. Celles de type « ON » expriment le récepteur mGluR6 qui maintient le canal Trpm1 fermé dans le noir, celui-ci dépolarisant la cellule à la lumière (Nawy and Jahr 1990; Shiells and Falk 1990). Deux types de champs sont ainsi produits, ceux de type « ON » étant stimulés lorsque le centre est à la lumière, et ceux de type « OFF » l'étant à lorsque le centre est à l'obscurité. Les cellules amacrines établissent des connexions avec un grand nombre de cellules bipolaires, permettant d'une part un premier traitement spatial des signaux et d'autre part d'accroître la sensibilité aux faibles luminances.

La couche des cellules ganglionnaires contient, en plus des cellules ganglionnaires, certaines cellules amacrines dites déplacées. Les cellules ganglionnaires vont permettre d'acheminer le signal nerveux au cerveau : leurs axones se rejoignent pour former le nerf optique.

Un raffinement la classification de ces 6 types de cellules neurales a permis de distinguer non moins de 50 sous-types cellulaires différant par leur arborisation dendritique, la position de leurs connexions synaptiques, ou encore par l'expression de marqueurs spécifiques (Masland 2001). Enfin un type de cellules gliales, les cellules de Müller, traverse toute la rétine neurale jusqu'au photorécepteur.

2) LA RETINE PIGMENTEE

La rétine pigmentée, ou RPE (retinal pigment epithelium), est une monocouche épithéliale située du côté basal de la rétine neurale. Elle est intimement liée aux segments externes des photorécepteurs. Dotée d'un grand nombre d'organelles renfermant la mélanine, les mélanosomes, elle absorbe la lumière non captée par les photorécepteurs, limitant la diffusion lumineuse au fond de l'œil, ce qui permet d'accroître l'acuité visuelle. Elle approvisionne les photorécepteurs en nutriments tels que glucose, acide gras et rétinol prélevés au pôle basal, où elle évacue également les déchets métaboliques provenant de l'espace sous-rétinien. Elle possède un rôle important dans le renouvellement des segments externes. : les disques neufs sont générés à la base des segments externes, et les plus

anciens sont desquamés à l'extrémité distale, avant d'être activement phagocytés par la rétine pigmentée. Cet entretien nécessite une capacité de phagocytose très puissante car 10% des disques sont changés quotidiennement. La rétine pigmentée produit des molécules anti-oxydantes dont le rôle est de désactiver les radicaux libres produits par ce processus. Enfin elle permet de maintenir l'excitabilité des photorécepteurs : le tout-trans rétinol est acheminé vers la rétine pigmentée où il est isomérisé en 11-cis rétinal avant d'être renvoyé aux photorécepteurs par un jeu de réactions enzymatiques et un système spécifique de transport appelé « cycle visuel ». La stabilité de la concentration ionique dans l'espace sous-rétinien, qu'elle assure également, est indispensable pour le bon fonctionnement des photorécepteurs.

Ainsi les deux structures de la rétine sont intimement liées l'une à l'autre pour permettre un fonctionnement correct de la perception visuelle.

B) DEVELOPPEMENT DE LA RETINE DE SOURIS

Le développement de la rétine est un processus très finement contrôlé et régulé qui s'étend de la période embryonnaire (E8) jusqu'au-delà de la naissance (P20), pour parvenir à un agencement efficace et cohérent.

Au jour embryonnaire E8,0, dès la formation de la plaque neurale, avant même la fermeture du tube neural, un champ oculaire est défini par l'expression des facteurs de transcription *Pax6, Rx1, Six3, Lhx2, Tl1, ET,* et *Six6* (Zuber et al. 2003). Leur expression est modulée par des facteurs extrinsèques tels que le morphogène Shh, et se localise dans la partie médiane de la plaque neurale. Au moment de la fermeture du tube neural, autour du jour embryonnaire E8,5, deux vésicules optiques émergent du prosencéphale. Des facteurs de la famille FGF (Fgf8) ou TGF-β (Bmp4) induisent la compartimentation du neuroépithélium en pédoncule optique présomptif dorsal et ventral exprimant le gène *Pax2*, en RPE présomptif exprimant les gènes *Otx2* et *Mitf* et en rétine neurale présomptive exprimant le gène Chx10 (Crossley et al. 2001). Les territoires présomptifs du neuroépithélium gardent cependant une certaine plasticité, la rétine neurale présomptive, ventrale, restant compétente pour devenir de la rétine pigmentée (Westenskow et al. 2010) et inversement (Stroeva and Mitashov 1983). Chez la souris, l'expression de *Mitf* est présent dans l'intégralité de la vésicule optique avant de se restreindre au RPE présomptif pendant que celle de *Chx10* apparaît dans la rétine neurale présomptive (Green et al. 2003; Sigulinsky et al. 2008).

Ces vésicules vont croître jusqu'à toucher l'ectoderme de surface avant de former la cupule optique à E10,5 à l'origine des différentes couches de la rétine ainsi que du nerf optique (Chow and Lang 2001). Simultanément, au niveau de leur point de contact, l'ectoderme s'épaissit pour former la placode cristallinienne qui donnera naissance au cristallin. La cupule optique va former le globe oculaire à E13,5 par la fermeture de la fissure optique (Larsen and Dhem 1996).

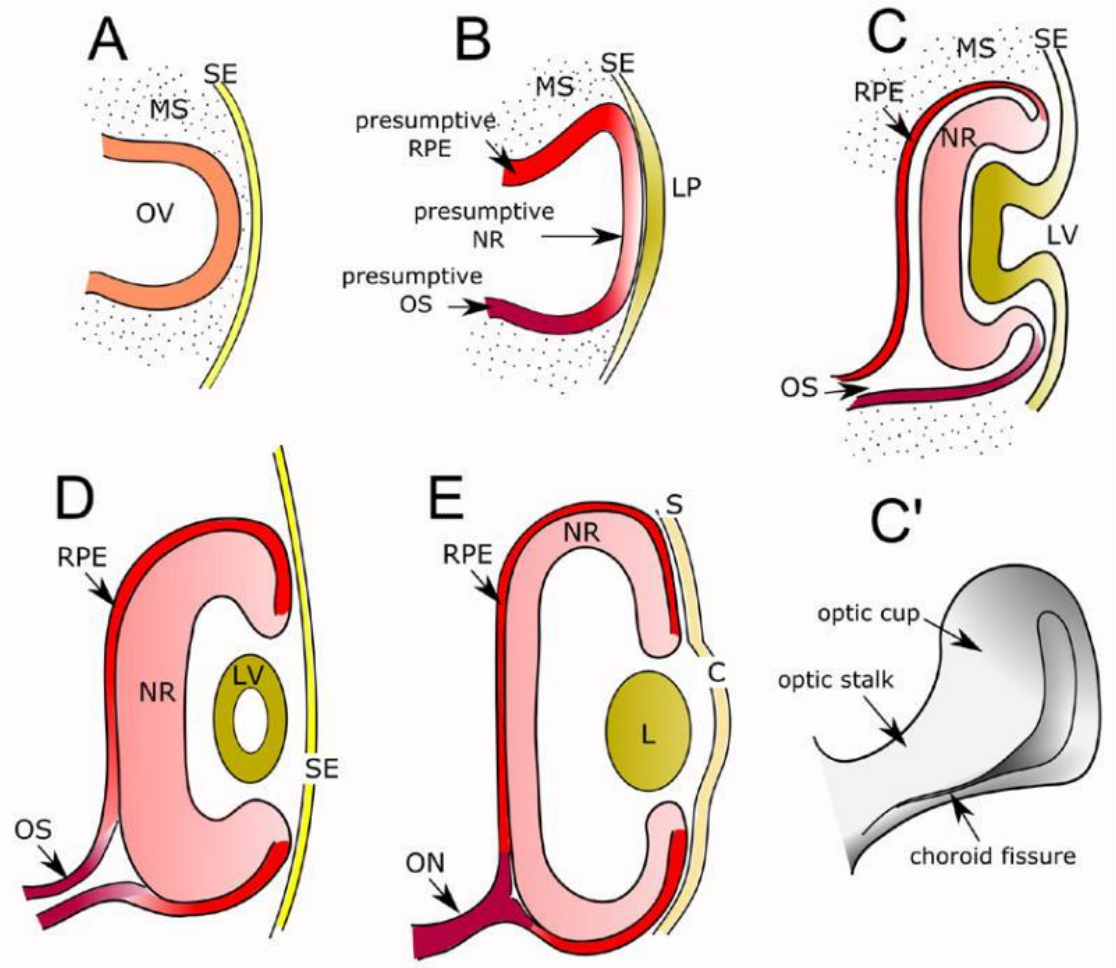


Figure 10 : Développement de l'œil de vertébré

A. Une évagination du télencéphale est à l'origine de la vésicule optique.
B. La vésicule optique est définie en territoires présomptifs du RPE, de la rétine neurale, et du pédoncule optique au contact de l'ectoderme de surface, qui formera la placode cristallinienne.
C. La vésicule optique donne naissance à la cupule optique par invagination, de la même façon que la placode à l'origine de la vésicule cristallinienne.
C'. La région ventrale de la vésicule optique forme la fissure choroïde.
D-E. Maturation de la cupule optique. Le pédoncule optique donne l'enveloppe du nerf optique, et l'ectoderme de surface adjacent au cristallin donne naissance à la cornée.
Abréviations: C: Cornée; L: Cristallin; LP: placode cristallinienne; LV: vésicule cristallinienne; MS: Mésenchyme; NR: Rétine neurale; ON: Nerf optique; OS: Pédoncule optique; OV: vésicule optique; RPE: rétine pigmentée; S: Sclérotique; SE: Ectoderme de surface. Adapté de Canto-Soler and Adler (2006).

1) SPECIFICATION DE LA RETINE PIGMENTEE

L'acteur majeur de la différenciation du RPE est Mitf (Microphthalmia transcription factor). C'est un facteur de transcription jouant un rôle fondamental et conservé pour la différenciation des types cellulaires producteurs de mélanine de la peau et de l'œil tels que les mélanocytes dérivés de la crête neurale ou encore le RPE. Dans les mélanocytes, l'isoforme M est exprimée tandis que dans les cellules du RPE, ce sont ses isoformes A, H et D qui sont exprimées (Hodgkinson et al. 1993; Nguyen and Arnheiter 2000; Widlund and Fisher 2003). Sans lui, la rétine pigmentée devient hyperproliférative et non pigmentée, adoptant un destin de rétine neurale (Nguyen and Arnheiter 2000). Inversement, son expression dans la rétine neurale provoque un phénotype pigmenté (Martinez-Morales et al. 2005).

A côté de son rôle dans l'induction du destin de rétine pigmentée, le facteur de transcription Mitf contrôle des fonctions différenciées des cellules de RPE, comme l'expression des gènes codant les principales enzymes de la mélanogenèse : Tyr, Tyrp1, PmeI/Si (Martinez-Morales et al. 2003). Des études menées sur les mélanocytes issus de la crête neurale indiquent également que l'expression du gène *Mitf* est en lien étroit avec la voie Wnt (Saito et al. 2002; Yasumoto et al. 2002). Des effecteurs de la voie Wnt dite canonique, les facteurs de transcription LEF-1 et TCF-1, sont exprimés dans le RPE. Si celle-ci est inhibée spécifiquement dans le RPE, des défauts de développement et des malformations importantes apparaissent (Westenskow et al. 2009). En particulier, la rétine pigmentée perd l'expression de *Mitf* et *Otx2* et adopte un destin plus neural. La β -caténine, effecteur de la voie Wnt, se lie à proximité des sites TCF/LEF dans les enhancers de ces deux gènes. Des signaux extérieurs activant la voie Wnt sont donc importants pour la bonne spécification de la rétine pigmentée.

La formation du RPE dépend de facteurs extrinsèques comme l'acide rétinoïque. En effet, lorsque les récepteurs à l'acide rétinoïque sont mutés (Matt et al. 2008; Mori et al. 2004), le RPE est incapable de se former. Des éléments de réponse à cette signalisation ont été identifiés et sont également nécessaires à la formation du RPE, notamment le facteur de transcription Pitx2 qui est indispensable très précocement, pour former la cupule optique (Evans and Gage 2005; Kitamura et al. 1999), et AP-2 (Bassett et al. 2007; Moser et al. 1997; Zhou and Kochhar 2003).

D'autres signaux sont également requis, dont une signalisation en provenance du mésenchyme extra-oculaire. En effet, ce mésenchyme est essentiel pour la bonne mise en place du RPE. La signalisation TGF-β semble être responsable de cette interaction tissulaire, comme cela a été montré par culture d'explants chez le poulet (Fuhrmann et al. 2000). En effet, en absence de mésenchyme, le territoire présomptif de la rétine pigmentée n'exprime plus des gènes caractéristiques comme *Mitf*, *MMP115* et *Wnt13*. Un agoniste de la voie du TGF-β, l'activine, permet alors de restaurer leur expression correcte. Plus tardivement, la signalisation BMP permet de renforcer les identités de rétine neurale et de rétine pigmentée, la surexpression d'un antagoniste entraînant de sévères altérations de la cupule optique ventrale, comme par exemple la substitution de marqueurs du RPE par des marqueurs du pédoncule optique tels que *Pax2* (Muller et al. 2007).

En conclusion, la formation de l'épithélium pigmenté de la rétine dépend d'une signalisation Wnt très précoce, qui active l'expression d'un déterminant majeur, le facteur de transcription Mitf. Ce dernier confère une identité de rétine pigmentée au neuroépithélium, identité stabilisée par la suite par l'action d'une signalisation TGF-β/BMP. Nous verrons plus loin qu'un autre facteur de transcription, Otx2, joue également un rôle important dans ce processus.

2) SPECIFICATION DE LA RETINE NEURALE

Une autre partie du champ oculaire précédemment décrit va donner naissance à la rétine neurale. Dans le territoire exprimant *Pax6, Rx1, Six3, Lhx2, Tl1, ET,* et *Six6*, sous l'influence des voies FGF, un territoire présomptif donnant naissance à la rétine neurale apparaît.

Le gène *Chx10* a été montré comme y étant spécifiquement exprimé (Liu et al. 1994). Son expression n'est par la suite maintenue que dans les cellules bipolaires. En son absence, les rétines ne possèdent pas de cellules bipolaires et on peut observer des microphtalmies. Son action semble être de réprimer l'expression de *Mitf*, tandis que *Pax6*, également exprimé dans cette région, est plutôt requis pour la pluripotence des cellules progénitrices (Bharti et al. 2008).

Des signaux extérieurs sont également responsables du développement de la rétine neurale, et notamment la famille FGF dont les récepteurs et les ligands sont abondamment exprimés dans les tissus oculaires et extra-oculaires (Vogel-Hopker et al. 2000). Chez le poulet, l'ablation de l'ectoderme entraîne des défauts de développement de la rétine avec un

manque d'expression de marqueurs neuronaux (Pittack et al. 1997). L'ajout d'une source externe de facteurs FGF permet de restaurer un développement normal (Hyer et al. 1998). Chez la souris, un mutant *Fgf9* présente également une extension du domaine du RPE (Zhao et al. 2001).

Plus récemment, des mutants conditionnels pour le gène codant la phosphatase Shp2 à des stades précoces de développement, requis pour activer la voie FGF, se sont avérés incapables d'induire l'expression de *Chx10*. Ainsi, Mitf s'est trouvé présent dans toute la rétine entraînant une spécification généralisée de type RPE dans toute la cupule optique (Cai et al. 2010). Ce phénotype a pu être contré par l'activation des FGF par une autre voie indépendante de *Shp2*, par activation ectopique de *Ras*.

De plus, l'activation ectopique de la voie MAP kinase FGF a permis d'induire un destin de type neural dans la rétine pigmentée, avec obtention de cellules ganglionnaires et photorécepteurs en lieu et place du RPE. Cependant, il n'a pas été possible de reproduire ce résultat dans des souris mutantes pour *Chx10* (Horsford et al. 2005). Les signaux FGF sont donc essentiels pour enclencher l'expression de *Chx10*, permettant ainsi de spécifier le destin de rétine neurale.

3) DEVELOPPEMENT

Une fois que les précurseurs ont acquis leur identité, une phase proliférative précède leur différenciation post-mitotique et leur organisation en couches. Chez tous les vertébrés, l'ensemble des types cellulaires de la rétine dérive de précurseurs rétiniens multipotents (Livesey and Cepko 2001). Les différents types cellulaires se forment par vagues successives et chevauchantes avec deux grandes phases : une phase précoce où les précurseurs quittant le cycle cellulaire forment les cellules ganglionnaires, les cellules horizontales, les cellules amacrines et les photorécepteurs cônes, et une phase plus tardive où se mettent en place les photorécepteurs bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules gliales de Müller. Chez la souris, les cellules ganglionnaires apparaissent dès E11, suivies ensuite par les autres types cellulaires, comme indiqué dans la figure 10. Le développement se fait du centre vers la périphérie. A chaque instant du développement rétinien, la rétine centrale est donc plus avancée que la rétine périphérique, et ce jusqu'à la fin du développement à P7. Les cellules vont ensuite établir leurs synapses et poursuivre leur maturation jusqu'à P21.

C'est une combinatoire entre facteurs de transcription qui va permettre de définir chaque type cellulaire. Ceux exprimés dans les précurseurs, comme *Chx10, Pax6, Six6* et *Rax* restent importants (Agathocleous and Harris 2009). Certains facteurs de transcription sont associés à un type cellulaire précis : Nrl pour les bâtonnets (Mears et al. 2001), Math5/Atoh7 pour la spécification des cellules ganglionnaires (Brown et al. 2001; Wang et al. 2001), et Chx10 pour les cellules bipolaires (Burmeister et al. 1996). Mais une combinatoire permet des spécifications différentes : Chx10 seul amène à la formation de neurones de l'INL, alors que combiné à Ascl1 et Neurod4 il permet la formation de cellules bipolaires (Hatakeyama et al. 2001).

Enfin, une fois la rétine formée, les cellules de la glie de Müller sont les seules à encore exprimer des gènes de précurseurs rétiniens. Elles peuvent alors être impliquées dans la réparation du tissu lors de blessures. Ceci est vrai chez le poisson (Bernardos et al. 2007), mais le potentiel régénérateur de cette glie est fortement réduit chez le mammifère (Lamba et al. 2008). La propagation *in vitro* à partir de cellules de Müller de mammifères a cependant été réalisée (Agathocleous and Harris 2009).

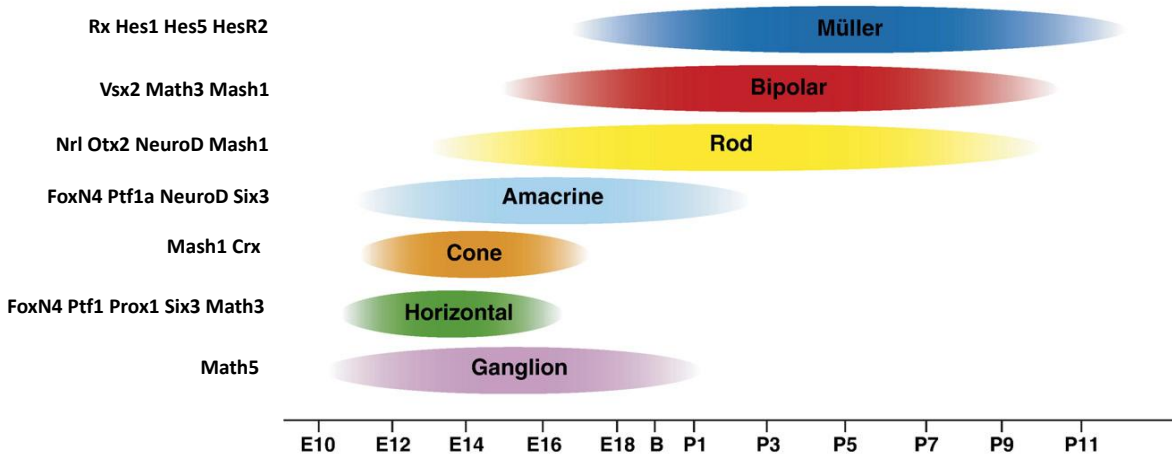


Figure 11 : Différenciations successives des types cellulaires de la rétine

Les 7 types cellulaires composant la rétine se différencient par vagues successives et parfois chevauchantes tout au long du développement embryonnaire. On distingue principalement deux vagues, la première débutant vers E12 sera à l'origine des cellules amacrines, des cônes, des cellules horizontales et des cellules ganglionnaires. La seconde vague est plus tardive, initiée vers E16, elle se poursuit après la naissance pour former les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules de Müller. Les déterminants géniques de ces types cellulaires sont indiqués à gauche.
Adapté de Ohsawa and Kageyama (2008).

C) OTX2 DANS LA RETINE

Le facteur de transcription Otx2 est exprimé très précocement, après induction de la plaque neurale, permettant de déclencher la formation de l'œil en levant la répression exercée par Noggin (Zuber et al. 2003). Les deux autres membres de la famille Otx sont également exprimés dans l'œil en formation, *Otx1* dès le stade de la vésicule optique et *Otx5/Crx* vers E12,5 chez l'embryon de souris. A l'âge adulte, *Otx2* est encore exprimé au niveau du RPE, des cellules bipolaires et des photorécepteurs au développement desquels il a contribué (Fossat et al. 2007).

1) LA RETINE PIGMENTEE

L'action conjointe d'*Otx1* et *Otx2* est requise pour spécifier le RPE, comme l'indiquent des études de souris mutantes homozygotes ou hétérozygotes pour les deux gènes (Martinez-Morales et al. 2001; Matsuo et al. 1995). Des malformations de l'œil apparaissent alors, et les activités *Mitf* et *Tyrosinase*, spécifiques du RPE, sont grandement réduites alors que les domaines d'expression de gènes typiques de la rétine neurale tels que *Pax2*, *Pax6*, *Chx10* et *Six3* sont étendus au territoire présomptif de la rétine pigmentée. L'expression du gène *Otx2* dans les cellules en culture issues du territoire présomptif de la rétine neurale permet donc de transformer celles-ci en cellules caractéristiques de la rétine pigmentée (Martinez-Morales et al. 2003).

Son action est conjointe à d'autres facteurs de transcription, puisqu'il faut éliminer complètement *Otx1* pour observer des phénotypes chez un mutant hétérozygote pour *Otx2*. Ceci démontre un phénomène de dosage des protéines Otx. Une quantité minimale de protéine Otx2 ou Otx1 est suffisante pour la détermination précoce de la rétine pigmentée. En-dessous de cette dose, le phénotype alors obtenu est très proche de celui d'un mutant *Mitf* : le RPE présomptif demeure non pigmenté et hyperprolifératif, adoptant *in fine* un destin de rétine neurale (Mochii et al. 1998; Nakayama et al. 1998; Nguyen and Arnheiter 2000). La protéine Otx2 interagit avec Mitf en formant un complexe avec Sox9 (Masuda and Esumi 2010). Cette interaction est requise pour permettre l'expression correcte de gènes spécifiques du RPE, tels que le gène *Best1* codant la bestrophine et impliqué dans des formes de dystrophies maculaires (Esumi et al. 2009).

2) LES PHOTORECEPTEURS

L'expression du gène *Otx2* n'est cependant pas restreinte au RPE, puisque ce facteur de transcription est également présent transitoirement dans tous les types cellulaires au cours de leur dernière division cellulaire (Baas et al. 2000). Cette expression est maintenue dans les photorécepteurs et dans les cellules bipolaires (Brzezinski et al. 2010). L'expression du gène *Blimp1* distingue ces deux derniers types cellulaires, puisqu'en son absence les photorécepteurs acquièrent un destin bipolaire, avec expression de marqueurs spécifiques tels que *Chx10* ou *Vsx1* (Katoh et al. 2010).

Dans les photorécepteurs, *Otx2* induit l'expression de son paralogue *Crx* à E12,5 (Koike et al. 2007; Nishida et al. 2003). Ce dernier est requis pour la formation des segments externes des photorécepteurs et l'expression les gènes responsables de la phototransduction. En absence de *Crx*, les photorécepteurs vont rapidement dégénérer après la naissance (Furukawa et al. 1999). Le facteur Crx est capable de se lier et de transactiver les promoteurs de gènes spécifiques des photorécepteurs tels que les gènes *Irbp* et *Rho* (Akagi et al. 2005). Sa surexpression dans les progéniteurs rétiniens réduit la proportion de cellules amacrines et de la glie de Müller au profit des bâtonnets (Furukawa et al. 1997). L'ensemble des sites de liaison du facteur de transcriptionCrx a récemment été identifié (Corbo et al. 2010), permettant ainsi de comprendre ses mécanismes d'action qui impliquent une combinatoire de plusieurs sites de liaison pour un même gène cible.

L'invalidation conditionnelle du gène *Otx2* dans les précurseurs des photorécepteurs et des cellules bipolaires, induite grâce au promoteur du gène *Crx*, perturbe la spécification des précurseurs rétiniens exprimant ce gène *Otx2*. La proportion des différents types cellulaires dans la rétine se trouve profondément modifiée : une forte augmentation du nombre de cellules amacrines (révélées par les marqueurs Pax6 et Hpc-1) est observée au détriment des photorécepteurs, puisqu'aucune cellule exprimant la rhodopsine n'est plus détectée (Nishida et al. 2003). L'interprétation de ce résultat est que l'expression du gène *Otx2* oriente ces précurseurs vers un destin de photorécepteur, alors qu'ils possèdent un destin amacrine par défaut. A l'inverse, en surexprimant le gène *Otx2* dans les précurseurs à l'aide de rétrovirus, il a été possible d'augmenter la proportion des photorécepteurs en réduisant celle des cellules amacrines. *Otx2* semble donc essentiel pour spécifier les photorécepteurs, *Crx* intervenant plus tard pour leur différenciation terminale et leur survie.

D'autres déterminants sont également connus pour remplir des fonctions analogues à celles du gène *Otx2*. Par exemple, l'absence de la protéine Pax6 dans la rétine périphérique réduit le potentiel des précurseurs rétiniens qui ne parviennent plus qu'à développer des cellules amacrines (Marquardt et al. 2001). D'autres déterminants ont des fonctions plus restreintes, comme *Math5* dont l'absence empêche exclusivement la formation de cellules ganglionnaires (Wang and Zoghbi 2001).

3) LES CELLULES BIPOLAIRES

Les protéines Otx2 et Crx ont une action combinée et additive pour permettre la formation des cellules bipolaires : en mutant leurs gènes indépendamment on n'observe pas d'effet du nombre de cellules bipolaires, tandis que chez des souris [*Otx2*$^{+/-}$; *Crx*$^{-/-}$], une réduction importante du nombre de cellules bipolaires est enregistrée (Furukawa et al. 1999).

L'élimination du gène *Otx2* dans les cellules bipolaires entraîne la réduction de l'expression de certains marqueurs comme Pkc-α (Koike et al. 2007). Ces cellules ne dégénèrent pas, mais présentent des déficits fonctionnels visibles à l'électrorétinogramme. La transmission du signal chimique reçu des photorécepteurs en signal nerveux en direction des cellules ganglionnaires est réduite. Ce dysfonctionnement est similaire à celui de souris *Grm6*$^{-/-}$, gène codant un récepteur métabotropique au glutamate (Zeitz et al. 2005). Enfin des gènes essentiels pour le bon fonctionnement des cellules bipolaires matures, à savoir *Chx10, Cabp5* et *Grm6* possèdent dans leur région promotrice une séquence cible TAATCC, que la protéine Otx2 peut lier. Grâce à l'électroporation d'explants, il a été montré qu'Otx2 stimule effectivement la transcription à partir de ces régions dans les cellules bipolaires (Kim et al. 2008). Ces données sont compatibles avec un rôle de régulation directe de ces trois gènes par le facteur de transcription Otx2. L'expression du gène *Otx2* apparaît donc nécessaire à la maturation des cellules bipolaires.

Au sein de la rétine, et tout au long de son développement, la protéine Otx2 exerce des fonctions variées : définition du champ optique, spécification de l'épithélium pigmenté, induction de la rétine neurale, orientation du destin des progéniteurs, contrôle de la différenciation et de la maturation neuronale. Mais même à l'âge adulte, son expression est maintenue dans la rétine, et nous n'avons été en mesure de comprendre son action que grâce à des outils récemment développés.

Du fait de la létalité embryonnaire des souris mutantes pour le gène *Otx2*, il a été nécessaire de développer un système de knockout conditionnel pour étudier précisément ses fonctions tardives (Fossat et al. 2006). Pour ce faire, les deux allèles du gène ont été modifiés dans une lignée de souris ayant un fonds génétique suffisamment robuste pour ne présenter aucun défaut dans le cas d'une hétérozygotie pour *Otx2*.

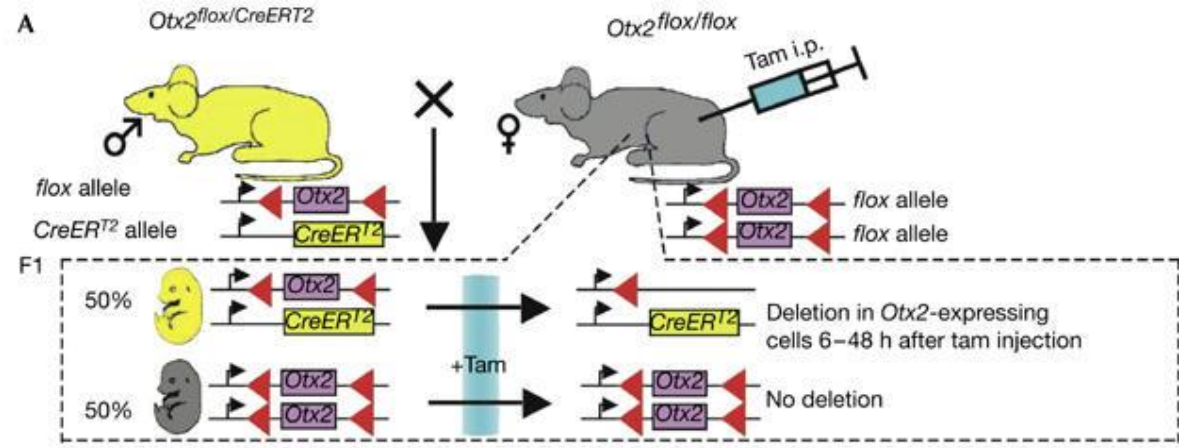


Figure 12 : Le self-knockout d'*Otx2*

La technique de self-knockout consiste à modifier les deux allèles du gène *Otx2* chez la souris : l'un va exprimer une recombinase CreERT2 inductible par le tamoxifène, et l'autre exprimera une protéine Otx2 normale, mais l'exon 2 sera flanqué de sites *loxP* permettant l'élimination du gène par action de la recombinase. A l'injection de tamoxifène, les cellules exprimant le gène *Otx2* vont donc éliminer l'unique allèle fonctionnel de ce gène qu'il leur reste, et passer de l'état hétérozygote mutant ne présentant pas de défauts phénotypiques à un état homozygote mutant.
Ici, l'injection du tamoxifène se fait chez la mère pour une élimination du gène *Otx2* au stade embryonnaire. Celle-ci est également possible directement à l'âge adulte.
Adapté de Fossat et al. (2006).

Dans le premier, la séquence codant la protéine Otx2 a été remplacée par une séquence codant une recombinase Cre fusionnée au domaine de liaison hormonal du récepteur aux oestrogènes modifié, noté ERT2. Ce récepteur n'est plus sensible aux œstrogènes endogènes de la souris, mais est activable par le tamoxifène. Lorsqu'on injecte du tamoxifène, la protéine CreERT2 séquestrée dans le cytoplasme par la chaperonne Hsp70 va changer de conformation en liant cet agoniste. Ce faisant, elle va exposer un signal de localisation nucléaire lui permettant d'être transportée au noyau, où elle peut exercer son activité recombinase. Dans le second allèle, le deuxième exon codant, contenant la majeure partie de la séquence codant l'homéodomaine de la protéine Otx2, a été flanqué de sites *loxP*. Sous l'action de la recombinase Cre, les deux sites *loxP* vont recombiner, conduisant à l'excision de la séquence qu'ils encadrent et ainsi à la suppression définitive de l'expression

du gène *Otx2*. Ce système a été appelé « self-knockout », car la recombinase CreERT2 est exprimée sous le contrôle du promoteur du gène qu'elle va éliminer après injection de tamoxifène. Il est donc possible d'exercer un contrôle dans le temps (moment de l'injection) et dans l'espace (cellules exprimant le gène *Otx2* au moment de l'injection) de l'élimination du gène *Otx2*.

Dans la rétine adulte, cette méthode est très efficace puisque les premiers effets sont mis en place très rapidement : perte d'expression de l'ARNm *Otx2* en 48h, disparition complète de la protéine en 4 jours (Beby et al. 2010). Phénotypiquement, les conséquences de la suppression de ce facteur de transcription dans la rétine adulte sont beaucoup moins immédiates. Une dégénérescence lente des photorécepteurs par apoptose est observée à partir du vingtième jour suivant l'invalidation du gène *Otx2*, qui se poursuit plusieurs semaines jusqu'à la perte complète de la couche des photorécepteurs en quatre mois. L'identité des autres types cellulaires de la rétine semble maintenue et ces cellules ne paraissent pas subir de dysfonctionnements majeurs.

Dans le RPE où la protéine Otx2 est présente en abondance, des défauts ont cependant pu être détectés par microscopie électronique. L'adhésion entre le RPE et les segments externes des photorécepteurs s'altère en l'absence de protéine Otx2, et des changements morphologiques interviennent au sein des cellules de cet épithélium pigmenté : celles-ci présentent des vacuoles et les mélanosomes adoptent une localisation apicale et apparaissent moins densément pigmentés.

Les changements morphologiques du RPE peuvent avoir des conséquences importantes, notamment en raison de la photo-oxydation liée au stimulus lumineux (Boulton and Dayhaw-Barker 2001). Les mélanosomes étant affectés, le stress oxydatif peut engendrer davantage de dommages, comme c'est le cas lors de stress oxydatifs liés à la consommation de tabac (Fujihara et al. 2008). Il est cependant difficile de définir quels mécanismes sont précisément à l'origine de la dégénérescence des photorécepteurs, et s'ils sont une cause secondaire à l'atteinte du RPE. Afin de comprendre ces observations, il est désormais nécessaire de comprendre les bases moléculaires à l'origine de ces phénotypes en identifiant les gènes impliqués.

Toutes ces fonctions développementales et adultes du facteur de transcription Otx2 dans la rétine réitèrent des activités jouées par le même gène dans l'embryon précoce. Cette réutilisation d'un même acteur moléculaire pour réaliser des aspects successifs et différents du développement est un concept central. La boite à outils des gènes du développement est

restreinte et joue davantage de la combinatoire d'un petit nombre d'acteurs que de leur diversification pour réaliser une grande diversité de formes et de structures. Le cas Otx2 n'est qu'un des exemples de cette économie moléculaire : un facteur de transcription comme Cux1 va être impliqué à la fois dans des migrations cellulaires (Kedinger and Nepveu 2010) et des phénomènes prolifératifs (Truscott et al. 2008), Dlx5 est essentiel dans des processus généraux comme la fermeture du tube neural (Lee et al. 2013) mais aussi très spécialisés comme l'ostéogenèse (Holleville et al. 2007) et le développement du système olfactif (Long et al. 2003).

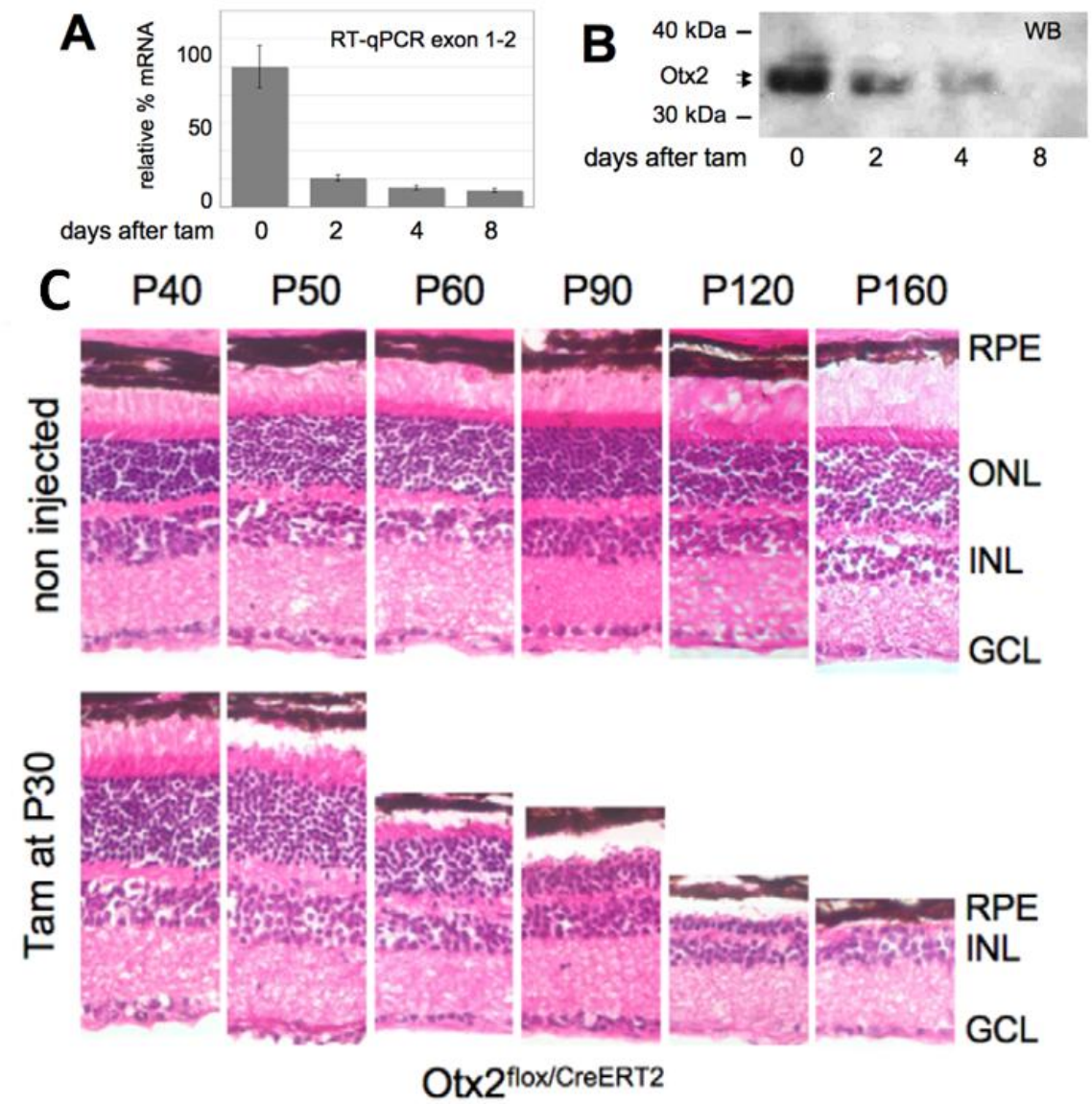


Figure 13 : Dégénérescence des photorécépteurs après self-knockout du gène *Otx2*

A. et B. Analyse de l'efficacité de l'élimination du gène *Otx2* dans des rétines de souris adultes $Otx2^{flox/CreERT2}$ à différents stades après injection de tamoxifène induisant le self-knockout par RT-qPCR (A) : la quantité relative de transcrit est drastiquement réduite en deux jours ; et par Western Blot (B) : la quantité de protéine encore présente dans la rétine est réduite progressivement pour n'être plus du tout détectable 8 jours après élimination du gène.
C. Dégénérescence des photorécepteurs observée après élimination du gène Otx2 : l'ensemble des autres types cellulaires composant la rétine ne semble pas affecté alors que les photorécepteurs dégénèrent progressivement tout en perdant leur liaison au RPE.
Adapté de Beby et al. (2010).

III) APPORT DES TECHNIQUES D'ETUDES GENOMIQUES A LA COMPREHENSION MECANISTIQUE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Le facteur de transcription Otx2 joue des rôles extrêmement divers au cours du développement jusqu'à l'âge adulte. Pourtant il n'existe que sous deux formes de protéines très semblables, et tous ses transcrits les produisent de façon équivalente. Possède-t-il un répertoire de gènes cibles variable d'un tissu à l'autre ? Si c'est bien le cas, comment fait-il pour sélectionner l'expression de gènes différents dans chaque tissu ?

En prenant comme modèle la rétine de souris adulte dans laquelle il est exprimé dans des couches cellulaires distinctes, rétine pigmentée et rétine neurale, il est possible de mener une étude mécanistique approfondie pour tenter d'apporter des éléments de réponse à ces questions. Les outils disponibles aujourd'hui permettent d'avoir accès à des informations larges telles que le répertoire de gènes cibles, et de connaître l'interactome complet d'un facteur de transcription, potentiellement à l'origine d'un fonctionnement différent dans chaque type cellulaire.

A) CONNAISSANCES MECANISTIQUES DES FONCTIONS D'OTX2

Les nombreuses fonctions du facteur de transcription Otx2 sont essentielles et centrales au cours du développement, notamment celui de la rétine où son expression est maintenue dans différentes couches cellulaires à l'âge adulte. L'étude de toutes ces fonctions a permis de collecter des informations sur ce facteur de transcription dans divers tissus, de connaître notamment certains de ses gènes cibles et de ses partenaires protéiques. Il est possible de dégager une vue d'ensemble des connaissances mécanistiques actuelles de toutes ces données publiées.

1) LES GENES CIBLES

Au regard de la compréhension fonctionnelle détaillée du facteur de transcription Otx2, notamment par l'étude des rôles développementaux spectaculaires qu'il joue, peu de données moléculaires avaient encore été collectées. Il y a 10 ans, à peine plus d'une dizaine de gènes avaient été identifiés comme étant régulés par Otx2, classés en six catégories majeures : protéines liées à l'actine/myosine, molécules d'adhésion, peptides sécrétés,

facteurs de transcription, protéines liant l'ARN, protéases et inhibiteurs de protéases. Des molécules d'adhésion telles que NCAM, DDS-1-PG, R-Cadherin, Ephrin-A2, Tenascin-C avaient été décrites comme étant sous le contrôle du facteur Otx2 (Boncinelli and Morgan 2001). Il est à noter que la démonstration rigoureuse de l'action directe de la protéine Otx2 sur le promoteur de ces gènes *in* vivo était manquante dans la plupart des cas.

L'étude de la fonction du gène *Otx2* dans la rétine a permis d'identifier un ensemble de gènes qu'il semble contrôler. Parmi ceux-ci, plusieurs codent des protéines essentielles pour permettre la vision : QNR71, TRP-1 et Tyr qui est impliqué dans la mélanogenèse (Martinez-Morales et al. 2005). Il a été montré que le gène *Otx2* régule des gènes spécifiques des cellules bipolaires comme *Chx10, Cabp5* et *Grm6* (Kim et al. 2008), du RPE comme *DCT* (Takeda et al. 2003) et *Best1* (Masuda and Esumi 2010), ou encore des photorécepteurs : *Crx, Nrl, Nr2e3, Esrrb, Isl1, Blimp1, Pias3* et *NeuroD* (Omori et al. 2011a). Chez l'homme, l'étude d'un patient présentant une mutation *OTX2* suggère que ce facteur régule le niveau d'expression des protéines IRBP, HESX1 et POU1F1 (Dateki et al. 2008). Il semble également que le facteur Otx2 contrôle l'expression d'un gène important pour le développement de la rétine, Rax (Danno et al. 2008).

Dans l'endoderme viscéral antérieur, Otx2 participe à la répression des molécules Gbx2 et Fgf8, et induit l'expression d'En1 ainsi que de gènes codant des molécules sécrétées comme *Lefty*, *Dkk1* et *Cer1* (Yamamoto et al. 2003). Les fonctions moléculaires précises d'Otx2 n'ont cependant pas encore été complètement élucidées. Son action répressive sur Gbx2 s'exercerait à la fois directement et indirectement par l'activation de la voie Wnt.

Une étude plus systématique des gènes régulés par Otx2 s'avère indispensable pour compléter l'ensemble des données connues concernant ses nombreuses fonctions au cours du développement, bien que les connaissances soient déjà relativement avancées dans certains tissus à des stades développementaux précis.

2) LES PARTENAIRES PROTEIQUES

Le facteur de transcription Otx2 joue des rôles extrêmement divers au cours du développement jusqu'à l'âge adulte. Pourtant il n'a que deux formes connues, et tous ses transcrits les produisent de façon équivalente. Possède-t-il un répertoire de gènes cibles variable d'un tissu à l'autre ? Si c'est bien le cas, comment fait-il pour sélectionner l'expression de gènes différents dans chaque tissu ?

Une des explications possibles est que ce facteur de transcription s'associe à des partenaires protéiques différents dans chaque situation pour réguler des gènes différents. Malheureusement, c'est dans le domaine des interactions protéines-protéines que les données sont les plus rares, ce qui ne favorise pas une approche intégrée de la compréhension mécanistique du facteur de transcription Otx2.

Seules quelques interactions ont été à ce jour documentées. Les gènes *Lim1* et *HNF3β*, exprimés dans l'endoderme viscéral antérieur dès E5,5 (Perea-Gomez et al. 1999) peuvent interagir directement avec Otx2 *in vitro (Nakano et al. 2000)*. Cette interaction permet également d'augmenter le niveau d'expression de promoteurs cibles, et pourrait avoir lieu *in vivo* étant donné que les mutants pour ces trois gènes donnent des phénotypes semblables, et qu'ils sont exprimés dans les mêmes structures au cours du développement.

Pendant l'établissement de la barrière mésencéphalo-métencéphalique, il a également été montré qu'Otx2 interagissait directement avec le co-répresseur Grg4/Tle4 (Heimbucher et al. 2007). Cette interaction entre en compétition avec une interaction Otx2-Meis2, nécessaire en position dorsale afin de permettre le développement du tectum (Agoston and Schulte 2009). Ainsi l'interaction et la compétition entre les interacteurs potentiels d'Otx2 permet de lui conférer des rôles différentiels au cours du développement.

Au niveau de la rétine, deux interactions ont été identifiées. La première est requise notamment pour activer l'expression du gène *Rax*. Elle a été mise en évidence chez le xénope, où Otx2 interagit directement avec Sox2 *in vitro* et *in vivo* (Danno et al. 2008). La régulation du gène *Best1*, quant à elle, est permise grâce à la formation d'un complexe impliquant Sox9, Mitf et Otx2 (Masuda and Esumi 2010).

Il a été suggéré, de par la proximité des phénotypes observés et l'expression dans les mêmes tissus, qu'une interaction directe entre Otx2 et Alx4 pouvait intervenir dans le développement cranio-facial (Hide et al. 2002).

Cette dernière interaction n'a certes pas encore été montrée *in vivo*, mais une large expérience réalisée *in vitro* indique qu'elle pourrait bien être réelle. En effet, l'ensemble des facteurs de transcription de souris et humains ont été testés deux à deux pour leur capacité à former des interactions protéine-protéine dans l'ovule de hamster (Ravasi et al. 2010). Ce crible a permis d'identifier sept partenaires potentiels du facteur de transcription Otx2 : Alx4, Dmrtc2, Mixl1, Tlx3, Emx1, HoxB13 et Zbtb3.

Certains d'entre eux n'ont pas encore été montrés comme étant co-exprimés avec Otx2, et sont peut-être des artefacts (HoxB13, Zbtb3, Mixl1, Dmrtc2) alors que d'autres sont exprimés dans les mêmes types cellulaires, sont associés à des pathologies similaires et ont des fonctions proches de celles d'Otx2 (Alx4, Tlx3, Emx1). Il est à noter que plusieurs d'entre eux sont exprimés au niveau de l'appareil reproducteur mâle (HoxB13, Dmrtc2 et Alx4). Il est possible qu'Otx2 y soit également exprimé et y joue un rôle jusqu'alors non identifié.

