



**HAL**  
open science

# Importance du contexte cellulaire et de la régulation spatio-temporelle de l'expression du facteur de transcription Otx2 dans la modulation de ses fonctions

Bruno Fant

► **To cite this version:**

Bruno Fant. Importance du contexte cellulaire et de la régulation spatio-temporelle de l'expression du facteur de transcription Otx2 dans la modulation de ses fonctions. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4100 . tel-01265309

**HAL Id: tel-01265309**

**<https://theses.hal.science/tel-01265309>**

Submitted on 1 Feb 2016

**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 : Sciences de la Vie et de la Santé - Interactions Moléculaires et Cellulaires

## **Importance du contexte cellulaire et de la régulation spatio-temporelle de l'expression du facteur de transcription *Otx2* dans la modulation de ses fonctions**

*présentée par*  
Bruno FANT

*dirigée par*  
Pr. Thomas LAMONERIE

**Madame Sylvie MAZAN**  
**Madame Muriel RHINN**  
**Madame Michèle STUDER**  
**Monsieur Thomas LAMONERIE**

*Devant un jury composé de*  
(Dr.)  
(Dr.)  
(Dr.)  
(Pr.)

Rapportice  
Rapportrice  
Présidente  
Directeur de thèse

***Soutenue publiquement le lundi 8 décembre à 14h***

# REMERCIEMENTS

Dans le présent travail, je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Thomas Lamonerie. Sa rigueur et sa curiosité intellectuelle ont été indispensables pour mener cette étude à bien, et restent pour moi une inspiration, tout comme sa connaissance encyclopédique de la biologie, et l'enthousiasme scientifique qu'il arrive à insuffler. Sa patience et sa disponibilité à tout instant forcent l'admiration, et permettaient aux conversations de dériver plus souvent qu'à leur tour, vers des domaines scientifiques comme viticoles.

Je remercie également Mike et Alex, les «patrons» du projet rétine, pour nos discussions enrichissantes au labo et en-dehors. Mike, par son dynamisme et son attention aux détails, a toujours été le moteur de ce projet, et son humour permettait de facilement lui pardonner ses goûts musicaux de fin de soirée. La capacité de travail impressionnante d'Alex et la facilité avec laquelle il maniait les concepts scientifiques, associées à son ouverture d'esprit et à sa sérénité, ont fait de lui un collègue précieux.

Je tiens à remercier les collaborateurs qui ont permis ce travail : Stéphane Audebert, pour son expertise protéomique et sa disponibilité, et Dario Acampora et Antonio Simeone, pour avoir aimablement accepté l'utilisation de leurs outils génétiques.

Je remercie bien sûr tous les membres de l'équipe Neurodéveloppement, anciens ou récents : Coralie Le Greneur pour m'avoir appris les arcanes du labo et apporté une expertise précieuse à mes débuts, Michaël Delhorbe pour son soutien technique plus qu'efficace et sa gentillesse, Nathalie Billon pour son esprit pratique qui savait me maintenir les pieds sur terre, ainsi que sa rigueur et son perfectionnisme, et Fabien d'Autréaux pour ses solides connaissances scientifiques associées à un petit grain de folie, et pour nos escapades furtives au billard. Je remercie également Almahdi Chakroun et Salsabiel El Nagar, la relève des doctorants, et leur souhaite toute la réussite possible pour des thèses que j'imagine brillantes. Je souhaite également la bienvenue aux nouveaux membres de l'équipe, Béatrice Polo et Puneh Maraghechi, en espérant qu'ils s'épanouissent au laboratoire autant que j'ai pu le faire.

Je remercie aussi les membres passés et présents des autres équipes du 7ème: Christian Braendle et la team Elegans, notamment Stéphanie «elle est où la poulette ?» Grimbert et Emilie «vendredi j'arrête» Demoinet ; Max Furthauer et les experts du zebra, Morgane Poulain, Sophie Polès, Marie-Alix Derieppe, Priyanka Sharma (sorry, we were supposed to defend together) et Thomas Juan ; Thierry Lepage et Loli Molina, dont je n'ai jamais mangé les oursins, promis.

Je remercie les autres amis de la science, et compagnons de galère : Alain Corinus, Nicolas Mélis, Jonathan Pini, Jean-Baptiste Coutelis, toute l'équipe de l'animalerie... Ainsi que les anciens de l'ENS (et associés), bien bien au-dessus de mon niveau humainement comme scientifiquement : Ferdie, Guillaume C, Chloé, Florian, Lise, Benoît, Rita, Nathalie, Anne-Cé, Isa, et tous les autres qui j'espère ne m'en voudront pas de ne pas les nommer. Je remercie enfin tout ceux qui ont su me supporter et me soutenir durant ces quatre années, même quand je leur parlais de science un peu trop longtemps : ma famille bien évidemment qui m'a toujours apporté un soutien essentiel, et qui a enduré mes contacts erratiques, Baptiste à qui je peux maintenant rendre notre cerveau commun, Flo, Julie, Adnan, Guillaume P, et Chloé, pour sa patience et ses pâtes aux poivrons.

# RÉSUMÉ

Les capacités régulatrices des facteurs de transcription en font des acteurs majeurs du développement embryonnaire. Leurs fonctions y sont le plus souvent multiples, et s'y échelonnent de façon spatiale et temporelle. Les travaux du laboratoire cherchent à caractériser chez la souris les mécanismes moléculaires permettant à ces gènes d'exercer des rôles aussi variés en se concentrant sur l'un d'entre eux, l'homéogène *Otx2*. Essentiel très tôt à la mise en place de la partie la plus antérieure de l'embryon, *Otx2* est également nécessaire par la suite à la régionalisation et à la différenciation du système nerveux central, au développement du cervelet et des organes sensoriels.

Deux approches complémentaires ont été entreprises ici pour mieux comprendre comment la multiplicité des fonctions d'*Otx2* peut être assurée de façon cohérente au sein d'un développement intégré. Une première partie de cette thèse se concentre sur l'importance de la régulation spatio-temporelle de son expression, en étudiant son rôle dans la régionalisation du système nerveux central. L'induction du mésencéphale et du métencéphale sont dépendantes de l'activité de l'organisateur isthmique. Or la régulation de l'expression d'*Otx2* conditionne la position finale de ce centre organisateur. Initialement exprimé dans tout l'épiblaste, *Otx2* est en effet restreint à la partie antérieure de l'embryon au cours de la gastrulation, et le réseau de régulation génétique qui constitue l'organisateur isthmique émerge à sa frontière postérieure nouvellement formée. Pour mieux caractériser le lien entre antériorisation d'*Otx2* et mise en place du centre organisateur, un modèle murin a été mis au point, dans lequel la restriction antérieure d'*Otx2* est remplacée par une présence uniforme du gène dans l'embryon. A l'encontre du modèle actuel, le réseau génétique de l'isthme est correctement induit dans ces embryons, et est qui plus est déplacé antérieurement. Ce phénotype, semblable à celui d'embryons mutants pour *Otx2*, indique qu'une régulation fine de cet homéogène qui assure un seuil net de sa concentration est nécessaire à sa fonction dans la régionalisation de l'embryon.

Une seconde partie s'appuie sur le rôle d'*Otx2* dans la rétine adulte pour étudier l'importance du contexte cellulaire dans les modalités d'action de ce facteur de transcription. *Otx2* est exprimé dans les deux tissus qui composent cet organe : dans les photorécepteurs et les cellules bipolaires de la neurorétine et dans toutes les cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine (RPE). Son expression au niveau du RPE est essentielle à la survie des photorécepteurs adjacents, comme des expériences de *knock-out* spécifique ont pu le montrer. Il n'apparaît au contraire pas indispensable dans la neurorétine. Une analyse par ChIP-seq a été menée pour identifier les sites de fixation d'*Otx2* dans les deux tissus de la rétine, et a pu montrer que ce facteur de transcription y occupait des sites très différents, suggérant des fonctions distinctes. L'écrasante majorité des sites occupés par *Otx2* dans la rétine l'était qui plus est également par son paralogue *Crx*, avec lequel une redondance fonctionnelle pourrait donc exister. L'occupation de motifs de fixation distincts dans les différents tissus exprimant *Otx2* pouvant s'expliquer par la formation de complexes protéiques tissus-spécifiques, une lignée de souris exprimant une protéine OTX2 taggée optimisée pour la purification protéique a été créée (*Otx2<sup>CTAP-tag</sup>*) et validée par l'analyse des partenaires d'OTX2 dans la neurorétine. Cette dernière a permis de démontrer qu'OTX2 ne formait pas d'interactions avec les autres facteurs de la neurorétine, faisant effectivement de CRX l'acteur principal de la famille *Otx* dans ce tissu. Elle a également dévoilé une série de partenaires jusque-là inconnus d'OTX2, potentiellement associée à de nouvelles fonctions de la protéine : elle pourrait notamment être impliquée dans la régulation de toutes les étapes de l'expression d'un gène, depuis la transcription jusqu'à la traduction.

## SUMMARY

Transcription factors are major actors of embryonic developments. They have multiple functions that can scale in time and space. Our laboratory is working to identify the molecular mechanisms that can allow this variety of roles by focusing on one specific gene, the homeodomain transcription factor *Otx2*. This homeogene is crucial very early on for the induction and development of the head, and remains necessary to various processes throughout development. It is for instance essential in the regionalisation and differentiation of the central nervous system as well as in the development of the cerebellum and of the sense organs.

Two complementary approaches have been undergone here to better understand how the various functions of *Otx2* can occur in an integrated manner during embryonic development. In a first part, we show that tight regulation of its expression is necessary to its role in brain regionalisation. During segmentation of the central nervous system, the induction of mesencephalon and metencephalon is under the control of the isthmus organizer. Final positioning of this organizing center in the embryo depends on *Otx2* expression. Initially expressed throughout the epiblast, *Otx2* is restricted to the anterior pole of the embryo during gastrulation, and its posterior limit of expression will determine the position of the isthmus organizer. A mouse genetic model has been developed to better understand the link between *Otx2* anteriorization and establishment of the organizer; in this model, the anterior restriction of *Otx2* in early embryos is replaced by ubiquitous expression of the gene. Contrary to predictions of the current model for isthmus organizer establishment, the isthmus genetic regulatory network is correctly induced in the embryo, but is displaced to a more anterior location. This phenotype resembles the one observed in *Otx*-deficient embryos, and suggests that tight regulation of *Otx2* is necessary to ensure a concentration threshold of this homeogene along the antero-posterior axis where the isthmus organizer would then emerge.

In a second part, we used the mouse adult retina as a model to study the influence of cellular context on *Otx2* molecular function. In this organ *Otx2* is expressed in two adjoining tissues, the retinal pigmented epithelium and the neuroretina. Its expression is necessary in the RPE for photoreceptor maintenance, whereas its deletion in the neuroretina does not seem to have any deleterious consequences. To better understand the molecular mechanism underlying this functional variety, a ChIP-seq analysis of *Otx2* binding sites in both tissues has been conducted. We were thus able to show that the genome occupancy and binding profile of *Otx2* vary widely depending on the tissues, suggesting very different target genes repertoires. Moreover, *Otx2* shares most of its binding sites with its paralogue *Crx* in the neural retina, indicating that a functional redundancy might exist between members of the *Otx* family in the retina. The differential DNA-binding selectivity of *Otx2* between tissues could be explained by its binding to different protein partners that modify its biochemical properties ; we therefore developed a new mouse line designed for purification of protein complexes (*Otx2*<sup>CTAP-tag</sup>). Validation of this line led to the obtention of the comprehensive interactome of *Otx2* in the adult retina. Correlation of this interactome with the data available for *Crx* shows that, although they share the same binding sites, OTX2 and CRX form very different protein complexes and thus probably have complementary rather than redundant functions. Finally, careful analysis of the OTX2 interactome revealed a new series of partners associated to putative novel functions of the homeoprotein: importantly, it might be involved in all the post-transcriptional steps of genetic expression regulation, up to translation.

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>1</b>
<b>RESUME</b>	<b>2</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>4</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>8</b>
<b>TABLE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>11</b>
<b>I. Otx2 , un facteur de transcription à l'expression dynamique associée à des fonctions multiples</b>	<b>14</b>
<b>I.1. Biologie moléculaire de la famille <i>Otx</i></b>	<b>14</b>
I.1.1 Présentation et phylogénie	14
I.1.1.1. Une famille présente de manière ubiquitaire dans le règne animal	14
I.1.1.2. Une famille multigénique	16
I.1.1.3. Des fonctions conservées à travers l'évolution	18
I.1.2 Du gène à la protéine	26
I.1.2.1. Structure des gènes <i>Otx</i>	26
I.1.2.2. Transcription des gènes <i>Otx</i>	28
I.1.2.2.1. Promoteurs multiples et épissage alternatif	28
I.1.2.2.2. Enhancers spatialement et temporellement spécifiques	33
I.1.2.3. Traduction des gènes <i>Otx</i> et caractéristiques protéiques	40
I.1.2.3.1. Régulation de la traduction des gènes <i>Otx</i>	40
I.1.2.3.2. Structure et conservation des protéines OTX	43
I.1.2.3.3. Modifications post-traductionnelles des protéines OTX	46
I.1.2.3.4. Équivalence fonctionnelle des protéines OTX	48
<b>I.2 Multiplicité des rôles du gène <i>Otx2</i></b>	<b>50</b>
I.2.1 Développement embryonnaire précoce	50
I.2.1.1. Gastrulation	54
I.2.1.1.1. Différenciation de l'endoderme viscéral et établissement	54
de l'axe proximo-distal	
I.2.1.1.2. Antériorisation de l'endoderme viscéral et mise en place	55
de l'axe antéro-postérieur	
I.2.1.2. Induction et maintien du système nerveux antérieur	57
I.2.1.2.1. Induction par le mésendoderme antérieur	57
I.2.1.2.2. Maintien du neurectoderme antérieur	59
I.2.2 Régionalisation du système nerveux antérieur	61
I.2.2.1 Mise en place du prosencéphale	62
I.2.2.1.1. Spécification du prosencéphale	62
I.2.2.1.2. Régionalisation du prosencéphale	63

I.2.2.2	Mise en place du mésencéphale	66
I.2.2.2.1.	Spécification du mésencéphale	66
I.2.2.2.2.	Polarité dorso-ventrale	66
I.2.2.2.3.	Mise en place des différents territoires	68
I.2.2.2.4.	Neurogénèse et différenciation des neurones	71
I.2.3.	Développement crânio-facial	72
I.2.4.	Développement et maintien des plexus choroïdes	75
I.2.5.	Développement des organes sensoriels	77
I.2.5.1.	Oreille interne	78
I.2.5.2.	Oeil et système visuel	79
I.2.5.3.	Glande pinéale	80
I.2.5.4.	Bulbes olfactifs ?	80
I.2.6.	Etablissement des tracés nerveux et croissance axonale	81
I.2.7.	Mise en place et régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique	82
I.2.8.	Développement et pathologies du cervelet postérieur	84
I.2.9	Entretien et plasticité du système visuel	86
I.3.	Conclusion	90
<b>II.</b>	<b>Importance de la régulation spatio-temporelle d'<i>Otx2</i> dans la régionalisation du système nerveux antérieur</b>	<b>91</b>
II.1	Spécification du mésencéphale et du métencéphale par l'organisateur isthmique	91
II.1.1	L'organisateur isthmique, un centre organisateur	91
II.1.1.1	Découverte	91
II.1.1.2	Un réseau complexe d'interactions génétiques à la frontière mésencéphale-métencéphale	93
II.1.1.3	Le signal <i>Fgf8</i> à la base des propriétés inductives de l'organisateur isthmique	96
II.1.2	Une restriction des lignages cellulaires de part et d'autre de l'organisateur	99
II.2	Rôle d' <i>Otx2</i> dans le fonctionnement de l'organisateur	100
II.2.1	La limite postérieure d'expression d' <i>Otx2</i> détermine la position de l'IsO	100
II.2.1.1.	Opposition <i>Otx2</i> / <i>Gbx2</i>	100
II.2.1.2	Un mécanisme évolutivement conservé ?	104
II.2.2	Les causes de l'antériorisation d' <i>Otx2</i>	105
II.3.	Conclusion	106
<b>III.</b>	<b>Un rôle majeur d'<i>Otx2</i> dans le développement et l'entretien de la rétine de souris</b>	<b>107</b>
III.1.	Structure de la rétine de souris adulte	107
III.1.1	Anatomie	107
III.1.2	Fonctions des différents types cellulaires	109
III.1.2.1.	Les photorécepteurs, sièges de la phototransduction	109
III.1.2.2.	Le RPE, auxiliaire essentiel des photorécepteurs	111
III.1.2.3.	La neurorétine, premier lieu de traitement de l'information visuelle	113
III.1.3	Expression d' <i>Otx2</i> dans la rétine de souris adulte	116

III.2. Rôle d'Otx2 dans le développement de la rétine	117
III.2.1. Le développement de la rétine	117
III.2.2. Mise en place du champo optique et <i>Otx2</i>	119
III.2.3. Spécification du RPE et <i>Otx2/Otx1</i>	119
III.2.4. Différenciation de la NR et <i>Otx2/Crx</i>	123
III.3. Importance majeure d'Otx2 dans le maintien de la rétine de souris adulte.	126
III.4. Modalités d'action différentes d'Otx2 dans la rétine de souris adulte	129
III.4.1. Une asymétrie des capacités régulatrices d'Otx2	129
III.4.2. Des sites de fixation différents	130
III.4.3. Des partenaires protéiques potentiellement différents	131
<b>RESULTATS</b>	<b>136</b>
<b>I. L'expression ubiquitaire d'Otx2 déplace l'organiseur isthmique vers le pôle antérieur de l'embryon</b>	<b>136</b>
<b>II. Otx2 occupe des répertoires de sites de fixation distincts dans la rétine neurale et la rétine pigmentée</b>	<b>158</b>
<b>III. L'analyse de l'interactome d'Otx2 dans la neurorétine y éclaire son rôle et révèle de nouvelles fonctions potentielles de l'homéogène</b>	<b>171</b>
<b>DISCUSSION - PERSPECTIVES</b>	<b>188</b>
<b>I. Un nouveau modèle nécessaire pour la mise en place de l'organiseur isthmique à la frontière de deux compartiments cellulaires.</b>	<b>189</b>
I.1. Mécanismes moléculaires de la compartimentation entre mésencéphale et métencéphale.	189
I.1.1. Compartimentation précoce et affinité différentielle des cellules	190
I.1.2. Compartimentation sous le contrôle de l'isthme	191
I.1.2.1. Une analogie avec les rhombomères ?	191
I.1.2.2. Un autre mécanisme possible montré chez le poulet	192
I.1.2.3. Le maintien d'un processus antérieur ?	192
I.1.3. Un lien possible entre restriction des lignages cellulaires et mise en place de l'isthme	193
I.2. Insuffisance du modèle actuel de mise en place de l'isthme	193
I.2.1. Nécessité d'un seuil abrupt de concentration d'Otx ?	194
I.2.2. Effet collatéral de l'expression ubiquitaire d'Otx	196
<b>II. Fonctions d'Otx2 dans la rétine adulte</b>	<b>198</b>
II.1. <i>Otx2</i> régule deux répertoires différents de gènes-cibles dans le RPE et la neurorétine.	198
II.1.1. Une dynamique différente de fixation d'Otx2 dans les deux tissus de la rétine adulte	198
II.1.1.1. Une activité régulatrice d'Otx2 par conséquent différente	199
II.1.1.2. Structure de la chromatine et fixation d'Otx2	199
II.1.1.3. Interactome d'Otx2 et sites de fixation	200
II.1.2. Pertinence de l'association entre sites de fixation et régulation de gènes proches	201
II.1.2.1. Relation d'un site de fixation à un gène proche	201
II.1.2.2. Prédiction de l'activité régulatrice d'un site de fixation	202
II.2. <i>Otx2</i> dans la neurorétine de souris adulte	204
II.2.1. <i>Otx2</i> ou <i>Crx</i> dans la rétine adulte : redondance, déséquilibre fonctionnel ou complémentarité ?	204
II.2.2. Pourquoi <i>Otx2</i> et <i>Crx</i> ne partagent-ils pas leurs partenaires protéiques ?	206



<b>III. Vers une approche systématique de l'interactome d'OTX2</b>	<b>207</b>
III.1. Noyau de partenaires et interactions tissus-spécifiques	207
III.2. Applications pratiques à l'étude de pathologies	208
<b>IV. De nouvelles fonctions potentielles de l'homéoprotéine OTX2 ?</b>	<b>209</b>
IV.1. Une sécrétion de l'homéogène <i>Otx2</i> ?	209
IV.2. <i>Otx2</i> pourrait réguler l'intégralité des étapes d'expression de certains gènes	210
<b>CONCLUSION</b>	<b>213</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>215</b>

# TABLE DES FIGURES

1. Phylogénie de la famille <i>Otx</i>	15
2. Structure et régionalisation moléculaire des SNC de trois Bilatériens actuels, et de leur ancêtre commun, l'Urbilatérien	19
3. Conséquences d'une perturbation de l'expression de la famille <i>Otx</i>	20
4. Evolution de la répartition des fonctions de la famille <i>Otx</i> chez les Deutérostomiens	22
5. Structure génomique des gènes <i>Otx</i>	27
6. Fonctions différentes des transcrits <i>Otx</i>	31
7. Éléments <i>cis</i> -régulateurs du groupe d'orthologie <i>Otx2</i>	37
8. Expression d' <i>Otx2</i> en fonction des isoformes ARNm présents	42
9. Représentation schématique des protéines OTX à travers l'évolution	44
10. Modifications post-traductionnelles d'OTX2	47
11. Equivalence fonctionnelle des protéines OTX	49
12. Expression précoce d' <i>Otx2</i>	51
13. Interaction entre <i>Otx2</i> et <i>Cripto</i> dans l'induction du DVE et la mie en place de l'axe proximo-distal	53
14. <i>Otx2</i> assure le mouvement antérieur de l'endoderme viscéral	56
15. Rôles du gène <i>Otx2</i> pendant le développement précoce	58
16. Expression des gènes de la famille <i>Otx</i> pendant la régionalisation du SNC	62
17. Fonction d' <i>Otx2</i> dans la spécification du prosencéphale	64
18. Fonction d' <i>Otx2</i> dans la régionalisation du prosencéphale	65
19. Fonction d' <i>Otx2</i> dans le développement du crâne	67
20. <i>Otx2</i> protège le mésencéphale ventral d'une identité métencéphalique	69
21. <i>Otx2</i> protège le mésencéphale dorsal d'une identité métencéphalique	70
22. Fonction d' <i>Otx2</i> dans le développement du crâne	73
23. Fonction d' <i>Otx2</i> dans le développement des plexus choroïdes	76
24. Fonction d' <i>Otx2</i> dans le développement de l'oreille interne	78
25. Fonction d' <i>Otx2</i> dans le développement du cervelet	85
26. Rôle d' <i>Otx2</i> dans la maturation des neurones à parvalbumine	87
27. Dynamique d'expression et diversité des rôles d' <i>Otx2</i> au cours du développement	89

<b>28. Capacités inductrices de la constriction isthmique</b>	<b>92</b>
<b>29. Caractéristiques moléculaires et réseau de régulation génétique de l'IsO</b>	<b>93</b>
<b>30. Le signal <i>Fgf8</i> confère ses propriétés inductrices à l'organisateur isthmique</b>	<b>96</b>
<b>31. Antériorisation de l'expression d'<i>Otx2</i> et établissement de la frontière <i>Otx2/Gbx2</i></b>	<b>101</b>
<b>32. La frontière d'expression <i>Otx2/Gbx2</i> détermine la position de l'isthme</b>	<b>103</b>
<b>33. Structure cellulaire de la rétine de Vertébré</b>	<b>108</b>
<b>34. Mécanismes moléculaires de la phototransduction dans les photorécepteurs</b>	<b>110</b>
<b>35. Le cycle visuel</b>	<b>112</b>
<b>36. Expression d'<i>Otx2</i> dans la rétine adulte</b>	<b>116</b>
<b>37. Développement de l'oeil de Vertébré</b>	<b>118</b>
<b>38. Spécification des territoires rétiniens par <i>Otx2</i></b>	<b>121</b>
<b>39. Différenciation par vagues des types cellulaires de la rétine</b>	<b>123</b>
<b>40. <i>Otx2</i> est nécessaire dans le RPE pour assurer la survie des photorécepteurs</b>	<b>128</b>
<b>41. <i>Crx</i> interagit fonctionnellement avec <i>Nrl</i> et <i>Nr2e3</i></b>	<b>134</b>
<b>42. Modèle de fonctionnement d'<i>Otx2</i> au niveau de la MHB</b>	<b>195</b>

# TABLE DES ABRÉVIATIONS

Les abréviations suivantes ont été utilisées dans le texte de cette thèse ; leur sens est précisé dans le texte au moment de leur première utilisation :

**5'/3'-UTR** - région non-traduite en 5'/3' de l'ARNm

**AVE** - endoderme viscéral antérieur

**ChIP(-seq)** - immunoprécipitation de la chromatine (suivie de séquençage)

**CSF** - fluide cérébro-spinal

**DVE** - endoderme viscéral distal

**EGL** - couche granulaire externe (du cervelet)

**EX.X** - jour de développement X.X

**FSH** - *follicule stimulating hormone*

**LH** - *luteinizing hormone*

**GH** - hormone de croissance/*growth hormone*

**GnRH** - gonadolibérine/*Gonadotropin releasing hormone*

**IGL** - couche granulaire interne (du cervelet)

**INL** - couche nucléaire interne (de la rétine)

**IsO** - organisateur isthmique

**KO** - *knock-out*, ablation génétique d'un gène

**MS/MS** - spectrométrie de masse en tandem

**MHB** - frontière mésencéphale-métencéphale

**NLS** - signal de localisation cellulaire

**NR** - neurorétine

**ONL** - couche nucléaire externe (de la rétine)

**PR** - photorécepteurs

**PV** - parvalbumine

**PX.X** - jour postnatal X.X

**RA** - acide rétinoïque

**RIP(-seq)** - immunoprécipitation des ARN (suivie de séquençage)

**RPE** - épithélium rétinien pigmenté

**SNC** - système nerveux central

**ZLI** - *zona limitans intrathalamica*

# INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE LA THESE

Le développement embryonnaire d'un organisme aboutit à la formation de tissus spécialisés, appelés à assurer des fonctions particulières et formés de cellules parfois extrêmement différenciées. Leur mise en place résulte de l'action combinée de deux types de facteurs, extrinsèques d'une part et intrinsèques de l'autre. Les facteurs extrinsèques sont des signaux reçus par les cellules, parcourant parfois de longues distances. Les facteurs intrinsèques, de leur côté, permettent à chaque cellule de mettre en place son programme de différenciation, au moins en partie en réponse aux signaux externes. Les facteurs de transcriptions constituent une grande partie des facteurs intrinsèques. Ces protéines peuvent, de par leur structure particulière, se fixer à l'ADN en amont d'un ensemble de gènes-cibles et moduler leur niveau de transcription, contrôlant ainsi leur activité dans la cellule. Les dernières études suggèrent que jusqu'à 5% des gènes humains pourraient être des facteurs de transcription (entre 1400 et 1900, *Vaquerizas et al., 2009*). Ils sont donc abondants au sein du génome, et leur étude constitue une part importante de la biologie du développement.

L'action d'un grand nombre de facteurs de transcription au cours du développement a déjà été caractérisée au sein d'organismes modèles, notamment la souris *Mus musculus*. De façon remarquable, les effets d'un même facteur sont multiples et variables dans leur portée spatiale et temporelle. Ainsi, un seul gène peut être à la fois responsable de la régionalisation de grands territoires et de la différenciation de types cellulaires précis, et ce à différents moments du développement embryonnaire. Mais quels sont les processus moléculaires qui permettent à ces fonctions multiples d'avoir lieu en cohérence avec les autres processus développementaux à l'oeuvre ?

Cette question peut être abordée sous deux angles complémentaires. On peut d'une part se demander dans quelle mesure la régulation de son expression, et du niveau de cette dernière, contrôle également sa fonction. On verra dans la première partie de cette introduction que la spécification d'un territoire ou la différenciation d'une population de cellules vers un destin particulier par un facteur de transcription se fait souvent au

détriment d'un autre destin, qu'une population ou un territoire adjacent adopte au contraire. Il devient alors intéressant de déterminer les zones de compétence spatiales et temporelles au sein desquelles, par sa seule expression, un facteur de transcription est capable d'assurer une fonction déterminée, ainsi que les modalités de sa régulation au sein de la zone. D'autre part, on peut s'interroger sur le rôle du contexte cellulaire dans la détermination des divers rôles du facteur de transcription. En effet, l'effet d'un gène régulateur est également en partie dû à l'accessibilité relative de ses gènes cibles, ainsi qu'au protéotype de sa cellule d'expression. Ces deux approches permettent donc d'étudier à la fois les mécanismes permettant à un facteur de transcription d'exercer ses fonctions multiples et la façon dont elles sont fonctionnellement intégrées dans le développement global d'un organisme.

Cette thèse s'attache à répondre en partie à ces questions en étudiant les rôles du gène *Otx2* à différents instants de son expression dans la souris. L'importance de la régulation de son expression sera abordée dans un premier temps, en s'intéressant à sa fonction dans la délimitation des territoires du mésencéphale et du métencéphale. *Otx2* est en effet impliqué à E8,5 dans la mise en place de l'organiseur isthmique qui, par ses capacités inductives, est ensuite capable de spécifier le système nerveux central (SNC) postérieur. Le mésencéphale se développera en position antérieure relativement à l'organiseur isthmique, tandis que le métencéphale y sera postérieur. Les modalités de positionnement de ce centre organisateur par rapport à la zone d'expression d'*Otx2* en font un modèle intéressant. Initialement exprimé dans l'intégralité de l'épiblaste, cet homéogène est rapidement restreint au pôle antérieur de l'embryon ; l'organiseur isthmique s'installe à la frontière postérieure de sa nouvelle zone d'expression. Plusieurs études ont pu confirmer que la position de cette frontière dictait l'emplacement de l'isthme ; cependant, aucune ne s'est intéressée à l'étendue de la zone de compétence au sein de laquelle ce processus pouvait avoir lieu. Un modèle murin d'expression inductible d'*Otx2* a permis l'obtention d'embryons mutants dans lesquels la restriction antérieure d'*Otx2* n'avait pas complètement lieu ; sa frontière postérieure d'expression est alors abolie au profit d'une présence plus uniforme du gène. Selon le modèle actuel, si l'isthme venait à être mis en place, il le serait alors à l'extrémité postérieure de la zone compétente pour l'accueillir. De façon surprenante, c'est pourtant le contraire qui se produit : l'expression de tous les facteurs impliqués dans l'établissement de l'organiseur isthmique est déplacée antérieurement. L'identité métencéphalique est également étendue vers l'avant. Ce phénotype est similaire à celui d'embryons mutants pour *Otx2*. Ainsi, une

expression quasi-uniforme d'*Otx2* a les mêmes effets qu'un KO de ce gène. Ces résultats indiquent qu'une régulation fine d'*Otx2* est nécessaire pour permettre la régionalisation correcte de l'embryon, en assurant la présence d'un seuil net de concentration de cet homéogène : elle est donc essentielle à la fonction d'*Otx2*.

Dans un second temps, l'importance du contexte cellulaire sera étudiée au niveau de 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. Un modèle génétique développé au laboratoire a permis de révéler que l'ablation généralisée du gène *Otx2* dans la rétine entraîne la dégénérescence exclusive des photorécepteurs. Pourtant, les fonctions moléculaires immédiatement affectées par ce KO sont spécifiques du RPE. Il s'avère après une analyse approfondie qu'une délétion d'*Otx2* restreinte au RPE est suffisante pour récapituler le phénotype de dégénérescence. A l'inverse, forcer l'expression de cet homéogène dans le RPE d'une rétine KO suffit à protéger les photorécepteurs. *Otx2* exerce donc dans l'épithélium pigmenté une fonction essentielle à la survie des photorécepteurs, alors qu'il paraît facultatif dans ces derniers. Afin de mieux comprendre ces différences fonctionnelles dans deux tissus très proches et étroitement liés, deux approches ont été mises en place. Le répertoire des sites de fixation d'*Otx2* a d'une part été étudié par ChIP-seq dans le RPE et la neurorétine ; il en ressort que l'occupation génomique par ce facteur de transcription est extrêmement différente dans les deux tissus, ce qui suggère qu'*Otx2* y jouerait des fonctions distinctes. Les sites de fixation d'*Otx2* dans la neurorétine recouvrent qui plus est largement ceux de son paralogue *Crx* ; une redondance fonctionnelle de ces deux homéogènes est donc envisageable. D'autre part, une étude de protéomique centrée sur *Otx2* a été menée dans la neurorétine. La différence d'importance entre *Otx2* et *Crx* dans la neurorétine pourrait en effet provenir d'interactomes différents de ces deux protéines. Notamment, des partenaires protéiques différents confèreraient des facultés de fixation et de régulation distinctes. En effet, l'étude des interacteurs d'*Otx2* révèle qu'aucun des facteurs cruciaux pour le fonctionnement normal de la rétine adulte n'interagit avec *Otx2 in vivo*, alors qu'ils développent des liaisons au pouvoir synergique avec *Crx*. De plus, cette étude protéomique a révélé des partenaires de la protéine *Otx2* jusque là inconnus, qui suggèrent des fonctions encore inexplorées de ce facteur de transcription, dans la régulation de l'épissage et de la traduction notamment.

La partie introductive de cette thèse a pour but de résumer les connaissances accumulées sur le facteur de transcription *Otx2* et sur les fonctions qu'il peut endosser lors du développement embryonnaire de la souris. Après avoir décrit la structure de la famille *Otx*, au niveau phylogénétique et moléculaire, le premier chapitre s'attachera à exposer les différents rôles que peut jouer le gène *Otx2* au cours du développement et de la vie d'un Vertébré, en les reliant à l'expression spatio-temporelle extrêmement dynamique de ce gène. Les deux chapitres suivants détailleront davantage les deux sous-parties de cette dynamique d'expression qui ont servi de modèles aux différents axes de ce travail de thèse : le second se penchera sur le rôle d'*Otx2* dans la régionalisation et la spécification du mésencéphale, tandis que le troisième sera centré sur les fonctions qu'il joue dans l'établissement et l'entretien de la rétine d'un organisme modèle, la souris *Mus musculus*.

## **I. Otx2 , un facteur de transcription à l'expression dynamique associée à des fonctions multiples**

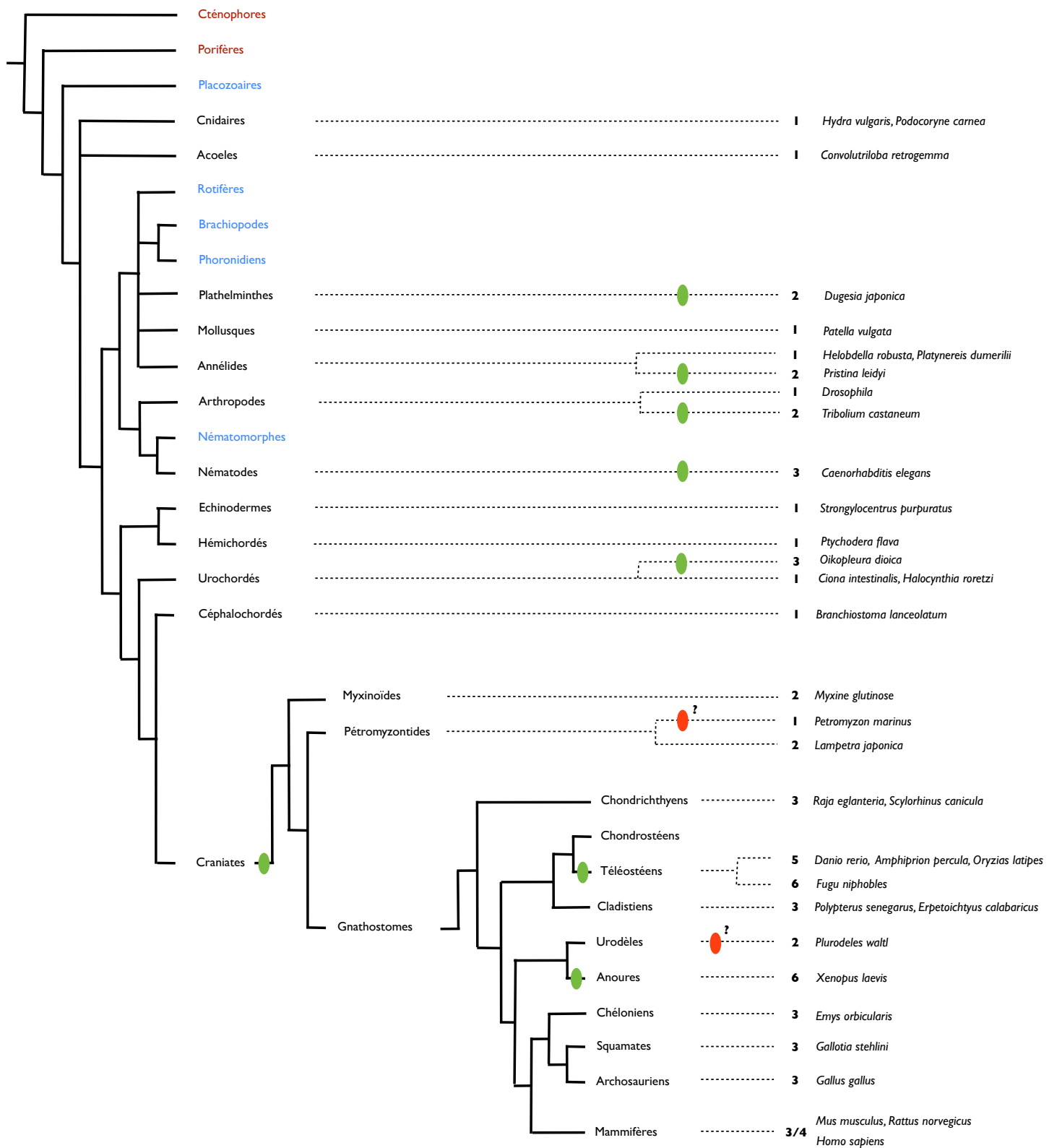
### I.1. Biologie moléculaire de la famille Otx

#### I.1.1 Présentation et phylogénie

I.1.1.1 Une famille présente de manière ubiquitaire dans le règne animal.

D'abord découverte chez la mouche à la suite d'un crible de mutants létaux à la recherche de phénotypes aberrants au niveau de la tête (*Finkelstein et al., 1990*), puis rapidement chez la souris par homologie de séquence (*Simeone et al., 1992*), la famille *Otx* a depuis pu être caractérisée dans la très grande majorité des embranchements du règne animal (**Figure 1**). On la trouve ainsi dans tous les embranchements des Deutérostomiens, des Chordés (*Imai et al., 2002, Williams et Holland, 1998*) aux Echinodermes (*Li et al., 1997*). Par ailleurs, en plus de sa présence déjà mentionnée chez





**Figure 1 : Phylogénie de la famille *Otx*.**

Arbre phylogénétique des Métazoaires adapté de *Lecointre et Le Guyader, 2001, Moroz et al., 2014, Nielsen, 2012*. Les groupes dans lesquels au moins un gène *Otx* a été découvert sont indiqués en noir. Ceux dans lesquels la famille *Otx* a été démontrée absente sont écrits en rouge, tandis que ceux dans lesquels son existence est encore inconnue sont indiqués en bleus. A droite sont indiquées les espèces utilisées dans chaque groupe ainsi que le nombre de gènes qu'elles présentent. Les pastilles vertes indiquent un événement de dupli-/triplication au sein de la famille *Otx*, placé de la façon la plus parcimonieuse. Dans ce cadre, les pastilles rouges indiquent des événements probables de dégénérescence d'un des gènes de la famille. Les Mammifères possèdent 3 ou 4 gènes *Otx* selon le choix d'intégrer ou non *Otx3*.

D'après *Finkelstein et al., 1990, Zhang et al., 2002, Simeone et al., 1992, Cañestro et al., 2005, Li et al., 1996, Bely et Wray, 2001, Veilleux et al., 2013, Lanjuin et al., 2003, Imai et al., 2002, Wada et al., 1996, Tomsa et al., 1999, Williams et Holland, 1998, Li et al., 1997, Bruce et Shankland, 1998, Steinmetz et al., 2010, Smith et al., 1999, Ueki et al., 1998, Suda et al., 2009, Nederbragt et al., 2002, Sikes et Bely, 2010, Müller et al., 1999, Germot et al., 2001, Umesono et al., 1999, Coolen et al., 2007, Harada et al., 2000, Sauka-Spengler et al., 2001, Sauka-Spengler et al., 2002*

les Arthropodes, elle a également été identifiée chez les autres Protostomiens, que ce soit chez les Nématodes (*Satterlee et al., 2001*), les Annélides (*Bruce et Shankland, 1998, Steinmetz et al. 2010*), les Plathelminthes (*Umesono et al., 1999*) et les Mollusques (*Nederbragt et al., 2002*). Enfin, on peut la retrouver chez les Acoeles (*Sikes et Bely, 2010*) et les Cnidaires (*Müller et al., 1999, Smith, 1999*). De fait, les seuls embranchements où la famille *Otx* est absente (de façon corrélée, incidemment, à l'absence des gènes *Hox*) sont les Cténophores et les Porifères, et cette absence est une des raisons pour lesquelles les Cténophores sont maintenant placés comme l'embranchement le plus basal des Métazoaires (*Moroz et al., 2014*). La famille *Otx* est donc un élément ubiquitaire des génomes métazoaires; cependant, sa composition a évolué.

#### I.1.1.2 Une famille multigénique

La plupart des Métazoaires ne présentent qu'un seul gène de la famille *Otx*, mais on peut noter plusieurs exceptions à cette règle. Tous les craniates étudiés, notamment, possèdent plusieurs gènes de cette famille. On a pu en effet identifier clairement trois classes d'orthologie, *Otx1*, *Otx2*, et *Otx5/Crx*, dans l'ensemble des gnathostomes (*Germot et al., 2001*). Plusieurs gènes existent également chez les agnathes (*Germot et al., 2001, Tomsa et Langeland, 1999*), même si leurs relations avec les classes d'orthologie des gnathostomes n'ont pas été établies. Les céphalochordés et les urochordés, groupes frères des craniates, ne possédant qu'un seul gène *Otx* (*Williams et Holland 1998, Imai et al., 2002*), la présence de plusieurs gènes *Otx* chez ces derniers est donc dûe à un événement de duplication à partir d'un gène ancestral, concomitante à la radiation des gnathostomes.

Si cet événement de duplication touche un clade entier, d'autres événements du même type ont pu avoir lieu de manière indépendante et isolée dans d'autres espèces. La planaire *Dugesia japonica* possède par exemple deux gènes *Otx* (*Umesono et al., 1999*), tandis que le génome du nématode *Caenorhabditis elegans* en présente trois (*Lanjuin et al., 2003*). Au sein même des gnathostomes, un second épisode de duplication a eu lieu chez certaines espèces. Le xénope du Cap *Xenopus laevis*, par exemple, possède six gènes de la famille *Otx*, deux par classe d'orthologie (*XOtx2* et *OtxA*, *Blitz et Cho 1995*,

*XOtx1* et *XOtx4*, Kablar et al., 1996, *XOtx5* et *XOtx5b*, Kuroda et al., 2000, Vignali et al., 2000). Seulement deux gènes *Otx* existent chez l'urodèle *Pleurodeles waltl* (Sauka-Spengler et al., 2002), ce qui indique une duplication des trois membres de la famille *Otx* gnathostome uniquement chez les Anoures. De la même façon, une duplication génomique a eu lieu dans un ancêtre commun des Téléostéens avant leur radiation (Amores et al., 1998). Plutôt que d'entraîner la dégénérescence par mutation d'une des deux copies de chaque gène présentes à l'issue d'un tel événement, l'évolution a pu dans certains cas mener à une ségrégation fonctionnelle de ces deux copies, souvent par ségrégation des patrons d'expression (Force et al., 1999). Dans le cas de la famille *Otx*, les 6 gènes issus de la duplication des trois paralogues communs à tous les gnathostomes ont été conservés dans certaines espèces, comme le fugu *Fugu niphobles* (Suda et al., 2009). Souvent, cependant, une des copies d'*Otx2* a dégénéré et été perdue, ce qu'on peut observer chez le poisson-zèbre *Danio rerio* et le medaka *Oryzias latipes* (listés dans Suda et al., 2009).