Ainsi, seul un nombre restreint de gènes régulés par Otx2 dans des contextes précis est connu à ce jour, et bien peu de partenaires protéiques permettant à ce facteur de transcription d'agir de façon différentielle dans chacune de ces situations ont été découverts. L'arrivée de nouvelles technologies permet aujourd'hui d'envisager d'avoir une caractérisation plus exhaustive de ces interactions, essentielle pour comprendre le mode d'action du facteur de transcription Otx2 dans la variété de situations où il intervient.

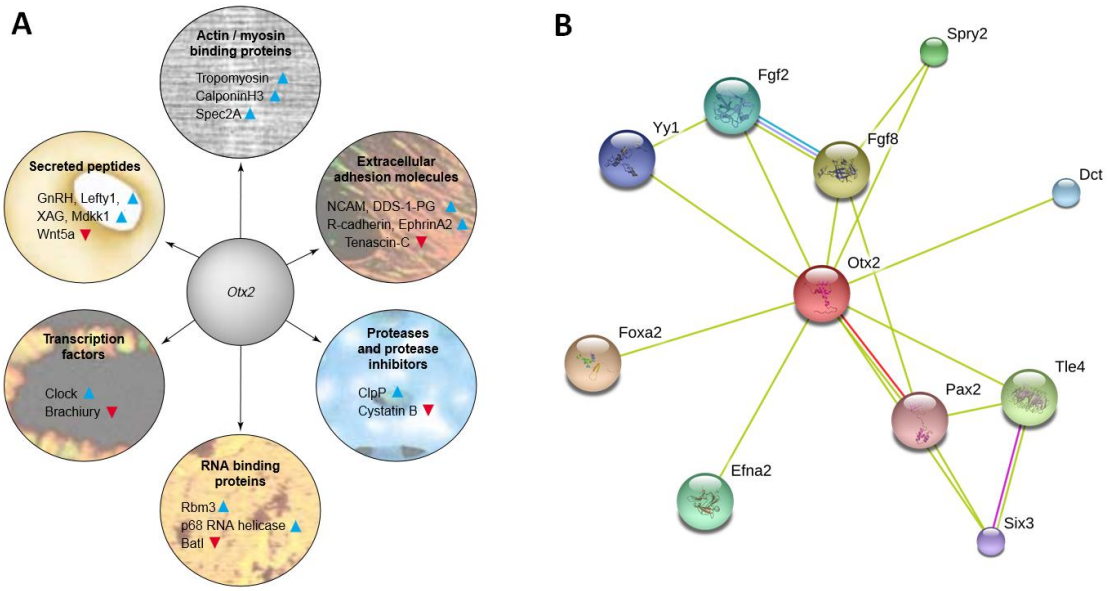


Figure 14 : Gènes cibles et partenaires du facteur de transcription Otx2

A. Représentation des genes ciblés par Otx2, par catégories fonctionnelles. Une flèche bleue indique les gènes activés, les flèches rouges indiquent les gènes réprimés..
B. Représentation des partenaires potentiels d'Otx2, tous étant obtenus par datamining automatique. Sont représentés : en rouge, les gènes liés dans le génome de certains organismes, qui ont de fortes probabilités d'interagir dans d'autres organismes, en violet les liens démontrés expérimentalement et en bleu les liens issus de bases de données.
Adapté de Boncinelli and Morgan (2001) et base de donnée STRING (2013).

B) APPORTS DE LA GENOMIQUE

Depuis plus d'une décennie, des techniques de génomique moderne ont été développées, permettant des approches globales. En passant à des échelles plus larges, il a été possible de comprendre le fonctionnement de facteurs de transcription de façon bien plus approfondie. Deux types d'informations capitales sont aujourd'hui facilement accessibles : le niveau d'expression de l'ensemble des gènes du génome, et l'ensemble des sites de liaison d'un facteur de transcription sur la chromatine. Ces deux informations peuvent être combinées pour comprendre plus finement le mécanisme d'action d'un facteur de transcription dans un tissu donné.

De plus, il est possible de développer des stratégies à l'échelle protéomique permettant de connaître l'interactome complet d'un facteur de transcription, potentiellement à l'origine d'un fonctionnement différent dans chaque type cellulaire.

1) TRANSCRIPTOME

Plutôt que de rechercher spécifiquement la présence ou l'absence de cibles biologiquement pertinentes grâce à des outils ciblés (sonde ARN pour hybridation *in situ*, anticorps couplé à un fluorochrome), les puces à ADN permettent de détecter rapidement la présence ou l'absence de transcrits du génome complet. Ainsi, par analyse comparative, il est possible de détecter la présence ou l'absence d'expression de gènes dans différentes conditions (Carulli et al. 1998). L'approche la plus classique est de comparer l'expression du génome en condition sauvage ou mutante pour un gène donné. Cette méthode, apparue dans les années 2000, a commencé à être appliquée au développement de la rétine.

Par exemple, le rôle d'Otx2 dans la différenciation finale des photorécepteurs a été étudié en comparant le profil d'expression des gènes de rétine de souris à P1 et P12 avec ou sans élimination conditionnelle du gène *Otx2*. Cette étude a été menée en déclenchant l'invalidation du gène *Otx2* grâce à l'utilisation d'une lignée murine exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur du gène *Crx* au jour embryonnaire E12,5. Les gènes dont l'expression varie codent des facteurs de transcription essentiels pour le développement des photorécepteurs : *Crx, Nrl, Nr2e3, Esrrb, Isl1, Blimp1, Pias3* et *NeuroD* (Omori et al. 2011b). Du fait de la distance temporelle séparant l'établissement de l'invalidation (E12,5) et l'analyse (8 jours pour l'analyse à P1 et 19 jours pour l'analyse à P12), l'interprétation doit rester prudente : il est possible que des réarrangements et des mécanismes de

compensation apparaissent, ou que la modification du niveau d'expression de certains gènes observés soit la conséquence indirecte de défauts de développements plus précoces. Une approche semblable a permis de connaître les cibles d'Otx2 dans les plexus choroïdes, permettant ainsi de déterminer 360 gènes dont l'expression varie après élimination d'Otx2 dans les ce tissu à l'aide d'une lignée Gdf7-Cre (Johansson et al. 2013).

Le facteur de transcription Nrl est responsable de la formation des photorécepteurs bâtonnets, et sa mutation entraîne le développement d'une rétine ne possédant que des photorécepteurs de type cône. Ainsi, la comparaison des gènes exprimés en son absence avec ceux exprimés chez la souris normale a permis d'identifier les gènes exprimés différentiellement entre ces deux types cellulaires (Yu et al. 2004). Des membres des voies de signalisation Wnt et Bmp voient leur expression affectée chez ces mutants, indiquant que cônes et bâtonnets utilisent ces voies de façon différente. Cette étude a été menée en mélangeant différents stades développementaux et types cellulaires, et visait à avoir une vision d'ensemble de l'action du facteur de transcription Nrl. Elle a été complétée par une étude plus fine dans des rétines adultes à P21, ayant permis de confirmer l'expression de certains gènes spécifiques des cônes, et d'en identifier de nouveaux (Corbo et al. 2007).

La comparaison de souris sauvages et homozygotes mutantes pour le gène *Crx* a également permis d'identifier les gènes dont l'expression est contrôlée par ce facteur de transcription dans la rétine. Le nombre de gènes dont l'expression est diminuée chez le mutant est extrêmement réduit : seuls 15 gènes présentent une réduction de leur expression (Livesey et al. 2000). Ces gènes sont principalement impliqués dans la phototransduction et exprimés au niveau des photorécepteurs. Une étude encore plus complète a été menée au niveau de la glande pinéale, avec une comparaison entre souris sauvage et mutantes pour ce gène, mais aussi cycle jour/nuit pour les deux cas, indiquant que Crx peut contrôler ses gènes cibles selon un rythme circadien (Rovsing et al. 2011).

L'analyse du transcriptome a également été développée dans des systèmes hétérologues, fournissant des informations sur la conservation évolutive de fonction des membres de la famille Otx. En analysant la différence de niveau d'expression des 13 400 gènes de drosophile dans des mouches surexprimant leur gène *otd* ou le gène *Otx2* humain, 287 gènes variant dont 90 communs aux deux expériences indiquent la fonction évolutivement conservée de la protéine Otx2 (Montalta-He et al. 2002). En comparant des mouches sauvages et mutantes pour le gène *otd* spécifiquement au niveau de l'œil, il a été possible de montrer que les gènes sous le contrôle de ce facteur de transcription sont très proches de

ceux contrôles par Crx dans l'œil de la souris (Ranade et al. 2008). Ainsi ces techniques ont permis de montrer une conservation fonctionnelle très large au sein de la famille Otx.

Cette approche peut également être utilisée pour observer l'effet de l'environnement ou de l'âge sur les tissus. Il a par exemple été montré que l'expression de 227 gènes du RPE varie avec l'âge (Chen et al. 2008). Etudier les gènes variant avec l'âge au niveau de la rétine est une approche très pertinente dans le cadre de la compréhension de pathologies telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

Si ces analyses du transcriptome ont apporté un nombre considérable d'informations, elles présentent aussi parfois quelques limitations, d'ordre conceptuel ou technique. Lorsque l'objectif est d'identifier les cibles d'un facteur de transcription en comparant des situations normales et mutantes pour celui-ci, le délai entre le déclenchement de la mutation et l'observation du niveau d'expression du génome peut s'avérer un obstacle pour pouvoir imputer les différences observées à la stricte perte de ce facteur de transcription. Il est probable que des réarrangements du réseau génétique ou des compensations secondaires se mettent en place, pouvant conduire à des manifestations très indirectes lorsque le délai s'allonge. De plus, une limitation technique de sensibilité est due au bruit de fond inhérent à la méthode d'hybridation : un signal lumineux proportionnel à la quantité de sonde fixée sur chaque sonde est lu sur les puces à ADN. Il est parfois difficile de distinguer signal et bruit de fond, notamment pour les gènes exprimés faiblement. Enfin, le transcriptome exploré peut se trouver limité par l'ensemble des séquences déposées sur le support. De nouvelles technologies permettent de pallier à ces inconvénients.

2) SEQUENÇAGE DE MASSE : RNA-SEQ ET CHIP-SEQ

Grâce au développement récent des techniques de séquençage de masse (Quail et al. 2008; Schuster 2008), les méthodes d'analyse du transcriptome ont pu évoluer vers un système permettant une résolution beaucoup plus fine : le RNA-seq (Mortazavi et al. 2008). Celui-ci permet de détecter les ARN messagers présents même en très faible quantité (Wilhelm et al. 2008). La sensibilité est élevée, le bruit de fond très faible et il n'y a pas de biais ou d'a priori : toute séquence exprimée est prise en compte. La technique consiste à rétrotranscrire les ARNs extraits après déplétion des ARN ribosomiques et à séquencer massivement l'ensemble des ADNc ainsi obtenus. De la même façon que pour l'étude du transcriptome par puces à ADN, il suffit alors de comparer le nombre de transcrits dans des conditions normales ou mutantes pour un facteur de transcription donné pour avoir accès aux gènes

qu'il régule. Le très grand nombre de lectures parallèles assure une couverture quasi-totale du transcriptome avec une résolution inégalée.

L'ensemble des gènes exprimés dans la rétine de souris à P21 a été identifié par cette technique (Gamsiz et al. 2012). Plus de 15 000 gènes sont exprimés, dont les plus abondants sont ceux connus comme exerçant un rôle important dans la vision, comme le gène de la rhodopsine des bâtonnets *Rho* ou de la transducine *Gnat1*. Le gène codant le facteur de transcription Crx apparaît également abondamment exprimé. Cette étude fournit un catalogue du répertoire génétique actif dans la rétine mature qui constitue une référence précieuse pour toute étude fonctionnelle.

La technique de RNA-seq a été appliquée pour rechercher les gènes régulés par le facteur de transcription Nrl à P21 (Brooks et al. 2011) et à 5 semaines (Mustafi et al. 2011) en comparant l'expression de rétines résultant du KO germinal $Nrl^{-/-}$ à celle de rétines normales. Les gènes dont l'expression diminuait incluaient bien ceux spécifiques des bâtonnets, alors que ceux dont l'expression augmentait étaient incluaient bien des gènes connus comme étant exprimés spécifiquement dans les cônes. La combinaison des deux études, comparée à l'étude sur puce à ADN, a permis d'identifier 634 gènes dérégulés qui n'avaient pas été détectés par la méthode de puce à ADN, dont une grande partie étaient effectivement des gènes spécifiques des photorécepteurs.

L'application des techniques modernes de séquençage permet donc d'augmenter l'efficacité et la résolution de la recherche de gènes exprimés ou dérégulés dans des contextes mutants. Ces avancées technologiques ont aussi permis d'étendre le champ d'application du séquençage de masse à de nombreux domaines. Une de ces applications, essentielle pour l'étude des facteurs interagissant avec l'ADN, dont font partie les facteurs de transcription, est la technique d'immuno-précipitation de la chromatine suivie de séquençage de masse (ChIP-seq). Celle-ci permet d'identifier spécifiquement et simultanément toutes les régions de la chromatine auxquelles se lie un facteur de transcription (Barski and Zhao 2009).

Après pontage chimique des protéines liant l'ADN, la chromatine est fragmentée et immuno-précipitée à l'aide d'un anticorps contre le facteur d'intérêt. Le pontage est hydolysé, l'ADN isolé et soumis au séquençage de masse. Les séquences lues sont alignées sur le génome, puis des outils d'analyse statistique permettent d'identifier les régions génomiques les plus liées. Pour ce faire, différents algorithmes ont été développés. Toutes les méthodes ne sont pas équivalentes (Malone et al. 2011; Rye et al. 2011), mais la plus communément utilisée est Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS) (Zhang et al. 2008). Cette méthode s'est

avérée être la plus pertinente en vérifiant la détection des sites de liaison de trois facteurs de transcription (NRSF, Foxa1 et GABP) confirmée par PCR quantitative (Wilbanks and Facciotti 2010).

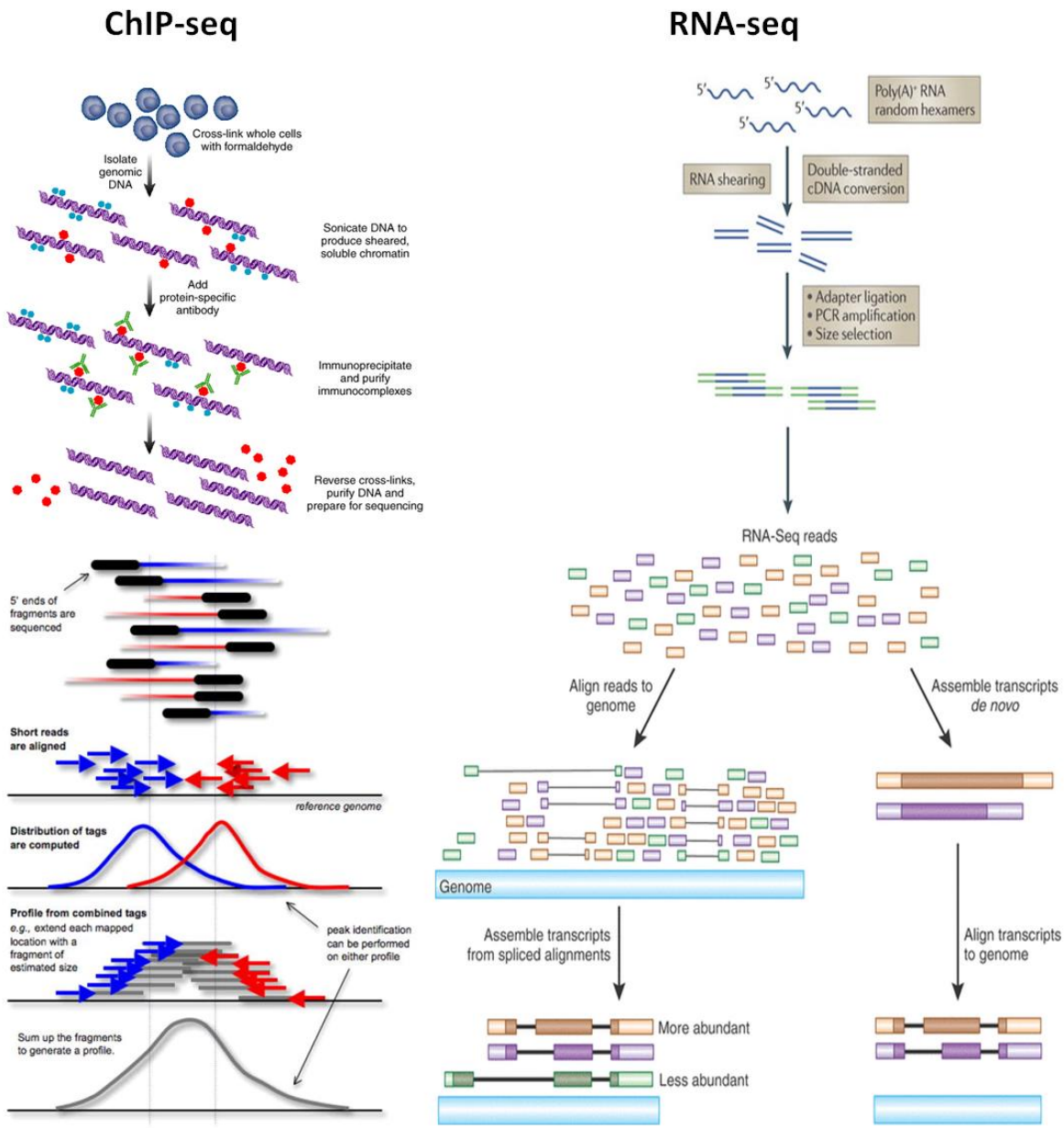


Figure 15 : Méthode de ChIP-seq et de RNA-seq

Le ChIP-seq consiste à purifier les complexes protéine-ADN grâce à des anticorps spécifiques dirigés contre des protéines d'intérêt après une étape de cross-link. L'ADN est alors fragmenté et séquencé massivement. Les séquences sont alignées sur le génome et permettent d'identifier avec précision le site de fixation d'une protéine sur l'ADN.
Le RNA-seq consiste à créer une banque d'ADNc à partir d'extraits d'ARNm. Celle-ci sera ensuite amplifiée et des adapteurs seront liés afin de permettre un séquençage de masse. L'alignement sur le génome des séquences identifiées permettra de détecter la présence de transcrits de gènes connus et l'abondance relative de leurs différents transcrits, ainsi que celle de transcrits encore inconnus.
Adapté de Mardis (2007), Park (2009), Haas and Zody (2010) et Ozsolak and Milos (2011).

Une telle expérience a été réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le facteur de transcription Crx dans la rétine de souris. Celle-ci a permis d'identifier 5595 sites de liaison sur l'ensemble du génome. L'analyse fine des sites de liaison à proximité de gènes spécifiques des photorécepteurs comme *Gnat1* a permis de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la régulation génique : un site principal permettant l'activation du promoteur de ce gène a été identifié. Les autres de sites de liaison n'ont qu'un faible effet activateur lorsqu'ils sont isolés, mais l'action conjointe de plusieurs de ces sites de liaison permet de moduler l'activité de Crx (Corbo et al. 2010).

Le nombre de sites de liaison au génome apparaît très important et il n'y a pas encore de critères clairs permettant de déterminer lesquels sont pertinents et lesquels ne le sont pas. Des premiers éléments de réponse commencent cependant à apparaître : White et ses collaborateurs ont testé à grande échelle l'activité de toutes les séquences liées par Crx. L'ensemble des sites de liaison a été synthétisé, inséré dans un plasmide rapporteur avec un code barre pour chaque site et introduit dans la rétine par électroporation. Une analyse des plasmides exprimés par RNA-seq a permis de rechercher si des éléments de la séquence primaire des sites de liaison de la protéine Crx corrèlent avec l'activité transcriptionnelle. D'après cette étude, un contenu en GC élevé distinguerait les séquences actives et indiquerait ainsi une plus grande signification de ces sites de liaison Crx (White et al. 2013).

Il reste cependant incontournable de confronter les données de liaison à l'ADN à des données transcriptomiques pour définir les gènes cibles réels d'un facteur de transcription et comprendre les lois qui gouvernent leur régulation.

3) INTERACTOME

Les gènes contrôlés par un facteur de transcription varient d'un tissu à l'autre ou d'un temps de développement à un autre. Pour Pax6 par exemple, qui est exprimé au niveau du cristallin de l'œil, dans le cortex cérébral et dans les cellules β du pancréas, les gènes ciblés sont extrêmement différents d'un tissu à un autre (Xie et al. 2013). En combinant de nombreuses informations de sites de liaison et d'expression de gènes, il est même devenu possible de faire des modèles prédictifs d'expression génique au cours du développement (Wilczynski et al. 2012).

Cependant, lorsqu'il s'agit d'un facteur de transcription n'ayant que peu d'isoformes, il est légitime de se demander comment une telle variété de cibles est possible. La structure de la

chromatine a une influence sur l'accessibilité ou non d'un facteur de transcription à l'ADN et donc sur l'expression de ses gènes cibles dans un tissu (Gertz et al. 2013). Mais un autre mécanisme est sans doute également à l'œuvre, notamment pour le facteur de transcription Otx2 dont on sait l'activité modulée par sa liaison avec le co-répresseur Grg4 (Larder and Mellon 2009). En effet, selon le contexte cellulaire et les partenaires protéiques potentiels exprimés, des complexes protéiques différents vont pouvoir se former et sélectionner des répertoires génétiques différents.

Connaître l'interactome d'un facteur de transcription devient alors une information capitale pour comprendre les bases de son action différentielle d'un tissu à un autre. Les méthodes historiques d'identification d'interaction protéine-protéine nécessitaient la connaissance préalable de candidats afin de co-immunoprécipiter les partenaires potentiels à l'aide d'anticorps spécifiques. Lorsqu'il s'est agit de rechercher de nouveaux partenaires de façon plus large, des cribles ont été réalisés *in vitro* utilisant des banques d'ADNc. Ainsi, il a été possible d'identifier par un crible double-hybride en levure l'ensemble des interactants potentiels du facteur de transcription Hoxa1, puis de vérifier ces interactions dans chaque tissu où ce dernier est exprimé, et ainsi d'établir le premier interactome d'un gène Hox (Lambert et al. 2012). Il est en effet nécessaire de confirmer chaque interaction individuellement, et dans le contexte cellulaire réel, celui-ci n'étant pas reproduit dans la cellule de levure. De ce fait, il est possible que tous les interactants ne soient pas correctement identifiés.

De nouvelles techniques de purification protéique, utilisant des tags optimisés pour permettre la purification, ont été développées (Puig et al. 2001; Rigaut et al. 1999). Parmi elles, la purification par affinité en tandem est particulièrement attractive pour son efficacité et sa spécificité. Celle-ci consiste à accoler deux tags à une même protéine pour permettre deux purifications par affinité successives. Ces étapes permettent de purifier des complexes natifs, et ainsi d'identifier les réseaux d'interactions *in vivo* sans passer par une surexpression ectopique systématisée comme dans le cas de cribles double-hybrides. Ainsi, il est non seulement permis de confirmer des interactions protéiques connues, mais de nouvelles interactions sont identifiées par cette méthode. La pureté et le rendement des purifications ont été améliorés en modifiant les tags utilisés (Drakas et al. 2005; Gloeckner et al. 2007; Rohila et al. 2004). Parmi les différents tags développés, l'un d'entre eux s'est montré particulièrement efficace chez les cellules mammifères, en particulier les cellules murines : le tag GS (protéine G – Streptavidin Binding Protein) (Burckstummer et al. 2006).

Grâce aux avancées dans le domaine de la spectrométrie de masse, en particulier sa récente miniaturisation, il est possible d'identifier tous les constituants de complexes protéiques obtenus à partir de préparations de taille raisonnable. Il est possible de faire la carte complète des interactions protéine-protéine d'un organisme modèle comme la drosophile en appliquant ces méthodes (Guruharsha et al. 2011).

Les outils moléculaires et biochimiques existent donc pour tenter des avancées majeures dans le domaine de l'identification des associations protéiques que fait un facteur de transcription dans des tissus différents ou à des temps développementaux différents, pour les confronter aux données transcriptomiques dont l'exploration est déjà en cours.

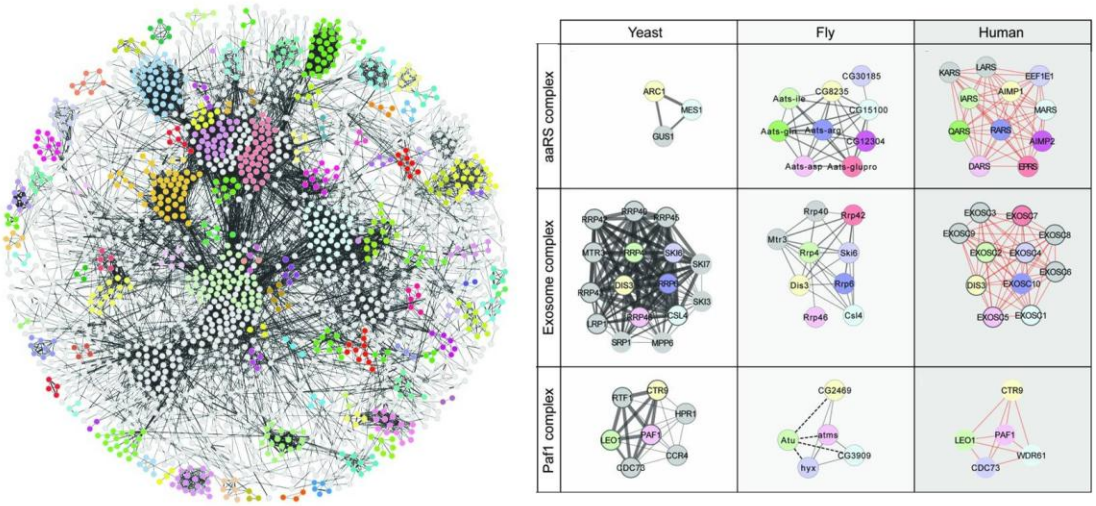


Figure 16 : Visualisation de la carte de l'interactome de la drosophile

Les liens entre protéines de la drosophile sont représentés sur cette figure. Plus de 5000 protéines de fusion avec un tag flag-HA ont été employées pour purifier et identifier les partenaires protéiques par spectrométrie de masse. Ceux-ci ont été comparés à des cribles double-hybrides effectués dans la levure ou à des données connues chez l'humain.
Adapté de Guruharsha et al. (2011).

Le facteur de transcription Otx2 est codé par un gène très conservé, et possède une structure simple et constante. Pourtant il permet la réalisation de nombreuses fonctions au cours du développement. Dans chaque tissu où il est exprimé, son mode d'action est diversifié et il permet le développement de plusieurs structures différentes. L'étude de mutants confirme qu'il joue un rôle essentiel dans tous ces organes antérieurs, et il est aussi associé à de nombreuses pathologies.

C'est le cas de la rétine, où il est impliqué dans la différenciation de tous les types cellulaires qui la composent. Son expression y est maintenue à l'âge adulte aussi bien dans la rétine pigmentée que dans la rétine neurale. Une méthode de self-knockout conditionnel a provoqué la dégénérescence lente des photorécepteurs tout en affectant la morphologie des cellules de l'épithélium pigmenté.

Le manque d'informations sur les gènes cibles et les partenaires protéiques de ce facteur de transcription se fait de plus en plus sentir, notamment à l'ère du transcriptome, du séquençage de masse et de la spectrométrie de masse.

OBJECTIFS

L'élimination du gène *Otx2* dans l'ensemble de la rétine de souris adulte entraîne la dégénérescence des photorécepteurs.

La recherche des gènes contrôlés par Otx2 dans les deux couches distinctes de la rétine où il est exprimé a été engagée. Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser les bases moléculaires de cette dégénérescence, et notamment si celle-ci est causée de façon cellule autonome dans les photorécepteurs, ou si elle est due à des dysfonctionnements dans des cellules adjacentes comme celles de l'épithélium pigmenté rétinien.

La seconde hypothèse s'étant avérée exacte, nous avons cherché à déterminer s'il était possible que le facteur de transcription Otx2 régule également des gènes cibles dans la neurorétine, et les raisons de l'absence de phénotype autonome dans celle-ci, en envisageant notamment une redondance fonctionnelle avec son paralogue *Crx* exprimé dans la neurorétine et absent de l'épithélium pigmenté.

Faisant l'hypothèse de ciblage de gènes différents selon les tissus grâce à la formation de complexes protéiques variés, l'étude des fonctions jusqu'alors inconnues du facteur de transcription Otx2 dans la rétine adulte est un bon support pour une approche mécanistique globale. Des outils permettant d'identifier les complexes protéiques formés par Otx2 *in vivo* dans ces deux structures ont été développés.

Une approche encore inédite pourra être initiée à partir des données ainsi collectées : il sera possible de confronter les complexes protéiques formés par un facteur de transcription aux gènes qu'il régule de façon dynamique, tout au long du développement.

RESULTATS

Le facteur de transcription Otx2 a de nombreuses fonctions au cours du développement : gastrulation, établissement de l'axe antéro-postérieur, régionalisation et maturation du cerveau antérieur, acquisition de l'identité du mésencépahle, développement du cervelet, d'organes sensoriels, et de l'hypophyse. Au sein d'un seul organe, il peut également participer à des mécanismes diversifiés. C'est le cas de la rétine où il participe à la différentiation de tous les types cellulaires qui la composent, notamment le RPE, les cellules bipolaires et les photorécepteurs dans lesquels son expression est maintenue à l'âge adulte.

Les connaissances dans le domaine du transcriptome et de l'interactome de ce facteur de transcription ne sont pas suffisantes pour donner une explication moléculaire claire à cette grande diversité d'action. Une hypothèse peut cependant être soumise : le facteur de transcription Otx2 pourrait réguler différents gènes cibles dans les différents contextes, grâce à son association à des partenaires protéiques différents.

Dans la rétine de souris adulte, nous sommes en mesure d'apporter quelques éléments de réponse en utilisant l'approche de self-knockout développée au sein de notre laboratoire. Des effets phénotypiques ont été observés spécifiquement au niveau des photrécepteurs et du RPE, et nous avons donc entrepris d'étudier les gènes cibles et les partenaires potentiels d'Otx2 dans ce tissu par des approches globales (étude du transcriptome, ChIP-seq, interactome).

I) MECANISME DE DEGENERESCENCE DES PHOTORECEPTEURS DANS LE MODELE DE SOURIS SELF-KNOCKOUT OTX2

Notre équipe de recherche a montré préalablement que l'ablation du gène *Otx2* peut être effectuée très efficacement dans la rétine adulte au jour post-natal 30 (P30), l'expression d'*Otx2* est alors éliminée dans trois types cellulaires où il est normalement exprimé : cellules bipolaires, photorécepteurs et RPE. La principale conséquence observée concerne les photorécepteurs qui dégénèrent progressivement à partir du jour P50, jusqu'à leur perte totale après 4 mois (Beby et al. 2010). Les autres types cellulaires ne sont pas affectés dans leur viabilité.

Afin d'orienter notre diagnostique de l'origine du mécanisme de dégénérescence des photorécepteurs, nous avons recouru à une méthode permettant d'étudier simultanément l'activité des trois types cellulaires qui expriment le gène *Otx2* : une exploration fonctionnelle de l'activité électrique de la rétine a été menée en collaboration avec le Dr. Mohamed Ettaiche (IPMC, Sophia-Antipolis). Les premières atteintes que l'analyse électrorétinographique (ERG) met en évidence concernent d'abord le tracé correspondant à l'activité du RPE (onde c) qui présente une forte hyperpolarisation et un accroissement du délai de repolarisation. Ces anomalies précèdent de plusieurs jours la réduction progressive d'amplitude des ondes a et b qui signent une baisse d'activité des photorécepteurs et des cellules bipolaires. L'analyse ERG démontre l'installation progressive d'une cécité, précédée par une atteinte précoce du fonctionnement des cellules du RPE.

Pour comprendre les altérations génétiques induites par la perte de fonction *Otx2* et conduisant au phénotype de dégénérescence des photorécepteurs, une étude cinétique de la variation du transcriptome a été conduite durant les premiers jours après élimination du gène *Otx2*. Elle a permis d'identifier 71 gènes dont l'expression est modifiée. Parmi ceux-ci, 50 ont une cinétique très bien corrélée avec la disparition d'Otx2 et 24 sont spécifiques du RPE. Ces gènes contrôlent des fonctions importantes telles que la mélanogenèse, le métabolisme des rétinoïdes, la régulation du stress oxydatif, la concentration du pH et de métaux ; des fonctions nécessaires à l'homéostasie du RPE et au maintien des photorécepteurs.

Les principaux dysfonctionnements étant localisés au niveau du RPE, le gène *Otx2* y a été supposé jouer un rôle prépondérant dans le déclenchement de la dégénérescence des

photorécepteurs. Afin de tester cette hypothèse, une stratégie a été recherchée pour réaliser une ablation sélective du gène *Otx2* uniquement dans les cellules du RPE. L'absence de lignée de souris exprimant une recombinase Cre inductible.spécifiquement dans les cellules du RPE interdisait une approche génétique telle que celle mise en œuvre dans toute la rétine avec la lignée *Otx2*$^{flox/CreERT2}$. Une alternative a consisté à introduire directement la recombinase Cre dans les cellules du RPE de souris *Otx2*$^{flox/flox}$. Pour cela, en collaboration avec le Dr. Alexis Bemelmans (Institut de la Vision, Paris), le gène Cre a été inséré au sein des séquences d'un vecteur lentiviral et des particules de ce lentivirus recombinant ont été injectées dans l'espace sous-rétinien. Du fait de l'activité phagocytaire importante des cellules du RPE, les particules virales sont internalisées exclusivement dans cet étage de la rétine. Ces injections lentivirales topiques ont permis une élimination spécifique d'*Otx2* dans le RPE. Le phénotype complet de la rétine avec la dégénérescence des photorécepteurs a été récapitulé. En utilisant la même méthode pour restaurer l'expression d'*Otx2* spécifiquement dans le RPE de rétines self-knockout *Otx2*, il a été possible de supprimer intégralement le phénotype de dégénérescence des photorécepteurs. Ainsi, la fonction de ce facteur de transcription est cellulaire non-autonome, la survie des photorécepteurs dépendant uniquement de son action dans le RPE.

Dans un second temps, afin d'identifier plus précisément les fonctions régulatrices d'Otx2, un protocole d'immuno-précipitation de la chromatine suivi de séquençage de masse a été mis au point en collaboration avec le Dr. Michael Clarkson (U631, Nice). Les sites de liaison d'Otx2 à la chromatine ont été mis en évidence dans le RPE. Ils confirment la présence de la protéine Otx2 sur des éléments régulateurs situés à proximité de gènes contrôlant des fonctions du RPE altérées par le self-knockout.

Ces résultats ont été publiés dans l'édition du 12 Juin 2013 de la revue « The Journal of Neuroscience » sous le titre « Loss of Otx2 in the adult retina disrupts retinal pigment epithelium function, causing photoreceptor degeneration. » par Michaël Housset, Alexander Samuel, Mohamed Ettaiche, Alexis Bemelmans, Francis Béby, Nathalie Billon, et Thomas Lamonerie.

Neurobiology of Disease

Loss of Otx2 in the Adult Retina Disrupts Retinal Pigment Epithelium Function, Causing Photoreceptor Degeneration

Michael Housset,[1,2,3] Alexander Samuel,[1,2,3] Mohamed Ettaiche,[4] Alexis Bemelmans,[5] Francis Béby,[6] Nathalie Billon,[1,2,3] and Thomas Lamonerie[1,2,3]

[1]Institut de Biologie Valrose, University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences, [2]CNRS, UMR7277, and [3]Inserm U1091, Nice F-06108, France, [4]Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7275, Valbonne F-06560, France, [5]Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, Commissariat à l'Energie Atomique, Fontenay-aux-Roses F-92265, France, and [6]Department of Ophthalmology, Queen Fabiola Children's University Hospital, 1020 Brussels, Belgium

Photoreceptors are specialized neurons of the retina that receive nursing from the adjacent retinal pigment epithelium (RPE). Frequent in the elderly, photoreceptor loss can originate from primary dysfunction of either cell type. Despite intense interest in the etiology of these diseases, early molecular actors of late-onset photoreceptor degeneration remain elusive, mostly because of the lack of dedicated models. Conditional *Otx2* ablation in the adult mouse retina elicits photoreceptor degeneration, providing a new model of late-onset neuronal disease. Here, we use this model to identify the earliest events after *Otx2* ablation. Electroretinography and gene expression analyses suggest a nonautonomous, RPE-dependent origin for photoreceptor degeneration. This is confirmed by RPE-specific ablation of *Otx2*, which results in similar photoreceptor degeneration. In contrast, constitutive *Otx2* expression in RPE cells prevents degeneration of photoreceptors in *Otx2*-ablated retinas. We use chromatin immunoprecipitation followed by massive sequencing (ChIP-seq) analysis to identify the molecular network controlled *in vivo* by Otx2 in RPE cells. We uncover four RPE-specific functions coordinated by Otx2 that underpin the cognate photoreceptor degeneration. Many direct Otx2 target genes are associated with human retinopathies, emphasizing the significance of the model. Importantly, we report a secondary genetic response after *Otx2* ablation, which largely precedes apoptosis of photoreceptors, involving inflammation and stress genes. These findings thus provide novel general markers for clinical detection and prevention of neuronal cell death.

Introduction

In degenerative disorders, brain neurons can succumb to intrinsic failure or to dysfunction of their environment, such as cytokine release by microglia (Zindler and Zipp, 2010). Similarly, photoreceptors may die from autonomous or nonautonomous defects. In the mature retina, outer segments of photoreceptors establish close contact with retinal pigment epithelium (RPE) microvilli (Bramall et al., 2010). RPE cells perform essential functions for photoreceptors, including homeostasis of the microenvironment, protection against light-induced oxidative damage, regeneration of photo-pigment, and phagocytosis of shed discs (Young and Bok, 1969). Defects in any of these functions lead to a progressive loss of photoreceptors (Pacione et al., 2003). However, the molecular links that connect RPE alteration to photoreceptor degeneration remain poorly understood.

The use of animal models that develop retinal diseases with similar traits to humans has enhanced our understanding of inherited retinal deficiencies. However, because most relevant mutations also affect developmental processes, these models generally preclude the assessment of gene function in the mature retina. In general, there is a paucity of suitable models for adult diseases (Fletcher et al., 2011). In particular, very few of the existing models allow the study of the early genetic changes at the root of photoreceptor degeneration. One important regulatory gene that is expressed both in RPE and photoreceptor cells (the major cell types involved in retinal diseases) is *Otx2*. This gene encodes a key transcription factor for the development of the brain and sensory organs (Acampora et al., 1995; Cantos et al., 2000; Fossat et al., 2006). During retina development, Otx2 regulates RPE specification (Martinez-Morales et al., 2001), and photoreceptor and bipolar cell differentiation and maturation (Nishida et al., 2003; Koike et al., 2007; Sato et al., 2007). *Otx2* expression is maintained in these three cell types throughout life (Fossat et al., 2007) and is critical for photoreceptor maintenance (Beby et al., 2010). Otx2 also modulates the plasticity of the visual cortex (Beurdeley et al., 2012). Mutations of this gene in humans have been linked to ocular malformation, pituitary defects, and mental retardation (Gorbenko Del Blanco et al., 2012).

We developed a genetic model that allows conditional *Otx2* ablation in mice at any life stage (Fossat et al., 2006). In the adult

Received March 13, 2013; revised April 26, 2013; accepted April 26, 2013.

Author contributions: M.H. and T.L. designed research; M.H., A.S., M.E., F.B., and T.L. performed research; A.B. contributed unpublished reagents/analytic tools; M.H., A.S., M.E., N.B., and T.L. analyzed data; M.H., N.B., and T.L. wrote the paper.

This work was supported by the CNRS and Retina France (T.L.). M.H. was supported by the French Research Ministry (fellowship) and the Fondation Recherche Médicale. We thank Michaël Delhorbe and Cendrine Dubaud for expert handling of mice; Mickael Clarkson for help in ChIP-seq setup; Raivo Kolde for statistical analyses; and Martin Raff, Christian Braendle, and Pierre Godement for comments on the manuscript.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Dr. Thomas Lamonerie, Institut de Biologie Valrose, University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences, Nice F-06108, France. E-mail: lamonerie@unice.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1099-13.2013

Copyright © 2013 the authors 0270-6474/13/339890-15$15.00/0

retina, *Otx2* ablation leads to dramatic photoreceptor degeneration, starting 20 d later and ending with their full disappearance within 4 months (Beby et al., 2010). Here, we have used this model to identify the primary cellular and molecular bases of this neuronal degeneration. Using a combination of functional and genomic approaches, we demonstrate a nonautonomous, RPE-dependent origin for photoreceptor cell degeneration. We identify two key features of the genetic response to the synchronous ablation of *Otx2*: (1) immediately after *Otx2* ablation, we observe downregulation of genes directly regulated by Otx2, controlling functions essential for RPE homeostasis; and (2) we observe a shifted wave of upregulated genes involved in stress, inflammation, and apoptosis. As these genes are induced well before apoptosis starts, their identification provides new potential markers for clinical screening and prevention of neurodegeneration.

Materials and Methods

Mouse breeding and tamoxifen administration. Mice were housed with a 12 h light/dark cycle. All mouse strains were maintained in 129/SV background. $Otx2^{CreERT2/flox}$, $Otx2^{flox/flox}$, and $Otx2^{Otx2\text{-}GFP/+}$ mouse lines were generated as described previously (Fossat et al., 2006, 2007). For *Otx2* self-knock-out (sKO), one intraperitoneal injection of tamoxifen (Sigma-Aldrich; 10 mg/ml in sunflower oil) was done at 1 mg per 20 g body weight at 3:00 P.M. Mice of either sex were used. Animals were handled according to French regulation, the European Communities Council Directive, as well as the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Protocols were approved by CIEPAL-Azur, the local ethic committee for animal experimentation. T.L. received the authorization to experiment #A06–261 from the Direction Départementale de la Protection des Populations des Alpes-Maritimes, France.

Scotopic electroretinogram recordings. After overnight dark adaptation, mice were anesthetized (60 mg/kg pentobarbital, i.p.) under dim red light (640 nm) and placed on a heating pad to maintain body temperature near 38°C. Pupils were dilated with 2.5% neosynephrine and 0.5% Mydriaticum, and corneas were kept moist with local application of 1% carboxymethylcellulose sodium (Celluvisc; Allergan). Electroretinogram (ERG) was recorded using an AgCl ring electrode in contact with the corneal surface through a thin layer of 0.7% methylcellulose. Needle electrodes placed in the ear served as reference. Animals were grounded with a subcutaneous electrode placed in the neck region. The dark-adapted responses (scotopic ERG) were recorded with an ERG test system (UTAS 2000; LKC Technologies), as described previously (Ettaiche et al., 2001). Light stimuli were produced by a Grass PS 22 xenon flash positioned 10 cm from the eye. Because of anesthesia duration (20 min), ERGs were recorded on both eyes using only a flash intensity of 3.3 log scot td.sec. Responses of 5 successive flashes were averaged, and the interflash interval was 60 s. Responses were differentially amplified (0.3–500 Hz), averaged, and stored using a UTAS EM-2000 signal averaging system (LKC Technologies).

The amplitude of the a-wave and the implicit time were measured from the prestimulus baseline to the trough of the a-wave. The b-wave amplitude and the b-wave implicit time were measured from the trough of the a-wave to the positive peak. The amplitude of the c-wave and the implicit time were measured from the prestimulus baseline to the peak of the c-wave.

RNA isolation and qRT-PCR. Retinas were dissected at 3:00 P.M. in cold PBS. Total RNA was prepared with TRIzol (Invitrogen). First-strand cDNA was synthesized using 1 μg of total mRNA, MLV reverse transcriptase (Promega), and random hexamers. For real-time PCR, 1/100 of cDNA was used per reaction using PowerSYBR Green PCR mix and StepOne Plus apparatus and software (Applied Biosystems). Comparable efficiency of each PCR was first demonstrated using serial dilutions of control cDNA. Gene to TBP ratios were determined from three independent assays by the $2-\Delta C_t$ method. PCR cycles are as follows: 15 s at 95°C, 30 s at 60°C, 30 s at 72°C. Sequence information for primers and amplicon size are available upon request.

Microarray analysis. All microarrays were performed in biological triplicates. RNA processing for microarray was performed by ProfileXpert platform. Quantity and quality of RNA were ensured before labeling by nanodrop (Thermo Scientific) and Bioanalyzer 2100 (Agilent). Samples with an RNA integrity number >7.0 were considered suitable for labeling. For samples meeting standards, 1 μg of total RNA was labeled using the MessageAmp II Kit (Ambion). A total of 10 μg of labeled and fragmented cRNA were then hybridized to CodeLink Mouse Whole Genome Bioarray (GE Healthcare) for 18 h at 37°C. Automated washing and staining were performed according to the manufacturer's protocols. Chips were scanned with a high-numerical aperture and flying objective (FOL) lens in the Genepix 4000B scanner (Acon) and GENEPIX software. Raw expression data were analyzed using CODELINK expression software, version 4.0 (GE Healthcare).

Microarray data processing. CODELINK software was used to normalize the raw hybridization signal on each array to the median of the array (median intensity is 1 after normalization) for better cross-array comparison. The threshold of detection was calculated using the normalized signal intensities of the 100 negative control samples in the array. Signal intensities were then converted to log base 2 values. Comparison and filtering were performed using GENESPRING version 7.0 software (Agilent). Gene expression data were analyzed by comparing each time point against all others and time days 0 and 2 against days 4 and 8 using moderated *t* test from Bioconductor package Limma (Gentleman et al., 2004) with false discovery rate level 0.2. Genes with a fold change ratio <1.3 were filtered out. Cluster analyses of expression data of regulated genes were performed using the TM4 program (Saeed et al., 2006).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). For RPE ChIP, two independent pools of chromatin were prepared: one from wild-type (WT) mice that express normal Otx2 protein and one from *Otx2-GFP* knock-in mice that express an Otx2-GFP fusion protein. For each pool, 40 mouse eyes were dissected to remove cornea, lens, and retina. RPE/choroid eye cups were directly cross-linked in 1% formaldehyde in DMEM at room temperature for 10 min then quenched by adding glycine at a final concentration 125 mM and incubated at room temperature for 5 min. Eye cups were washed twice in cell wash buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 125 mM glycine, 1 mM PMSF). RPE/choroid nuclei (~5 million) were then isolated with a Dounce (pestle B) in cell lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% SDS, 125 mM glycine, 1 mM PMSF). Eye cups were removed and RPE/choroid nuclei suspension was obtained. The ChIP procedures were performed as described at the Farnham Laboratory website (http://farnham.genomecenter.ucdavis.edu/protocol.html). A goat antibody raised against OTX2 (R&D Systems) and a rabbit antibody raised against GFP (Abcam) were used to specifically precipitate chromatin–Otx2 complexes from WT mice in the WT assay, and chromatin–Otx2-GFP complexes from $Otx2^{Otx2\text{-}GFP/+}$ mice in the Otx2-GFP assay, respectively. A goat antibody raised against Laminin B (Santa Cruz Biotechnology) and the rabbit GFP antibody were applied to WT RPE chromatin and used as controls for WT and Otx2-GFP assays, respectively. The final DNA precipitates were resuspended in 20 μl of Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), and 0.5 μl of each sample was used for PCR with primers designed to amplify 300 bp fragments in genomic regions. The relative enrichment of each genomic region was measured as the ratio of the amount PCR sample obtained with a specific assay to that of its respective control. Sequence information for primers and amplicon size are available upon request.

ChIP-seq, clustering of sequence reads, and identification of Otx2 binding regions (OBRs). ChIP-seq experiments were performed according to standard protocols as previously described (Kobi et al., 2010). All four samples of ChIP dual assay were processed for ChIP-seq by IGBMC sequencing platform (IGBMC). Quantity and quality of DNA were ensured before processing by Qubit dsDNA HS Kit (Invitrogen) and Bioanalyzer 2100 (Agilent). For each sample, 10 ng of DNA was used to generate the ChIP-DNA library. Libraries were analyzed by Bioanalyzer 2100 (Agilent) before they were massively sequenced by Illumina GAIIx Sequencer generating 40 million reads of 35 bp length per sample on average. Raw reads data were analyzed and aligned on mouse genome mm9 by CASAVA version 1.8.

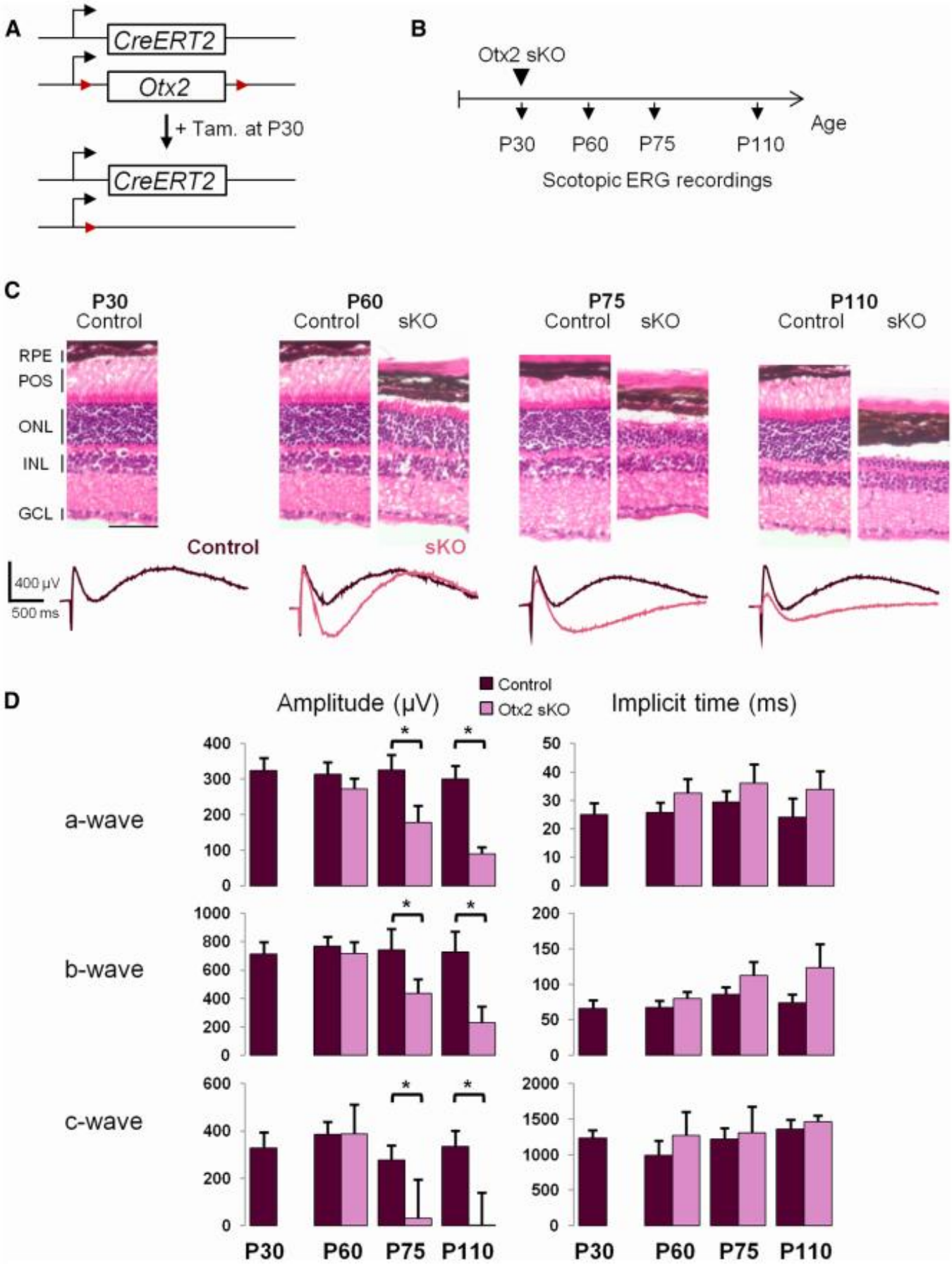


Figure 1. *Otx2* sKO deeply impairs RPE and neural retina activity. ***A***, Schematic diagram of *Otx2* allele constitution before and after induction of sKO, by tamoxifen injection at P30. Boxes represent coding sequences of each *Otx2* allele; black arrows, *Otx2* promoters; red triangles, *loxP* sites. ***B***, Schematic of the time course for ERG recordings. ***C***, Histological and functional (*Figure legend continues.*)

Peak detection for WT and Otx2-GFP assays were performed using the MACS software (http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/) (Feng et al., 2012) under settings where the Lmnb-ChIP and GFP-ChIP made on WT RPE were used as negative control, respectively. OBRs sharing at least 50 bp in both assays were considered as common OBRs. Common OBRs were then annotated using PeakAnalyzer version 1.3 free software, with respect to the coordinates of the beginning and end of RefSeq transcripts. Clustering was performed by first generating density (.wig format files) counting the number of tags in a 25pb sliding window for each ChIP-seq.

The nucleotide sequences for 500 highly occupied loci were extracted from the UCSC genome browser of mouse genome build mm9 and analyzed for overrepresented sequences by MEME-ChIP software version 4.8 (Machanick and Bailey, 2011).

Construction and production of lentiviral vectors. The lentiviral plasmids used in this study were derived from the control pTrip-PGK-GFP plasmid (Bemelmans et al., 2005). For the *Cre-GFP* transgene vector, the 1 kb BglII fragment of pTZCreN plasmid, which includes the *Cre* cDNA and the nuclear localization signal, was inserted in-frame at the N terminus of GFP in pTrip-PGK-GFP. For the *Otx2-HA* transgene, mouse *Otx2* cDNA fused in C-terminal to HA-tag was substituted to the GFP ORF in the pTrip-PGK-GFP plasmid using BamHI and BstbI sites. The sequences were verified by sequencing and *in vitro* functional assays.

Recombinant lentiviral particles were produced by transient transfection of 293T cells as previously described (Kostic et al., 2011). Viral supernatants were concentrated by ultracentrifugation at 70,000 × *g* for 90 min at 4°C. Finally, to achieve a 1000-fold concentration of the initial supernatant, viral pellets were resuspended in a minimum of volume of PBS containing 10 mg/ml BSA. Aliquots of 5–10 μl were then stored at −80°C. Total particle concentration of the viral stocks was estimated by quantification of the p24 capsid protein using RETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISA kit (ZeptoMetrix) according to the manufacturer's instructions.

Subretinal injection. Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (66 mg/kg) and xylazine (11 mg/kg), and pupils were dilated with 2.5% neosynephrine and 0.5% Mydriaticum (Novartis Pharma). Mice were then positioned on a heated platform to maintain body temperature, and corneas were kept moist with local application of 0.9% NaCl physiologic serum (bébisol, Omega Pharma). The dorsal cornea was punctured at its periphery with a 30-gauge needle. A 34-gauge blunt needle mounted on a Nanofil syringe (World Precision Instruments) was then inserted into this hole to reach the posterior temporal part of the subretinal space. A total of 3 μl of viral suspension containing 40 ng of p24 was injected at 300 nl/s to create a subretinal bleb, and the needle was left in place 30 s before withdrawal. $Otx2^{flox/flox}$ and WT mice were injected at P30 with Cre-GFP viral suspension, whereas $Otx2^{CreERT2/flox}$ were injected at P25 with Otx2-HA viral suspension. As a control, the contralateral eye was injected with GFP viral suspension.

Immunocytochemistry and histological studies. Eyes were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 3 h at 4°C, rinsed twice (30 min) in PBS, protected in PBS-sucrose (10–30%) and frozen in Tissue-Tek OCT at −80°C. Sections (10 μm) were mounted onto SuperFrost+ slides (Fisher Scientific), blocked 1 h in PBST (PBS with 0.2% gelatin and 0.1% Triton X-100) containing 5% donkey serum and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies diluted in PBST with 2% donkey serum. After rinsing, slides were incubated 1 h at 20°C with the secondary antibodies. Specimens were washed twice 15 min in PBS, coverslipped with Vectashield, observed under fluorescent LSM 510 meta microscope (Carl Zeiss), and images analyzed using LSM Image browser software version 4.2 (Carl Zeiss). Primary antibodies were used at the following concentrations: rabbit anti-GFP (1/1000) (Abcam), and goat anti-Otx2 (1/1000) (R&D Systems). Secondary antibodies (1/1000) included the following: donkey anti-goat AlexaFluor-647 and donkey anti-rabbit AlexaFluor-488 (Invitrogen). Hematoxylin and eosin staining was performed according to standard protocol.

Statistical analyses. Gene ontology analyses were performed using the DAVID tool (http://david.abcc.ncifcrf.gov/). Gene enrichment for retinal disease was calculated using Fisher's exact test. *p* value corresponds to the enrichment of the 71 deregulated genes in a list of 292 retinopathy-related genes, including RetNet genes and self-curated gene lists (AMD and oculocutaneous genes) on Malacards (www.Malacards.org) compared with mouse whole genome.

Results

RPE and/or Müller cell activity is first modified in *Otx2* sKO retina

To address the mechanisms of late-onset photoreceptor degeneration, we devised a model coined sKO, which combines a floxed *Otx2* allele and an *Otx2* allele expressing the tamoxifen-inducible Cre-ERT2 recombinase. We triggered *Otx2* sKO in adult $Otx2^{flox/CreERT2}$ mice at postnatal day 30 (P30). Tamoxifen- or vehicle-treated animals are referred to as mutants or controls, respectively (Fig. 1*A*). Although gene deletion was efficient in all mutant retinal cell types expressing *Otx2* (i.e., RPE, photoreceptor, and bipolar cells), it only provoked the death of photoreceptor cells, which underwent apoptosis from 20 d later (Beby et al., 2010). The cause of photoreceptor degeneration might be either autonomous or result from dysfunction of neighboring cells (e.g., RPE) or both. To identify the cellular origin of photoreceptor degeneration, we first performed ERG, which simultaneously records light-induced electric activity of photoreceptor cells (a-wave), bipolar cells (b-wave), and Müller and RPE cells (c-wave). Retinal activity of control and *Otx2* mutant mice was measured in scotopic conditions at P30, P60, P75, and P110 (Fig. 1*B*). At P60, one month after Otx2 ablation, amplitude and implicit time of a-, b-, and c-waves of mutant retinas were not significantly different from control retinas. By contrast, the c-wave exhibited a strong hyperpolarization component in mutants (−400 μV), which was absent in controls, suggesting that, at earlier time points, only RPE and/or Müller cells were affected (Fig. 1*C*). At P75, amplitude of a- and b-wave decreased by 45% and 41%, respectively, in mutants, whereas depolarization amplitude of c-wave decreased by 89%. The hyperpolarization component of c-wave persisted in mutants (Fig. 1*D*). Finally, at P110, a-wave was further reduced by 70% in mutants, reflecting the thinning of photoreceptor layer observed at that time. The b-wave was reduced by 68% in mutants. The c-wave depolarization was abolished and the hyperpolarization component was very weak.

Together, these results show that deletion of *Otx2* in the whole retina dramatically alters the function of RPE and/or Müller cells early on, and over a more extended time period, Otx2 ablation also affects activity of photoreceptor and bipolar cells. Thus, the latter two cell types exhibited parallel deterioration of their electric activity at a slower pace compared with RPE cells.

Identification of a core set of deregulated genes after *Otx2* sKO in the mature retina

The *Otx2* sKO model displays two features that make it particularly interesting for investigating the molecular mechanisms of photoreceptor degeneration: first, gene ablation occurs in >90% of cells and Otx2 protein completely disappears 4 d after *Otx2* sKO (Beby et al., 2010). Second, there is an asymptomatic period of 10 d, during which primary molecular changes accounting for subsequent photoreceptor degeneration may take place. We took advantage of these two features in time-series experiments of

←

(*Figure legend continued.*) evolution of adult retina after *Otx2* sKO. Top, Hematoxylin and eosin staining of control and sKO retina vertical section at the indicated times. Bottom, Scotopic ERG traces of control (purple) and sKO (red) mice at corresponding times. ***D***, Quantification of averaged amplitude and implicit time of a-, b-, and c-wave in ERG of control and sKO mice at indicated times. Error bars indicate SD. $*p \leq 0.05$, statistically significant change (Student's *t* test). Tam, Tamoxifen; POS, photoreceptor outer segments; ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar, 50 μm.

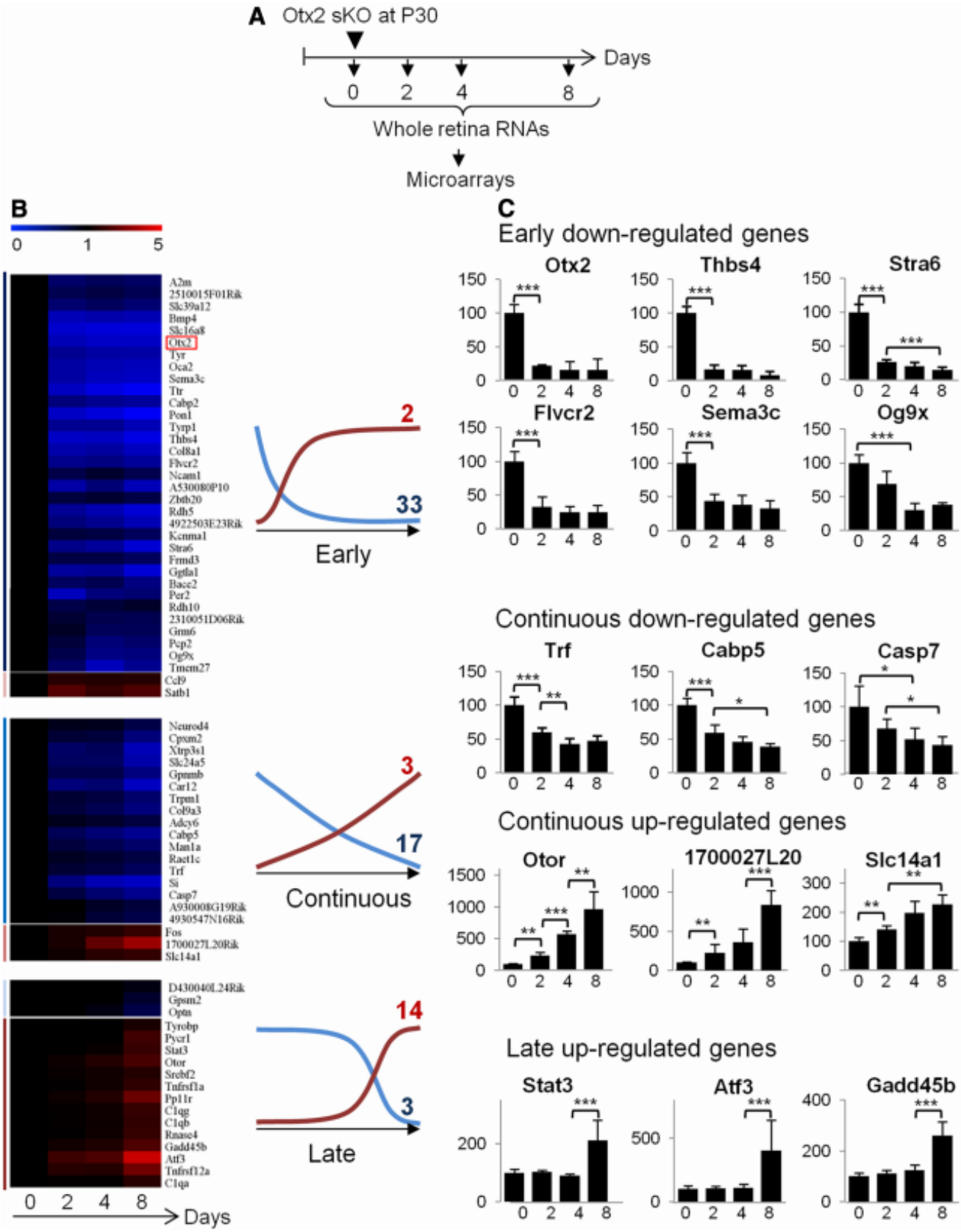


Figure 2. Two waves of gene deregulation are induced after *Otx2* sKO in the mature retina. ***A***, Schematic of the sampling for time-series transcriptome analysis. ***B***, Clustering of differentially expressed genes after *Otx2* sKO. Left, Downregulated and upregulated genes were grouped into three gene sets according to their kinetics of variation: early, continuous, and late. Heat map shows the averaged expression relative to day 0 for each time point. Right, Schematics of kinetic profile for each gene set with the number of downregulated (blue line) and upregulated (red line) genes. ***C***, Representative examples of qRT-PCR validation of all classes of deregulated genes after *Otx2* sKO in the adult retina. Histograms represent percentage of mRNA level at each time relative to level on day 0. Genes are categorized according to their profile in the time-series gene expression analysis. All experiments were done in triplicate. Error bars indicate SD. Significant changes between relevant consecutive time points: $^{*}p \leq 0.05$ (Student's *t* test); $^{**}p \leq 0.01$ (Student's *t* test); $^{***}p \leq 0.001$ (Student's *t* test).

Table 1. Properties of genes deregulated in Otx2 sKO retinas

Gene symbol	Category	RPE-specific OBR	Cell specificity	Function	Disease	References
Downregulated genes						
Otx2[a]	Early	−			A/M, RP	RetNet, 2013; Slavotinek, 2011
A2m	Early	+	RPE			Booij et al., 2010
Bmp4[a]	Early	+	RPE		A/M	Booij et al., 2010; Liao et al., 2010; Slavotinek, 2011
Slc16a8[a]	Early	+	RPE			Booij et al., 2010
Tyr[a]	Early	+	RPE	Melanogenesis	oca	Booij et al., 2010; Ajmal et al., 2012
Oca2[a]	Early	+	RPE	Melanogenesis	oca	Booij et al., 2010; Ray and Sengupta, 2010
Tyrp1[a]	Early	+	RPE	Melanogenesis	oca	Booij et al., 2010; Liao et al., 2010; Zhang et al., 2011
Ttr[a]	Early	+	RPE	Retinol metabolism		Liao et al., 2010
Rdh5[a]	Early	+	RPE	Retinol metabolism	RP	Booij et al., 2010; RetNet, 2013
Stra6[a]	Early	+	RPE	Retinol metabolism	A/M	Booij et al., 2010; Slavotinek, 2011
Rdh10	Early	+	RPE	Retinol metabolism		Booij et al., 2010
Sema3c[a]	Early	+	RPE			Booij et al., 2010
Thbs4[a]	Early	+	RPE			Booij et al., 2010
Col8a1[a]	Early	+	RPE		AMD	Booij et al., 2010; Neale et al., 2010
Flvcr2[a]	Early	+	RPE			Booij et al., 2010
Tmem27[a]	Early	+	RPE			Booij et al., 2010
Nt5dc2	Early	+				
Pon1[a]	Early	+			AMD	Pauer et al., 2010
A530080P10	Early	+				
Zbtb20	Early	+				
Per2[a]	Early	+				
Cpxm2	Continuous	+	RPE			Booij et al., 2010
Trf[a]	Continuous	+	RPE		AMD	Chowers et al., 2006; Wysokinski et al., 2011
Car12[a]	Continuous	+				
Casp7[a]	Continuous	+				
Slc39a12[a]	Early	−	RPE			Booij et al., 2010
Slc24a5[a]	Continuous	−	RPE	Melanogenesis		Booij et al., 2010
Gpnmb[a]	Continuous	−	RPE	Melanogenesis		Liao et al., 2010
Si[a]	Continuous	−	RPE	Melanogenesis		Liao et al., 2010
Xtrp3s1[a]	Continuous	−	RPE			Booij et al., 2010; Liao et al., 2010
Trpm1	Continuous	−	RPE / BC	mGluR6 pathway	CSNB	Siegert et al., 2012; Liao et al., 2010; RetNet, 2013
Grm6[a]	Early	−	BC	mGluR6 pathway	CSNB	Siegert et al., 2012; RetNet, 2013
Pcp2	Early	−	BC	mGluR6 pathway		Siegert et al., 2012
Frmd3	Early	−	BC			Siegert et al., 2012
Cabp2[a]	Early	−	BC			Siegert et al., 2012
Og9x[a]	Early	−	BC			Siegert et al., 2012
Cabp5[a]	Continuous	−	BC			Siegert et al., 2012
Neurod4	Continuous	−	BC			Siegert et al., 2012
Optn[a]	Late	−	BC			Swarup and Nagabhushana, 2010; Siegert et al., 2012
Gpsm2	Late	−	BC			Dhingra et al., 2008
Dnajc5g	Early	−				
Kcnma1	Early	−				
Ggtla1	Early	−				
Rpusd1	Early	−				
Ncam1	Early	−				
Bace2[a]	Early	−				
Col9a3[a]	Continuous	−				
Adcy6	Continuous	−				
A930008G19Rik	Continuous	−				
Man1a	Continuous	−				
Raet1c	Continuous	−				
4930547N16Rik	Continuous	−				
D430040L24Rik	Late	−				
Upregulated genes						
Slc14a1[a]	Continuous	−	RPE			Booij et al., 2010
Srebf2	Late	−	RPE			Booij et al., 2010
Ccl9[a]	Early	−				
Satb1	Early	−				
1700027L20Rik[a]	Continuous	−			A/M	Orr et al., 2011
Fos[a]	Continuous	−		Stress signaling		
Stat3[a]	Late	−		Stress signaling		
C1qg	Late	−		Stress signaling		
Atf3[a]	Late	−		Stress signaling		
C1qb	Late	−		Stress signaling		

(*Table continues.*)

Table 1. Continued

Gene symbol	Category	RPE-specific OBR	Cell specificity	Function	Disease	References
C1qa	Late	–		Stress signaling		
Tnfrsf1a	Late	–		Stress signaling		
Gadd45b[a]	Late	–		Stress signaling		
Tnfrsf12a	Late	–		Stress signaling		
Tyrobp	Late	–				
Pycr1	Late	–				
Otor[a]	Late	–				
Pp11r	Late	–				
Rnase4	Late	–				

[a]Gene tested for qRT-PCR validation. All variations were validated, except for Optn and Ccl9.

OBR, presence of an Otx2 bound region in RPE nuclei. Associated disease abbreviations: A/M, Anophthalmia/microphthalmia; RP, retinitis pigmentosa; Oca, oculocutaneous albinism; CSNB, congenital stationary night blindness.

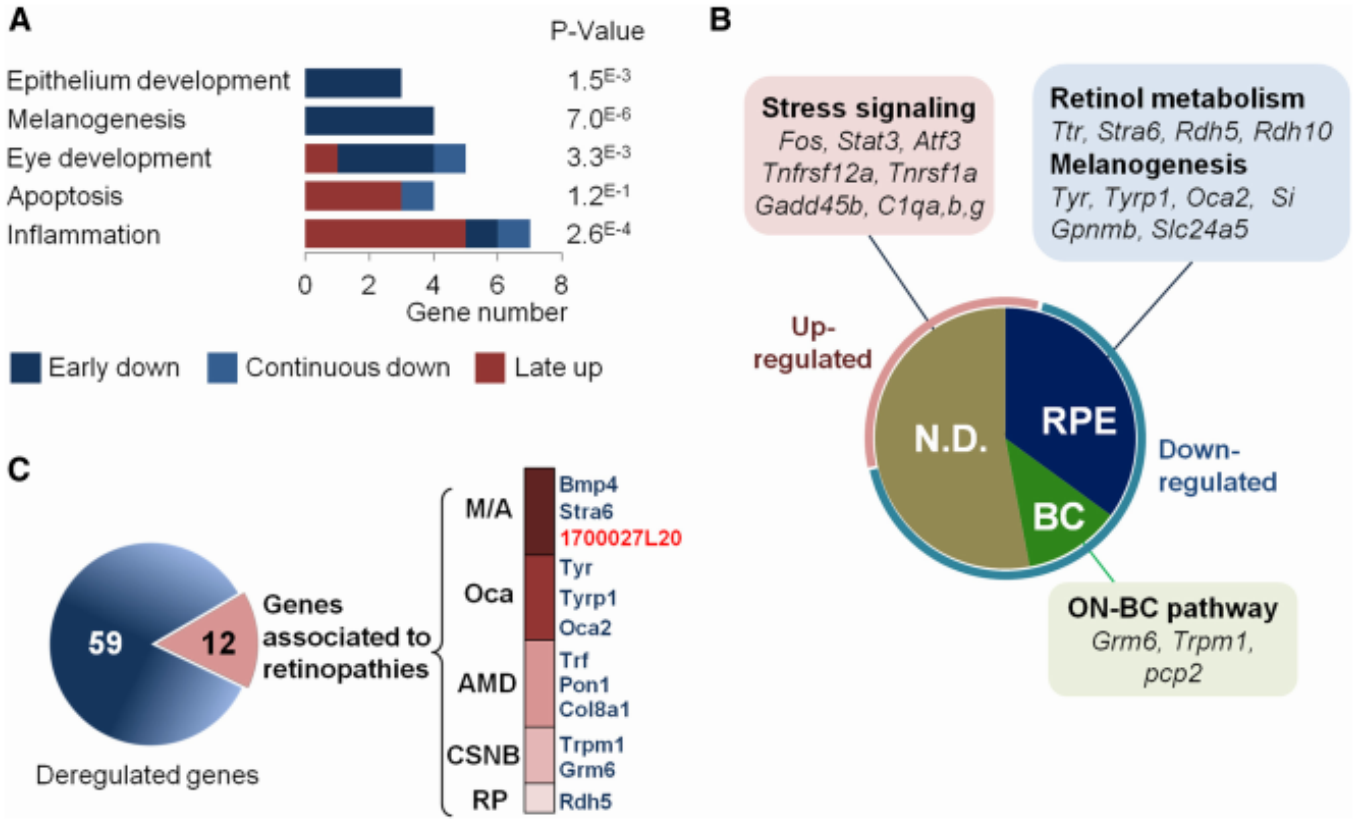


Figure 3. Functional categorization of genes deregulated after *Otx2* ablation. ***A***, Gene Ontology analysis of deregulated genes. Histograms represent the number of color-coded genes of each category, with statistical significance shown by *p* value. ***B***, Distribution of deregulated genes according to retinal cell-type specificity and functional clusters: genes exclusively expressed in RPE cells (blue, 34%), in bipolar cells (green, 14%), or not determined or not specific of a cell-type (N.D., brown, 52%). Distribution of downregulated (light blue) and upregulated (light red) genes is shown in the surrounding ring. Functional clusters identified within each group are shown with gene symbols. BC, Bipolar cell. ***C***, Relevance to human retinopathies. Red portion of chart represents deregulated genes related to five types of retinopathies. Gene symbols of downregulated (blue) and upregulated (red) genes are indicated in front of corresponding retinopathies. M/A, Microphthalmia/anophthalmia; Oca, oculocutaneous albinism; CSNB, congenital stationary night blindness; RP, retinitis pigmentosa.

gene expression profiling, immediately after *Otx2* gene ablation, and before degeneration onset, to focus on initial genetic events.

Otx2 deletion was induced at P30, and whole retina RNA was extracted on days 0, 2, 4, and 8 after induction (Fig. 2*A*). For each time point, three mice were used. Each sample was independently processed and applied to a Codelink mouse whole genome microarray, yielding 12 datasets. Differential expression was analyzed for all combinations of different time points using moderated *t* tests from Bioconductor (Gentleman et al., 2004). We found 71 significantly genes deregulated at at least one of the time points, of which 52 (74%) showed downregulation (Fig. 2*B*; Table 1). To confirm microarray results, 39 of the 71 deregulated genes were randomly selected to quantify their mRNA expression levels using qRT-PCR at days 0, 2, 4, and 8. Thirty-seven of 39 tested genes (96%) exhibited the same profile, thus validating our microarray results (Fig. 2*C*; Table 1).

Next, we analyzed the kinetics of expression variation of all deregulated genes. Using K-mean clustering with Mev software (Saeed et al., 2006), we found three different kinetic profiles (Fig. 2*B*): (1) Early genes (33 downregulated; 2 upregulated) showed strongest changes of expression between days 0 and 2 and moderate or no further variation. As expected, the full-length *Otx2* transcript fell into this category. (2) Continuous genes (17 downregulated and 3 upregulated) showed steady variation all along the time course. (3) Late genes (3 downregulated and 14 upregulated genes) changed their level of expression only between days 4 and 8. Interestingly, >94% of downregulated genes belong to early and continuous profiles, whereas 73% of upregulated genes

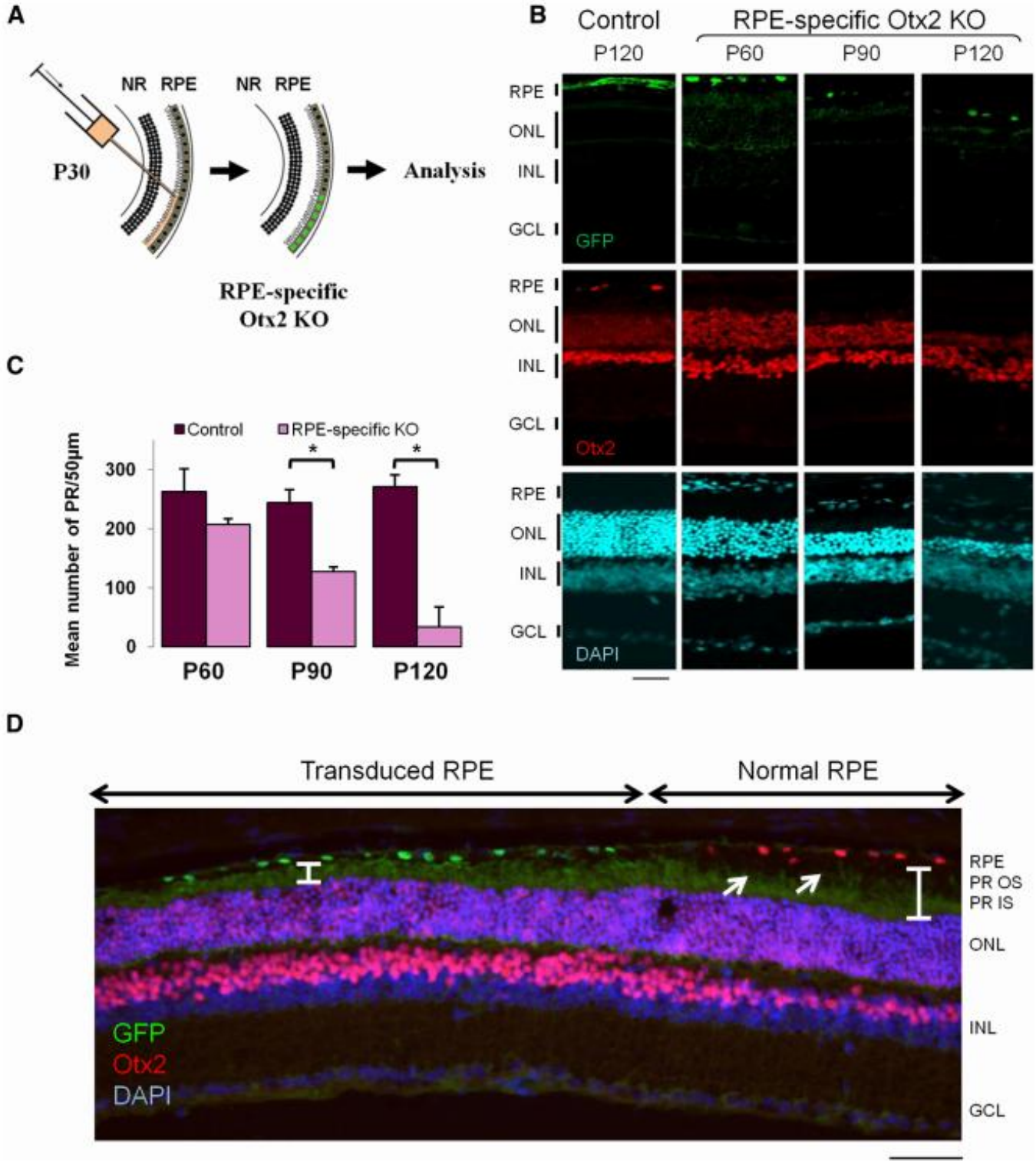


Figure 4. Otx2 RPE-specific functions are necessary for photoreceptor maintenance. ***A***, Schematic of RPE-specific *Otx2* conditional knock-out by subretinal injection of Cre-expressing lentivirus in P30 $Otx2^{flox/flox}$ mice. ***B***, Immunostaining of GFP (green), Otx2 (red), and DAPI staining on vertical sections of control and RPE-specific *Otx2* KO retinas at the indicated age, showing sustained Cre expression, RPE-specific *Otx2* ablation, and progressive loss of photoreceptors in RPE-KO mice. ***C***, Cell counts in the photoreceptor layer of retinal sections of control or RPE-specific *Otx2* conditional knock-out mice at indicated ages. Normalized fields of the same eye area were used. Cell numbers were determined by counting the nuclei in a 50-μm-wide region of retinal section located at equal distance from the ora serrata and the optic disk. For each point, three eyes were dissected. For each, three different regions were counted. Mean cell numbers are indicated for each condition. Error bars indicate SD. $^*p \leq 0.001$. ***D***, Coimmunostaining of GFP, Otx2, and DAPI staining on a vertical section of a P60 $Otx2^{flox/flox}$ retina showing adjacent Cre-expressing (transduced RPE) and nonexpressing areas. Tick bars indicate the thickness of photoreceptor segment in the corresponding areas; arrows indicate the preserved outer segments in noninfected area. Scale bar, 50 μm.

belong to the late profile. These results highlight two sequential waves of gene deregulation: in the first wave, loss of Otx2 is rapidly followed by downregulation of 50 genes. In the second wave, 17 genes are upregulated.

To gain insights into the biological response triggered by *Otx2* ablation, we first searched each cluster of deregulated genes for enriched functions using Gene Ontology (Fig. 3*A*). We found that early and continuous downregulated genes were associated

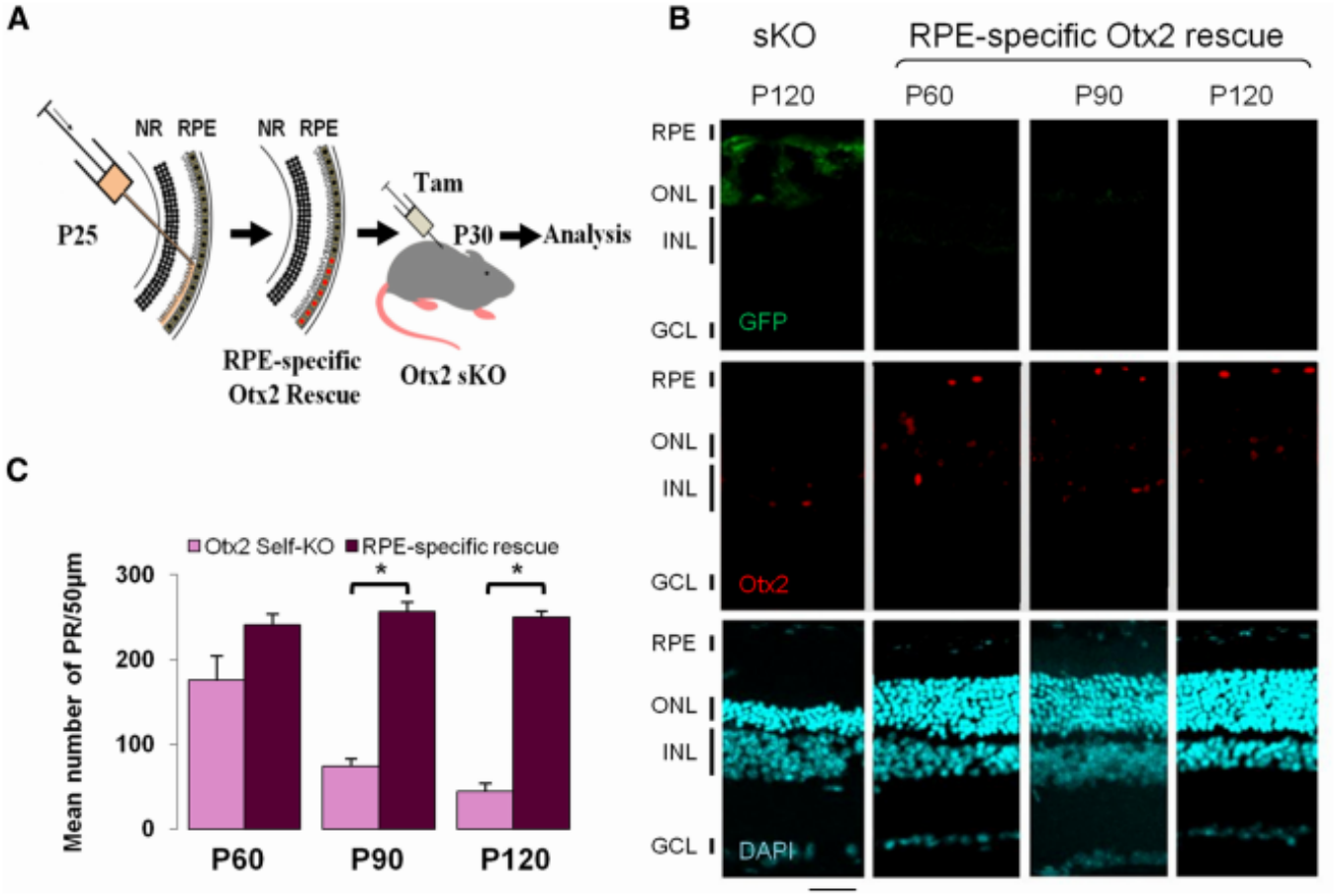


Figure 5. Otx2 RPE-specific functions are sufficient for photoreceptor maintenance. ***A***, Schematic of the RPE-specific rescue protocol. Lentivirus-expressing GFP (sKO) or Otx2-HA (RPE-specific rescue) were injected at P25 in the subretinal space of *Otx2*$^{flox/CreERT2}$ mice, and sKO was triggered by tamoxifen (Tam) administration at P30. ***B***, Immunostaining of GFP (green), Otx2 (red), rhodopsin (orange), and DAPI staining on vertical section of sKO and RPE-specific *Otx2* rescue retinas at the indicated age, showing sustained RPE-specific Otx2 expression and maintenance of photoreceptors in RPE-KO mice. ***C***, Cell counts in the photoreceptor layer of retinal sections of control or RPE-specific rescued mice at indicated ages. Cell numbers were determined as in Figure 4. For each, three different regions were counted. Mean cell numbers are indicated for each condition. Error bars indicate SD. *$p \leq 0.001$. Scale bar, 50 μm.

with RPE-specific functions, such as melanogenesis ($p \leq 0.00001$), epithelial development ($p \leq 0.001$), and eye development ($p \leq 0.01$), whereas upregulated genes of the late category related to inflammatory response ($p \leq 0.00001$) and apoptosis ($p \leq 0.2$). We next used molecular signatures of mouse neural retina cell types (Siegert et al., 2012) and human RPE (Booij et al., 2010; Liao et al., 2010) to assign cell specificity to all of the 71 deregulated genes (Fig. 3*B*). Twenty-five genes (35%, mostly downregulated) were specific to RPE cells, with 10 of them involved in two major RPE pathways: melanogenesis (*Tyr*, *Tyrp1*, *Oca2*, *Gpnmb*, *Si*, *and Slc24a5*) and retinol metabolism (*Ttr*, *Stra6*, *Rdh5*, and *Rdh10*). In line with Otx2 expression in bipolar cells, nine downregulated genes (12%) were specific to this cell type, with three of them involved in ON-bipolar mGluR6 pathway (*Grm6*, *Trpm1*, and *pcp2*). Yet, no photoreceptor-specific genes were found among the deregulated genes. Therefore, half of the early downregulated genes were specific to one cell type, mostly RPE cells. By contrast, the majority of late upregulated genes were not specific to any retinal cell type. Together, these observations suggest a two-step scenario where Otx2 loss initially deregulates genes controlling key RPE-specific functions. Then, these RPE alterations elicit subsequent activation of cell stress signaling and inflammation genes, initiating photoreceptor degeneration.

We aimed to examine whether the identified genes had already been known to be involved in retinal diseases, and we therefore scoured retinal disease databases. Of the 71 genes, 12 (17%) were associated with retinopathies. In humans, mutations of these genes were reported to cause microphthalmia or anophthalmia (*Stra6*, *Bmp4*, and *1700027L20Rik*), oculocutaneous albinism (*Tyr*, *Tyrp1*, and *Oca2*), susceptibility to age-related macular degeneration (AMD) (*Pon1*, *Col8a1*, and *Trf*), congenital stationary night blindness (*Grm6* and *Trpm1*) and retinitis pigmentosa (*Rdh5*) (Fig. 3*C*). These findings emphasize the capacity of our model to identify novel human retinopathies-related genes.

RPE-specific ablation of Otx2 recapitulates photoreceptor disease

Our analyses suggested that *Otx2* ablation primarily affects RPE function, which subsequently initiates photoreceptor degeneration. To confirm this hypothesis, we performed RPE-specific ablation of *Otx2* and asked whether it could recapitulate the sKO phenotype. We used subretinal injection of HIV-1-derived lentivirus. In the mature retina, beyond P15, lentivirus vector delivery at this site is known to target exclusively RPE cells because of the outer limiting membrane that functions as a barrier (Calame et al., 2011; Kostic et al., 2011). A suspension of lentivirus expressing a CreN-GFP fusion protein was injected in the subretinal space of one eye of *Otx2*$^{+/+}$ or *Otx2*$^{flox/flox}$ mice at P30 (Fig. 4*A*), and consequences were examined at P60, P90, and P120 (Fig. 4*B*). At least three mice (n = 3–6) were analyzed at each stage. As

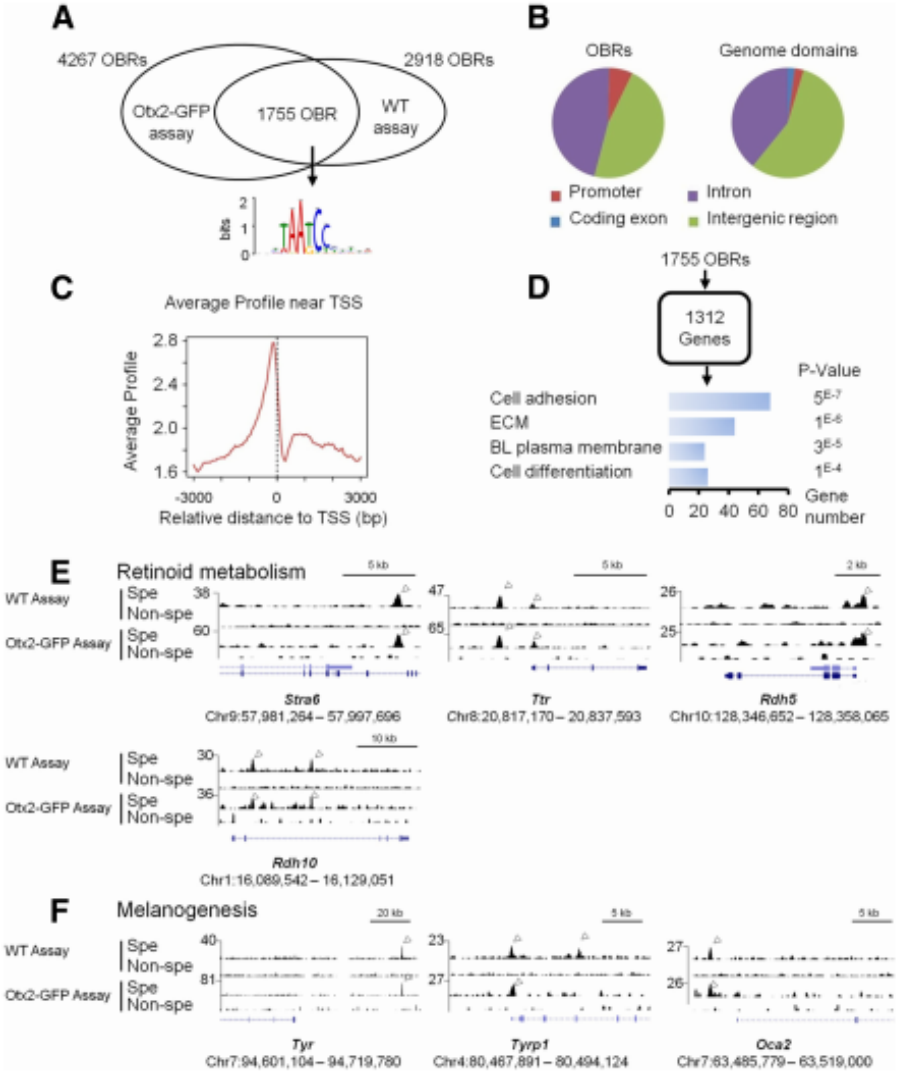


Figure 6. Identification of Otx2 targetome in RPE cells by dual ChIP-seq analysis. ***A***, Venn diagram comparison of identified OBRs in the RPE genome by Otx2-GFP and WT ChIP-seq assays. Weight matrix of overrepresented positions is shown below (E-value = 1.0e-313). ***B***, Comparison of the distribution of common OBRs (left) and genome domains (right): promoters (defined as 3 kb upstream TSSs, red), introns (purple), coding exons (blue), and intergenic regions (green). ***C***, Distribution of common OBRs in a concatenated 6 kb window centered on TSSs. ***D***, OBR association to closest genes and Gene Ontology analyses. ***E***, ***F***, Visualization of Otx2 ChIP-seq peaks obtained with WT and Otx2-GFP assays for retinol metabolism (***E***) and melanogenesis (***F***) genes. Distribution of sequence tags (black areas) obtained with specific and nonspecific antibodies is shown on the genome for WT (top rows) and Otx2-GFP (bottom rows) assays. The numbers are the peak summit counts. Regions significantly enriched for each assay (arrows) were defined as OBRs. For each gene, position of exons (blue box) and introns (blue line) is shown below with gene symbol and genomic coordinates of the visualized genome portion. ECM, Extracellular matrix; BL, basolateral; Chr, chromosome.

a control, a suspension of lentivirus-expressing GFP was injected in the contralateral eye. We used lentivirus amounts previously determined to yield robust expression of exogenous genes (Pang et al., 2006; Kostic et al., 2011). Using such a dose, the retina exhibited two exclusive aspects (Fig. 4*D*): in the region corresponding to the injection bleb, 100% of RPE cells expressed nuclear GFP, hence CreN protein. Transition at the edge of the bleb was sharp. Outside the region of injection, neither GFP nor Cre expression was found. We never observed any mosaic pattern in the injected region, suggesting efficient topic infection and expression of HIV-derived lentivirus, which results in an all-or-none situation. In eyes injected with recombinant CreN-GFP lentivirus, nuclear expression of CreN-GFP was consistently restricted to RPE cells facing the site of injection both in WT and *Otx2*$^{flox/flox}$ mice. This expression pattern was maintained during the whole period of observation, demonstrating cell-specific integration and expression of the lentiviral vector (Fig. 4*B*). As expected, Otx2 expression was abolished in the infected RPE area of *Otx2*$^{flox/flox}$ mice but was fully maintained in infected RPE cells of *Otx2*$^{+/+}$ mice. Degeneration of photoreceptor cells was observed exclusively in retinal areas in contact with the knock-out RPE cells of *Otx2*$^{flox/flox}$ mice (Fig. 4*B*,*D*): at P60, we observed shortening of the photoreceptor outer segment. At P90, we found a 48% decrease of the photoreceptor cell number; and at P120, the decrease exceeded 85% indicating progressive photoreceptor death (Fig. 4*C*). The kinetics of the observed photoreceptor loss closely mirrored the one observed in sKO mice. Similarly to the Otx2 sKO model, the other cell layers were not affected. Contralateral retinas infected with a GFP-expressing vector appeared normal. This demonstrates that Otx2 expression is essential in RPE cells to prevent photoreceptor degeneration.