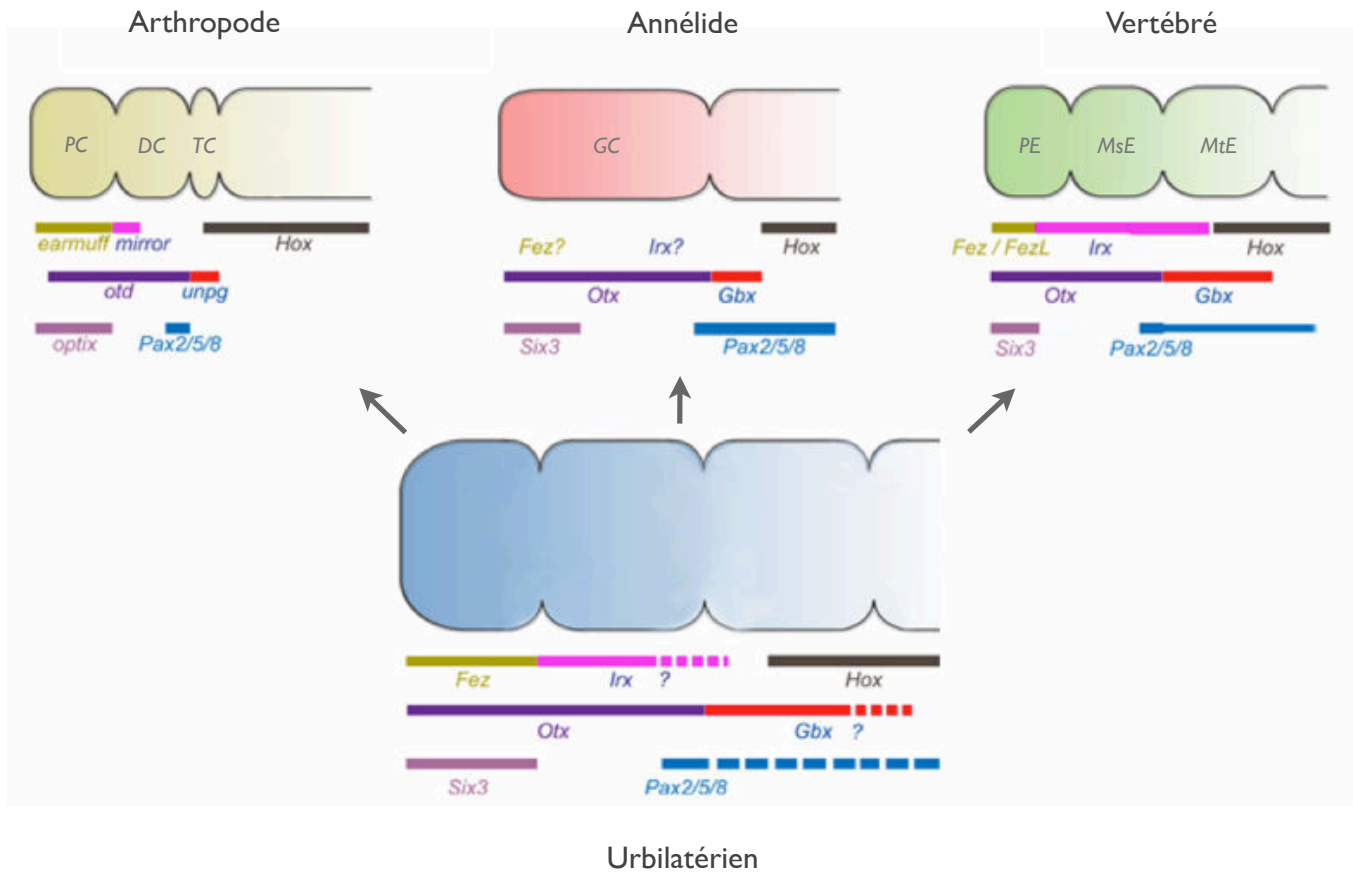
La découverte indépendante de *Dmbx1/Otx3* par deux équipes en 2002 (Ohtoshi et al., 2002, Zhang et al., 2002) vient compliquer cette analyse phylogénétique. La séquence de cet homéogène, dont l'existence est prédite chez l'homme et le poisson-zèbre, et avérée chez la souris et le rat, a pour plus proches voisines phylogénétiques les séquences des autres gènes *Otx* (65% de similarité avec chacun d'entre eux, Zhang et al., 2002). En particulier, l'homéodomaine de *Dmbx1/Otx3* est particulièrement proche de ceux des autres membres de la famille *Otx*. Par ailleurs, le patron d'expression de *Dmbx1/Otx3* coïncide en grande partie avec celui d'autres membres de la famille *Otx* (Ohtoshi et al., 2002, Zhang et al., 2002). Une analyse phylogénétique plus approfondie de ce gène à travers les Gnathostomes permettrait de vérifier l'appartenance éventuelle de *Dmbx1/Otx3* à une des trois classes d'orthologie des Gnathostomes, et dans tous les cas de mesurer l'étendue de la présence de ce gène chez les Gnathostomes. Le cas échéant, elle permettrait même d'ajouter une classe d'orthologie à la famille *Otx*.

Ainsi, la famille *Otx*, bien que monogénique dans la plupart des cas, peut être constituée de plusieurs gènes au sein d'une même espèce, comme le montre de façon plus complète la **Figure 1**. C'est notamment le cas dans les modèles animaux Vertébrés de laboratoire.

### I.1.1.3. Des fonctions conservées à travers l'évolution

Les différentes fonctions de la famille *Otx*, et plus particulièrement du gène *Otx2*, seront décrites plus loin, mais il est déjà possible de relever ici des rôles que cette famille semble conserver dans la plupart, sinon toutes, les espèces chez lesquelles elle est présente.

Une fonction dans l'organisation de la partie antérieure de l'organisme, et plus particulièrement de son système nerveux central (lorsque celui-ci est présent), semble être de loin la plus associée à la famille *Otx*. Chez tous les bilatériens, lorsqu'un axe antéro-postérieur est présent, les membres de la famille *Otx* sont exprimés de façon extrêmement antérieure. Cela se vérifie dans des groupes aussi précocément divergents que les Acoeles, chez qui *Otx* est exprimé au pôle antérieur à la fois dans l'organisme lui-même, et dans ses bourgeons une fois leur polarité antéro-postérieure établie (*Sikes et Bely, 2010*). Cette antériorité se retrouve chez les Lophotrochozoaires : les deux gènes *Otx* de la planaire *Dugesia japonica* sont exprimés dans le système nerveux central (SNC) antérieur et marquent la zone du futur cerveau dans des parties postérieures de planaires en régénération (*Umesono et al., 1999*), tandis que le gène *Otx* du Mollusque *Patella vulgata* marque le stomodaeum des larves. Chez les Annélides *Pristina leidy* et *Platynereis dumerilii* également, la famille *Otx* est exprimée au pôle antérieur de l'animal, immédiatement à l'arrière d'une région positive pour l'expression du gène *Six3* (*Steinmetz et al., 2010*). De la même façon, chez les Ecdysozoaires, les gènes *otd* de la drosophile et *otd-1* et *otd-2* de *Tribolium castaneum* sont exprimés dans le SNC antérieur (*Li et al., 1996, Finkelstein et al., 1990*) ; au niveau embryonnaire même, le patron d'expression d'*otd* chez la drosophile consiste en une bande de noyaux située aux trois-quarts de l'embryon, du côté antérieur. Enfin, chez les Deutérostomiens, cette expression antérieure de la famille *Otx* se retrouve chez tous les embranchements non-radiaires : chez les Hémichordés (*Cañestro et al., 2005*), les Céphalochordés (*Williams et Holland, 1998*), les Pétromyzontides (*Tomsa et al., 1999*), et tous les Gnathostomes (*Sauka-Spengler et al., 2002, Suda et al., 2009, Pannese et al., 1995, Bally-Cuif et al., 1995, Simeone et al., 1992*). L'antériorité de l'expression des gènes *Otx*, et sa position extrêmement conservée par rapport à d'autres patrons d'expression génétique (notamment ceux des facteurs de



**Figure 2 : Structure et régionalisation moléculaire des SNC de trois Bilatériens actuels, et de leur ancêtre commun, l'Urbilatérien.**

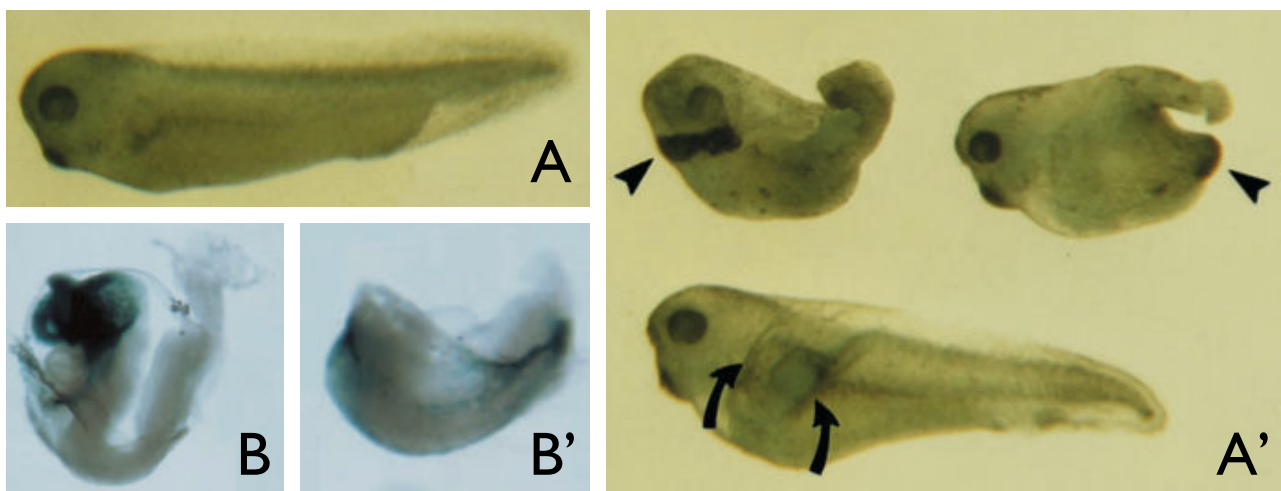
Les patrons d'expressions de plusieurs gènes le long de l'axe antéro-postérieur des SNC de l'Arthropode *Drosophila melanogaster*, de l'Annélide *Platynereis dumerilii*, et du Vertébré *Mus musculus*, permettent d'inférer la structure probable du SNC de l'ancêtre commun des Bilatériens : un système tripartite caractérisé par l'expression de facteurs de transcription particuliers, dont la famille *Otx* en violet, exprimée très antérieurement.

*PC* : Protocerebrum, *DC* : Deutocerebrum, *TC* : Tritocerebrum, *GC* : ganglion cérébral, *PE* : Prosencéphale, *MsE* : Mésencéphale, *MtE* : Métencéphale. D'après *Holland et al., 2013*

transcription *unpg/Gbx* et *Pax2/5/8*), sont en fait si générales chez les Bilatériens, qu'elle a mené l'équipe de Heinrich Reichert à postuler l'homologie entre le système nerveux de la drosophile et des Vertébrés (*Hirth et al., 2003*). Cette hypothèse est à son tour un argument très fort en faveur d'une organisation tripartite du SNC de l'ancêtre commun de tous les Bilatériens (*Holland et al., 2013*), dans laquelle *Otx* servirait de marqueur aux domaines les plus antérieurs (**Figure 2**).

L'universalité de cette expression antérieure de la famille *Otx* est corrélée, au moins chez les Vertébrés, à un rôle majeur de ces gènes dans l'induction et la mise en place des territoires antérieurs de l'embryon. Dans toutes les espèces chez qui sa fonction a été testée, une perturbation de l'expression de la famille *Otx* résulte en des défauts morphologiques plus ou moins extrêmes du SNC et des structures antérieures de

l'embryon. Chez le Xénope, une expression ectopique de *XOtx2* dans l'embryon par injection d'ARNm mène à une diminution en taille du tronc et de la queue, pouvant dans certains cas aboutir à une disparition de cette dernière. Cette altération des structures postérieures s'accompagne d'une apparition de structures supplémentaires : certains embryons présentent une glande cémentaire additionnelle, et une petite fraction développent même un axe secondaire antérieurement depuis le tronc (*Pannese et al., 1995, Figure 3A,A'*). Chez la souris, une délétion constitutive (*knock-out, KO*) du gène *Otx2* empêche la mise en place des prosencéphale et mésencéphale (*Acampora et al., 1995, Figure 3B,B'*), et les marqueurs de la plaque neurale antérieure ne s'expriment pas dans les embryons *Otx2*<sup>-/-</sup> (*Rhinn et al., 1998*). Chez le poisson-zèbre, un traitement des embryons par des morpholinos contre *Otx1-like* et *Otx2* n'aboutit pas à un phénotype aussi drastique (peut-être parce que d'autres gènes *Otx* sont encore exprimés avec succès dans le système nerveux), mais le mésencéphale et l'épiphyse sont tout de même absents dans les morphants (*Foucher et al., 2006*). Non contente d'être exprimée de façon antérieure dans l'écrasante majorité des Bilatériens, la famille *Otx* est donc responsable, chez toutes les espèces testées, du développement correct des structures antérieures de l'embryon. Il est par conséquent possible de lui supposer un rôle similaire chez l'ensemble



**Figure 3 : Conséquences d'une perturbation de l'expression de la famille *Otx*.**

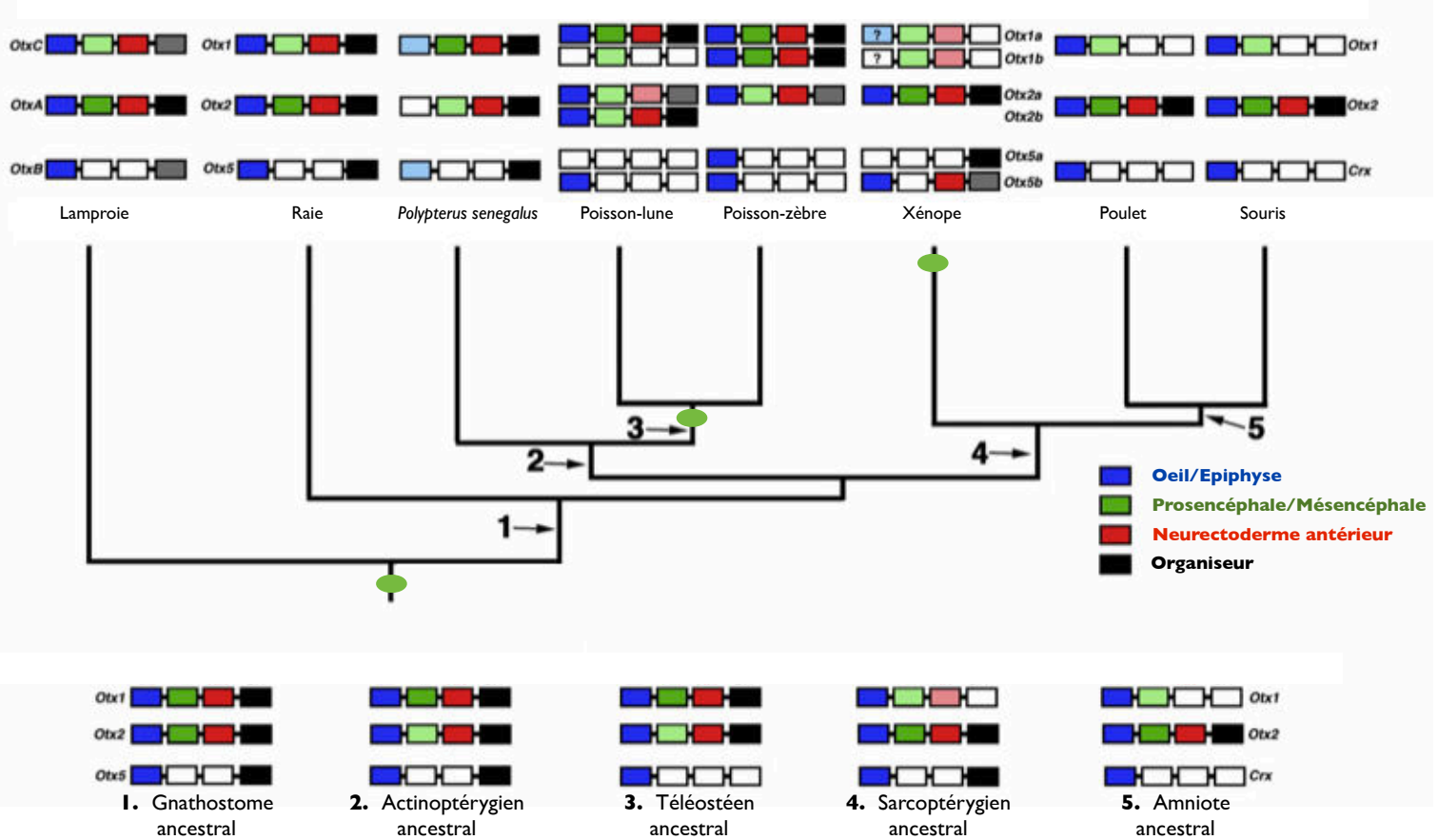
(A,A') Conséquences d'une surexpression de *XOtx2* chez le xénope, par injection d'ARNm *XOtx2* dans l'embryon au stade une cellule. Comparés aux embryons non traités, ou injectés avec une forme non-fonctionnelle de *XOtx2* (A), les embryons traités présentent des structures postérieures de taille réduite (A'), et des glandes cémentaires additionnelles pour 8 à 33% d'entre eux (A' en haut, les têtes de flèche pointent les glandes supplémentaires, marquées en hybridation *in situ* par XCG-1). Entre 2 et 10% des embryons traités développent même un axe secondaire (A' en bas, les flèches marquent chaque extrémité de l'axe secondaire). D'après *Pannese et al., 1995*.

(B,B') Conséquences d'une délétion constitutive d'*Otx2* chez la souris. Si les embryons sauvages ou hétérozygotes (B) ont une morphologie normale, le prosencéphale, mésencéphale, ainsi que toutes les structures non-neurales de la tête sont absentes chez les mutants homozygotes *Otx2*<sup>-/-</sup> (B'). D'après *Acampora et al., 1995*

des Bilatériens, et d'en faire un acteur de régionalisation antéro-postérieure majeur de ce groupe, à l'instar des gènes *Hox*, qui serait responsable de la mise en place des structures les plus antérieures, notamment au niveau du SNC.

Chez beaucoup de Bilatériens, la famille *Otx* est également associée au développement des organes sensoriels, et notamment des yeux. Dès les Plathelminthes, comme par exemple la planaire *Dugesia japonica*, les cellules qui expriment *DjOtxA* sont innervées par les axones visuels, et Umesono et ses collègues attribuent à ce domaine d'expression de *DjOtxA* une fonction de phototransduction (Umesono et al., 1999) ; le domaine *Otx+* inclut aussi le territoire de l'oeil présomptif chez un autre Lophotrochozoaire, l'Annélide *Platynereis dumerillii* (Steinmetz et al., 2010). Chez la drosophile, *otd* est exprimé dans l'organe de Bolwig (système visuel de la larve), ainsi que chez son dérivé chez l'adulte, l'organe de Hofbauer-Buchner (Ranade et al., 2008). Il est également exprimé dans les photorécepteurs de l'oeil adulte (Vandendries et al., 1996). Son expression dans ces organes n'est pas anodine : en l'absence d'expression d'*otd*, un sous-type de photorécepteurs de l'organe de Bolwig, qui expriment en temps normal la *rhodopsine 5*, n'est pas présent (Sprecher et al., 2007). C'est également le cas chez l'adulte : *otd* assure la mise en place correcte de deux sous-types de photorécepteurs permettant la vision en couleur (Tahayato et al., 2003). Certaines mutations de ce gène provoquent même des phénotypes plus drastiques, telle une absence de l'organe de Hofbauer-Buchner (mutation *ocelliless*, Finkelstein et al., 1990), ou des malformations des photorécepteurs de l'oeil adulte (Vandendries et al., 1996). Chez les Nématodes, en absence d'organes visuels, on retrouve tout de même les membres de la famille *Otx* dans le système sensoriel : *ttx-1* est exprimé dans des neurones thermosensoriels, tandis que *ceh-36* et *ceh-37* sont exprimés dans des neurones chémosensoriels (Satterlee et al., 2001, Lanjuin et al., 2003), et leur mutation empêche le développement correct de ces neurones. Chez les Protostomiens, la famille *Otx* est donc associée à, et sans doute responsable de la mise en place de certaines parties du système sensoriel, en particulier le système visuel.

L'implication des gènes *Otx* dans le système sensoriel se retrouve dans les organismes deutérostomiens. Wada et confrères ont détecté l'expression du seul membre de la famille *Otx* présent dans le génome de l'ascidie *Halocynthia roretzi*, Hroth, dans les cellules destinées à former la vésicule sensorielle (Wada et al., 1996). Chez la lamproie *Lampetra japonica*, les gènes *LjOtxA* et *LjOtxB* sont exprimés dans les placodes



**Figure 4 : Evolution de la répartition des fonctions de la famille *Otx* chez les Deutérostomiens.**

L'expression de chaque membre de la famille *Otx* présent dans les différentes espèces est indiquée en suivant le code couleur sur la droite. La composition putative de la famille *Otx* à chaque noeud numéroté (de 1 à 5), ainsi que son patron d'expression, est indiquée en-dessous de l'arbre. Les pastilles vertes indiquent un événement de dupli-/triplication au sein de la famille *Otx*, probablement dû à un événement de duplication du génome entier. D'après Suda et al., 2009.

olfactives, et *LjOtxB* est également retrouvé dans les yeux en développement (Ueki et al., 1998). Suda et d'autres scientifiques de l'institut RIKEN, en comparant les expressions des membres de la famille *Otx* dans différents Deutérostomiens aquatiques, ont pu démontrer l'expression d'au moins un gène *Otx/Crx* au niveau des yeux dans chacune des espèces (Suda et al., 2009, **Figure 4**). On retrouve également l'expression d'au moins un gène *Otx/Crx* au niveau de l'oeil et de la placode olfactive chez le Chondrichthyen *Scyliorhinus canicula* (Sauka-Spengler et al., 2001), et au niveau de l'oeil du Xénope (*XOtx5b*, Vignali et al. 2000) et du poisson-zèbre (*Crx*, Liu et al., 2001). Chez les Mammifères, enfin, le gène *Otx2* murin est exprimé dans l'épithélium olfactif (Mallamaci et al., 1996) et dans l'oeil en développement, ainsi que dans la rétine adulte (Fossat et al., 2007), tandis que le gène *Crx* murin est exprimé dans la rétine à partir de E12.5 jusqu'à l'âge adulte (Chen et al., 1997). Le rôle de la famille *Otx* dans le système visuel des membres de cette dernière classe a été étudié plus en profondeur, et il s'avère que ces gènes jouent un rôle majeur dans le développement et le maintien de la rétine. Les



mécanismes précis dans lesquels ils sont impliqués seront décrits plus précisément dans la troisième partie de cette introduction, mais il est déjà possible de noter que des mutations dans les gènes *Otx2* et *Crx* humains sont respectivement responsables de microphthalmies/anophthalmies (Wyatt et al., 2008, Schilter et al., 2011) et de dystrophies des photorécepteurs (Swain et al., 1997, Freund et al., 1997). Ainsi, la famille *Otx* est exprimée au niveau du système sensoriel, et plus particulièrement visuel, d'un grand nombre de Bilatériens, et pourrait jouer un rôle majeur dans sa mise en place au sein de cet embranchement phylogénétique, à condition de généraliser les données établies chez les Mammifères.

Pour finir, certaines fonctions plus mécanistiques peuvent être associées aux gènes *Otx*.

Cette famille génétique semble d'une part associée à la régulation des mouvements cellulaires, et par là même des propriétés d'adhésion cellulaire. Chez l'hydre *Hydra vulgaris* déjà, l'expression de *CnOtx* dans le bourgeon corrèle avec une phase de réarrangements et mouvements cellulaires intenses (Smith et al., 1999). Chez les chordés, la famille *Otx* semble jouer un rôle dans les mouvements cellulaires durant la gastrulation, et ce dès la radiation des Urochordés : cette hypothèse est en effet déjà formulée chez l'ascidie *Halocynthia roretzi* (Wada et al., 1996). Une perturbation dans l'expression des gènes *Otx* aboutit également à des mouvements gastrulatoires anormaux dans de nombreux Vertébrés (chez le Xénope, Pannese et al., 1995, et la souris, Ang et al. 1996, Perea-Gomez et al., 2001) ; elle est par exemple absolument nécessaire à la migration de l'endoderme viscéral, comme le montrera la partie I.2.1.1.2. Chez le poisson-zebre enfin, deux gènes *Otx*, *Otx1* et *Otx3*, sont exprimés dans le mésendoderme antérieur en mouvement lors de la gastrulation (Mercier et al., 1995). La famille *Otx* semble donc bien réguler les mouvements cellulaires, notamment au cours de la gastrulation, très probablement grâce à sa capacité ubiquitaire à réguler les propriétés d'adhésion des cellules. De fait une expression ectopique d'*Otx1* dans des embryons de poisson-zebre provoque l'agrégation des cellules qui l'expriment, et ce même après la gastrulation (Bellipanni et al., 2000); une injection d'ARNm *Otx2* dans l'embryon provoque pour sa part une épibolie aberrante et des problèmes de gastrulation (Rhinn et al., 2009). Les gènes *Otx* sont par ailleurs capables de réguler l'expression de nombreuses molécules d'adhésion chez la souris, telles que *ephrinA2*, *R-cadherin*, *N-cadherin*, *tenascin-C*, *NCAM* (de façon directe), et *thy-1* (Rhinn et al., 1999, Zakin et al., 2000, Housset et al., 2013, Gherzi et al., 1997, Nguyen Ba-Charvet et al., 1998, 1999). Un rôle dans la régulation directe de la motilité cellulaire n'est pas non plus à écarter : chez le

xénope, *XOtx2* active l'équivalent de la *calponin*, qui bloque le processus d'extension convergente dans les cellules qui l'expriment en empêchant la contraction des filaments d'actine (*Morgan et al., 1999*).

D'autre part, la famille *Otx* pourrait influencer la prolifération cellulaire dans les tissus où elle est exprimée, mais ce rôle reste encore très hypothétique. En 1997, des travaux sur l'oursin ont permis d'observer que l'expression du gène *Otx* de *Strongylocentrotus purpuratus*, notamment via son isoforme *SpOtx(β)*, est restreinte aux cellules de l'embryon en division active, ce qui a fait supposer aux auteurs un rôle de ce dernier dans la prolifération cellulaire (*Li et al., 1997*). Chez les Mammifères, un rôle d'*Otx2* sur la prolifération cellulaire a également été dégagé, mais les études ont été menées principalement *in vitro*, et leurs résultats divergent : la surexpression d'*Otx2* dans des lignées cellulaires, cancéreuses ou non, qui ne l'exprimaient pas entraîne dans certains cas une augmentation de la prolifération (*Adamson et al., 2010*), tandis que dans d'autres elle aboutit à la sénescence des cellules, accompagnée d'une activation forte des gènes associés à la phase G2-M du cycle cellulaire (*Bunt et al., 2010*). *In vivo*, l'équipe du Dr. Simeone a pu montrer dans une série d'études qui s'intéressaient au rôle d'*Otx2* dans la mise en place des différentes populations neuronales du mésencéphale ventral que ce gène y contrôlait la prolifération des neurones dopaminergiques. Une surexpression d'*Otx2* entraîne en effet une augmentation spécifique de la prolifération de ce sous-type de neurones sans affecter les populations voisines (*Omodei et al., 2008*).

Il est ainsi possible d'isoler plusieurs fonctions que la famille *Otx* semble assurer chaque fois qu'elle est présente. De quelle manière ces fonctions se répartissent-elles entre les membres de la famille *Otx* lorsque plusieurs sont présents au sein d'une espèce ? Lors de leur étude extensive des patrons d'expression des gènes *Otx* dans un grand nombre de vertébrés, Suda et confrères ont isolé quatre zones d'expression dans lesquelles au moins un membre de la famille *Otx* est toujours exprimé. En croisant leurs données d'expression et la phylogénie de leurs espèces d'intérêt, ils ont alors pu retracer, au cours de l'évolution, une spécialisation de l'expression de certains membres de la famille, possiblement associée à une spécialisation fonctionnelle (*Suda et al., 2009*, **Figure 4**). Les membres de la famille *Otx5/Crx* auraient par exemple perdu leur expression dans le neurectoderme antérieur, puis dans les prosencéphale et mésencéphale, au moment de la radiation des Gnathostomes (**Figure 4**, point 1). Ils se seraient par la suite encore davantage spécialisés chez les Téléostéens et Amniotes, affichant une expression restreinte à l'oeil et à l'épiphyse (**Figure 4**, points 3 et 5), tandis

que les gènes de la famille *Otx1*, de leur côté auraient perdu leur expression dans le neurectoderme antérieur et l'organisateur des Amniotes (**Figure 4**, point 5). Les gènes *Otx5/Crx* semblent ainsi préférentiellement associés aux fonctions relatives au développement et au fonctionnement corrects de l'oeil, à l'exclusion plus ou moins totale des autres (*Plouhinec et al., 2003, Suda et al., 2009*).

La dynamique d'expression et la répartition des fonctions des gènes *Otx* au sein de l'oeil des gnathostomes a d'ailleurs été étudiée de façon plus approfondie par Plouhinec et confrères en 2005. Par comparaison des patrons d'expression de tous les membres de la famille *Otx* dans l'oeil en développement d'un chondrichthyen d'une part (la roussette *Scyliorhinus canicula*), et d'un archosaurien (le poulet *Gallus gallus*), ils ont pu observer que les gènes *Otx* présentent trois patrons d'expression clairement spécialisés et différents, bien que superposables par endroits. Ces patrons sont hautement conservés dans l'ensemble des Gnathostomes, et permettent d'associer des fonctions distinctes à chacun des gènes *Otx* dans la formation de l'oeil, véhiculant ainsi une fois de plus l'idée d'une répartition des fonctions générales de la famille génétique entre ses différents membres (*Plouhinec et al., 2005*).

Cela dit, d'une manière générale, la dynamique d'expression globale de la famille *Otx* (et les fonctions qui y seraient associées) est remarquablement conservée au cours de l'évolution (*Acampora et al., 2001, Germot et al. 2001*). Il est donc possible de supposer que cette famille génétique assure des fonctions essentielles au développement, et subit par conséquent une pression de conservation considérable.

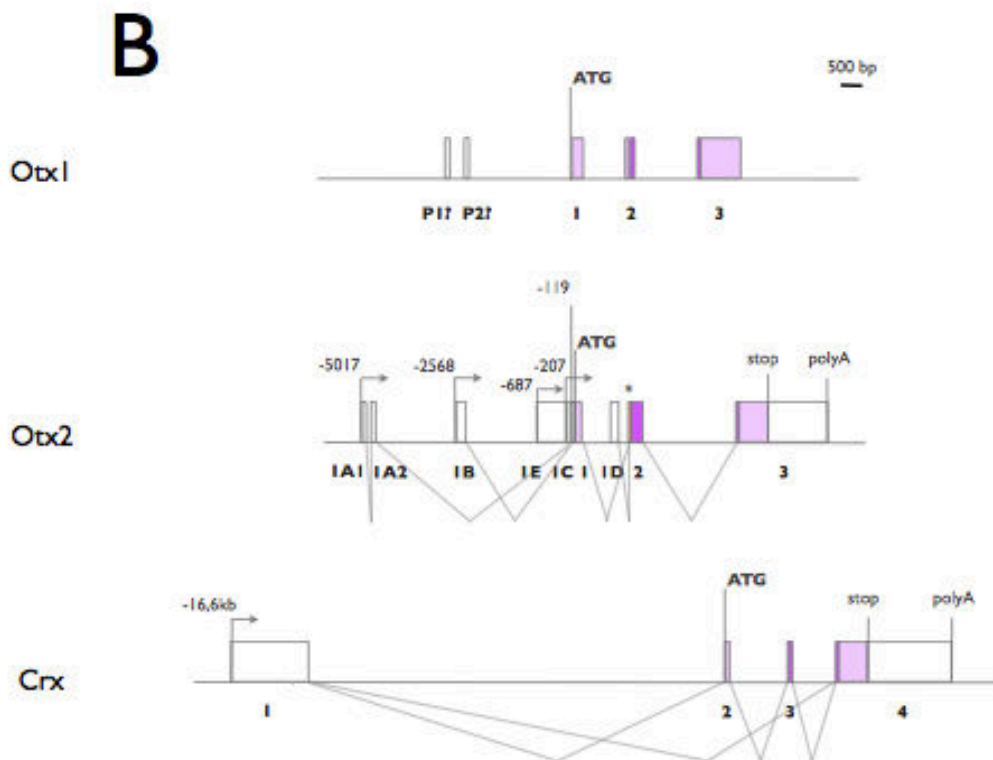
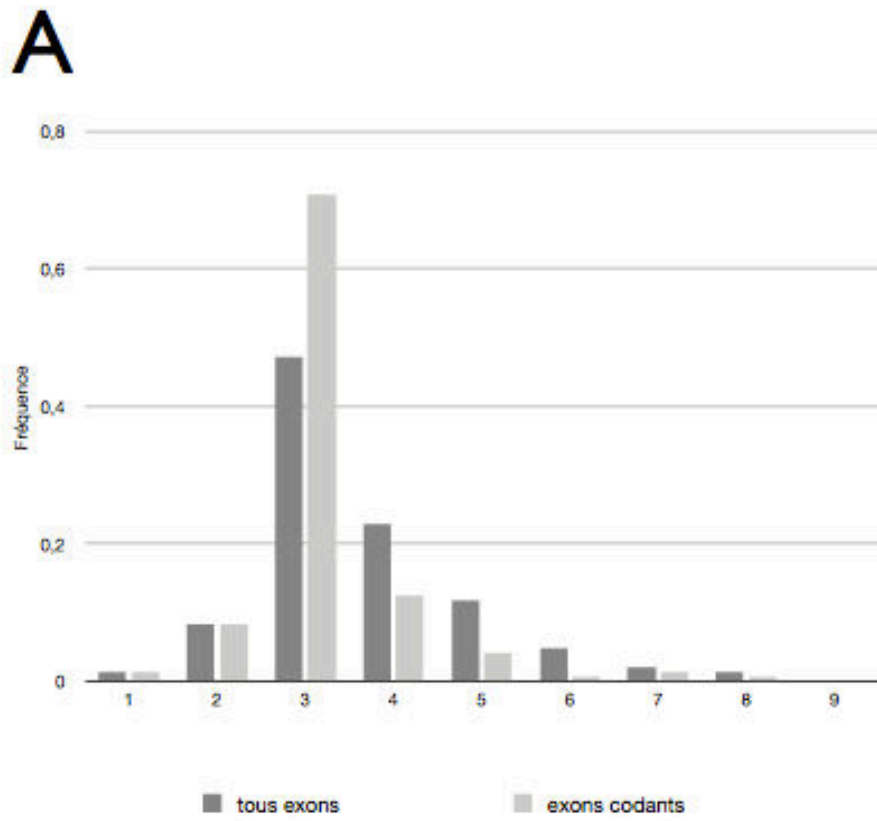
La prochaine partie portant sur la biologie moléculaire de la famille *Otx*, il sera d'ailleurs possible de remarquer que cette pression de conservation s'observe aussi au niveau protéique : les homéodomaines de tous les membres connus ont notamment des séquences extrêmement semblables, au point que certains gènes *Otx/otd* issus d'espèces différentes sont fonctionnellement interchangeables.

## I.1.2 Du gène à la protéine

### I.1.2.1. Structure des gènes *Otx*

Tous les gènes *Otx/Crx* moléculairement caractérisés sont mosaïques (*Freund et al. 1997, Simeone et al. 1993, Courtois et al. 2003, Hodges et al. 2002, Kiyama et al., 1998, Oda Ishii et Saiga, 2003, Vandendries et al. 1996, Satterlee et al. 2001, Lanjuin et al. 2003, Cañestro et al. 2005, Williams et Holland 1998, Li et al. 1997, Hinman et al. 2003a, Müller et al., 1999, Veilleux et al., 2013*). De fait, dans l'ensemble des génomes connus et répertoriés par la base de données ENSEMBL, seuls deux gènes *Otx* annotés ne présentent qu'un seul exon (*Taenopygia guttata* et *Microchiroptera*, **Figure 5A**). Tous les autres gènes sont répartis sur plusieurs exons, et 90,3% d'entre eux en ont trois ou plus (**Figure 5A**). Tous les exons ne sont pas codants, et on peut encore une fois remarquer la grande conservation moléculaire de la famille *Otx* : dans la grande majorité des cas (70,8%, **Figure 5A**), la séquence codante se distribue sur trois exons. Cette structure tripartite est principalement vérifiée chez les Gnathostomes, et les gènes *Otx* des autres embranchements présentent plus de variations. Les gènes *Hroth*, *CiOtx* et *CsOtx* issus de trois espèces d'ascidies présentent tous par exemple cinq exons codants (*Oda Ishii et Saiga, 2003, Wada et al., 2003*), les gènes *ttx-1*, *ceh-36* et *ceh-37* de *Caenorhabditis elegans* en ont respectivement 8, 6 et 5, et les gènes *SpOtx* et *HpOtx* de l'oursin en ont 4 et 8 (*Kiyama et al., 1998, Lanjuin et al., 2003, Li et al., 1997, Satterlee et al., 2001*). Cependant, même chez les invertébrés, certains gènes *Otx* ont une séquence codante sur trois exons : c'est le cas du gène *otd* de drosophile et du gène *AmphiOtx* de l'amphioxus (*Vandendries et al., 1996, Williams et Holland 1998*).

Plus frappant encore, la séquence codante pour l'homéodomaine de tous les gènes *Otx* découverts jusqu'ici est distribuée sur deux exons, sauf pour trois gènes - les deux gènes à un seul exon codant mentionnés plus haut, et *Otxb* de l'Urochordé *Oikopleura dioica* (*Cañestro et al., 2005*). Cet «intrinsic gap» est considéré comme caractéristique de la structure génomique de la famille *Otx*, mais sa portée biologique n'a pas encore été étudiée.



**Figure 5 : Structure génomique des gènes *Otx*.**

(A) Distribution du nombre total d'exons (gris foncé) ou du nombre d'exons codants (gris clair) des gènes de la famille *Otx* recensés dans la base de données ENSEMBL.

(B) Représentation schématique des gènes *Otx* de la souris. Les exons sont numérotés en gras sous chaque gène, et la position de l'initiation de la traduction est signalée par le codon ATG. Les différents sites connus d'initiation de la transcription sont indiqués par des flèches. La séquence codante est colorée en violet pâle, et la séquence correspondant à l'homéodomaine est représentée en violet foncé. Les différentes possibilités d'épissage sont indiquées sous chaque gène. Le site d'épissage alternatif d'*Otx2* aboutissant à la présence de 8 acides aminés supplémentaires est marqué d'une astérisque. D'après *Courtois et al., 2003, Hodges et al., 2002*

Les gènes *Otx* humains et murins ont été extensivement étudiés, les premiers du fait de leur implication dans de nombreuses maladies génétiques, et les seconds suite à l'importance du modèle murin dans l'étude de leurs fonctions ; la **figure 5B** présente les structures génomiques des trois gènes *Otx* de la souris. Le gène *Otx2* murin compte huit exons, dont trois codants, répartis sur 10 kb. Une analyse par comparaison de séquence permet de supposer qu'*Otx2* présente la même organisation chez l'Homme (*Courtois et al., 2003*), même si les seuls transcrits détectés et annotés pour l'instant ne comptent que cinq exons (ENSEMBL). Les gènes *Crx* divergent davantage entre ces deux espèces : si le gène humain possède six exons, dont 3 codants, et couvre 25 kb, le gène murin n'en a que quatre (dont 3 codants) distribués sur 15 kb (*Hodges et al., 2002*). *Otx1* est le moins étudié des trois membres, et aucune analyse en profondeur de sa région génomique n'a été publiée. Il possède de manière certaine trois exons codants (*Simeone et al., 1993*), mais la présence éventuelle et le nombre de ses exons non-codants n'est pas avérée. Les transcrits détectés par le projet ENSEMBL chez la souris présentent cela dit deux exons non-codants, tandis que ceux de l'Homme permettent de supposer une structure plus complexe, à 6 exons.

#### I.1.2.2. Transcription des gènes *Otx*

##### I.1.2.2.1. Promoteurs multiples et épissage alternatif

L'étude des transcrits produits à partir des locus de la famille *Otx* dans différentes espèces a permis de révéler dans plusieurs cas l'utilisation de promoteurs multiples. L'oursin est le premier organisme chez qui ce processus a été étudié : plusieurs promoteurs, et donc plusieurs sites d'initiation de la transcription, ont été découverts de façon simultanée chez *Hemicentrotus pulcherrimus* (deux promoteurs, *Kiyama et al., 1998*) et *Strongylocentrotus purpuratus* (trois promoteurs, *Li et al., 1997*). La présence commune d'une boîte TATA, et de trois sites de fixation *Otx*, permet de relier le deuxième promoteur de *Strongylocentrotus purpuratus* (responsable de *SpOtx*( $\beta$ -1)/( $\beta$ -2)) et le premier promoteur de *Hemicentrotus pulcherrimus* (responsable de *HpOtx<sub>L</sub>*). Cette observation, ainsi que le manque d'homologie entre les parties propres à *HpOtx<sub>E</sub>* d'un côté, et *SpOtx*( $\alpha$ ) de l'autre, permettent de supposer que les autres formes d'*Otx* chez ces

deux espèces ont émergé de façon indépendante, *de novo* ou par insertion génomique. L'usage de promoteurs alternatifs semble cependant généralisé chez les Echinodermes : l'étoile de mer *Asterina miniata* présente au moins quatre sites d'initiation de la transcription (Hinman et al., 2003a). Une analyse phylogénétique des protéines *Otx* de différents Echinodermes révèle que ces espèces partagent une grande partie de la protéine (depuis une séquence d'acides aminés PPRK jusqu'à l'extrémité C-terminale), mais que la partie N-terminale est sujette à de grandes variations particulières à chaque espèce (Hinman et al., 2003a). Les raisons de ces variations, ainsi que leurs conséquences au niveau fonctionnel, n'ont toutefois pas encore été étudiées.

Chez les Vertébrés également, les transcrits des gènes *Otx* peuvent être issus de l'activité de plusieurs promoteurs. La transcription du gène *Otx2* murin a par exemple été étudiée en profondeur (Courtois et al., 2003) : trois types de transcrits *Otx2* peuvent être identifiés, qui ne diffèrent que par leur séquence 5', indice de trois sites distincts d'initiation de la transcription (situés respectivement à -5017, -2568 et -207 bp de l'ATG initiant la séquence codante, **Figure 5B**). Dans la suite de leur étude, Courtois et collègues ont effectivement confirmé la présence de ces trois sites, et ont analysé la structure des promoteurs associés. Le promoteur proximal (promoteur C) contient des boîtes TATA et CAAT, alors que les deux promoteurs les plus en amont en sont dépourvus ; ils contiennent en contrepartie un grand nombre de sites SP1. Un quatrième type de transcrit, dont la transcription débiterait en aval du début de la séquence codante, a également été mis en évidence dans cette étude, bien que sa fonction n'ait pas été étudiée plus avant. Enfin, dans une étude menée en 2009, l'équipe italienne d'Antonio Simeone a ajouté un cinquième transcrit à cette liste, issu d'une initiation de la transcription située 687 bp en amont de l'ATG (Acampora et al., 2009). Comme il a été mentionné plus haut, la forte homologie des séquences permet de supposer que ces découvertes faites sur le gène *Otx2* murin s'appliquent également à l'Homme. Ce n'est pas le cas pour *Crx* : si le gène murin n'a qu'un seul promoteur, la version humaine en compte deux (Hodges et al., 2002). L'un des promoteurs humains, le plus proche de la séquence codante, serait homologue au promoteur murin, et le second serait apparu après la divergence des deux lignages évolutifs. On peut ainsi voir que les gènes de la famille *Otx* peuvent être sous le contrôle de plusieurs promoteurs dans de nombreuses espèces.

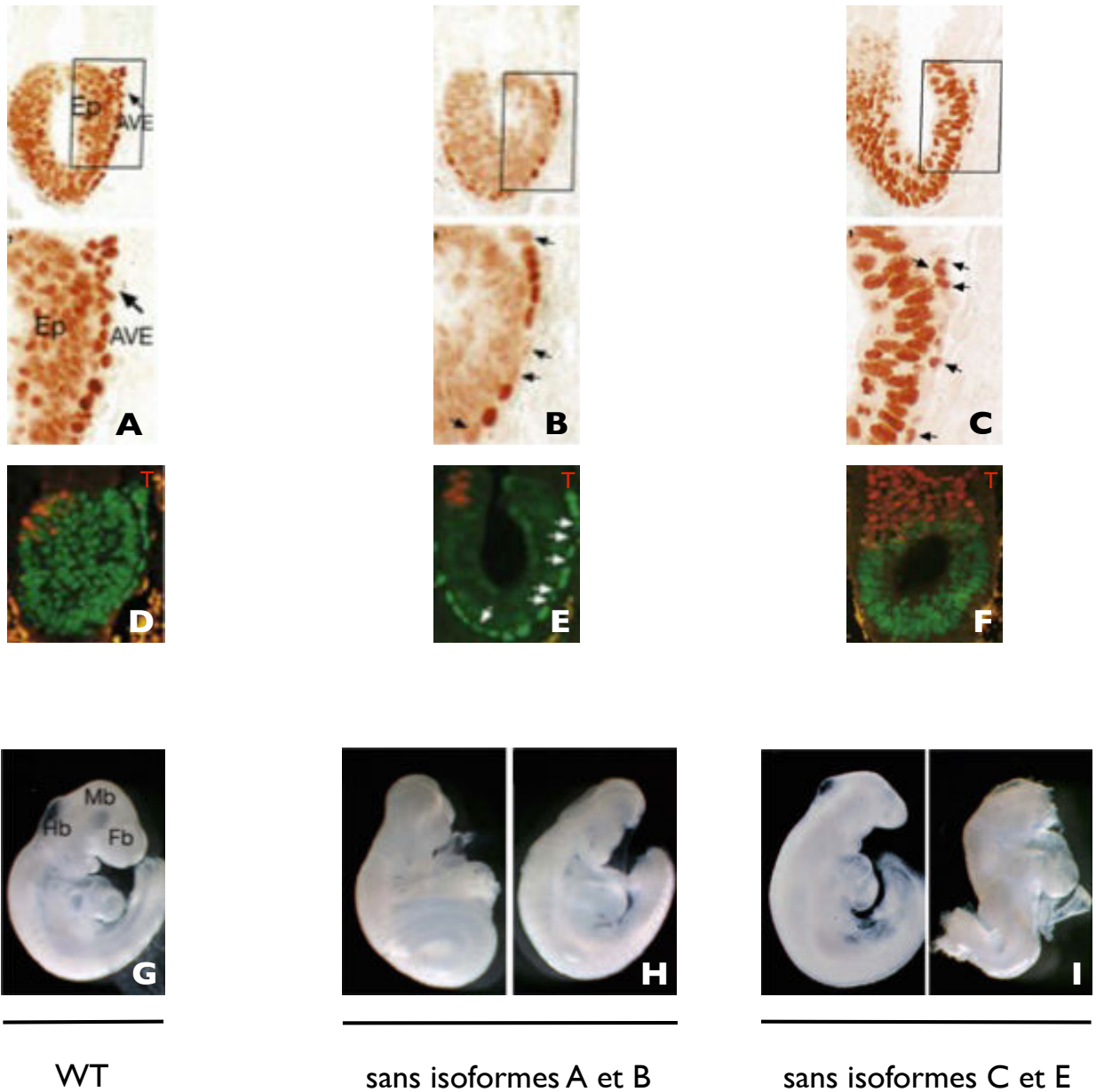
Les gènes *Otx* peuvent qui plus est être sujets à des épissages alternatifs. A partir des trois promoteurs qu'il possède, l'oursin *Strongylocentrus purpuratus* produit quatre transcrits : les ARNm *SpOtx(β-1)* et *SpOtx(β-2)* diffèrent uniquement par l'inclusion ou non

de l'exon 4 (Li et al., 1997). Chez l'étoile de mer *Asterina miniata*, ce sont deux exons qui différencient *AmOtx(β-a-1)* et *AmOtx(β-a-2)* (Hinman et al., 2003a). De même, le gène *Crx* humain donne sept transcrits à partir de deux promoteurs, et le même gène chez la souris aboutit à deux transcrits avec un promoteur unique, l'un d'entre eux n'étant probablement pas codant (Hodges et al., 2002). Selon les analyses, le gène *Otx2* pourrait pour sa part produire jusqu'à 8 types de transcrits différant par leur séquence 5' (Acampora et al., 2005). Les gènes *otd* de la drosophile et *Otx2* de la souris partagent enfin une particularité (Vandendries et al., 1996, Courtois et al. 2003): un épissage alternatif de leurs transcrits aboutit dans les deux cas à l'addition ou non d'une série d'acides aminés au produit protéique, en position N-terminale de l'homéodomaine (chez *otd*, la séquence GDLCYP est ajoutée 12 acides aminés en amont, et chez *Otx2* on observe l'addition de l'octapeptide GPWASCPA 5 acides aminés en amont, **Figure 5B**).