RPE-specific expression of Otx2 prevents photoreceptor degeneration in the sKO retina

We next examined whether Otx2 expression in RPE is sufficient for photoreceptor maintenance. We constitutively expressed Otx2 in RPE cells in animals with an *Otx2* mutant retina to ask whether such expression is sufficient to prevent photoreceptor degeneration. To this end, a suspension of lentivirus driving expression of HA-tagged Otx2 protein was injected in the subretinal space of *Otx2*$^{CreERT2/flox}$ mice at P25, and *Otx2* sKO was triggered by intraperitoneal injection of tamoxifen at P30 (Fig. 5*A*). Lentivirus injection was done 5 d before induction of sKO to avoid a transient lack of Otx2 in the RPE compartment, as 3–4 d are required for lentivirus integration and expression. This resulted in global Otx2 extinction, except in the infected RPE cells. Retina histology was examined at P60, P90, and P120 and compared with contralateral eyes infected with the GFP expressing vector, at P120 (Fig. 5*B*). At least three mice (n = 3–6) were examined at each stage. Despite the loss of Otx2 in photoreceptor and bipolar cells, photoreceptor outer segments as well as outer nuclear layer thickness remained unaltered in areas contacting RPE cells that constitutively expressed Otx2, even 3 months after *Otx2* sKO (Fig. 5*C*). In contrast, photoreceptor degeneration was found outside these areas. This experiment demonstrates that Otx2 expression is dispensable in both photoreceptor and bipolar cells and that RPE-specific expression of Otx2 is sufficient for photoreceptor maintenance in the mature retina.

The present phenotypic analysis shows that RPE-specific Otx2 ablation fully recapitulates the degeneration of photoreceptor cells observed in *Otx2* sKO mice and that RPE-specific Otx2 expression protects Otx2-ablated photoreceptors from degen-

eration. Therefore, in our *Otx2* sKO model, photoreceptor degeneration occurs as a secondary consequence of RPE dysfunction.

Identification of Otx2 targetome in adult RPE cells

Otx2 appears both necessary and sufficient in RPE cells to prevent photoreceptor degeneration in our model. This prompted us to focus on genes regulated by Otx2 in the RPE layer. To obtain a global view of the repertoire of Otx2 target genes in these cells, we isolated adult RPE nuclei and analyzed the genome occupancy of Otx2 by ChIP followed by massive sequencing (ChIP-seq). To enhance the reliability of identified OBRs, we performed two parallel experiments using either $Otx2^{Otx2\text{-}GFP/+}$ knock-in mice expressing an Otx2-GFP fusion protein (Fossat et al., 2007) together with an anti-GFP antibody, or WT mice together with an anti-Otx2 antibody. This generated two independent sets of data, thereafter referred to as the WT and the Otx2-GFP assays. After sequencing, peak calling was performed using MACS algorithm (Feng et al., 2012). WT and Otx2-GFP assays yielded 2918 and 4267 OBRs, respectively, among which 1755 overlapped, showing strikingly similar distribution patterns with the exact same position on the genome, and similar relative enrichment (Fig. 6*A*,*E*,*F*). ChIP-seq analysis was further performed using this restrained set of 1755 high-confidence OBRs. Importantly, *de novo* motif discovery run on the 500 highest peaks identified strong enrichment for TAATCC motif (MEME E-value = 1.0×10^{-313}), previously known as Otx2 high-affinity binding site (Chatelain et al., 2006) (Fig. 6*A*). This supported specificity of identified OBRs. Together, these results confirm a high-quality dataset of 1755 OBRs.

The 1755 OBRs had a median width of 617 bp and an average height of 36 tags. To further characterize their location, we compared them with the UCSC RefSeq gene database using CEAS (Shin et al., 2009). OBRs did not follow a random distribution across the genome but appeared overrepresented in the vicinity of genes: 49.5% of them located within a gene region extending from 3 kb upstream transcription start sites (TSS) to 3 kb downstream the 3′UTR (Fig. 6*B*). In total, 47.2% of all OBRs located within introns, 0.2% within exons, 0.7% within the 5′ UTR, and 1.4% within the 3′UTR. The remaining OBRs, located farther than 3 kb upstream or downstream of the annotated genes, were scored as intergenic. Otx2 binding was enriched in promoter regions, with 7% of peaks located <1 kb upstream TSS, fitting with transcriptional regulation activity (Fig. 6*C*). Based on closest relative distance to TSS, the 1755 OBRs could be assigned to 1312 genes, whose biological functions were examined using Gene Ontology (Fig. 6*D*). We found that Otx2 binds to chromatin regions close to genes involved in cell adhesion ($p = 8 \times 10^{-7}$), extracellular matrix constituent ($p = 1 \times 10^{-6}$), and basolateral plasma membrane ($p = 3 \times 10^{-5}$), which are major features of epithelial cells. As RPE cells are the only epithelial cells in the retina, this confirms cell-type specificity of identified OBRs. Genes involved in regulation of cell differentiation were also enriched ($p = 1 \times 10^{-4}$), in accordance with Otx2 embryonic functions in RPE (Martinez-Morales et al., 2001). These findings suggest that Otx2 is involved in the regulation of genes of structural and functional importance for adult RPE cells.

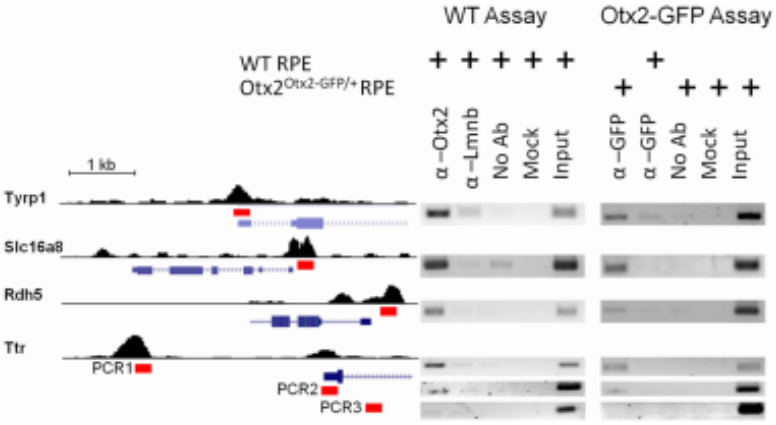


Figure 7. Otx2 binds specifically to OBRs identified by ChIP-seq. ChIP-PCR assessment of Otx2 binding on a representative set of OBRs for RPE-specific genes. Left, The ChIP-seq profiles of each indicated gene obtained in WT assay is shown above the position of exons (blue boxes) and introns (blue lines). The PCR-amplified regions are indicated in red. Right, Ethidium bromide staining of gels showing the PCR amplification products obtained with indicated antibodies and chromatin samples (top) for WT and Otx2-GFP assays.

To characterize the core set of Otx2 direct target genes in the RPE, we searched all deregulated genes following *Otx2* sKO (Fig. 2) for the presence of OBR (Table 1). Twenty-four downregulated genes possessed an associated OBR, with seven of them not previously recognized as RPE-specific: *Pon1*, *Nt5dc2*, *Zbtb20*, *Per2*, *Car12*, *Casp7*, and *A530080P10*. In RPE chromatin, Otx2 was found to bind sites proximal to all four genes involved in retinoid metabolism (Fig. 6*E*). The same situation was observed for three genes controlling melanogenesis (Fig. 6*F*).

We tested the direct binding of Otx2 on a subset of selected OBRs by assessing their specific DNA enrichment by PCR in independent ChIP experiments (Fig. 7). Five DNA regions corresponding to ChIP-seq peaks of four representative genes expressed in the RPE (*Tyrp1*, *Slc16a8*, *Rdh5*, and *Ttr*) were tested. All of them showed specific enrichment when using anti-Otx2 or anti-GFP antibodies and WT or $Otx2^{Otx2\text{-}GFP/+}$ RPE chromatin, respectively, indicating true Otx2 binding. On the contrary, a DNA region of the *Ttr* locus outside a peak did not show any enrichment, confirming the specificity of OBRs (Fig. 7, PCR3). We thus concluded that Otx2 binds to and coordinately regulates the expression of several sets of genes, each devoted to important RPE functions. The synchronized perturbation of these functions by simultaneous loss of Otx2 function in all RPE cells, rather than other Otx2 functions in the neural retina, induces subsequent stress and inflammation responses that stand at the origin of the cognate photoreceptor apoptosis (Fig. 8). Noteworthy, none of the nine bipolar-specific genes displayed any OBR, confirming the cell specificity of ChIP experiments. Moreover, none of the 19 upregulated genes exhibited any associated OBR, indicating that their induction was an indirect event. Together, this analysis confirmed that the genes downregulated in the first wave after *Otx2* sKO were direct Otx2 targets in RPE, whereas genes of the second wave were induced as a secondary consequence of these initial downregulations.

Discussion

Our study demonstrates that Otx2 plays a critical role in the maintenance of photoreceptors and the prevention of late-onset neuronal degeneration in the adult retina, through its activity in RPE cells. First, soon after Otx2 ablation, ERG reveals a dramatic

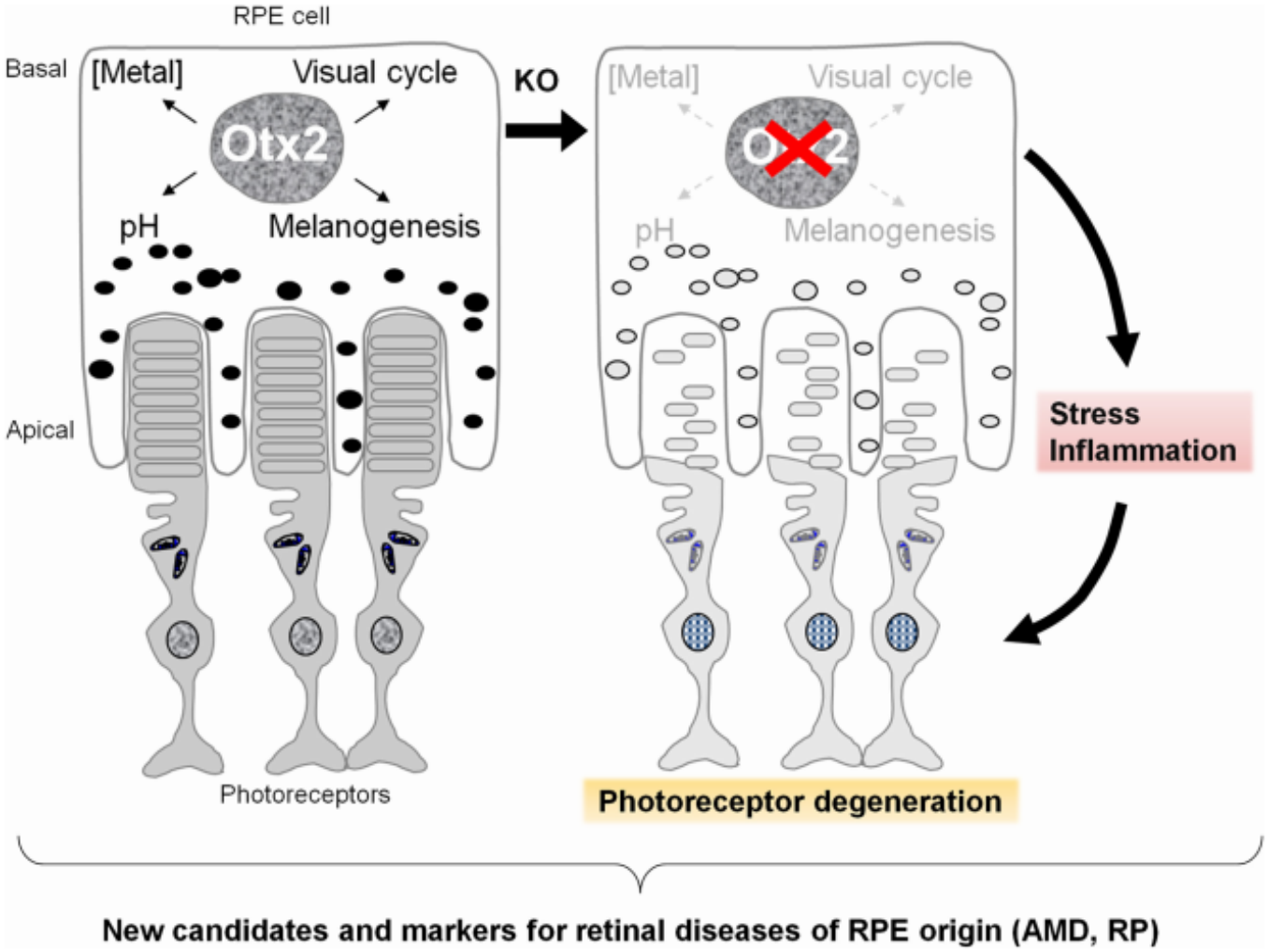


Figure 8. Model for photoreceptor degeneration in adult *Otx2* sKO mice. In the adult retina, Otx2 coordinates the expression of homeostatic and metabolic functions in RPE cells. Loss of Otx2 primarily induces synchronous deregulation of these RPE functions, which secondarily provoke cell stress gene activation that leads to photoreceptor degeneration. The deregulated genes provide both new candidates for photoreceptor homeostasis and new makers for clinical diagnosis of retinal diseases of RPE origin.

alteration of the c-wave pattern, which reflects altered RPE and/or Müller cell response to light (Hanitzsch and Lichtenberger, 1997). Second, gene expression analysis shows that half of the genes downregulated upon Otx2 ablation are specifically expressed in RPE cells, with 24 of them demonstrated to be direct Otx2 target genes by cell-specific ChIP-seq analysis. Third, using a lentivirus-mediated functional approach to drive Otx2 knock-out or ectopic expression specifically in RPE cells, we demonstrate that RPE-specific ablation of Otx2 fully recapitulates the photoreceptor syndrome induced in full retina knock-out and that constitutive Otx2 expression in RPE cells is sufficient to prevent neuronal degeneration in knock-out retina. It therefore appears that Otx2 functions in the mature RPE are both necessary and sufficient to prevent late-onset photoreceptor degeneration.

Critical RPE-specific function for Otx2 in the adult retina

Otx2 was previously shown to play a role in retina development both in mice and humans, notably by controlling several aspects of RPE, photoreceptor, and bipolar cell determination and differentiation (Martinez-Morales et al., 2003; Nishida et al., 2003; Ragge et al., 2005; Koike et al., 2007; Sato et al., 2007). Here, we identify Otx2 functions in the mature retina by carrying out genome-wide analyses of the molecular events that immediately follow *Otx2* gene ablation and subsequently lead to photoreceptor degeneration in adult mice. We also present the first *in vivo* ChIP-seq performed on RPE cells.

The time-series transcriptomic analysis of sKO retina captures the dynamics of the genetic response to Otx2 ablation, without the interference of any other processes. As a result, we found a surprisingly small set of 71 deregulated genes. Among these, 49 correspond to early or continuously downregulated genes, whereas 17 upregulated genes appear only in late stages. Although Otx2 has been reported to act as a repressor in the nervous system (Gherzi et al., 1997; Puelles et al., 2003; Steventon et al., 2012), our results strongly support the notion that Otx2 acts as a transcriptional activator in the adult retina. Interestingly, none of the genes regulated by Otx2 during retina development, such as *Crx* (Nishida et al., 2003), *Dct* (Takeda et al., 2003), IRBP (Fong and Fong, 1999), Best1 (Masuda and Esumi, 2010), or PKC-α (Koike et al., 2007), was found to be differentially expressed. This suggests that Otx2 function in the adult retina could profoundly differ from its functions during known developmental processes.

We show that Otx2 exerts pleiotropic regulation of metabolic and homeostatic functions in RPE cells: Otx2 controls the expression of several groups of genes involved in RPE-specific functions, especially melanogenesis (*Tyrosinase*, *Tyrp1*, *Oca2*, *Scl24a5*, *Gpnmb*, and *Si*), retinol metabolism (*Ttr*, *Stra6*, *Rdh5*, and *Rdh10*), pH regulation (*Slc16a8* and *Car12*), and metal concen-

tration (*Slc39a12* and *Trf*). The simultaneous downregulation of these genes, after Otx2 ablation, induces synchronous impairment of multiple RPE functions. Given the close dependence of photoreceptor cells on RPE protective, nurturing, and maintenance activities (Bramall et al., 2010), it is expected that these cells experience a major stress upon RPE dysfunction, which ultimately may induce their progressive death, thereby accounting for the neuronal degeneration observed in our model.

We found no targets in adult photoreceptors that require Otx2 for their maintenance. This observation is intriguing, given that Otx2 is essential for photoreceptor development (Nishida et al., 2003; Sato et al., 2007). In the mouse embryo, Otx2 is expressed in retinal progenitors at E12.5, where it controls the activation of the *Crx* gene (Nishida et al., 2003). Otx2 expression in then stably maintained in differentiated photoreceptors (Fossat et al., 2007). One possible explanation of our results is that loss of Otx2 expression in adult photoreceptor cells is masked by the strong and unaffected level of expression of the Otx-related Crx protein in these cells. Crx and Otx2 share preferential DNA binding to the TAATCC sequence (Chau et al., 2000; Chatelain et al., 2006). Contrary to RPE cells, where only Otx2 is present, Crx and Otx2 could act redundantly in adult photoreceptor cells. Photoreceptor-specific ablation of *Otx2* or *Crx* or both in the adult retina should help address this issue.

A new model for late-onset neuronal degeneration

Inherited and complex forms of neuronal degeneration share a common feature: the loss of neurons as a primary or secondary event. In the retina, nonautonomous, RPE-dependent origin for photoreceptor degeneration is found in a significant proportion of both inherited and sporadic diseases, such as mutations in the human *MERTK* or *RPE65* genes, as well as in AMD (Pacione et al., 2003). Although clinical diagnosis and genetic analysis have uncovered a large number of implicated genes (RetNet, 2012), mechanistic understanding of these diseases lags behind. In AMD, which may affect 30% of individuals >75 years old (Ting et al., 2009), slowly accumulated deposits called drusens isolate RPE from the neural retina. As a consequence, RPE cells can no longer take care of cognate photoreceptor cells, which subsequently degenerate (Wright et al., 2010). Because of the heterogeneity of the process, photoreceptor death occurs asynchronously in scattered areas of the retina, which renders the identification of the mechanism involved difficult. In the *Otx2* sKO model, all RPE cells undergo a synchronous block of several homeostatic functions, which is much more abrupt than in AMD. Nevertheless, this model is of great value for addressing the mechanisms of photoreceptor death secondary to RPE dysfunction. Indeed, synchronous Otx2 ablation makes it possible to distinguish two consecutive waves of gene deregulation: an early wave of downregulated genes starting 2 d after *Otx2* sKO and a late wave of upregulated genes raising 4–8 d after *Otx2* sKO.

The early wave of deregulated-genes, recorded 2 d after knock-out induction, mostly comprises downregulated genes, half of them being specifically expressed in RPE cells. Their kinetics and the presence of OBR in most of them indicate they represent Otx2 direct target genes. Among them, 12 have been implicated in retinal diseases. For instance, germline mutations disrupting the genes encoding the secreted molecule BMP4 and the Retinol Binding Protein receptor/channel STRA6 have been reported to cause severe developmental eye defects leading to microphthalmia or anophthalmia (Bakrania et al., 2008; Casey et al., 2011). Mutations of the 11-*cis*-retinol dehydrogenase *RDH5* gene, a component of the visual cycle, which allows the regeneration of the 11-*cis*-retinal chromophore, cause retinitis pigmentosa and *Fundus albipunctatus* diseases in humans (Sato et al., 2004; Sergouniotis et al., 2011; Ajmal et al., 2012). Interestingly, Otx2 also regulates genes involved in late-onset retinal diseases: *PON1* and *TRANSFERRIN* have been linked to high risks for AMD (Chowers et al., 2006; Pauer et al., 2010), whereas *COL8A1* is associated with advanced forms of this disease (Neale et al., 2010; Yu et al., 2011). Identification of these disease-related genes supports the idea that the remaining RPE-specific deregulated genes may be highly relevant for human retinal diseases. They provide new candidates to be evaluated in both inherited and sporadic forms of photoreceptor degenerative syndromes, as half of these diseases still lack molecular explanation (Wright et al., 2010).

The model presented here may help uncover mechanisms underlying neuronal degeneration because of our identification of a second wave of gene deregulation. This second wave, starting 4 d after sKO, could only be revealed by the sharpness and synchrony of Otx2 ablation, and by the short time-scale of gene expression analyses. It mostly comprises upregulated genes, with nine of them being clearly associated with cell stress and inflammation: these encode the transcription factors Fos, Stat3, and Atf3, the complement molecules C1qa, C1qb, and C1qc, the TNF receptors Tnfrsf1a and Tnfrsf12a, and the stress sensor Gadd45. The absence of OBR in the vicinity of all these genes and their short-delayed induction identify them as the earliest secondary genetic events triggered by Otx2 ablation. Increased expression of the transcription factor Stat3 in Müller glia is a well-known protective retinal response to photoreceptor mutation or insults (Bramall et al., 2010). Upregulation of components of the complement cascade has also been documented in mouse models of inherited photoreceptor degeneration (Rattner and Nathans, 2005; Demos et al., 2008). These typical retinal responses clearly validate our model as a good means to identify the earliest signs of photoreceptor disease. Moreover, as the upregulated genes found here are strongly induced 4 d after the initial genetic event whereas apoptosis only starts after 20 d, together these molecules likely represent the founding blocks on which the photoreceptor cell stress and apoptosis response are built. Targeting these molecules with chemical compounds that inhibit their activity might be of great interest for diminishing or abolishing photoreceptor degeneration. This could provide novel therapeutic tools for human late-onset retinal diseases, such as AMD. In addition, as most of these induced genes are widely expressed in neural tissues, they could be general markers of endangered neurons. Therefore, detection of their upregulation could help precocious clinical diagnosis of neurodegeneration.

References

Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A, Brûlet P (1995) Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2 $^{-/-}$ mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. Development 121:3279–3290. Medline

Ajmal M, Khan MI, Neveling K, Khan YM, Ali SH, Ahmed W, Iqbal MS, Azam M, den Hollander AI, Collin RW, Qamar R, Cremers FP (2012) Novel mutations in RDH5 cause fundus albipunctatus in two consanguineous Pakistani families. Mol Vis 18:1558–1571. Medline

Bakrania P, Efthymiou M, Klein JC, Salt A, Bunyan DJ, Wyatt A, Ponting CP, Martin A, Williams S, Lindley V, Gilmore J, Restori M, Robson AG, Neveu MM, Holder GE, Collin JR, Robinson DO, Farndon P, Johansen-Berg H, Gerrelli D, et al. (2008) Mutations in BMP4 cause eye, brain, and digit developmental anomalies: overlap between the BMP4 and hedgehog signaling pathways. Am J Hum Genet 82:304–319. CrossRef Medline

Béby F, Housset M, Fossat N, Le Greneur C, Flamant F, Godement P, Lamonerie T (2010) Otx2 gene deletion in adult mouse retina induces rapid RPE dystrophy and slow photoreceptor degeneration. PLoS One 5:e11673. CrossRef Medline

Bemelmans AP, Bonnel S, Houhou L, Dufour N, Nandrot E, Helmlinger D, Sarkis C, Abitbol M, Mallet J (2005) Retinal cell type expression specificity of HIV-1-derived gene transfer vectors upon subretinal injection in the adult rat: influence of pseudotyping and promoter. J Gene Med 7:1367–1374. CrossRef Medline

Beurdeley M, Spatazza J, Lee HH, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo AA, Hensch TK, Prochiantz A (2012) Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. J Neurosci 32:9429–9437. CrossRef Medline

Booij JC, ten Brink JB, Swagemakers SM, Verkerk AJ, Essing AH, van der Spek PJ, Bergen AA (2010) A new strategy to identify and annotate human RPE-specific gene expression. PLoS One 5:e9341. CrossRef Medline

Bramall AN, Wright AF, Jacobson SG, McInnes RR (2010) The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. Annu Rev Neurosci 33:441–472. CrossRef Medline

Calame M, Cachafeiro M, Philippe S, Schouwey K, Tekaya M, Wanner D, Sarkis C, Kostic C, Arsenijevic Y (2011) Retinal degeneration progression changes lentiviral vector cell targeting in the retina. PLoS One 6:e23782. CrossRef Medline

Cantos R, Cole LK, Acampora D, Simeone A, Wu DK (2000) Patterning of the mammalian cochlea. Proc Natl Acad Sci U S A 97:11707–11713. CrossRef Medline

Casey J, Kawaguchi R, Morrissey M, Sun H, McGettigan P, Nielsen JE, Conroy J, Regan R, Kenny E, Cormican P, Morris DW, Tormey P, Chróinín MN, Kennedy BN, Lynch S, Green A, Ennis S (2011) First implication of STRA6 mutations in isolated anophthalmia, microphthalmia, and coloboma: a new dimension to the STRA6 phenotype. Hum Mutat 32: 1417–1426. CrossRef Medline

Chatelain G, Fossat N, Brun G, Lamonerie T (2006) Molecular dissection reveals decreased activity and not dominant negative effect in human OTX2 mutants. J Mol Med 84:604–615. CrossRef Medline

Chau KY, Chen S, Zack DJ, Ono SJ (2000) Functional domains of the cone-rod homeobox (CRX) transcription factor. J Biol Chem 275:37264–37270. CrossRef Medline

Chowers I, Wong R, Dentchev T, Farkas RH, Iacovelli J, Gunatilaka TL, Medeiros NE, Presley JB, Campochiaro PA, Curcio CA, Dunaief JL, Zack DJ (2006) The iron carrier transferrin is upregulated in retinas from patients with age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 47:2135–2140. CrossRef Medline

Demos C, Bandyopadhyay M, Rohrer B (2008) Identification of candidate genes for human retinal degeneration loci using differentially expressed genes from mouse photoreceptor dystrophy models. Mol Vis 14:1639–1649. Medline

Dhingra A, Sulaiman P, Xu Y, Fina ME, Veh RW, Vardi N (2008) Probing neurochemical structure and function of retinal ON bipolar cells with a transgenic mouse. J Comp Neurol 510:484–496. CrossRef Medline

Ettaiche M, Heurteaux C, Blondeau N, Borsotto M, Tinel N, Lazdunski M (2001) ATP-sensitive potassium channels (K(ATP)) in retina: a key role for delayed ischemic tolerance. Brain Res 890:118–129. CrossRef Medline

Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y, Liu XS (2012) Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. Nat Protoc 7:1728–1740. CrossRef Medline

Fletcher EL, Jobling AI, Vessey KA, Luu C, Guymer RH, Baird PN (2011) Animal models of retinal disease. Prog Mol Biol Transl Sci 100:211–286. CrossRef Medline

Fong SL, Fong WB (1999) Elements regulating the transcription of human interstitial retinoid-binding protein (IRBP) gene in cultured retinoblastoma cells. Curr Eye Res 18:283–291. CrossRef Medline

Fossat N, Chatelain G, Brun G, Lamonerie T (2006) Temporal and spatial delineation of mouse Otx2 functions by conditional self-knockout. EMBO Rep 7:824–830. CrossRef Medline

Fossat N, Le Greneur C, Béby F, Vincent S, Godement P, Chatelain G, Lamonerie T (2007) A new GFP-tagged line reveals unexpected Otx2 protein localization in retinal photoreceptors. BMC Dev Biol 7:122. CrossRef Medline

Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, et al. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biol 5:R80. CrossRef Medline

Gherzi R, Briata P, Boncinelli E, Ponassi M, Querzè G, Viti F, Corte G, Zardi L (1997) The human homeodomain protein OTX2 binds to the human tenascin-C promoter and trans-represses its activity in transfected cells. DNA Cell Biol 16:559–567. CrossRef Medline

Gorbenko Del Blanco D, Romero CJ, Diaczok D, de Graaff LC, Radovick S, Hokken-Koelega AC (2012) A novel OTX2 mutation in a patient with combined pituitary hormone deficiency, pituitary malformation, and an underdeveloped left optic nerve. Eur J Endocrinol 167:441–452. CrossRef Medline

Hanitzsch R, Lichtenberger T (1997) Two neuronal retinal components of the electroretinogram c-wave. Doc Ophthalmol 94:275–285. CrossRef Medline

Kobi D, Steunou AL, Dembélé D, Legras S, Larue L, Nieto L, Davidson I (2010) Genome-wide analysis of POU3F2/BRN2 promoter occupancy in human melanoma cells reveals Kitl as a novel regulated target gene. Pigment Cell Melanoma Res 23:404–418. CrossRef Medline

Koike C, Nishida A, Ueno S, Saito H, Sanuki R, Sato S, Furukawa A, Aizawa S, Matsuo I, Suzuki N, Kondo M, Furukawa T (2007) Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. Mol Cell Biol 27:8318–8329. CrossRef Medline

Kostic C, Crippa SV, Pignat V, Bemelmans AP, Samardzija M, Grimm C, Wenzel A, Arsenijevic Y (2011) Gene therapy regenerates protein expression in cone photoreceptors in Rpe65(R91W/R91W) mice. PLoS One 6:e16588. CrossRef Medline

Liao JL, Yu J, Huang K, Hu J, Diemer T, Ma Z, Dvash T, Yang XJ, Travis GH, Williams DS, Bok D, Fan G (2010) Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells. Hum Mol Genet 19:4229–4238. CrossRef Medline

Machanick P, Bailey TL (2011) MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. Bioinformatics 27:1696–1697. CrossRef Medline

Martinez-Morales JR, Signore M, Acampora D, Simeone A, Bovolenta P (2001) Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. Development 128:2019–2030. Medline

Martínez-Morales JR, Dolez V, Rodrigo I, Zaccarini R, Leconte L, Bovolenta P, Saule S (2003) OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. J Biol Chem 278:21721–21731. CrossRef Medline

Masuda T, Esumi N (2010) SOX9, through interaction with microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and OTX2, regulates BEST1 expression in the retinal pigment epithelium. J Biol Chem 285:26933–26944. CrossRef Medline

Neale BM, Fagerness J, Reynolds R, Sobrin L, Parker M, Raychaudhuri S, Tan PL, Oh EC, Merriam JE, Souied E, Bernstein PS, Li B, Frederick JM, Zhang K, Brantley MA Jr, Lee AY, Zack DJ, Campochiaro B, Campochiaro P, Ripke S, et al. (2010) Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC). Proc Natl Acad Sci U S A 107:7395–7400. CrossRef Medline

Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, Furukawa T (2003) Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. Nat Neurosci 6:1255–1263. CrossRef Medline

Orr A, Dubé MP, Zenteno JC, Jiang H, Asselin G, Evans SC, Caqueret A, Lakosha H, Letourneau L, Marcadier J, Matsuoka M, Macgillivray C, Nightingale M, Papillon-Cavanagh S, Perry S, Provost S, Ludman M, Guernsey DL, Samuels ME (2011) Mutations in a novel serine protease PRSS56 in families with nanophthalmos. Mol Vis 17:1850–1861. Medline

Pacione LR, Szego MJ, Ikeda S, Nishina PM, McInnes RR (2003) Progress toward understanding the genetic and biochemical mechanisms of inherited photoreceptor degenerations. Annu Rev Neurosci 26:657–700. CrossRef Medline

Pang J, Cheng M, Haire SE, Barker E, Planelles V, Blanks JC (2006) Efficiency of lentiviral transduction during development in normal and rd mice. Mol Vis 12:756–767. Medline

Pauer GJ, Sturgill GM, Peachey NS, Hagstrom SA (2010) Protective effect of paraoxonase 1 gene variant Gln192Arg in age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 149:513–522. CrossRef Medline

Puelles E, Acampora D, Lacroix E, Signore M, Annino A, Tuorto F, Filosa S, Corte G, Wurst W, Ang SL, Simeone A (2003) Otx dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain. Nat Neurosci 6:453–460. Medline

Ragge NK, Brown AG, Poloschek CM, Lorenz B, Henderson RA, Clarke MP, Russell-Eggitt I, Fielder A, Gerrelli D, Martinez-Barbera JP, Ruddle P, Hurst J, Collin JR, Salt A, Cooper ST, Thompson PJ, Sisodiya SM, Williamson KA, Fitzpatrick DR, van Heyningen V, et al. (2005) Heterozy-

gous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. Am J Hum Genet 76:1008–1022. CrossRef Medline

Rattner A, Nathans J (2005) The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia. J Neurosci 25:4540–4549. CrossRef Medline

Ray K, Sengupta M (2010) Novel human pathological mutations. Gene symbol: OCA2. Disease: albinism, oculocutaneous II. Hum Genet 127: 487–488. Medline

RetNet (2013) Retinal Information Network. https://sph.uth.edu/retnet/.

Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li J, Thiagarajan M, White JA, Quackenbush J (2006) TM4 microarray software suite. Methods Enzymol 411:134–193. CrossRef Medline

Sato M, Oshika T, Kaji Y, Nose H (2004) A novel homozygous Gly107Arg mutation in the RDH5 gene in a Japanese patient with fundus albipunctatus with sectorial retinitis pigmentosa. Ophthalmic Res 36:43–50. CrossRef Medline

Sato S, Inoue T, Terada K, Matsuo I, Aizawa S, Tano Y, Fujikado T, Furukawa T (2007) Dkk3-Cre BAC transgenic mouse line: a tool for highly efficient gene deletion in retinal progenitor cells. Genesis 45:502–507. CrossRef Medline

Sergouniotis PI, Sohn EH, Li Z, McBain VA, Wright GA, Moore AT, Robson AG, Holder GE, Webster AR (2011) Phenotypic variability in RDH5 retinopathy (Fundus Albipunctatus). Ophthalmology 118:1661–1670. CrossRef Medline

Shin H, Liu T, Manrai AK, Liu XS (2009) CEAS: cis-regulatory element annotation system. Bioinformatics 25:2605–2606. CrossRef Medline

Siegert S, Cabuy E, Scherf BG, Kohler H, Panda S, Le YZ, Fehling HJ, Gaidatzis D, Stadler MB, Roska B (2012) Transcriptional code and disease map for adult retinal cell types. Nat Neurosci 15:487–495. CrossRef Medline

Slavotinek AM (2011) Eye development genes and known syndromes. Mol Genet Metab 104:448–456. CrossRef Medline

Steventon B, Mayor R, Streit A (2012) Mutual repression between Gbx2 and Otx2 in sensory placodes reveals a general mechanism for ectodermal patterning. Dev Biol 367:55–65. CrossRef Medline

Swarup G, Nagabhushana A (2010) Optineurin, a multifunctional protein involved in glaucoma, amyotrophic lateral sclerosis and antiviral signalling. J Biosci 35:501–505. CrossRef Medline

Takeda K, Yokoyama S, Yasumoto Ki, Saito H, Udono T, Takahashi K, Shibahara S (2003) OTX2 regulates expression of DOPAchrome tautomerase in human retinal pigment epithelium. Biochem Biophys Res Commun 300:908–914. CrossRef Medline

Ting AY, Lee TK, MacDonald IM (2009) Genetics of age-related macular degeneration. Curr Opin Ophthalmol 20:369–376. CrossRef Medline

Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS (2010) Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. Nat Rev Genet 11:273–284. CrossRef Medline

Wysokinski D, Szaflik J, Sklodowska A, Kolodziejska U, Dorecka M, Romaniuk D, Wozniak K, Blasiak J, Szaflik JP (2011) The A allele of the −576G>A polymorphism of the transferrin gene is associated with the increased risk of age-related macular degeneration in smokers. Tohoku J Exp Med 223:253–261. CrossRef Medline

Young RW, Bok D (1969) Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. J Cell Biol 42:392–403. CrossRef Medline

Yu Y, Bhangale TR, Fagerness J, Ripke S, Thorleifsson G, Tan PL, Souied EH, Richardson AJ, Merriam JE, Buitendijk GH, Reynolds R, Raychaudhuri S, Chin KA, Sobrin L, Evangelou E, Lee PH, Lee AY, Leveziel N, Zack DJ, Campochiaro B, et al. (2011) Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration. Hum Mol Genet 20:3699–3709. CrossRef Medline

Zhang KH, Li Z, Lei J, Pang T, Xu B, Jiang WY, Li HY (2011) Oculocutaneous albinism type 3 (OCA3): analysis of two novel mutations in TYRP1 gene in two Chinese patients. Cell Biochem Biophys 61:523–529. CrossRef Medline

Zindler E, Zipp F (2010) Neuronal injury in chronic CNS inflammation. Best Pract Res Clin Anaesthesiol 24:551–562. CrossRef Medline

II) FONCTIONNEMENT D'OTX2 DANS LA RETINE NEURALE ET DANS LA RETINE PIGMENTEE

Le rôle du facteur de transcription Otx2 ayant été clairement établi dans le RPE, une interrogation subsistait cependant quant à son rôle dans la rétine neurale. Bien que ce soit celle-ci qui soit affectée principalement lors de l'élimination du gène *Otx2* dans la rétine de souris adulte dans le système de self-knockout, c'est au niveau du RPE que la fonction Otx2 est requise pour prévenir la dégénérescence des photorécepteurs.

Cependant, le facteur de transcription est bien présent dans les cellules bipolaires et dans les photorécepteurs. Deux hypothèses permettent d'expliquer l'absence de phénotype cellule-autonome dans ces deux types cellulaires. Premièrement, il est possible que des fonctions très différentes de celles qu'il exerce dans le RPE y soient réalisées. Deuxièmement, ces fonctions pourraient être compensées par l'action d'un autre facteur de transcription présent dans la rétine neurale.

La recherche des sites de liaison d'Otx2 dans chacune des deux couches de la rétine a donc été réalisée par immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage de masse (ChIP-seq). Afin de renforcer la fiabilité de l'identification des sites de liaison, l'approche a été faite avec deux méthodes impliquant deux anticorps différents. Cette double approche a permis d'identifier des ensembles de sites de liaison robustes et cohérents.

La comparaison des résultats de ChIP-seq dans les deux compartiments de la rétine indique que le facteur de transcription Otx2 se lie a des endroits extrêmement différents dans les deux tissus, y compris lorsque c'est à proximité des mêmes gènes. S'il possède un rôle dans la rétine neurale, ce dernier n'est pas identique à celui que joue Otx2 dans le RPE, puisque le répertoire des gènes à proximité desquels la protéine Otx2 est fixée diffère dans les deux tissus. Il est donc possible que la survie des photorécepteurs ne soit pas dépendante des fonctions qu'assure Otx2 dans ce tissu. Aucun autre phénotype n'est cependant apparu clairement en son absence, même lorsque ce facteur n'était exprimé que dans le RPE. Nous avons émis l'hypothèse que ceci pourrait être dû à la présence du facteur de transcription apparenté à Otx2, Crx, qui est exprimé dans les mêmes types cellulaires de la rétine neurale mais qui n'est pas exprimé dans le RPE. Pour tester cette hypothèse, les données de ChIP-seq Otx2 ont été confrontées aux données de ChIP-seq Crx disponibles publiquement. Le résultat est éloquent : il indique clairement que dans la rétine neurale, le facteur de

transcription Crx se lie majoritairement aux mêmes endroits du génome qu'Otx2, à proximité de gènes essentiels pour le bon fonctionnement de ce tissu.

L'absence de phénotype discernable dans la rétine neurale des souris self-knockout *Otx2* est donc très probablement liée à un phénomène de redondance fonctionnelle : le gène paralogue *Crx* serait capable de remplacer le gène *Otx2* et de prendre le relais pour assurer le fonctionnement correct des photorécepteurs et des cellules bipolaires.

Ce travail fait l'objet d'un manuscrit soumis à publication dans le journal Plos One intitulé :
« Otx2 ChIP-seq reveals unique and redundant functions in the mature mouse retina », par Alexander Samuel, Michael Housset, Bruno Fant et Thomas Lamonerie.

Otx2 ChIP-seq reveals unique and redundant functions in the mature mouse retina

Running title: Otx2 ChIP-seq in adult retina

Alexander Samuel*, Michael Housset*, Bruno Fant and Thomas Lamonerie

Institut de Biologie Valrose, University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences, (CNRS, UMR7277, Inserm, U1091. Nice, F-06108, France.

*Equal contribution.

Corresponding author: Thomas Lamonerie. Institut de Biologie Valrose, University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences, CNRS, UMR7277, Inserm, U1091. Nice, F-06108, France. lamonerie@unice.fr

Keywords: Otx2 , RPE, neural retina, ChIP-seq, Crx

Conflict of Interest: None of the authors declares any conflict of interest

Acknowledgements

We thank Michaël Delhorbe for expert handling of mice, Mickael Clarkson for help in ChIP-seq setup, and Nathalie Billon and Fabien D'Autréaux for comments on the manuscript. This work was supported by grants from the CNRS, ARC and Retina France to TL. AS was supported by a fellowship from French Research Ministry and University of Nice, MH was supported by a fellowship from the French Research Ministry and The Fondation Recherche Médicale.

Abstract

During retinal development and into adulthood, the transcription factor Otx2 is expressed in pigment epithelium, photoreceptors and bipolar cells. In the mature retina, *Otx2* ablation causes photoreceptor degeneration through a non-cell-autonomous mechanism involving *Otx2* function in the supporting RPE. Surprisingly, photoreceptor survival does not require *Otx2* expression in the neural retina, where the related *Crx* homeobox gene, a major regulator of photoreceptor development, is also expressed. To get a deeper view of *Otx2* activities in the RPE and the neural retina, we performed chromatin-immunoprecipitation followed by massively parallel sequencing (ChIP-seq) on Otx2. Using two independent ChIP-seq assays on each compartment of the retina, we identified consistent sets of Otx2-bound cis-regulatory elements. We show that Otx2 occupies different functional domains of the genome in RPE cells and in neural retina cells and regulates mostly different sets of genes. To assess the potential redundancy of Otx2 and Crx, we compared our data with Crx ChIP-seq data. While Crx genome occupancy markedly differs from Otx2 genome occupancy in the RPE, it largely overlaps that of Otx2 in the neural retina. Thus, in accordance with its essential role in the RPE and its dispensable role in the neural retina, Otx2 regulates different gene sets in the RPE and the neural retina, and shares an important part of its repertoire with Crx in the neural retina. Overall, this study provides a better understanding of gene-regulatory networks controlling photoreceptor homeostasis and disease.

Introduction

A handful of signalling pathways and transcription factors families are reused for multiple purposes in plant and animal development [1], implying that these actors take part in different regulatory networks. Transcription factors act in this context by regulating target genes through interaction with protein partners and binding to selected cis-regulatory sequences. Although significant progress has been made in the large-scale identification of cis-regulatory elements[2], we are still lacking a global view of how a defined transcription factor regulates various target genes in different contexts.

All three members of the Otx family of homeodomain transcription factors, Otx1, Otx2 and Crx play critical roles in development and function of the mammalian retina. Mutations in human *OTX2* and *CRX* are associated with severe ocular and retinal diseases such as microphthalmia, *retinitis* pigmentosa, cone-rod distrophy and Leber's congenital amaurosis [3-5]. Early in mouse retinal development at embryonic day 9.5 (E9.5), overlapping expression of *Otx1* and *Otx2* is required to specify the retinal pigment epithelium (RPE) [6]. Otx2 expression is then maintained in RPE cells into adulthood. At E12.5, photoreceptor and bipolar cell fate is determined by the expression of Otx2 in retinal progenitor cells [7], which controls the subsequent induction of the related Crx transcription factor. Expression of both Otx2 and Crx is then maintained throughout life in photoreceptor and bipolar cells [8-10].

The function of *Otx2* has been addressed in the adult retina. At this stage, RPE cells express *Otx2* alone while photoreceptor and bipolar cells co-express *Otx2* and *Crx*. Photoreceptor cells express *Crx* at a higher level than *Otx2* while bipolar cells, express *Otx2* at a higher level than *Crx* [11]. Conditional ablation in all cell types expressing *Otx2* causes exclusive, progressive and complete degeneration of photoreceptors [9]. Strikingly, a similar phenotype is observed when *Otx2* deletion is restricted to RPE cells, indicating a non-cell-autonomous, RPE-based mechanism for photoreceptor degeneration. Furthermore, RPE-specific expression of *Otx2* in conditionally ablated retinas rescues photoreceptor disease, showing that *Otx2* expression in photoreceptor and bipolar cells is not required for survival [12]. Interestingly, gene expression analysis following *Otx2* knockout in the whole retina has identified mostly RPE-specific genes as *Otx2* direct target genes. Despite the recognized role of *Otx2* in photoreceptor cell specification and development and the maintenance of its expression in photoreceptor and bipolar cells, the function of *Otx2* in the adult neural retina remains unknown.

Here, genome-scale identification of Otx2 binding sites specifically in the RPE or in the neural retina was done as a first step toward the characterization of Otx2 target genes in

both compartments. Otx2 genome occupancy was analysed using two independent Otx2 chromatin immuno-precipitation strategies followed by massively parallel sequencing (ChIP-seq), providing a robust map of Otx2 binding sites in both compartments of the adult retina. We show that cis-regulatory regions bound by Otx2 in the RPE and in the neural retina are mostly non-overlapping and have very different structural features, indicating tissue specific activities. Finally, comparison to Crx genome occupancy clearly points to redundant Otx2 and Crx functions in the neural retina.

Results

Distinct patterns of Otx2 genome occupancy in retinal compartments

To gain insight into the respective function of Otx2 in RPE and neural retina (NR), we set out to define the genomic targets of Otx2 in each compartment. We dissected eyes from 4-5 weeks old mice and carried out Otx2-ChIP-seq separately on RPE and NR nuclei. In order to enhance the reliability for identified Otx2-bound sites, we performed two parallel experiments using two different antibodies: first, *Otx2*$^{Otx2\text{-}GFP/+}$ knock-in mice expressing an Otx2-GFP fusion protein [13] together with an anti-GFP antibody, second, wild type mice together with an anti-Otx2 antibody (Fig. 1A). Two pairs of independent sets of data were generated, thereafter referred to as the GFP and the WT assays (Fig. 1A). A total of 4-16 x 10^6 sequence reads were mapped to the genome for each condition. MACS algorithm with a <1% FDR threshold was used to identify peaks, henceforth referred to as Otx2-bound regions (OBRs). NR-WT and NR-GFP assays respectively yielded 15448 and 5997 OBRs, while RPE-WT and RPE-GFP assays respectively yielded 2941 and 3766 OBRs (Fig. 1B). Control experiments with GFP antibody on wild-type mice and non-relevant Lamin-B1 antibody on wild-type mice failed to show significant sequence enrichment above background across the genome, indicating that Otx2 and GFP antibodies were both specific.

For each experiment, peak distribution across functional domains of the genome was analysed using Cis-regulatory Element Annotation System (CEAS) (Fig. 1B). For all conditions, distributions of peaks departed from the actual distribution of functional domains, indicating that peaks were not randomly located on the genome but were enriched in specific functional domains. Strikingly, both NR assays and both RPE assays exhibited their own specific characteristics. In NR-WT and NR-GFP assays, peaks were strongly enriched in promoter regions: while these regions represent about 1% of the genome, they concentrated 20 to 30% of the NR peaks. Enrichment of peaks was also significantly found in 5'UTR regions in NR assays. By contrast, peaks were under-represented in distal intergenic regions. RPE peaks from WT and GFP assays also showed a specific distribution pattern: peak concentrated to promoter regions, although to a lesser extent than in NR (5.3 and 7% for WT and GFP assay, respectively). RPE peaks were consistently enriched in introns and under-represented in intergenic regions. Therefore, the two independent WT and GFP assays show consistent and specific Otx2 genome occupancy landscapes in the neural retina and in the RPE, with Otx2 binding enriched in promoters and 5'UTRs in the NR and in promoters and introns in the RPE. Peak height distribution was also found to differ between NR and RPE assays: in NR assays, it showed a unimodal shape, with a moderate height. By

contrast, the distribution was bimodal in both RPE assays with two distinguishable populations of low- and medium-height (Fig. 1B). The finding of NR and RPE-specific OBR signature with different global characteristics suggests that Otx2-mediated gene regulation proceeds differentially in these two retinal compartments.

Independent ChIP-seq assays yield high confidence Otx2 bound regions datasets with characteristic features

We next examined to which extent the double antibody approach enhanced the reliability of OBR identification, by comparing the pairs of datasets obtained in the NR and the RPE (Fig. 2A). In the NR, 69.5% of the OBRs detected in the GFP assay overlapped with OBRs detected in the WT experiment, forming a core set of 4167 peaks. We analysed the gene ontology of the corresponding 3308 closest genes using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) tool (Table 1). We found an enrichment for the following ontology terms: visual perception ($p=9.9x10^{-15}$, Fisher Exact P-value) sensory perception of light stimulus ($p=1.6x10^{-14}$), vision ($p=2.6x10^{-11}$), detection of light stimulus ($p=1.1x10^{-6}$), response to light stimulus ($p=8.2x10^{-6}$). By contrast, such enrichment was absent in the 5903 closest genes corresponding to the non-core set of peaks. This indicates that the intersection of GFP and WT datasets in the NR corresponds to a core set of high confidence Otx2 bound regions, with strong relevance to NR function. Similarly, in the RPE, 55.6% of the OBRs detected in the WT assay were common with the OBRs detected in the GFP assay. A total core set of 1638 peaks was deduced. DAVID analysis indicated that the 1374 closest genes were enriched in specific ontology terms (Table 2): cell adhesion ($p=2.3x10^{-5}$), cell junction ($p=1.0x10^{-5}$), metal-ion binding ($p=3.5x10^{-4}$), eye development ($p=2.2x10^{-3}$), melanocyte differentiation ($p=2.4x10^{-3}$) whereas these enrichments were absent or strongly reduced ($p>8.8x10^{-3}$) in the 2151 non-core specific closest genes. Therefore, the intersection of GFP and WT datasets in the RPE also represents a core set of high confidence OBRs with relevance to specialized function of the RPE.

To characterize the structure of Otx2 bound sequences, we searched NR and RPE core datasets for enriched motifs using three different tools: Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment (HOMER), MEME-ChIP and Motiflab (Fig. 2B and supplementary tables S1 and S2). In the NR, all methods called the preferred Otx2 binding site TAATCC [14] with T/G flexibility at position 4. This motif was present in 67.2 % of called peaks in the NR. In the RPE core dataset, the Otx2 binding motif was present in 83.4% of called peaks, with similar T/G flexibility at position 4 and a 3' extension TAATCCNNT/C. The distribution of Otx2 binding motifs in 1 kb of genomic sequence centred on all core OBRs was evaluated. In each

tissue, we found a prominent peak of TAATCC sites at the centre of the OBRs (Fig. 2C), indicating that the majority of genomic fragments were captured through the binding of Otx2 protein to its preferred motif. Together, these results show that our dual ChIP-seq approach yields robust sets of OBRs with clear relevance to NR or RPE function, most of which contain the Otx2 preferred binding site at their centre.

Gene promoters and regulatory regions often lie close to CpG islands, which have a higher GC percentage than genome average. To test whether Otx2 bound regions display specific base content, we compared the percentage of GC in 1000 bases around the centre of OBRs to 1000 random genome sequences of the same length (Fig. 2D). The GC percentage of OBR-containing genomic fragments was increased in both NR and RPE, indicating that Otx2 preferentially binds to GC rich regions. In the RPE, the increase was evenly distributed around the OBRs and appeared modest (about 3%). In the NR, the GC percentage close to the OBRs was highly increased. It culminated over 55% GC in two symmetrical peaks flanking the centre of the OBRs, which might correspond to a nucleosome positioning signal [15].

To evaluate the relevance of core vs non-core datasets, we examined whether the closest corresponding genes were enriched in known Otx2 target genes. In the RPE, Otx2 target genes identified in previous microarray studies [12] were 4 times more frequent in the RPE core set than in the non-core set, with 18 Otx2 target genes in the core set (Fig. 2E). This analysis could not be done for NR core datasets as no Otx2 target gene specific to photoreceptor cells has been identified so far. Nonetheless, both in the NR and RPE experiments, the intersection of sequences identified in the GFP and the WT assays showed consistent global and structural traits, making them high confidence core datasets. As a consequence, further analyses were restricted to NR and RPE core datasets, which represent robust ensembles of OBRs.

Evolutionary conservation as an indicator of relevance for Otx2-bound regions

Among the thousands of genome sites bound by transcription factors, no clear indication has emerged so far that could help recognizing those that have prominent regulatory role. We used our knowledge of Otx2 direct target genes to evaluate whether additional features such as chromatin marks or sequence properties could help predicting the relevance of OBRs. The rationale was the following: if a given criteria is relevant to cis-active function of an OBR, then target-gene OBRs should have a lower rank according to this criteria (Fig. 3A). We used the list of previously identified Otx2 direct target genes to sample

criteria. As most of these genes were RPE-specific, we restricted our analysis to the RPE OBR core dataset. OBRs were sorted using the Motiflab tool according to 10 criteria: GC percentage, conservation, number of TAATCC motifs, CCDS (Consensus CoDing Sequences), H3K4 mono- or tri-methylation, DNAse hotspots, TFBS, CpG islands. In each sorted list, the mean rank of all OBRs relative to the mean rank of OBRs close to Otx2 regulated genes was calculated. This ratio is expected to be higher than 1 for any relevant criteria. Figure 3B shows that only sequence conservation led to a ratio above 1 for the selected genes. For all other criteria, the relative mean rank of OBRs close to Otx2 target genes remained equal to or below 1. Thus, sequence conservation is an indicator for OBR relevance in this experiment, and might help distinguishing functional binding sites in ChIP-seq experiments. To assess the predictive value of this criterion, we applied it to the NR core dataset. We tested whether OBRs close to genes with relevant ontology terms were enriched among the most conserved OBRs (Fig. 3C). When considering the 2/3 most conserved OBRs in the NR, we observed that 90% of OBRs close to relevant NR genes were present, a proportion significantly superior to the expected one. When considering the 50% most conserved OBRs, 75% of OBRs close to relevant NR genes were included, an even more remote proportion from the expected one. Khi² tests supported the statistical significance of these results. Hence, filtering the most conserved OBRs also distinguishes relevant genes in the NR.

Otx2-bound regions evocate different Otx2 genetic repertoires in NR and RPE

Although Otx2 is expressed in photoreceptor and bipolar cells of the adult mouse retina, its role in the NR, especially in photoreceptors, remains unclear. Previous studies have shown that RPE-specific rescue of Otx2 expression following whole retina knockout is sufficient to maintain healthy photoreceptors, suggesting that Otx2 is dispensable in these cells. This raises three hypotheses: i) either Otx2 transcription factor has no function in the NR, or ii) these functions are not essential and do not lead to any visible phenotype, or iii) compensatory mechanisms in the NR mask the effects of Otx2 deletion. All these hypotheses imply that Otx2 would have different functions in NR and RPE. To test this idea, the two confident NR and RPE core OBR sets were compared to determine whether Otx2 binds to the same locations in both tissues (Fig. 4A). Out of their respective 4167 and 1638 OBRs, NR and RPE core datasets shared only 426, indicating that Otx2 occupancy is mostly different in both tissues. Surprisingly, when looking at the closest gene to each bound region, and comparing genes close to OBRs instead of binding regions in NR and RPE, the overlap was notably increased. From the 426 overlapping peaks, corresponding to 381 genes, common closest genes to Otx2 bound regions were brought up to 765 (Fig. 4B). An

additional group of 384 genes with an OBR in their vicinity in both NR and RPE was hereby identified, with their OBR located at different positions in each tissue. An example for each case is shown in Figure 4C. Thus, Otx2 binds to the proximity of mostly different genes in the NR and in the RPE, and for half of the minority of genes that share an OBR in both tissues the site of binding occupies a different position. This is in favour of Otx2 regulating very different gene repertoires in different retinal layers.

The observation of a different OBR location for 384 genes in the NR and in the RPE suggested potential difference of Otx2-bound cis-regulatory elements organization in both tissues. For instance, PR specific genes have short promoters [16,17]. To test whether this observation extended to all genes with an OBR, we made a systematic evaluation of the position of OBRs relative to the closest transcription start site (TSS) for all OBRs located from -10kb to +10kb of a known TSS (Fig. 4D). This revealed a major difference between NR and RPE. In the RPE, OBRs were widely distributed around the TSS, with a modest but clear increase in most proximal (<200bp) region around the TSS. Around 10% of OBRs located in this region, the other 90% being localized homogeneously along those 20kb. In the NR, OBRs preferentially localized in the proximal region, with over 40% tightly associated to the TSS. This showed that Otx2 binds to regulatory motifs with flexible distance to TSS in the RPE. On the contrary, in the NR, Otx2-bound regulatory motifs have a much more prevalent proximity to TSS, which may be dictated by the short size of photoreceptor specific promoters.

Along with different chromatin structure and promoter organization, differential protein associations could contribute to select specific Otx2 binding sites, explaining the differences observed in both tissues. To explore this possibility, we used HOMER motif enrichment analysis to search whether motifs recognized by other transcription factors could be associated to the OBRs (Fig. 4E). In the NR, an associated Sp1 site was found in 19.6% of OBRs. Other enhancer sites for GFY and NFY were enriched to a lesser degree (Table S1). In the RPE, an enrichment of Nkx2-5 (29.7% of OBRs), Lhx3 (24.5% of OBRs)and Pax7 (3.0% of OBRs) transcription factor binding site was found in Otx2 bound regions (Table S2). To further characterize the relationship between the enriched motifs and the Otx2 binding motif, we examined the distribution of Sp1 and Nkx2-5 motives 1kb around the centre of the OBRs. Sp1 motif clustered to the centre of OBRs only in NR while Nkx2-5 motif peaked around the centre of RPE OBRs only. Conversely, the distribution of Sp1 and Nkx2-5 motives was totally random in RPE and NR OBRs respectively (Fig 4E). Since the Otx2 binding TAATCC motif occupies the centre of OBRs in both retinal tissues (Fig. 2C), this demonstrates a close and specific association of Otx2 and Sp1 binding sites on NR cis-

regulatory elements and of Otx2 and Nkx2-5 binding sites on RPE cis-regulatory elements. The data are consistent with the possibility that specific transcription factor-Otx2 combinations select different regulatory motifs in the NR and in the RPE.

In conclusion, the strong difference of Otx2-bound regulatory element architecture in RPE and NR and the difference of gene sets with an OBR in each of these retinal tissues as well as the presence of specific enriched motifs for other transcription factors clearly supports a different role for Otx2 in the NR and in the RPE.

Otx2 and Crx may act redundantly in the neural retina

Otx2 does not bind to the same gene regulatory regions in the NR and the RPE, and therefore might have a different, yet unknown function in the NR. The rescue of photoreceptor degeneration in Otx2 knockout retinas by the RPE-restricted expression of Otx2 shows that there is no crucial need for Otx2 in the NR. One reason for this apparent uselessness could be that Crx, an Otx2 paralogue expressed in the same cell types of the NR as Otx2 but not in the RPE, could compensate for the lack of Otx2. To explore this possibility, we used previously published Crx Chip-seq data [18] to compare Otx2 and Crx genome occupancy. In order to homogenize all datasets, the Crx data was re-processed with the same analysis pipeline as the Otx2 data using MACS2 to call peaks.

First, a global comparative analysis of Otx2 and Crx raw ChIP-seq data was carried out using the bioconductor DIffBind tool, clustering multiple ChIP-Seq experiments together into a correlation heatmap (Fig. 5A). Both Otx2 RPE WT and GFP ChIP-seq data clustered together in a very close group, and the two Crx replicates also clustered together in another close group. Interestingly, in this analysis, the Otx2 NR WT and GFP ChIP-seq data bracketed the Crx group, showing closer similarity to this Crx group than to the Otx2 RPE group. This indicated that Otx2 genome occupancy in the NR was more similar to Crx genome occupancy that to Otx2 genome occupancy in the RPE.

Next, the Otx2 NR and RPE core datasets were compared to the Crx ChIP-seq data in detail (Fig. 5B). Peak location analysis revealed a very large overlap between Otx2 NR and Crx peaks with 2822 overlapping peaks. On the contrary, Otx2 RPE and Crx only shared 415 peaks, 339 of which already belonged to the intersection of NR and RPE peaks (as shown in Fig. 4A) and were thus not RPE specific ones (Fig. 5C). Finally, in the RPE, only 101 genome sites representing 6% of OBRs were common with Crx bound regions whereas in the NR, 67,7% of Otx2 bound regions were also bound by Crx. This supports the view of a

redundant activity of Crx and Otx2 in the NR that may explain the absence of phenotype in NR-specific knockout of Otx2.

To test whether Otx2 and Crx may display similar regulatory activities and hence compensate each other, we compared their ability to stimulate transcription in a transient transfection assay (Fig. 5D) A reporter construct containing the *Rbp3* promoter, an Otx2 target [20] fused to the secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene was transfected into HeLa cells along with expression vectors for GFP, GFP-Crx or GFP-Otx2 fusion proteins. Both Otx2 and Crx proteins stimulated *Rbp3* promoter transcription to similar levels, causing a 20-fold increase of phosphatase activity compared to controls. This demonstrates that Otx2 and Crx can have identical activity on target promoters.

Together, these results show that, in the neural retina, both Otx2 and Crx transcription factors can bind to many identical places on the genome and have similar activity *in vitro*, making it is very likely that they exert redundant activities in the NR. On the contrary, in the RPE, where Otx2 binds to essentially different sites, no redundant Crx activity is present. Therefore, while Otx2 ablation in the RPE causes dramatic phenotypical changes, it is expected to have much less impact in the NR because of Crx redundancy.

Discussion

Although it has been long recognized that regulatory proteins may control different activities in different contexts, little is known about how this is achieved. This study provides the first comparative genome-scale analysis of the binding of a transcription factor in two different tissues. By performing dual ChIP-seq experiments on Otx2 in two contiguous but physiologically different retinal tissues, the neural retina and the retinal pigment epithelium, we bring strong evidence that this transcription factor regulates mostly non-overlapping gene sets in both retinal compartments.

The dual ChIP-seq experiment using two different antibodies is a unique approach, which guarantees robust OBR identification. Identified binding sites are consistent and their intersection is a reliable dataset. Thanks to this strategy, we show that in the adult retina, Otx2 has extremely different properties in two distinct cellular layers where it is expressed: the RPE and the NR. OBR-bearing genes have relevant tissue-specific ontologies for both tissues. In the NR, Otx2 binds to cis-regulatory elements with high GC content that lie very close to the TSS. In the RPE, Otx2-bound cis-regulatory elements have a broader distribution, relative to the TSS. This suggests that Otx2 exerts different activities in NR and RPE by regulating differential genetic networks. Accordingly, OBRs are very different in both tissues, with poor overlap.

Two elements may contribute to the binding diversity observed in mouse retina. First, chromatin structure may influence gene accessibility [21]. Photoreceptors have a very special chromatin architecture [22,23] with their heterochromatin condensed at the centre of the nuclei, and a peripheral ring of euchromatin around. Secondly, different protein associations can target a given transcription factor to different genomic sites. Interestingly, Otx2 binds in the vicinity of Sp1 binding sites in the NR, whereas it binds close to other transcription factors binding sites in the RPE. The ubiquitously expressed Sp transcription factors are known to regulate photoreceptor specific genes through synergistic interaction with cell-specific regulatory proteins. For instance, the Otx-related Crx protein interacts with Sp1, Sp3 and Sp4 in photoreceptors to achieve elevated expression of phosophodiesterase-beta and rod opsin genes [24]. Our findings suggest that Otx2 may also synergise with Sp proteins to regulate photoreceptor-specific genes.

One unexpected observation is that, in NR and RPE, Otx2 binds to different regions even in the vicinity of the same genes. Both tissues derive from the same neuro-epithelium and their fate can be changed at early stages. In *Otx1*$^{-/-}$*; Otx2*$^{+/-}$ embryos, upon low dosage of

Otx proteins, RPE cells adopt an NR identity [6,25]. On the contrary, Otx2 overexpression in the NR activates an RPE-specific gene network [26]. At adult stage, both tissues express Otx2, but use it in different means. In the RPE, Otx2 regulates genes involved in melanogenesis, visual cycle, pH regulation, and metal concentration homeostasis. In the mature NR, Otx2 has no known functions, but it exhibits much different genome occupancy. This may reflect tissue specific specialization with cell equipment and chromatin organization creating gene regulatory conditions that profoundly differ, even for the same genes. Such a regulatory rewiring might explain the loss of tissue plasticity in species with reduced regenerative capacity [27]. Although human pluripotent stem cells can be cultured to induce photoreceptor differentiation [28], and rat ciliary-derived cells can be transformed into cells showing a photoreceptor phenotype [29], the cellular plasticity of mammalian retinal cells is by far not as potent as in Zebrafish [30] or Goldfish [31]. It would be of high interest to test whether OBR localisation in RPE and NR of organisms with high retinal regenerative capacities is more similar than in mice, as an indication of greater plasticity of cell types.

Transcription factors ChIP-seq experiments generally reveal thousands of binding sites. Are all of them truly active? That a given transcription factor could regulate the expression of thousands of genes does not easily conciliate with the fine-tuned gene expression observed in complex organisms. It is therefore important to find out diagnostic elements that can help predicting functional binding sites. One study has explored whether specific features of the primary sequences bound by Crx have informative value [32]. Comparison of heterologous constructs containing Crx Bound Regions (CBRs), to unbound regions containing Crx motif in a large scale *ex vivo* expression assay indicates that a high GC content of DNA regions bound by Crx is a cue of their functional activity. We tried a different approach. Starting from our knowledge of direct Otx2 targets in the RPE [12], we examined how the corresponding OBR ranked among all OBRs sorted according to several criteria. This analysis did not pick-out GC content as a relevance criteria. This may be due to the fact that we did the analysis with RPE OBRs, as our target gene list was restricted to this cell type. The situation may be different in the NR, notably in photoreceptor where short promoters may concentrate Otx2 or Crx binding sites together with GC-rich Sp binding sites. However, we found that evolutionary conservation positively correlates with functionally active OBRs, which makes sense, as regulatory sequences are known to be under selection constraints [33].

Another way to identify which transcription binding sites, among the thousands revealed by ChIP-seq, are functionally important would be to identify those that are engaged in enhancers or transcription factories. As chromatin marks and protein complexes present in

these structures are better and better understood, they will provide new means to annotate transcription factors ChIP-seq datasets.

Otx1, Otx2 and Crx have a common evolutionary origin. In Drosophila, a single ortholog, Orthodenticle (otd) performs all Otx functions in eye and retina development. Mammalian Otx proteins can rescue some defects of *otd* mutant flies although to various extents [34]. These differences reflect the fact that mammalian *Otx* genes have acquired specialized sub-functions through evolution. Indeed, each member of the family has specialized activities, some of which being unique. For instance, Otx1 can rescue gastrulation defects in *Otx2* knockout mice but fails to develop anterior head [35]. Symmetrically, Otx2 rescues epilepsy and corticogenesis abnormalities in *Otx1* knockout mice but fails to recover the lateral semicircular canal of the inner ear [36]. Whether Crx is able to replace Otx1 or Otx2 activities has not been tested so far. In the adult mouse retina, Otx2 and Crx are both expressed in bipolar cells and photoreceptors. Our findings that both transcription factors share *in vivo* binding and *in vitro* transactivation properties plead for their redundancy in the neural retina and hence bring a simple explanation for the absence of photoreceptor specific *Otx2* knockout phenotype.

Methods

Chromatin Immunoprecipitation— For RPE ChIP, 40 mouse eyes were dissected to remove cornea, lens and retina. RPE/choroid eye cups were directly cross-linked in 1% formaldehyde in DMEM at room temperature for 10 min then quenched by adding glycine at a final concentration 125mM and incubated at room temperature for 5 min. Eye cups were washed twice in cell wash buffer (20mM HEPES pH7.4; 150mM NaCl; 125mM Glycine, 1mM PMSF). RPE/choroid nuclei (around 5 million) were then isolated with a dounce (pestle B) in cell lysis buffer (20mM HEPES pH7,4; 1mM EDTA; 150mM NaCl; 1% SDS; 125mM Glycine; 1mM PMSF). Eyecups were removed and RPE/choroid nuclei suspension was obtained. The rest of ChIP procedures were performed as described on Farnham Lab web site. (http://farnham.genomecenter.ucdavis.edu/pdf/FarnhamLabChIP%20Protocol.pdf)

For neural retina, 6 mouse eyes were dissected to remove cornea, lens and RPE/choroid cup. Neural retinae were processed following the same protocol than for RPE ChIP. On average, around 100 million cell nuclei were obtained.

An antibody raised against OTX2 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) and an antibody raised against GFP (Abcam, Cambridge, UK) were used to precipitate chromatin–Otx2 complexes from wild type mice in the WT assay, and chromatin-Otx2-GFP complexes from $Otx2^{Otx2\text{-}GFP/+}$ mice in the GFP assay, respectively. An antibody raised against LamininB (Santa-Cruz, California) and the antibody raised against GFP were applied to wild type chromatin and used as controls for Otx2-GFP and WT assays, respectively. The final DNA precipitates were dissolved in 20µl of TE (20mM Tris–HCl pH 8.0, 1mM EDTA).

ChIP-seq, clustering of sequence reads and identification of OBRs— ChIP-seq experiments were performed according to standard protocols as previously described [37]. All four samples of ChIP dual-assay were processed for ChIP-seq by IGBMC sequencing platform (IGBMC, France). Quantity and quality of DNA was ensured before processing by Qubit dsDNA HS Kit (Invitrogen) and bioanalyzer 2100 (Agilent). For each sample, 10ng of DNA was used to generate ChIP-DNA library. Libraries were analyzed by bio-analyzer 2100 (Agilent) before they were massively sequenced by Illumina GAIIx sequencer generating 40 million reads of 35bp length per sample on average. Raw reads data were analyzed and aligned on mouse genome mm9 by CASAVA v1.8.

Clustering for WT and Otx2-GFP assays was performed by first generating density (.wig format files) counting the number of tags in a 25pb sliding window for each ChIP-seq data set. Peak detection was performed using the MACS software

(http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/) [38] in version 2.0 at a q-value of 0.01, which reproduced most of the MACS 1.4 called peaks in each experiment with 3 times higher precision. Overlapping OBRs were identified and annotated using PeakAnalyzer v1.4 (http://www.ebi.ac.uk/bertone/software.html), with respect to the coordinates of the beginning and end of RefSeq transcripts. Due to possible overlap of one peak from a dataset with two peaks from another, total peak number may slightly vary.

Comparative ChIP-seq Analysis— For each ChIP-seq dataset, Cis-regulatory Element Annotation System 1.0.2 [39] was used to map called peaks on genomic regions. Further comparative analysis were yielded using R [40]. Proportional Venn diagrams were plotted using made4 [41] and VennDiagram [42] packages. ChIP-seq clustering was performed using Diffbind tool [43].

Peak Ranking— Motiflab tool [44] was used to load UCSC tracks and evaluate region coverage of each criterion. Peaks were then sorted according to these criteria. Global mean rank varied according to the number of peaks having the same criterion value. The selected gene's mean rank was compared to this global mean rank. A ratio above 1 indicates a good confidence criterion.

ChIP-seq motif Analysis— Three independent motif enrichment methods were used on the neuroretina and RPE specific overlapping "core" set : MEME-ChIP software Version 4.9.0 [45], Homer 4.3 [46] and Motiflab [44]. The latter tool was also used for OBR ranking and GC content analysis.

Cell Culture— HeLa cells were cultured at 37°C, 5% CO2 and 95% humidity in Dulbecco Modified Eagle's Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Perbio, Helsingborg, Sweden), 50 units/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 2mM L-glutamine (Invitrogen).

Reporter gene assay— Transcriptional activity of the Otx2 and Crx proteins was assayed using the region -66 to +68 of the *IRBP* promoter cloned into the pSEAP2-basic vector (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA). The pSEAP2-Basic (promoter-less) and pSEAP2-Control (SV40 promoter) vectors were used as negative and positive controls respectively. In standard assays, 10^5 HeLa cells per well were seeded in 24 wells plates and transfected by the $CaPO_4$ method with unless indicated, 1 µg IRBP-SEAP, 0.25 µg GFP or GFP-Otx2 or GFP-Crx expression vector and 0.1 µg beta-galactosidase expression vector. After 40 hours incubation, secreted alkaline phosphatase (SEAP) and beta-galactosidase

activities were measured. SEAP activity was normalized with beta-galactosidase activity. Normalized SEAP background in the absence of Otx2 expression vector was taken as 1 fold activation. Three independent experiments were performed in duplicate to generate each data.

References

1. Pires-daSilva A, Sommer RJ (2003) The evolution of signalling pathways in animal development. Nat Rev Genet 4: 39-49.
2. Nandi S, Blais A, Ioshikhes I (2013) Identification of cis-regulatory modules in promoters of human genes exploiting mutual positioning of transcription factors. Nucleic Acids Res 41: 8822-8841.
3. Freund CL, Gregory-Evans CY, Furukawa T, Papaioannou M, Looser J, et al. (1997) Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. Cell 91: 543-553.
4. Freund CL, Wang QL, Chen S, Muskat BL, Wiles CD, et al. (1998) De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. Nat Genet 18: 311-312.
5. Ragge NK, Brown AG, Poloschek CM, Lorenz B, Henderson RA, et al. (2005) Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. Am J Hum Genet 76: 1008-1022.
6. Martinez-Morales JR, Signore M, Acampora D, Simeone A, Bovolenta P (2001) Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. Development 128: 2019-2030.
7. Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, et al. (2003) Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. Nat Neurosci 6: 1255-1263.
8. Fossat N, Le Greneur C, Beby F, Vincent S, Godement P, et al. (2007) A new GFP-tagged line reveals unexpected Otx2 protein localization in retinal photoreceptors. BMC Dev Biol 7: 122.
9. Beby F, Housset M, Fossat N, Le Greneur C, Flamant F, et al. (2010) Otx2 gene deletion in adult mouse retina induces rapid RPE dystrophy and slow photoreceptor degeneration. PLoS One 5: e11673.
10. Hennig AK, Peng GH, Chen S (2008) Regulation of photoreceptor gene expression by Crx-associated transcription factor network. Brain Res 1192: 114-133.
11. Koike C, Nishida A, Ueno S, Saito H, Sanuki R, et al. (2007) Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. Mol Cell Biol 27: 8318-8329.
12. Housset M, Samuel A, Ettaiche M, Bemelmans A, Beby F, et al. (2013) Loss of Otx2 in the adult retina disrupts retinal pigment epithelium function, causing photoreceptor degeneration. J Neurosci 33: 9890-9904.
13. Fossat N, Le Greneur C, Beby F, Vincent S, Godement P, et al. (2007) A new GFP-tagged line reveals unexpected Otx2 protein localization in retinal photoreceptors. BMC Dev Biol 7: 122.
14. Chatelain G, Fossat N, Brun G, Lamonerie T (2006) Molecular dissection reveals decreased activity and not dominant negative effect in human OTX2 mutants. J Mol Med (Berl) 84: 604-615.
15. Tillo D, Hughes TR (2009) G+C content dominates intrinsic nucleosome occupancy. BMC Bioinformatics 10: 442.
16. Cai X, Conley SM, Cheng T, Al-Ubaidi MR, Naash MI (2010) A 350 bp region of the proximal promoter of Rds drives cell-type specific gene expression. Exp Eye Res 91: 186-194.
17. Yin J, Brocher J, Fischer U, Winkler C (2011) Mutant Prpf31 causes pre-mRNA splicing defects and rod photoreceptor cell degeneration in a zebrafish model for Retinitis pigmentosa. Mol Neurodegener 6: 56.
18. Corbo JC, Lawrence KA, Karlstetter M, Myers CA, Abdelaziz M, et al. (2010) CRX ChIP-seq reveals the cis-regulatory architecture of mouse photoreceptors. Genome Res 20: 1512-1525.

19. Chen S, Wang QL, Nie Z, Sun H, Lennon G, et al. (1997) Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. Neuron 19: 1017-1030.
20. Fong SL, Fong WB (1999) Elements regulating the transcription of human interstitial retinoid-binding protein (IRBP) gene in cultured retinoblastoma cells. Curr Eye Res 18: 283-291.
21. Apostolou E, Hochedlinger K (2013) Chromatin dynamics during cellular reprogramming. Nature 502: 462-471.
22. Solovei I, Kreysing M, Lanctot C, Kosem S, Peichl L, et al. (2009) Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. Cell 137: 356-368.
23. Kizilyaprak C, Spehner D, Devys D, Schultz P (2010) In vivo chromatin organization of mouse rod photoreceptors correlates with histone modifications. PLoS One 5: e11039.
24. Lerner LE, Peng GH, Gribanova YE, Chen S, Farber DB (2005) Sp4 is expressed in retinal neurons, activates transcription of photoreceptor-specific genes, and synergizes with Crx. J Biol Chem 280: 20642-20650.
25. Matsuo I, Kuratani S, Kimura C, Takeda N, Aizawa S (1995) Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. Genes Dev 9: 2646-2658.
26. Martinez-Morales JR, Dolez V, Rodrigo I, Zaccarini R, Leconte L, et al. (2003) OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. J Biol Chem 278: 21721-21731.
27. Barbosa-Sabanero K, Hoffmann A, Judge C, Lightcap N, Tsonis PA, et al. (2012) Lens and retina regeneration: new perspectives from model organisms. Biochem J 447: 321-334.
28. Boucherie C, Mukherjee S, Henckaerts E, Thrasher AJ, Sowden JC, et al. (2013) Brief report: self-organizing neuroepithelium from human pluripotent stem cells facilitates derivation of photoreceptors. Stem Cells 31: 408-414.
29. Akagi T, Mandai M, Ooto S, Hirami Y, Osakada F, et al. (2004) Otx2 homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue. Invest Ophthalmol Vis Sci 45: 4570-4575.
30. Fraser B, DuVal MG, Wang H, Allison WT (2013) Regeneration of cone photoreceptors when cell ablation is primarily restricted to a particular cone subtype. PLoS One 8: e55410.
31. Marotte LR (1980) Goldfish retinotectal system: continuing development and synaptogenesis. J Comp Neurol 193: 319-334.
32. White MA, Myers CA, Corbo JC, Cohen BA (2013) Massively parallel in vivo enhancer assay reveals that highly local features determine the cis-regulatory function of ChIP-seq peaks. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 11952-11957.
33. Loots GG (2008) Genomic identification of regulatory elements by evolutionary sequence comparison and functional analysis. Adv Genet 61: 269-293.
34. Terrell D, Xie B, Workman M, Mahato S, Zelhof A, et al. (2012) OTX2 and CRX rescue overlapping and photoreceptor-specific functions in the Drosophila eye. Dev Dyn 241: 215-228.
35. Suda Y, Nakabayashi J, Matsuo I, Aizawa S (1999) Functional equivalency between Otx2 and Otx1 in development of the rostral head. Development 126: 743-757.
36. Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Barone P, Perera M, et al. (1999) Differential transcriptional control as the major molecular event in generating Otx1-/- and Otx2-/- divergent phenotypes. Development 126: 1417-1426.
37. Kobi D, Steunou AL, Dembele D, Legras S, Larue L, et al. (2010) Genome-wide analysis of POU3F2/BRN2 promoter occupancy in human melanoma cells reveals Kitl as a novel regulated target gene. Pigment Cell Melanoma Res 23: 404-418.
38. Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y, Liu XS (2012) Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. Nat Protoc 7: 1728-1740.
39. Ji X, Li W, Song J, Wei L, Liu XS (2006) CEAS: cis-regulatory element annotation system. Nucleic Acids Res 34: W551-554.

40. R Development Core Team (2013) R: A Language and Environment for Statistical Computing.
41. Culhane AC, Thioulouse J, Perriere G, Higgins DG (2005) MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. Bioinformatics 21: 2789-2790.
42. Chen H, Boutros PC (2011) VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. BMC Bioinformatics 12: 35.
43. Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, Holmes KA, Ali HR, et al. (2012) Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. Nature 481: 389-393.
44. Klepper K, Drablos F (2013) MotifLab: a tools and data integration workbench for motif discovery and regulatory sequence analysis. BMC Bioinformatics 14: 9.
45. Machanick P, Bailey TL (2011) MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. Bioinformatics 27: 1696-1697.
46. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, et al. (2010) Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. Mol Cell 38: 576-589.

Figure legends:

FIGURE 1: Otx2 and GFP ChIP-seq experiments in the retina
A. Experimental design: four independent ChIP experiments were yield. Neuroretina and retinal pigmented epithelium were dissociated. For each tissue, GFP assay using GFP antibody on Otx2-GFP knock-in mice and WT assay using the R&D Otx2 antibody on wild-type mice had a GFP antibody on wild-type mice and a non-specific Lmnb antibody assay as control, respectively. **B.** MACS2 called peak's height and distribution on genome was compared to the global genome distribution for each experiment. Both antibodies had similar results in each tissue. In the neuroretina, peaks were localized in the close promoter region, whereas in the RPE, this localization was not as much enhanced, Otx2 also bound to intronic regions.

FIGURE 2: An Otx2 "core" binding sites set
A. Overlap of called peaks with both antibody approaches in each tissue, selecting a core set of high confidence. 4167 binding sites were obtained in the neuroretina, and 1638 in the RPE. **B.** Motif enrichment analysis on the core datasets. Both tissues exhibit the TAATCC Otx2 binding consensus motif as the highest enriched motif. **C.** Distribution of the TAATCC motif 1000 bases around the center of the Otx2 bound region. In both tissues, the motif was centered on the Otx2 binding site. **D.** GC content 1000 bases around the Otx2 bound region compared to a random selection of 1000 regions in the genome. In the neuroretina, Otx2 binds specifically to GC enriched regions, whereas it is not the case in the RPE. **E.** List of RPE specific microarray confirmed genes that had a called peak in their vicinity.

TABLE 1 and 2: Relevant terms of ontology for core-set closest genes
For each term of ontology, core p-value was compared to the non-core p-value. In the neuroretina, ontological relevant genes were only present in the core set. In the RPE, relevant genes were highly enriched in the core set, harboring a much lower p-value than in the non-core dataset.

FIGURE 3: Phylogenetic conservation marks OBR relevance
A. Principle of the relevance assay method: OBRs are sorted according to a criteria and the mean rank of a selected gene set is compared to the random mean rank. **B.** Global Mean Rank / Mean rank of the microarray confirmed genes after sorting Otx2 bound regions according to Genomic Conservation, DNase sensibility and sensibility peaks, histone methylation, known transcription factor bound regions, CoG islands, GC content, Consensus Coding sequences (CCDS). A value of 1 indicates that the selected genes mean rank does not differ from the random mean rank. Only conservation had a value higher than 1, indicating a better ranking of the selected genes. **C.** Application of the gene selection method to the NR: 2/3 and 1/2 most conserved peaks significantly increased the proportion of ontologically relevant genes.

FIGURE 4: Comparison of Otx2 neuroretina and RPE binding sites
A. Overlap of the Otx2 bound sequences (Peaks) in neuroretina and RPE. Only 426 regions were bound in both tissues **B.** Overlap of the closest genes to these bound regions, 765 common closest genes were found. **C.** Illustration of the Otx2 tissue specific binding: Atf3 in the neuroretina, Ttr in the RPE, and Elmo2 in both tissues but with differential binding sites. **D.** Distribution of the distance to the transcription start site in both tissues, from -10 kb to +10 kb. In the neuroretina, Otx2 binds very close to the TSS and does not have a very large distribution on higher distances, whereas the distribution is much flatter in the RPE. **E.** Distribution of the Sp1 and Nkx2-5 motives 1000 bases around the center of the Otx2 bound region. Sp1 motif was centered on the Otx2 binding site only in the NR, and Nkx2-5 was centered on the Otx2 binding site only in the RPE.

FIGURE 5: Otx2 / Crx redundancy in the neuroretina
A. Diffbind clustering of Otx2-GFP, Otx2 and Crx ChIP-seq experiments. Both RPE experiments clustered together whereas the Otx2 experiments circled the Crx experiment, indicating a high vicinity between both bound regions. **B.** Otx2 core bound regions were overlapped against the Crx consensus bound regions from both replicates. The neuroretina core dataset had an impressive overlap with Crx, whereas in the RPE there were only 415 common bound regions. **C.** 339 of those 415 common bound regions were included in the 436 neuroretina/RPE commonly bound regions, indicating that in fact only 101 RPE specifically Otx2 bound regions were found in the Crx ChIP-seq experiment **D.** SEAP assay on an IRBP-luciferase reporter indicates that both Otx2 and Crx can activate the *Rbp3* promoter at the same level.

Supplementary Figures:

TABLE S1: HOMER enriched motifs in the NR.
TABLE S2: HOMER enriched motifs in the RPE.

Table 1: Ontology term enrichment p-value in core and non-core set of the NR

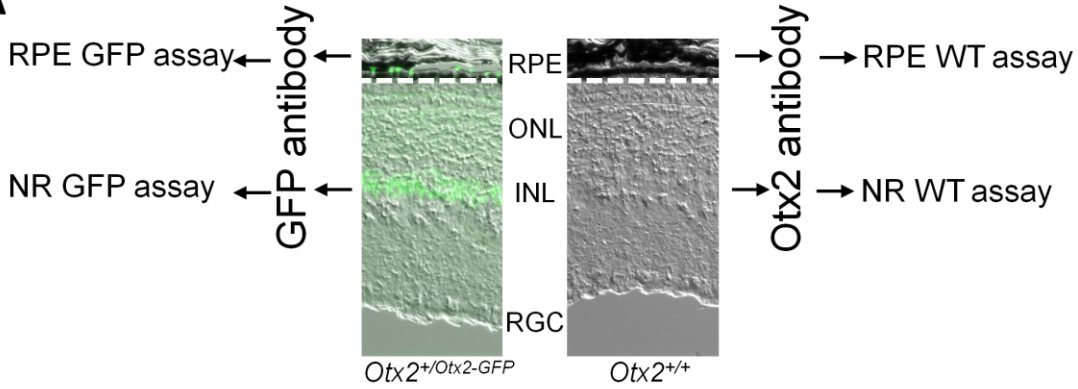
Neuroretina	**CORE**	**NON-CORE**
visual perception	9.9E-15	absent
sensory perception of light stimulus	1.6E-14	absent
vision	2.6E-11	absent
detection of light stimulus	1.1E-6	absent
response to light stimulus	8.2E-6	absent
photoreceptor cell differentiation	2.4E-5	absent
detection of visible light	2.5E-2	absent

Table 2: Ontology term enrichment p-value in core and non-core set of the RPE

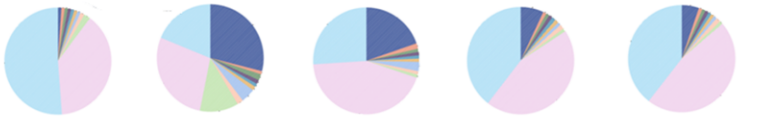
RPE	**CORE**	**NON-CORE**
cell adhesion	2.3E-5	4.4E-2
cell junction	1.0E-5	2.9E-2
metal-ion binding	3.5E-4	absent
eye development	2.2E-3	8.8E-3
melanocyte differentiation	2.4E-3	absent
eye morphogenesis	2.0E-3	6.5E-2
pigment cell differentiation	3.2E-3	absent
melanin metabolic process	3.7E-3	absent

Samuel et al. Figure 1

A

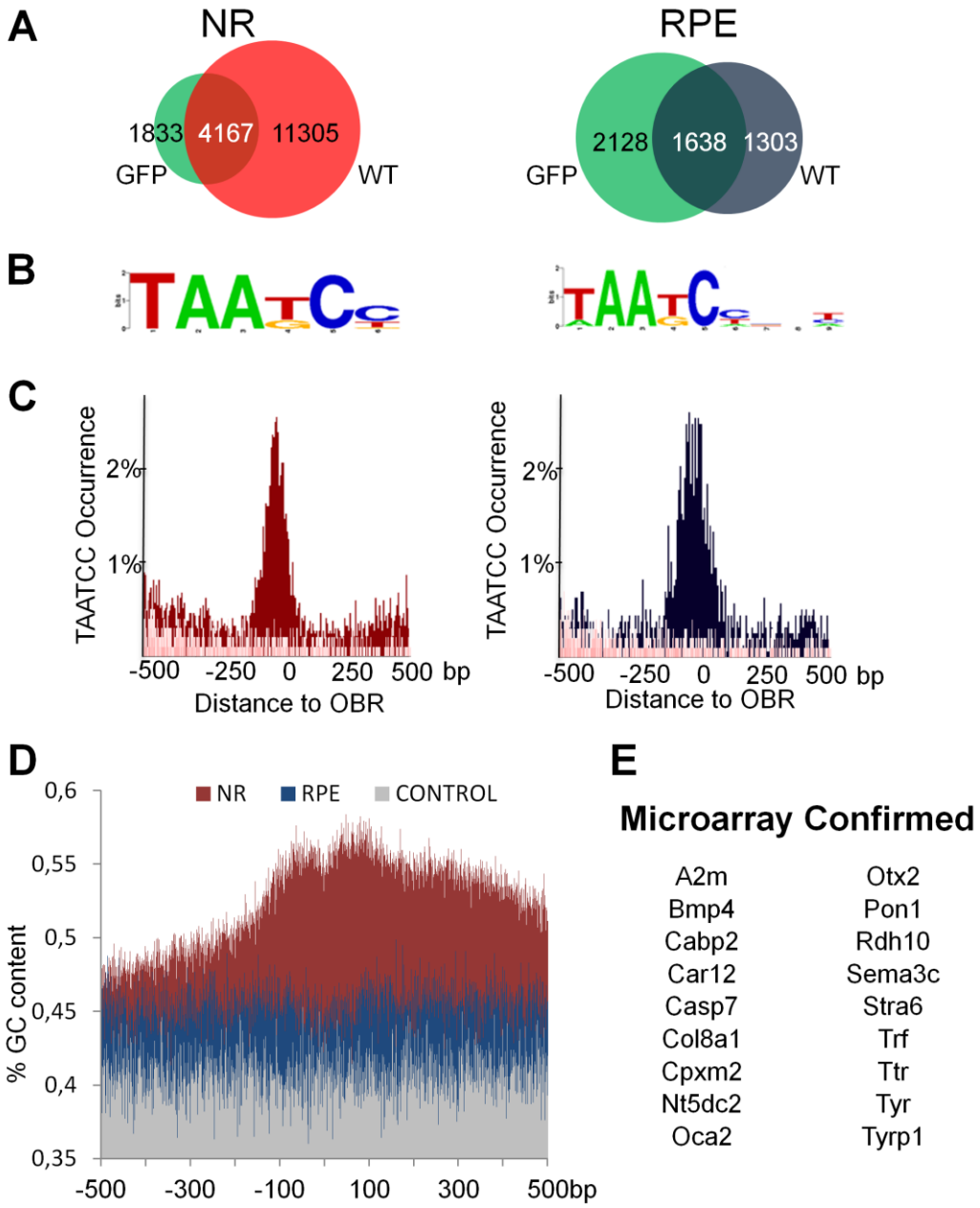


B

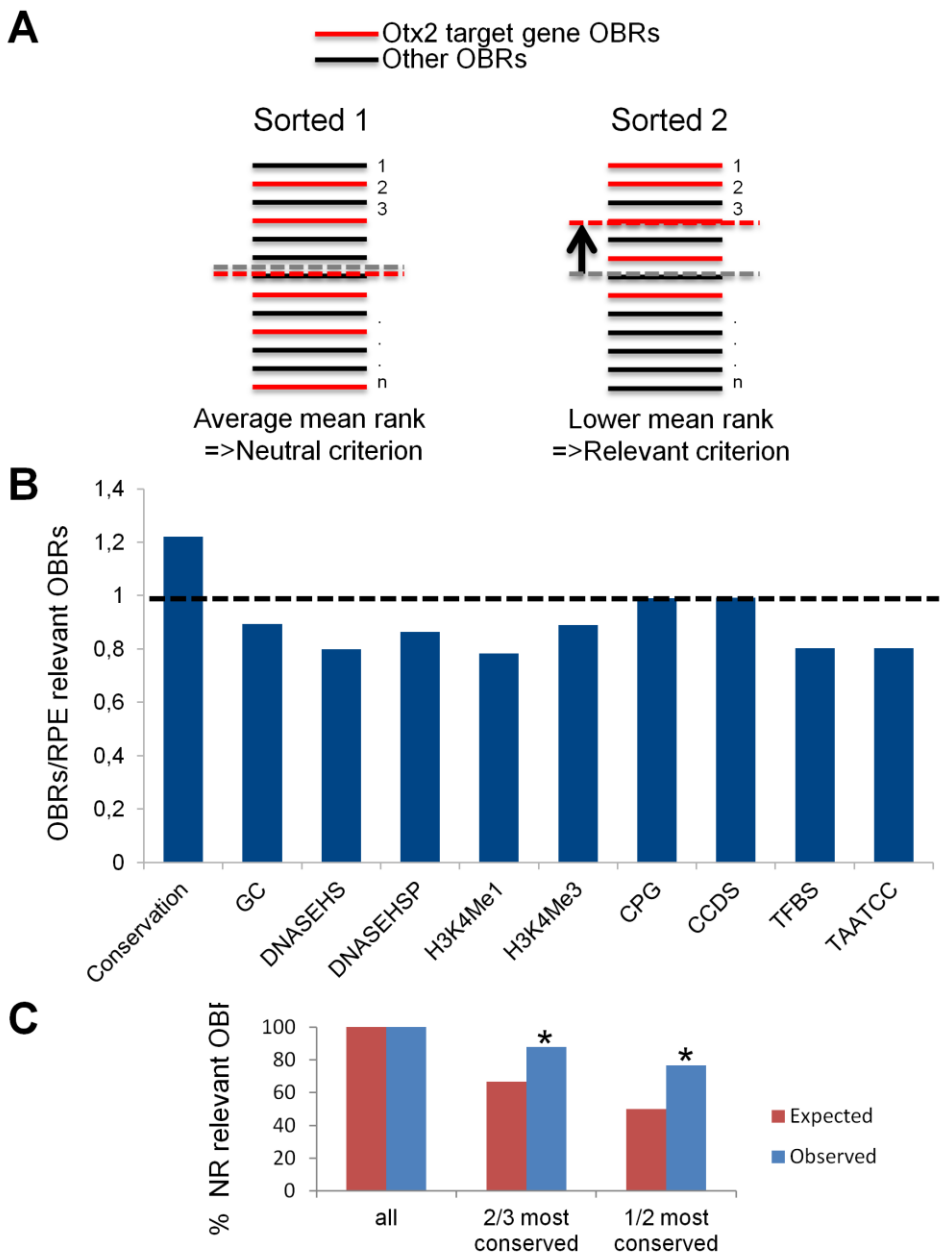


	Genome	NR GFP	NR WT	RPE GFP	RPE WT
Called Peaks		5997	15448	3766	2941
Height Distribution					
Pr 0-1000bp	1,1%	29,1%	19,9%	7%	5,3%
Pr 1000-2000bp	0,8%	0,6%	1,7%	1%	1,1%
Pr 2000-3000bp	0,7%	1,9%	1%	1%	0,9%
Dw 0-1000 bp	1%	1,2%	1%	1,1%	1,1%
Dw 1000-2000bp	0,8%	0,9%	0,8%	1,2%	0,8%
Dw 2000-3000bp	0,7%	1,2%	0,7%	1,1%	0,6%
5' UTR	0,3%	4,3%	2,8%	0,9%	0,4%
3' UTR	1,3%	1,9%	1%	1,4%	1,4%
Coding Exon	2%	11,8%	0,7%	0,3%	0,3%
Intron	39,3%	28,2%	44,2%	45,1%	47,7%
Distal Intergenic	59,1%	18,9%	26,2%	39,9%	40,2%