Par la combinatoire de l'utilisation de promoteurs différents et de phénomènes d'épissage alternatif, un même gène *Otx/otd* peut ainsi être transcrit en de multiples ARNm différents ; la **Figure 5B** expose par exemple les modalités de transcription et d'épissage des gènes *Otx* chez la souris. Or ces isoformes sont différentiellement exprimés selon les tissus, et sont pour certains responsables de fonctions spécifiques que d'autres transcrits ne peuvent pas assurer.

Ce phénomène est particulièrement observable chez la souris, où il était déjà suspecté dès 2003 (Martinez-Morales et al., 2003). En 2005, Nicolas Fossat et al. se sont intéressés à la distribution des différents transcrits *Otx2* alors connus, pendant le développement et dans l'animal adulte. Ils ont pu observer que les transcrits majoritaires étaient issus du promoteur le plus proximal (en amont de l'exon **1C** de la **Figure 5B**), mais que le recours à ce promoteur diminuait au cours du développement et chez l'adulte : alors que les transcrits de type «C» représentent 96% des ARNm *Otx2* dans les cellules ES, ils ne composent plus que 35 à 40% des transcrits *Otx2* totaux chez le foetus en fin de développement, et encore moins chez l'adulte (Fossat et al., 2005). Le promoteur le plus distal (en amont de **1A1**, **Figure 5B**) connaît l'évolution inverse : presque inactif en début de développement, son activité augmente en flèche jusqu'à E9.5 où les transcrits de type «A» représentent 60% des transcrits totaux. Ces derniers sont ensuite majoritaires dans le SNC adulte, ainsi que dans l'épithélium pigmenté de la rétine (RPE). Au cours du développement, la transcription du gène *Otx2* passerait donc d'un contrôle proximal à un contrôle distal. Le troisième promoteur (en amont de **1B**, **Figure 5B**) semble avoir une activité spécialisée dans les structures nerveuses sensorielles (neurorétine et bulbe





**Figure 6 : Fonctions différentes des transcrits *Otx*.**

(A-C) Immunomarquage dirigé contre *Otx2* dans un embryon sauvage (A), dans un embryon où les isoformes distaux A et B ne sont pas produits (B), ou dans un embryon où les isoformes proximaux C et E ne sont pas produits (C), à E6,5. L'expression d'*Otx2* disparaît de l'épiblaste et de certaines cellules de l'AVE (flèches en B) en absence des isoformes A et B, tandis qu'elle disparaît presque entièrement dans l'AVE mais se maintient dans l'épiblaste en l'absence des isoformes C et E (les flèches en C pointent les cellules de l'AVE qui continuent à exprimer *Otx2*).

(D-F) Expression d'*Otx2* (en vert) et du marqueur postérieur de gastrulation *T* (en rouge) dans les mêmes embryons que (A-C). Les flèches en E indiquent les cellules de l'AVE qui ont conservé l'expression d'*Otx2* en l'absence des isoformes A et B. L'expression de *T* est perturbée en l'absence des isoformes C et E (F) mais pas en l'absence des isoformes A et B (E).

(G-I) Morphologie, selon les génotypes indiqués, d'embryons E9,5. Les embryons qui n'expriment pas les isoformes A et B présentent une exencéphalie (H, à gauche) ou une anencéphalie (H, à droite). Les embryons où les isoformes C et E sont absents présentent des phénotypes proches des embryons *Otx2*<sup>-/-</sup>, signe d'une perturbation de la gastrulation.

*Ep* : épiblaste, *AVE* : Anterior Visceral Endoderm, endoderme viscéral antérieur, *Hb* : Hindbrain, métencéphale, *Mb* : Midbrain, mésencéphale, *Fb* : Forebrain, prosencéphale. D'après *Acampora et al., 2009*

olfactif). L'étude de 2009 mentionnée plus haut vient confirmer ces résultats au niveau du développement embryonnaire précoce, en y ajoutant l'analyse du dernier transcrit découvert (transcrit «E» commençant à l'exon **1E**, **Figure 5B**). A E6,5 les deux transcrits majoritaires sont «C» et «A», et ce dernier devient le seul majoritaire quelques jours plus tard. Qui plus est, les auteurs ont réussi à mettre à jour une localisation différentielle des transcrits *Otx2* pendant la gastrulation : les transcrits «A» et «B» seraient exprimés préférentiellement dans l'épiblaste, et les transcrits «C» et «E» dans l'endoderme (*Acampora et al., 2009, Figure 6A,B,C*). Il existe donc une dynamique d'expression des différents isoformes d'*Otx2*, à la fois temporelle et spatiale, durant le développement embryonnaire et la vie adulte de la souris.

Cette dynamique n'est pas anodine ; dans des modèles murins où la séquence d'épissage 5' de l'exon 1 est absente (et qui ne peuvent donc pas produire de transcrits «A» ni «B»), on observe des défauts de formation de la tête (*Acampora et al., 2001, 2005, 2009, Figure 6B,H*, à comparer avec **6A,G**). La gastrulation et la régionalisation antéro-postérieure précoce ont bien lieu (**Figure 6D,E**) mais le prosencéphale et le mésencéphale ne parviennent pas à conserver leur identité, ce qui souligne l'importance spécifique des transcrits «A» et/ou «B», et donc de l'expression d'*Otx2* dans l'épiblaste, dans cette dernière fonction. Inversement, l'inactivation spécifique des transcrits les plus proximaux par ablation de la région génomique contenant les exons 1C et 1E entraîne des problèmes de gastrulation, et empêche notamment l'antériorisation de l'endoderme viscéral où ils sont normalement exprimés (*Acampora et al., 2009, Figure 6F,I* à comparer avec **Figure 6D,G**). En fonction de leurs zones d'expression, il est donc possible d'associer des fonctions distinctes aux différents transcrits d'*Otx2*.

On observe les mêmes processus chez d'autres espèces qui synthétisent plusieurs ARNm *Otx* à part d'un seul locus. Chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*, l'ARNm *SpOtxa* est exprimé en premier, et s'accumule dans l'embryon jusqu'à 12 h de développement. Il diminue rapidement par la suite, et les trois ARNm *SpOtxβ* prennent le relais, restant largement majoritaires jusqu'à 80 h après fertilisation. Une fois apparus, les ARNm *SpOtxβ* reproduisent cependant assez fidèlement le patron d'expression des précédents, s'accumulant dans l'endoderme et l'ectoderme oral, signe d'une régulation temporelle mais non spatiale des différents isoformes de *SpOtx* (*Li et al., 1997, Yuh et al., 2002*). On retrouve cet échelonnement temporel de la transcription des isoformes d'*Otx* chez d'autres Echinodermes, comme l'étoile de mer *Asterina miniata* et l'oursin *Hemicentrotus pulcherrimus* (*Hinman et al., 2003a, Mitsunaga-Nakatsubo, 1998*), et il

s'associe dans ces espèces à une répartition spatiale de cette transcription : les différents isoformes d'*Otx* ont des patrons d'expression en partie spécifiques. La boîte TATA semble être responsable du retard temporel accusé par certains isoformes : une étude menée chez *Hemicentrotus pulcherrimus* révèle que la délétion de la boîte TATA située en amont de l'isoforme tardif (*HpOtx<sub>L</sub>*) provoque son expression précoce, alors que l'insertion d'une boîte TATA en amont de l'isoforme précoce, au contraire, retarde son apparition (Kobayashi et al., 2002). Cette activité de la boîte TATA dépend apparemment d'une autre séquence, la «boîte E» (CACGTG, site de fixation d'USF, un facteur de transcription bHLH), en l'absence de laquelle les effets de la boîte TATA sont parfaitement inversés. On constate donc ici aussi que plusieurs transcrits peuvent être produits depuis un seul gène *Otx*, et que leur expression est différemment régulée dans le temps et l'espace.

Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes *Otx*, et notamment d'*Otx2*, ont par ailleurs été extensivement étudiés, au-delà de la structure des promoteurs minimaux. Des études individuelles chez les Invertébrés, et une impressionnante série d'études de l'équipe de Shinichi Aizawa et Isao Matsuo centrée sur les gnathostomes (et surtout la souris), ont pu identifier un grand nombre de régions génomiques responsables de l'expression des gènes *Otx* dans des zones spécifiques, et ainsi associer certaines fonctions de ces gènes à une région d'expression particulière. La section suivante aura pour but de résumer les connaissances accumulées sur les éléments de contrôle en *cis* de l'expression des gènes *Otx*, et surtout des caractéristiques qu'ils partagent, en se centrant chez les gnathostomes sur le contrôle de l'expression d'*Otx2*.

#### 1.1.2.2.2. Enhancers spatialement et temporellement spécifiques

Chez les invertébrés, la *cis*-régulation de l'expression de la famille *Otx* a été étudiée dans des espèces où elle ne compte qu'un seul membre, comme par exemple la drosophile, où il a été montré qu'une région de 1,5kb située au niveau du troisième intron suffit à elle seule à commander l'expression d'*otd* dans le système visuel à tous les stades (Vandendries et al., 1996). Le présence d'un seul *Otx* dans ces organismes présente deux avantages conséquents : elle permet tout d'abord, par comparaison une à une des séquences nucléiques à proximité des gènes *Otx* de plusieurs espèces, d'isoler des

régions conservées à travers l'évolution. Or le fait que la famille *Otx* soit monogénique empêche le remplacement d'un gène *Otx* par un autre pour l'accomplissement d'une fonction spécifique dans une zone particulière, et empêche donc le transfert du contrôle de l'expression de la famille *Otx* dans cette zone d'un élément *cis* à un autre : les régions génomiques régulatrices sont soumises à une forte pression de conservation. Les régions conservées non-codantes identifiées par homologie comme mentionné précédemment ont donc beaucoup plus de chances de jouer un rôle régulateur. Une stratégie tirant avantage de ce phénomène a été mise en place par Yuh et al. en 2002 : en cherchant les zones génomiques conservées entre les oursins *Hemicentrotus pulcherrimus* et *Lychetinus variegatus*, ils ont pu disséquer le locus *Otx* et établir que son expression chez ces deux espèces (ainsi que, très probablement, chez *Asterina miniata*, *Hinman et al. 2003b*) était sous le contrôle de 11 éléments de régulation répartis sur 60 kb, dont 4 commandaient à eux seuls une expression spécifique dans l'endoderme, et 4 autres une expression dans l'ectoderme (les 3 derniers étant ubiquitaires, *Yuh et al., 2002*).

Qui plus est, le caractère monogénique de la famille *Otx* permet chez les invertébrés de comparer les éléments *cis*-régulateurs du même gène chez deux espèces sans souci d'oubli, d'absence ou de redondance de ces éléments du fait de la présence d'autres gènes de la même famille. Il est ainsi possible d'analyser leur constitution et d'en dégager des caractéristiques communes. Cette approche a été utilisée pour comparer les régions génomiques de deux ascidies, *Halocynthia roretzi* et *Ciona intestinalis* : une double région génomique du gène *HrOtx*, couvrant de façon cumulative 4,8 kb en amont de l'ATG, a les mêmes capacités de régulation qu'une région de 3,5 kb en amont de *CiOtx* (*Oda-Ishii, 2005*). La fonction de la première région peut être attribuée à 6 enhancers de petite taille (de 140 à 280 bp), alors que la seconde ne contiendrait que trois enhancers. Cependant, les 6 enhancers de *Halocynthia roretzi* conservent leurs propriétés régulatrices chez *Ciona intestinalis*, signe d'une équivalence réelle des deux régions. Une analyse des différentes séquences nucléiques révèle que tous les enhancers de *HrOtx* et de *CiOtx* partagent les mêmes motifs de fixation de facteurs protéiques : plusieurs sites Ets/GATA, dont l'importance dans la régulation de l'expression d'*Otx* chez l'ascidie avait déjà été démontrée (*Bertrand et al., 2003*), des sites Lhx et Fox qui semblent fonctionner de concert ou de façon redondante, et des sites «T-boxes». L'équivalence fonctionnelle des régions régulatrices de *Halocynthia roretzi* et *Ciona intestinalis* serait donc due à la combinatoire des sites de fixations qu'elles présentent plus qu'à leur structure génomique (*Oda-Ishii, 2005*). Une caractéristique majeure des éléments *cis*-régulateurs des gènes

*Otx* est ainsi mise à jour : leur fonction est principalement assurée par l'ensemble des motifs qu'ils contiennent, ce sont des modules de fixation combinatoire.

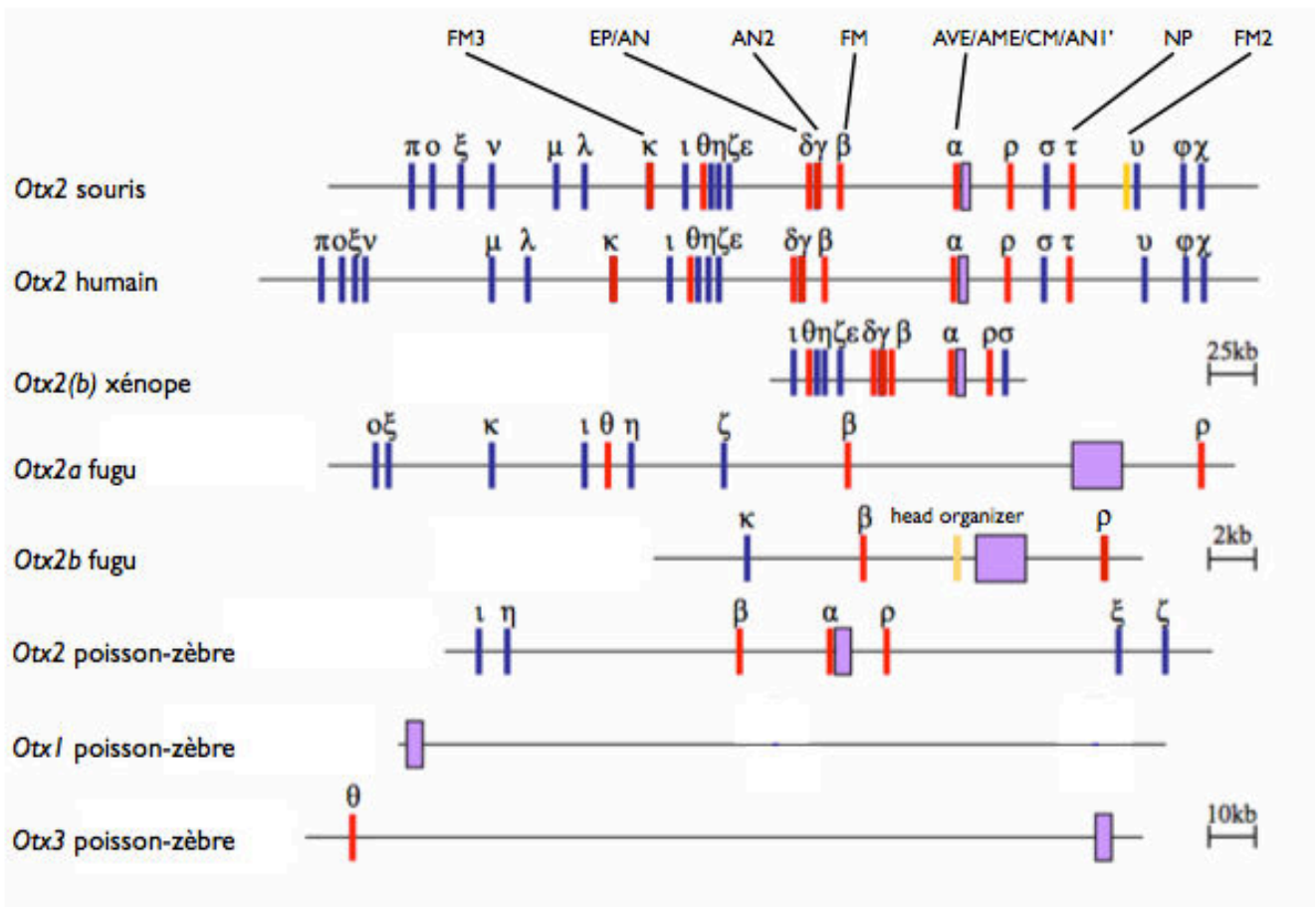
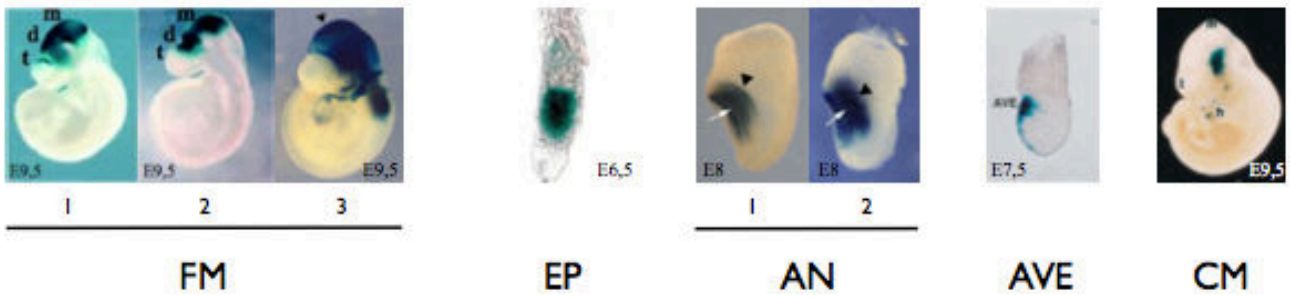
On retrouve de fait des sites de fixation particuliers dans les éléments cis-régulateurs des Echinodermes mentionnés plus haut. Dès leur première étude en 2002, Yuh et collègues avaient identifiés des motifs TCF, GATA et *Otx* dans les éléments cis-régulateurs de *HpOtx*, et ont par la suite ajouté à cette liste des motifs Krox (*Davidson et al., 2002*) ; les trois derniers types sont nécessaires et suffisants à l'expression normale de *HpOtx*. De plus, une dynamique d'utilisation de ces sites de fixation assure l'évolution de l'expression d'*Otx* aussi bien chez les oursins que chez les ascidies. Dans les premiers, KROX puis *Otx* et enfin GATA viennent successivement appuyer l'expression d'*Otx* (*Yuh et al., 2004*) en se fixant sur leurs sites respectifs. L'étude d'un enhancer de 300 bp responsable, dans les secondes, de l'expression de *HrOtx* dans les cellules du lignage sensoriel, a révélé un mécanisme similaire : des sites Sox, Zic et Fox assurent l'expression précoce du gène au stade gastrula, tandis que les «T-boxes» agissent en conjonction avec des sites YY1 et HDTF pour permettre son expression tardive (*Oonuma et al., 2014*).

La longue série d'études entreprise par l'équipe de Isao Matsuo et Shinichi Aizawa vient confirmer ces résultats chez les gnathostomes. En accolant des fragments de la région génomique du gène *Otx2* de la souris à un rapporteur *LacZ* (-65 à +15 kb) et en prenant la localisation de l'expression de la  $\beta$ -galactosidase comme un indicateur de la capacité cis-régulatrice du fragment, cette équipe avait à l'origine pu démontrer qu'une région de 1,8 kb immédiatement en amont de l'ATG d'*Otx2* dirigeait son expression dans l'endoderme viscéral (jusqu'à sa restriction antérieure) ainsi que dans le mésenchyme céphalique (*Kimura 1997, 2000* ; cette région sera par la suite appelée le «promoteur minimal»). Elle avait également prouvé qu'une région de 1,1 kb située à 15 kb en aval du gène pouvait aussi chez le poisson-lune *Fugu rubripes* permettre une expression dans le mésenchyme céphalique, indice déjà que l'organisation des éléments cis-régulateurs d'*Otx2* en modules fonctionnels importants par les motifs qu'ils présentent serait également vérifiée chez les Vertébrés. Lors de cette première approche, l'équipe n'avait cependant pas réussi à trouver dans les 80 kb étudiés d'éléments régulateurs assurant l'expression d'*Otx2* dans les autres régions où on peut l'observer au cours du développement. Elle s'était alors penchée de manière plus approfondie sur l'étude de la régulation d'*Otx2* chez le poisson-lune. Cet organisme possède en effet autant de gènes que la souris, mais dans un génome huit fois plus petit. Les séquences cis-régulatrices

sont donc bien plus susceptibles d'être situées à courte distance du gène sur lequel elles influent chez le poisson-lune du fait de la compaction de son génome. De fait, une analyse systématique de la région de 70 kb encadrant le gène *Otx2a* du poisson-lune (-30 kb à +40 kb), analogue à celle menée chez la souris, a révélé la présence de sept zones enhancers qui récapitulent à elles seules la quasi-totalité du patron d'expression d'*Otx2* (Kimura-Yoshida, 2004). Ces zones fonctionnent de façon indépendante et commandent l'expression dans des régions spécifiques, superposables seulement en partie ; elles jouent le même rôle chez le poisson-zèbre lorsqu'on les y introduit artificiellement, et elles contiennent qui plus est huit régions hautement conservées, y compris chez la souris, bien qu'à des emplacements génomiques plus lointains.

Par la suite, l'équipe de Shinchi Aizawa a étendu ces méthodes à l'ensemble du locus *Otx2*. Elle a combiné l'étude systématique (identique à celle décrite plus haut) de régions génomiques de plus en plus lointaines du gène *Otx2* murin, l'étude ciblée chez la souris de zones conservées entre plusieurs gnathostomes, ainsi que les deux mêmes types d'études dans d'autres organismes. Elle a ainsi pu disséquer l'organisation des éléments régulateurs en *cis* du gène *Otx2* gnathostome avec une précision impressionnante. Leurs résultats sont combinés dans la **Figure 7** et détaillés ci-dessous dans l'ordre chronologique de leur fonctionnement. Ils montrent que le gène *Otx2* est sous le contrôle d'un grand nombre de modules, souvent conservés chez tous les gnathostomes, mais à des endroits différents du génome, qui présentent chacun une combinatoire de sites de fixation qui leur est propre.

Le promoteur minimal d'*Otx2* (noté  $\alpha$  dans la **Figure 7**) est nécessaire et suffisant, comme mentionné plus haut, à l'expression du gène dans l'endoderme viscéral (VE) et le mésendoderme antérieur (AME) . Plus précisément, une séquence de 51 bp, située 0,6 kb en amont de l'ATG serait la principale responsable (Kimura-Yoshida et al., 2007). Riche en sites Foxa2, elle fonctionnerait en tandem avec une autre séquence de 49 bp (0,8 kb en amont de l'ATG) qui aurait en outre pour rôle d'assurer l'expression d'*Otx2* dans le mésenchyme céphalique (CM) (Kimura et al., 1997, Kurokawa et al., 2010). Ces deux enhancers sont conservés chez la tortue, le poulet, et le Xénope, où ils commandent l'expression d'*Otx2* dans les cellules profondes de l'endoderme. Ils sont ainsi considérés comme responsables de l'expression d'*Otx2* dans la région dite «head organizer», en charge de l'induction des tissus les plus antérieurs. La séquence CM est présente au niveau du gène *Otx2a* du poisson-lune, 15 kb en aval (Kimura et al., 1997, Kurokawa et al., 2012), et assure donc l'expression du gène dans le mésenchyme céphalique, mais la séquence VE est absente. Le gène *Otx2a* n'est donc pas exprimé dans la région «head



**Figure 7 : Éléments *cis*-régulateurs du groupe d'orthologie *Otx2***

*En haut*, activités de quelques enhancers du gène *Otx2* murin (de gauche à droite, FM, FM2, FM3, EP, AN, AN2, AVE, CM). Ces activités ont été obtenues en révélant l'activité de la  $\beta$ -galactosidase dans des souris transgéniques exprimant le gène *LacZ* sous le contrôle : (1) du promoteur minimal  $\alpha$  (pour AVE et CM), ou (2) du promoteur minimal combiné en amont avec un autre enhancer (resp.  $\beta$ , FM2,  $\kappa$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). Le stade de développement montré est indiqué sur chaque image. La flèche blanche des images AN indique une activité non-spécifique, due au promoteur minimal  $\alpha$ .

*En bas*, structure schématique des locus *Otx* de différents vertébrés. Les séquences entourant le locus et conservées dans deux espèces ou plus sont indiquées par des barres bleues et codées  $\alpha$ - $\chi$  ; celles dont l'activité *cis*-régulatrice est avérée sont indiquées par des barres rouges. Les séquences à l'activité *cis*-régulatrice avérée, mais uniquement présentes dans certaines espèces, sont indiquées par des barres jaunes.

*FM* : fore-midbrain (proscéphale-mésencéphale), *t* : télencéphale, *d* : diencéphale, *m* : mésencéphale, *EP* : épiblaste, *AN* : neurectoderme antérieur, *AVE* : endoderme viscéral antérieur, *CM* : mésenchyme céphalique, *AME* : mésendoderme antérieur, *NP* : placodes nasales. D'après Kimura *et al.*, 1997, 2000, et Kurokawa *et al.*, 2004a, 2004b, 2012, 2014.

organizer» : ce rôle est dévolu au gène *Otx2b*, pour lequel une séquence de 200 bp située 1 kb en amont, également riche en sites FOX, assure la même fonction que la séquence VE (Kurokawa et al., 2012).

Au niveau de l'épiblaste, *Otx2* est exprimé via l'action de l'enhancer EP ( $\delta$  dans la **Figure 7**). Situé 90 kb en amont de l'ATG chez la souris, EP est la plus grande région régulatrice connue : il couvre 2,3 kb de séquence, conservée chez le rat, l'Homme et le xénope, et contient une séquence de 559 bp absolument essentielle à son fonctionnement (Kurokawa et al., 2004a).

L'expression d'*Otx2* dans le neurectoderme antérieur (AN,  $\delta$  dans la **Figure 7**) est pour sa part dirigée par au moins trois éléments *cis*-régulateurs chez la souris. Le premier, AN1, découvert dès 2004, est une séquence de 165 bp située 90 kb en amont du site d'initiation de la traduction chez la souris (Kurokawa et al., 2004a); c'est en fait une sous-partie de EP. Il contient un site SOX et un site Otx, apparemment facultatifs pour son rôle, et un site de fixation YY1 essentiel à son fonctionnement. YY1 est un facteur de transcription à doigts de zinc apparenté aux GLI ; il se fixe à AN1 seulement sous sa forme acétylée, et il est uniquement acétylé dans la partie antérieure de l'embryon (Takasaki et al., 2007). AN1 est conservé chez les gnathostomes non-téléostéens, en particulier au niveau du site YY1. Le deuxième enhancer, AN2 ( $\gamma$ , **Figure 7**), conservé de la même façon que AN1 au sein des gnathostomes, a été découvert beaucoup plus récemment (Kurokawa et al., 2014). Situé 88 kb en amont du gène, il contient également plusieurs sites YY1, ainsi qu'un site SOX, un site ZIC et un site POU, faisant apparemment de YY1 le principal régulateur protéique de l'expression d'*Otx2* dans le neurectoderme. Cependant, la délétion de ces deux enhanceurs dans des embryons de souris transgéniques n'abolit pas totalement l'expression d'*Otx2* ; il existe donc au moins un troisième enhancer, AN3 (Kurokawa et al., 2014). Enfin, si l'on admet le rôle essentiel de YY1 dans l'activité des enhanceurs AN, on pourrait également définir une région de 140 bp du génome murin (-603 à -468 bp) comme l'enhancer AN1' ; sa présence est en effet essentielle à l'action correcte de YY1 lorsqu'il se fixe à AN1 (Takasaki et al., 2007).

Trois régions génomiques semblent également dicter l'expression d'*Otx2* dans le prosencéphale et le mésencéphale murins (forebrain-midbrain, FM). Le premier enhancer, FM ( $\beta$ , **Figure 7**), est constitué de 364 bp situées 75 kb en amont chez la souris. Il est conservé dans l'ensemble des gnathostomes, et composé de sites TCF, SOX et Otx importants pour son fonctionnement (Kurokawa et al., 2006), ainsi qu'un site PAX facultatif. Un large motif X est également extrêmement conservé au sein de cet enhancer ; il contient notamment la séquence TAATTA, essentielle pour la régulation fine d'*Otx2* à la



frontière mésencéphale/métencéphale (*Inoue et al., 2012* ; son rôle sera étudié plus avant dans la partie II). Un deuxième enhancer (FM2, **Figure 7**) de 1 kb situé 115 kb en aval de l'ATG n'existe que chez les rongeurs ; il contient essentiellement des sites TCF (*Kurokawa et al., 2004b*). Un troisième enhancer (FM3,  $\kappa$  dans la **Figure 7**) situé 153 kb en amont chez la souris est également riche en sites TCF, et se retrouve chez tous les gnathostomes, sauf les téléostéens (*Kurokawa et al., 2014*).

Enfin, deux enhancers situés en 3' assurent l'expression d'*Otx2* dans les placodes nasales ( $\tau$ , **Figure 7**). Cependant, Aizawa et collègues pensent que d'autres éléments cis-régulateurs restent à découvrir : d'une part, le contrôle de l'expression dans le télencéphale ventral et le mésencéphale/diencéphale tardifs ne peut encore être attribué à aucun enhancer (*Sakurai et al., 2010*), et d'autre part, toutes les régions génomiques conservées de manière interspécifique à proximité du gène *Otx2* n'ont pas été associées à une fonction particulière (**Figure 7**).

La régulation de l'expression d'*Otx2* chez les Téléostéens présente une particularité intéressante. Comme cela a été mentionné plus haut, ce groupe ne dispose pas de l'enhancer AN (**Figure 7**) ; c'est l'enhancer FM qui assure l'expression d'*Otx2* au niveau du neurectoderme antérieur. Qui plus est, il ne présente dans ce groupe aucun des sites classiquement associés à l'activité AN (il n'a notamment pas de sites YY1), ce qui fait supposer que les Téléostéens régulent l'expression d'*Otx2* dans le neurectoderme d'une façon complètement différente (*Kurokawa et al., 2006*).

En conclusion, chez les Gnathostomes comme chez les Invertébrés, la régulation en *cis* de la famille *Otx* est sous le contrôle de plusieurs éléments génomiques de taille relativement réduite, composés d'une combinatoire de motifs de fixation particulière à chacun et conservée à travers l'évolution. Le nombre et la disposition exacte des régions régulatrices varie, du très complexe comme ce qui a été décrit ci-dessus pour *Otx2*, au très simple comme c'est le cas pour *Crx*. La région de 2 kb en amont de l'initiation de la transcription de ce dernier semblent en effet suffisants pour résumer son expression (*Furukawa et al., 2002*). La passation du contrôle de la transcription des gènes *Otx* d'un sous-ensemble d'éléments régulateurs à un autre permet en tout cas d'assurer leur expression extrêmement dynamique.

### I.1.2.3. Traduction des gènes *Otx* et caractéristiques protéiques

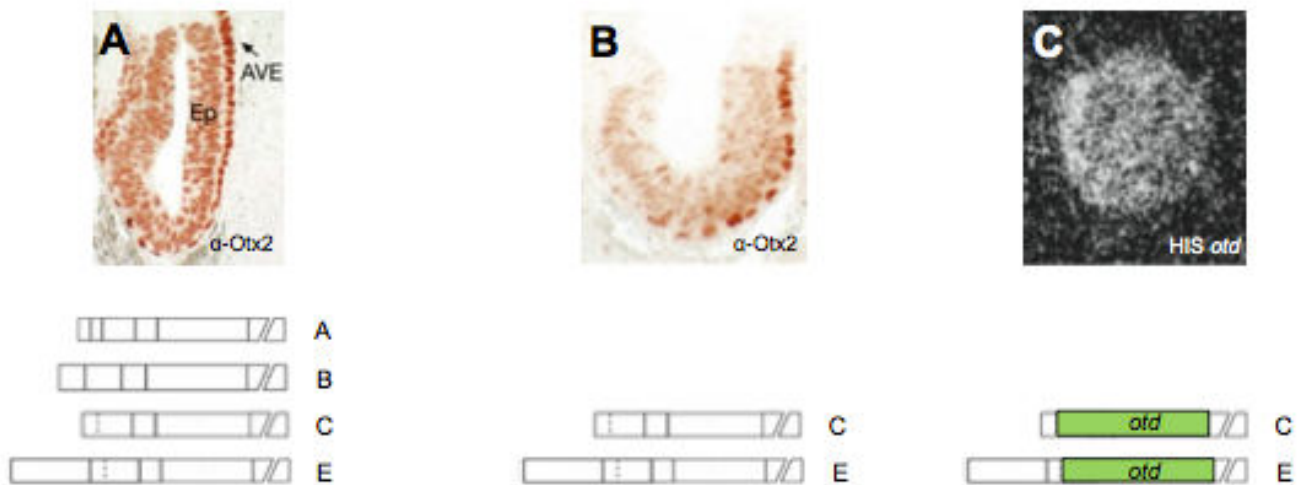
#### I.1.2.3.1 Régulation de la traduction des gènes *Otx*.

Au delà de la régulation complexe de leur expression, abordée dans la partie précédente, les gènes *Otx* peuvent également être sous contrôle traductionnel. L'étude de cette régulation a principalement été effectuée sur le gène *Otx2*, et les régions non-codantes (5'- et 3'-UTR) des différents ARNm semblent en être dans ce cas les acteurs majeurs.

Le premier indice quant à l'importance des régions non-traduites est venu de l'étude d'une souris transgénique dans laquelle le gène *Otx2* avait été remplacée par un cDNA du gène *Otx1* humain (*hOtx1*), afin d'étudier leur potentielle équivalence fonctionnelle. Dans ces souris, le cDNA de *hOtx1*, suivi d'une séquence de polyadénylation, avait été intégré à la place de l'extrémité de l'exon 1 d'*Otx2* (qui inclut une partie de la 5'-UTR et le début de la séquence codante), de l'exon 2 dans son entier, et du premier et second intron. L'ARN ainsi produit, sous le contrôle du locus *Otx2*, était donc privé d'une partie de la 5'-UTR et de l'intégralité de la 3'-UTR (du fait de la polyadénylation précoce). Dans ces souris, *hOtx1* était correctement transcrit dans les zones normales d'expression d'*Otx2*, mais sa traduction était restreinte à l'endoderme viscéral : les ARNm *hOtx1* présents dans l'épiblaste et le neurectoderme ne menaient pas à la synthèse de protéines hOtx1 (*Acampora et al., 1998a*). Des souris où le cDNA d'*otd* vient remplacer les mêmes régions du gène *Otx2*, et est donc exprimé dans les mêmes conditions, présentent le même défaut de traduction dans l'épiblaste et le neurectoderme (*Acampora et al., 2001*). L'export des ARNm *otd* depuis le noyau semble également affecté. L'absence des régions 5' et 3' non-codantes de l'ARNm *Otx2* semblent donc capitales à sa traduction correcte, indépendamment de la séquence codante qu'il porte. Cette hypothèse a été confirmée par de nouveaux modèles murins dans lesquels les mêmes cDNA *hOtx1* et *otd* ont été introduits dans le locus *Otx2*, cette fois flanqués des régions 5' et 3' du gène *Otx2*, afin d'assurer leur incorporation dans les ARNm produits. Les protéines hOtx1 et OTD étaient alors synthétisées de façon normale dans la totalité de la zone d'expression des ARNm (*Acampora et al., 2001, Acampora et al., 2003*).

Afin de dégager les mécanismes à l'oeuvre dans la régulation de la traduction d'*Otx2* par les 5'- et 3'-UTR, Pietro Pilo Boyl et collègues ont spécifiquement perturbé la région 3' non-codante par insertion d'une séquence de 300 pb issue du phage  $\lambda$ . Cette simple modification empêche à elle seule la traduction d'*Otx2* dans l'épiblaste et le neurectoderme, en gênant la formation efficace de complexes polyribosomiques (Boyl *et al.*, 2001). Une structure correcte de la séquence 3' est donc cruciale pour assurer la traduction d'*Otx2* dans tous les tissus où il est exprimé. Une séquence de 140 bp est conservée dans les 3'-UTR de tous les Vertébrés, et pourrait en être un composant majeur.

Le rôle *in vivo* des séquences non-codantes en 5' est plus difficile à examiner, notamment car il en existe au moins quatre différentes issues des différents promoteurs, comme mentionné plus haut, et qu'elles présentent déjà des patrons de transcription différents. On sait cependant qu'elles apportent des propriétés de traduction différents à l'ARNm *Otx2* : des constructions codant pour *Otx2* produisent des quantités différentes de protéines dans des lignées de cellules en culture selon les 5'-UTR qu'elles présentent (Courtois *et al.*, 2003). Leurs propriétés peuvent même changer dans le temps ; l'isoforme «E» décrit en I.1.2.2.1, par exemple, est efficacement traduit à E6,5, mais ne forme plus de complexes polyribosomiques à E10,5 (Acampora *et al.*, 2009). Mais leur importance exacte au niveau traductionnel durant le développement n'a pas encore été élucidée, et encore moins démêlée de la régulation transcriptionnelle associée à ces séquences. Les embryons de souris dans lesquelles elles sont absentes présentent des anencéphalies (Acampora *et al.*, 2001), ce qui n'a jamais lieu dans les embryons où elles existent (Boyl *et al.*, 2001), qui ne développent que des exencéphalies ou des anomalies du SNC antérieur. Cela dit, la séquence 3'-UTR est également absente des premiers, alors qu'elle est simplement perturbée chez les seconds, ce qui empêche d'attribuer la totalité des différences observées aux seules séquences 5'. Pour aller plus loin, on peut s'interroger ici sur les contradictions apparentes soulevées par les études de 2001 et 2009 de l'équipe d'Antonio Simeone (Acampora *et al.*, 2001, Acampora *et al.*, 2009) : en 2009, elle a montré qu'en l'absence des isoformes nucléiques «A» et «B», *Otx2* était moins exprimé dans l'épiblaste au niveau protéique (**Figure 8B**). Pourtant, en 2001, ils avaient observé l'expression de l'ARN *otd* sous le contrôle d'un locus *Otx2* incapable de produire les isoformes «A» et «B», en absence de leurs sites d'épissage. *otd* était alors exprimé à la fois dans l'endoderme et l'épiblaste au niveau nucléaire (**Figure 8C**) ! Le mécanisme exact de la régulation du niveau d'*Otx2* par les isoformes «A» et «B» dans l'épiblaste reste donc encore incomplet.



### Figure 8 : Expression d'*Otx2* en fonction des isoformes ARNm présents

Sous chaque image sont représentés les isoformes exprimés.

(A) Immunohistochimie  $\alpha$ -*Otx2* sur un embryon sauvage à E6,5. Les quatre isoformes A, B, C, E sont exprimés normalement dans cet embryon.

(B) Immunohistochimie  $\alpha$ -*Otx2* sur un embryon *Otx2* $\Delta$ 3SS/ $\Delta$ 3SS à E6,5. Les sites d'épissage des isoformes A et B ont été supprimés dans cet embryon, et par conséquent, seuls les isoformes C et E sont exprimés. On remarque que les protéines Otx sont presque complètement absentes de l'épiblaste.

(C) Hybridation *in situ* utilisant une sonde *otd* sur un embryon *Otx2*<sup>otd/otd</sup>. Dans ces embryons, une partie du locus *Otx2* a été remplacée par la séquence codante *otd*. La recombinaison ayant supprimé les sites d'épissage des isoformes A et B, les ARNm *otd* ne sont représentés que par les isoformes C et E. On remarque qu'*otd* est alors exprimé dans tout l'épiblaste.

D'après *Acampora et al., 2009, Acampora et al., 2001*

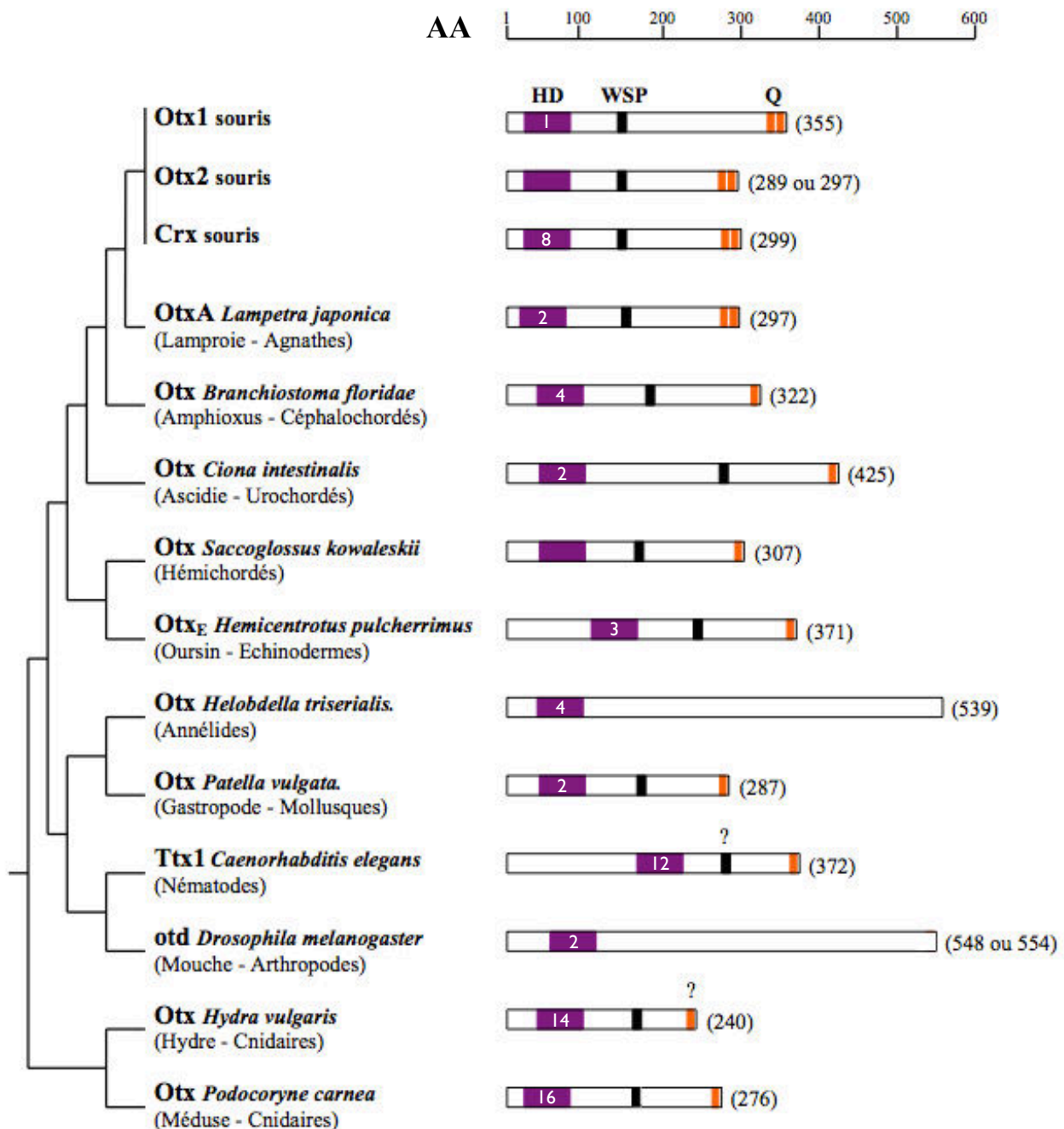
Une interaction entre les régions 5'-UTR et 3'-UTR est enfin envisageable : la région 3' régule la traduction d'*Otx2* uniquement dans l'épiblaste et le neur ectoderme, où les isoformes «A» et «B» sont majoritaires (*Acampora et al., 2009*), et n'a pas d'effet sur la traduction dans l'endoderme où les isoformes «C» et «E» dominent. Il est donc possible, comme *Boyl et al.* l'avaient supposé, que la région 3'-UTR interagisse spécifiquement avec certains isoformes 5', et stabilise des structures secondaires formées par ces isoformes et facilitant la fixation des sous-unités ribosomales.