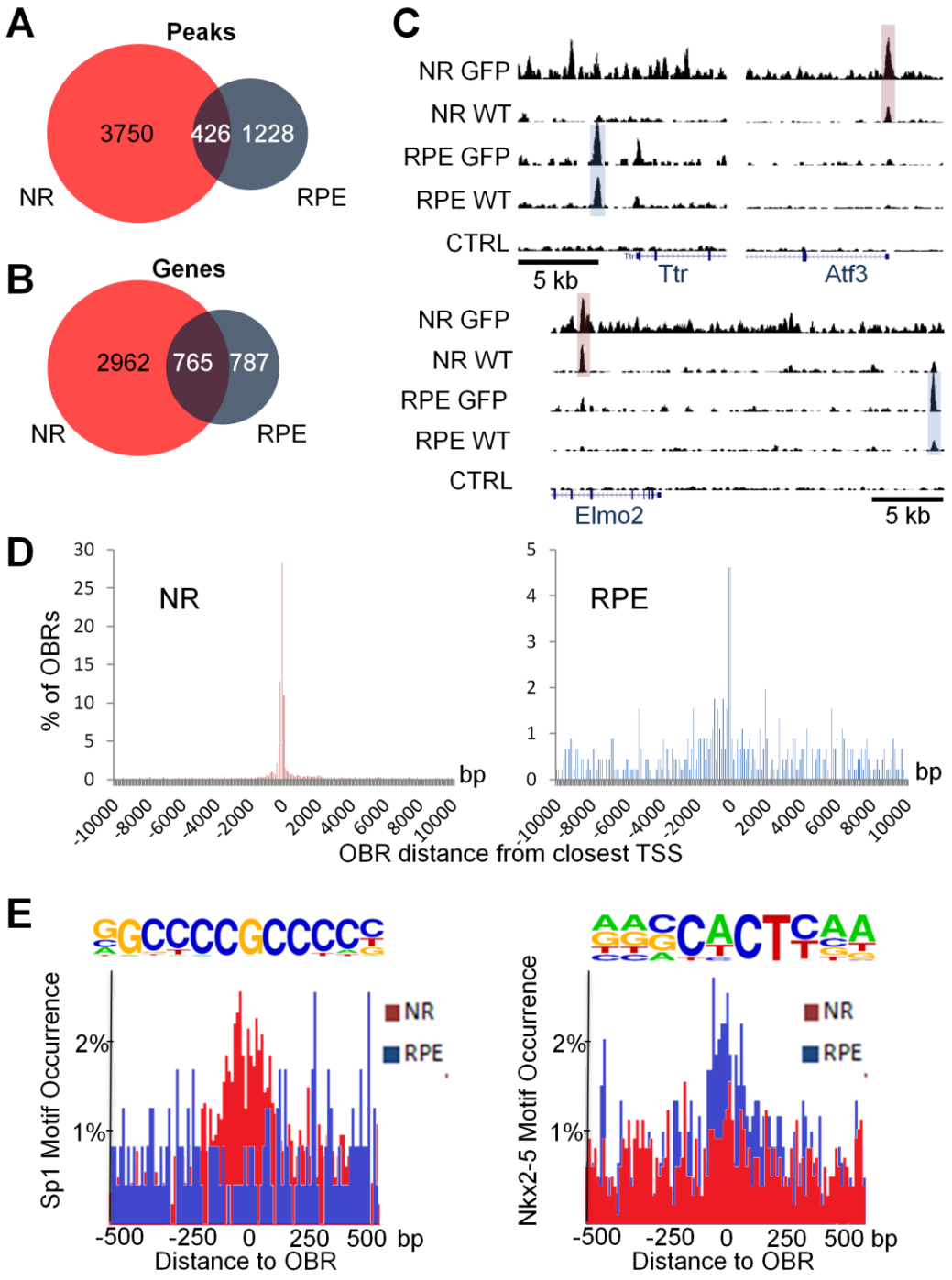
Samuel et al. Figure 2



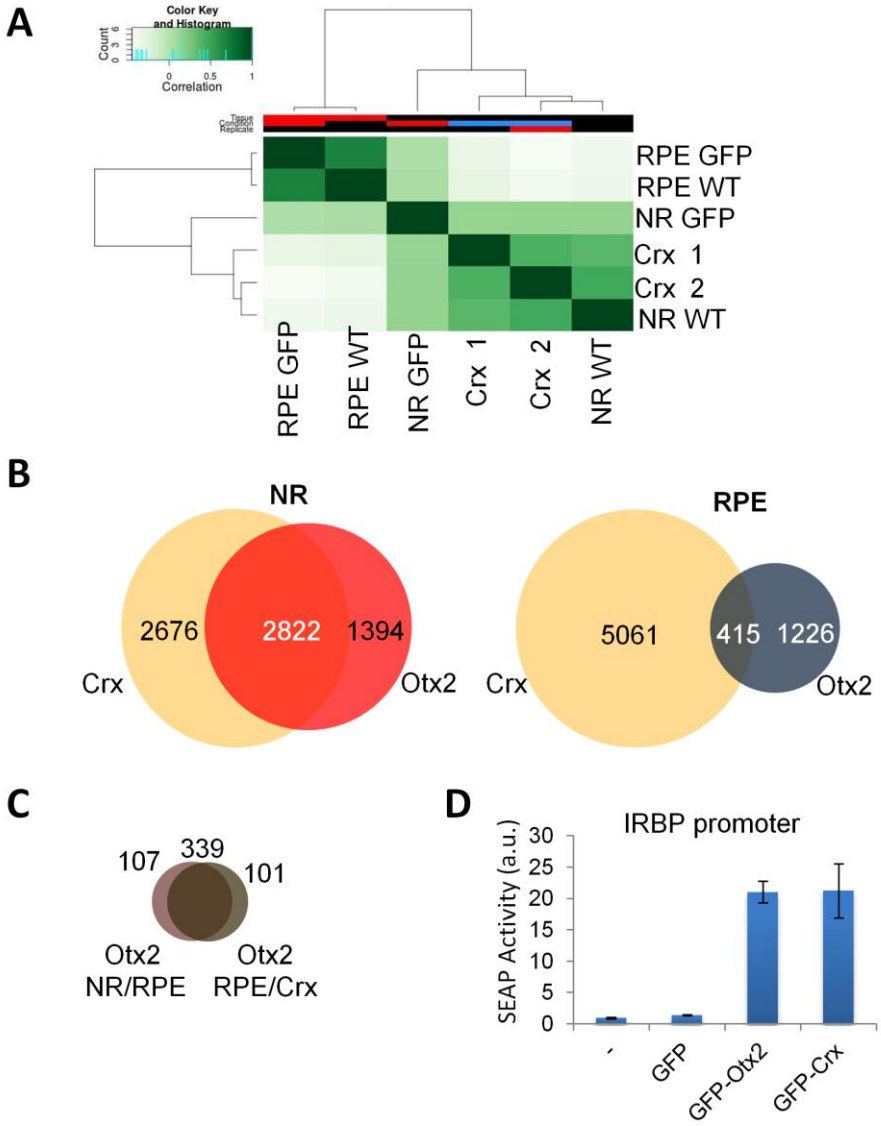
Samuel et al. Figure 3



Samuel et al. Figure 4



Samuel et al. Figure 5



Samuel et al. Supplementary Table S1

Rank	Name	P-value	# Target Sequences with Motif	% Targets Sequences with Motif	# Background Sequences with Motif	% of Background Sequences with Motif
1	CRX(Homeobox)/Retina-Crx-ChIP-Seq/Homer	1e-776	2802.0	67.24%	9862.0	23.54%
2	Sp1(Zf)/Promoter/Homer	1,00E-133	815.0	19.56%	3196.1	7.63%
3	GFY-Staf/Promoters/Homer	1,00E-76	184.0	4.42%	319.0	0.76%
4	NFY(CCAAT)/Promoter/Homer	1,00E-73	762.0	18.29%	3839.9	9.17%
5	GFY(?)/Promoter/Homer	1,00E-65	164.0	3.94%	298.3	0.71%
6	Elk4(ETS)/Hela-Elk4-ChIP-Seq(GSE31477)/Homer	1,00E-56	656.0	15.74%	3446.5	8.23%
7	ELF1(ETS)/Jurkat-ELF1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-53	614.0	14.73%	3197.6	7.63%
8	ETS(ETS)/Promoter/Homer	1,00E-52	435.0	10.44%	1943.9	4.64%
9	Elk1(ETS)/Hela-Elk1-ChIP-Seq(GSE31477)/Homer	1,00E-51	652.0	15.65%	3531.2	8.43%
10	Gata4(Zf)/Heart-Gata4-ChIP-Seq(GSE35151)/Homer	1,00E-43	571.0	13.70%	3126.3	7.46%
11	Klf4(Zf)/mES-Klf4-ChIP-Seq/Homer	1,00E-40	455.0	10.92%	2321.7	5.54%
12	Atf1(bZIP)/K562-ATF1-ChIP-Seq(GSE31477)/Homer	1,00E-40	433.0	10.39%	2164.1	5.17%
13	ATF3(bZIP)/K562-ATF3-ChIP-Seq/Homer	1,00E-34	204.0	4.90%	754.4	1.80%
14	Maz(Zf)/HepG2-Maz-ChIP-Seq(GSE31477)/Homer	1,00E-34	1326.0	31.82%	9834.9	23.48%
15	NRF1(NRF)/MCF7-NRF1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-33	314.0	7.54%	1476.2	3.52%
16	CRE(bZIP)/Promoter/Homer	1,00E-32	249.0	5.98%	1073.0	2.56%
17	NRF1/Promoter/Homer	1,00E-29	305.0	7.32%	1506.5	3.60%
18	Fli1(ETS)/CD8-FLI-ChIP-Seq(GSE20898)/Homer	1,00E-28	828.0	19.87%	5684.7	13.57%
19	GABPA(ETS)/Jurkat-GABPa-ChIP-Seq/Homer	1,00E-27	676.0	16.22%	4439.9	10.60%
20	E-box(HLH)/Promoter/Homer	1,00E-27	124.0	2.98%	390.5	0.93%
21	c-Jun-CRE(bZIP)/K562-cJun-ChIP-Seq/Homer	1,00E-26	211.0	5.06%	926.0	2.21%
22	GATA3(Zf)/iTreg-Gata3-ChIP-Seq(GSE20898)/Homer	1,00E-25	694.0	16.65%	4689.1	11.19%
23	ZNF143|STAF(Zf)/CUTLL-ZNF143-ChIP-Seq(GSE29600)/Homer	1,00E-24	311.0	7.46%	1659.1	3.96%
24	CTCF(Zf)/CD4+-CTCF-ChIP-Seq/Homer	1,00E-23	164.0	3.94%	668.0	1.59%
25	NeuroD1(bHLH)/Islet-NeuroD1-ChIP-Seq(GSE30298)/Homer	1,00E-23	506.0	12.14%	3201.9	7.64%
26	Usf2(HLH)/C2C12-Usf2-ChIP-Seq(GSE36030)/Homer	1,00E-23	227.0	5.45%	1095.4	2.62%
27	Pbx3(Homeobox)/GM12878-PBX3-ChIP-Seq/Homer	1,00E-22	183.0	4.39%	810.3	1.93%
28	USF1(HLH)/GM12878-Usf1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-22	316.0	7.58%	1758.5	4.20%
29	JunD(bZIP)/K562-JunD-ChIP-Seq/Homer	1,00E-19	97.0	2.33%	321.3	0.77%
30	Mef2c(MADS)/GM12878-Mef2c-ChIP-Seq(GSE32465)/Homer	1,00E-19	191.0	4.58%	922.1	2.20%
31	ETV1(ETS)/GIST48-ETV1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-18	874.0	20.97%	6586.5	15.72%
32	Pax7-long(Paired/Homeobox)/Myoblast-Pax7-ChIP-Seq(GSE25064)/Homer	1,00E-17	41.0	0.98%	70.9	0.17%
33	GFX(?)/Promoter/Homer	1,00E-17	57.0	1.37%	141.8	0.34%
34	Mef2a(MADS)/HL1-Mef2a.biotin-ChIP-Seq/Homer/	1,00E-17	183.0	4.39%	915.0	2.18%
35	bHLHE40(HLH)/HepG2-BHLHE40-ChIP-Seq/Homer	1,00E-16	147.0	3.53%	676.8	1.62%
36	Lhx3(Homeobox)/Forebrain-p300-ChIP-Seq/Homer	1,00E-16	485.0	11.64%	3318.9	7.92%
37	Nanog(Homeobox)/mES-Nanog-ChIP-Seq/Homer	1,00E-16	1833.0	43.99%	15785.7	37.68%
38	Foxh1(Forkhead)/hESC-FOXH1-ChIP-Seq(GSE29422)/Homer	1,00E-16	275.0	6.60%	1623.1	3.87%
39	BORIS(Zf)/K562-CTCFL-ChIP-Seq/Homer	1,00E-16	235.0	5.64%	1320.9	3.15%
40	ETS1(ETS)/Jurkat-ETS1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-15	658.0	15.79%	4848.7	11.57%
41	E2F4(E2F)/K562-E2F4-ChIP-Seq(GSE31477)/Homer	1,00E-15	462.0	11.09%	3182.4	7.60%
42	Atoh1(bHLH)/Cerebellum-Atoh1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-14	631.0	15.14%	4660.3	11.13%
43	RFX(HTH)/K562-RFX3-ChIP-Seq/Homer	1,00E-14	92.0	2.21%	360.5	0.86%
44	EWS:FLI1-fusion(ETS)/SK_N_MC-EWS:FLI1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-14	386.0	9.26%	2592.1	6.19%
45	PBX1(Homeobox)/MCF7-PBX1-ChIP-Seq(GSE28007)/Homer	1,00E-12	76.0	1.82%	298.2	0.71%
46	Gfi1b(Zf)/HPC7-Gfi1b-ChIP-Seq/Homer	1,00E-10	314.0	7.54%	2136.2	5.10%
47	c-Myc(HLH)/LNCAP-cMyc-ChIP-Seq/Homer	1,00E-10	335.0	8.04%	2313.6	5.52%
48	Rfx1(HTH)/NPC-Rfx1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-09	132.0	3.17%	726.0	1.73%
49	Olig2(bHLH)/Neuron-Olig2-ChIP-Seq(GSE30882)/Homer	1,00E-09	893.0	21.43%	7403.0	17.67%
50	ERG(ETS)/VCaP-ERG-ChIP-Seq/Homer	1,00E-09	832.0	19.97%	6836.3	16.32%
51	ZBTB33/GM12878-ZBTB33-ChIP-Seq/Homer	1,00E-08	80.0	1.92%	382.5	0.91%
52	X-box(HTH)/NPC-H3K4me1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-08	73.0	1.75%	336.3	0.80%
53	Gata1(Zf)/K562-GATA1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-08	265.0	6.36%	1836.3	4.38%
54	Rfx5(HTH)/GM12878-Rfx5-ChIP-Seq(GSE31477)/Homer	1,00E-08	202.0	4.85%	1339.2	3.20%
55	Gata2(Zf)/K562-GATA2-ChIP-Seq/Homer	1,00E-07	276.0	6.62%	2010.1	4.80%
56	LXRE(NR/DR4)/BLRP(RAW)-LXRb-ChIP-Seq/Homer	1,00E-06	38.0	0.91%	144.4	0.34%
57	Eomes(T-box)/H9-Eomes-ChIP-Seq/Homer	1,00E-06	1249.0	29.97%	11076.6	26.44%
58	Stat3(Stat)/mES-Stat3-ChIP-Seq/Homer	1,00E-06	274.0	6.58%	2019.6	4.82%
59	MafA(bZIP)/Islet-MafA-ChIP-Seq(GSE30298)/Homer	1,00E-05	403.0	9.67%	3232.0	7.72%
60	Nkx2.5(Homeobox)/HL1-Nkx2.5.biotin-ChIP-Seq/Homer	1,00E-05	994.0	23.85%	8795.3	21.00%
61	n-Myc(HLH)/mES-nMyc-ChIP-Seq/Homer	1,00E-05	366.0	8.78%	2931.2	7.00%
62	EKLF(Zf)/Erythrocyte-Klf1-ChIP-Seq(GSE20478)/Homer	1,00E-04	127.0	3.05%	856.1	2.04%
63	Stat3+il23(Stat)/CD4-Stat3-ChIP-Seq/Homer	1,00E-04	317.0	7.61%	2513.2	6.00%
64	SPDEF(ETS)/VCaP-SPDEF-ChIP-Seq/Homer	1,00E-04	527.0	12.65%	4445.7	10.61%
65	SCL/HPC7-Scl-ChIP-Seq/Homer	1,00E-04	2182.0	52.36%	20604.0	49.19%
66	TATA-Box(TBP)/Promoter/Homer	1,00E-04	557.0	13.37%	4749.6	11.34%
67	BMYB(HTH)/Hela-BMYB-ChIPSeq(GSE27030)/Homer	1,00E-04	618.0	14.83%	5325.1	12.71%
68	Hoxb4/ES-Hoxb4-ChIP-Seq(GSE34014)/Homer	1,00E-04	82.0	1.97%	521.6	1.25%
69	Foxo1(Forkhead)/RAW-Foxo1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-03	712.0	17.09%	6278.0	14.99%
70	Max(HLH)/K562-Max-ChIP-Seq/Homer	1,00E-03	315.0	7.56%	2567.8	6.13%
71	Oct4(POU/Homeobox)/mES-Oct4-ChIP-Seq/Homer	1,00E-03	143.0	3.43%	1045.1	2.49%
72	GATA-DR4(Zf)/iTreg-Gata3-ChIP-Seq(GSE20898)/Homer	1,00E-03	39.0	0.94%	219.5	0.52%
73	HOXA9/HSC-Hoxa9-ChIP-Seq(GSE33509)/Homer	1,00E-03	230.0	5.52%	1874.5	4.47%
74	Egr2/Thymocytes-Egr2-ChIP-Seq(GSE34254)/Homer	1,00E-02	153.0	3.67%	1202.6	2.87%
75	MYB(HTH)/ERMYB-Myb-ChIPSeq(GSE22095)/Homer	1,00E-02	759.0	18.21%	6910.8	16.50%
76	STAT4(Stat)/CD4-Stat4-ChIP-Seq/Homer	1,00E-02	346.0	8.30%	2988.0	7.13%
77	Hoxc9/Ainv15-Hoxc9-ChIP-Seq/Homer	1,00E-02	171.0	4.10%	1378.1	3.29%
78	Smad3(MAD)/NPC-Smad3-ChIP-Seq(GSE36673)/Homer	1,00E-02	1318.0	31.63%	12416.6	29.64%
79	Esrrb(NR)/mES-Esrrb-ChIP-Seq/Homer	1,00E-02	263.0	6.31%	2254.0	5.38%
80	HIF-1a(HLH)/MCF7-HIF1a-ChIP-Seq/Homer	1,00E-02	135.0	3.24%	1084.7	2.59%
81	STAT1(Stat)/HelaS3-STAT1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-02	102.0	2.45%	791.3	1.89%
82	E2F6(E2F)/Hela-E2F6-ChIP-Seq(GSE31477)/Homer	1,00E-02	417.0	10.01%	3723.7	8.89%
83	GATA-DR8(Zf)/iTreg-Gata3-ChIP-Seq(GSE20898)/Homer	1,00E-02	35.0	0.84%	227.1	0.54%
84	CTCF-SatelliteElement/CD4+-CTCF-ChIP-Seq/Homer	1,00E-02	12.0	0.29%	54.3	0.13%
85	GATA:SCL/Ter119-SCL-ChIP-Seq/Homer	1,00E-02	55.0	1.32%	395.3	0.94%

Samuel et al. Supplementary Table S2

Rank	Name	P-value	# Target Sequences with Motif	% Target Sequences with Motif	# Background Sequences with Motif	% of Background Sequences with Motif
1	CRX(Homeobox)/Retina-Crx-ChIP-Seq/Homer	1e-384	1364.0	83.27%	14705.6	33.00%
2	Pax7-long(Paired/Homeobox)/Myoblast-Pax7-ChIP-Seq(GSE25064)/Homer	1,00E-30	49.0	2.99%	136.3	0.31%
3	Lhx3(Homeobox)/Forebrain-p300-ChIP-Seq/Homer	1,00E-25	402.0	24.54%	6505.8	14.60%
4	NF1-halfsite(CTF)/LNCaP-NF1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-18	415.0	25.34%	7389.1	16.58%
5	Foxh1(Forkhead)/hESC-FOXH1-ChIP-Seq(GSE29422)/Homer	1,00E-18	190.0	11.60%	2585.0	5.80%
6	TEAD4(TEA)/Tropoblast-Tead4-ChIP-Seq(GSE37350)/Homer	1,00E-17	257.0	15.69%	4024.5	9.03%
7	NF1(CTF)/LNCAP-NF1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-16	115.0	7.02%	1283.0	2.88%
8	TEAD(TEA)/Fibroblast-PU.1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-10	207.0	12.64%	3540.9	7.95%
9	USF1(HLH)/GM12878-Usf1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-08	96.0	5.86%	1347.0	3.02%
10	X-box(HTH)/NPC-H3K4me1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-07	37.0	2.26%	342.2	0.77%
11	Gfi1b(Zf)/HPC7-Gfi1b-ChIP-Seq/Homer	1,00E-06	175.0	10.68%	3179.2	7.13%
12	NFkB-p65(RHD)/GM12787-p65-ChIP-Seq/Homer	1,00E-06	116.0	7.08%	1907.8	4.28%
13	ATF3(bZIP)/K562-ATF3-ChIP-Seq/Homer	1,00E-06	41.0	2.50%	454.5	1.02%
14	Nkx2.5(Homeobox)/HL1-Nkx2.5.biotin-ChIP-Seq/Homer	1,00E-06	487.0	29.73%	10896.3	24.45%
15	Usf2(HLH)/C2C12-Usf2-ChIP-Seq(GSE36030)/Homer	1,00E-06	68.0	4.15%	973.6	2.18%
16	Nanog(Homeobox)/mES-Nanog-ChIP-Seq/Homer	1,00E-05	908.0	55.43%	22166.1	49.74%
17	Gata4(Zf)/Heart-Gata4-ChIP-Seq(GSE35151)/Homer	1,00E-04	249.0	15.20%	5200.0	11.67%
18	NFkB-p65-Rel(RHD)/LPS-exp/Homer	1,00E-04	20.0	1.22%	187.1	0.42%
19	Rfx1(HTH)/NPC-Rfx1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-04	46.0	2.81%	660.3	1.48%
20	E-box(HLH)/Promoter/Homer	1,00E-04	19.0	1.16%	180.5	0.40%
21	Atf1(bZIP)/K562-ATF1-ChIP-Seq(GSE31477)/Homer	1,00E-04	119.0	7.26%	2261.3	5.07%
22	NFAT:AP1/Jurkat-NFATC1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-03	42.0	2.56%	629.4	1.41%
23	CEBP:AP1/ThioMac-CEBPb-ChIP-Seq/Homer	1,00E-03	145.0	8.85%	2936.5	6.59%
24	Hoxb4/ES-Hoxb4-ChIP-Seq(GSE34014)/Homer	1,00E-03	56.0	3.42%	942.3	2.11%
25	Sox3(HMG)/NPC-Sox3-ChIP-Seq(GSE33059)/Homer	1,00E-03	349.0	21.31%	8061.9	18.09%
26	RFX(HTH)/K562-RFX3-ChIP-Seq/Homer	1,00E-03	20.0	1.22%	231.3	0.52%
27	Tlx?/NPC-H3K4me1-ChIP-Seq/Homer	1,00E-03	92.0	5.62%	1748.2	3.92%
28	TATA-Box(TBP)/Promoter/Homer	1,00E-03	321.0	19.60%	7388.2	16.58%
29	Sox2(HMG)/mES-Sox2-ChIP-Seq/Homer	1,00E-03	184.0	11.23%	3978.2	8.93%
30	Stat3+il23(Stat)/CD4-Stat3-ChIP-Seq/Homer	1,00E-02	143.0	8.73%	3061.7	6.87%
31	c-Jun-CRE(bZIP)/K562-cJun-ChIP-Seq/Homer	1,00E-02	50.0	3.05%	909.7	2.04%
32	CEBP(bZIP)/CEBPb-ChIP-Seq/Homer	1,00E-02	130.0	7.94%	2831.0	6.35%
33	ZNF711(Zf)/SH-SY5Y-ZNF711-ChIP-Seq/Homer	1,00E-02	282.0	17.22%	6691.7	15.02%
34	CRE(bZIP)/Promoter/Homer	1,00E-02	31.0	1.89%	526.7	1.18%

III) PRODUCTION D'OUTILS PERMETTANT D'IDENTIFIER L'INTERACTOME D'OTX2

Le facteur de transcription Otx2 a donc au moins deux modes d'action différents dans la rétine adulte, l'une spécifique de la rétine pigmentée et l'autre de la rétine neurale. Mais la variété de ses actions est bien plus grande, puisque cette protéine à homéodomaine est impliquée dans de nombreux processus développementaux, de l'établissement de l'axe antéro-postérieur à la différenciation finale des cellules granulaires du cervelet.

Ne possédant pourtant que deux isoformes extrêmement semblables, comment est-il possible qu'une si petite protéine de 32 kDa aie une telle diversité fonctionnelle ?

Une part de la diversité d'action de ce facteur de transcription peut s'expliquer par les complexes protéiques qu'il forme dans chaque situation. Des modulateurs ont déjà été montrés comme interagissant directement avec lui pour modifier son action. Il est donc capital d'avoir accès à l'ensemble des partenaires d'Otx2 dans chacun des tissus où il est exprimé.

Pour ce faire, la stratégie retenue a été de produire une souris transgénique exprimant une forme modifiée d'*Otx2* depuis son propre locus. Une séquence codant un motif dédié à la purification d'affinité en tandem (TAP-tag pour Tandem Affinity Purification tag) a été inséré à sa suite, afin de produire une protéine de fusion ayant un tag en position C-terminale. Celui-ci est constitué de deux protéines G, d'un site de clivage TEV et d'une Streptavidin Binding Protein, permettant deux étapes successives de purification. Avec la protéine de fusion Otx2-TAP-tag exprimée à son niveau physiologique sous le contrôle de tous les éléments de régulation du gène *Otx2*, il devient possible d'être suffisamment sensible et spécifique pour identifier les partenaires naturels d'Otx2, c'est-à-dire non issus de modèles cellulaires comme la levure (cribles double-hybride) ou encore de surexpressions ectopiques.

Grâce à cet outil, il devient possible d'identifier les partenaires natifs d'Otx2 dans chacune des deux couches de la rétine, mais également dans chaque tissu dans lequel il est exprimé au cours du développement.

A) MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) CELLULES EMBRYONNAIRES SOUCHES

Culture des cellules embryonnaires souches :

Des cellules embryonnaires souches de souris de lignées Sv/129 ont été cultivées sur fibroblastes de souris traitées à la mitomycine en milieu DMEM (Gibco) additionné d'acides aminés non essentiels, de pyruvate, de glutamine, de LIF et de β-mercaptoéthanol.

Electroporation des cellules embryonnaires souches :

L'électroporation du vecteur de recombinaison homologue s'est faite sur 8 millions de cellules à 240V et 500µF avec une constante de temps de 7ms. Les cellules ont alors été à nouveau ensemencées et sélectionnés pendant 8 jours à 300µg/ml de G418. L'insertion unique au locus Otx2 a été criblée par PCR et par Southern Blot. 200 clones ont été criblés.

Elimination de la cassette de sélection :

L'élimination de la cassette de sélection FRT-*Néomycine*-FRT a été effectuée par électroporation d'un vecteur d'expression transitoire du plasmide pFIP exprimant la flippase, selon le même protocole d'électroporation que précédemment. Les clones ont été testés pour leur non résistance à la néomycine, et confirmés par PCR.

2) PURIFICATION DE COMPLEXES PROTEIQUES

Extraction protéique :

L'extraction protéique se fait en deux étapes pour séparer protéines nucléaires et cytoplasmiques. Une première solution hypotonique Tris 10mM pH 8, contenant 10mM de KCl, 0,5% NP40, 1mM DTT, 0,1mM EDTA et 0,1mM EGTA ainsi que des inhibiteurs de protéases permet d'accéder aux protéines cytoplasmiques après 10 minutes à 4°C. Le mélange est centrifugé 2 minutes à 1000g. Le surnageant est gardé pour contrôle, il ne contient pas de protéines nucléaires. Une solution hypertonique Tris 20mM pH 8, contenant 400mM de NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA et 1 mM DTT permet d'ouvrir les noyaux sous agitation franche durant 20 minutes. Les débris sont alors précipités par centrifugation à 16 000g durant 10 minutes, et le surnageant est collecté, il contient les protéines nucléaires.

Purification protéique :

50 µl de billes IGG (Sigma Rabbit IGG Agarose) TAP-tag sont utilisées pour 1 mg de protéines nucléaires. Elles sont lavées trois fois dans une solution identique à celle de l'étape finale d'extraction protéique puis incubées une nuit à 4°C en présence de l'extrait protéique. Le lendemain, elles sont lavées deux fois : une première fois avec la solution d'extraction protéique et une seconde fois avec du tampon TEV 1x. Les extraits sont ensuite lysées 1h30 à température ambiante sous agitation faible par la protéase TEV (Invitrogen AcTEV protease). Le mélange est ensuite centrifugé 2 minutes à 800g et le surnageant, contenant les complexes protéiques libérés, est transféré sur des billes Streptavidine (Pierce Streptavidin Ultralink Plus) préalablement lavées dans le tampon TEV 1x. Après 2 heures d'incubation à 4°C, l'élution se fait avec une solution à 1mM de Biotine.

3) SOURIS OTX2-TAP-TAG

La production de la lignée de souris Otx2-tap-tag a été effectuée en collaboration avec la Plateforme de Biologie Expérimentale de la Souris de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon. Des blastocytes de souris C57/Black6 ont été injectés avec des cellules Sv/129 recombinées pour produire des chimères. Celles-ci ne transmettant pas l'allèle modifié après plus de 5 portées, une fécondation *in vitro* a permis d'obtenir la première souris hétérozygote portant un allèle modifié. La présence de cet allèle a été vérifiée par PCR et séquençage.

B) PRODUCTION D'UNE SOURIS OTX2-TAP-TAG

Le vecteur de recombinaison homologue a été construit en cinq étapes successives, il est constitué d'un bras de recombinaison long (3,3 kb) se terminant au niveau d'un codon stop muté sur le dernier exon d'Otx2, suivi d'une séquence codant pour le TAP-tag et d'un gène de sélection *néo* flanqué de sites FRT, puis d'un bras de recombinaison court (2,5 kb). Le détail des clonages successifs ayant permis d'aboutir à cette construction est décrit dans la figure 17.

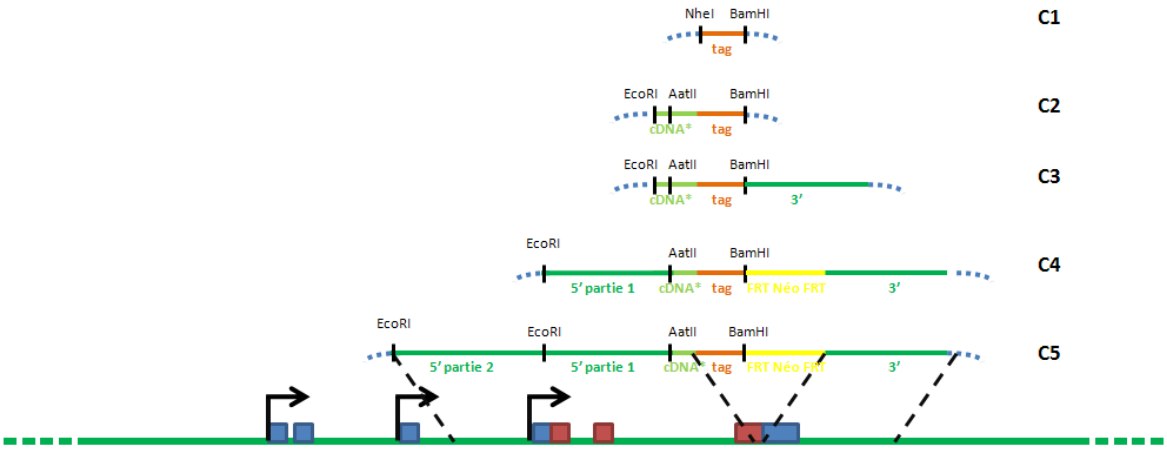


Figure 17 : Vecteur de recombinaison homologue

Différentes étapes de clonage (C1, C2, C3, C4) permettant d'aboutir au vecteur de recombinaison homologue (C5) contenant un bras de recombinaison long (5') et court (3') ainsi qu'une séquence codant pour le TAPtag (orange) et un gène de sélection FRT – PGK Néo – FRT (jaune).
L'homologie du bras de recombinaison avec le locus *Otx2* est représentée par des pointillets. Les flèches indiquent les trois promoteurs connus, un rectangle bleu indique les régions transcrites non codantes et un rectangle rouge indique les régions codantes.

Cette molécule de recombinaison homologue a été introduite par électroporation dans des cellules embryonnaires souches murines de lignée Sv/129, qui ont ensuite été soumises à une sélection en G418. Les recombinaisons homologues ont été discriminées des insertions aléatoires dans le génome par PCR. Une expression transitoire d'un vecteur d'expression de la flippase, couplé à un gène résistance à la puromycine, a permis l'élimination de la cassette de sélection pGK-Néo flanquée de sites FRT. Pour éliminer l'hypothèse d'insertions multiples, une analyse en Southern Blot a été réalisée, avec digestion de l'ADN génomique par l'enzyme BamHI. La construction comportant un site BamHI unique, il a été possible de repérer la forme correspondant à une recombinaison homologue, et de s'assurer qu'il n'y avait aucune autre insertion dans l'ADN génomique de la lignée cellulaire.

En collaboration avec la Plate-forme de Biologie Expérimentale de la Souris de l'école Normale Supérieure de Lyon, les cellules ont été injectées à des blastocystes de souris C57/Black6. Plusieurs chimères ont été produites, mais suite à des difficultés de transmission de l'allèle recombinant, ce dernier a été transmis à la génération suivante par fécondation *in vitro*. Une lignée est actuellement en cours d'établissement et d'amplification. Les souris porteuses de cet allèle à l'état hétérozygote ne présentent pas de phénotype visible affectant leur viabilité, sont fertiles et capables de transmettre l'allèle normalement.

C) PURIFICATIONS PROTEIQUES

Le facteur de transcription Otx2 est exprimé dans les cellules souches embryonnaires de souris à un faible niveau. Au cours de la différenciation cellulaire, son niveau d'expression augmente. Il est donc possible d'induire son expression à un plus fort niveau en induisant une première différenciation, la formation de corps embryoïdes, à partir de cellules souches embryonnaires en culture.

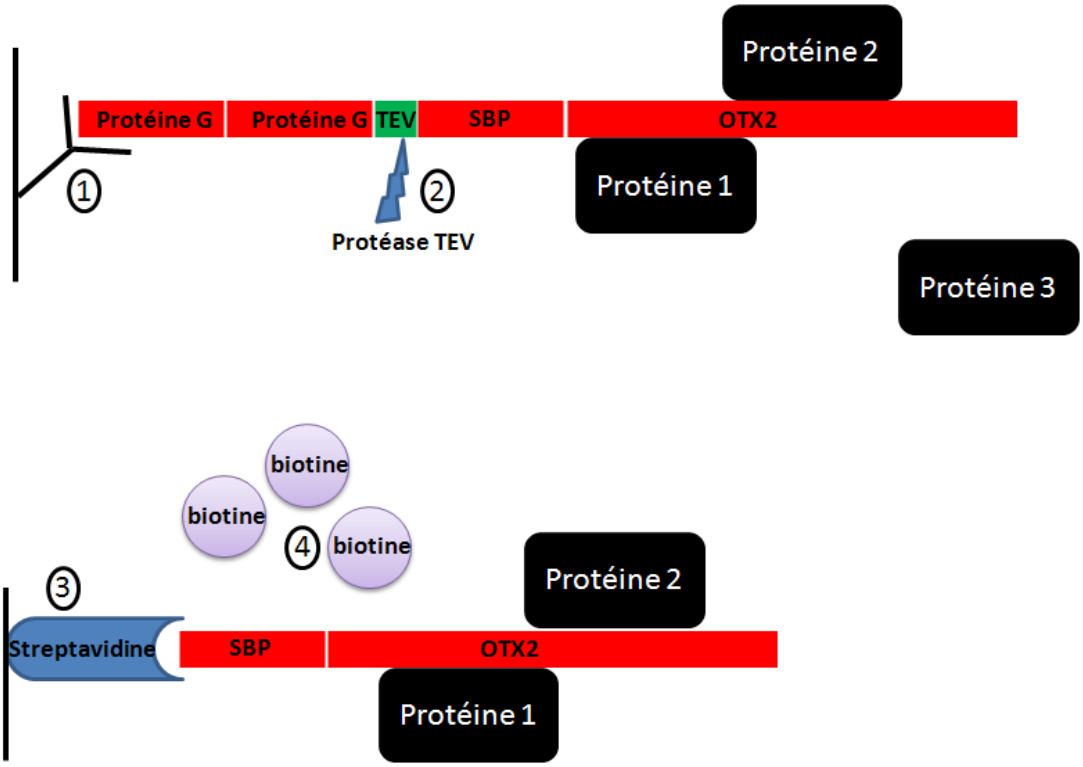


Figure 18 : Purification par Affinité en Tandem

Les différentes étapes de la purification sont représentées ici : en rouge les différents domaines de la protéine de fusion Otx2-TAP-tag, en vert le site de clivage à la protéase TEV,
1) Fixation des complexes protéiques sur résine d'affinité IgG
2) Clivage par la protéase TEV
3) Fixation des complexes sur résine d'affinité streptavidine
4) Elution par ajout de biotine

Ces cellules sont un matériel intéressant pour mettre au point la purification des complexes protéiques. Quatre étapes successives sont requises pour effectuer les deux purifications comme décrites dans la figure 18.

Après purifications successives, la protéine Otx2 est toujours détectée en Western Blot à sa taille clivée attendue. L'analyse par spectrométrie de masse peut donc être réalisée sur ces complexes purifiés afin d'identifier les partenaires protéiques d'Otx2 *in vitro*.

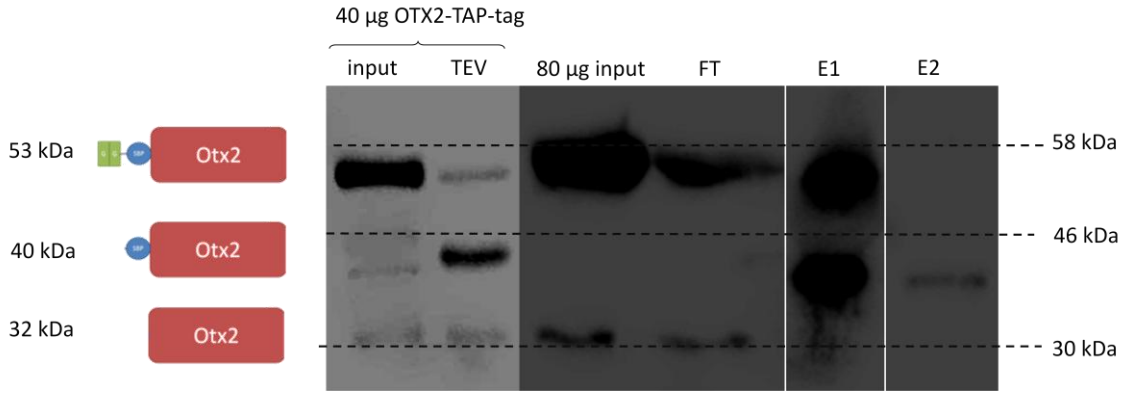


Figure 19 : Purification de la protéine de fusion Otx2-CTAP-tag

Western Blot avec des extraits protéiques natifs et purifiés. Un anticorps primaire de chèvre dirigé contre la protéine Otx2 (R&D) a été utilisé à une dilution de 1/2000ème, l'anticorps secondaire dirigé contre la chèvre couplé à la péroxydase de raifort dilué au 1/10000ème permet une révélation en chimio-luminescence.
La protéine de fusion Otx2-CTAP-tag de 53kDa (représentée à gauche) peut être clivée par la protéase TEV pour former une protéine Otx2-SBP de 40 kDa. Les deux premières pistes contiennent 40 µg d'extrait nucléaire total de cellules embryonnaires souches, avec ou sans clivage à la protéase TEV. Les pistes suivantes correspondent à 80 µg de protéines nucléaires totales avant purification (input), lavage (FT), première purification (E1) et seconde purification (E2).

La lignée de souris ainsi établie et les méthodes de purifications optimisées, les outils sont opérationnels pour démarrer l'identification des partenaires protéiques d'Otx2 *in vivo* par spectrométrie de masse.

DISCUSSION

Grâce à l'approche présentée ici, il a été possible de découvrir des fonctions encore inconnues et pourtant essentielles d'un facteur de transcription à homéodomaine impliqué normalement dans des situations développementales, Otx2, à l'âge adulte. Mais au-delà de la connaissance très spécialisée de ses fonctions rétiniennes, c'est un aspect fondamental du mécanisme de régulation génique et de sélection de répertoire de gènes cibles qui peut être entrevu, à l'origine d'un fonctionnement très différentiel d'une même protéine dans des contextes différents.

I) ROLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION OTX2 DANS LA RETINE DE SOURIS ADULTE

Les facteurs de transcription développementaux, notamment ceux possédant un homéodomaine, sont rarement étudiés dans un contexte plus tardif. Certaines familles géniques sont étudiées au cours de l'embryogenèse et leur fonction chez l'adulte n'est souvent même pas envisagée. Pourtant, nombreux sont les gènes de développement qui sont encore exprimés à l'âge adulte, où le maintien d'un fonctionnement correct de l'organisme peut dépendre de leur activité.

C'est notamment le cas du gène *Otx2*, qui est impliqué dans des processus développementaux bien définis comme la gastrulation, la formation du cerveau, du cervelet, des organes sensoriels et globalement d'un grand nombre de tissus antérieurs, A l'âge adulte, alors que les étapes du développement sont réalisées, son expression est maintenue dans la rétine, et son élimination a des conséquences désastreuses, entraînant la perte des photorécepteurs et donc de la vision, une fonction sensorielle majeure dans le règne animal (Gehring, 2011).

A) FONCTIONS D'OTX2 DANS LA RETINE DE SOURIS ADULTE

Les fonctions du facteur de transcription Otx2 dans la rétine de souris adulte ont été identifiées et étudiées avec précision grâce à la lignée de souris self-knockout. Les principaux phénotypes observés sont une mort lente des photorécepteurs ainsi qu'un changement morphologique des cellules du RPE. L'ordre d'apparition de ces deux événements a été confirmé et caractérisé par ERG, dont les ondes permettent de distinguer

l'activité des différentes couches de la rétine. C'est bien le RPE qui apparaît altéré primairement, avant dégénérescence des photorécepteurs. En combinant cette lignée à des outils de transcriptomique, il a été possible d'observer les gènes variant directement après élimination du gène *Otx2*, sans laisser le temps aux cellules de se réorganiser pour compenser son absence. Les gènes dont l'expression était modifiée se sont avérés être en grande partie exprimés dans le RPE. Otx2 y maintient des fonctions métaboliques et d'homéostasie, décrites plus en détail dans le chapitre II, indispensables à la survie des photorécepteurs adjacents. Dans ces derniers, ainsi que dans les cellules bipolaires, ces deux types cellulaires faisant partie de la rétine neurale, Otx2 est également exprimé.

Pourtant, aucune fonction indispensable à la survie des photorécepteurs n'a été identifiée dans la rétine neurale. L'absence de phénotype associé à une mutation du gène *Otx2* spécifiquement dans ce tissu, avec maintien de son expression dans le RPE, le démontre sans aucune ambigüité. Il est cependant possible qu'Otx2 exerce des fonctions non essentielles à la survie des photorécepteurs, ou qu'il ne soit pas seul à permettre l'accomplissement de ces fonctions. Il y régule notamment certaines voies biologiques en contrôlant ici encore plusieurs acteurs comme les gènes *Grm6, Trpm1* et *Pcp2*, participant à la voie de neurotransmission du récepteur mGluR6. Il a également été identifié comme régulant directement l'expression du gène *Cabp5*, comme cela était suggéré par des études développementales précédemment (Kim et al. 2008).

En dehors de la rétine neurale, dans toutes les structures où il a été étudié, le gène *Otx2* s'est toujours avéré crucial pour le développement et le fonctionnement de ces structures. Pour expliquer son apparent rôle facultatif au niveau de la rétine neurale, une redondance fonctionnelle est envisagée. Dans ce tissu, le mode d'action du facteur de transcription Otx2 serait quasiment identique à celui du facteur de transcrpition Crx, son paralogue. Tous deux possèdent une activité similaire *in vitro* (Boatright et al. 2001; Fong and Fong 1999). Ils sont exprimés dans les mêmes cellules et l'absence d'Otx2 pourrait être compensée par la présence de Crx qui prend le relais au niveau de la rétine neurale, mais est absent du RPE. Nos travaux apportent des éléments qui soutiennent cette hypothèse.

B) SITES DE LIAISON D'OTX2 DANS LE GENOME DE SOURIS ADULTE

Grâce au séquençage de masse, il est possible de connaître la distribution génomique des sites de liaison d'un facteur de transcription. Dans la rétine de souris adulte, Otx2 possède des modes de liaison différents selon les couches cellulaires où il est exprimé. D'une

distribution assez large dans le RPE, à proximité de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire notamment, il va se fixer uniquement dans les régions les plus proximales de gènes impliqués dans la vision au niveau de la couche de la rétine neurale. Il est donc vraisemblable qu'il assure des fonctions différentes dans les deux couches de la rétine. Le recouvrement extrêmement faible des régions chromatiniennes liées par Otx2 dans les deux tissus est remarquable. On aurait pu imaginer qu'Otx2 régule un nombre de gènes génériques, et complète son action en périphérie par quelques gènes spécifiques d'un tissu ou d'un autre. Il semble qu'il n'en soit rien, et que ce facteur de transcription aie des fonctions extrêmement différentes avec très peu d'aspects communs entre les types cellulaires (figure 20).