La régulation traductionnelle des gènes *Otx*, ou du moins d'*Otx2*, est donc principalement sous le contrôle des régions non-codantes de l'ARNm. D'autres mécanismes de régulation de la traduction peuvent cependant être envisagés, notamment *via* d'autres ARN. Ainsi, des ARN antisens de la région génomique de *Crx* (qui n'englobent pas l'ARNm de ce dernier) sont ainsi exprimés dans la rétine humaine, et sont capables d'inhiber l'expression de *Crx* et d'*Otx2*, sans que la manière, directe ou indirecte, dont ils procèdent ne soit connue (*Alfano et al., 2005*). Des miRNAs pouvant cibler les ARN *Otx* existent également, sans que leur rôle ait été étudié (*Lewis et al., 2005, Landgraf et al., 2007*).

### I.1.2.3.2 Structure et conservation des protéines Otx.

Encore plus qu'au niveau des patrons d'expression ou des structures génomiques, c'est au niveau protéique que la conservation de la famille *Otx* se fait le plus ressentir. Les différentes protéines *Otx* caractérisées présentent en effet des similitudes remarquables, notamment au niveau de leur domaine le plus caractéristique, l'homéodomaine.

Les protéines *Otx* sont de taille variable, entre 200 et 600 acides aminés (pour comparaison, les deux isoformes issus des différents ARNm murins font 289 et 297 AA, (Courtois et al., 2003) alors que la protéine du gène *otd* a 542 AA (Vandendries et al., 1996)), mais toutes, sans exception, présentent un homéodomaine. Ce domaine d'environ 60 AA leur confère leur capacité de fixation à l'ADN (Briata et al., 1999, Chau et al., 2000, Chen et al., 2002). Qui plus est, son 50ème AA est toujours une lysine (K), située en 9ème position de la troisième hélice dans l'homéodomaine correctement conformé, ce qui fait entrer la famille *Otx* dans les facteurs de transcription *paired-like/POU* (K<sub>50</sub>). Cette lysine confère aux protéines *Otx* leur spécificité de fixation sur l'ADN : lorsqu'elle est substituée pour un autre acide aminé, les propriétés des facteurs *Otx* sont modifiées (Pannese et al., 1995, Mao et al., 1996). En l'état, l'homéodomaine *Otx* permet la reconnaissance et la fixation du motif *bicoid/Otx* (T/C)TAATC(C/T) (Simeone et al., 1993, Furukawa et al., 1997, Chen et al., 1997, Freund et al., 1997, Briata et al., 1999). Il serait également un domaine d'interaction protéique important (Nakano et al., 2000, Peng et al., 2005, Lerner et al., 2005, Mitton et al., 2005). Il est conservé de manière impressionnante au sein des Métazoaires, et ce à travers toutes les classes d'orthologie existantes (**Figure 9**). Les homéodomains des protéines *Otx1* et *Crx* murines ne diffèrent par exemple que de 1 et 8 AA d'*Otx2*, respectivement, et les protéines *Otx2* de la souris et du xénope n'ont qu'un seul acide aminé de différence au niveau de l'homéodomaine (Simeone et al., 1993, Furukawa et al., 1997, Pannese et al., 1995). La conservation de l'homéodomaine s'étend très loin chez les Métazoaires : seuls 2 AA changent entre la drosophile et la souris, et même l'homéodomaine d'une espèce ayant divergé aussi précocément que la méduse *Podocoryne carnea* présente 73% de similitude avec celui de la souris (Simeone et al., 1993, Müller et al., 1999, **Figure 9**). Etant donné que ce domaine est essentiel pour conférer aux protéines *Otx* leurs propriétés principales, on peut en déduire que toutes les protéines *Otx* fixent le motif *bicoid/Otx*.



**Figure 9 : Représentation schématique des protéines Otx à travers l'évolution**

L'homéodomaine (HD) est représenté en violet, le motif WSP en noir, et la/les queue(s) Otx (Q) en orange. La taille de chaque protéine est indiquée entre parenthèses. Les points d'interrogation indiquent que la présence de la structure n'est que putative. Le nombre blanc à l'intérieur de chaque homéodomaine indique le nombre d'acides aminés différents de celui d'Otx2 murin. Adapté de *Acampora et al., 2005*

Du fait de leur mécanisme d'action, les protéines Otx sont principalement nucléaires. En accord avec cette localisation subcellulaire, des études ont montré qu'elles comportent des signaux de localisation nucléaire (NLS) qui permettent leur import, mais la position de ces derniers n'est pas conservée d'une protéine à l'autre. Le NLS de la protéine Crx murine serait principalement composé des 10 derniers AA de son homéodomaine (*Fei and Hughes, 2000*), tandis que celui d'Otx1 serait dans la partie N-

terminale de la protéine chez le rat (*Zhang et al., 2002*). Chez Otx2 murin, on pensait le NLS situé un peu en aval de l'homéodomaine (*Baas et al., 2000*). En effet, une séquence située 20 AA en N-terminal de l'homéodomaine permet la présence la protéine dans le noyau ; l'homéodomaine lui-même serait qui plus est un NLS (*Chatelain et al., 2006*). Dans certains cas, cependant, les protéines Otx sont retrouvées dans le cytoplasme, comme par exemple dans les cellules de la zone ventriculaire du rat (*Zhang et al., 2002*) ; Cette séquestration cytoplasmique semble être un processus actif.

D'autres structures sont également présentes dans plusieurs protéines Otx, et peuvent influencer sur leur activité (**Figure 9**). L'une d'entre elles est la «queue Otx» ; ce domaine de 12 à 13 acides aminés est présent chez les Echinodermes, les Céphalochordés, les Urochordés, les Nématodes, et même chez la méduse *Podocoryne carnea* (*Li et al., 1997, Satterlee et al., 2001, Cañestro et al., 2005*), mais est apparemment absent, ou tout du moins trop dégénéré, dans le gène *otd* de drosophile, ainsi que chez l'Annélide *Hellobdella robusta* (*Acampora et al., 2005, Bruce et Shankland, 1998*). Il est de plus dupliqué dans l'intégralité des Craniates et chez l'amphioxus (*Furukawa et al., 1997, Ueki et al., 1998, Williams et Holland, 1998, Germot et al., 2001, Sauka-Spengler, 2001, 2002*), mais une des copies est plus ou moins dégénérée dans les protéines de la classe d'orthologie *Otx5/Crx* des mammifères, ainsi que chez certaines protéines du xénope, du poulet et du poisson-zèbre (*Furukawa et al., 1997, Germot et al., 2001, Plouhinec et al., 2003*). Malgré sa conservation apparemment assez forte, les fonctions de cette séquence n'ont pas été clairement identifiées : elles ne semblent pas être impliquées dans la localisation subcellulaire des protéines Otx (*Fei and Hughes, 2000*) ni dans leurs interactions protéine-protéine (*Nakano et al., 2000*). Leur implication dans la fonction transactivatrice des protéines Otx est sujette à controverse : si elles semblent nécessaires et suffisantes à l'activité transactivatrice d'Otx1 chez le rat (*Zhang et al., 2002*), elles n'ont pas d'influence apparente sur l'activité de Crx (*Yanagi et al., 2000, Chen et al., 2002*). La protéine Otx2, cependant, leur doit apparemment une grande partie de son potentiel activateur (*Chatelain et al., 2006*).

Parmi les autres domaines plus ou moins conservés parmi les protéines Otx, on compte également le domaine WSP. Cet hexapeptide dont la séquence exacte est (S/A)(I/L)WSPA est retrouvé chez tous les Deutérostomiens (*Chen et al., 1997, Freund et al., 1997, Ueki et al., 1998, Germot et al., 2001, Sauka-Spengler et al., 2002, Cañestro et al., 2005*). Il semble avoir beaucoup dérivé chez les Protostomiens (*Acampora et al., 2005*), et est par conséquent absent du gène *otd*, mais il peut néanmoins être retrouvé chez

certain membres de ce groupe, comme *Tribolium castaneum*, et la méduse *Podocoryne carnea* (Li et al., 1996, Müller et al., 1999) ; sa fonction reste toutefois peu décrite. Il semblerait avoir pour fonction d'atténuer la fonction transactivatrice d'Otx2, voire d'inverser son rôle, par l'adjonction de corépresseurs. Il permettrait en effet l'interaction d'Otx2 avec Tle/Groucho à la frontière mésencéphale/métencéphale, ainsi qu'avec GRG4 dans l'hypothalamus, faisant ainsi de l'homéopeptide un répresseur potentiel (Puelles et al., 2004, Heimbucher et al., 2006, Larder et al., 2009). On retrouverait également une séquence PEST chez plusieurs organismes deutérostomiens, ainsi que sur la protéine OTD de drosophile, qui assurerait une dégradation rapide des protéines Otx (Finkelstein et al., 1990, Williams et Holland, 1998).

Enfin, deux régions basiques sont souvent retrouvées de part et d'autre de l'homéodomaine, ainsi qu'une région polyglutamine en aval de ce dernier (Chen et al., 1997, Freund et al., 1997, Germot et al., 2001). Les régions basiques pourraient avoir un rôle transactivateur (Chau et al., 2000), et la région polyglutamine est impliquée dans les interactions protéine-protéine de Crx (Chen et al., 2004).

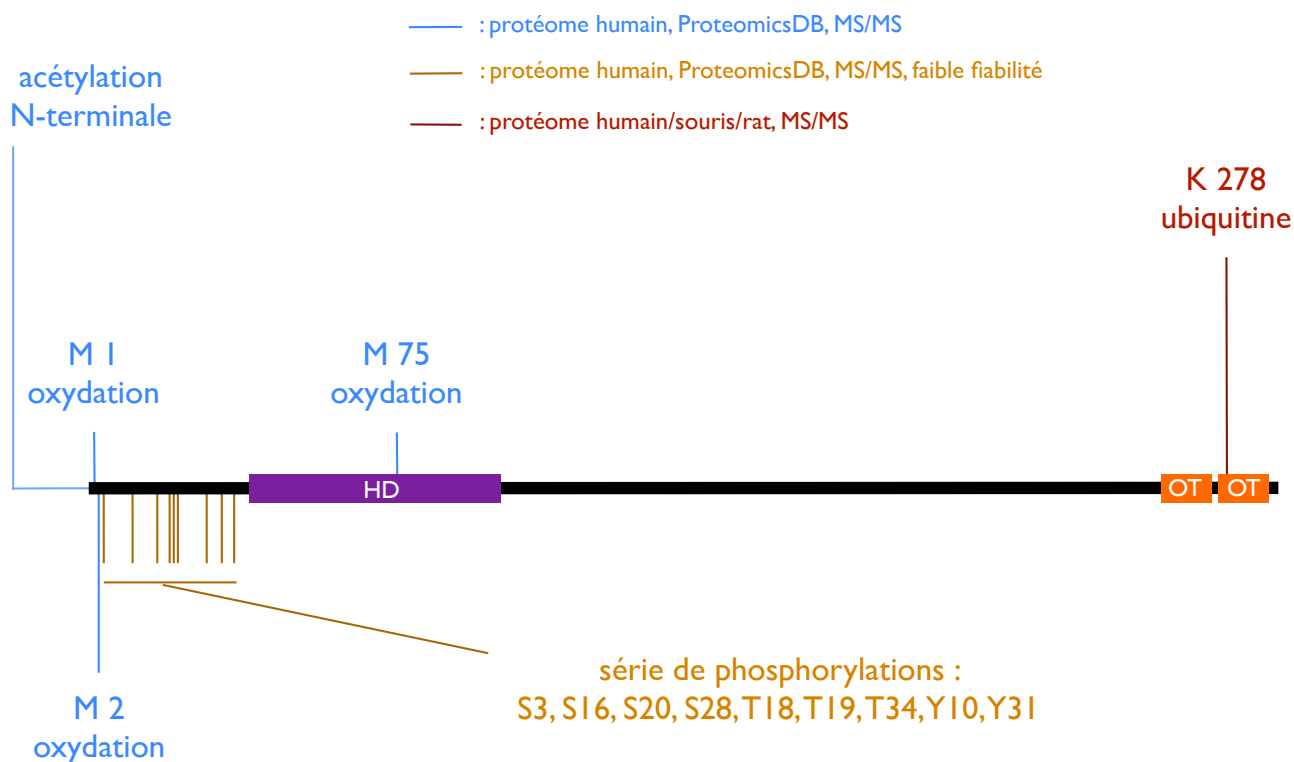
Les protéines Otx forment donc une famille extrêmement conservée, notamment au niveau de domaines discrets, dont la signification fonctionnelle n'est pas encore avérée. L'homéodomaine en particulier est demeuré quasi-constant au cours de l'évolution, à tel point que les protéines Otx de différentes espèces sont fonctionnellement équivalentes, comme la sous-partie suivante va le décrire.

#### I.1.2.3.3. Modifications post-traductionnelles des protéines Otx

Très peu d'informations sont disponibles sur les modifications post-traductionnelles potentielles des protéines Otx. En tant que facteurs de transcription, leur faible concentration cellulaire empêche une analyse aisée de leurs modifications *in vivo*. Un article récent a toutefois révélé que des groupements N-acétyl glucosamine étaient ajoutés à plusieurs acides aminés (sérine ou thréonine) de la protéine Otx2 dans des lignées cellulaires de médulloblastomes, où elle est suffisamment exprimée pour permettre l'observation de ses modifications (Ortiz-Meoz et al., 2014). Les conséquences de l'addition de ces groupements sont encore inconnues.



Une recherche approfondie de différentes bases de données (ProteomicsDB, SwissProt) sur la protéine d'intérêt de cette thèse, Otx2, fait apparaître plusieurs modifications post-traductionnelles détectées par spectrométrie de masse. Ces dernières sont décrites **Figure 10** ; elles sont cependant le résultat d'une agrégation de données de



sources multiples, y compris de lignées cellulaires, et il est ainsi impossible de savoir si

### Figure 10 : Modifications post-traductionnelles d'Otx2

La structure schématique de la protéine Otx2 est indiquée. Pour chaque modification post-traductionnelle, le type, l'acide aminé concerné (si pertinent), ainsi que sa position dans la séquence protéique est indiquée. Pour chaque couleur associée à une modification, la ou les espèce(s) d'origine, la base de données utilisée, ainsi que la méthode de découverte sont indiquées. La série de phosphorylations est considérée peu fiable car elle est retrouvée sur un seul fragment en spectrométrie de masse dans l'intégralité de la base de données. De plus, ces sites de phosphorylation ne sont pas recensés par d'autres bases de données spécialisées dans la phosphorylation, comme PhosphoSitePlus. *HD* : Homéodomaine, *OT* : queue Otx (OTx Tail)

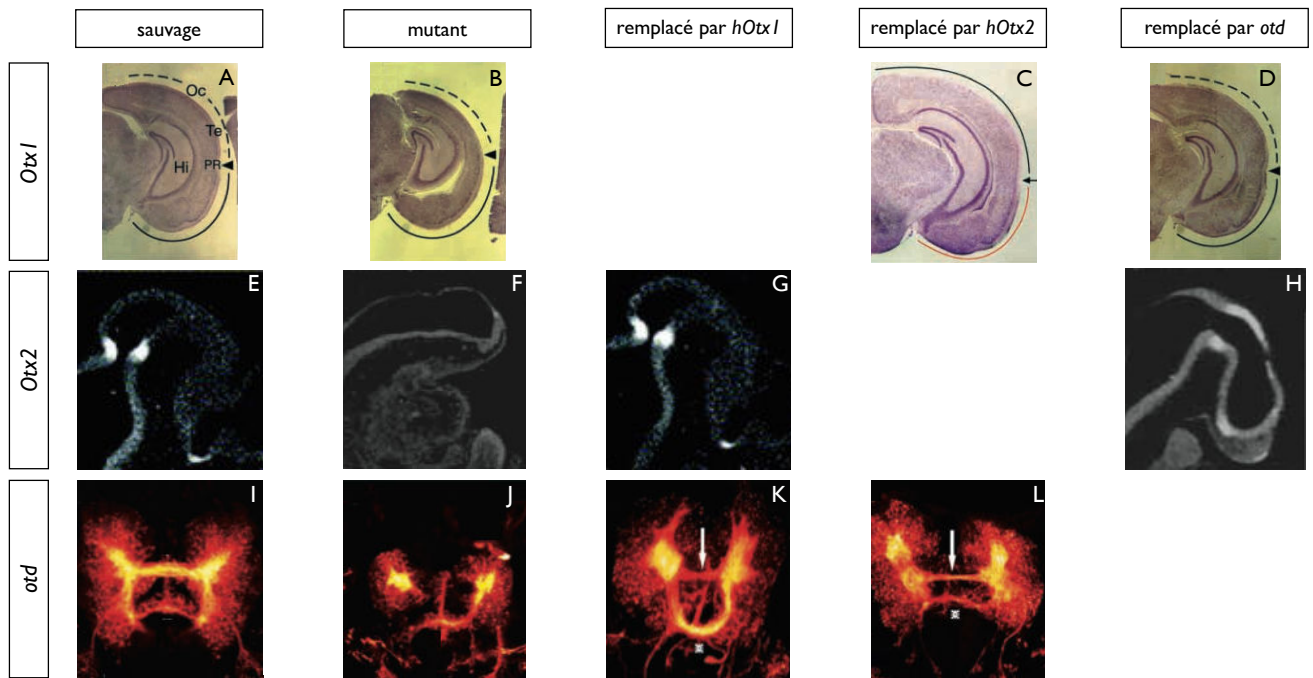
elles présentent une spécificité tissulaire. Leur importance fonctionnelle est également inconnue.

#### I.1.2.3.4. Équivalence fonctionnelle des protéines Otx

Plusieurs études ont remplacé la séquence codante d'un gène *Otx* par un autre afin d'étudier leur équivalence fonctionnelle. Dès 1999, Dario Acampora et collègues avaient remarqué que la substitution de *hOtx2* ou *otd* à la séquence codante du gène *Otx1* de souris permettait un développement quasi-normal des souris. En particulier, les crises d'épilepsie et les défauts de corticogénèse normalement présents dans les souris déficientes en *Otx1* sont complètement abolis dans les souris *Otx1<sup>hOtx2/hOtx2</sup>* ou *Otx1<sup>otd/otd</sup>* (Acampora et al., 1999, Acampora et al., 1998b). Des défauts morphologiques du mésencéphale et du cervelet subsistent, mais sont fortement atténués lorsqu'on les compare à ceux présents dans des souris *Otx1<sup>-/-</sup>*, signe que les protéines Otx2 et OTD peuvent accomplir les rôles normalement dévolus à Otx1 (**Figure 11**). Seul le canal latéral semicirculaire de l'oreille interne n'est jamais récupéré : sa mise en place ne serait donc permise que par la protéine Otx1. Dans une revue publiée quelques années plus tard, Dario Acampora suggère que cette spécificité fonctionnelle pourrait être attribuée à trois séquences (deux d'entre elles riches en alanines, la troisième riche en histidines) propres à Otx1 (Acampora et al., 2005).

L'équivalence fonctionnelle est par ailleurs réciproque : pour peu que les séquences 5' et 3' du locus *Otx2* soient conservées, des souris qui expriment *hOtx1* au locus *Otx2* sont presque parfaitement normales : l'induction du neurectoderme antérieur se fait correctement, et les cerveaux des souris transgéniques sont morphologiquement normaux (Acampora et al., 2003, **Figure 11**). De la même manière, l'expression ubiquitaire de *hOtx1* ou *hOtx2* dans des mouches *otd<sup>-/-</sup>* restaure en grande partie les phénotypes affectés chez les mutants : la structure du système nerveux antérieur et ventral est normale et le système visuel est partiellement induit (Leuzinger et al., 1998, Nagao et al., 1998, Adachi et al., 2001, **Figure 11**).

Enfin, l'équivalence fonctionnelle semble véritablement ubiquitaire, et n'est pas restreinte aux trois espèces utilisées plus haut : le gène *Hroth* d'ascidie peut lui aussi efficacement remplacer *otd*, et le gène *Otx1* de rat peut jouer le rôle des gènes *ceh-36* et *ceh-37* de nématode (Adachi et al., 2001, Lanjuin et al., 2003). Elle n'est toutefois pas universelle : le gène *ttx-1* de *C. elegans* ne peut par exemple être remplacé par *Otx1* ni *ceh-37* (Lanjuin et al., 2003).



### Figure 11 : Equivalence fonctionnelle des protéines Otx

(A-D) Capacités des protéines Otx à remplacer Otx1. Les flèches marquent le sulcus rhinalis. Coupes transversales d'un cerveau adulte (A) sauvage, (B) *Otx1*<sup>-/-</sup>, (C) *Otx1<sup>hOtx2/hOtx2</sup>*, (D) *Otx1<sup>otd/otd</sup>*. Le cortex est moins épais et l'hippocampe malformé chez le mutant (B) ; les tailles relatives des parties dorsales et ventrales prises par rapport au sulcus rhinalis sont également modifiées. L'expression de *hOtx2* (C) et *otd* (D) restaure ces défauts.

(E-F) Capacités des protéines Otx à remplacer Otx2. Hybridations in situ de l'ARNm *Fgf8* sur des coupes sagittales d'embryon E10,5 (E) sauvage, (F) *Otx2<sup>otd/otd</sup>*, (G) *Otx2<sup>hOtx1/hOtx1</sup>*, (H) *Otx2<sup>otd/otd</sup>*. Les embryons sont orientés côté antérieur à droite. L'embryon *Otx2<sup>hOtx1/hOtx1</sup>* est considéré mutant car la traduction d'*Otx2* n'y a pas lieu à E10,5. L'expression de *Fgf8* à la frontière mésencéphale/métencéphale est abolie chez les mutants (F), et restaurée totalement (G) ou en partie (H) avec l'expression de *hOtx2* ou *otd*.

(I-L) Capacités des protéines Otx à remplacer OTD. Visualisation par immunofluorescence (anticorps neurone-spécifique) de la structure des cerveaux de drosophile (I) sauvage, (J) *otd*<sup>-/-</sup>, (K) *otd*<sup>-/-</sup> ; *hsp-Otx1*<sup>+</sup>, (L) *otd*<sup>-/-</sup> ; *hsp-Otx2*<sup>+</sup>. Chez le mutant, le neuromère protocérébral est absent, ainsi que la commissure préorale (B). Les drosophiles exprimant *hOtx1* et *hOtx2* récupèrent toutes la commissure préorale (flèches en K et L), mais les mouches *otd*<sup>-/-</sup> ; *hsp-Otx1*<sup>+</sup> ont une commissure frontale anormale (K, astérisque), à la différence des *otd*<sup>-/-</sup> ; *hsp-Otx2*<sup>+</sup> (L, astérisque).

Adapté de Acampora et al., 1998, Leuzinger et al., 1998, Acampora et al., 1999, Acampora et al., 2001, Acampora et al., 2003

Les protéines Otx, fortement conservées, semblent donc interchangeables. La fonction précise d'une protéine Otx, dans un organisme comportant plusieurs gènes de la famille, serait alors attribuable à deux facteurs principaux : le plus important semble être son patron d'expression. Etant donné que les différentes protéines semblent capables d'assurer, au moins en partie, leurs fonctions mutuelles, seule l'expression de l'une d'entre elles dans une zone donnée différencierait son rôle de celui de ses paralogues (Acampora et al., 2005). Les zones de coexpression de plusieurs protéines Otx seraient une exception à ce postulat : des phénomènes émergents d'interaction, voire de synergie, pourraient être mis en place. Le deuxième facteur tient à la structure des protéines, et aux partenaires qu'elles pourraient recruter. En effet, comme mentionné plus haut,

l'équivalence fonctionnelle des protéines Otx n'est pas parfaite, et qui plus est des fonctions absolument spécifiques à une protéine ont pu être mises en évidence. L'homéodomaine commun, fortement conservé, permet de supposer des capacités de fixation à l'ADN et donc des répertoires de gènes cibles identiques. En tant que domaine extrêmement important à l'interaction des protéines Otx avec d'autres peptides (voir la partie III.4.2), il pourrait même expliquer la présence d'un ensemble de partenaires protéiques communs. Mais le reste de la séquence peptidique, plus variable entre protéines, permettrait le recrutement de partenaires spécifiques différents, et/ou pourrait modifier les capacités transactivatrices, ce qui expliquerait l'équivalence incomplète entre deux protéines de la famille.

Grâce à leur structure protéique, acquise précocément au cours de l'évolution, les différents membres de la famille Otx peuvent ainsi se fixer à l'ADN et moduler l'expression de gènes-cibles par leurs capacités transactivatrices. La sous-partie suivante s'attache à décrire, de manière plus ou moins chronologique, les divers rôles qu'un des membres de la famille *Otx*, le gène *Otx2*, peut jouer grâce à ses capacités, et montrera l'importance majeure que ce facteur de transcription peut avoir au cours du développement. Les trois classes d'orthologie n'existant que chez les gnathostomes, on se centrera sur l'étude des Vertébrés, et notamment de la souris. Etant donné que le patron d'expression des gènes *Otx* constitue une partie majeure de la spécificité de son rôle, et semble étroitement régulé, une attention particulière sera portée au lien entre la zone d'expression du gène et sa fonction, à diverses étapes du développement. On constatera ainsi que la multiplicité des rôles du gène *Otx2* peut être attribuée à son expression extrêmement dynamique.

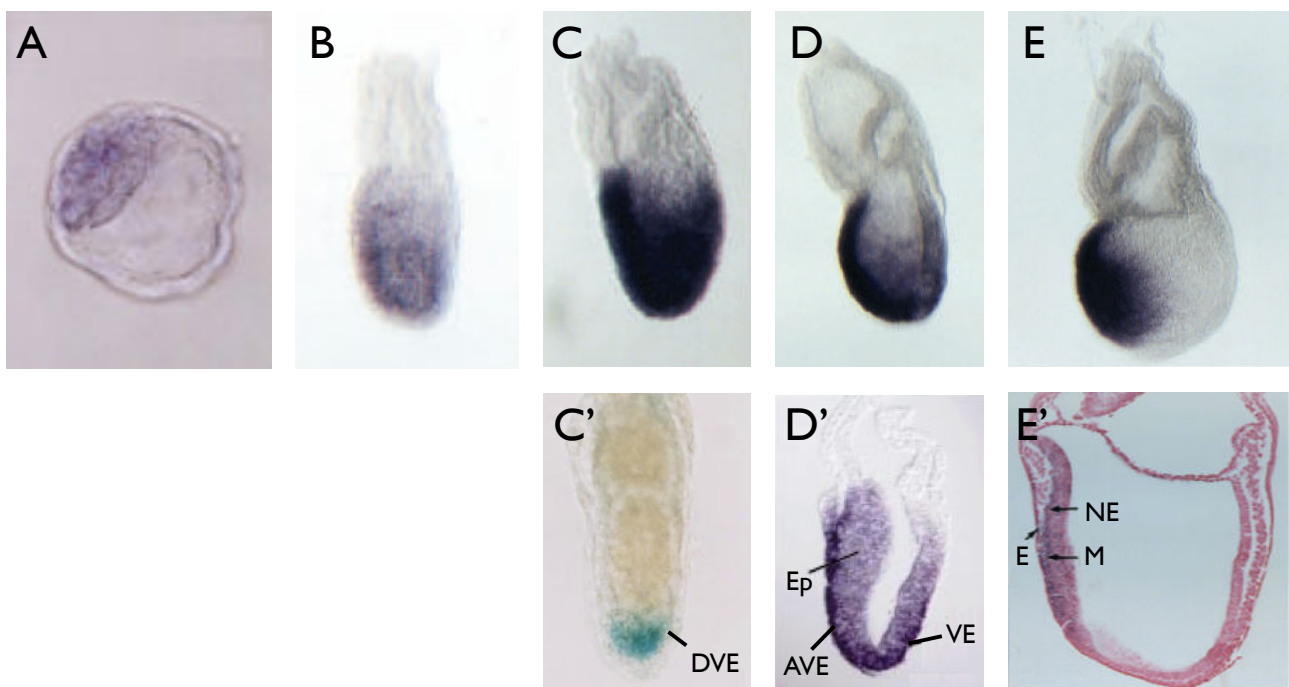
## 1.2 Multiplicité des rôles du gène *Otx2*

### 1.2.1 Développement embryonnaire précoce

Dès sa découverte, l'expression d'*Otx2* fut détectée très tôt durant le développement : une hybridation in situ à E5,5/E6,5 révéla sa présence dans l'épiblaste, ainsi que dans l'endoderme viscéral antérieur (*Simeone et al., 1992, 1993*). Le gène *Otx2* est en fait exprimé beaucoup plus tôt ; son ARN est présent dès E3,5 dans la masse interne du blastocyste (*Kimura et al., 2001, Figure 12*). Son expression est ensuite généralisée dans l'épiblaste, et est plus tard également retrouvée dans l'endoderme

viscéral distal (DVE, E5,5, *Simeone et al., 1993, Acampora et al., 1995, Kimura et al., 2000*). Elle persiste dans ce dernier compartiment tout au long de son antériorisation pendant la gastrulation entre E5,5 et E6,5 (**Figure 12**). Les territoires du mésodermes antérieur, formés au cours du même processus, et qui viennent remplacer l'endoderme viscéral antérieur (AVE), expriment également *Otx2*. A la fin de la gastrulation, enfin, son expression dans l'épiblaste est progressivement restreinte à la moitié antérieure, et enfin au tiers antérieur à E7,5. On la retrouve alors dans les trois feuilletts embryonnaires (*Ang et al., 1994, Figure 12*).

On peut ainsi remarquer que l'expression d'*Otx2* est très dynamique dès les premières étapes du développement embryonnaire. Les premiers indices de son importance dans une phase si précoce de son expression sont venues des premières tentatives d'invalidation (*knock-out, KO*) de ce gène dans des souris transgéniques. Plusieurs groupes ont pu remarquer un phénotype drastique chez les mutants



**Figure 12 : Expression précoce d'*Otx2***

(A-E) Hybridations in situ de la séquence codante d'*Otx2* sur embryons sauvages entiers à (A) E3,5, (B) E5, (C) E5,5, (D) E6,5, (E) E7,5/E8. Cette séquence temporelle montre bien l'antériorisation temporelle d'*Otx2*.

(C') Coupe longitudinale d'un embryon *Otx2<sup>lacZ/+</sup>* à E5,5 ; la  $\beta$ -galactosidase est exprimée sous le contrôle du locus *Otx2*, et son activité délimite ici l'endoderme viscéral distal (DVE). La  $\beta$ -galactosidase n'est pas active dans l'épiblaste car son ARN n'est pas traduit (la région 3' du locus *Otx2* est perturbée dans les embryons transgéniques, et la traduction des ARNs *lacZ* est donc perturbée, comme décrit en I.1.2.3.1)

(D') Coupe longitudinale d'un embryon sauvage à E6,5. *Otx2* est exprimé dans l'endoderme viscéral (VE), et notamment dans sa partie antérieure (AVE), ainsi que dans l'épiblaste (Ep).

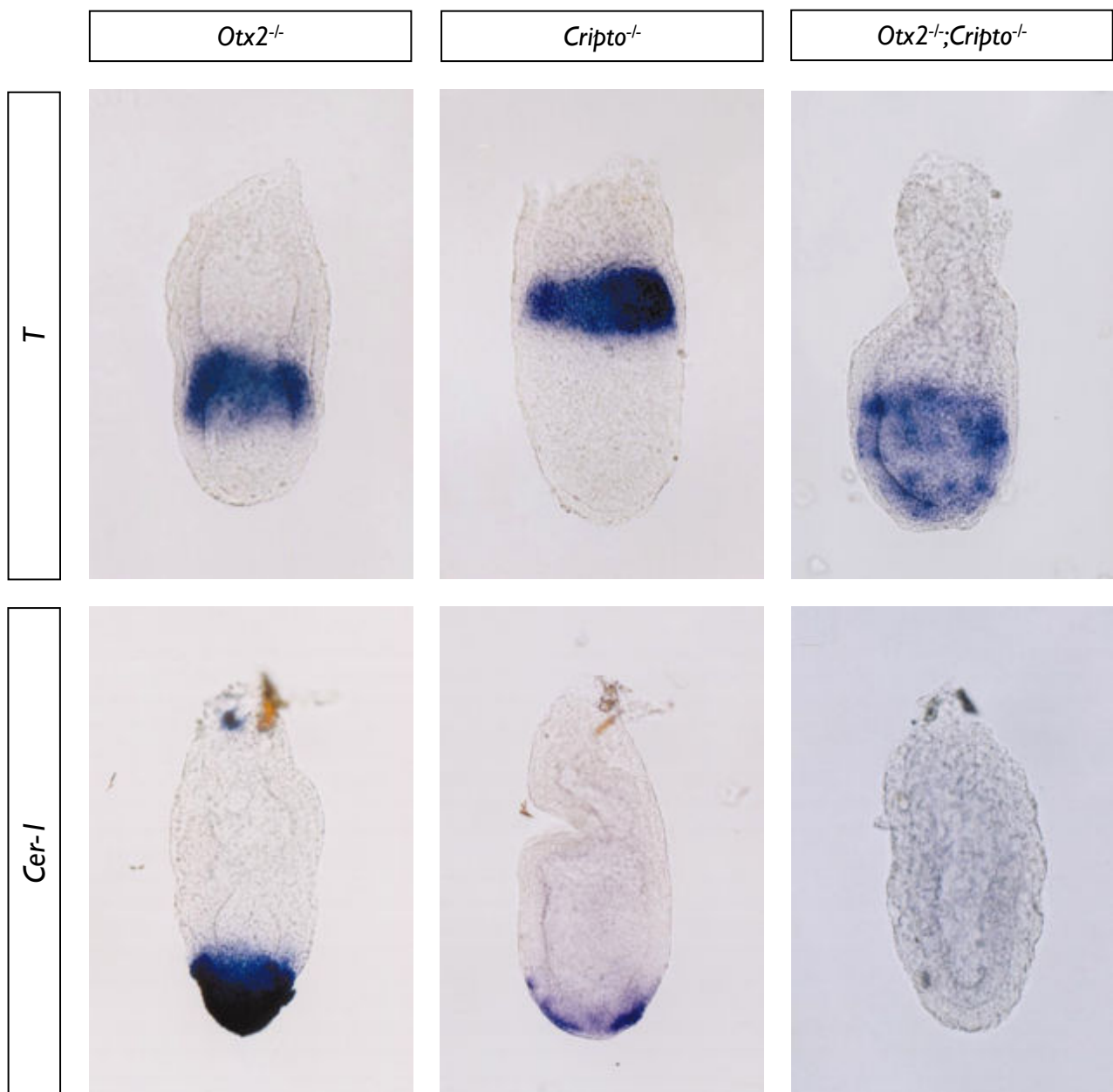
(E') Coupe longitudinale d'un embryon à E7,5. *Otx2* est exprimé à l'extrémité antérieure dans les trois feuilletts embryonnaires : l'endoderme définitif (E), le mésoderme (M) et le neuroectoderme (NE).

D'après *Ang et al, 1994, Beddington et al., 2001, Kimura et al. 2000, 2001*.

homozygotes : l'intégralité des structures antérieures aux premiers compartiments du métencéphale était manquante dès E8,5/E9,5 (*Acampora et al., 1995, Matsuo et al., 1995, Ang et al., 1996*), qu'elles soient neurales ou non. Les embryons ne développaient pas de structures antérieures au troisième rhombomère, comme indiqué par l'expression de marqueurs de différents territoires antérieurs : les marqueurs *Krox20* et *Hoxb1*, propres respectivement aux rhombomères 3/5 et 4, étaient exprimés à l'extrémité antérieure des embryons. Les marqueurs plus antérieurs, comme *Six3*, *En* et *Fkh2*, étaient tout simplement absents (*Ang et al., 1996, Matsuo et al., 1995, Rhinn et al., 1998*). Le tube neural des mutants, enfin, présente différents types de morphologie anormale, qui vont d'une interruption brutale à une structure en fourche (*Acampora et al., 1995, Ang et al., 1996*). Les embryons constitutivement mutants pour *Otx2* présentent donc des problèmes de mise en place de leur partie antérieure, notamment au niveau du tube neural.

Ces défauts morphologiques, certes frappants, ne sont pourtant pas les premières anomalies observables chez les mutants *Otx2*<sup>-/-</sup>. Des problèmes morphologiques de la gastrula sont visibles dès E7,25/E7,5, notamment une constriction anormale entre les parties embryonnaire et extraembryonnaire, ainsi qu'une absence de pli neural (*Ang et al., 1996, Acampora et al., 1995*). De plus, des cellules qui expriment le gène *lacZ* en lieu et place d'*Otx2* révèlent que certains mouvements gastrulatoires n'ont pas lieu dans les embryons mutants : dans les embryons *Otx2*<sup>lacZ/-</sup>, l'activité B-galactosidase, caractéristique de l'endoderme viscéral, reste confinée au pôle distal plutôt que de s'antérioriser (*Acampora et al., 1995*). Enfin, l'expression de plusieurs marqueurs de la gastrulation est anormale chez les mutants *Otx2* (cf partie suivante, *Ang et al., 1996, Matsuo et al., 1995*).

L'ensemble de ces observations, ainsi que le fait que le membre de la même famille d'orthologie chez le xénope, *XOtx2*, semble également influencer la gastrulation (*Pannese et al., 1995*), ont mené à l'étude plus approfondie du ou des rôle(s) qu'*Otx2* pourrait jouer dans le processus de gastrulation et de mise en place des structures antérieures de l'embryon. Les sous-parties suivantes montreront qu'il a une importance majeure dans l'établissement de l'axe proximo-distal de l'embryon de souris, dans sa rotation en axe antéro-postérieur, ainsi que dans le maintien d'une identité antérieure du neurectoderme. Ses différentes fonctions sont de plus étroitement liées à ses diverses zones d'expression, soulignant ainsi l'importance de leur régulation.



**Figure 13 : Interaction entre *Otx2* et *Cripto* dans l'induction du DVE et la mie en place de l'axe proximo-distal**

Hybridations in situ sur des embryons à E6.5 Les différents génotypes sont présentés par colonnes, les gènes étudiés par lignes. Le marqueur proximal/postérieur *T* est exprimé correctement dans les simples mutants, mais est présent de façon ubiquitaire dans le double mutant. Le marqueur du DVE *Cer-1*, présent dans les simples mutants, est absent du double mutant : le DVE n'est pas spécifié.

D'après *Kimura et al. 2001*.

#### I.2.1.1. Gastrulation

#### I.2.1.1.1. Différenciation de l'endoderme viscéral et établissement de l'axe proximo-distal

Au début de la gastrulation (entre E4,5 et E5,5), un axe proximo-distal est établi dans l'embryon, aisément identifiable par l'expression de plusieurs marqueurs. Les gènes *T* et *Wnt3* sont par exemple exprimés à l'extrémité proximale, tandis que le pôle distal, représenté par le DVE, exprime notamment *Lim-1* et *Cer-1* (**Figure 15, en haut**). La différenciation du DVE semble être l'élément clé de la mise en place de l'axe : il serait capable après son apparition de réprimer des signaux «proximalisants» (*Kimura et al., 2001, Figure 15, en haut*).

La première fonction du gène *Otx2* semble être de participer, en coopération avec *Cripto*, un facteur sécrété de type EGF-Cfc, à l'établissement de cet axe proximo-distal, en assurant la différenciation du DVE. En effet, si les simples mutants *Otx2*<sup>-/-</sup> ou *Cripto*<sup>-/-</sup> présentent des défauts de régionalisation fine de cet axe (les marqueurs *Dkk-1* et *Lefty1/2* sont par exemple respectivement absents, *Ding et al., 1998, Kimura et al. 2000, 2001*), la plupart des marqueurs sont cependant exprimés (*Kimura et al., 2001*). A l'inverse, la quasi-totalité des marqueurs, proximaux comme distaux, sont absents du double mutant *Otx2*<sup>-/-</sup>;*Cripto*<sup>-/-</sup> (**Figure 13**); en particulier, aucun des marqueurs de l'endoderme viscéral distal n'est exprimé (*Lim-1* ou *Cer-1*, **Figure 13** *Kimura et al., 2001*), et ce dernier adopte une morphologie et des caractéristiques moléculaires typiques de l'endoderme extraembryonnaire. *Otx2* et *Cripto* agiraient donc de concert pour spécifier le DVE et ainsi assurer la mise en place de l'axe proximo-distal. Peut-être en lien avec cette première fonction, ils auraient également un rôle dans le développement des parties extra-embryonnaires (*Kimura et al., 2001*).

Au moment de la différenciation de l'endoderme, les deux gènes apparaissent uniquement exprimés dans l'épiblaste. Ce dernier émettrait donc un signal, au moins en partie contrôlé par *Otx2* et *Cripto*, capable de spécifier le DVE.

Une fois le DVE différencié, *Otx2* y est également exprimé (*Kimura et al., 2000*). Cette expression est *Foxa2/HNF3β*-dépendante (*Kimura-Yoshida et al., 2007*) : *Foxa2* possède des sites de fixation sur l'enhancer VE-spécifique d'*Otx2* et est capable d'activer son expression. Or *Foxa2/HNF3β* lui-même est sous le contrôle de la voie Nodal activée par *FoxH1* (*Hoodless et al., 2001*). L'expression d'*Otx2* dans l'endoderme viscéral serait



donc indirectement sous le contrôle de la signalisation Nodal. Sa régulation directe par *Foxa2* explique par ailleurs en partie la proximité des phénotypes des mutants *Otx2<sup>-/-</sup>;Cripto<sup>-/-</sup>* décrits plus haut avec ceux des mutants *Foxa2/HNF3 $\beta$ <sup>-/-</sup>;Lim1<sup>-/-</sup>* (Perea-Gomez et al., 1999). L'interaction avérée et fonctionnellement significative entre les protéines Otx2 et Foxa2, et Lim1 et Otx2 de l'autre, vient également expliquer cette similitude phénotypique (Nakano et al., 2000).

I.2.1.1.2. Antériorisation de l'endoderme viscéral et mise en place de l'axe antéro-postérieur

Pendant la gastrulation à proprement parler, les cellules de l'endoderme viscéral distal effectuent un mouvement dans le sens proximal, et viennent alors marquer le nouveau pôle antérieur de l'embryon. L'axe proximo-distal précédemment établi suit ce mouvement et entre donc en rotation pour former le nouvel axe antéro-postérieur : les marqueurs distaux, principalement spécifiques au DVE, deviennent des marqueurs antérieurs, tandis que les marqueurs proximaux adoptent une position postérieure (**Figure 15, en haut**).

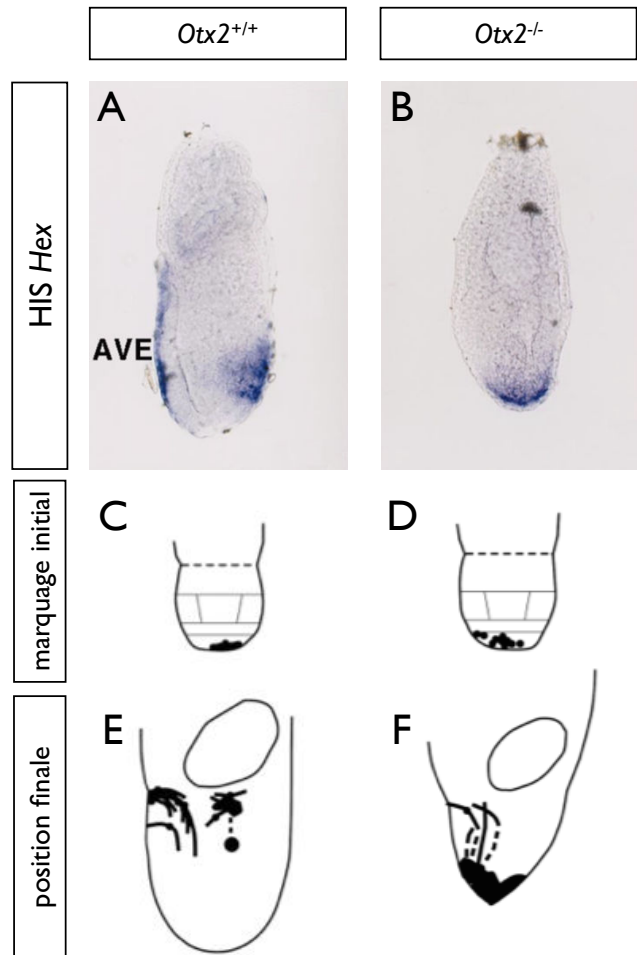
*Otx2* joue un rôle absolument majeur dans toutes les étapes de ce processus. En l'absence de ce gène, les marqueurs caractéristiques du DVE tels que *Hex*, *Dkk-1*, *Lim-1* et *Hex-1* restent en position distale plutôt que d'être antériorisés (**Figure 14A,B**, Acampora et al., 1998a, Kimura et al., 2000, Zakin et al., 2000). Un suivi temporel des cellules du DVE, censées exprimer *Otx2*, par l'insertion du gène *lacZ* au locus *Otx2*, a permis de révéler que le mouvement vers le pôle antérieur de l'endoderme viscéral n'avait pas lieu chez les mutants. Alors que les cellules de l'endoderme migraient correctement pour former l'AVE dans des embryons *Otx2<sup>lacZ/+</sup>*, l'activité  $\beta$ -galactosidase des embryons *Otx2<sup>lacZ/-</sup>* restait confinée au pôle distal, révélant l'immobilité des cellules (Kimura et al., 2000). L'analyse du devenir, pendant la gastrulation, de clones cellulaires de l'endoderme marqués par un traceur vient confirmer ces observations : les cellules d'embryons mutants n'entament par leur mouvement antérieur, et leurs descendantes restent donc distales, alors que les clones sauvages donnent une progéniture localisée antérieurement (**Figure 14C-F**, Perea-Gomez et al., 2001). Qui plus est, les cellules de l'endoderme, normalement cuboïdales, adoptent une morphologie squameuse lors de leur migration dans les

**Figure 14 : *Otx2* assure le mouvement antérieur de l'endoderme viscéral**

(A,B) Hybridation in situ *Hex* sur des embryons à E6.5. Ce marqueur de l'endoderme viscéral est présent en position antérieure dans l'AVE chez les embryons sauvages. Dans les mutants, il reste en position distale.