Dans la rétine neurale, l'absence d'Otx2 n'a entraîné aucun phénotype visible. Son profil de liaison à la chromatine est quasiment identique à celui de son paralogue Crx, précédemment étudié au niveau de la rétine (Corbo et al. 2010; White et al. 2013). Or, le facteur de transcription Otx2 induit l'expression du gène *Crx* au cours du développement de la rétine, lors de la différentiation terminale des photorécepteurs (Nishida et al. 2003). De plus, ces deux facteurs de transcription sont capables de remplacer les mêmes fonctions exercées par le facteur de transcription otd chez la Drosophile (Terrell et al. 2012). Il est donc probable que cette absence de phénotype spécifique à la rétine neurale soit due à une compensation exercée par le facteur de transcription Crx présent dans ce tissu et absent dans l'épithélium pigmenté de la rétine. Pour identifier les rôles potentiels d'Otx2 dans la rétine neurale de souris adulte, il est donc indispensable de l'étudier dans un contexte mutant pour le gène *Crx*. Des outils génétiques doivent à présent être développés dans ce but.

Il est possible que la famille Otx agisse de façon dose-dépendante, comme c'est le cas dans l'établissement de la barrière mésencéphalo-métencéphalique. Il est en effet nécessaire d'éliminer les deux allèles du gène *Otx1* et un allèle du gène *Otx2* pour obtenir des phénotypes marquants (Puelles et al. 2004). Ces deux facteurs de transcriptions activent les mêmes gènes et il est nécessaire de réduire la quantité de membres de la famille Otx exprimés sous un certain seuil pour pouvoir observer des effets sur l'expression de ces cibles, comme par exemple l'expression du gène *Best-1* (Esumi et al. 2009). Un mécanisme similaire pourrait se produire au niveau de la rétine neurale adulte, avec Crx et Otx2 comme représentants de la famille Otx.

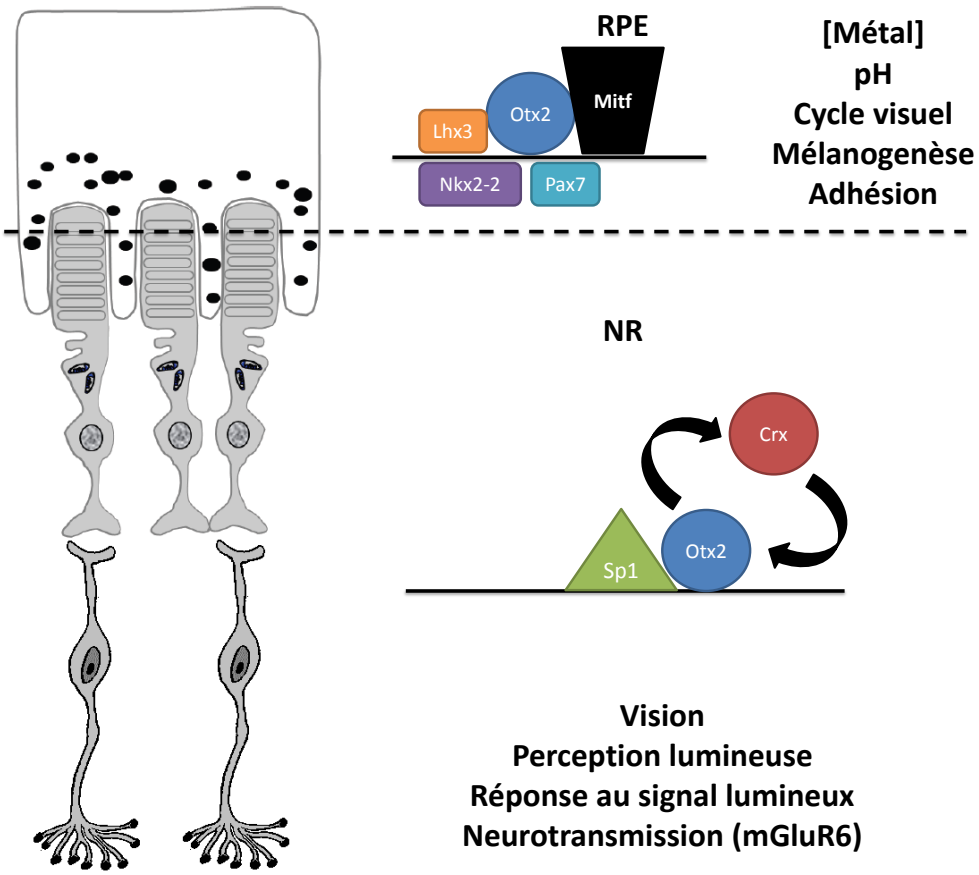


Figure 20 : Modèle des fonctions d'Otx2 dans le RPE et dans la NR

Les partenaires potentiels possédant un site de liaison à proximité des sites Otx2 ainsi que les fonctions associées aux gènes régulés et aux gènes situés à proximité de ces sites de liaison sont indiqués à droite de la figure.

C) LA LIGNEE SELF-KNOCKOUT : UN MODELE DE PATHOLOGIES RETINIENNES

Nous avons réalisé une étude du transcriptome comparative suite à l'élimination du gène *Otx2* dans la rétine de souris adulte. Auparavant, des études du transcriptome de la rétine de souris avaient déjà été tentées, notamment dans un contexte développemental (Omori et al. 2011b), mais elles ne permettaient pas de voir les effets directs, dans les jours qui suivent l'inactivation d'*Otx2*. Lorsque les délais entre inactivation d'un gène et observation sont longs, il est probable que le destin cellulaire ait été totalement changé et que les différences d'expressions observées avec une souris contrôle soient dues à un mélange d'effets directs et d'effets extrêmement indirects, et n'aient plus un sens biologique simple à interpréter. Par contre, l'observation directe dans les jours qui suivent l'inactivation d'un gène, et surtout le suivi temporel des changements d'expression, apportent des informations plus fiables sur ses actions à l'échelle moléculaire.

L'utilisation des lignées de souris self-knockout s'avère être un outil performant pour identifier avec précision les premières variations qui aboutiront à la mort des photorécepteurs, induite par des dysfonctionnements au niveau du RPE. Ce mécanisme s'apparente à celui observé dans des pathologies humaines où une atteinte primaire au niveau du RPE a pour conséquence secondaire la dégénérescence des photorécepteurs. C'est par exemple le cas des rétinites pigmentaires autosomales récessives (*MERKT,LRAT, RPE65*), des dystrophies de la macula (*BEST1*) ou encore des formes de fundus albipunctatus (*RDH5*) (Pacione et al. 2003). Dans le cas de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, atteignant près de 12% de la population entre 65 et 75 ans, c'est également au niveau du RPE qu'une accumulation de dérivés oxydés contribue à la dégénérescence des photorécepteurs (Wright et al. 2010). Le modèle murin ayant permis d'étudier les fonctions tardives d'Otx2 est un outil novateur permettant de déclencher la dégénérescence des photorécepteurs de façon contrôlée, par injection de tamoxifène, mais également rapide, puisque 95% des cellules perdent l'expression d'*Otx2* en 48 heures (Beby et al. 2010). Il devient ainsi possible d'avoir accès aux premières modifications consécutives à cette ablation, et aux événements précoces qui entraîneront la dégénérescence tardive des photorécepteurs. C'est donc un outil permettant de détecter les symptômes précliniques de telles pathologies. De façon tout à fait significative, parmi les gènes dérégulés immédiatement après l'invalidation du gène *Otx2*, dix sont déjà connus pour leur implication dans des pathologies humaines de la rétine. Le modèle nous fournit une douzaine d'autres gènes précocement dérégulés, qui pourraient s'avérer être des candidats pour expliquer des maladies rétiniennes orphelines. En effet, aujourd'hui seule une moitié des maladies de la rétine ont une cause génétique identifiée. Le modèle de self-knockout *Otx2* constitue donc à la fois un outil d'exploration des mécanismes moléculaires conduisant à la dégénérescence des photorécepteurs et un révélateur de gènes potentiellement impliqués dans des dystrophies rétiniennes.

L'étude présentée ici permet de répondre à des questions directes sur le rôle d'Otx2 dans la rétine de souris adulte. Il régule des gènes différents dans la rétine neurale et dans le RPE, en se liant à des régions différentes du génome. Lorsqu'il est éliminé par le système de self-knockout, les photorécepteurs entament une lente dégénérescence semblable à celle de pathologies humaines fréquentes. Grâce à la précision de l'outil utilisé, il est donc possible de s'en servir comme modèle d'étude pour rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques et établir un diagnostic pré-clinique. D'un point de vue plus fondamental, des mécanismes moléculaires essentiels ont pu être mis à jour.

II) BASES MOLECULAIRES DE L'ACTION D'OTX2 DANS LA RETINE DE SOURIS ADULTE

Les phénotypes observés et les pathologies liées à des défauts d'*Otx2* peuvent être compris plus précisément lorsqu'on passe à une échelle moléculaire. La connaissance des gènes dont l'expression est altérée par l'absence de ce facteur de transcription, des sites de liaison précis de ce facteur sur le génome, ainsi que de son interactome permettront non seulement d'identifier les premiers signes moléculaires de ces pathologies et d'identifier les marqueurs précoces d'une dégénérescence des photorécepteurs, mais elles sont également essentielles pour comprendre comment une cellule acquiert, maintient ou modifie son identité.

A) UN MECANISME CELLULE NON-AUTONOME

De façon très intéressante, notre étude révèle un mécanisme non-autonome cellulaire dans lequel le facteur de transcription Otx2 est impliqué, à l'instar des processus développementaux dans lesquels des signaux extérieurs permettent le développement correct de la rétine. L'influence de facteurs extrinsèques sur le bon développement et le bon fonctionnement de ces cellules est telle qu'il est possible de reprogrammer des cellules de l'épithélium ciliaire adulte en neurosphères. Ces dernières sont également sensibles à des signaux extérieurs, les trans-différenciant en cellules exprimant des marqueurs spécifiques de cellules spécialisées comme *Nrl* pour les cônes (Del Debbio et al. 2013). La collaboration entre les cellules et leur environnement est donc essentielle pour permettre à une rétine de se former correctement, et de maintenir un fonctionnement optimal.

Le rôle d'Otx2 est ici de permettre aux cellules du RPE d'effectuer leur activité de « nursing » des photorécepteurs, dont la plus intensive est de recycler correctement les disques des segments externes des photorécepteurs. Otx2 agit sur les cellules du RPE en maintenant leur homéostasie par la régulation du pH, de la concentration en ions, la mélanogenèse et les voies du métabolisme régénératif du rétinol. Pour ce dernier, quatre gènes sont directement régulés : Stimulated by retinoic acid 6 (*Stra6*), Transthyretin (*Ttr*), Retinol dehydrogenase 5 (*Rdh5*) et Retinol dehydrogenase 10 (*Rdh10*). Leur importance dans le cycle visuel a été montrée à plusieurs reprises (Jang et al. 2001; Nakamura et al. 2003). Ils font partie des gènes importants qui permettent au RPE d'entretenir les photorécepteurs, dont le maintien à long terme est impossible lorsqu'ils sont privés de cette aide.

Il est possible qu'Otx2 agisse à un niveau encore supérieur, en coordonnant plusieurs voies métaboliques, en particulier celle du rétinol et celle de la mélanogenèse. Celles-ci pourraient interagir physiquement, comme cela a été montré chez le singe rhésus par la fusion de mélanosomes et de lysosomes dans le RPE (Gouras et al. 2011), mais également fonctionnellement puisque la mélanogenèse y est interrompue en l'absence de contact entre RPE et segments externes de photorécepteurs (Peters et al. 2000). Ainsi Otx2 pourrait coordonner ces deux fonctions et agir sur elles de façon simultanée, servant de méta-régulateur central dans la bonne coordination des fonctions du RPE.

B) CHROMATINE ET INTERACTOME

Le facteur de transcription Otx2 se lie dans des régions génomiques totalement différentes dans la rétine neurale et dans le RPE. Il est difficile de concevoir qu'un même facteur de transcription, à la structure identique, puisse se lier de façons si diverses tout en ayant des gènes cibles très différents d'un tissu à un autre, voire dans deux couches cellulaires différentes d'un même tissu.

Deux mécanismes sont envisageables, impliquant des différences :
- de structure de la chromatine, rendant certains gènes plus accessibles que d'autres,
- de l'interactome d'Otx2, suivant l'hypothèse que des complexes protéiques différents auront des spécificités de liaison de séquences cis-régulatrices différentes.

La première hypothèse a déjà fait l'objet d'études. La structure de la chromatine permet à certains gènes d'être plus accessibles que d'autres (Apostolou and Hochedlinger 2013). Celle-ci est extrêmement particulière dans les photorécepteurs bâtonnets de souris qui représentent 97% des photorécepteurs. L'hétérochromatine y est condensée au centre des noyaux plutôt que de se trouver en périphérie, entourée d'un anneau d'euchromatine contenant la partie active du génome de ces cellules (Kizilyaprak et al. 2010; Solovei et al. 2009). Ce dispositif, retrouvé chez d'autres espèces nocturnes, ajoute une fonction de lentille optique aux photorécepteurs. Cette adaptation leur permet de canaliser le moindre photon en direction de leurs segments externes et donc de disposer d'une extrême sensibilité. Cette structure de l'hétérochromatine dépend de l'action des co-activateurs CBP et p300 (Hennig et al. 2013). L'état de la chromatine rend différentes régions accessibles et va ainsi moduler l'action d'un facteur de transcription selon la cellule dans laquelle il est exprimé. C'est notamment le cas dans le développement de la rétine (Cayouette et al. 2013).

La structure de la chromatine des différents compartiments de la rétine pourrait sans doute être étudiée avec précision grâce aux nouvelles technologies impliquant le séquençage de masse telles que la Hi-C, permettant de capturer une image de la conformation tridimensionnelle de la chromatine (Lieberman-Aiden et al. 2009; van Berkum et al. 2010). La proximité des sites de liaison de deux facteurs de transcription différents pourrait s'expliquer par l'accessibilité extrêmement restreinte de la chromatine, ne laissant l'accès qu'aux gènes essentiels pour leur fonctionnement.

Pour explorer la seconde hypothèse, des outils puissants ont été développés et permettront non seulement d'étudier l'interactome réel, capturé *in vivo*, dans la rétine de souris adulte, mais ils permettront également de l'identifier dans tous les tissus et à tous les stades de développement de la souris. Cette information nouvelle pourra être renforcée par des études transcriptomiques utilisant le self-knockout d'*Otx2* dans différents tissus au cours du développement. La dynamique fonctionnelle d'un facteur de transcription pourra alors être expliquée à l'échelle moléculaire.

A partir des sites de liaison du facteur de transcription Otx2 sur le génome, il est déjà possible d'envisager certaines associations qui ont du sens. En effet, Otx2 se lie à proximité de sites de liaison riches en GC de facteurs de la famille Sp dans la rétine neurale alors qu'il se lie près de sites de liaison d'autres facteurs de transcription dans le RPE. La famille Sp est connue pour jouer un rôle dans le contrôle de gènes spécifiques des photorécepteurs comme l'opsine-R et la phosphodiestérase bêta, notamment par l'association de la protéine Sp4 avec le facteur de transcription Crx (Lerner et al. 2005). Une interaction spécifique au niveau du promoteur du gène *Nrl* a également été montrée, impliquant Crx, Otx2 et RORβ (Montana et al. 2011). De plus, le facteur de transcription Crx pourrait interagir avec le facteur Nr2e3 pour activer certains promoteurs dans les photorécepteurs, comme celui du gène *Rho* (Peng and Chen 2013). Cette interaction pourrait également être valable pour le facteur de transcription Otx2. Toutes ces interactions pourront être confirmées par ces nouveaux outils.

C'est donc un même facteur de transcription qui peut avoir des actions autonomes et non-autonomes sur un type cellulaire précis. Certaines fonctions sont plus robustes que d'autres, pouvant être compensées ou non par d'autres facteurs de transcription assurant des fonctions similaires. Pour pouvoir agir différentiellement dans plusieurs tissus, ces facteurs de transcription peuvent profiter d'accessibilités géniques différentes en fonction de l'état de la chromatine, et de contextes cellulaires différents leur permettant d'interagir avec des partenaires préférentiels dans chacun de ces tissus.

III) VERS UNE VISION INTEGRATIVE DE LA REGULATION GENIQUE

L'utilisation du ChIP-seq dans les expériences rapportées ici et dans la littérature pose également des questions nouvelles inhérentes à cette technique. En effet, les facteurs de transcription se lient en de nombreux endroits du génome, et dans le voisinage de nombreux gènes. Sont-il réellement capables de réguler l'expression de plusieurs milliers de gènes ? Il est raisonnable d'en douter. Si l'on s'en tient à l'exemple du gène *Otx2*, le nombre d'OBRs dans le RPE excède largement le nombre de gènes dont l'expression varie dans la rétine après self-knockout. Il faut donc identifier ce qui rendra un site de liaison pertinent. La seule information sur la position de ces sites de liaison au génome est également intéressante au regard de la plasticité cellulaire. Il faut enfin confronter la connaissance exhaustive des sites de liaison à l'ADN aux données transcriptomiques et interactomiques afin d'établir un modèle intégré permettant d'expliquer la dynamique d'action d'un facteur de transcription.

A) PERTINENCE DES GENES A PROXIMITE DES SITES DE LIAISON D'OTX2

Il est difficile de déduire quels gènes sont réellement régulés par un facteur de transcription à partir d'un ensemble de sites de liaison. La stratégie la plus courante est de rechercher les gènes les plus proches d'un site de liaison, et de les recenser. Mais à quelle distance d'un site d'initiation de la transcription doit-il se trouver pour avoir un rôle réel ?

Certains enhancers peuvent se trouver à de très longues distances ou même sur des chromosomes différents. La combinaison des connaissances des cibles réelles et directes d'Otx2 vues par étude transcriptomique fine, combinée aux sites de liaison de ce facteur de transcription, n'a pas encore permis d'identifier des éléments décisifs permettant de distinguer les sites fonctionnels.

Pour découvrir des critères rendant un site fonctionnel, il est nécessaire de connaître un sous-ensemble de sites fiables et réellement fonctionnels, afin de les comparer aux sites qui ne le sont pas. Une première stratégie a été tentée avec les sites de liaison du facteur de transcription Crx. Des milliers de séquences ont été clonées et leur potentiel transactivateur a été testé *ex vivo* dans des explants de rétines de souris, en amont d'un promoteur minimal *Rho* suivi contrôlant l'expression d'un gène rapporteur *DsRed*. En testant 1300 séquences liées par Crx et 3000 séquences contrôles, le principal critère semblant indiquer qu'une

région liée par Crx est active s'est avéré être le contenu en GC de celle-ci (White et al. 2013).

Nous avons choisi une approche différente, forts de la connaissance de cibles directes du facteur de transcription Otx2 dans le RPE. En classant les sites de liaison d'Otx2 selon des critères tels que leur conservation, leur contenu en GC, ou encore la méthylation des histones, nous avons mesuré le rang moyen des sites situés à proximité de gènes effectivement régulés par Otx2 et nous l'avons comparé au rang moyen de la totalité des sites. Le contenu en GC n'est pas apparu comme un critère intéressant dans ce contexte, alors que la conservation évolutive a permis d'améliorer le rang moyen de ces séquences confirmées dans le classement. Ce critère n'apparaît cependant pas de façon très marquante, mais est tout de même pertinent puisque les régions fonctionnelles de l'ADN sont davantage sujettes à subir des pressions de sélection.

Il a été montré que les membres de la famille Sp se liaient à Crx pour agir en synergie et activer la transcription de ses gènes cibles (Lerner et al. 2005). Ces facteurs possèdent des sites de liaison riches en GC. Ceci expliquerait donc pourquoi des séquences riches en GC et liées par Crx semblent être davantage activatrices au niveau de la rétine neurale. Otx2 se lie également à des sites riches en GC au niveau de la rétine neurale, alors que ce n'est pas le cas dans le RPE. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi nous ne retrouvons pas le contenu en GC comme critère important pour la fonctionnalité d'une région liée par Otx2. Cependant, nos résultats ne permettent pas de mettre en avant des critères suffisamment déterminants quant à la pertinence des sites de liaison à la chromatine d'un facteur de transcription.

Un autre moyen de déterminer quels sont les sites de liaison les plus pertinents d'un facteur de transcription à la chromatine serait de reconnaître ceux qui se lient à des enhancers ou à des foyers de transcription. Des critères additionnels tels que la position des marques ou des sites de liaison de protéines spécifiques de ces régions pourront servir à étendre notre étude. Le classement moyen des sites de liaison à proximité de gènes effectivement régulés par le facteur de transcription Otx2 permettra d'indiquer si ces nouvelles marques sont pertinentes pour sélectionner les sites de liaison d'un facteur de transcription à la chromatine.

Une étude plus rigoureuse consisterait à muter individuellement chaque région liée par Otx2 à proximité d'un même gène, et d'étudier sa fonction in vivo. L'investissement requis en transgenèse murine ne permet pas encore de réaliser de telles études, mais il est possible de les envisager grâce aux progrès récents dans ce domaine. Le système CRISPR/Cas

développé récemment (Yang et al. 2013) permet notamment de produire très rapidement de nombreux mutants, et pourrait être employé à cet effet. Il serait possible, pour une sélection de gènes pertinents, d'étudier précisément les différents enhancers situés en amont pour comprendre leur fonctionnement et rechercher des critères associés à ceux qui ont une activité transactivatrice établie. Ceci permettrait, à partir de nombreux sites de liaison à l'ADN, d'identifier rapidement ceux qui sont les plus pertinents, et ainsi d'effectuer une curation selon ces critères des données de ChIP-seq sur facteurs de transcription.

B) PLASTICITE DES CELLULES DE LA RETINE

La potentialité à régénérer la rétine est variable selon les espèces (Barbosa-Sabanero et al. 2012). Chez l'homme, il est possible de produire des cellules de rétine à partir de cellules souches pluripotentes en culture (Boucherie et al. 2013), et chez le rat des cellules de la marge ciliaire peuvent être différenciées en cellules exprimant les marqueurs spécifiques des photorécepteurs (Akagi et al. 2004). Cette plasticité n'a cependant rien de comparable avec celle observée chez le poisson-zèbre, qui est capable de régénérer des cônes à partir de précurseurs lorsqu'un sous-type très spécifique de cônes, sensible aux UV, est atteint (Fraser et al. 2013); ou même celle décrite chez le poisson rouge (Marotte 1980).

A partir de cellules du RPE, suite à une lésion de la rétine neurale, le triton est capable de régénérer une rétine neurale complète (Eguchi et al. 2011; Sanchez Alvarado and Tsonis 2006; Tsonis et al. 2000). Chez le Xénope, cette régénération est également possible à partir de cellules du RPE exprimant le gène Pax6 suite à des signaux FGF (Kuriyama et al. 2009; Yoshii et al. 2007). Des cellules de Müller sont capables de se transdifférencier pour régénérer une rétine neurale chez le poisson, mais pas chez le mammifère (Joly et al. 2011). D'un point de vue plus mécanistique, il a été montré que certains déterminants répriment la plasticité cellulaire. C'est le cas de la protéine Blimp1, qui empêche le changement d'identité des photorécepteurs en cellules bipolaires (Brzezinski et al. 2013)

Une hypothèse permettant d'expliquer la différence de plasticité entre les espèces pourrait être liée au profil de liaison des facteurs de transcription impliqués dans l'identité des différents types cellulaires sur le génome.

Chez les organismes à forte plasticité, un facteur de transcription se lie aux mêmes régions génomiques dans des types cellulaires différents. Un modulateur possédant un site de liaison à proximité, pourra discriminer entre deux identités cellulaire selon qu'il y est exprimé

ou non, en modifiant l'activité de ce facteur de transcription. Ainsi, dans un organisme comme le triton, un signal FGF2 induira l'expression de Pax6 dans le RPE et permettra alors aux cellules du RPE de changer d'identité.

Chez un organisme à plasticité restreinte, les sites de liaison diffèrent davantage entre types cellulaires distincts. Dans ce cas, l'expression d'un modulateur de l'activité de ce facteur de transcription ne suffira pas à elle seule à induire un changement d'identité (figure 21).

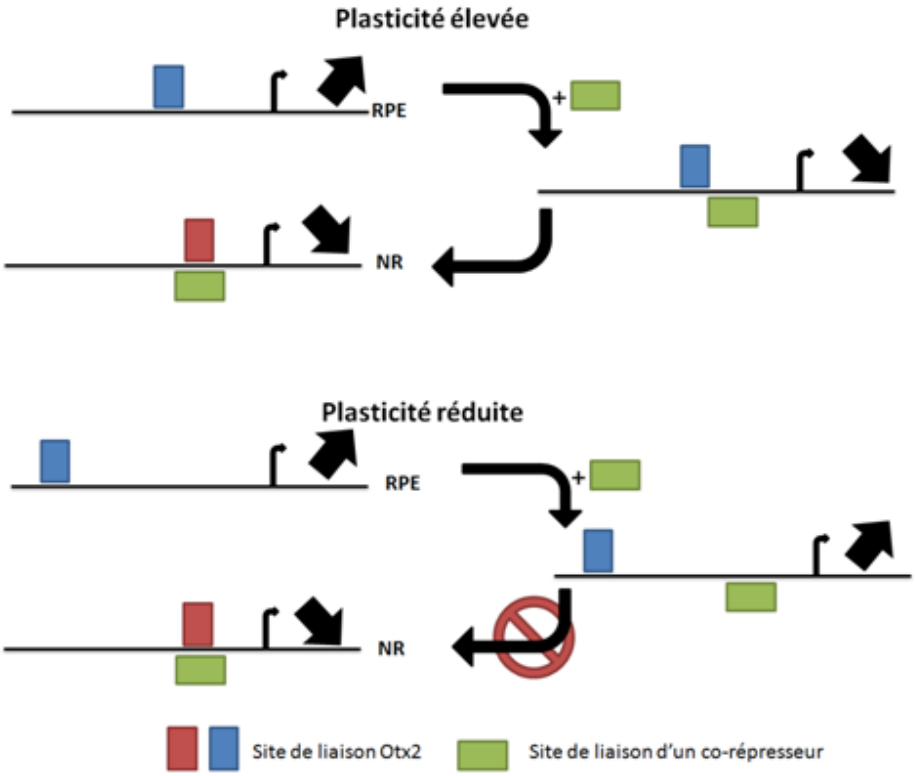


Figure 21 : Modèle d'évolution de la plasticité cellulaire

Deux sites de liaison (bleu et rouge) peuvent être plus ou moins distants l'un de l'autre. La présence d'un site de liaison d'un co-répresseur (vert) à proximité permettra de modifier l'action du facteur de transcription sur un gène cible. Chez un organisme à plasticité élevée, l'expression de ce partenaire permettra d'induire une modification de l'expression du gène cible quel que soit le site de liaison à la chromatine, ces sites étant proches. Chez un organisme à plasticité réduite, le co-répresseur ne pourra pas moduler son action car il ne se fixera pas à proximité de ce dernier.

Un point extrêmement intéressant soulevé par l'étude des sites de liaison d'Otx2 dans le RPE et dans la rétine neurale est le fait qu'en plus d'une occupation génomique extrêmement différente dans les deux tissus, Otx2 se lie à des endroits différents même lorsqu'il se trouve à proximité du même gène. C'est par exemple le cas pour le gène Elmo2, impliqué dans la polarité cellulaire (Ho et al. 2009). Cette polarisation est d'ailleurs

importante pour acquérir une structure rétinale fonctionnelle, et l'expression de ce gène a du sens dans tous les compartiments de la rétine adulte (Salbreux et al. 2012).

Il est possible que dans des organismes à plus forte plasticité, une liaison d'Otx2 sur le génome plus homogène d'un tissu à un autre empêche la possibilité à ce type de déterminants d'avoir une action tissu spécifique et maintienne un statut plus flexible de chaque type cellulaire.

Il serait donc intéressant de vérifier, par la même approche d'occupation génomique comparative, si le facteur de transcription Otx2 se lie de façon tout aussi diverse dans la neurorétine et l'épithélium pigmenté rétinien d'organismes aux capacités régénératrices plus élevées. Une plus grande ressemblance du répertoire des sites de liaison indiquerait des fonctions plus redondantes et communes pour Otx2 dans des tissus certes toujours distincts, mais davantage aptes à changer d'identité pour régénérer type cellulaire différent de la rétine.

De même, dans les stades développementaux plus précoces de la souris, la plasticité cellulaire est plus importante (Fuhrmann et al. 2013). Là encore, une étude des sites de liaison au génome des principaux déterminants de cette identité cellulaire permettrait de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses, notamment en comparant ces sites de liaison à ceux d'une rétine mature dont les cellules sont incapables de se transdifférencier de la sorte.

C) PERSPECTIVES DE CHRONOMIQUE

La dimension temporelle est extrêmement importante en biologie du développement. Chez la drosophile, cet aspect a été étudié au niveau des neuroblastes, qui expriment une séquence de quatre gènes (*hunchback* → *Krüppel* → *pdm1* → *castor*) dans un ordre et une durée bien précises, grâce à un contrôle externe sur la première étape et interne sur les deux suivantes (Grosskortenhaus et al. 2005). Ce contrôle temporel permet de générer la diversité neuronale de façon hiérarchisée au cours du développement. Chez la souris, l'ordre d'apparition des types cellulaires de la rétine suggérait la possibilité d'un mécanisme semblable. Un gène homologue de *hunchback*, *Ikaros,* est présent dans les précurseurs de la rétine. Sa mutation induit un changement de proportion des neurones de la rétine, qui compte moins de neurones précocement nés (Elliott et al. 2008).

Le mécanisme de diversification neuronale arrimé à un code moléculaire qui évolue avec le temps semble donc aussi présent chez la souris. L'extension de cette étude à d'autres régulateurs de cette séquence temporelle pose des difficultés : chez la souris, des duplications géniques ont conduit à une grande diversité d'homologues des gènes *Krüppel* et *pdm1*, mais le dernier d'entre eux, *castor*, ne possède qu'un seul homologue : *CasZ1*. L'analyse non encore publiée du transcriptome contrôlé par le facteur de transcription CasZ1 par l'équipe de Michel Cayouette indique également une très forte redondance avec les cibles d'Otx2 et de Crx dans la rétine neurale. CasZ1 fait partie des gènes potentiellement régulés par Otx2 et Crx car il possède plus de 9 sites de liaison de ces deux facteurs de transcription à proximité de son promoteur. Ce dernier semble donc être un candidat extrêmement intéressant pour mieux comprendre le contrôle temporel de la formation des différents types cellulaires de la rétine.

Il est en effet possible d'imaginer que le timing et la multiplicité des rôles d'un facteur de transcription comme Otx2 fonctionne comme une horloge interne. Dans un premier temps développemental, Otx2 active un ensemble de gènes cibles permettant la réalisation d'une première fonction, mais active également la transcription d'un de ses futurs partenaires, par exemple Crx. Lorsque la protéine est produite, celle-ci va modifier l'action d'Otx2, par interaction directe ou indirecte, voire par un effet dose s'il s'agit d'un paralogue aux propriétés semblables. Ainsi une seconde vague de gènes cibles sera produite, dont le partenaire suivant qui pourra alors à nouveau moduler l'action d'Otx2 (figure 22).

Ceci permet de contrôler, par le temps nécessaire à exprimer chacun des gènes, la durée de chaque fonction que va exercer un facteur de transcription. Mais la dynamique du répertoire des cibles de ce facteur de transcription est également contrôlée de cette façon, puisqu'à chaque étape, un ou plusieurs modulateurs et partenaires vont permettre de modifier son action.

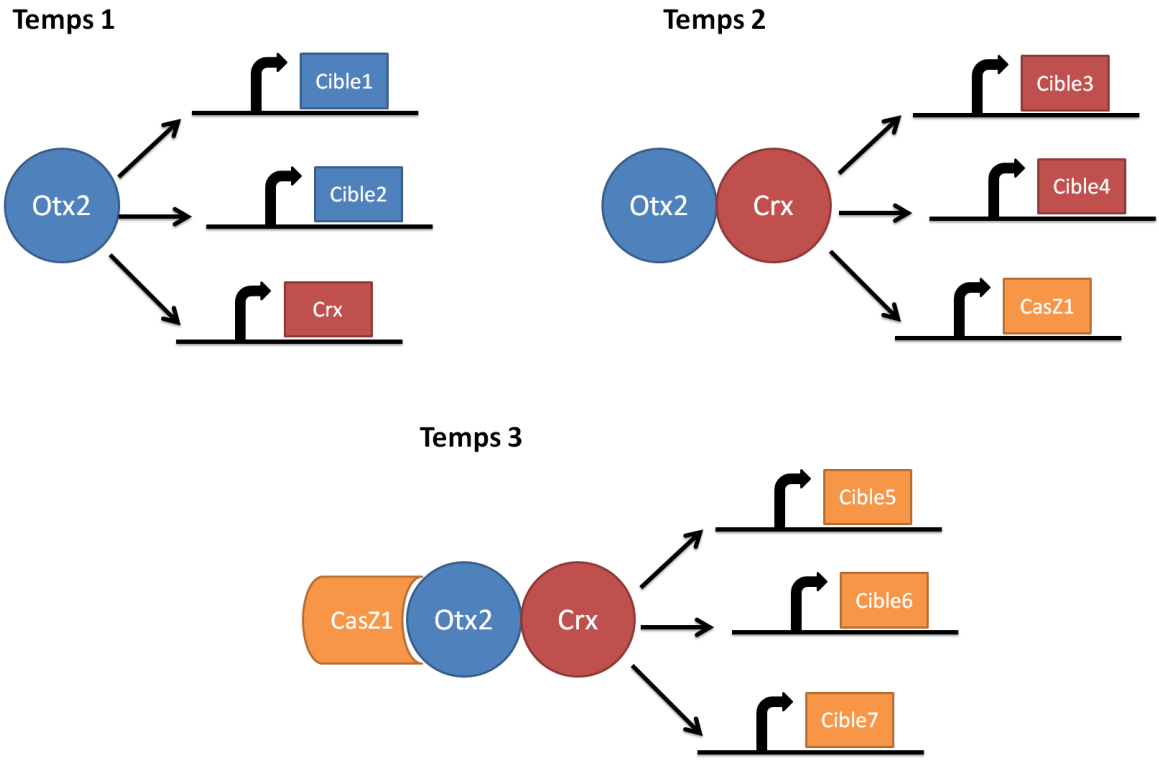


Figure 22 : Modèle des fonctions successives d'Otx2

Dans un premier temps, Otx2 active un ensemble de gènes cibles permettant de réaliser une première fonction, tout en déclenchant l'expression d'un de ses futurs partenaires. Ce dernier va alors modifier l'action d'Otx2 à un temps développemental plus tardif, permettant ainsi de modifier son répertoire de gènes cibles. A un troisième temps développemental, un nouveau partenaire tel que CasZ1 pourra alors permettre la réalisation d'une nouvelle fonction. L'observation des sites de liaison à la chromatine de ces trois facteurs de transcription au temps 3 indiquera alors les mêmes occupations génomiques.

Pour explorer une telle hypothèse, il est nécessaire de répertorier les sites d'occupation du facteur de transcription Otx2 à différents temps développementaux et dans différents tissus, pour confirmer une liaison génomique différente tout au long du développement, comme le suggèrent nos résultats sur la rétine de souris adulte.

La souris self-knockout est un outil extrêmement fin et précis puisqu'il permet d'observer l'effet de l'élimination du gène *Otx2* dans les heures et jours suivants. Grâce à cet outil, nous serons en mesure d'identifier les cibles exactes et précises de ce facteur de transcription tout au long du développement et dans divers tissus. Le ChIP-seq permettra alors de confirmer les cibles directes et d'étudier plus qualitativement le mode d'action de ce facteur de transcription. La souris exprimant la protéine de fusion Otx2-TAP-tag permettra ensuite d'accéder à l'interactome complet de ce facteur de transcription. La combinaison de cet ensemble de données fournira alors d'avoir une vision intégrée et globale de son fonctionnement tout au long du développement et jusqu'à l'âge adulte.

CONCLUSION

La protéine Otx2 fait partie d'une famille de facteurs de transcription à homéodomaine impliqués dans le développement d'organes aussi diversifiés que le cerveau, le cervelet, l'hypophyse, et la rétine. Son expression est maintenue dans la rétine de souris adulte, où aucune fonction ne lui était connue avant le développement d'outils comme le self-knockout inductible.

Le travail présenté ici montre que le gène *Otx2* joue un rôle cellulaire autonome au sein de l'épithélium pigmenté rétinien, permettant d'en maintenir l'homéostasie et les voies métaboliques, et un rôle non cellulaire autonome, son activité dans le RPE étant indispensable à la survie des photorécepteurs adjacents. Grâce aux technologies modernes se plaçant à l'échelle du génome entier, les puces à ADN permettant d'identifier le transcriptome et le ChIP-seq permettant d'identifier les sites de liaison à l'ADN, il a été possible de détecter un grand nombre de cibles génétiques précises et directes de ce facteur de transcription dans cet épithélium. Dans la rétine neurale, comprenant les photorécepteurs et les cellules bipolaires où ce facteur de transcription est également présent, une redondance fonctionnelle avec un paralogue, Crx, a été mise au jour. Cette dernière pose la question de l'interchangeabilité de plusieurs facteurs de transcription issus d'une même famille génique, et de leur aptitude à agir de façon synergique.

La grande diversité d'action d'un facteur de transcription au cours du développement jusqu'à l'âge adulte, y compris dans des cellules appartenant à un même organe et se trouvant dans des couches physiquement proches, doit s'expliquer par la sélection de répertoires de gènes cibles différents, elle-même dépendant de l'accessibilité de la chromatine et des facteurs présents dans chaque type cellulaire. Les outils disponibles aujourd'hui permettent d'étudier ces deux aspects. Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse intègre une contribution majeure pour le second de ces deux aspects, puisque des outils novateurs permettant d'identifier l'interactome de la protéine Otx2 *in vivo* ont été développés.

Les perspectives offertes par ce travail de thèse sont la possibilité de mener une étude intégrée de la dynamique fonctionnelle d'un acteur majeur du développment. Les outils et concepts mis en place permettront, à chaque stade de développement et dans chaque tissu où le facteur de transcription Otx2 joue un rôle, d'identifier les régions génomiques où il se lie, les gènes qu'il régule, et les partenaires protéiques qui lui permettent de les réguler. La détection et la correction des dysfonctionnements de ce système, dans les situations de

pathologies associées, des atteintes oculaires au médulloblastome, sont des pistes prometteuses.

Enfin, la connaissance des partenaires protéiques nécessaires à ce facteur de transcription pour déclencher l'expression de gènes requis pour un type cellulaire ou un rôle précis, ouvre la perspective d'une ingénierie fine et novatrice. En induisant l'expression de certains partenaires protéiques, et en en inhibant d'autres, il devient en effet possible de changer le répertoire génétique exprimé et donc l'identité même d'une cellule. Une telle transdifférenciation cellulaire contrôlée et maîtrisée serait non seulement une avancée majeure pour permettre la régénération de tissus endommagés, mais également un outil moléculaire innovant pour des études plus fondamentales.

BIBLIOGRAPHIE

Acampora, D., Annino, A., Tuorto, F., Puelles, E., Lucchesi, W., Papalia, A., and Simeone, A. (2005). "Otx genes in the evolution of the vertebrate brain." *Brain Res Bull*, 66(4-6), 410-20.

Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Barone, P., Reichert, H., Finkelstein, R., and Simeone, A. (1998a). "Murine Otx1 and Drosophila otd genes share conserved genetic functions required in invertebrate and vertebrate brain development." *Development*, 125(9), 1691-702.

Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Briata, P., Corte, G., and Simeone, A. (1998b). "Visceral endoderm-restricted translation of Otx1 mediates recovery of Otx2 requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation." *Development*, 125(24), 5091-104.

Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., and Simeone, A. (1997). "Genetic control of brain morphogenesis through Otx gene dosage requirement." *Development*, 124(18), 3639-50.

Acampora, D., Gulisano, M., Broccoli, V., and Simeone, A. (2001). "Otx genes in brain morphogenesis." *Prog Neurobiol*, 64(1), 69-95.

Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., and Brulet, P. (1995). "Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2-/- mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation." *Development*, 121(10), 3279-90.

Adamson, D. C., Shi, Q., Wortham, M., Northcott, P. A., Di, C., Duncan, C. G., Li, J., McLendon, R. E., Bigner, D. D., Taylor, M. D., and Yan, H. (2010). "OTX2 is critical for the maintenance and progression of Shh-independent medulloblastomas." *Cancer Res*, 70(1), 181-91.

Agathocleous, M., and Harris, W. A. (2009). "From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina." *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 45-69.

Agoston, Z., and Schulte, D. (2009). "Meis2 competes with the Groucho co-repressor Tle4 for binding to Otx2 and specifies tectal fate without induction of a secondary midbrain-hindbrain boundary organizer." *Development*, 136(19), 3311-22.

Akagi, T., Akita, J., Haruta, M., Suzuki, T., Honda, Y., Inoue, T., Yoshiura, S., Kageyama, R., Yatsu, T., Yamada, M., and Takahashi, M. (2005). "Iris-derived cells from adult rodents and primates adopt photoreceptor-specific phenotypes." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(9), 3411-9.

Akagi, T., Mandai, M., Ooto, S., Hirami, Y., Osakada, F., Kageyama, R., Yoshimura, N., and Takahashi, M. (2004). "Otx2 homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(12), 4570-5.

Apostolou, E., and Hochedlinger, K. (2013). "Chromatin dynamics during cellular reprogramming." *Nature*, 502(7472), 462-71.

Baas, D., Bumsted, K. M., Martinez, J. A., Vaccarino, F. M., Wikler, K. C., and Barnstable, C. J. (2000). "The subcellular localization of Otx2 is cell-type specific and developmentally regulated in the mouse retina." *Brain Res Mol Brain Res*, 78(1-2), 26-37.

Barbosa-Sabanero, K., Hoffmann, A., Judge, C., Lightcap, N., Tsonis, P. A., and Del Rio-Tsonis, K. (2012). "Lens and retina regeneration: new perspectives from model organisms." *Biochem J*, 447(3), 321-34.

Barski, A., and Zhao, K. (2009). "Genomic location analysis by ChIP-Seq." *J Cell Biochem*, 107(1), 11-8.

Bassett, E. A., Pontoriero, G. F., Feng, W., Marquardt, T., Fini, M. E., Williams, T., and West-Mays, J. A. (2007). "Conditional deletion of activating protein 2alpha (AP-2alpha) in

the developing retina demonstrates non-cell-autonomous roles for AP-2alpha in optic cup development." *Mol Cell Biol*, 27(21), 7497-510.
Beby, F., Housset, M., Fossat, N., Le Greneur, C., Flamant, F., Godement, P., and Lamonerie, T. (2010). "Otx2 gene deletion in adult mouse retina induces rapid RPE dystrophy and slow photoreceptor degeneration." *PLoS One*, 5(7), e11673.
Bernardos, R. L., Barthel, L. K., Meyers, J. R., and Raymond, P. A. (2007). "Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells." *J Neurosci*, 27(26), 7028-40.
Bharti, K., Liu, W., Csermely, T., Bertuzzi, S., and Arnheiter, H. (2008). "Alternative promoter use in eye development: the complex role and regulation of the transcription factor MITF." *Development*, 135(6), 1169-78.
Boatright, J. H., Borst, D. E., Stodulkova, E., and Nickerson, J. M. (2001). "Endogenous CRX expression and IRBP promoter activity in retinoblastoma cells." *Brain Res*, 916(1-2), 136-42.
Boncinelli, E., and Morgan, R. (2001). "Downstream of Otx2, or how to get a head." *Trends Genet*, 17(11), 633-6.
Boon, K., Eberhart, C. G., and Riggins, G. J. (2005). "Genomic amplification of orthodenticle homologue 2 in medulloblastomas." *Cancer Res*, 65(3), 703-7.
Boucherie, C., Mukherjee, S., Henckaerts, E., Thrasher, A. J., Sowden, J. C., and Ali, R. R. (2013). "Brief report: self-organizing neuroepithelium from human pluripotent stem cells facilitates derivation of photoreceptors." *Stem Cells*, 31(2), 408-14.
Boulton, M., and Dayhaw-Barker, P. (2001). "The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes." *Eye (Lond)*, 15(Pt 3), 384-9.
Broccoli, V., Boncinelli, E., and Wurst, W. (1999). "The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmic organizer." *Nature*, 401(6749), 164-8.
Brooks, M. J., Rajasimha, H. K., Roger, J. E., and Swaroop, A. (2011). "Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of wild-type and Nrl(-/-) retinal transcriptomes." *Mol Vis*, 17, 3034-54.
Brown, N. L., Patel, S., Brzezinski, J., and Glaser, T. (2001). "Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation." *Development*, 128(13), 2497-508.
Brzezinski, J. A. t., Lamba, D. A., and Reh, T. A. (2010). "Blimp1 controls photoreceptor versus bipolar cell fate choice during retinal development." *Development*, 137(4), 619-29.
Brzezinski, J. A. t., Uoon Park, K., and Reh, T. A. (2013). "Blimp1 (Prdm1) prevents re-specification of photoreceptors into retinal bipolar cells by restricting competence." *Dev Biol*.
Bunt, J., Hasselt, N. E., Zwijnenburg, D. A., Hamdi, M., Koster, J., Versteeg, R., and Kool, M. (2012). "OTX2 directly activates cell cycle genes and inhibits differentiation in medulloblastoma cells." *Int J Cancer*, 131(2), E21-32.
Burckstummer, T., Bennett, K. L., Preradovic, A., Schutze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G., and Bauch, A. (2006). "An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells." *Nat Methods*, 3(12), 1013-9.
Burmeister, M., Novak, J., Liang, M. Y., Basu, S., Ploder, L., Hawes, N. L., Vidgen, D., Hoover, F., Goldman, D., Kalnins, V. I., Roderick, T. H., Taylor, B. A., Hankin, M. H., and McInnes, R. R. (1996). "Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation." *Nat Genet*, 12(4), 376-84.
Cai, Z., Feng, G. S., and Zhang, X. (2010). "Temporal requirement of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in establishing the neuronal fate in early retinal development." *J Neurosci*, 30(11), 4110-9.
Canto-Soler, M. V., and Adler, R. (2006). "Optic cup and lens development requires Pax6 expression in the early optic vesicle during a narrow time window." *Dev Biol*, 294(1), 119-32.

Carulli, J. P., Artinger, M., Swain, P. M., Root, C. D., Chee, L., Tulig, C., Guerin, J., Osborne, M., Stein, G., Lian, J., and Lomedico, P. T. (1998). "High throughput analysis of differential gene expression." *J Cell Biochem Suppl*, 30-31, 286-96.

Cayouette, M., Mattar, P., and Harris, W. A. (2013). "Progenitor competence: genes switching places." *Cell*, 152(1-2), 13-4.

Chassaing, N., Sorrentino, S., Davis, E. E., Martin-Coignard, D., Iacovelli, A., Paznekas, W., Webb, B. D., Faye-Petersen, O., Encha-Razavi, F., Lequeux, L., Vigouroux, A., Yesilyurt, A., Boyadjiev, S. A., Kayserili, H., Loget, P., Carles, D., Sergi, C., Puvabanditsin, S., Chen, C. P., Etchevers, H. C., Katsanis, N., Mercer, C. L., Calvas, P., and Jabs, E. W. (2012). "OTX2 mutations contribute to the otocephaly-dysgnathia complex." *J Med Genet*, 49(6), 373-9.