(C-E) Suivi de clones cellulaires au cours de la gastrulation. Des clones de l'endoderme distal sont marqués par un traceur à E6 dans des embryons sauvages (C) ou mutants pour *Otx2* (D). Après 25 à 31h de culture *ex vivo*, leur devenir est étudié par observation de la position du traceur. Dans les embryons sauvages (E) les cellules se sont déplacées vers le pôle antérieur. Les cellules des embryons mutants (F) sont restées immobiles pour la majorité d'entre elles.

L'exrémité antérieure de l'embryon est à gauche dans chaque image. D'après *Kimura et al., 2000, Perea-Gomez et al., 2001*



embryons sauvages ; cette transition morphologique n'a jamais lieu dans les mutants *Otx2*<sup>-/-</sup> (*Kimura et al., 2000*).

*Otx2* est donc nécessaire au mouvement antérieur de l'endoderme viscéral lors de la gastrulation. Il serait à l'origine de plusieurs processus non-exclusifs pour assurer cette fonction. Le changement morphologique des cellules du DVE *Otx2*-positives lors de leur migration suggère qu'il pourrait modifier leurs propriétés adhésives ; il est en effet, comme mentionné en I.1., capable de réguler un grand nombre de molécules d'adhésion. Cependant, son action principale semble être l'activation de *Dkk-1*, un antagoniste de la voie Wnt sous son contrôle direct (*Kimura et al., 2001*). En effet, l'expression ectopique de *Dkk-1* semble être capable d'attirer les cellules du DVE, alors que la voie Wnt, dont les acteurs *Wnt3* et *Wnt8a* sont exprimés de façon postérieure dans l'embryon, repousse ces mêmes cellules (*Kimura-Yoshida et al., 2005*). Via l'activation de *Dkk-1* dans le DVE, *Otx2* serait donc en mesure de lancer la migration de ce dernier vers le futur pôle antérieur.

Une fois positionné antérieurement, le DVE (maintenant devenu l'AVE) est nécessaire et suffisant pour assurer la rotation correcte de l'axe proximo-distal en axe antéro-postérieur ; il est considéré comme un centre organisateur antérieur (*Beddington et*

*Robertson, 1999, Figure 15, en haut*). En cultivant des explants d'ectoderme en contact avec des cellules originaires de l'AVE, Kimura-Yoshida et confrères ont pu montrer que ce dernier assurait sa fonction en réprimant des facteurs postériorisants tels que *Cripto* et *T* plutôt qu'en activant des marqueurs antérieurs (*Kimura et al., 2000*). Cette fonction est *Otx2*-dépendante : des «pseudo-AVE» mutants (restés en position distale) sont incapables de réprimer *Cripto* ou *T* (*Kimura et al., 2000*). Incidemment, la capacité mentionnée plus haut du DVE à réprimer les facteurs proximaux plus tôt dans la gastrulation pourrait donc également être due à *Otx2*.

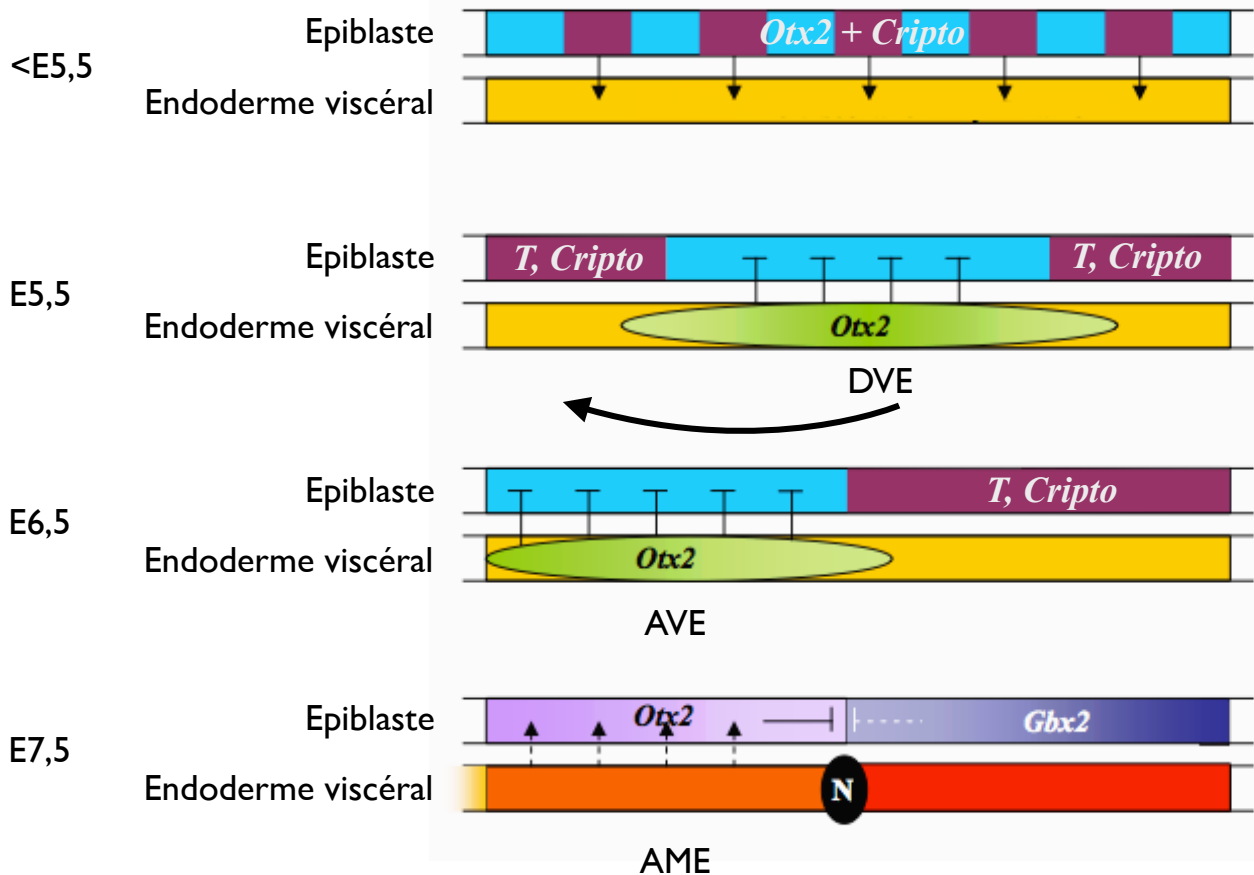
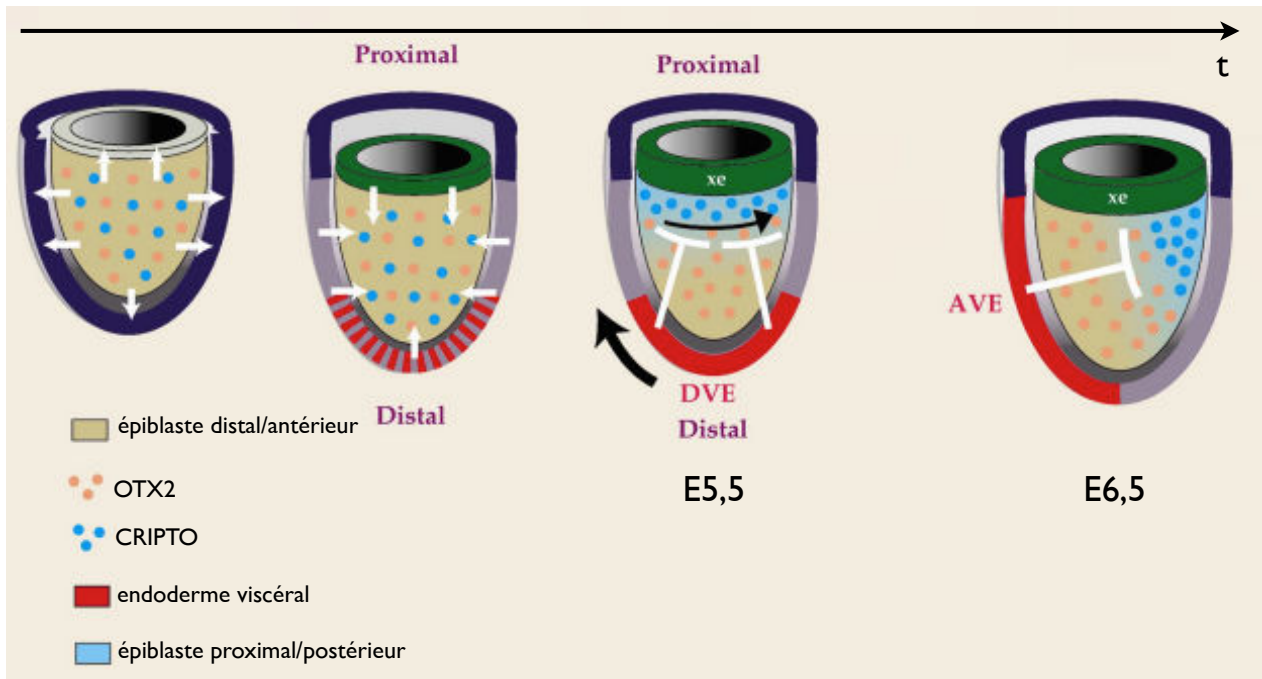
Ainsi, après avoir assuré sa migration correcte au pôle antérieur, *Otx2* assure également les fonctions organisatrices de l'AVE et permet donc la mise en place correcte de l'axe antéro-postérieur. Il est cependant difficile de déterminer s'il assure cette fonction de façon active ou s'il empêche simplement la capacitation de l'AVE en empêchant son mouvement.

Les différents rôles d'*Otx2* décrits dans cette partie sont attribuables exclusivement à son activité dans l'endoderme viscéral. Dans des souris qui n'expriment *Otx2* (ou un de ses orthologues) que dans l'endoderme viscéral, la migration de ce dernier et l'établissement précoce de l'axe antéro-postérieur sont restaurés (*Acampora et al., 1998a, 2009*). De même, des souris chimères résultant de l'inoculation de cellules *Otx2*<sup>-/-</sup> dans des embryons sauvages ont été produites ; ces chimères ont un endoderme viscéral *Otx2*<sup>+/+</sup> alors que le reste de l'embryon est *Otx2*<sup>-/-</sup>. La migration de l'endoderme viscéral et l'induction de la plaque neurale antérieure est également restaurée dans ces animaux (*Rhinn et al., 1998*).

#### I.2.1.2. Induction et maintien du neurectoderme antérieur

##### I.2.1.2.1. Induction par le mésendoderme antérieur

Le mésendoderme antérieur semble responsable de l'induction du neurectoderme antérieur. Il est en effet capable d'activer l'expression de gènes spécifiques de ce feuillet en culture d'explants (*Ang et al., 1994*). Il se forme à partir des descendants du noeud à partir de E6,25/E6,5, suite à l'antériorisation de l'AVE, et vient progressivement remplacer



**Figure 15 : Rôles du gène *Otx2* pendant le développement précoce**

En haut, représentation schématique du processus de gastrulation. Un signal provenant de l'épiblaste lance la différenciation de l'endoderme viscéral. Une fois initié, ce dernier permet la mise en place de l'axe proximo-distal en réprimant les signaux proximaux. A E5,5, le DVE entame une migration vers le futur pôle antérieur pour former l'AVE. Une fois mis en place, l'AVE assure l'établissement de l'axe antéro-postérieur par la répression des signaux postériorisants.

En bas, représentation plus précises des divers rôles d'*Otx2* au cours du processus. DVE : endoderme viscéral distal, AVE : endoderme viscéral antérieur, AME : endomésoderme antérieur, N: noeud. D'après Kimura et al., 2000.

ce dernier en position antérieure (Kimura et al., 2000). Il n'est jamais présent dans les embryons *Otx2*<sup>-/-</sup> (Acampora et al., 1995, Ang et al., 1996, Kimura et al., 2000), pour des raisons sans doute purement mécaniques : sans migration de l'endoderme viscéral sa formation n'est pas possible car ses cellules ne peuvent pas s'installer.

*Otx2* est donc indirectement responsable de l'induction du neurectoderme antérieur. Il ne semble pas jouer de rôle plus actif : dans les chimères mentionnés plus haut (Rhinn et al., 1998) le mésendoderme antérieur est de génotype *Otx2*<sup>-/-</sup>, et l'induction du neurectoderme a lieu correctement. Un neuroépithélium est en effet formé en avant du métencéphale, ce qui n'a jamais lieu dans les mutants *Otx2*<sup>-/-</sup> constitutifs.

#### I.2.1.2.2. Maintien du neurectoderme antérieur

S'il ne semble impliqué que d'une manière détournée dans l'induction du neurectoderme, l'étude des mêmes chimères montre qu'*Otx2* est toutefois absolument nécessaire au maintien et à la régionalisation précoce de ce dernier. En effet, le système nerveux rostral (antérieur au métencéphale) est mal spécifié dans ces chimères, dont le neurectoderme est *Otx2*<sup>-/-</sup>. Les marqueurs les plus antérieurs, tels que *Six3*, *Pax2* et *En*, sont exprimés dans une région beaucoup plus réduite dès leur apparition ; au cours du temps la plupart d'entre eux disparaissent qui plus est de façon quasi-complète. Certains sont même toujours absents, comme *Hesx1*, indice sans doute d'une régulation plus directe par *Otx2*. Une analyse des chimères «faibles», dans lesquelles les cellules *Otx2*<sup>-/-</sup> avaient colonisé l'embryon sauvage de façon moins complète, a permis d'approfondir cette étude, en étudiant quels gènes étaient exprimés ou absents spécifiquement dans les cellules *Otx2*<sup>-/-</sup> : *Otx2* régulerait ainsi certains gènes du neurectoderme antérieur de façon cellule-autonome, comme c'est le cas pour *Wnt1*, alors que d'autres, comme *En*, sont régulés d'une façon différente, non-cellule-autonome (Rhinn et al., 1999). L'expression d'*Otx2* dans le neurectoderme est donc nécessaire à son maintien.

Le gène *Otx2* est ainsi un élément crucial du processus de gastrulation, nécessaire à plusieurs moments-clés (**Figure 15, en bas**) :

- son expression dans l'épiblaste est nécessaire, en coopération avec celle de *Cripto*, à l'induction de l'endoderme viscéral distal

- elle permettrait également l'établissement de l'axe proximo-distal
- son expression consécutive dans l'endoderme distal assure la migration antérieure de ce dernier et permet donc la gastrulation
- elle est ensuite nécessaire à la mise en place correcte de l'axe antéro-postérieur
- il est également indirectement responsable de la formation de l'AME
- enfin, son expression dans le neurectoderme antérieur permet le maintien de l'identité et de la régionalisation de ce dernier.

On peut au passage remarquer une fois de plus que chacune de ses fonctions est associée à une zone bien précise de son patron d'expression, soulignant encore l'importance fondamentale d'un contrôle fin de ce dernier. L'absence d'*Otx2* aboutissant à un échec de la mise en place de l'axe antéro-postérieur, de la formation du mésendoderme antérieur et de l'induction du neurectoderme antérieur, on comprend mieux qu'au-delà de leurs problèmes de gastrulation, les mutants constitutifs pour *Otx2* présentent une troncature des structures antérieurs au rhombomère 3.

Cependant, le phénotype aussi drastique que léthal des mutants homozygotes pendant le développement embryonnaire précoce a ralenti l'étude des rôles potentiels plus tardifs d'*Otx2*. D'autres stratégies que l'utilisation de KO constitutifs ont dues être mises en place pour contourner la létalité précoce. Trois stratégies principales se dégagent : l'utilisation d'hétérozygotes *Otx2*<sup>+/-</sup> (ou d'autres hypomorphes, en combinaison ou non avec d'autres mutations), l'utilisation de KO conditionnels (dans le temps ou l'espace) pour *Otx2*, ou l'expression ectopique d'*Otx2*. La première stratégie mise sur l'importance de la concentration de la protéine *Otx2* pour sa fonction : des hétérozygotes pour *Otx2* expriment une quantité moindre de protéine, et des phénotypes pourraient donc y apparaître, permettant le décryptage des fonctions du gène. Dans les animaux utilisés au sein du deuxième type de stratégie, le gène *Otx2* (généralement à son locus) est flanqué de sites de recombinaison (de type *lox* ou *frt* par exemple). Il est donc exprimé normalement jusqu'à l'expression dans les cellules d'une recombinaise capable d'utiliser les sites qui l'entourent ; il est alors excisé, aboutissant à des cellules génétiquement, et rapidement fonctionnellement, mutantes pour *Otx2*. L'utilisation de recombinaises de structures diverses sous le contrôle de promoteurs différents permet de provoquer le KO à des moments différents du développement, dans des tissus différents, voire de façon inductible. La dernière stratégie enfin, moins répandue, consiste à introduire dans des animaux transgéniques une copie supplémentaire du gène *Otx2*, sous le contrôle d'un autre promoteur. Son expression peut alors avoir lieu dans un endroit où il n'est

normalement pas présent, et les phénotypes alors observés peuvent offrir un aperçu des fonctions réelles du gène dans ses zones d'expression normales.

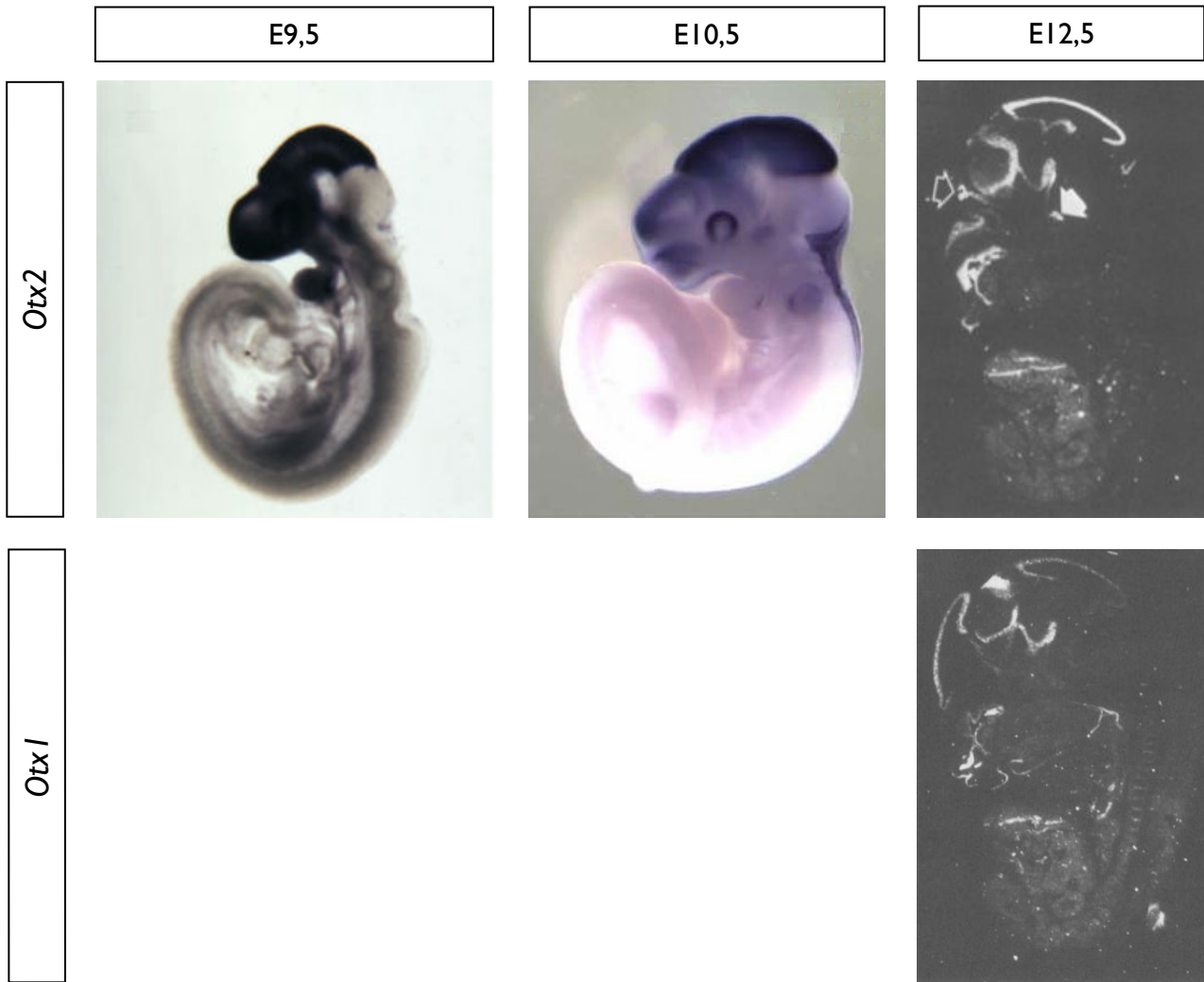
Les prochaines sous-parties s'attacheront à décrire les fonctions plus tardives du gène *Otx2* en utilisant les divers types d'étude décrites ci-dessus.

## I.2.2 Régionalisation du système nerveux antérieur

Une fois le neurectoderme antérieur mis en place, *Otx2* est exprimé dans l'ensemble des régions moyennes et antérieures du cerveau en formation. Il marque ainsi à E9,5 l'ensemble des futurs télencéphale, diencéphale et mésencéphale. Sa frontière d'expression postérieure se situe alors au niveau de la constriction isthmique qui sépare le mésencéphale du métencéphale (**Figure 16**, *Simeone et al., 1993, Ang et al., 1994, Acampora et al., 1995, Fossat et al., 2007*). Ce patron d'expression se maintient globalement à E10,5, où *Otx2* est simplement absent du télencéphale ventral antérieur au chiasma optique (**Figure 16**, *Simeone et al., 1992, Fossat et al., 2006*). Il disparaît également du télencéphale antérieur dorsal autour de E11,5. Par la suite, son expression sera exclusivement non-corticale (**Figure 16**, *Simeone et al., 1993, Frantz et al., 1994*).

La zone d'expression d'*Otx2* inclut, à partir de E8-E8,5, celle d'un des ses paralogues chez les Vertébrés, le gène *Otx1*. Ce dernier partage approximativement la frontière postérieure d'*Otx2* à la frontière mésencéphale-métencéphale, même si son expression y est très faible, notamment au niveau médian (**Figure 16**, *Simeone et al., 1992*). Leurs patrons d'expression divergeront ensuite, et *Otx1* restera exprimé dans le télencéphale antérieur. L'étude de modèles hypomorphes pour *Otx2*, souvent combinés à d'autres mutations, ciblant notamment le gène *Otx1*, a permis de dégager les rôles qu'il joue à cette période du développement ; comme son patron d'expression le suggère, il est alors particulièrement important à la spécification et à la régionalisation des parties les plus antérieures du SNC. Les fonctions d'*Otx2* ne s'arrêtent donc pas au maintien de l'identité et à la régionalisation du neurectoderme antérieur.

### I.2.2.1 Mise en place du prosencéphale



**Figure 16 : Expression des gènes de la famille *Otx* pendant la régionalisation du SNC**

Hybridations *in situ* pour *Otx2* (*en haut*) et *Otx1* (*en bas*) à E9,5, E10,5 et E12,5. Le gène *Otx2* est exprimé dans l'intégralité du neurectoderme antérieur à partir du mésencéphale à E9,5. A E10,5 son expression s'atténue dans le télencéphale, et est absent du télencéphale antérieur. Il est absent du futur cortex à E12,5, et fortement exprimé dans le mésencéphale, les plexus choroïdes (flèche évidée) et la neurohypophyse (flèche pleine). *Otx1* a un patron d'expression complémentaire, encore fortement exprimé dans le télencéphale antérieur et beaucoup plus faiblement au niveau du mésencéphale. D'après Simeone *et al.*, 1993, Ang *et al.*, 1994, Fossat *et al.*, 2006.

#### I.2.2.1.1. Spécification du prosencéphale

La régionalisation précoce du neurectoderme antérieur donne une première information de position aux cellules. La réponse différentielle de ces cellules à des signaux inducteurs en provenance de plusieurs centres de signalisation aboutit à la spécification et à la mise en place de régions cérébrales différentes. Le prosencéphale, par exemple, est spécifié par les messages instructeurs de la ride neurale antérieure (**anterior neural ridge**,



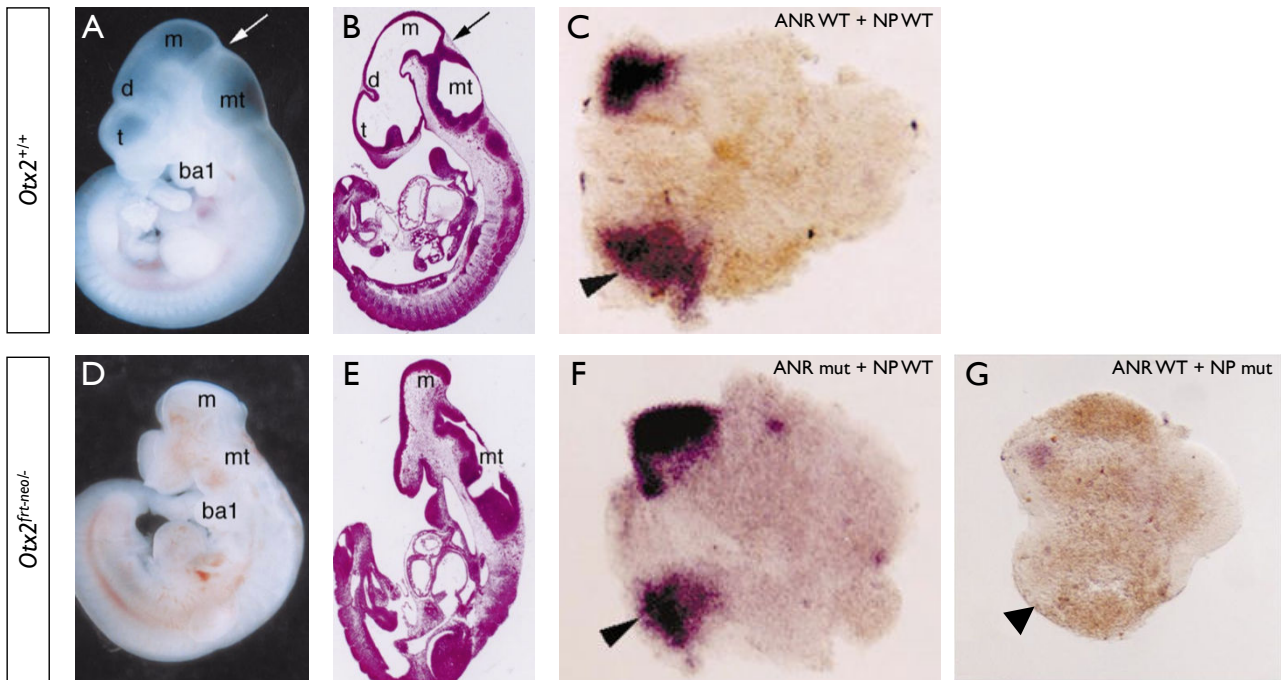
ANR). L'implication d'*Otx2* dans cette spécification a pu être mise en évidence grâce à l'obtention d'une lignée de souris extrêmement hypomorphe pour *Otx2* (Tian et al., 2002).

Dans ces souris *Otx2<sup>frt-neo/-</sup>*, seul un allèle d'*Otx2*, hypomorphe qui plus est, est exprimé ; les embryons passent alors la gastrulation sans problème, mais présentent des phénotypes drastiques d'exencéphalie/anencéphalie à E18,5 (**Figure 17A,D**). Une analyse à un temps de développement plus précoce a permis de révéler que les embryons ne développaient ni télencéphale, ni diencéphale (**Figure 17B,E**). Seul un pseudo-mésencéphale était présent, qui présentait par ailleurs un profil moléculaire typique du mésencéphale antérieur. Les structures issues du prosencéphale sont donc absentes, du fait d'une absence de spécification de ce dernier. L'étude moléculaire du neurectoderme antérieur des souris hypomorphes révèle en effet que les marqueurs typiques du prosencéphale tels que *BF-1*, *Six3*, ou *Emx2* sont tous absents à E9,5. Certains d'entre eux, comme *Six3*, sont induits avec la spécification du neurectoderme antérieur dans une zone beaucoup plus réduite que dans des animaux sauvages, et finissent par disparaître ; d'autres, comme *BF-1*, ne sont tout simplement jamais présents au sein du neurectoderme. L'absence de ces marqueurs serait due à une incapacité du neurectoderme à répondre au signal Fgf8 envoyé par l'ANR : la plaque neurale mutante est incapable d'induire l'expression des gènes caractéristiques du mésencéphale, même en présence d'une ANR sauvage ou de billes Fgf8, alors que l'ANR mutante peut induire sans aucun problème une plaque neurale sauvage (**Figure 17C,F,G**, Tian et al., 2002).

*Otx2* fournirait donc la compétence nécessaire au prosencéphale pour répondre aux signaux en provenance de l'ANR, et permettrait ainsi sa spécification.

#### 1.2.2.1.2. Régionalisation du prosencéphale

Le prosencéphale, une fois mis en place, se régionalise en télencéphale et diencéphale. Cette étape, une fois de plus, requiert la participation du gène *Otx2*, en coopération avec d'autres facteurs de transcription, ce que des modèles d'hypomorphisme ont permis de montrer. Des modèles murins simultanément mutants pour *Emx2* et hétérozygotes pour *Otx2* (*Emx2<sup>-/-</sup>;Otx2<sup>+/-</sup>*), notamment, présentent un télencéphale réduit en taille, notamment au niveau des hémisphères. Leur diencéphale est également en grande partie absent : il manque à ces souris les préthalamus et thalamus, l'archipallium



### Figure 17 : Fonction d'*Otx2* dans la spécification du prosencéphale

Comparaison du développement du prosencéphale entre des souris *Otx2*<sup>+/+</sup> (A-C) ou *Otx2*<sup>frt-neo/-</sup> (D-G).

(A,D) comparaison morphologique d'embryons à E10,5. Chez l'embryon mutant (D), toutes les structures antérieures au mésencéphale, normalement présentes dans un embryon sauvage (A), sont absentes (anencéphalie). Le métencéphale et le premier arc branchial semblent normaux.

(B,E) Coupes sagittales représentatives des embryons (A,D) ; toutes les structures antérieures au métencéphale ne se développent effectivement pas. Le métencéphale, supposé intact, présente en fait des anomalies morphologiques chez le mutant (E).

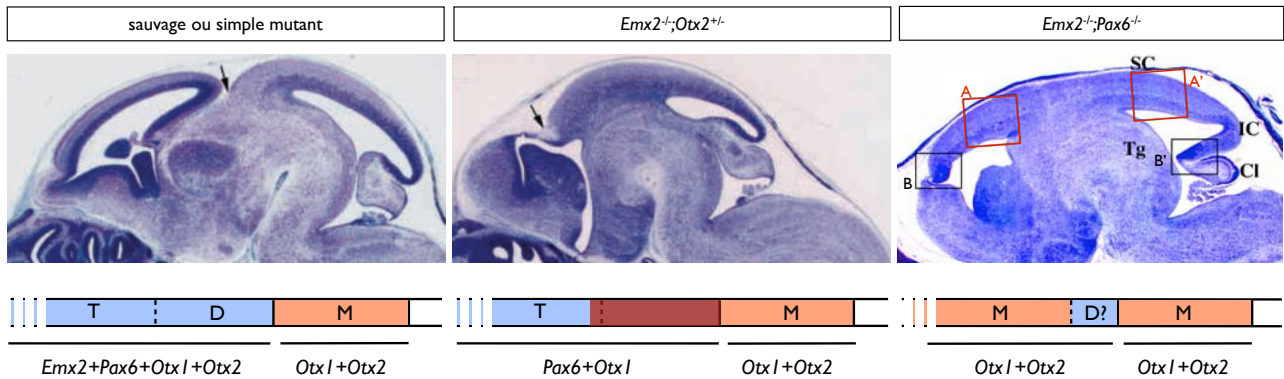
(C,F,G) Cultures d'explants combinant une ANR sauvage et une plaque neurale sauvage (C), une ANR hypomorphe pour *Otx2* avec une plaque neurale sauvage (F), et une ANR sauvage avec une plaque neurale hypomorphe (G). L'ANR est mise en contact avec la plaque neurale au niveau de la pointe de flèche, et son activité inductrice est révélée par l'expression de *BF-1* (observée par hybridation *in situ*). L'activité *BF-1* non fléchée en (C) et (F) est le résultat du développement normal de la plaque neurale. L'ANR mutante conserve ses propriétés d'induction (F, à comparer à C) mais la plaque neurale mutante est incapable de répondre aux signaux d'une ANR sauvage (G).

t : télencéphale, d : diencephale, m : mésencéphale, mt : métencéphale, ba1 : premier arc branchial.

D'après Tian et al., 2002.

et le prétectum antérieur. En accord avec la disparition de ces territoires, l'expression de *Pax6*, caractéristique du diencephale, n'est jamais retrouvée dans les mutants. Les plexus choroïdes ne se développent pas non plus (Figure 18, Suda et al., 2001). Le même phénotype est observé chez des souris *Emx2*<sup>-/-</sup>;*Otx1*<sup>-/-</sup>, alors qu'il n'est jamais retrouvé chez les simples mutants *Emx2*<sup>-/-</sup>, *Otx2*<sup>+/+</sup>, ou *Otx1*<sup>-/-</sup> (Figure 18, Kimura et al., 2005, Suda et al., 2001). La perturbation de la régionalisation prosencéphalique est attribuée dans ces mutants à l'antériorisation de l'expression de marqueurs et acteurs du métencéphale antérieur, comme *Pax2*, *Gbx2* et *Fgf8*.

Des souris mutantes *Otx1*<sup>-/-</sup>;*Otx2*<sup>+/+</sup> ou *Otx1*<sup>+/+</sup>;*Otx2*<sup>+/+</sup>, selon les souches, peuvent également présenter des défauts du mésencéphale antérieur touchant jusqu'au



**Figure 18 : Fonction d' *Otx2* dans la régionalisation du prosencéphale**

Comparaison du développement du prosencéphale entre des souris sauvages (ou mutantes pour un seul des trois gènes *Emx2*, *Otx1* et *Otx2*), doubles mutantes *Emx2*<sup>-/-</sup>;*Otx2*<sup>+/-</sup>, ou *Emx2*<sup>-/-</sup>;*Pax6*<sup>-/-</sup>. Une coupe sagittale représentative est présentée pour chaque génotype après coloration au violet de crésyl, accompagnée d'une structure schématique du cerveau de l'animal.

Le diencephale est absent des animaux *Emx2*<sup>-/-</sup>;*Otx2*<sup>+/-</sup>, ce qui aboutit à une antériorisation de la commissure postérieure (indiquée par une flèche) ; la structure comprise entre le mésencéphale et le métencéphale ne présente pas de marqueurs permettant son identification de façon certaine.

Chez les animaux *Emx2*<sup>-/-</sup>;*Pax6*<sup>-/-</sup>, le télencéphale est remplacé par une structure de type tectale/mésencéphalique (comme le montrent les similitudes histologiques entre A et A' d'une part, et B et B' d'autre part). La structure séparant les deux tecta n'exprime pas tous les marqueurs caractéristiques du diencephale.

*Cl* : cervelet, *D* : diencephale, *IC* : colliculus inférieur, *M* : mésencéphale, *SC* : colliculus supérieur, *T* : télencéphale, *Tg* : tegmentum.

D'après Suda et al., 2001, Kimura et al., 2005

diencephale (Suda et al., 1996, 1997, Acampora et al., 1997). Ces anomalies sont cependant considérées comme une conséquence de la mauvaise spécification du mésencéphale et du métencéphale chez ces animaux. Leur phénotype sera donc étudié dans la partie II de cette introduction ; elle reviendra également à cette occasion sur l'explication du phénotype *Emx2*<sup>-/-</sup>;*Otx2*<sup>+/-</sup> proposée plus haut pour tenter de l'intégrer à la conception actuelle de la formation du mésencéphale. Quoi qu'il en soit, les gènes *Otx1*, *Otx2* et *Emx2* semblent coopérer dans la régionalisation du prosencéphale, notamment dans la spécification du diencephale.

Enfin, des souris mutantes *Emx2*<sup>-/-</sup>;*Pax6*<sup>-/-</sup> présentent elles aussi des malformations du télencéphale dorsal : ce dernier se transforme, histologiquement comme moléculairement, en tectum, c'est-à-dire en mésencéphale. Les préthalamus et thalamus sont également absents de ces doubles mutants (Figure 18, Kimura et al., 2005). *Pax6* vient donc s'ajouter à la liste des gènes qui permettent la régionalisation du prosencéphale. Il semble ainsi que *Emx2*, *Pax6*, *Otx2* et *Otx1*, par leur action combinée, permettent la mise en place du télencéphale et diencephale.

De manière intéressante, on peut d'ores et déjà remarquer que les zones d'expression des quatre gènes précédemment mentionnés ne sont qu'en partie superposées. En particulier, *Otx1* et *Otx2* sont seuls exprimés dans le mésencéphale. Or, en l'absence de *Emx2* et *Pax6*, la zone normale de coexpression des 4 gènes (qui comprend une partie du diencephale et du télencéphale antérieur), n'exprimant alors plus qu'*Otx1* et *Otx2*, se transforme en mésencéphale. Il serait alors possible de supposer que la combinaison d'*Otx2* et *Otx1* seuls permet la spécification en mésencéphale, et que l'ajout d'*Emx2* et *Pax6* permet la spécification en diencephale/télencéphale.

### I.2.2.2 Mise en place du mésencéphale

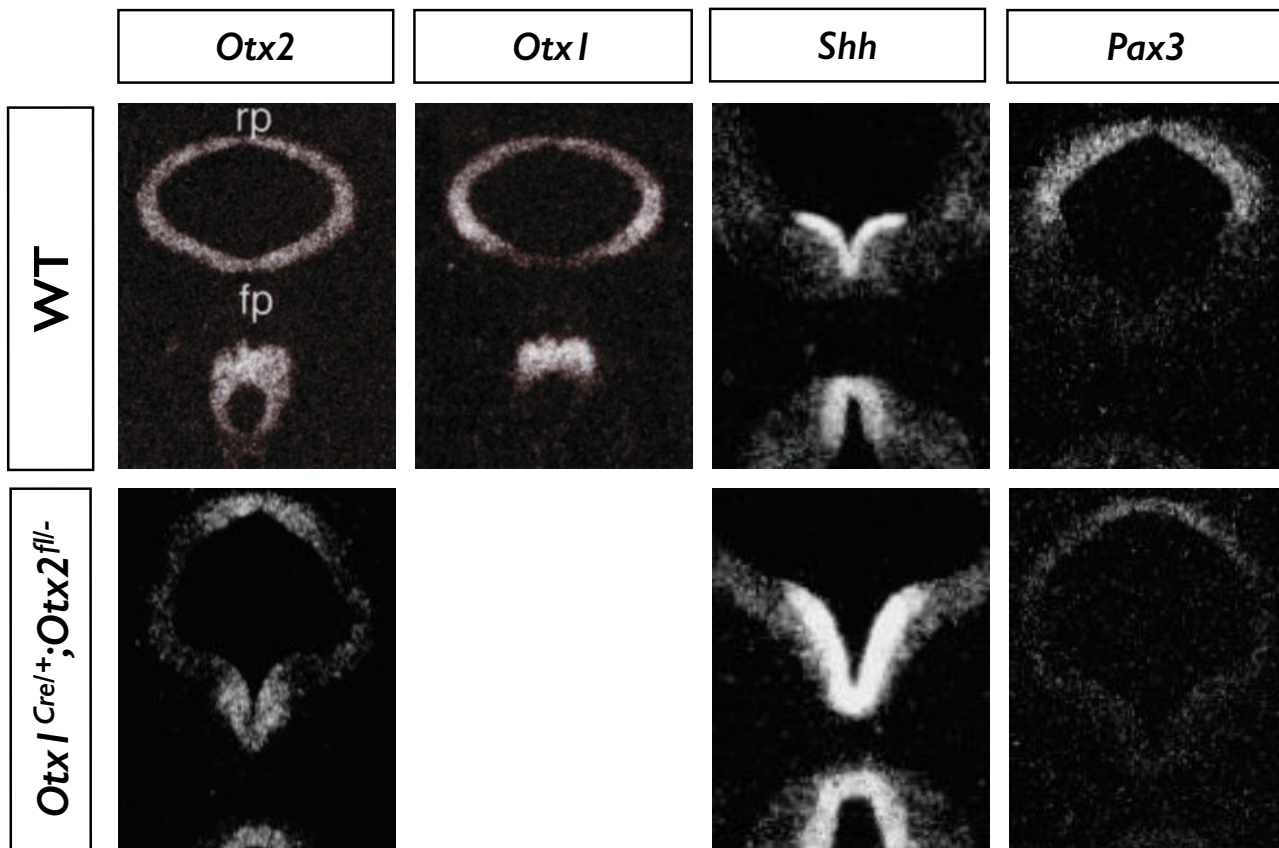
#### I.2.2.2.1. Spécification du mésencéphale

Le gène *Otx2*, probablement en combinaison avec *Otx1*, est un acteur majeur de la spécification du mésencéphale le long de l'axe antéro-postérieur, en jouant un rôle essentiel dans la mise en place du centre organisateur local, l'organiseur isthmique. La fonction d'*Otx2*, ainsi que le fonctionnement exact de l'IsO, seront abordés dans la partie II de cette introduction.

#### I.2.2.2.2. Polarité dorso-ventrale

Au cours du développement du tube neural, une information positionnelle dorso-ventrale est fournie aux cellules par des signalisations asymétriques originaires de la plaque du toit (comme les signaux BMP) ou de la partie ventrale du tube (Shh). Le positionnement correct des zones d'émission et de transduction des signaux en provenance des deux extrémités du tube est essentiel à l'établissement d'une polarité dorso-ventrale normale. L'expression d'*Otx2* est uniforme le long de l'axe dorso-ventral dans l'intégralité du mésencéphale, au contraire d'*Otx1*, dont l'expression remonte vers la plaque du toit à partir du mésencéphale latéral (**Figure 19**, *Puelles et al., 2003*). Il semble toutefois participer à la mise en place correcte des signaux de polarité dorso-ventrale du mésencéphale. Une inactivation précoce (à E9,5) d'*Otx2* dans tout le mésencéphale, ou

même uniquement dans sa partie dorsale, aboutit en effet à une extension dorsale de la signalisation Shh originaire du plancher neural (*Puelles et al., 2003, Puelles et al., 2004*) : les patrons d'expression du facteur sécrété *Shh*, de son récepteur *Patched* et des gènes de transduction *Gli* sont tous étendus en direction de la plaque du toit (**Figure 19**). La régionalisation dorso-ventrale du tube neural est par conséquent affectée, comme le montre par exemple le patron d'expression perturbé du marqueur dorsal *Pax3* (**Figure 19**). Les auteurs des études ayant mis en évidence cette influence d'*Otx2* sur la signalisation Shh suggèrent qu'il agirait de concert avec son orthologue *Otx1* pour réprimer *Foxa2*, un activateur bien connu du gène *Shh*, au pôle ventral du mésencéphale. Effectivement, *Foxa2* est lui aussi dorsalisé chez les animaux KO pour *Otx2* (*Puelles et al., 2003*).



**Figure 19 : Fonction d'*Otx2* dans le développement du crâne**

Hybridations *in situ* des gènes *Otx2*, *Otx1*, *Shh*, *Pax3* dans des embryons sauvages (*ligne du haut*) ou KO pour *Otx2* à partir de E8,5/E9,5 (*ligne du bas*). Dans un embryon sauvage, *Otx2* est exprimé de façon uniforme le long du tube neural, à la différence d'*Otx1* dont l'expression n'est pas présente au pôle ventral. Une inactivation d'*Otx2* induite par une activité Cre sous le contrôle du promoteur *Otx1* mène à l'inactivation d'*Otx2* dans l'intégralité du tube mis à part ses extrémités dorsales et ventrales (*Otx2*, en bas). En conséquence, la signalisation *Shh* s'intensifie et s'étend dorsalement, et les marqueurs dorsaux comme *Pax3* voient leur domaine d'expression restreint. *fp* : floor plate, *rp* : plaque du toit (roof plate)

D'après *Puelles et al., 2003*.