Chatelain, G., Fossat, N., Brun, G., and Lamonerie, T. (2006). "Molecular dissection reveals decreased activity and not dominant negative effect in human OTX2 mutants." *J Mol Med (Berl)*, 84(7), 604-15.

Chau, K. Y., Chen, S., Zack, D. J., and Ono, S. J. (2000). "Functional domains of the cone-rod homeobox (CRX) transcription factor." *J Biol Chem*, 275(47), 37264-70.

Chen, H., Liu, B., Lukas, T. J., and Neufeld, A. H. (2008). "The aged retinal pigment epithelium/choroid: a potential substratum for the pathogenesis of age-related macular degeneration." *PLoS One*, 3(6), e2339.

Chen, S., Wang, Q. L., Xu, S., Liu, I., Li, L. Y., Wang, Y., and Zack, D. J. (2002). "Functional analysis of cone-rod homeobox (CRX) mutations associated with retinal dystrophy." *Hum Mol Genet*, 11(8), 873-84.

Chow, R. L., and Lang, R. A. (2001). "Early eye development in vertebrates." *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 255-96.

Corbo, J. C., Lawrence, K. A., Karlstetter, M., Myers, C. A., Abdelaziz, M., Dirkes, W., Weigelt, K., Seifert, M., Benes, V., Fritsche, L. G., Weber, B. H., and Langmann, T. (2010). "CRX ChIP-seq reveals the cis-regulatory architecture of mouse photoreceptors." *Genome Res*, 20(11), 1512-25.

Corbo, J. C., Myers, C. A., Lawrence, K. A., Jadhav, A. P., and Cepko, C. L. (2007). "A typology of photoreceptor gene expression patterns in the mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(29), 12069-74.

Courtois, V., Chatelain, G., Han, Z. Y., Le Novere, N., Brun, G., and Lamonerie, T. (2003). "New Otx2 mRNA isoforms expressed in the mouse brain." *J Neurochem*, 84(4), 840-53.

Crossley, P. H., Martinez, S., Ohkubo, Y., and Rubenstein, J. L. (2001). "Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles." *Neuroscience*, 108(2), 183-206.

Danno, H., Michiue, T., Hitachi, K., Yukita, A., Ishiura, S., and Asashima, M. (2008). "Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate Rax expression." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(14), 5408-13.

Dateki, S., Fukami, M., Sato, N., Muroya, K., Adachi, M., and Ogata, T. (2008). "OTX2 mutation in a patient with anophthalmia, short stature, and partial growth hormone deficiency: functional studies using the IRBP, HESX1, and POU1F1 promoters." *J Clin Endocrinol Metab*, 93(10), 3697-702.

Dateki, S., Kosaka, K., Hasegawa, K., Tanaka, H., Azuma, N., Yokoya, S., Muroya, K., Adachi, M., Tajima, T., Motomura, K., Kinoshita, E., Moriuchi, H., Sato, N., Fukami, M., and Ogata, T. (2010). "Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype." *J Clin Endocrinol Metab*, 95(2), 756-64.

de Haas, T., Oussoren, E., Grajkowska, W., Perek-Polnik, M., Popovic, M., Zadravec-Zaletel, L., Perera, M., Corte, G., Wirths, O., van Sluis, P., Pietsch, T., Troost, D., Baas, F., Versteeg, R., and Kool, M. (2006). "OTX1 and OTX2 expression correlates with the clinicopathologic classification of medulloblastomas." *J Neuropathol Exp Neurol*, 65(2), 176-86.

Del Debbio, C. B., Peng, X., Xiong, H., and Ahmad, I. (2013). "Adult ciliary epithelial stem cells generate functional neurons and differentiate into both early and late born retinal neurons under non-cell autonomous influences." *BMC Neurosci*, 14(1), 130.

Di, C., Liao, S., Adamson, D. C., Parrett, T. J., Broderick, D. K., Shi, Q., Lengauer, C., Cummins, J. M., Velculescu, V. E., Fults, D. W., McLendon, R. E., Bigner, D. D., and Yan, H. (2005). "Identification of OTX2 as a medulloblastoma oncogene whose product can be targeted by all-trans retinoic acid." *Cancer Res*, 65(3), 919-24.

Di Giovannantonio, L. G., Di Salvio, M., Acampora, D., Prakash, N., Wurst, W., and Simeone, A. (2013). "Otx2 selectively controls the neurogenesis of specific neuronal subtypes of the ventral tegmental area and compensates En1-dependent neuronal loss and MPTP vulnerability." *Dev Biol*, 373(1), 176-83.

Diaczok, D., DiVall, S., Matsuo, I., Wondisford, F. E., Wolfe, A. M., and Radovick, S. (2011). "Deletion of Otx2 in GnRH neurons results in a mouse model of hypogonadotropic hypogonadism." *Mol Endocrinol*, 25(5), 833-46.

Diaczok, D., Romero, C., Zunich, J., Marshall, I., and Radovick, S. (2008). "A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency." *J Clin Endocrinol Metab*, 93(11), 4351-9.

Drakas, R., Prisco, M., and Baserga, R. (2005). "A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells." *Proteomics*, 5(1), 132-7.

Eguchi, G., Eguchi, Y., Nakamura, K., Yadav, M. C., Millan, J. L., and Tsonis, P. A. (2011). "Regenerative capacity in newts is not altered by repeated regeneration and ageing." *Nat Commun*, 2, 384.

Elliott, J., Jolicoeur, C., Ramamurthy, V., and Cayouette, M. (2008). "Ikaros confers early temporal competence to mouse retinal progenitor cells." *Neuron*, 60(1), 26-39.

Esumi, N., Kachi, S., Hackler, L., Jr., Masuda, T., Yang, Z., Campochiaro, P. A., and Zack, D. J. (2009). "BEST1 expression in the retinal pigment epithelium is modulated by OTX family members." *Hum Mol Genet*, 18(1), 128-41.

Evans, A. L., and Gage, P. J. (2005). "Expression of the homeobox gene Pitx2 in neural crest is required for optic stalk and ocular anterior segment development." *Hum Mol Genet*, 14(22), 3347-59.

Fei, Y., and Hughes, T. E. (2000). "Nuclear trafficking of photoreceptor protein crx: the targeting sequence and pathologic implications." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(10), 2849-56.

Fong, S. L., and Fong, W. B. (1999). "Elements regulating the transcription of human interstitial retinoid-binding protein (IRBP) gene in cultured retinoblastoma cells." *Curr Eye Res*, 18(4), 283-91.

Fossat, N., Chatelain, G., Brun, G., and Lamonerie, T. (2006). "Temporal and spatial delineation of mouse Otx2 functions by conditional self-knockout." *EMBO Rep*, 7(8), 824-30.

Fossat, N., Courtois, V., Chatelain, G., Brun, G., and Lamonerie, T. (2005). "Alternative usage of Otx2 promoters during mouse development." *Dev Dyn*, 233(1), 154-60.

Fossat, N., Le Greneur, C., Beby, F., Vincent, S., Godement, P., Chatelain, G., and Lamonerie, T. (2007). "A new GFP-tagged line reveals unexpected Otx2 protein localization in retinal photoreceptors." *BMC Dev Biol*, 7, 122.

Fraser, B., DuVal, M. G., Wang, H., and Allison, W. T. (2013). "Regeneration of cone photoreceptors when cell ablation is primarily restricted to a particular cone subtype." *PLoS One*, 8(1), e55410.

Fuhrmann, S., Levine, E. M., and Reh, T. A. (2000). "Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick." *Development*, 127(21), 4599-609.

Fuhrmann, S., Zou, C., and Levine, E. M. (2013). "Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis." *Exp Eye Res*.

Fujihara, M., Nagai, N., Sussan, T. E., Biswal, S., and Handa, J. T. (2008). "Chronic cigarette smoke causes oxidative damage and apoptosis to retinal pigmented epithelial cells in mice." *PLoS One*, 3(9), e3119.
Furukawa, A., Koike, C., Lippincott, P., Cepko, C. L., and Furukawa, T. (2002). "The mouse Crx 5'-upstream transgene sequence directs cell-specific and developmentally regulated expression in retinal photoreceptor cells." *J Neurosci*, 22(5), 1640-7.
Furukawa, T., Morrow, E. M., and Cepko, C. L. (1997). "Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation." *Cell*, 91(4), 531-41.
Furukawa, T., Morrow, E. M., Li, T., Davis, F. C., and Cepko, C. L. (1999). "Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice." *Nat Genet*, 23(4), 466-70.
Galliot, B., de Vargas, C., and Miller, D. (1999). "Evolution of homeobox genes: Q50 Paired-like genes founded the Paired class." *Dev Genes Evol*, 209(3), 186-97.
Gammill, L. S., and Sive, H. (1997). "Identification of otx2 target genes and restrictions in ectodermal competence during Xenopus cement gland formation." *Development*, 124(2), 471-81.
Gamsiz, E. D., Ouyang, Q., Schmidt, M., Nagpal, S., and Morrow, E. M. (2012). "Genome-wide transcriptome analysis in murine neural retina using high-throughput RNA sequencing." *Genomics*, 99(1), 44-51.
Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P., and Rijli, F. M. (1997). "Role of Hoxa-2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning." *Development*, 124(19), 3693-702.
Germot, A., Lecointre, G., Plouhinec, J. L., Le Mentec, C., Girardot, F., and Mazan, S. (2001). "Structural evolution of Otx genes in craniates." *Mol Biol Evol*, 18(9), 1668-78.
Gertz, J., Savic, D., Varley, K. E., Partridge, E. C., Safi, A., Jain, P., Cooper, G. M., Reddy, T. E., Crawford, G. E., and Myers, R. M. (2013). "Distinct Properties of Cell-Type-Specific and Shared Transcription Factor Binding Sites." *Mol Cell*.
Gloeckner, C. J., Boldt, K., Schumacher, A., Roepman, R., and Ueffing, M. (2007). "A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes." *Proteomics*, 7(23), 4228-34.
Glubrecht, D. D., Kim, J. H., Russell, L., Bamforth, J. S., and Godbout, R. (2009). "Differential CRX and OTX2 expression in human retina and retinoblastoma." *J Neurochem*, 111(1), 250-63.
Goldowitz, D., and Hamre, K. (1998). "The cells and molecules that make a cerebellum." *Trends Neurosci*, 21(9), 375-82.
Gonzalez-Rodriguez, J., Pelcastre, E. L., Tovilla-Canales, J. L., Garcia-Ortiz, J. E., Amato-Almanza, M., Villanueva-Mendoza, C., Espinosa-Mattar, Z., and Zenteno, J. C. (2010). "Mutational screening of CHX10, GDF6, OTX2, RAX and SOX2 genes in 50 unrelated microphthalmia-anophthalmia-coloboma (MAC) spectrum cases." *Br J Ophthalmol*, 94(8), 1100-4.
Gorbenko Del Blanco, D., Romero, C. J., Diaczok, D., de Graaff, L. C., Radovick, S., and Hokken-Koelega, A. C. (2012). "A novel OTX2 mutation in a patient with combined pituitary hormone deficiency, pituitary malformation, and an underdeveloped left optic nerve." *Eur J Endocrinol*, 167(3), 441-52.
Gouras, P., Brown, K., Ivert, L., and Neuringer, M. (2011). "A novel melano-lysosome in the retinal epithelium of rhesus monkeys." *Exp Eye Res*, 93(6), 937-46.
Green, C. B., Durston, A. J., and Morgan, R. (2001). "The circadian gene Clock is restricted to the anterior neural plate early in development and is regulated by the neural inducer noggin and the transcription factor Otx2." *Mech Dev*, 101(1-2), 105-10.
Green, E. S., Stubbs, J. L., and Levine, E. M. (2003). "Genetic rescue of cell number in a mouse model of microphthalmia: interactions between Chx10 and G1-phase cell cycle regulators." *Development*, 130(3), 539-52.
Grosskortenhaus, R., Pearson, B. J., Marusich, A., and Doe, C. Q. (2005). "Regulation of temporal identity transitions in Drosophila neuroblasts." *Dev Cell*, 8(2), 193-202.

Guruharsha, K. G., Rual, J. F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., Beekman, C., Wong, C., Rhee, D. Y., Cenaj, O., McKillip, E., Shah, S., Stapleton, M., Wan, K. H., Yu, C., Parsa, B., Carlson, J. W., Chen, X., Kapadia, B., VijayRaghavan, K., Gygi, S. P., Celniker, S. E., Obar, R. A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2011). "A protein complex network of Drosophila melanogaster." *Cell*, 147(3), 690-703.

Haas, B. J., and Zody, M. C. (2010). "Advancing RNA-Seq analysis." *Nat Biotechnol*, 28(5), 421-3.

Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T., and Kageyama, R. (2001). "Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type." *Development*, 128(8), 1313-22.

Hatori, M., and Panda, S. (2010). "The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light." *Trends Mol Med*, 16(10), 435-46.

Heimbucher, T., Murko, C., Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Huber, A., Stebegg, R., Eberhard, D., Fink, M., Simeone, A., and Czerny, T. (2007). "Gbx2 and Otx2 interact with the WD40 domain of Groucho/Tle corepressors." *Mol Cell Biol*, 27(1), 340-51.

Henderson, R. A., Williamson, K., Cumming, S., Clarke, M. P., Lynch, S. A., Hanson, I. M., FitzPatrick, D. R., Sisodiya, S., and van Heyningen, V. (2007). "Inherited PAX6, NF1 and OTX2 mutations in a child with microphthalmia and aniridia." *Eur J Hum Genet*, 15(8), 898-901.

Henderson, R. H., Williamson, K. A., Kennedy, J. S., Webster, A. R., Holder, G. E., Robson, A. G., FitzPatrick, D. R., van Heyningen, V., and Moore, A. T. (2009). "A rare de novo nonsense mutation in OTX2 causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction." *Mol Vis*, 15, 2442-7.

Hennig, A. K., Peng, G. H., and Chen, S. (2013). "Transcription coactivators p300 and CBP are necessary for photoreceptor-specific chromatin organization and gene expression." *PLoS One*, 8(7), e69721.

Hide, T., Hatakeyama, J., Kimura-Yoshida, C., Tian, E., Takeda, N., Ushio, Y., Shiroishi, T., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2002). "Genetic modifiers of otocephalic phenotypes in Otx2 heterozygous mutant mice." *Development*, 129(18), 4347-57.

Ho, E., Irvine, T., Vilk, G. J., Lajoie, G., Ravichandran, K. S., D'Souza, S. J., and Dagnino, L. (2009). "Integrin-linked kinase interactions with ELMO2 modulate cell polarity." *Mol Biol Cell*, 20(13), 3033-43.

Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Arnheiter, H. (1993). "Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein." *Cell*, 74(2), 395-404.

Holleville, N., Mateos, S., Bontoux, M., Bollerot, K., and Monsoro-Burq, A. H. (2007). "Dlx5 drives Runx2 expression and osteogenic differentiation in developing cranial suture mesenchyme." *Dev Biol*, 304(2), 860-74.

Horsford, D. J., Nguyen, M. T., Sellar, G. C., Kothary, R., Arnheiter, H., and McInnes, R. R. (2005). "Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity." *Development*, 132(1), 177-87.

Hyer, J., Mima, T., and Mikawa, T. (1998). "FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain." *Development*, 125(5), 869-77.

Jang, G. F., Van Hooser, J. P., Kuksa, V., McBee, J. K., He, Y. G., Janssen, J. J., Driessen, C. A., and Palczewski, K. (2001). "Characterization of a dehydrogenase activity responsible for oxidation of 11-cis-retinol in the retinal pigment epithelium of mice with a disrupted RDH5 gene. A model for the human hereditary disease fundus albipunctatus." *J Biol Chem*, 276(35), 32456-65.

Jimenez, N. L., Flannick, J., Yahyavi, M., Li, J., Bardakjian, T., Tonkin, L., Schneider, A., Sherr, E. H., and Slavotinek, A. M. (2011). "Targeted 'next-generation' sequencing in anophthalmia and microphthalmia patients confirms SOX2, OTX2 and FOXE3 mutations." *BMC Med Genet*, 12, 172.

Johansson, P. A., Irmler, M., Acampora, D., Beckers, J., Simeone, A., and Gotz, M. (2013). "The transcription factor Otx2 regulates choroid plexus development and function." *Development*, 140(5), 1055-66.

Joly, S., Pernet, V., Samardzija, M., and Grimm, C. (2011). "Pax6-positive Muller glia cells express cell cycle markers but do not proliferate after photoreceptor injury in the mouse retina." *Glia*, 59(7), 1033-46.
Joyner, A. L., Liu, A., and Millet, S. (2000). "Otx2, Gbx2 and Fgf8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer." *Curr Opin Cell Biol*, 12(6), 736-41.
Kamnasaran, D., Morin, F., and Gekas, J. (2010). "Prenatal diagnosis and molecular genetic studies on a new case of agnathia-otocephaly." *Fetal Pediatr Pathol*, 29(4), 207-11.
Katoh, K., Omori, Y., Onishi, A., Sato, S., Kondo, M., and Furukawa, T. (2010). "Blimp1 suppresses Chx10 expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper photoreceptor development." *J Neurosci*, 30(19), 6515-26.
Kedinger, V., and Nepveu, A. (2010). "The roles of CUX1 homeodomain proteins in the establishment of a transcriptional program required for cell migration and invasion." *Cell Adh Migr*, 4(3), 348-52.
Kelley, C. G., Lavorgna, G., Clark, M. E., Boncinelli, E., and Mellon, P. L. (2000). "The Otx2 homeoprotein regulates expression from the gonadotropin-releasing hormone proximal promoter." *Mol Endocrinol*, 14(8), 1246-56.
Kim, D. S., Matsuda, T., and Cepko, C. L. (2008). "A core paired-type and POU homeodomain-containing transcription factor program drives retinal bipolar cell gene expression." *J Neurosci*, 28(31), 7748-64.
Kimura, C., Shen, M. M., Takeda, N., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2001). "Complementary functions of Otx2 and Cripto in initial patterning of mouse epiblast." *Dev Biol*, 235(1), 12-32.
Kimura, C., Yoshinaga, K., Tian, E., Suzuki, M., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2000). "Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals." *Dev Biol*, 225(2), 304-21.
Kimura, J., Suda, Y., Kurokawa, D., Hossain, Z. M., Nakamura, M., Takahashi, M., Hara, A., and Aizawa, S. (2005). "Emx2 and Pax6 function in cooperation with Otx2 and Otx1 to develop caudal forebrain primordium that includes future archipallium." *J Neurosci*, 25(21), 5097-108.
Kitamura, K., Miura, H., Miyagawa-Tomita, S., Yanazawa, M., Katoh-Fukui, Y., Suzuki, R., Ohuchi, H., Suehiro, A., Motegi, Y., Nakahara, Y., Kondo, S., and Yokoyama, M. (1999). "Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism." *Development*, 126(24), 5749-58.
Kizilyaprak, C., Spehner, D., Devys, D., and Schultz, P. (2010). "In vivo chromatin organization of mouse rod photoreceptors correlates with histone modifications." *PLoS One*, 5(6), e11039.
Koike, C., Nishida, A., Ueno, S., Saito, H., Sanuki, R., Sato, S., Furukawa, A., Aizawa, S., Matsuo, I., Suzuki, N., Kondo, M., and Furukawa, T. (2007). "Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development." *Mol Cell Biol*, 27(23), 8318-29.
Kuratani, S., Matsuo, I., and Aizawa, S. (1997). "Developmental patterning and evolution of the mammalian viscerocranium: genetic insights into comparative morphology." *Dev Dyn*, 209(2), 139-55.
Kuriyama, F., Ueda, Y., and Araki, M. (2009). "Complete reconstruction of the retinal laminar structure from a cultured retinal pigment epithelium is triggered by altered tissue interaction and promoted by overlaid extracellular matrices." *Dev Neurobiol*, 69(14), 950-8.
Kurokawa, D., Kiyonari, H., Nakayama, R., Kimura-Yoshida, C., Matsuo, I., and Aizawa, S. (2004a). "Regulation of Otx2 expression and its functions in mouse forebrain and midbrain." *Development*, 131(14), 3319-31.
Kurokawa, D., Takasaki, N., Kiyonari, H., Nakayama, R., Kimura-Yoshida, C., Matsuo, I., and Aizawa, S. (2004b). "Regulation of Otx2 expression and its functions in mouse epiblast and anterior neuroectoderm." *Development*, 131(14), 3307-17.

Lamba, D., Karl, M., and Reh, T. (2008). "Neural regeneration and cell replacement: a view from the eye." *Cell Stem Cell*, 2(6), 538-49.
Lambert, B., Vandeputte, J., Remacle, S., Bergiers, I., Simonis, N., Twizere, J. C., Vidal, M., and Rezsohazy, R. (2012). "Protein interactions of the transcription factor Hoxa1." *BMC Dev Biol*, 12, 29.
Larder, R., and Mellon, P. L. (2009). "Otx2 induction of the gonadotropin-releasing hormone promoter is modulated by direct interactions with Grg co-repressors." *J Biol Chem*, 284(25), 16966-78.
Larsen, K. B., Lutterodt, M., Rath, M. F., and Moller, M. (2009). "Expression of the homeobox genes PAX6, OTX2, and OTX1 in the early human fetal retina." *Int J Dev Neurosci*, 27(5), 485-92.
Larsen, K. B., Lutterodt, M. C., Mollgard, K., and Moller, M. (2010). "Expression of the homeobox genes OTX2 and OTX1 in the early developing human brain." *J Histochem Cytochem*, 58(7), 669-78.
Larsen, W. J., and Dhem, A. (1996). *Embryologie humaine*: De Boeck université.
Lee, J., Corcoran, A., Han, M., Gardiner, D. M., and Muneoka, K. (2013). "Dlx5 and Msx2 regulate mouse anterior neural tube closure through ephrinA5-EphA7." *Dev Growth Differ*, 55(3), 341-9.
Lerner, L. E., Peng, G. H., Gribanova, Y. E., Chen, S., and Farber, D. B. (2005). "Sp4 is expressed in retinal neurons, activates transcription of photoreceptor-specific genes, and synergizes with Crx." *J Biol Chem*, 280(21), 20642-50.
Leuzinger, S., Hirth, F., Gerlich, D., Acampora, D., Simeone, A., Gehring, W. J., Finkelstein, R., Furukubo-Tokunaga, K., and Reichert, H. (1998). "Equivalence of the fly orthodenticle gene and the human OTX genes in embryonic brain development of Drosophila." *Development*, 125(9), 1703-10.
Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N. L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B. R., Sabo, P. J., Dorschner, M. O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M. A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L. A., Lander, E. S., and Dekker, J. (2009). "Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome." *Science*, 326(5950), 289-93.
Lin, Z., Cantos, R., Patente, M., and Wu, D. K. (2005). "Gbx2 is required for the morphogenesis of the mouse inner ear: a downstream candidate of hindbrain signaling." *Development*, 132(10), 2309-18.
Liu, I. S., Chen, J. D., Ploder, L., Vidgen, D., van der Kooy, D., Kalnins, V. I., and McInnes, R. R. (1994). "Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer." *Neuron*, 13(2), 377-93.
Livesey, F. J., Furukawa, T., Steffen, M. A., Church, G. M., and Cepko, C. L. (2000). "Microarray analysis of the transcriptional network controlled by the photoreceptor homeobox gene Crx." *Curr Biol*, 10(6), 301-10.
Livesey, R., and Cepko, C. (2001). "Neurobiology. Developing order." *Nature*, 413(6855), 471, 473.
Long, J. E., Garel, S., Depew, M. J., Tobet, S., and Rubenstein, J. L. (2003). "DLX5 regulates development of peripheral and central components of the olfactory system." *J Neurosci*, 23(2), 568-78.
Mallamaci, A., Di Blas, E., Briata, P., Boncinelli, E., and Corte, G. (1996). "OTX2 homeoprotein in the developing central nervous system and migratory cells of the olfactory area." *Mech Dev*, 58(1-2), 165-78.
Malone, B. M., Tan, F., Bridges, S. M., and Peng, Z. (2011). "Comparison of four ChIP-Seq analytical algorithms using rice endosperm H3K27 trimethylation profiling data." *PLoS One*, 6(9), e25260.
Mardis, E. R. (2007). "ChIP-seq: welcome to the new frontier." *Nat Methods*, 4(8), 613-4.
Marotte, L. R. (1980). "Goldfish retinotectal system: continuing development and synaptogenesis." *J Comp Neurol*, 193(2), 319-34.

Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F., and Gruss, P. (2001). "Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells." *Cell*, 105(1), 43-55.
Martinez-Morales, J. R., Del Bene, F., Nica, G., Hammerschmidt, M., Bovolenta, P., and Wittbrodt, J. (2005). "Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center." *Dev Cell*, 8(4), 565-74.
Martinez-Morales, J. R., Dolez, V., Rodrigo, I., Zaccarini, R., Leconte, L., Bovolenta, P., and Saule, S. (2003). "OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation." *J Biol Chem*, 278(24), 21721-31.
Martinez-Morales, J. R., Signore, M., Acampora, D., Simeone, A., and Bovolenta, P. (2001). "Otx genes are required for tissue specification in the developing eye." *Development*, 128(11), 2019-30.
Martinez, S. (2001). "The isthmic organizer and brain regionalization." *Int J Dev Biol*, 45(1), 367-71.
Masland, R. H. (2001). "Neuronal diversity in the retina." *Curr Opin Neurobiol*, 11(4), 431-6.
Masuda, T., and Esumi, N. (2010). "SOX9, through interaction with microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and OTX2, regulates BEST1 expression in the retinal pigment epithelium." *J Biol Chem*, 285(35), 26933-44.
Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N., and Aizawa, S. (1995). "Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head." *Genes Dev*, 9(21), 2646-58.
Matt, N., Ghyselinck, N. B., Pellerin, I., and Dupe, V. (2008). "Impairing retinoic acid signalling in the neural crest cells is sufficient to alter entire eye morphogenesis." *Dev Biol*, 320(1), 140-8.
Mears, A. J., Kondo, M., Swain, P. K., Takada, Y., Bush, R. A., Saunders, T. L., Sieving, P. A., and Swaroop, A. (2001). "Nrl is required for rod photoreceptor development." *Nat Genet*, 29(4), 447-52.
Millet, S., Campbell, K., Epstein, D. J., Losos, K., Harris, E., and Joyner, A. L. (1999). "A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer." *Nature*, 401(6749), 161-4.
Mochii, M., Ono, T., Matsubara, Y., and Eguchi, G. (1998). "Spontaneous transdifferentiation of quail pigmented epithelial cell is accompanied by a mutation in the Mitf gene." *Dev Biol*, 196(2), 145-59.
Montalta-He, H., Leemans, R., Loop, T., Strahm, M., Certa, U., Primig, M., Acampora, D., Simeone, A., and Reichert, H. (2002). "Evolutionary conservation of otd/Otx2 transcription factor action: a genome-wide microarray analysis in Drosophila." *Genome Biol*, 3(4), RESEARCH0015.
Montana, C. L., Lawrence, K. A., Williams, N. L., Tran, N. M., Peng, G. H., Chen, S., and Corbo, J. C. (2011). "Transcriptional regulation of neural retina leucine zipper (Nrl), a photoreceptor cell fate determinant." *J Biol Chem*, 286(42), 36921-31.
Mori, M., Metzger, D., Picaud, S., Hindelang, C., Simonutti, M., Sahel, J., Chambon, P., and Mark, M. (2004). "Retinal dystrophy resulting from ablation of RXR alpha in the mouse retinal pigment epithelium." *Am J Pathol*, 164(2), 701-10.
Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R., and Wu, D. K. (1998). "Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs." *J Neurosci*, 18(9), 3327-35.
Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B. (2008). "Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq." *Nat Methods*, 5(7), 621-8.
Moser, M., Ruschoff, J., and Buettner, R. (1997). "Comparative analysis of AP-2 alpha and AP-2 beta gene expression during murine embryogenesis." *Dev Dyn*, 208(1), 115-24.
Muller, F., Rohrer, H., and Vogel-Hopker, A. (2007). "Bone morphogenetic proteins specify the retinal pigment epithelium in the chick embryo." *Development*, 134(19), 3483-93.
Mustafi, D., Kevany, B. M., Genoud, C., Okano, K., Cideciyan, A. V., Sumaroka, A., Roman, A. J., Jacobson, S. G., Engel, A., Adams, M. D., and Palczewski, K. (2011). "Defective photoreceptor phagocytosis in a mouse model of enhanced S-cone syndrome causes progressive retinal degeneration." *FASEB J*, 25(9), 3157-76.

Nakamura, M., Skalet, J., and Miyake, Y. (2003). "RDH5 gene mutations and electroretinogram in fundus albipunctatus with or without macular dystrophy: RDH5 mutations and ERG in fundus albipunctatus." *Doc Ophthalmol*, 107(1), 3-11.
Nakano, T., Murata, T., Matsuo, I., and Aizawa, S. (2000). "OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3beta." *Biochem Biophys Res Commun*, 267(1), 64-70.
Nakayama, A., Nguyen, M. T., Chen, C. C., Opdecamp, K., Hodgkinson, C. A., and Arnheiter, H. (1998). "Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently." *Mech Dev*, 70(1-2), 155-66.
Nawy, S., and Jahr, C. E. (1990). "Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells." *Nature*, 346(6281), 269-71.
Nguyen Ba-Charvet, K. T., von Boxberg, Y., and Godement, P. (1999). "The mouse homeodomain protein OTX2 regulates NCAM promoter activity." *Brain Res Mol Brain Res*, 67(2), 292-5.
Nguyen, M., and Arnheiter, H. (2000). "Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF." *Development*, 127(16), 3581-91.
Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., and Furukawa, T. (2003). "Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development." *Nat Neurosci*, 6(12), 1255-63.
Nolen, L. D., Amor, D., Haywood, A., St Heaps, L., Willcock, C., Mihelec, M., Tam, P., Billson, F., Grigg, J., Peters, G., and Jamieson, R. V. (2006). "Deletion at 14q22-23 indicates a contiguous gene syndrome comprising anophthalmia, pituitary hypoplasia, and ear anomalies." *Am J Med Genet A*, 140(16), 1711-8.
Ohsawa, R., and Kageyama, R. (2008). "Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors." *Brain Res*, 1192, 90-8.
Omori, A., Akasaka, K., Kurokawa, D., and Amemiya, S. (2011a). "Gene expression analysis of Six3, Pax6, and Otx in the early development of the stalked crinoid Metacrinus rotundus." *Gene Expr Patterns*, 11(1-2), 48-56.
Omori, Y., Katoh, K., Sato, S., Muranishi, Y., Chaya, T., Onishi, A., Minami, T., Fujikado, T., and Furukawa, T. (2011b). "Analysis of transcriptional regulatory pathways of photoreceptor genes by expression profiling of the Otx2-deficient retina." *PLoS One*, 6(5), e19685.
Ozsolak, F., and Milos, P. M. (2011). "RNA sequencing: advances, challenges and opportunities." *Nat Rev Genet*, 12(2), 87-98.
Pacione, L. R., Szego, M. J., Ikeda, S., Nishina, P. M., and McInnes, R. R. (2003). "Progress toward understanding the genetic and biochemical mechanisms of inherited photoreceptor degenerations." *Annu Rev Neurosci*, 26, 657-700.
Park, P. J. (2009). "ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology." *Nat Rev Genet*, 10(10), 669-80.
Peng, G. H., and Chen, S. (2013). "Double chromatin immunoprecipitation: analysis of target co-occupancy of retinal transcription factors." *Methods Mol Biol*, 935, 311-28.
Perea-Gomez, A., Lawson, K. A., Rhinn, M., Zakin, L., Brulet, P., Mazan, S., and Ang, S. L. (2001). "Otx2 is required for visceral endoderm movement and for the restriction of posterior signals in the epiblast of the mouse embryo." *Development*, 128(5), 753-65.
Perea-Gomez, A., Shawlot, W., Sasaki, H., Behringer, R. R., and Ang, S. (1999). "HNF3beta and Lim1 interact in the visceral endoderm to regulate primitive streak formation and anterior-posterior polarity in the mouse embryo." *Development*, 126(20), 4499-511.
Perusek, L., and Maeda, T. (2013). "Vitamin A derivatives as treatment options for retinal degenerative diseases." *Nutrients*, 5(7), 2646-66.
Peters, S., Kayatz, P., Heimann, K., and Schraermeyer, U. (2000). "Subretinal injection of rod outer segments leads to an increase in the number of early-stage melanosomes in retinal pigment epithelial cells." *Ophthalmic Res*, 32(2-3), 52-6.

Pittack, C., Grunwald, G. B., and Reh, T. A. (1997). "Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos." *Development*, 124(4), 805-16.

Puelles, E., Acampora, D., Lacroix, E., Signore, M., Annino, A., Tuorto, F., Filosa, S., Corte, G., Wurst, W., Ang, S. L., and Simeone, A. (2003). "Otx dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain." *Nat Neurosci*, 6(5), 453-60.

Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S. L., Wurst, W., and Simeone, A. (2004). "Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain." *Development*, 131(9), 2037-48.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification." *Methods*, 24(3), 218-29.

Quail, M. A., Kozarewa, I., Smith, F., Scally, A., Stephens, P. J., Durbin, R., Swerdlow, H., and Turner, D. J. (2008). "A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system." *Nat Methods*, 5(12), 1005-10.

Ragge, N. K., Brown, A. G., Poloschek, C. M., Lorenz, B., Henderson, R. A., Clarke, M. P., Russell-Eggitt, I., Fielder, A., Gerrelli, D., Martinez-Barbera, J. P., Ruddle, P., Hurst, J., Collin, J. R., Salt, A., Cooper, S. T., Thompson, P. J., Sisodiya, S. M., Williamson, K. A., Fitzpatrick, D. R., van Heyningen, V., and Hanson, I. M. (2005). "Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations." *Am J Hum Genet*, 76(6), 1008-22.

Ranade, S. S., Yang-Zhou, D., Kong, S. W., McDonald, E. C., Cook, T. A., and Pignoni, F. (2008). "Analysis of the Otd-dependent transcriptome supports the evolutionary conservation of CRX/OTX/OTD functions in flies and vertebrates." *Dev Biol*, 315(2), 521-34.

Ravasi, T., Suzuki, H., Cannistraci, C. V., Katayama, S., Bajic, V. B., Tan, K., Akalin, A., Schmeier, S., Kanamori-Katayama, M., Bertin, N., Carninci, P., Daub, C. O., Forrest, A. R., Gough, J., Grimmond, S., Han, J. H., Hashimoto, T., Hide, W., Hofmann, O., Kamburov, A., Kaur, M., Kawaji, H., Kubosaki, A., Lassmann, T., van Nimwegen, E., MacPherson, C. R., Ogawa, C., Radovanovic, A., Schwartz, A., Teasdale, R. D., Tegner, J., Lenhard, B., Teichmann, S. A., Arakawa, T., Ninomiya, N., Murakami, K., Tagami, M., Fukuda, S., Imamura, K., Kai, C., Ishihara, R., Kitazume, Y., Kawai, J., Hume, D. A., Ideker, T., and Hayashizaki, Y. (2010). "An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man." *Cell*, 140(5), 744-52.

Rhinn, M., Dierich, A., Le Meur, M., and Ang, S. (1999). "Cell autonomous and non-cell autonomous functions of Otx2 in patterning the rostral brain." *Development*, 126(19), 4295-304.

Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R. R., Le Meur, M., and Ang, S. L. (1998). "Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification." *Development*, 125(5), 845-56.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." *Nat Biotechnol*, 17(10), 1030-2.

Rohila, J. S., Chen, M., Cerny, R., and Fromm, M. E. (2004). "Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants." *Plant J*, 38(1), 172-81.

Rovsing, L., Clokie, S., Bustos, D. M., Rohde, K., Coon, S. L., Litman, T., Rath, M. F., Moller, M., and Klein, D. C. (2011). "Crx broadly modulates the pineal transcriptome." *J Neurochem*, 119(2), 262-74.

Rye, M. B., Saetrom, P., and Drablos, F. (2011). "A manually curated ChIP-seq benchmark demonstrates room for improvement in current peak-finder programs." *Nucleic Acids Res*, 39(4), e25.

Sabunciyan, S., Yolken, R., Ragan, C. M., Potash, J. B., Nimgaonkar, V. L., Dickerson, F., Llenos, I. C., and Weis, S. (2007). "Polymorphisms in the homeobox gene OTX2 may

be a risk factor for bipolar disorder." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B(8), 1083-6.
Saito, H., Yasumoto, K., Takeda, K., Takahashi, K., Fukuzaki, A., Orikasa, S., and Shibahara, S. (2002). "Melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform activates its own gene promoter through physical interaction with lymphoid-enhancing factor 1." *J Biol Chem*, 277(32), 28787-94.
Salbreux, G., Barthel, L. K., Raymond, P. A., and Lubensky, D. K. (2012). "Coupling mechanical deformations and planar cell polarity to create regular patterns in the zebrafish retina." *PLoS Comput Biol*, 8(8), e1002618.
Sanchez Alvarado, A., and Tsonis, P. A. (2006). "Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models." *Nat Rev Genet*, 7(11), 873-84.
Sauka-Spengler, T., Germot, A., Shi, D. L., and Mazan, S. (2002). "Expression patterns of an Otx2 and an Otx5 orthologue in the urodele Pleurodeles waltl: implications on the evolutionary relationships between the balancers and cement gland in amphibians." *Dev Genes Evol*, 212(8), 380-7.
Schilter, K. F., Schneider, A., Bardakjian, T., Soucy, J. F., Tyler, R. C., Reis, L. M., and Semina, E. V. (2011). "OTX2 microphthalmia syndrome: four novel mutations and delineation of a phenotype." *Clin Genet*, 79(2), 158-68.
Schuster, S. C. (2008). "Next-generation sequencing transforms today's biology." *Nat Methods*, 5(1), 16-8.
Shiells, R. A., and Falk, G. (1990). "Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein." *Proc Biol Sci*, 242(1304), 91-4.
Sigulinsky, C. L., Green, E. S., Clark, A. M., and Levine, E. M. (2008). "Vsx2/Chx10 ensures the correct timing and magnitude of Hedgehog signaling in the mouse retina." *Dev Biol*, 317(2), 560-75.
Sillitoe, R. V., and Joyner, A. L. (2007). "Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum." *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 549-77.
Simeone, A. (2000). "Positioning the isthmic organizer where Otx2 and Gbx2meet." *Trends Genet*, 16(6), 237-40.
Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., and Boncinelli, E. (1992). "Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain." *Nature*, 358(6388), 687-90.
Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M. R., Nigro, V., and Boncinelli, E. (1993). "A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo." *EMBO J*, 12(7), 2735-47.
Simeone, A., Puelles, E., and Acampora, D. (2002). "The Otx family." *Curr Opin Genet Dev*, 12(4), 409-15.
Solovei, I., Kreysing, M., Lanctot, C., Kosem, S., Peichl, L., Cremer, T., Guck, J., and Joffe, B. (2009). "Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution." *Cell*, 137(2), 356-68.
Steventon, B., Mayor, R., and Streit, A. (2012). "Mutual repression between Gbx2 and Otx2 in sensory placodes reveals a general mechanism for ectodermal patterning." *Dev Biol*, 367(1), 55-65.
Stroeva, O. G., and Mitashov, V. I. (1983). "Retinal pigment epithelium: proliferation and differentiation during development and regeneration." *Int Rev Cytol*, 83, 221-93.
Suda, Y., Matsuo, I., Kuratani, S., and Aizawa, S. (1996). "Otx1 function overlaps with Otx2 in development of mouse forebrain and midbrain." *Genes Cells*, 1(11), 1031-44.
Swaroop, A., Kim, D., and Forrest, D. (2010). "Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina." *Nat Rev Neurosci*, 11(8), 563-76.
Tajima, T., Ohtake, A., Hoshino, M., Amemiya, S., Sasaki, N., Ishizu, K., and Fujieda, K. (2009). "OTX2 loss of function mutation causes anophthalmia and combined pituitary

hormone deficiency with a small anterior and ectopic posterior pituitary." *J Clin Endocrinol Metab*, 94(1), 314-9.
Takeda, K., Yokoyama, S., Yasumoto, K., Saito, H., Udono, T., Takahashi, K., and Shibahara, S. (2003). "OTX2 regulates expression of DOPAchrome tautomerase in human retinal pigment epithelium." *Biochem Biophys Res Commun*, 300(4), 908-14.
Terrell, D., Xie, B., Workman, M., Mahato, S., Zelhof, A., Gebelein, B., and Cook, T. (2012). "OTX2 and CRX rescue overlapping and photoreceptor-specific functions in the Drosophila eye." *Dev Dyn*, 241(1), 215-28.
Truscott, M., Harada, R., Vadnais, C., Robert, F., and Nepveu, A. (2008). "p110 CUX1 cooperates with E2F transcription factors in the transcriptional activation of cell cycle-regulated genes." *Mol Cell Biol*, 28(10), 3127-38.
Tsonis, P. A., Trombley, M. T., Rowland, T., Chandraratna, R. A., and del Rio-Tsonis, K. (2000). "Role of retinoic acid in lens regeneration." *Dev Dyn*, 219(4), 588-93.
van Berkum, N. L., Lieberman-Aiden, E., Williams, L., Imakaev, M., Gnirke, A., Mirny, L. A., Dekker, J., and Lander, E. S. (2010). "Hi-C: a method to study the three-dimensional architecture of genomes." *J Vis Exp*(39).
Vernay, B., Koch, M., Vaccarino, F., Briscoe, J., Simeone, A., Kageyama, R., and Ang, S. L. (2005). "Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain." *J Neurosci*, 25(19), 4856-67.
Vogel-Hopker, A., Momose, T., Rohrer, H., Yasuda, K., Ishihara, L., and Rapaport, D. H. (2000). "Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development." *Mech Dev*, 94(1-2), 25-36.
Wang, V. Y., and Zoghbi, H. Y. (2001). "Genetic regulation of cerebellar development." *Nat Rev Neurosci*, 2(7), 484-91.
Wang, Y., Osterbur, D. L., Megaw, P. L., Tosini, G., Fukuhara, C., Green, C. B., and Besharse, J. C. (2001). "Rhythmic expression of Nocturnin mRNA in multiple tissues of the mouse." *BMC Dev Biol*, 1, 9.
Westenskow, P., Piccolo, S., and Fuhrmann, S. (2009). "Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating Mitf and Otx2 expression." *Development*, 136(15), 2505-10.
Westenskow, P. D., McKean, J. B., Kubo, F., Nakagawa, S., and Fuhrmann, S. (2010). "Ectopic Mitf in the embryonic chick retina by co-transfection of beta-catenin and Otx2." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(10), 5328-35.
White, M. A., Myers, C. A., Corbo, J. C., and Cohen, B. A. (2013). "Massively parallel in vivo enhancer assay reveals that highly local features determine the cis-regulatory function of ChIP-seq peaks." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(29), 11952-7.
Widlund, H. R., and Fisher, D. E. (2003). "Microphthalamia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival." *Oncogene*, 22(20), 3035-41.
Wilbanks, E. G., and Facciotti, M. T. (2010). "Evaluation of algorithm performance in ChIP-seq peak detection." *PLoS One*, 5(7), e11471.
Wilczynski, B., Liu, Y. H., Yeo, Z. X., and Furlong, E. E. (2012). "Predicting spatial and temporal gene expression using an integrative model of transcription factor occupancy and chromatin state." *PLoS Comput Biol*, 8(12), e1002798.
Wilhelm, B. T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C. J., Rogers, J., and Bahler, J. (2008). "Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution." *Nature*, 453(7199), 1239-43.
Williams, N. A., and Holland, P. W. (1998). "Gene and domain duplication in the chordate Otx gene family: insights from amphioxus Otx." *Mol Biol Evol*, 15(5), 600-7.
Wingate, R. J., and Hatten, M. E. (1999). "The role of the rhombic lip in avian cerebellum development." *Development*, 126(20), 4395-404.
Wright, A. F., Chakarova, C. F., Abd El-Aziz, M. M., and Bhattacharya, S. S. (2010). "Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait." *Nat Rev Genet*, 11(4), 273-84.

Wyatt, A., Bakrania, P., Bunyan, D. J., Osborne, R. J., Crolla, J. A., Salt, A., Ayuso, C., Newbury-Ecob, R., Abou-Rayyah, Y., Collin, J. R., Robinson, D., and Ragge, N. (2008). "Novel heterozygous OTX2 mutations and whole gene deletions in anophthalmia, microphthalmia and coloboma." *Hum Mutat*, 29(11), E278-83.

Xie, Q., Yang, Y., Huang, J., Ninkovic, J., Walcher, T., Wolf, L., Vitenzon, A., Zheng, D., Gotz, M., Beebe, D. C., Zavadil, J., and Cvekl, A. (2013). "Pax6 interactions with chromatin and identification of its novel direct target genes in lens and forebrain." *PLoS One*, 8(1), e54507.

Yamamoto, S., Hikasa, H., Ono, H., and Taira, M. (2003). "Molecular link in the sequential induction of the Spemann organizer: direct activation of the cerberus gene by Xlim-1, Xotx2, Mix.1, and Siamois, immediately downstream from Nodal and Wnt signaling." *Dev Biol*, 257(1), 190-204.

Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L., and Jaenisch, R. (2013). "One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering." *Cell*, 154(6), 1370-9.

Yasumoto, K., Takeda, K., Saito, H., Watanabe, K., Takahashi, K., and Shibahara, S. (2002). "Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling." *EMBO J*, 21(11), 2703-14.

Yoshii, C., Ueda, Y., Okamoto, M., and Araki, M. (2007). "Neural retinal regeneration in the anuran amphibian Xenopus laevis post-metamorphosis: transdifferentiation of retinal pigmented epithelium regenerates the neural retina." *Dev Biol*, 303(1), 45-56.

You, T., Lv, Y., Liu, S., Li, F., Zhao, Y., Lv, J., Qiu, G., and Li-Ling, J. (2012). "Novel OTX2 mutation associated with congenital anophthalmia and microphthalmia in a Han Chinese family." *Acta Ophthalmol*, 90(6), e501-2.

Yu, J., He, S., Friedman, J. S., Akimoto, M., Ghosh, D., Mears, A. J., Hicks, D., and Swaroop, A. (2004). "Altered expression of genes of the Bmp/Smad and Wnt/calcium signaling pathways in the cone-only Nrl-/- mouse retina, revealed by gene profiling using custom cDNA microarrays." *J Biol Chem*, 279(40), 42211-20.

Zeitz, C., van Genderen, M., Neidhardt, J., Luhmann, U. F., Hoeben, F., Forster, U., Wycisk, K., Matyas, G., Hoyng, C. B., Riemslag, F., Meire, F., Cremers, F. P., and Berger, W. (2005). "Mutations in GRM6 cause autosomal recessive congenital stationary night blindness with a distinctive scotopic 15-Hz flicker electroretinogram." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(11), 4328-35.

Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoute, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., and Liu, X. S. (2008). "Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS)." *Genome Biol*, 9(9), R137.

Zhang, Y. A., Okada, A., Lew, C. H., and McConnell, S. K. (2002). "Regulated nuclear trafficking of the homeodomain protein otx1 in cortical neurons." *Mol Cell Neurosci*, 19(3), 430-46.

Zhao, S., Hung, F. C., Colvin, J. S., White, A., Dai, W., Lovicu, F. J., Ornitz, D. M., and Overbeek, P. A. (2001). "Patterning the optic neuroepithelium by FGF signaling and Ras activation." *Development*, 128(24), 5051-60.

Zhou, J., and Kochhar, D. M. (2003). "Regulation of AP-2 and apoptosis in developing eye in a vitamin A-deficiency model." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 67(1), 41-53.

Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G., and Harris, W. A. (2003). "Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors." *Development*, 130(21), 5155-67.