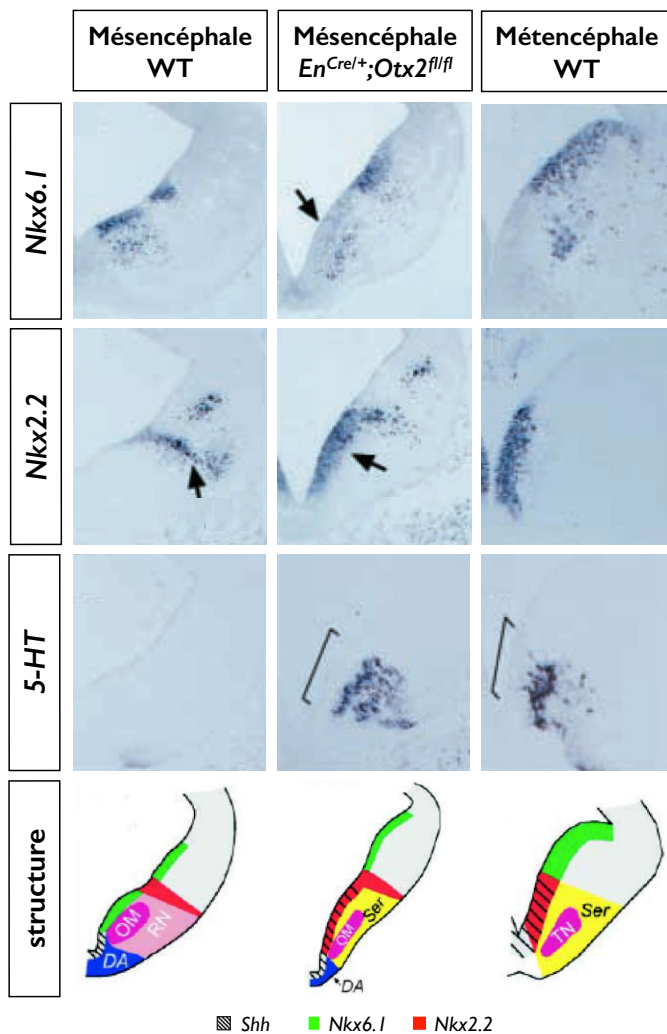
L'homéogène *Otx2* assurerait donc l'établissement correct de la polarité dorso-ventrale du mésencéphale en restreignant la signalisation Shh à l'extrémité ventrale du tube neural. Il assurerait cette fonction par une interaction physique de sa protéine avec le corépresseur GRG4, exprimé dans le mésencéphale dorsal (*Puelles et al., 2004*).

#### I.2.2.2.3. Mise en place des différents territoires

neuronaux

La mise en place des territoires neuronaux du tube neural résulte de l'interaction entre les voies de signalisation, notamment la voie Shh, et l'action de différents facteurs de transcription, dont les facteurs *Nkx*, exprimés dans des zones restreintes de l'axe dorso-ventral. Le gène *Nkx2.2*, par exemple, est exprimé à la frontière alaire/basale du tube neural, tandis que le gène *Nkx6.1* comprend deux zones d'expression, une de chaque côté de cette frontière (**Figure 20**). A cette période plus tardive du développement du tube neural, l'homéogène *Otx2* semble assurer le déroulement normal de l'établissement des territoires neuronaux du mésencéphale en réprimant, ventralement comme dorsalement, une identité métencéphalique.

Dans les KO précoces d'*Otx2* précédemment mentionnés (I.2.2.2.2.), la perturbation de la polarité dorso-ventrale entraîne la disparition du noyau rouge, groupe de neurones caractérisés par l'expression des gènes *Nkx6.1* et *Pou4f1* (*Puelles et al., 2003, Puelles et al., 2004*). Une étude plus approfondie des patrons d'expression des différents gènes *Nkx* régionalisant le tube neural a permis de révéler une expansion ventrale du gène *Nkx2.2* dans la région basale du tube, et une disparition de la zone ventrale de *Nkx6.1* (*Puelles et al., 2004, Figure 20*). De manière intéressante, ces deux anomalies sont attribuables au moins en partie à l'action spécifique d'*Otx2*, et non simplement à la modification de la signalisation *Shh* que son inactivation entraîne. En effet, la comparaison des KO précoces *En1<sup>Cre/+</sup>;Otx2<sup>fl/fl</sup>*, dans lequel *Otx2* disparaît totalement du mésencéphale à E9,5, avec les KO *Otx1<sup>Cre/+</sup>;Otx2<sup>fl/-</sup>*, où *Otx2* reste exprimé dans la région basale du tube, révèle que l'expansion du gène *Nkx2.2* n'a lieu que dans le premier cas, bien que la signalisation Shh soit également perturbée dans les deux KO. *Otx2* serait donc nécessaire de façon cellule-autonome à sa répression. Si la comparaison des KO précoces ne mène pas au même type de conclusion pour *Nkx6.1*, *Otx2* est tout de



**Figure 20 : *Otx2* protège le mésencéphale ventral d'une identité métencéphalique**

Hybridations *in situ* des gènes (*par ligne*) *Nkx6.1*, *Nkx2.2*, 5-HT (marqueur des neurones sérotoninergiques), et organisation schématique du tube neural au niveau d'un mésencéphale sauvage (*colonne de gauche*), d'un mésencéphale *EnCre/+;Otx2<sup>fl/fl</sup>* KO pour *Otx2* à partir de E9,5 (*colonne du milieu*), et d'un métencéphale sauvage (*colonne de droite*). L'expression la plus ventrale de *Nkx6.1* disparaît du mésencéphale KO (flèche), et l'expression de *Nkx2.2*, normalement restreinte au niveau de la frontière alaire/basale, s'étend ventralement (flèches). En conséquence, un territoire de neurones à sérotonine apparaît dans les mésencéphales KO. L'organisation schématique du mésencéphale KO s'apparente donc plus à celle d'un métencéphale sauvage. DA : neurones dopaminergiques, OM : noyau oculomoteur, RN : noyau rouge, Ser : neurone sérotoninergiques, TN : noyau trochléaire.

D'après *Puelles et al., 2004, Vernay et al., 2005*.

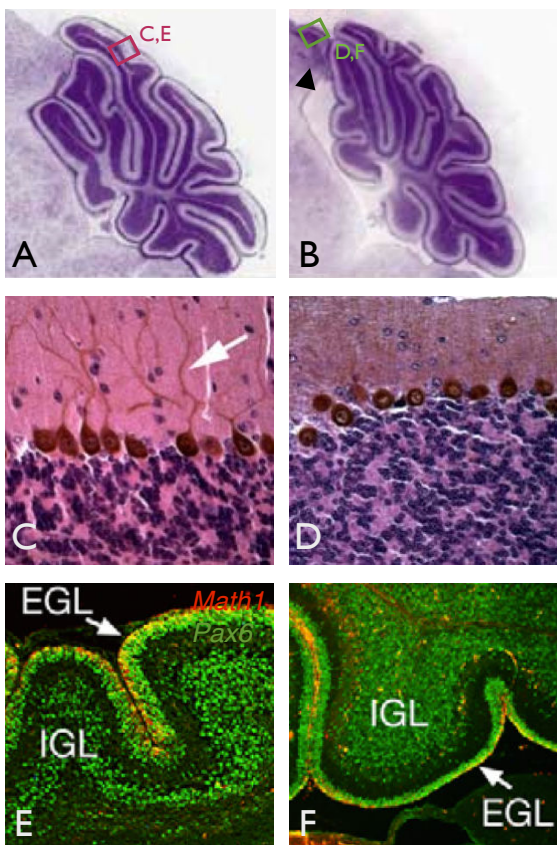
même capable d'induire ce gène de façon ectopique dans le métencéphale (*Prakash et al., 2009*) ; il pourrait donc réguler ce gène conjointement avec *Shh*. Plus notable encore, un KO plus tardif d'*Otx2* dans le mésencéphale (à E10,5, *Vernay et al. 2005*) n'affecte pas la signalisation *Shh* ; l'expansion ventrale de *Nkx2.2* y est pourtant constatée (*Vernay et al., 2005*). Ce faisceau d'observations permet de conclure qu'*Otx2* est responsable de la mise en place correcte du code *Nkx* dans le mésencéphale ventral.

La perturbation de ce code dans les mutants *Otx2* a des conséquences sur l'identité des neurones qui s'y mettent en place. La disparition déjà mentionnée des neurones du noyau rouge s'accompagne de l'apparition d'une population de neurones sérotoninergiques issues du territoire positif pour *Nkx2.2* (**Figure 20**, *Puelles et al., 2004, Vernay et al., 2005*). Le territoire tout à fait ventral du tube, à l'origine de neurones dopaminergiques, est également extrêmement réduit chez les mutants (*Puelles et al., 2004, Vernay et al., 2005, Omodei et al., 2008*) ; l'effet spécifique d'*Otx2* sur ces neurones sera abordé dans la partie suivante.

De fait, le code *Nkx* ainsi que la répartition des différents territoires neuronaux des mutants *Otx2* présentent d'énormes similitudes avec la structure d'un métencéphale normal (**Figure 20**, *Puelles et al., 2004, Vernay et al., 2005*). Le rôle d'*Otx2* dans le

mésencéphale ventral serait donc de réprimer la mise en place du programme développemental métencéphalique au profit d'un programme mésencéphalique.

Le même mécanisme se retrouve dorsalement : après avoir assuré la spécification du mésencéphale (cf. partie II), *Otx2* assure la mise en place des territoires neuronaux du mésencéphale dorsal, en réprimant notamment un devenir métencéphalique. Des KO *Otx2* ont été conçus de telle sorte que l'inactivation de l'homéogène ait lieu soit trop tard pour affecter son rôle dans la spécification du mésencéphale (E10,5, Vernay et al., 2005, ou E12,5, Fossat et al., 2006), soit dans une zone excluant la limite mésencéphale/métencéphale, lui permettant ainsi d'y effectuer son rôle (Di Giovannantonio et al., 2013). Dans chacun de ces modèles, une structure de type cérébelleuse, tant histologiquement que moléculairement, émerge depuis un territoire du mésencéphale dorsal (Figure 21, Vernay et al., 2005, Fossat et al., 2006, Di Giovannantonio et al., 2013). Les trois couches du cervelet y sont effectivement présentes à l'âge adulte (Vernay et al., 2005), et les marqueurs caractéristiques du développement du cervelet *Math1* et *Pax6* y sont exprimés (Figure 21, Vernay et al., 2005, Di Giovannantonio et al., 2013). Des études de lignage cellulaire ont permis de confirmer que cette structure ectopique émergeait chez les mutants d'un territoire cellulaire normalement *Otx2*<sup>+</sup>/*Pax7*<sup>+</sup>/*Zic1*<sup>+</sup>, destiné à produire des neurones exprimant *Pou4f1* (Di Giovannantonio et al., 2013). Le territoire voisin cellulaire



**Figure 21 : *Otx2* protège le mésencéphale dorsal d'une identité métencéphalique**

(A,B) Colorations Nissl de cervelets à P30 ; (A) animal sauvage, (B) animal KO pour *Otx2* à partir de E12,5. Une portion de mésencéphale dorsal est transformée en structure cérébelleuse (indiquée par la pointe de flèche). Des cadres indiquent les zones dont les photos (C,E) ou (D,F) sont représentatives.

(C,D) Colorations éosine-hématoxyline d'un cervelet sauvage à P30 (C) ou de la structure cérébelleuse mésencéphalique d'un mutant *Otx2* à P30 (D). Les deux tissus ont des histologies extrêmement semblables, seule la projection des dendrites des cellules de Purkinje est spécifique au cervelet normal (flèche blanche).

(E,F) Immunomarquages dirigés contre *Math1* et *Pax6* à P7 sur (A) un cervelet sauvage ou (B) la structure cérébelleuse mésencéphalique d'un mutant *Otx2*. Au cours du développement, les deux structures partagent également le même code moléculaire.

EGL : couche granulaire externe (external granule layer), IGL : couche granulaire interne (internal granule layer). D'après Vernay et al., 2005, Fossat et al., 2006, Di Giovannantonio et al., 2013.



voisin, s'il ne se transforme pas en cervelet, est également affecté chez des mutants *Otx2*, où la population de neurones GABAergiques qu'il engendre est réduite (Di Giovannantonio et al., 2013)

*Otx2* réprimerait donc la mise en place d'un développement de type métencéphalique dans le mésencéphale dorsal aussi bien que ventral. Des expériences ont permis de prouver qu'il interagissait avec le co-répresseur *Grg4/Tle4* ; cette interaction lui permettrait de réprimer les inducteurs du programme développemental métencéphalique au niveau de la frontière mésencéphale-métencéphale (Heimburger et al., 2007, Puellas et al., 2003, 2004). Il activerait par la suite le programme mésencéphalique en interagissant avec *Meis2* ; une coexpression d'*Otx2* et de *Meis2* est effectivement suffisante pour installer un tectum mésencéphalique chez le poulet (Agoston et al., 2009).

#### I.2.2.2.4 Neurogénèse et différenciation des neurones

dopaminergiques

*Otx2* semble enfin particulièrement impliqué dans la prolifération, la neurogénèse et la différenciation des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale. Dans les mutants *Otx2 En1<sup>Cre/+</sup> ; Otx2<sup>fl/fl</sup>*, l'expansion ventrale du territoire *Nkx2.2*, aboutissant à la mise en place d'un large territoire neuronal sérotoninergique, s'accompagne d'une forte réduction de la taille du territoire le plus ventral dont émergent des neurones dopaminergiques (Puellas et al., 2004, Vernay et al., 2005, Omodei et al., 2008). Cette réduction n'est cependant pas attribuable à l'expansion du domaine *Nkx2.2*, qui provoquerait un changement d'identité des futurs neurones dopaminergiques, car on la retrouve également dans les mutants *En1<sup>Cre/+</sup> ; Otx2<sup>fl/fl</sup> ; Nkx2.2<sup>-/-</sup>* (Vernay et al., 2005). *Otx2* jouerait donc un rôle spécifique dans la mise en place des neurones dopaminergiques.

Des études plus avancées ont pu prouver que la prolifération des progéniteurs dopaminergiques, ainsi que leur taux de sortie du cycle cellulaire, étaient proportionnels à la dose d'*Otx2* (Vernay et al., 2005, Puellas et al., 2004, Omodei et al., 2008). Des souris mutantes avaient un domaine dopaminergique réduit dont les progéniteurs se multipliaient peu et sortaient très rapidement du cycle cellulaire, tandis que des souris surexprimant

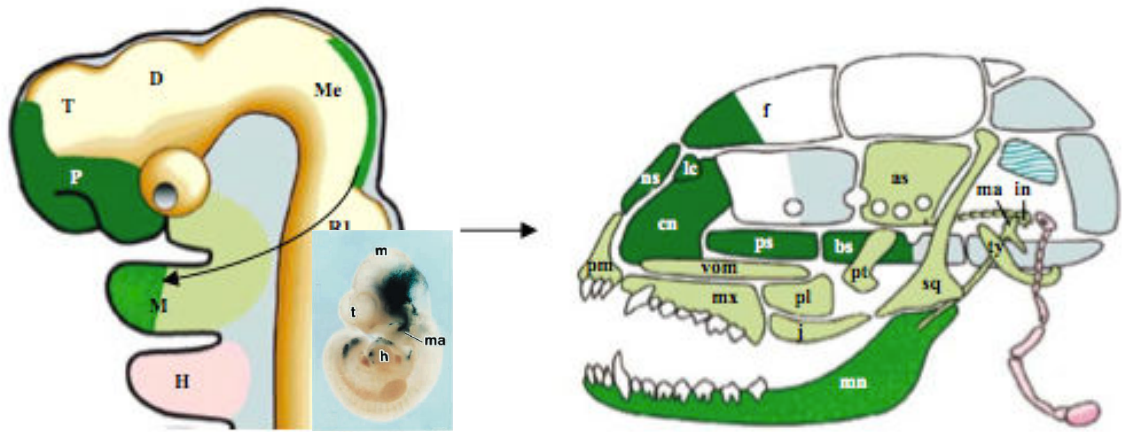
*Otx2* présentait un territoire dopaminergique agrandi avec une prolifération des progéniteurs augmentée (*Omodei et al., 2008*). La neurogénèse des progéniteurs à leur sortie du cycle est également affectée : la totalité des gènes marquant la progression des neurones le long de la voie de différenciation dopaminergique est négativement affectée par l'inactivation d'*Otx2*, alors qu'on les retrouve surexprimés dans des souris surexprimant l'homéogène (*Omodei et al., 2008*). Chez les mutants *Otx2*, les progéniteurs dopaminergiques sortant rapidement du cycle ne peuvent donc pas enclencher leur neurogénèse, et demeurent dans un état intermédiaire. Ainsi, *Otx2* assure la prolifération et la différenciation en neurones dopaminergiques des progéniteurs ventraux du mésencéphale. Certaines cibles canoniques de la voie Wnt étant réprimées au niveau de ces progéniteurs dans les mutants pour *Otx2*, il a été suggéré qu'*Otx2* pourrait moduler l'expression de *Wnt1* au niveau du plancher neural dans le cadre de sa fonction.

Au-delà de son rôle dans leur différenciation, *Otx2* semble qui plus est contrôler l'identité des neurones dopaminergiques. Plusieurs sous-types de neurones dopaminergiques existent dans le mésencéphale, différant l'un de l'autre par la combinatoire de gènes qu'ils expriment et par leurs caractéristiques fonctionnelles (*Chung et al., 2005*). Des expériences semi-quantitatives sur des souris exprimant un plus ou moins grand nombre d'allèles *Otx2* au niveau des neurones dopaminergiques (de 2 à 6) ont permis de découvrir que l'adoption par les neurones d'une identité *Girk2<sup>+</sup>* était réprimée de façon proportionnelle par *Otx2* (*Di Salvio et al., 2010*). Cet homéogène contrôle donc la distribution des neurones dopaminergiques selon leurs différents sous-types.

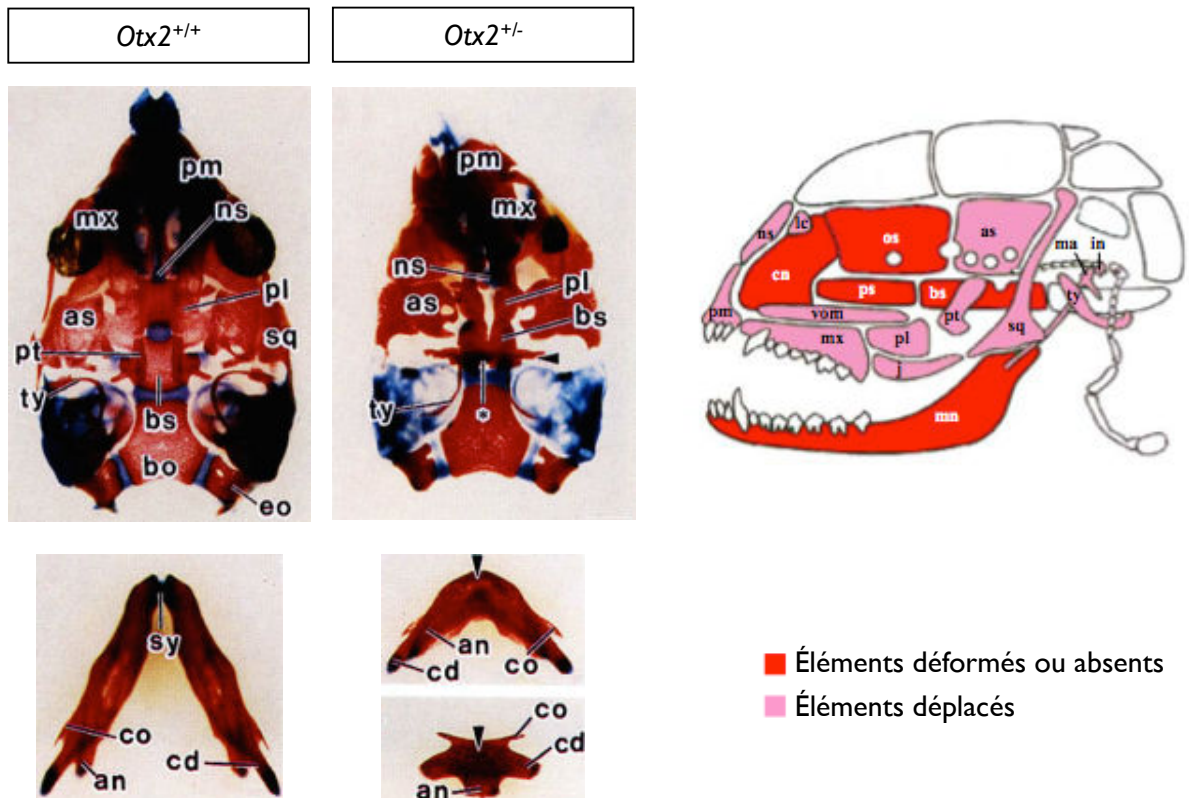
### 1.2.3. Développement crânio-facial

Chez les Vertébrés, le crâne (incluant la mâchoire) se développe principalement à partir de dérivés de cellules de la crête neurale positionnés dans le mésenchyme céphalique et dans les deux premiers arcs pharyngés (**Figure 22A**, *Kuratani et al. 1997*, *Knight et Schilling, 2006*), qui donneront chacun des os différents (**Figure 22A**). Le gène *Otx2* commence dès E8,25 à être exprimé dans le mésenchyme céphalique, et est facilement détecté à E9,5 dans ce dernier, au niveau du segment prémandibulaire, ainsi que dans le premier arc pharyngé, l'arc mandibulaire (**Figure 22A**, *Kimura et al., 1997*), qui servira comme son nom l'indique à former la mandibule.

A



B



**Figure 22 : Fonction d'*Otx2* dans le développement du crâne**

(A) Représentation schématique indiquant par un code couleur, la nature et la localisation des régions de l'embryon contribuant aux différents éléments du crâne de mammifère adulte. Le gène *Otx2* est actif dans la région frontonasale (le segment prémandibulaire) ainsi que dans le mésencéphale où sont produites les cellules des crêtes neurales qui remplissent l'arc mandibulaire (flèche). L'insert montre l'expression d'*Otx2* dans le mésenchyme céphalique au niveau du mésencéphale, ainsi que dans l'arc mandibulaire.

(B) Comparaison d'un crâne de souris sauvage et hétérozygote pour *Otx2* (à gauche, en haut). Un foramen est observable dans le basisphénoïde chez l'hétérozygote, la capsule nasale est tordue et le prémaxillaire à peine développé. Les mâchoires des hétérozygotes sont également atteintes (à gauche, en bas) : de taille parfois extrêmement réduite, elles ne présentent pas de symphyse. Un schéma (à droite) montre l'ensemble des os du crâne déformés/absents (en rouge) ou simplement déplacés (en rose) chez les hétérozygotes.

*an* : processus angulaire *as* : alisphénoïde, *bo* : basioccipital, *cd* : processus condyloïde, *co* : processus coronôïde, *eo* : exoccipital, *bs* : basisphénoïde, *cn* : capsule nasale, *D* : diencephale, *f* : frontal, *H* : arc hyoïde, *in* : incus, *j* : jugal, *lc* : lacrymal, *M* : arc mandibulaire, *ma* : malleus, *Me* : mésencéphale, *mn* : mandibulaire, *mx* : maxillaire, *ns* : nasal, *os* : orbitosphénoïde, *P* : segment prémandibulaire, *pl* : palatine, *pm* : prémaxillaire, *ps* : presphénoïde, *pt* : ptérygoïde, *R1* : rhombomère 1, *sq* : squamosal, *sy* : symphyse, *T* : télencéphale, *ty* : tympanique, *vom* : vomer. Insert : *h* : coeur (heart), *m* : mésencéphale, *ma* : arc mandibulaire, *t* : télencéphale.

Or, des mutants hétérozygotes pour *Otx2* dans un certain fonds génétique murin (C57BL/6 croisé avec CBA) présentent, en plus des autres problèmes discutés jusqu'ici, des anomalies de morphologie crânienne (*Matsuo 1995, Makiyama et al., 1997*). Un cinquième d'entre eux sont agnathes (21,5%, *Hide et al., 2002*), et un autre cinquième sont affectées par une micrognathie plus ou moins prononcée (**Figure 22B**, 19%, *Hide et al., 2002*). Le développement de la mandibule, issue du premier arc pharyngé (*Otx2*-positif), est donc perturbé chez les hétérozygotes, même s'il arrive à être normal chez 37% d'entre eux (*Hide et al., 2002*). D'autres os de la partie basale du crâne, issus eux de la zone prémandibulaire, sont également touchés chez les souris *Otx2*<sup>+/-</sup> : le basisphénoïde, par exemple, comporte souvent des foramens anormaux (*Matsuo et al., 1995, Makiyama et al., 1997*). Enfin, la capsule nasale peut également mal se développer, voire être complètement absente, dans les hétérozygotes (**Figure 22B**, *Matsuo et al., 1995*). Un déficit en protéines *Otx2* entraîne donc des anomalies morphologiques des parties du crâne issues des segments prémandibulaire et mandibulaire.

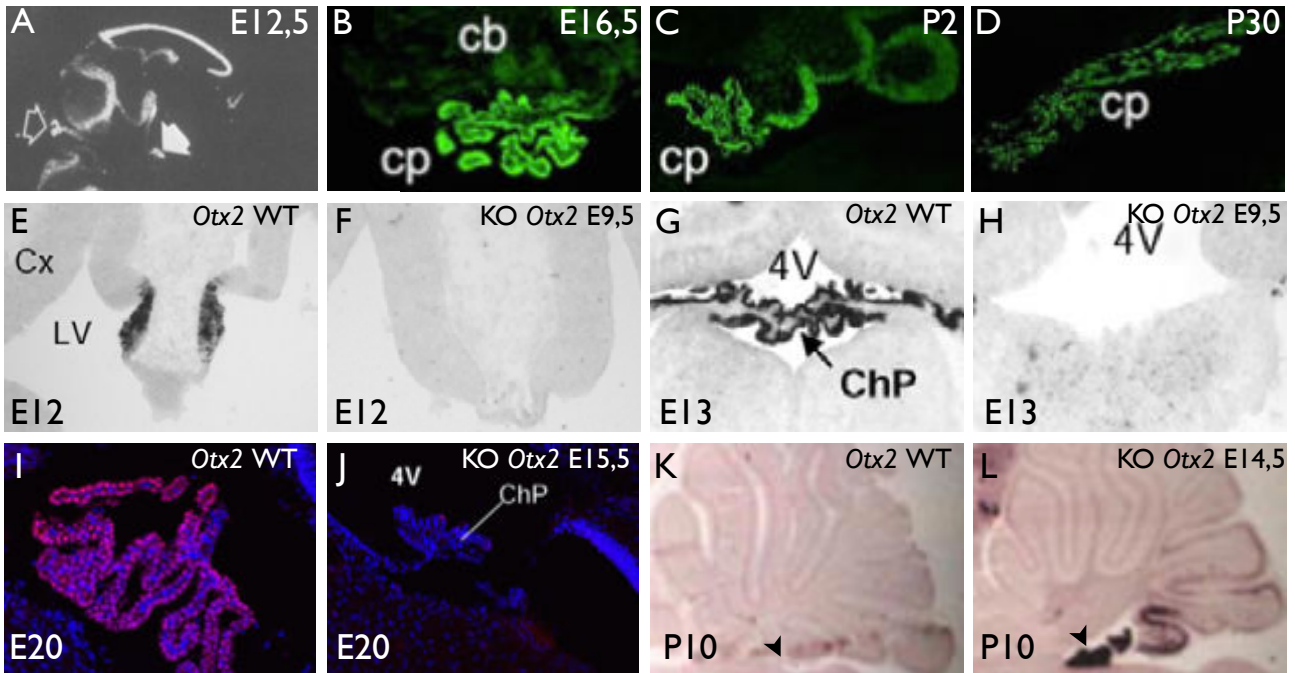
*Otx2* jouerait ainsi un rôle non négligeable dans le développement du crâne et de la mâchoire. L'analyse de mutants *Otx2*<sup>+/-</sup>;*Otx1*<sup>+/-</sup> et *Otx1*<sup>-/-</sup> révèle qu'il pourrait fonctionner en conjonction avec *Otx1* (*Suda et al., 1996*). Enfin, dans un étude de 2002, l'équipe de Shinichi Aizawa et Isao Matsuo a cherché à isoler par analyse QTL les fragments génomiques préférentiellement associés à un phénotype d'agnathie ou de micrognathie dans des souris *Otx2*<sup>+/-</sup>. Il s'avère qu'un de ces fragments porte la séquence codante du facteur de transcription *Alx4* ; ce dernier interagirait donc avec *Otx2* pour permettre son rôle dans le développement crânio-facial (*Hide et al., 2002*). Les auteurs de l'étude émettent l'hypothèse qu'*Alx4* pourrait se fixer sur l'enhancer d'*Otx2*, récemment isolé par la même équipe, qui assure l'expression de l'homéogène dans le mésenchyme céphalique. Toutefois, une interaction physique entre les produits des deux gènes n'est pas à écarter (*Hide et al., 2002*).

#### I.2.4. Développement et maintien des plexus choroïdes

Pendant le développement embryonnaire et jusqu'à l'âge adulte, la composition, et par extension le volume du fluide cérébrospinal (CSF, pour *cerebrospinal fluid*) sont contrôlés par les plexus choroïdes (*Dziegielewska et al., 2001, Johansson et al., 2013*). Le CSF assure d'une part, par sa forte concentration en protéine, une forte pression osmotique de l'environnement liquide du cerveau, et permet ainsi l'expansion latérale des ventricules au cours de la croissance du SNC (*Dziegielewska et al., 2001*). Il est d'autre part riche en molécules de signalisation, et des variations dans sa composition seraient donc capables de moduler certains processus cérébraux (*Dziegielewska et al., 2001, Johansson et al., 2013*). Dès lors, la régulation du CSF par les plexus choroïdes est un élément essentiel au bon déroulement du développement embryonnaire, et au bon fonctionnement du cerveau adulte. Il existe quatre plexus choroïdes dans le cerveau des Mammifères : trois d'entre eux sont situés au niveau du cortex cérébral (les deux plexus ventriculaires latéraux et le plexus du troisième ventricule), tandis que le quatrième se met en place de façon immédiatement postérieure au cervelet (le plexus du quatrième ventricule, *Dziegielewska et al., 2001, Johansson et al., 2013*).

Le gène *Otx2* est exprimé dans les plexus choroïdes dès leur mise en place, à E11. On le retrouve dès E9,5 dans les futures zones de développement des plexus, et son expression s'y maintient par la suite jusqu'à l'âge adulte (**Figure 16, Figure 23A-D**, *Boncinelli et al., 1993, Simeone et al., 1993, Fossat et al., 2006, Fossat et al., 2007*). La concentration de la protéine *Otx2* semble d'ailleurs particulièrement élevée dans ces structures (**Figure 23B-D**, *Fossat et al., 2007, Johansson et al., 2013*). L'importance de cette forte expression d'*Otx2* dans les plexus choroïdes a été suspectée dès 1995 : les mêmes souris *Otx2<sup>+/-</sup>* que celles mentionnées dans la sous-partie précédente présentaient en effet tous les signes d'une hydrocéphalie (*Makiyama et al., 1997*). Outre les symptômes extérieurs caractéristiques (tête en forme de dôme, faiblesse des membres, léthargie, émaciation), l'anatomie du SNC des souris était également perturbée. Les ventricules latéraux étaient dilatés, et le cervelet ballonné, signes d'une pression excessive du CSF. Bien que les plexus de ces souris ne présentaient pas d'anomalie morphologique, seulement une cytoarchitecture différente, les auteurs de l'étude attribuèrent l'hydrocéphalie spécifiquement à une dysfonction des plexus choroïdes due à l'hypomorphisme pour *Otx2* (*Makiyama et al., 1997*).

Une récente étude semble définitivement prouver l'importance d'*Otx2* dans la mise en place des plexus choroïdes. Cette étude utilise des modèles murins dans lesquels le gène *Otx2* est flanqué, sur ses deux allèles, de sites *lox* (*Otx2<sup>fl/fl</sup>*, *Johansson et al., 2013*),



### Figure 23 : Fonction d'*Otx2* dans le développement des plexus choroïdes

(A-D) Expression d'*Otx2* dans les plexus choroïdes au cours du développement. (A) Hybridation *in situ* du gène *Otx2* à E12,5, montrant déjà son expression dans les plexus choroïdes (flèche évidée). (B-D) Immunomarquage d'une protéine de fusion *Otx2::GFP* à E16,5 (B), P2 (C) et P30 (D) révélant que l'expression d'*Otx2* dans les plexus choroïdes persiste jusqu'à l'âge adulte. On peut remarquer que cette expression est particulièrement intense, au niveau ARN (A) comme protéique (C, comparer à l'expression dans le cervelet).

(E-H) Effet du KO d'*Otx2* à E9,5 sur le développement des plexus. Hybridations *in situ* pour le marqueur des plexus *Ttr* au niveau du ventricule latéral à E12 (E,F), ou du quatrième ventricule à E13 (G,H) chez des animaux sauvages (E,G) ou KO pour *Otx2* à partir de E9,5 (F,H). Les territoires présomptifs des plexus choroïdes ne se met jamais en place chez les mutants (F), et les plexus ne se développent pas (H).

(I-L) Controverse sur la nécessité d'*Otx2* dans le maintien des plexus choroïdes. (I,J) Immunomarquage dirigé contre *Otx2* à E20 du plexus du quatrième ventricule d'une souris sauvage (I) ou KO pour *Otx2* à partir de E15,5 (J). Le plexus est extrêmement atrophié dans les souris chez lesquelles la mutation d'*Otx2* a été induite (J). (K,L) Morphologie à P10 du cervelet et du plexus du quatrième ventricule chez une souris sauvage (K) ou KO pour *Otx2* à partir de E14,5 (L). Les plexus choroïdes, indiqués par une tête de flèche, sont présents et normaux dans les deux cas.

*cb* : cervelet (*cerebellum*), *cp/ChP* : plexus choroïde, *LV* : ventricule latéral, *4V* : quatrième ventricule.

D'après Simeone *et al.*, 1993, Fossat *et al.*, 2006, Johansson *et al.*, 2013.

et peut donc être excisé par l'action d'une recombinaison Cre. En utilisant plusieurs Cre, différant par leur zone d'expression ou leur caractère inducible, les auteurs peuvent ainsi créer des KO fonctionnels pour *Otx2* au niveau des plexus à divers moments du développement.

En cas d'inactivation du gène *Otx2* à E9,5, aucun des plexus choroïdes ne se développe dans les souris mutantes, et les zones putatives d'émergence de ces structures n'expriment pas le marqueur caractéristique *Ttr* (Figure 23E-H, Johansson *et al.*, 2013). On peut également y observer une augmentation de l'apoptose et une diminution de la prolifération. Plus frappant encore, une inactivation plus tardive d'*Otx2*, à E15,5, conduit à une atrophie spécifique du plexus choroïde métencéphalique (Figure 23I,J). *Otx2* serait

donc essentiel d'une part à la mise en place des plexus choroïdes en promouvant la survie et la prolifération de leurs cellules, et d'autre part au maintien spécifique de celui du quatrième ventricule. On peut toutefois ici remarquer l'incohérence apparente de ces résultats avec les observations tirées d'une étude plus ancienne (*Fossat et al., 2006*). En effet, l'induction d'un KO *Otx2* à E14,5 ou E16,5 dans cette étude ne mène pas à l'atrophie morphologique des plexus choroïdes, bien que leur identité moléculaire n'ait pas été avérée (**Figure 23K,L**).

Par ailleurs, l'inactivation d'*Otx2* dans les plexus entraîne une modification transitoire de la composition du CSF ; en particulier, un certain nombre de composants de la voie Wnt voient leur concentration augmenter. Cette modification a des conséquences à court terme sur le potentiel mitotique des cellules corticales, et à long terme sur la composition des différentes couches du cortex (*Johansson et al., 2013*). *Otx2*, via son expression dans les cellules des plexus choroïdes, pourrait donc avoir des effets à plus longue portée en influant directement sur la composition du CSF.

L'expression d'*Otx2* dans les plexus choroïdes n'est donc une fois de plus pas anodine, et confère à ce gène des effets locaux sur le développement des plexus et à plus longue portée sur le développement cortical. La sous-partie I.2.9. abordera un troisième rôle potentiel de l'expression choroïdale d'*Otx2* dans la plasticité du système visuel.

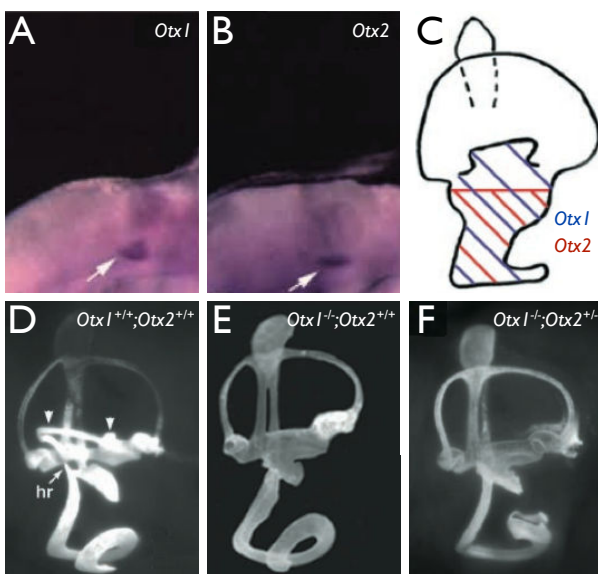
### I.2.5. Développement des organes sensoriels

La famille *Otx* semble fortement impliquée dans la mise en place des différents organes sensoriels. Le développement de ces organes est d'ailleurs le théâtre principal des interactions entre les différents membres de la famille. Il requiert en effet en général l'action simultanée et complémentaire de deux gènes *Otx*, dont *Otx2* à chaque fois, comme on le verra pour l'oreille interne (sous-partie I.2.5.1.) et la rétine (partie III).

### I.2.5.1. Oreille interne

L'oreille interne des Vertébrés se met en place à partir de la placode otique, située au niveau du métencéphale (Lin et al., 2005). L'expression de deux membres de la famille *Otx* peut être détectée dès E10,25 (voire E9,5) dans la future oreille interne (Simeone et al., 1993, Morsli et al., 1999). *Otx1* est tout d'abord exprimé dans la partie ventrolatérale de l'otocyste à E10,25 (**Figure 24A**) ; son expression se maintient dans cette zone au cours du développement, et on le retrouve par conséquent exprimé dans le canal latéral semicirculaire, dans l'ampoule, et dans toute la partie ventrale à partir de la moitié de l'utricule (Morsli et al., 1999). La zone d'expression d'*Otx2*, pour sa part, est à chaque étape incluse dans celle d'*Otx1* : il est restreint à la partie la plus latérale de l'otocyste à E10,25, et on le retrouve dans les parois latérales du saccule et de la cochlée à E13. Sa zone d'expression finale est de même incluse dans celle d'*Otx1* (**Figure 24A-C**).

Le gène *Otx1* semble de prime abord l'orthologue le plus important pour la mise en place de l'oreille interne : en effet, dans des mutants *Otx1*<sup>-/-</sup>, des anomalies morphologiques peuvent être détectées dans cette dernière (Acampora et al., 1996, Morsli et al., 1999). Le canal latéral semicirculaire et son ampoule sont absents, tout comme les conduits utriculosacculaires et cochléosacculaires ; le canal spiral de la cochlée est également mal défini (**Figure 24D-F**). Cependant, ces trois derniers phénotypes sont aggravés chez des mutants *Otx1*<sup>-/-</sup>;*Otx2*<sup>+/-</sup>, signe que le gène *Otx2* participe lui aussi à la morphologie correcte de l'oreille interne (**Figure 24D-F**, Morsli et al., 1999).



**Figure 24 : Fonction d'*Otx2* dans le développement de l'oreille interne**

(A-C) Expression des membres de la famille *Otx* dans l'oreille interne au cours du développement. (A,B) Hybridation *in situ* des gènes *Otx1* (A) et *Otx2* (B) à E10,5 ; (C) schéma des expressions des deux gènes à E12,5.

(D-F) Morphologie de l'oreille interne de souris sauvages (D), *Otx1*<sup>-/-</sup>, *Otx2*<sup>+/+</sup> (E) ou *Otx1*<sup>-/-</sup>;*Otx2*<sup>+/-</sup> (F). Les mutants *Otx1* ne développent pas le canal latéral semicirculaire (compris entre les têtes de flèches en D) et présentent des défauts de la cochlée (E). Ces défauts (notamment au niveau du canal spiral de la cochlée) sont aggravés chez les animaux *Otx1*<sup>-/-</sup>;*Otx2*<sup>+/-</sup> (F).

hr : crochet de la cochlée (hook region).

D'après Morsli et al., 1999, Cantos et al., 2000.



De plus, plusieurs études chez le poulet ont remarqué que les zones d'expression de *Pax2*, *Gbx2*, *Otx2* et *Fgf8* découpaient l'otocyste en territoires bien définis (*Hidalgo-Sanchez et al., 2000, Sanchez-Calderon et al., 2002, 2004*). Les auteurs ont alors suggéré que les patrons d'expression de ces gènes, ainsi que leurs interactions potentielles, assureraient la régionalisation de l'otocyste pour permettre la formation correcte des différentes parties de l'oreille interne. De fait, l'oreille interne de souris *Gbx2*<sup>-/-</sup> présente des défauts morphologiques plus ou moins prononcés, associés à une extension dorsomédiale du domaine d'expression d'*Otx2* ; les patrons d'expression des gènes énoncés plus haut semblent donc tout du moins corrélés à des modifications ultérieures de la morphologie de l'oreille interne (*Lin et al., 2005*). Ils pourraient en fait interagir selon un mécanisme analogue à celui ayant lieu à la frontière entre mésencéphale et métencéphale, qui sera étudié de façon plus approfondie dans la partie II.

De manière intéressante, l'oreille interne est incidemment un des rares exemples de spécificité fonctionnelle entre les différents membres de la famille *Otx*. La sous-partie I. 1.2.3.4. avait abordé l'équivalence fonctionnelle des différentes protéines *Otx* ; or cette dernière trouve sa limite au niveau de l'oreille interne. Des souris exprimant le gène *Otx2* humain [resp. *otd*] au niveau du locus *Otx1* (*Otx1*<sup>h*Otx2*/h*Otx2*</sup> [resp. *Otx1*<sup>*otd*/*otd*</sup>]) ne retrouvent jamais le canal latéral semicirculaire ni son ampoule ; des défauts de la cochlée et du saccule persistent également (*Morsli et al., 1999, Cantos et al., 2000*). Ainsi, *Otx1* est non seulement exprimé seul au niveau du canal latéral (*Morsli et al., 1999*), il semble également accomplir une fonction qui lui est absolument spécifique ; cette fonction serait apparue très tôt chez les gnathostomes (*Mazan et al., 2000*). La redondance potentielle des gènes de la famille *Otx* n'est donc pas absolue.

#### I.2.5.2. Oeil et système visuel

L'effet principal du gène *Otx2* sur les organes sensoriels s'observe au niveau du système visuel. En effet, il serait responsable, en coopération avec son orthologue *Crx*, du développement correct de l'oeil, et du maintien à l'âge adulte de la rétine. Cette fonction d'*Otx2* sera étudiée de façon plus approfondie dans la partie III de l'introduction.

### I.2.5.3. Glande pinéale

La glande pinéale ou épiphyse est un organe sensible à la photopériode ; on la considère comme faisant partie du système visuel «non-image-forming», qui ne permet pas la perception d'image (*Rovsing et al., 2010, 2011*). Elle synthétise et sécrète selon un rythme journalier la mélatonine, influençant ainsi le cycle circadien de l'individu. *Otx2* est exprimé dans l'épiphyse durant le développement embryonnaire et chez l'individu adulte, tout comme son orthologue *Crx* (*Nishida et al., 2003, Rath et al., 2006*).

Les deux gènes de la famille *Otx* semblent assurer des rôles complémentaires dans la glande pinéale. *Otx2* est responsable de la mise en place et du développement de l'organe ; *Crx* régulerait pour sa part le réseau génétique à l'origine du fonctionnement correct de la glande adulte (*Rovsing et al., 2011*).

En effet, l'induction d'un KO d'*Otx2* à E12,5 entraîne l'absence totale de l'épiphyse à l'âge adulte (*Nishida et al., 2003*). Son orthologue *Crx* semble contribuer au moins en partie à ce développement ; en effet, des souris *Crx*<sup>-/-</sup>;*Otx2*<sup>+/-</sup> sont également quasi dépourvues de glande pinéale (*Koike et al., 2007*). Une dose minimale de protéines *Otx* serait ainsi nécessaire au bon développement de la glande pinéale, *Otx2* restant le déterminant majeur de sa mise en place.

### I.2.5.4. Bulbes olfactifs

L'expression d'*Otx2* dans les placodes nasales, puis dans les bulbes olfactifs a été détectée dès les premières études du gène, et ce dans plusieurs espèces de Vertébrés (*Simeone et al., 1993, Li et al., 1994, Kablar et al., 1996, Mallamaci et al., 1996*), ainsi que chez la lamproie *Lampetra japonica* (*Ueki et al., 1998*). L'homéogène est principalement exprimé dans les cellules postmitotiques de l'épithélium olfactif (cellules de soutien et peut-être cellules sensorielles), et dans l'organe voméronasal. Cependant, malgré la conservation de cette zone d'expression, seul un petit nombre d'études s'est penché sur le potentiel rôle d'*Otx2* dans ce système sensoriel. L'épithélium olfactif et l'organe voméronasal présentent bien des anomalies morphologiques dans des souris hétérozygotes *Otx2*<sup>+/-</sup>, mais ce phénotype est sans doute à relier aux perturbations du développement crânien que ces souris subissent (*Matsuo et al., 1995*).

De fait, seules trois études, menées chez d'autres organismes que des Mammifères, permettent de supposer une fonction spécifique d'*Otx2* dans le système olfactif. Deux études (*Harden et al., 2006, Veilleux et al., 2013*), menées respectivement chez le poisson-zèbre et le poisson-clown, mettent en évidence une augmentation de l'expression du gène *Otx2* de ces espèces au cours du processus d'«imprinting» olfactif (apprentissage précoce d'une odeur). Des variations d'expression d'*Otx2* sont donc corrélées à des événements fonctionnels significatifs. Par ailleurs, le gène *XOtx2* du xénope semble réguler l'expression du marqueur *Dmrt4* de la placode olfactive (*Steventon et al., 2012*). Le rôle exact de ce gène reste cependant à élucider de manière plus précise.

#### I.2.6. Etablissement des tracés nerveux et croissance axonale

A partir de E10,5, *Otx2* est plus intensément exprimé au niveau des voies de passage des fibres axonales, notamment au niveau de la ZLI (*zona limitans intrathalamica, Nguyen Ba-Charvet et al., 1998*). Cette expression plus intense se retrouve également au niveau des voies de passage des nerfs optiques et olfactifs, ainsi qu'au niveau de la commissure entre pretectum et tectum (*Mallamaci et al., 1996*). De manière intéressante, une insuffisance en protéines *Otx2* a été associée à des anomalies de projection axonale, notamment au niveau du nerf oculomoteur ainsi que de la branche ophtalmique du nerf V (*Matsuo et al., 1995*). Le gène *Otx2* pourrait donc jouer un rôle dans le guidage axonale des fibres nerveuses dans les régions où il est exprimé.

Bien qu'aucune étude n'ait encore permis de démontrer cette hypothèse de façon concluante, un faisceau d'indices la soutient, tant *in vitro* que *in vivo*. Dans des lignées cellulaires transfectées de façon stable par *Otx2*, l'homéogène semblait dicter la croissance de neurites de façon dépendante à la quantité de protéines *Otx2* présente (*Nguyen Ba-Charvet et al., 1998*) : les clones exprimant une faible quantité de protéines *Otx2* projetaient des neurites plus longues que les clones exprimant fortement le gène transfecté. Par ailleurs, l'expression de plusieurs molécules d'adhésion impliquées dans les processus précoces de mise en place des fibres nerveuses était modifiée proportionnellement à la concentration en protéines *Otx2* présente dans les clones cellulaires. *In vitro* tout du moins, *Otx2* pourrait donc influencer la croissance axonale en régulant finement plusieurs protéines d'adhésion (*Nguyen Ba-Charvet et al., 1998*). Une

étude plus récente sur des cultures primaires de mésencéphale ventral a permis de confirmer qu'*Otx2* était capable de réguler des gènes impliqués dans le guidage axonal (*Chung et al., 2010*).

*In vivo* enfin, l'étude de souris chimères contenant à la fois des cellules *Otx2*<sup>-/-</sup> et *Otx2*<sup>+/-</sup> (*Rhinn et al., 1999*) a permis de révéler qu'*Otx2* était capable de réguler de façon cellule-autonome le gène *ephrinA2*, membre d'une famille notoirement impliquée dans les processus de guidance axonale (*Xu et al., 2000, Poliakov et al., 2004*). L'ensemble de ces données suggère qu'*Otx2* serait capable, par la régulation d'une multitude de molécules d'adhésion, d'influencer la progression des axones de plusieurs nerfs en développement, et notamment des nerfs liés à l'oeil.

### I.2.7. Mise en place et régulation de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique

Chez les Mammifères, la production d'hormones sexuelles par les gonades, indispensable à la fertilité des individus, est sous le contrôle d'hormones hypophysaires, la FSH et la LH. Les concentrations de ces dernières sont à leur tour régulées par la GnRH, sécrétée par un groupe diffus d'environ 1000 neurones de l'hypothalamus. Les neurones à GnRH se forment à l'origine au niveau de la placode nasale, et migrent à partir de E13,5 vers leur destination finale (*Kelley et al., 2000, Wray et al., 1989*).

L'expression d'*Otx2* est retrouvée dès E12,5 chez la souris au niveau de la future hypophyse (**Figure 16**, *Simeone et al., 1993*), ainsi que dans les cellules de placode nasale destinées à former les neurones à GnRH (*Mallamaci et al., 1996*). Cette dernière expression se maintiendrait jusqu'à l'âge adulte : en effet, *Otx2* est coexprimé avec la GnRH au niveau de l'hypothalamus de souris adulte (*Kelley et al., 2000*), et son niveau d'expression augmente au cours de la maturation neuronale (*Larder et al., 2009*). D'un point de vue fonctionnel, certains hétérozygotes pour *Otx2* présentent un déficit en hormone de croissance, produite par l'hypophyse (*Makiyama et al., 2007*). Par ailleurs, chez de nombreux patients humains hétérozygotes pour une mutation *Otx2*, on peut déceler une insuffisance hypophysaire simple ou multiple : les patients présentent un déficit en hormone de croissance (**g**rowth **h**ormone, GH) seule, ou en l'ensemble des hormones hypophysaires (FSH, LH, GH, TSH). Cette insuffisance s'accompagne presque toujours d'une structure anormale de l'hypophyse : l'hypophyse antérieure (normale) est atrophiée, et on note la présence d'une hypophyse postérieure ectopique (*Diaczok et al.,*

2008, Dateki et al., 2008, Henderson et al., 2009, Tajima et al., 2009, Ashkenazi-Hoffnung 2009, Dateki et al., 2010, Del Bianco et al., 2012). L'ensemble de ces données laisse supposer un rôle d'*Otx2* dans la formation correcte de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique. Et en effet, une étude récente dans laquelle les effets de l'inactivation d'*Otx2* au sein du diencephale ventral ont été étudiés a pu en démontrer son importance : l'hypophyse des animaux *knock-out* pour cet homéogène est atrophiée et dysmorphique (Mortensen et al., 2014). Une analyse approfondie révèle qu'*Otx2* est nécessaire par lui-même pour le développement de l'hypophyse postérieure. Il est également requis de façon non-autonome à celui de l'hypophyse antérieure, probablement via sa régulation du signal *Fgf*.

De façon surprenante, le rôle d'*Otx2* au niveau de l'hypophyse reste encore peu connu, alors que les phénotypes observés notamment chez l'Homme touchent principalement cet organe. Cependant, des expériences tant *in vitro* que *in vivo* ont pu mettre en évidence son importance dans la mise en place et le bon fonctionnement des neurones à GnRH. La protéine *Otx2* est tout d'abord capable de se fixer *in vitro* sur deux sites différents en amont du gène *GnRH* murin : au niveau de son promoteur minimal, activant ainsi son expression, et au niveau d'un enhancer neurone-spécifique, ce qui augmente encore l'expression de la GnRH dans les neurones matures (Kim et al., 2007). Ces sites lui sont spécifiques, et leur mutation diminue drastiquement l'activité de transcription du promoteur. *Otx2* serait donc un activateur majeur de la synthèse de la GnRH ; comme mentionné en 1.1.2.3.2., son activité dans les neurones hypothalamiques pourrait être modulée par l'interaction avec un co-répresseur, GRG4 (Larder et al., 2009).

Enfin, deux modèles murins ont permis de confirmer l'importance d'*Otx2* dans le développement des neurones à GnRH. L'un d'eux tire encore une fois parti de l'hypomorphisme de certaines hétérozygotes, en analysant le phénotype de souris *Otx2*<sup>+/-</sup> (Larder et al., 2013) : ces souris présentent une diminution globale de la concentration en protéines *Otx2*, y compris dans les neurones à GnRH de l'hypothalamus. Le deuxième, GnRH-*Otx2*KO, permet l'excision du gène *Otx2* (flanqué de sites *lox* dans le génome de ces animaux) par une *Cre* sous le contrôle du promoteur de la GnRH ; le gène *Otx2* est donc spécifiquement excisé dans les neurones à GnRH (Diaczok et al., 2011). Dans les deux cas, la concentration en GnRH, ainsi qu'en l'ARNm du gène *GnRH*, sont plus faibles. La concentration en LH diminue également dans le premier modèle, alors que ce sont les concentrations en FSH, testostérone et oestradiol qui sont touchées dans le deuxième.

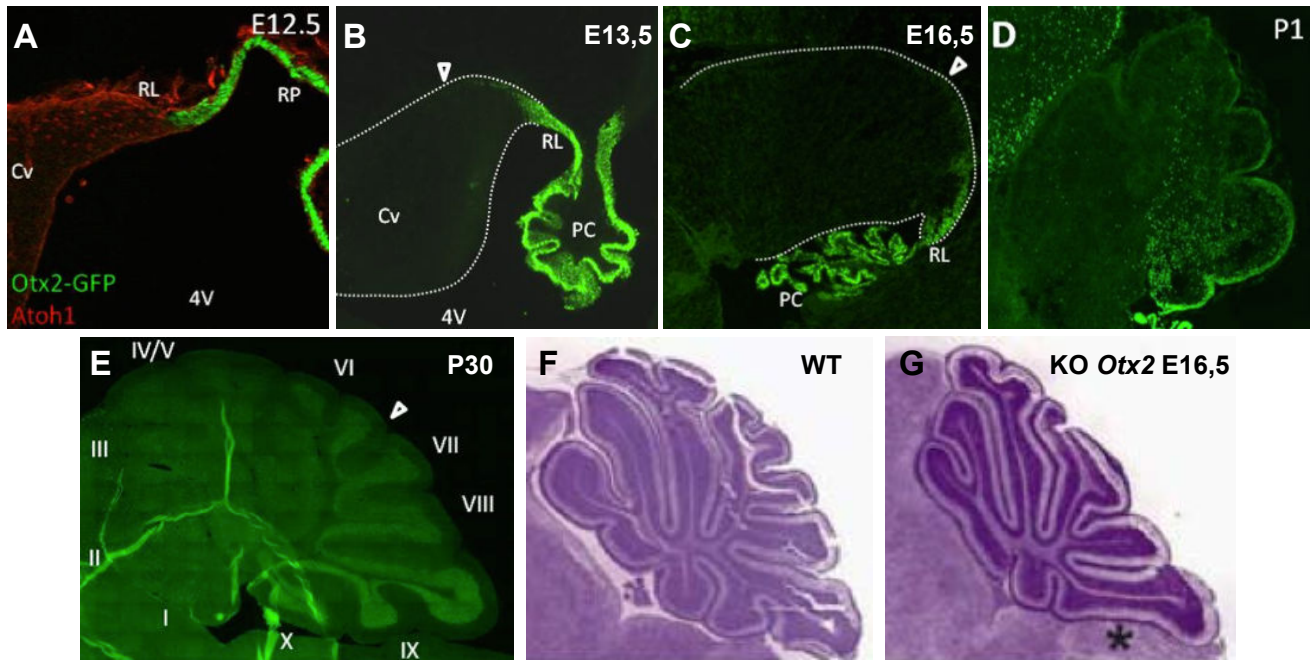
Ces perturbations hormonales aboutissent dans les deux cas à une diminution de la fertilité (*Larder et al., 2013, Diaczok et al., 2011*).

La perte d'expression globale en GnRH peut être expliquée par le nombre plus faible de neurones à GnRH chez les mutants. En effet, dès E14,5, l'hypothalamus des mutants est moins riche en neurones aptes à produire l'hormone. Or la quantité de neurones à GnRH dans leur région d'origine, la placode nasale, est normale chez les mutants à partir de E14,5 (*Larder et al., 2013, Diaczok et al., 2011*). Le gène *Otx2* serait donc responsable de la mise en place correcte des neurones GnRH au niveau de l'hypothalamus. Une étude de lignage cellulaire a permis de révéler que la descendance des précurseurs GnRH était beaucoup plus réduite chez les mutants que chez les animaux sauvages, ce qui s'accompagnait par ailleurs d'une mort cellulaire intense à proximité de la placode nasale (*Diaczok et al., 2011*). *Otx2* assurerait donc la survie (et peut-être la prolifération) précoce de ces futurs neurones. Il pourrait également être responsable de la migration correcte des neurones jusqu'à l'hypothalamus (*Larder et al., 2013*).

Le gène *Otx2* est donc nécessaire au développement correct du groupe de neurones hypothalamiques produisant l'hormone GnRH. Il est aussi probablement impliqué dans le développement de l'hypophyse ; c'est donc un facteur majeur dans la mise en place de la signalisation par les hormones sexuelles, et par là même dans la fertilité des individus.

#### 1.2.8. Développement et pathologies du cervelet postérieur

L'homéogène *Otx2* est exprimé assez tardivement dans le cervelet en développement, et son rôle n'y est apparent qu'à partir de E16,5. Dès E10,5, une nouvelle zone d'expression d'*Otx2* apparaît au niveau de la plaque du toit, à proximité de la lèvre rhombique à l'origine des cellules de la couche granulaire interne du cervelet (IGL, voir **Figure 25A** pour une expression représentative à E12,5). Son domaine d'expression s'étend rostralement dans le primordium du cervelet à E13,5 et E16,5 (**Figure 25B,C**), et marque les précurseurs de l'IGL au niveau de la couche granulaire externe (EGL) en développement. Ce patron d'expression se maintient à P1, et *Otx2* marque alors aussi certaines cellules de l'IGL (**Figure 25D**). A l'âge adulte, il est exprimé au niveau de l'IGL



### Figure 25 : Fonction d' *Otx2* dans le développement du cervelet

(A-E) Expression d' *Otx2* dans le cervelet au cours du développement. Immunomarquages anti-GFP d' animaux *Otx2<sup>Otx2-GFP/+</sup>* (exprimant *Otx2* fusionnée à la GFP en C-terminal) à (A) E12,5, (B) E13,5, (C) E16,5, (D) P1, (E) P30. Un immunomarquage de la protéine ATOH1, caractéristique de la lèvre rhombique, est également montré en (A) pour démontrer qu' *Otx2* n'y est pas exprimé (les deux immunomarquages ne se superposent pas). Une tête de flèche indique la fin de l'expression d' *Otx2* en (B), (C) et (E). Les lobes du cervelet sont numérotés de I à X en (E).

(F,G) Effet du KO d' *Otx2* à E16,5 sur le développement du cervelet. Coloration éosine-hématoxyline sur des cervelets à P30 : (A) sauvage, (B) KO pour *Otx2* à E16,5. Le cervelet KO est de taille réduite, et présente des anomalies de foliation (astérisque en G).

D'après Fossat et al., 2006. Photos (A-E) utilisées avec l'autorisation de C. Le Greneur

dans les quatre à cinq lobes postérieurs (**Figure 25E**). Considérées ensemble, ces données suggèrent qu' *Otx2* pourrait être impliqué dans la mise en place du cervelet postérieur.

Et en effet, l'inactivation du gène *Otx2* à E16,5 par une méthode de KO inductible entraîne une diminution de la taille du cervelet adulte, principalement attribuable au cervelet postérieur, ainsi que des anomalies de foliation de ce dernier (Fossat et al., 2006, **Figure 25F-G**). L'homéogène *Otx2* est donc important pour le développement correct du cervelet postérieur.

Il jouerait également un rôle chez l'homme dans un type de cancer très agressif caractéristique du cervelet, les médulloblastomes. L'étude de 15 médulloblastomes humains par Adamson et collègues a révélé que 14 d'entre eux surexprimaient *Otx2* (93%, Adamson et al., 2010), venant ainsi confirmer des résultats obtenus par d'autres méthodes (Yokota et al., 2004, Michiels et al., 1999). D'autres études ont montré que le gène *Otx2* était génomiquement amplifié dans une fraction non-négligeable des médulloblastomes

(jusqu'à 20%, *Boon et al., 2005, Northcott et al., 2012*), autre signe d'une surexpression du gène potentiellement essentielle à l'installation de ces pathologies. *Otx2* pourrait ainsi être un carcinogène au niveau du cervelet, où il aurait donc la capacité de réguler, directement ou indirectement, le cycle cellulaire. Les études tentant d'étudier le rôle d'*Otx2* dans la prolifération cellulaire donnent cependant des résultats contradictoires : si la plupart suggèrent qu'*Otx2* favorise la prolifération cellulaire (*Adamson et al., 2010, Wortham et al., 2012, Bunt et al., 2011*), l'induction d'*Otx2* dans une lignée cellulaire de médulloblastomes qui ne l'expriment normalement pas entraîne au contraire un blocage de ces cellules en phase G0/G1 (*Bunt et al., 2010*). Cette fonction d'*Otx2* serait donc extrêmement dépendante du contexte cellulaire.

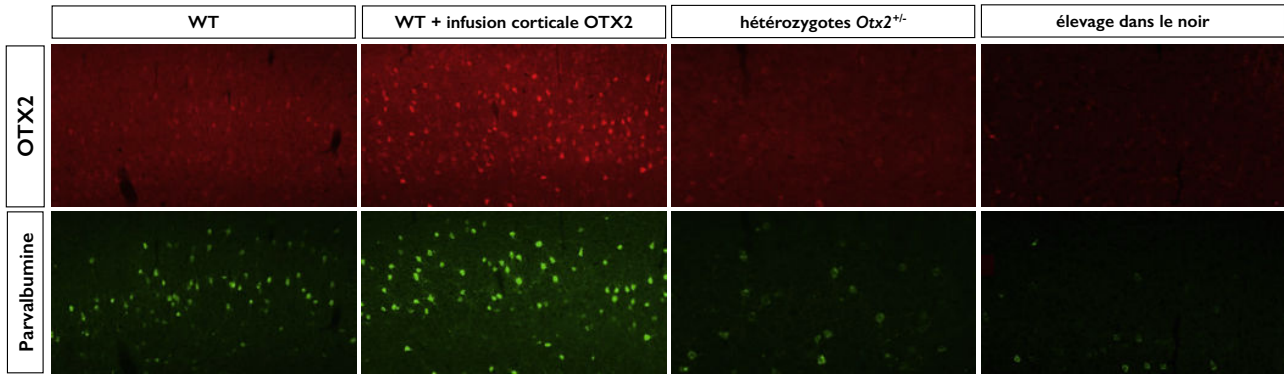
### I.2.9 Entretien et plasticité du système visuel

L'intégralité des fonctions du gène *Otx2* décrites jusqu'ici ont lieu durant le développement embryonnaire de l'animal. Pourtant, son expression persiste chez la souris adulte dans certains territoires. Des expériences récentes ont pu mettre en évidence certains rôles qu'*Otx2* pourrait jouer dans l'animal mature ; ils concernent pour l'instant tous le système visuel.

L'homéogène *Otx2* est tout d'abord essentiel à l'entretien et au maintien de la neurorétine adulte ; la partie III s'intéressera plus particulièrement à cette fonction, qui ne sera donc pas abordée ici.

Une série d'études semble par ailleurs montrer son importance dans la plasticité du cortex visuel primaire. Cette région du cerveau est le théâtre de l'installation de la dominance oculaire : des interactions compétitives entre les afférences des deux yeux qui y convergent déterminent quel oeil deviendra fonctionnellement et anatomiquement dominant. Des expériences d'occlusion monoculaire ont pu démontrer la plasticité de ce phénomène : lorsqu'un des yeux de la souris est artificiellement gardé fermé, celui qui conserve sa vision devient dominant d'un point de vue physiologique comme anatomique (*Sugiyama et al., 2008*). Il existe cependant une période critique pour la plasticité du cortex visuel, comprise entre P21 et P60, hors de laquelle l'expérience sensorielle n'influe normalement pas sur la neuranatomie.





**Figure 26 : Rôle d'*Otx2* dans la maturation des neurones à parvalbumine**

Immunomarquages anti-*Otx2* (*en haut*) et anti-PV (*en bas*) d'animaux sauvages, ayant subi une infusion corticale de protéine *Otx2*, hétérozygotes pour *Otx2* ou élevés dans le noir. Une infusion d'*Otx2* dans le cortex visuel augmente la quantité de protéine présente au niveau des neurones à parvalbumine, et accélère ainsi leur maturation (le signal parvalbumine augmente en intensité). L'effet inverse peut être observé chez les hétérozygotes *Otx2*<sup>+/-</sup>. La protéine *Otx2* s'accumule ainsi dans les neurones à PV avec une vitesse proportionnelle à sa concentration. Ce processus est expérience-dépendant : chez des animaux élevés dans le noir, et n'ayant donc jamais subi de stimulus visuel, l'accumulation d'*Otx2* n'a pas lieu.

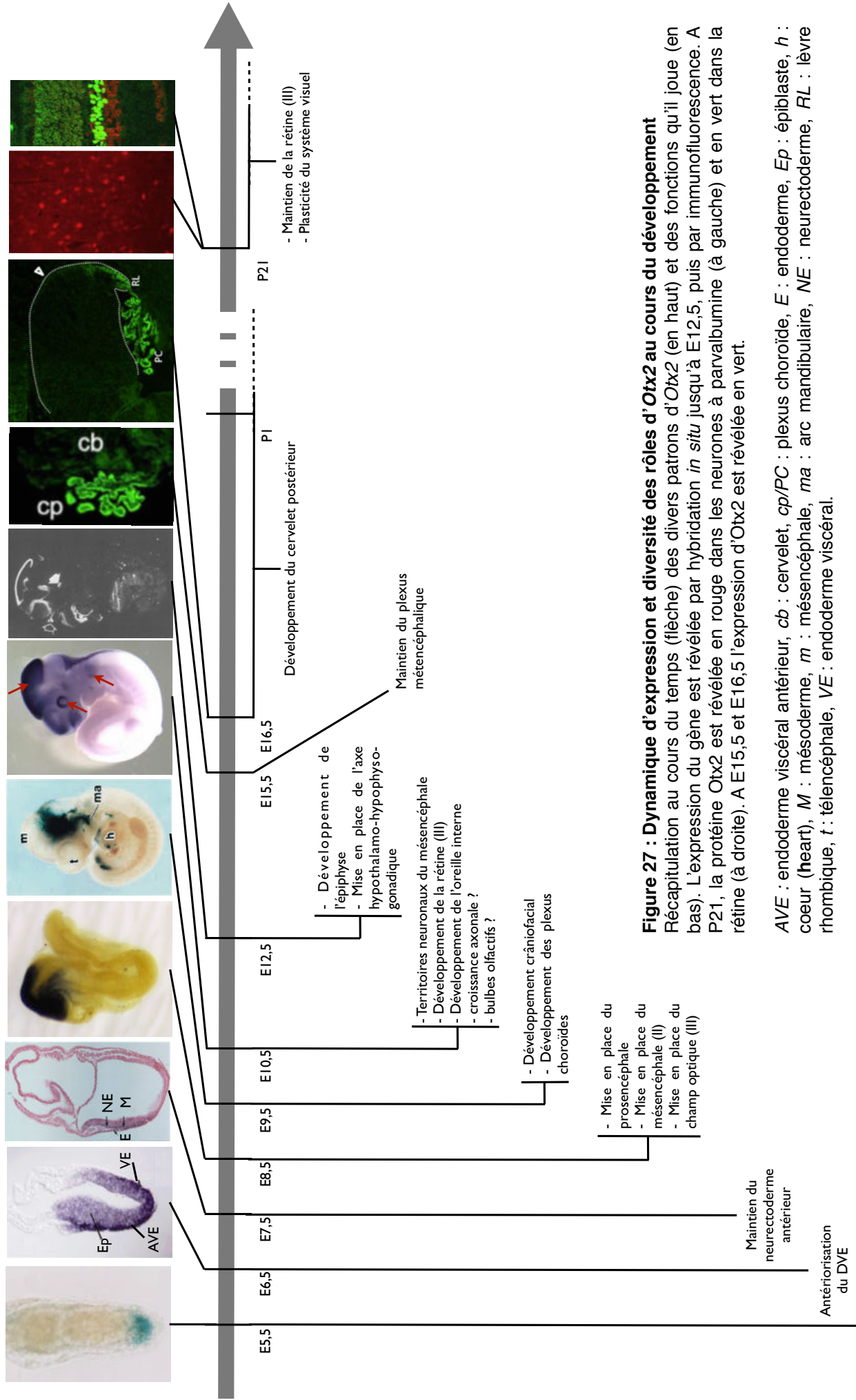
D'après Sugiyama *et al.*, 2008

La maturation d'un certain type de neurones présent dans le cortex visuel, les neurones à parvalbumine (PV) est étroitement associée à sa plasticité ; elle influence notamment la durée et le moment d'initiation de la période critique, et l'arrivée à l'état mature de ces cellules semble signer la fin de la période de plasticité. Une accélération de la maturation de ces neurones par surexpression du BDNF (**b**rain **d**erived **n**eurotrophic **f**actor) entraîne en effet l'apparition précoce et le raccourcissement de la période critique (Huang *et al.*, 1999, Hanover *et al.*, 1999). La protéine *Otx2* s'accumule dans les neurones à PV pendant leur maturation ; l'efficacité et la rapidité de cette dernière sont d'ailleurs proportionnelles à la quantité globale de protéines *Otx2* présentes dans l'organisme. Des animaux hétérozygotes pour le gène *Otx2* présentent moins de cellules PV-positives, alors que des animaux dans le système nerveux desquels la protéine *Otx2* était infusée présentaient une maturation accélérée des neurones à PV (**Figure 26**, Sugiyama *et al.* 2008). Ces effets se reflètent sur la plasticité du cortex visuel, dont la précocité et la rapidité sont elles aussi proportionnelles à la dose d'*Otx2* présente. L'accumulation de la protéine dans les neurones à parvalbumine n'a lieu que dans des souris chez lesquelles un des yeux au moins fournit une expérience sensorielle (**Figure 26**, Sugiyama *et al.* 2008)

Le gène *Otx2* serait donc essentiel pour assurer, de manière expérience-dépendante, la maturation des neurones à parvalbumine et ainsi contrôler la durée de la période critique de plasticité du cortex visuel.

De façon extrêmement surprenante, les neurones à PV du cortex visuel n'expriment pas *Otx2* (*Sugiyama et al., 2008, Spatazza et al., 2013*), et pourtant la présence de ce facteur de transcription y a été avérée de plusieurs façons différentes (*Kim et al., 2014*). Les protéines *Otx2* qui s'y accumulent seraient donc produites et sécrétées par une autre cellule avant d'être internalisées par les neurones à parvalbumine et de s'y accumuler au cours du temps. Elles interagissent pour leur internalisation avec les protéoglycanes qui forment des réseaux péri-neuronaux autour de ces neurones, *via* un domaine N-terminal juste en amont de l'homéodomaine (*Beurdeley et al., 2012*). Plusieurs origines non exclusives des protéines *Otx2* dans le cortex visuel ont été postulées : elles pourraient notamment provenir d'une des deux régions précédentes du système visuel, la rétine et le noyau géniculé latéral, exprimant toutes deux *Otx2*. Des protéines *Otx2* biotinylées injectées dans un oeil de souris au niveau de la rétine peuvent effectivement être retrouvées dans le cortex visuel, signe qu'elles sont capables de se propager le long de l'axe visuel (*Sugiyama et al., 2008*). Elles sont également sécrétées dans le CSF par les plexus choroïdes, et un knock-out d'*Otx2* spécifique aux plexus ralentit l'accumulation protéique dans le cortex visuel (*Spatazza et al., 2013*). Ainsi, la cinétique d'*Otx2* dans les cellules à PV du cortex n'est pas cellule-autonome. La présence de la protéine dans le CSF a d'ailleurs mené les auteurs à former l'hypothèse que d'autres neurones à PV pourraient eux aussi internaliser les protéines *Otx2*, et qu'*Otx2* pourrait influencer la plasticité d'autres régions corticales de façon indirecte par son expression dans les plexus choroïdes (*Spatazza et al., 2013*).

Enfin, la présence d'*Otx2* dans les neurones à PV semble essentielle pour les maintenir à l'état mature. Lorsque l'internalisation de la protéine *Otx2* par ces neurones est perturbée (par dégradation ou saturation des réseaux péri-neuronaux qui l'assurent), on observe une disparition des marqueurs moléculaires qui les caractérisent. On constate également que le système visuel retrouve alors sa plasticité (*Beurdeley et al., 2012*). Le maintien d'une forte concentration de la protéine *Otx2* dans les neurones à PV semble donc être important au fonctionnement normal du cerveau.



### I.3. Conclusion

Comme le montre cette première partie de l'introduction, le gène *Otx2* est un acteur majeur du développement chez la souris ; il est essentiel au processus de gastrulation et continue de jouer des fonctions-clés dans les étapes subséquentes. Si ses rôles restent cantonnés, après E7,5, à la partie antérieure de l'embryon, il n'en restent pas moins très divers et concernent des structures variées. Son expression extrêmement dynamique est à l'origine de la diversité de ses rôles. La **Figure 27** relie les différentes zones d'expression de l'homéogène au cours du développement embryonnaire aux différents rôles qu'il y assure : on constate bien que les deux sont étroitement corrélés.

Un contrôle fin de l'expression d'*Otx2* est donc absolument essentiel à sa fonction. Comme cela a déjà été mentionné plus haut, ce n'est bien sûr pas le seul gène dans ce cas. *Pax6*, par exemple, présente lui aussi une expression dynamique en de multiples régions de l'embryon au cours du développement, étroitement liée à la multiplicité de ses fonctions. Au-delà de son rôle précoce dans la régionalisation du prosencéphale (cf I. 2.2.1.2.), il est ainsi exprimé dans la lèvre rhombique dès E12,5 et dans les cellules précurseurs du cervelet à E16,5. Son *knock-out* provoque des problèmes de foliation de ce dernier, dûs à des défauts de migration cellulaire (*Engelkamp et al., 1999*). Il est par ailleurs exprimé au niveau du futur oeil, où il assure tout d'abord la spécification de la lentille et par conséquent la formation de l'oeil, puis la prolifération et la différenciation correcte des progéniteurs rétiniens (*Fahry et al., 2013, Klimova et al., 2014*). Le lien entre expression et fonction dégagé pour *Otx2* tout au long de cette première partie d'introduction s'avère donc avoir une portée beaucoup plus générale.

Mais ce lien, une fois établi, soulève alors de nombreuses questions. L'homéogène *Otx2* est par exemple capable d'induire, à certains moments du développement, la mise en place de territoires bien spécifiques, ou de lancer des programmes développementaux définis. Mais, dans le cadre d'un développement embryonnaire normal, sa présence seule est-elle suffisante, ou des zones de compétence spatiales et temporelles existent-elles au-delà desquelles il n'est plus capable de remplir sa fonction ? Dans ce cas, quelle sont les tailles de ces zones de compétence, relativement à son aire effective d'expression ? En d'autres termes, à quel point la régulation de l'expression d'*Otx2* contraint-elle son rôle ?

Cette question a été étudiée dans le cadre de cette thèse en prenant pour modèle le rôle d'*Otx2* dans la régionalisation du mésencéphale et du métencéphale. La spécification de ces deux parties du système nerveux central dépend de l'action d'un centre organisateur, l'organiseur isthmique, dont la position et le fonctionnement correct dépendent d'*Otx2*. La seconde partie de cette introduction s'intéressera donc aux propriétés fonctionnelles et moléculaires de cet organisateur, ainsi qu'à la fonction qu'y joue *Otx2*.

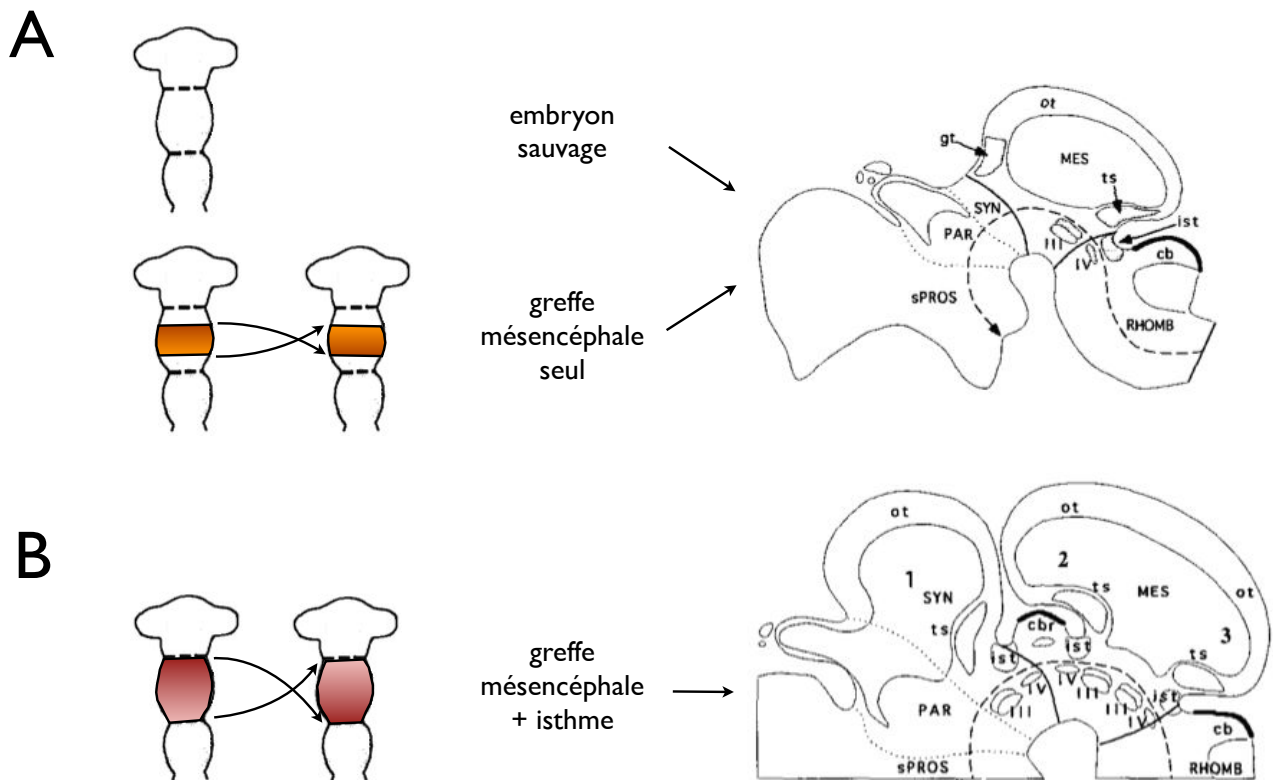
## II. Importance de la régulation spatio-temporelle d'*Otx2* dans la régionalisation du système nerveux antérieur

### II.1 Spécification du mésencéphale et du métencéphale par l'organiseur isthmique

#### II.1.1 L'organiseur isthmique, un centre organisateur

##### II.1.1.1 Découverte

L'existence d'un centre organisateur responsable de l'induction et de la polarisation du mésencéphale postérieur et de la partie antérieure du métencéphale a été postulée puis prouvée suite à une série d'expériences chez le poulet. La greffe sur un embryon de poulet d'une portion de mésencéphale selon une orientation antéro-postérieure inversée par rapport à celle qu'elle avait chez l'embryon donneur aboutit à un tube neural morphologiquement et moléculairement normal (**Figure 28A**, *Alvarado-Mallart et al., 1990*). La différenciation polarisée du mésencéphale n'est donc pas intrinsèque mais dépend de signaux externes. La mise en contact par chirurgie d'un diencephale de poulet avec la constriction isthmique immédiatement postérieure au mésencéphale a par ailleurs pour résultat la différenciation de ce diencephale en mésencéphale, y compris au niveau moléculaire : un tectum optique positif pour l'expression de *En-2* se forme (*Martinez et al., 1991*). L'ensemble de ces résultats suggère que la région isthmo-cérébelleuse est capable de régionaliser le neurectoderme adjacent de façon polarisée.



### Figure 28 : Capacités inductrices de la constriction isthmique

Résultats d'expériences de greffe de tissu embryonnaire chez le poulet. (A) La greffe au même niveau du tube neural chez l'embryon receveur, d'une portion de mésencéphale inversée selon l'axe antéro-postérieur (*en bas à gauche*), mène au développement d'un cerveau morphologiquement normal (*à droite, coupe sagittale*). (B) Si la même inversion par greffe inclut la construction isthmique, un tectum optique ectopique se forme à la place du diencéphale, polarisé dans le sens inverse du tectum normal, et séparé de ce dernier par un tissu de type cérébelleux.

*cb* : cervelet (*cerebellum*), *cbr* : rudiment cérébelleux, *ist* : isthme, *gt* : *griseum tectale*, *MES* : mésencéphale, *PAR* : thalamus (*parencéphale*), *ot* : tectum optique, *RHOMB* : rhombencéphale, *sPROS* : prosencephale secondaire, *SYN* : prepectum (*synencéphale*), *ts* : *torus semicircularis*.

D'après Marin et Puelles, 1994

Cette hypothèse fut prouvée en 1994 par Marin et Puelles : leurs expériences ont montré que lorsque l'inversion par greffe d'un mésencéphale inclut la constriction isthmique, les résultats diffèrent radicalement de ceux reportés précédemment. Un complexe isthmo-cérébelleux se forme ectopiquement, encadré de part et d'autre par une structure mésencéphalique de type caudal (**Figure 28B**, Marin et Puelles, 1994).

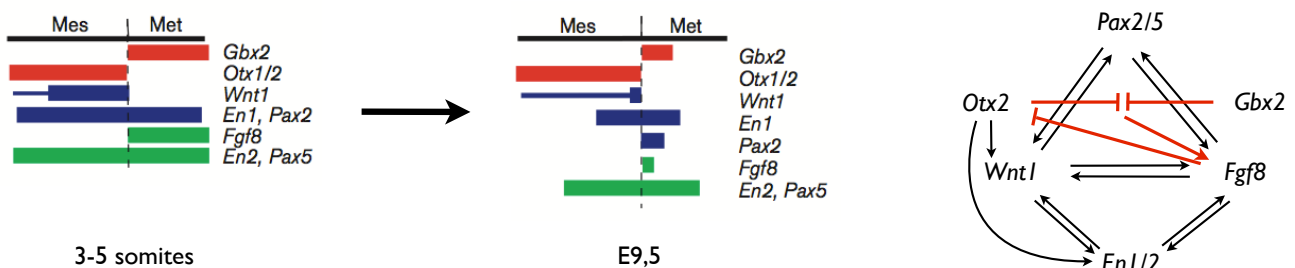
La constriction isthmique située entre le mésencéphale postérieur et le futur cervelet a donc des propriétés inductrices et polarisantes : c'est un centre organisateur, et il a à ce titre reçu le nom d'organiseur isthmique (IsO, **Isthmic Organizer**). L'IsO est responsable de la différenciation du mésencéphale postérieur (les colliculi chez la souris)

et du métencéphale antérieur (notamment le cervelet), et la moindre perturbation de son activité entraîne la disparition ou la respécification de ces structures. De nombreuses études ont par la suite réussi à disséquer le réseau génétique à l'origine de sa formation et de son fonctionnement.

### II.1.1.2 Un réseau complexe d'interactions génétiques à la frontière mésencéphale-métencéphale

Plusieurs gènes sont exprimés au niveau de l'organiseur isthmique et jouent un rôle dans sa mise en place et son maintien ; ils interagissent au sein d'un réseau génétique complexe à la frontière du mésencéphale et du métencéphale.

Chronologiquement, les gènes *Otx2* et *Gbx2* sont parmi les premiers à être exprimés au niveau du futur organisateur isthmique. Exprimés respectivement du côté mésencéphalique et métencéphalique et séparés par une frontière nette, ils remplissent une fonction cruciale dans le positionnement de ce dernier, qui sera abordée en détail dans la sous-partie II.2. Très vite au cours du développement (au stade pré-somitique), une expression du gène *Pax2* apparaît spécifiquement au niveau de la frontière mésencéphale-métencéphale (MHB, pour **Midbrain-Hindbrain Boundary**). Elle est suivie de l'expression de *Wnt1*, *Fgf8* et *En1/2*, dans une zone incluse dans celle de *Pax2*, puis, au stade 3 somites, de l'apparition de *Pax5*. Ces zones d'expression sont dynamiques : si



**Figure 29 : Caractéristiques moléculaires et réseau de régulation génétique de l'IsO**

A gauche, zones d'expression des différents acteurs de l'organiseur isthmique, au stade 3-5 somites (E8-E8,5) et E9,5. A droite, réseau de régulation génétique des mêmes acteurs.

Mes : mésencéphale, Met : métencéphale

D'après Joyner et al., 2000

celles de *Pax5*, *En2* et *En1* continuent d'englober l'ensemble de la MHB, *Wnt1* et *Fgf8* sont bientôt restreints à deux domaines plus réduits, du côté mésencéphalique et métencéphalique respectivement, et partageant la même frontière d'expression qu'*Otx2* et *Gbx2*. *Pax2* devient quant à lui cantonné au métencéphale antérieur (**Figure 29**). L'ensemble de ces gènes joue un rôle essentiel dans la mise en place de l'organisateur ; des souris knock-out pour *En1* ne développent ni colliculi (issus du mésencéphale postérieur) ni cervelet (issu du métencéphale antérieur, *Rowitch et McMahon, 1995*), signe d'un défaut de mise en place de l'IsO. *En2* semble jouer un rôle similaire en coopération avec son orthologue (*Joyner et al., 1996*). En l'absence de ces deux facteurs de transcription, l'expression des autres marqueurs de la MHB disparaît rapidement, au profit de celle de marqueurs plus antérieurs tels *Pax6* (*Liu et Joyner, 2001*). Des expériences chez le medaka démontrent par ailleurs qu'une expression ectopique d'*eng2* en position antérieure est suffisante pour induire l'expression de tous les marqueurs de l'IsO, et ainsi le développement d'un mésencéphale ectopique à la place du diencéphale (*Ristoratore et al., 1999*).

Les gènes *Pax2* et *Pax5* sont également nécessaires et suffisants, à l'établissement de l'IsO. Ils semblent agir en conjonction chez la souris pour assurer son installation correcte. Des animaux hétérozygotes *Pax2<sup>+/-</sup>* ou *Pax5<sup>+/-</sup>* n'ont pas de phénotype particulier, tandis que le cervelet et tout ou partie du mésencéphale ne se développent pas dans 20% des animaux *Pax2<sup>+/-</sup>;**Pax5<sup>+/-</sup>*, et dans la totalité des animaux *Pax5<sup>-/-</sup>;**Pax2<sup>+/-</sup>*. L'étude du double mutant *Pax2<sup>-/-</sup>;**Pax5<sup>-/-</sup>* révèle un phénomène analogue à celui observé dans les mutants *En1/2* : les marqueurs de la MHB *Fgf8* et *En2* ne sont pas exprimés, et les territoires présomptifs du mésencéphale et du métencéphale présentent en fait des marqueurs de neurectoderme plus antérieur (*Schwarz et al., 1999*). Chez le poisson-zèbre, seul *pax2* semble essentiel à la mise en place de l'IsO, mais sa mutation ou son knock-down a les mêmes effets que chez la souris (*Brand et al., 1996, Lun et Brand, 1998*). A l'inverse, l'expression ectopique chez le poulet de *Pax2* ou *Pax5* est suffisante pour la mise en place d'un IsO et le développement d'un mésencéphale ectopique (*Okafuji et al., 1999*).

Le gène *Wnt1*, lui aussi, est essentiel à la formation de la MHB ; des souris KO pour *Wnt1* ne présentent ni mésencéphale ni métencéphale antérieur (*McMahon et Bradley, 1990*), et des animaux hypomorphes pour *Wnt1* ont des défauts d'organisation de la MHB, au niveau de laquelle les frontières d'expression génétique ne sont plus



correctement définies (*Bally-Cuif et al., 1995*). Cependant, son expression dans un domaine plus large sous le contrôle du promoteur *En1* ne modifie ni la taille de l'IsO ni ses propriétés inductrices (*Panhuysen et al., 2004*).

Enfin, le facteur de signalisation *Fgf8* semble être l'acteur le plus important de l'IsO, et lui confère ses capacités d'induction tissulaire ; son rôle sera abordé en II.1.1.3.

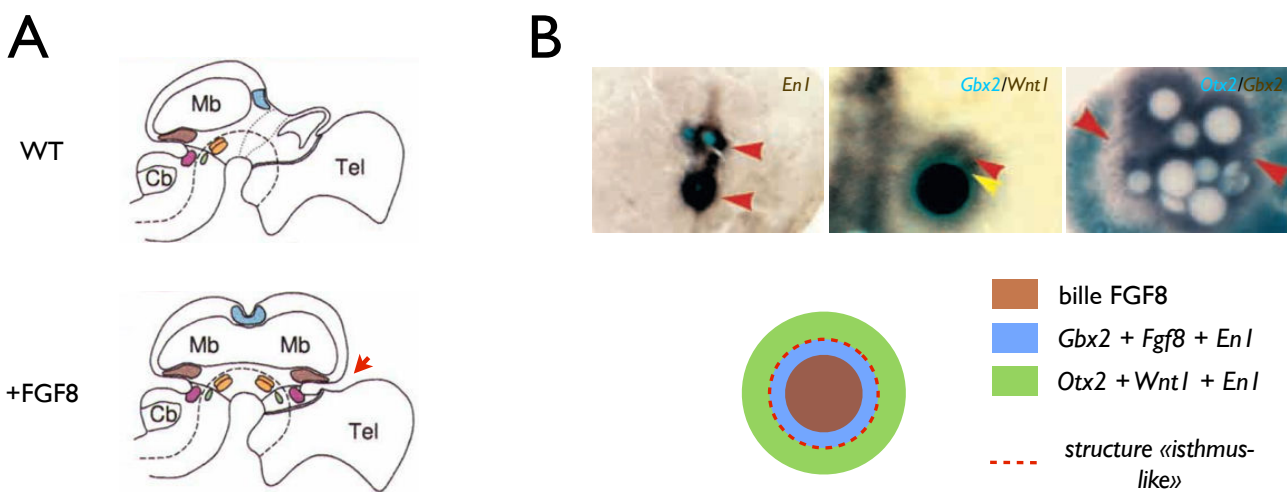
L'ensemble de ces gènes essentiels à la formation de l'IsO est activé de manière plus ou moins mutuellement indépendante au cours du développement normal ; l'expression des gènes *Pax* est observable dans des souris doubles mutantes pour les gènes *EN1/2* (*Liu et Joyner, 2001*). Leur induction pourrait être due à l'activité de la voie Notch (*Tossell et al., 2011*, cf Discussion I.1.3). Cependant, la MHB devient bientôt le théâtre d'un grand nombre d'interactions entre ses différents acteurs, qui sont nécessaires à son maintien. *Wnt1* est par exemple absolument essentiel à l'expression d'*En1* (*Joyner et al., 1996*) ; l'expression d'*En1* sous le contrôle du promoteur *Wnt1* est d'ailleurs suffisante pour restaurer un développement normal des mésencéphale et métencéphale (*Danielian et McMahon, 1996*). Cette régulation serait donc une des fonctions principales de *Wnt1* ; il est également capable d'activer *Fgf8* (*Lee et al., 1997*). Les gènes *Pax2* et *Pax5* activent eux aussi l'expression de *En1*, chez la souris comme chez le poisson-zèbre (*Joyner et al., 1996, Lun et Brand, 1998, Liu et Joyner 2001*). De leur côté, les gènes *En1/2* sont responsables de l'activation de *Pax2/5*, en coopération avec *Fgf8* (*Liu et Joyner, 2001*).

Il existe donc tout un réseau de régulation génétique entre les différents acteurs de la MHB, résumé en **Figure 29**. Il assure, par des interactions régulatrices mutuelles, le maintien de l'IsO à sa position correcte une fois ce dernier établi. D'autres acteurs importants de ce réseau ont été découverts chez le poisson-zèbre, comme les facteurs *pou2* (*Oct4* chez la souris, *Burgess et al., 2002, Reim et Brand, 2002*) et *iro5/7* (*Itoh et al., 2002, Glavic et al., 2002* pour son équivalent chez le Xénope) dont l'inactivation perturbe le développement du mésencéphale et du métencéphale ; cependant, dans le cas des facteurs *iro* (*Irx* chez la souris), leur rôle ne semble pas conservé chez les Mammifères (*Lebel et al., 2003*). La fonction principale des interactions génétiques ayant lieu au niveau de l'IsO semble être d'assurer le maintien de la structure et l'expression correcte de *Fgf8* : ce facteur de signalisation semble en effet être l'effecteur de l'IsO.

### II.1.1.3 Le signal *Fgf8* à la base des propriétés inductives de

l'organiseur isthmique

Le gène *Fgf8* code pour un facteur de signalisation capable, après liaison avec un de ses récepteurs, d'activer la voie ERK/MAPK et d'ainsi mener à des événements de régulation génétique. Il est exprimé au niveau de l'IsO, et semble être le signal responsable des capacités inductrices et polarisantes de cette structure. En effet, la simple application d'une bille enduite de FGF8 au niveau du diencephale récapitule l'effet d'une greffe d'IsO au même endroit, c'est-à-dire l'apparition d'un mésencéphale ectopique, polarisé par rapport à la bille, à la place du diencephale, et de structures isthmocérébelleuses au niveau de la zone d'application (**Figure 30A**, Crossley *et al.*, 1996, Martinez *et al.*, 1999). Le signal FGF8 est capable, chez le poulet comme chez la souris, de réguler la plupart des acteurs de l'IsO. Il peut réprimer *Otx2*, et activer *Gbx2*, *En1/2*, et *Pax5* ; il ne semble cependant pas avoir d'effet direct sur *Wnt1*, mais peut l'activer indirectement (Martinez *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 1999, Liu et Joyner 2001, Irving et



**Figure 30 : Le signal *Fgf8* confère ses propriétés inductrices à l'organiseur isthmique**

(A) Schéma de la morphologie de SNC de poulets en coupe sagittale. *En haut*, SNC de poulet sauvage. *En bas*, SNC de poulet après application d'une bille enduite de FGF8 (au niveau de la flèche rouge). Le diencephale se différencie en mésencéphale ectopique, à la polarisation symétrique au tectum normal, qui s'achève à l'extrémité antérieure par des structures isthmiques.

(B) Capacité du signal FGF8 à former un IsO ectopique. *En haut*, expression de différents gènes impliqués dans l'IsO autour de billes enduites de FGF8 appliquées sur des explants de mésencéphale murin. Comme exposé sur le schéma *en bas*, *En1* s'exprime dans une large zone autour des billes. *Gbx2* et *Fgf8* sont induits à proximité de la source du signal FGF8, et *Otx2* et *Wnt1* sont présents plus loin. Une région de type isthmique se met donc en place à courte distance des billes, à l'interface *Otx2/Gbx2*.

D'après Crossley *et al.*, 1996, Liu et Joyner, 2001

Mason 2000, Liu et al., 2003). De par ces capacités régulatrices, une source ectopique de *Fgf8* a qui plus est pour effet de former un IsO ectopique spatialement cohérent au niveau moléculaire. Les gènes métencéphaliques sont induits à proximité de la source, et les gènes mésencéphaliques un peu plus loin (**Figure 30B**, Martinez et al., 1999, Liu et al., 1999, Liu et Joyner 2001). Le gène *Fgf8* semble donc être l'effecteur principal de l'organisateur isthmique, capable à lui seul de recréer ses caractéristiques moléculaires et son effet inducteur.

Du fait de son importance, et à l'instar des autres acteurs de l'IsO, son inactivation a des conséquences désastreuses sur le développement du mésencéphale et du métencéphale. Des poissons-zèbres présentant la mutation *ace* (*acerebellar*), qui atteint le gène *fgf8*, ne développent ni mésencéphale ni métencéphale (Reifers et al., 1998). Les marqueurs de l'isthme apparaissent mais ne sont pas maintenus (Reifers et al., 1998), et des marqueurs du SNC antérieur, comme *Otx2*, viennent envahir et respécifier le métencéphale (Jaszai et al., 2003). De manière analogue, des souris KO pour *Fgf8* au niveau de la MHB (*En1-Cre ; Fgf8<sup>f/f</sup>*) ne forment pas de colliculi, ni de cervelet, et l'expression des marqueurs de l'IsO disparaît rapidement (Chi et al., 2003). Plus encore, il est requis de manière prolongée pour un développement normal du SNC, ce qu'une série d'expériences sur des embryons murins mutants inductibles pour *Fgf8* a permis de prouver (Sato et Joyner, 2009). L'induction précoce (à E8,5) de la mutation abolit le développement du cervelet et des colliculi de ces embryons. Le cervelet d'animaux dont la mutation est induite plus tardivement (à E9,5) se développe par contre normalement, tandis que le défaut de développement des colliculi est maintenu. Une mutation induite encore plus tardivement restaure le colliculus supérieur mais pas l'inférieur. Les tissus les plus proches de l'isthme nécessitent donc une stimulation prolongée par le signal FGF8 pour un développement normal. Ces résultats viennent renforcer l'importance de *Fgf8* dans le maintien et la fonction de l'organisateur isthmique.

La dernière étude mentionnée montre que tous les tissus ne répondent pas de la même manière au signal FGF8 envoyé par l'IsO. En particulier, métencéphale et mésencéphale n'ont pas la même dynamique de réponse. Le mode d'action de *Fgf8* est en fait tripartite, et dépend fortement de ses isoformes.

Au niveau de la MHB, *Fgf8* est en effet présent sous deux formes, *Fgf8a* et *Fgf8b*, dont les modes d'action diffèrent fortement. L'isoforme *Fgf8a*, en coopération avec *Fgf17*

et *Fgf18* (deux autres signaux FGF activés par *Fgf8* au niveau de la MHB), est capable d'induire les marqueurs du mésencéphale (*Liu et al., 2003*). C'est un puissant mitogène (*Lee et al., 1997*) au rôle instructif et polarisant ; en fonction de la distance des cellules du mésencéphale à la MHB, source de *Fgf8a*, différents ensembles de gènes vont être activés, à des niveaux plus ou moins forts (*Chen et al., 2009*). Le gradient de concentration de *Fgf8a*, qui diminue lorsque la distance à la MHB augmente, permet donc la mise en place de gradients d'expression génétique et ainsi la polarisation du mésencéphale.

L'isoforme *Fgf8b*, au contraire, réprime les gènes mésencéphaliques et permet l'expression des marqueurs métencéphaliques (*Liu et al., 2003*), et ce même de façon ectopique : l'expression de *Fgf8b* dans le mésencéphale est suffisante pour y installer un tissu de type métencéphale (*Liu et al., 1999*). Des expériences chez le poisson-zèbre suggèrent que son rôle serait en fait principalement permissif. Alors que le métencéphale antérieur de poissons uniquement KO pour *fgf8* ne forme pas de cervelet et devient positif pour l'expression d'*Otx2*, comme mentionné plus haut (*Jaszai et al., 2003*), le cervelet de poissons-zèbres KO pour *fgf8* et déficients en *Otx2* se développe normalement (*Foucher et al., 2006*). Le signal *fgf8* n'est donc pas requis pour induire le programme développemental du cervelet. La sous-partie 1.2.2.3. a montré qu'*Otx2* assurait un développement mésencéphalique aux dépens d'un programme métencéphalique. Dans le métencéphale, *Fgf8* (via son isoforme *Fgf8b*) serait ainsi principalement nécessaire pour réprimer les acteurs du développement mésencéphalique.

Enfin, *Fgf8* est également responsable du cantonnement des gènes *Hox* au côté postérieur du métencéphale. Il est capable de réprimer *Hoxa2* directement ; par ailleurs, le métencéphale antérieur d'un poulet est capable d'exprimer les gènes *Hox* appropriés lorsque greffé en position postérieure (*Irving et Mason, 2000*).

Ainsi, en induisant le mésencéphale d'une part, et en réprimant les gènes du mésencéphale et du métencéphale postérieur pour permettre le développement du métencéphale antérieur, les différents isoformes de *Fgf8* assurent la régionalisation correcte du SNC : ils fournissent à l'IsO ses capacités organisatrices.

## II.1.2 Une restriction des lignages cellulaires de part et d'autre de l'organisateur

En plus de sa capacité à induire les tissus adjacents, l'IsO présente la particularité de restreindre les mouvements cellulaires entre mésencéphale et métencéphale. Chez la souris comme chez le poisson-zèbre, il existe en effet une frontière dorsale de restriction des lignages cellulaires à la limite entre ces deux régions, qui empêche la traversée des cellules d'un territoire ainsi que de leurs descendantes. L'étude de souris *Wnt1-CreERT<sup>T</sup>;R26R*, dans lesquelles une injection de tamoxifène active l'expression du rapporteur *LacZ* dans toutes les cellules exprimant *Wnt1* au moment de l'injection, ainsi que dans leur descendance, a été menée par l'équipe du Pr Joyner. Elle a permis de révéler qu'à partir de E9.5 les cellules d'origine mésencéphalique (*Wnt1*-positives) n'étaient jamais retrouvées dans le métencéphale au niveau dorsal (*Zervas et al., 2004*). Chez le poisson-zèbre, une conclusion similaire a été tirée du suivi *in vivo* des mouvements cellulaires au niveau de la MHB d'embryons de 5 à 24 somites : les cellules du mésencéphale ou du métencéphale ne changent jamais de compartiment, et ont plutôt tendance à s'éloigner de la MHB au sein de leur territoire (*Langenberg et Brand, 2005*). Il semble donc bien que la MHB marque une frontière entre deux compartiments cellulaires aux échanges cellulaires inexistantes.

La précocité de cette compartimentation est encore peu claire ; elle semble cependant s'installer très rapidement, de façon concomitante avec les premiers acteurs de la MHB. L'étude du lignage cellulaire du territoire positif pour *Gbx2* suggère en effet qu'à partir de E7.5/E8 déjà les cellules du métencéphale ne peuvent plus traverser la MHB (*Sunmonu et al., 2011*) ; il reste encore à confirmer que cette restriction mésencéphale/métencéphale est mutuelle. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la ségrégation cellulaire entre mésencéphale et métencéphale sont également encore à explorer ; on sait simplement que c'est un processus d'abord dépendant de *Gbx2*, puis de *Fgf8* (*Sunmonu et al., 2011*).

En sus de ses propriétés organisatrices, *Fgf8* est donc responsable de la compartimentation, et donc des tailles relatives, du mésencéphale et du métencéphale. Le premier se mettra en place en position antérieure par rapport au signal FGF8, tandis que le second s'y formera postérieurement. Un positionnement correct de ce signal est

donc absolument nécessaire au développement correct du SNC : l'expression antériorisée de *Fgf8* (sous le contrôle d'un promoteur *Wnt1*) abolit par exemple la formation du mésencéphale (*Liu et al., 1999*). Or l'homéogène *Otx2* joue, avec *Gbx2*, un rôle essentiel dans le positionnement de l'IsO, et donc du signal FGF8.

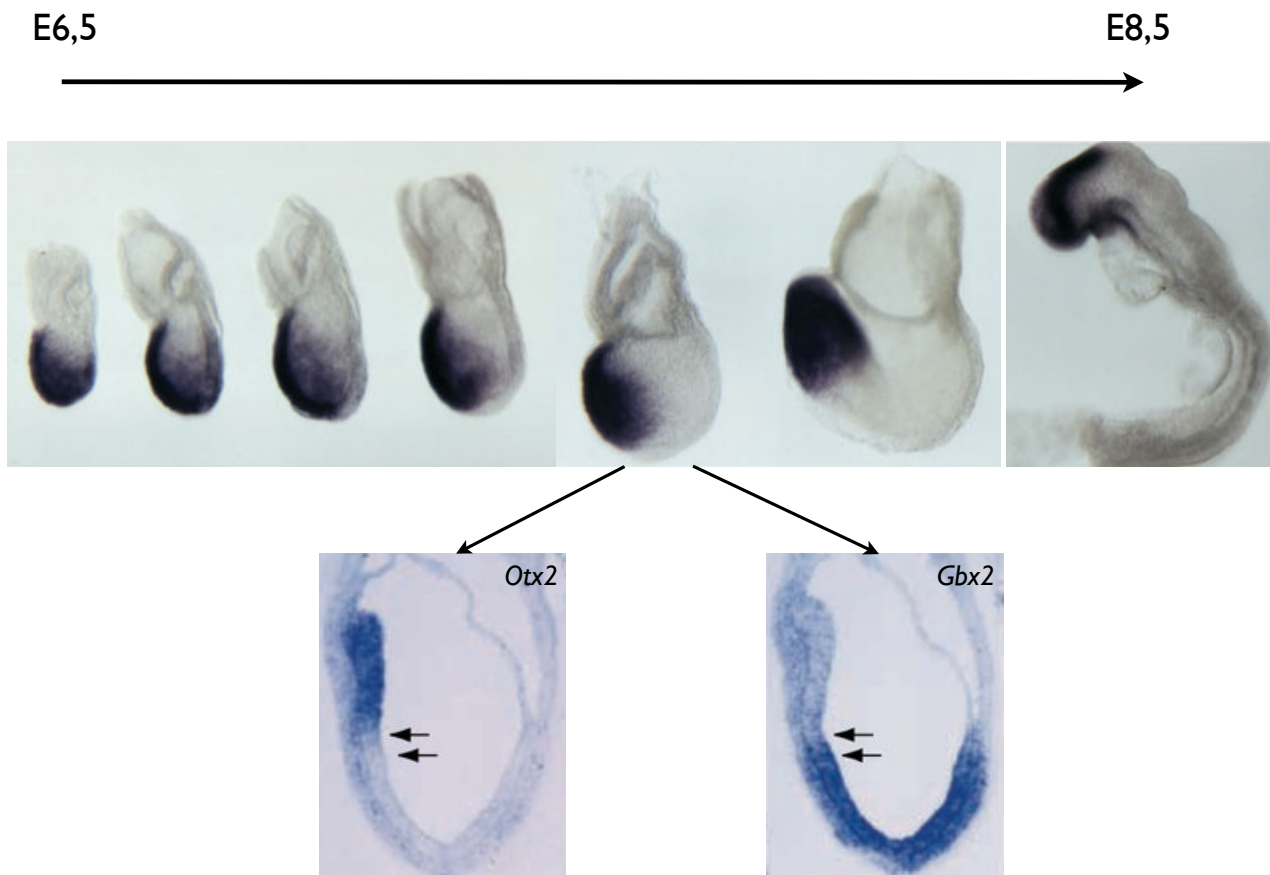
## II.2 Rôle d'*Otx2* dans la mise en place de l'organisateur

### II.2.1 La limite postérieure d'expression d'*Otx2* détermine la position de l'IsO

#### II.2.1.1. Opposition *Otx2*/*Gbx2*

Au cours du développement embryonnaire précoce, *Otx2* est initialement exprimé dans l'intégralité de l'épiblaste, avant de voir son expression progressivement restreinte au pôle antérieur de l'embryon (**Figure 12, Figure 31, Ang et al., 1994**). Sa frontière postérieure d'expression marque alors très exactement la MHB (**Figure 29, Figure 31, Millet et al., 1996**). Qui plus est, le tissu épiblastique alors dépourvu d'*Otx2* voit l'apparition de l'expression d'un autre gène, le facteur de transcription *Gbx2* (**Figure 29, Figure 31, Wassarman et al., 1997**), qui marque par conséquent la partie postérieure de la MHB.

Les frontières d'expression des deux homéogènes coïncident parfaitement au niveau de la future constriction isthmique, et l'étude des mutants de la famille *Otx2* ainsi que du mutant *Gbx2* chez la souris a permis de suggérer que ces gènes jouaient un rôle dans le positionnement de l'IsO. Dans des chimères KO pour *Otx2* au niveau du neurectoderme, les marqueurs de la MHB sont quasiment absents, exprimés pour certains d'entre eux comme *Pax2* à l'extrémité antérieure de l'embryon (*Rhinn et al., 1998*). L'équipe d'Antonio Simeone a de son côté mené l'étude de divers mutants de la famille *Otx*. Contrairement aux autres combinaisons non-létales possibles (*Otx1<sup>+/-</sup>;Otx2<sup>+/-</sup>*, *Otx1<sup>-/-</sup>;Otx2<sup>+/+</sup>*, *Otx1<sup>+/+</sup>;Otx2<sup>+/-</sup>*), des souris dans lesquels trois des allèles des gènes de la famille sont mutés (*Otx1<sup>-/-</sup>;Otx2<sup>+/-</sup>*, ou *Otx1<sup>Cre/+</sup>;Otx2<sup>lox/lox</sup>*) ne développent pas de mésencéphale, et présentent une expression antériorisée de tous les marqueurs de la MHB, dont *Gbx2* (**Figure 32, Acampora et al., 1997, Puellas et al., 2003**). Dans d'autres lignées murines, le même phénotype peut déjà être observé dans des souris *Otx1<sup>+/-</sup>;Otx2<sup>+/-</sup>* (*Suda et al., 1997, Puellas et al., 2003*), et l'ablation des quatre copies



**Figure 31 : Antériorisation de l'expression d'*Otx2* et établissement de la frontière *Otx2/Gbx2***

*En haut*, expression d'*Otx2* dans l'embryon de souris de E6,5 à E8,5. Initialement exprimé dans l'intégralité de l'épiblaste, *Otx2* est rapidement restreint au pôle antérieur de l'embryon, et sa frontière postérieure d'expression marque la MHB à E8,5

*En bas*, comparaison de l'expression d'*Otx2* et de *Gbx2* à E7,5 sur des coupes sagittales de gastrula. Les zones d'expression des deux homogènes sont complémentaires, et leur frontière commune s'établit au niveau de la future MHB. Les flèches marquent l'étendue de la zone *Gbx2*<sup>+</sup> négative pour *Hoxb1*, qui donnera le métencéphale antérieur.

D'après Ang *et al.*, 1994, Wassarman *et al.*, 1997

d'*Otx1/2* dans le SNC en développement a des conséquences encore plus drastiques ; le diencephale ne se développe en effet pas non plus dans ces animaux (Kurokawa *et al.*, 2010). L'ensemble de ces données conduit à supposer qu'une dose minimale d'*Otx2* est nécessaire pour correctement positionner l'organisateur isthmique à la frontière du mésencéphale et du métencéphale.

A l'inverse, les rhombomères 1,2 et 3 (cervelet compris) ne se forment pas dans des embryons mutants pour *Gbx2*, et les marqueurs *En2*, *Otx2* et *Wnt1* sont exprimés dans une région bien plus postérieure que dans des embryons sauvages. *Fgf8* est également exprimé postérieurement mais de manière réduite (Figure 32, Wassarman *et al.*, 1997, Millet *et al.*, 1999). La présence de *Gbx2*, elle aussi, est donc nécessaire à la mise en place de l'IsO à la position correcte.

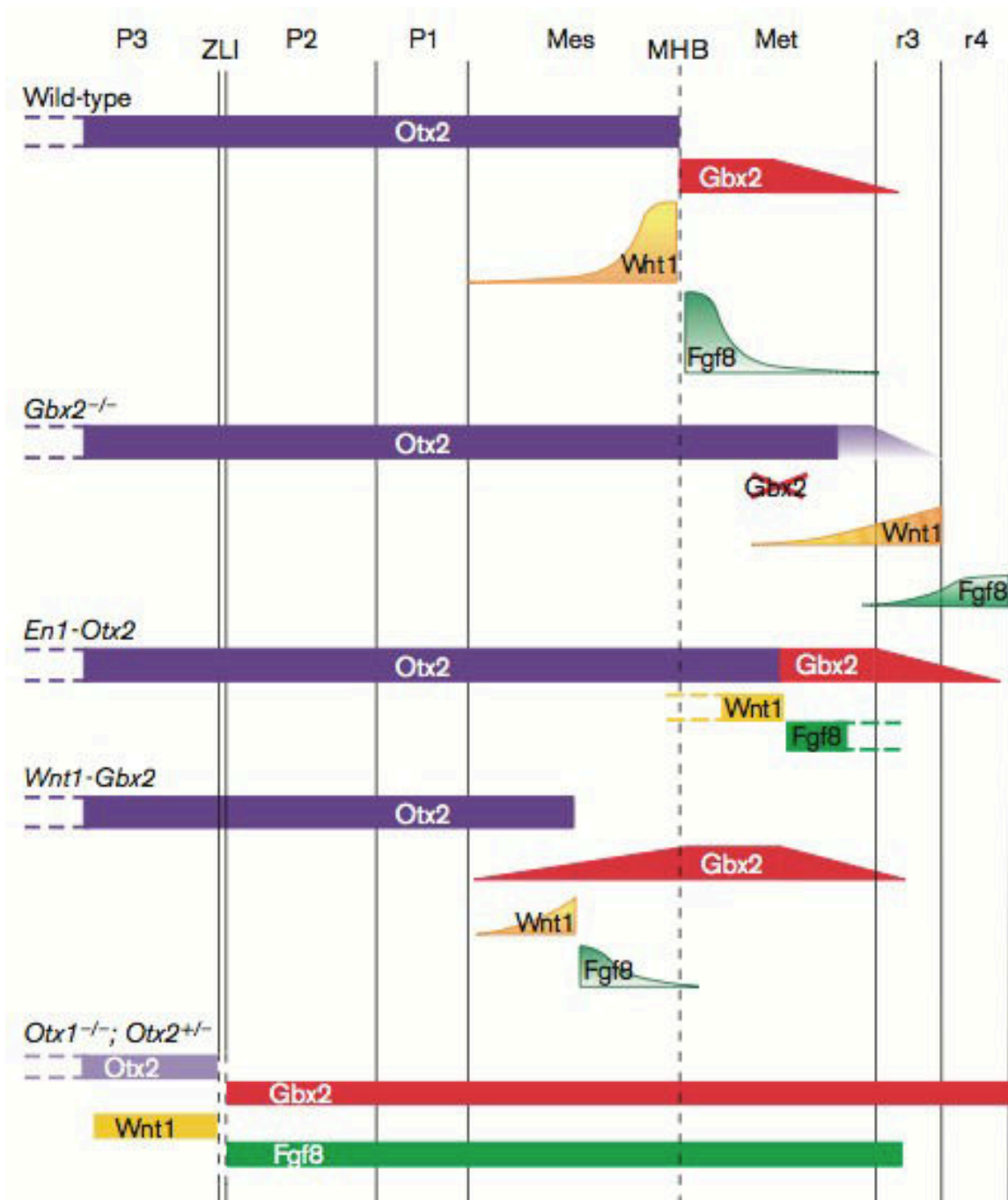
Deux études menées en 1999 sont venues compléter ces observations. L'étude de souris dans lesquels *Otx2* était exprimé sous le contrôle du promoteur *En1* dans une zone englobant le mésencéphale, la MHB et une partie du métencéphale antérieur, a révélé des anomalies morphologiques. Les colliculi des animaux mutants étaient plus grands et positionnés de façon plus postérieure, tandis que seuls les lobes postérieurs de leur cervelet persistaient (*Broccoli et al., 1999*). Une analyse moléculaire a pu montrer que dans ces animaux, l'expression de *Gbx2* et de *Fgf8* était réprimée dans la zone d'expression ectopique d'*Otx2*, et que tous les acteurs de la MHB étaient alors exprimés à la nouvelle frontière postérieure d'*Otx2* (**Figure 32**, *Broccoli et al., 1999*) ; les marqueurs mésencéphaliques de l'IsO étaient exprimés du côté *Otx2*<sup>+</sup>, tandis que les marqueurs métencéphaliques étaient coexprimés avec *Gbx2*.

Une analyse complémentaire a été menée sur un autre type de souris mutantes. Dans ces animaux, *Gbx2* était exprimé dans le mésencéphale postérieur sous le contrôle d'enhancers de *Wnt1* ; de manière analogue, *Otx2* était alors réprimé dans la nouvelle zone d'expression de *Gbx2*, et tous les gènes impliqués dans le fonctionnement de l'IsO étaient déplacés antérieurement (**Figure 32**, *Millet et al., 1999*). *Gbx2* est en particulier capable d'activer l'expression de *Fgf8*.

Quel que soit le modèle génétique employé, l'organisateur isthmique se met par conséquent en place au niveau de la frontière d'expression entre *Otx2* et *Gbx2* (**Figure 32**), et ces deux gènes sont capables de se réprimer mutuellement afin d'assurer le positionnement correct de la MHB. Le mécanisme selon lequel *Gbx2* réprime *Otx2* est maintenant connu : il se fixe sur un site TAATTA situé dans l'enhancer FM responsable de l'expression d'*Otx2* dans le neurectoderme antérieur (*Inoue et al., 2012*). Par ailleurs, l'un comme l'autre sont capables d'interagir avec le corépresseur *Tle4* au niveau de la MHB, ce qui leur permettrait d'assurer leur répression mutuelle (*Heimbucher et al., 2006*).

Même si la mise en contact d'un tissu *Otx2*<sup>+</sup> et d'un tissu *Gbx2*<sup>+</sup> est suffisante pour la mise en place d'une structure de type isthmique (*Hidalgo-Sanchez et al., 1999, Irving et Mason, 1999*), ni *Otx2* ni *Gbx2* ne semblent nécessaires à l'activation des gènes de l'IsO. En effet, ces derniers s'expriment dans des animaux double mutants pour *Otx2* et *Gbx2* (*Li et Joyner, 2001, Martinez-Barbera et al., 2001, Su et al., 2014*). Leur expression ne se régionalise par contre jamais et reste uniforme à travers le mésencéphale et le métencéphale. En plus de son positionnement, *Otx2* et *Gbx2* assurent ainsi par leur





**Figure 32 : La frontière d'expression *Otx2/Gbx2* détermine la position de l'isthme**

Schémas des zones d'expression d'*Otx2*, *Gbx2*, *Wnt1* et *Fgf8* (utilisé ici comme marqueur de l'isthme) dans différents modèles génétiques murins, indiqués à chaque fois à gauche. L'expression de *Fgf8* (et celle, complémentaire, de *Wnt1*) se met à chaque fois en place à la frontière d'expression *Otx2/Gbx2*.

*Mes* : mésencéphale, *Met* : métencéphale, *MHB* : frontière mésencéphale/métencéphale (*Midbrain-Hindbrain Boundary*), *P1/2/3* : prosomères 1/2/3, *r3/4* : rhombomères 3/4, *ZLI* : *zona limitans intrathalamica*

D'après Joyner et al., 2000

répression mutuelle l'organisation spatiale correcte de la MHB au niveau de leur frontière d'expression commune.

#### II.2.1.2 Un mécanisme évolutivement conservé ?

Le positionnement de l'organisateur isthmique par l'interaction entre *Otx2* et *Gbx2* a semble fonctionner de la même façon chez tous les organismes modèles étudiés. Les mécanismes moléculaires disséqués chez la souris et le poisson-zèbre se retrouvent chez le poulet (*Katahira et al., 2000*) comme chez le Xénope (*Tour et al., 2002a, 2002b*), bien que la répression de *Xgbx2* par *XOtx2* semble dose-dépendante dans ce dernier modèle. Le mécanisme de mise en place de l'IsO serait donc très conservé chez les Vertébrés. Mais de façon plus large, une frontière d'expression commune entre les orthologues d'*Otx2* et de *Gbx2* est présente dans le système nerveux antérieur de la plupart des Bilatériens (**Figure 2**, revue dans *Holland et al., 2013*). Il est donc possible que la portée du processus de répression mutuelle entre *Otx2* et *Gbx2* soit en fait encore plus grande.

Ce processus prend même par ailleurs place au cours de la mise en place d'autres organes ! Au cours du développement, la vésicule otique et future oreille interne est le théâtre de l'expression d'un réseau génétique assez semblable à celui de l'IsO : les gènes *Otx2* et *Gbx2* sont exprimés dans deux territoires complémentaires au sein d'une zone positive pour *Pax2*. *Fgf8* se met ensuite en place au niveau de leur frontière commune (*Hidalgo-Sanchez et al., 2000, Sanchez-Calderon et al., 2002, 2004*). Ce réseau fonctionne qui plus est de la même manière : l'étude de l'oreille interne de mutants *Gbx2*<sup>-/-</sup> révèle une étendue de la zone d'expression d'*Otx2* (*Lin et al., 2005*). Le même réseau de régulation que celui utilisé au niveau de l'IsO pourrait donc servir au développement de l'oreille interne. La répression mutuelle entre *Otx2* et *Gbx2* est également utilisée pour régionaliser le territoire pré-placodale du Xénope (*Steventon et al., 2012*) ; elle serait donc un mécanisme fortement conservé au cours de l'évolution, potentiellement capable de recruter tout un réseau régulateur au service de la régionalisation d'un territoire embryonnaire. Il serait intéressant de voir si elle est également à l'oeuvre dans d'autres zones de juxtaposition entre *Otx2* et *Gbx2*, par exemple au niveau du thalamus en développement.

## II.2.2 Les causes de l'antériorisation d'*Otx2*

La frontière d'expression entre *Gbx2* et *Otx2* se met en place suite à l'antériorisation de l'expression d'*Otx2* entre E7 et E7,5 (**Figure 31**). Cette antériorisation semble au commencement indépendante de l'action de *Gbx2* ; elle a en effet correctement lieu dans les embryons *Gbx2*<sup>-/-</sup> (*Li et Joyner, 2001*). L'apparition de *Gbx2*, et son positionnement initial approprié, est également indépendante d'*Otx2* puisqu'on peut l'observer dans des épiblastes négatifs pour *Otx2* (*Acampora et al., 1998a*).

Chez le zebrafish, c'est un signal *wnt8* émis par la marge du blastoderme qui est responsable de la restriction d'*Otx2* au pôle antérieur de l'embryon (*Rhinn et al., 2005*). Ce signal est au moins en partie direct, mais il est également médié par *gbx1* (*Rhinn et al., 2009*) ; l'injection d'ARN *gbx1* est en effet capable de restaurer un phénotype quasi-normal dans des embryons de poisson-zèbre déficients pour *wnt8* (*Rhinn et al., 2009*). L'existence d'un processus identique n'a pas été avéré chez la souris, mais il est possible qu'un signal *Wnt* y régule également *Otx2* pour l'antérioriser à la MHB. Il pourrait également régler *Gbx2* : un signal *Wnt* est déjà responsable de l'expression de *Xgbx2* dans les cellules de la crête neurale de Xénope (*Li et al., 2009*).

Une autre source de signalisation serait également capable d'assurer l'antériorisation d'*Otx2* et l'expression initiale de *Gbx2* à la MHB. L'acide rétinoïque (RA, **Retinoic Acid**) est en effet capable d'induire l'expression de *Gbx2*, ce qui a d'ailleurs mené à la découverte de ce dernier en 1995 (*Bouillet et al., 1995*). Le RA est par ailleurs capable de réprimer *Otx2* et de le cantonner à l'extrémité antérieure de l'embryon (*Ang et al., 1994*), selon un mécanisme dépendant de *Gbx2* (*Li et Joyner, 2001*) ; bien que son action soit surtout connue au niveau des rhombomères, il pourrait également agir comme facteur postériorisant au niveau du futur isthme. Si les mutants de synthèse de l'acide rétinoïque *Raldh2*<sup>-/-</sup> et *Rdh10*<sup>-/-</sup> n'ont pas de conséquence sur l'expression isthmique d'*Otx2* ou de *Gbx2* (*Niederreither et al., 2000, Grandel et al., 2002, Sandell et al., 2007, Rhinn et al. 2011*), les doubles mutants *Raldh2*<sup>-/-</sup>;*Raldh3*<sup>-/-</sup> ont une expression légèrement postériorisée d'*Otx2* (*Halilagic et al., 2007*). Cette postériorisation est encore plus visible dans des embryons de poulet déficients en vitamine A, dans lequel la synthèse d'acide rétinoïque est gravement affectée (*Halilagic et al., 2003*). La signalisation RA est donc potentiellement capable d'agir sur le positionnement de la frontière commune de *Gbx2* et *Otx2*.

Ainsi, le contrôle de l'antériorisation d'*Otx2* et l'induction de *Gbx2* pourraient être sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation.

### II.3. Conclusion

La régulation spatio-temporelle de l'expression d'*Otx2* est par conséquent d'une importance majeure pour le développement correct du SNC. La position de sa frontière postérieure d'expression à la fin de la gastrulation définira en effet l'emplacement de l'organisateur isthmique, et par extension la taille des futurs territoires mésencéphaliques et métencéphaliques. Cette position est rapidement régulée de façon étroite par l'action de *Gbx2*, mais elle s'installe en réponse à un signal indépendant de cet homéogène. Or, la relation entre ces deux événements n'est pas encore bien connue : la répression d'*Otx2* dans l'épiblaste postérieur est-elle essentielle à l'expression de *Gbx2*, ou, à l'instar des autres acteurs de l'organisateur isthmique, les dynamiques initiales d'expression de ces deux homéogènes sont-elles largement indépendantes l'une de l'autre ? Dans le second cas, on peut alors se demander quelle est la taille maximale de la zone de compétence au sein de laquelle l'opposition entre *Otx2* et *Gbx2* peut ensuite prendre place pour former un isthme correct. Il serait également intéressant de savoir si le processus développemental de mise en place de l'organisateur isthmique prend le pas sur d'autres. Le premier chapitre de résultats de cette thèse exposera les résultats obtenus grâce à l'utilisation d'un modèle murin dans lequel l'antériorisation d'*Otx2* est abolie au cours de la gastrulation, développé au laboratoire pour répondre à ces questions.

Si la régulation spatio-temporelle d'*Otx2* pourrait permettre d'expliquer l'intégration de ses différents rôles au sein d'un développement cohérent, et de mieux comprendre ses interactions avec d'autres facteurs de transcription, elle n'explique toutefois pas pourquoi *Otx2* peut avoir des effets différents lorsqu'il est exprimé de façon concomitante dans des tissus distincts. Dans ce cas, la modulation de l'activité du facteur *Otx2* est certainement assurée par le contexte cellulaire. La rétine de souris adulte est un bon modèle pour étudier ce phénomène. *Otx2* y est en effet exprimé dans deux tissus en étroit contact l'un avec l'autre, bien établis et moins dynamiques que des tissus embryonnaires, dans lesquels sa fonction et son importance varient fortement. La partie suivante de cette introduction étudiera d'abord la structure de la rétine adulte, en y précisant les zones d'expression d'*Otx2*, pour ensuite s'intéresser aux rôles de ce gène dans le

développement ainsi et surtout que dans le maintien de la rétine. Elle donnera enfin un aperçu de l'état des connaissances dans les axes de recherche que nous nous proposons d'aborder pour expliquer ces rôles.

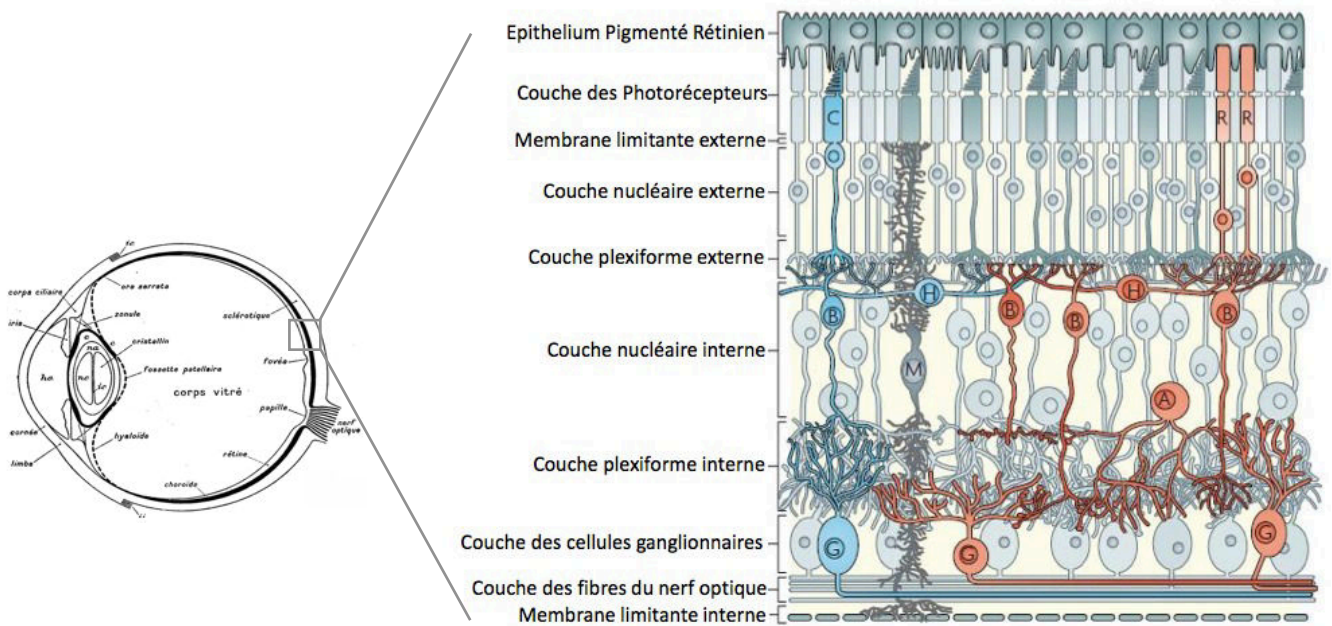
### III. Un rôle majeur d'*Otx2* dans le développement et l'entretien de la rétine de souris

L'expression de la famille *Otx* au niveau de l'organe visuel est particulièrement conservée au cours de l'évolution (cf. partie I.1.1.3). Chez la souris, les gènes *Otx2* et *Crx* sont tous deux exprimés au niveau de la rétine adulte, et les trois membres de la famille sont présents dans l'organe en développement. Qui plus est, leur expression persiste à l'âge adulte, à la différence de beaucoup de territoires au sein desquels ils jouent un rôle durant le développement. Cette partie de l'introduction aura pour but de décrire les diverses fonctions qu'*Otx2* (éventuellement en coopération avec *Crx*) assure au sein de la rétine de souris. On constatera qu'en plus d'être essentiel au développement correct de cette structure, *Otx2* garantit son intégrité à l'âge adulte.

#### III.1. Structure de la rétine de souris adulte

##### III.1.1 Anatomie

Tapissant le fond de l'oeil entre l'humeur vitrée et la choroïde (**Figure 33**), la rétine est un tissu stratifié qui assure d'une part la transformation de signaux lumineux en activité électrique interprétable par le système nerveux, et permet d'autre part un premier traitement de l'information visuelle avant de la transmettre au cerveau. Elle est ainsi responsable des processus initiaux de la vision. Elle comporte deux couches distinctes qui sont la rétine pigmentée et la rétine neurale (**Figure 33**). La rétine pigmentée (ou RPE, *retinal pigmented epithelium*) consiste en une monocouche épithéliale accolée à la choroïde. La rétine neurale (ou NR, *neurorétine*) comporte cinq types de neurones différents (les photorécepteurs, les cellules bipolaires, les cellules horizontales, les cellules ganglionnaires et les cellules amacrines) ainsi que des cellules gliales appelées cellules de Müller ; à l'instar d'autres structures du système nerveux central, elle peut à son tour être subdivisée en couches superposées en fonction des structures subcellulaires observables. Les segments externes des photorécepteurs, assurant la transduction du



**Figure 33 : Structure cellulaire de la rétine de Vertébré**

Les différentes couches de la rétine sont représentées avec les types cellulaires qui les composent. Les photons lumineux entrent dans la rétine au niveau de la membrane limitante interne (*en bas*), et vont exciter les photorécepteurs au fond de l'oeil (*en haut*). 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).

D'après Swaroop et al., 2010

signal lumineux (cf. III.1.2.) sont situés du côté distal et intimement associés aux cellules de la rétine pigmentée. De façon immédiatement proximale, les noyaux de ces mêmes photorécepteurs, tous présents au même niveau, forment la couche nucléaire externe (ONL, *outer nuclear layer*). La couche nucléaire interne (INL, *inner nuclear layer*), qui contient les noyaux des cellules bipolaires, horizontales et amacrines, est séparée de l'ONL par la couche plexiforme externe, où ont lieu les contacts synaptiques entre les prolongements des cellules de l'INL et de l'ONL. De manière analogue, la couche de noyaux la plus proximale, celle des cellules ganglionnaires, forme des synapses avec l'INL au sein de la couche plexiforme interne. Enfin, les longs axones des cellules ganglionnaires convergent dans la couche des fibres optiques pour aller par la suite former le nerf optique (**Figure 33**, Purves et al., 2004). La lumière en provenance de l'extérieur traverse ainsi l'intégralité de la rétine neurale pour aller frapper les segments externes des photorécepteurs.

Cette structure somme toute assez simple, très bien décrite et facilement accessible s'est prêtée à un grand nombre d'études fonctionnelles, et le rôle général de

chacun de ses éléments est à présent bien connu, ce que la sous-partie suivante s'attachera à montrer.

### III.1.2 Fonctions des différents types cellulaires

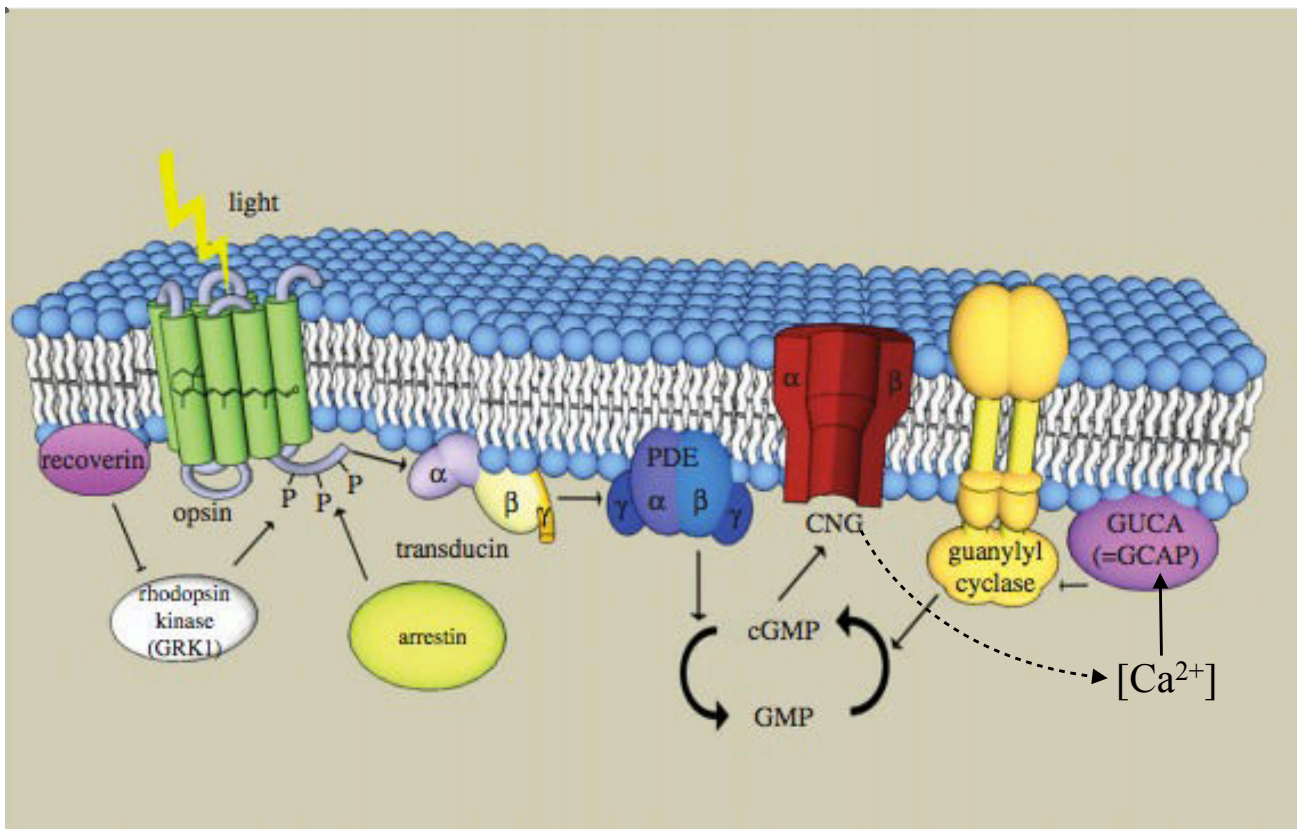
#### III.1.2.1. Les photorécepteurs, sièges de la phototransduction

Il existe deux types de photorécepteurs (PR) dans la rétine, les cônes et les bâtonnets, qui partagent une structure cellulaire très spécialisée. Ils sont tous deux composés d'un segment interne, composé du noyau et des prolongements cellulaires qui iront former des synapses avec le reste de la NR, et d'un segment externe. Cette structure ciliée photosensible leur confère leur capacité la plus remarquable, la faculté de transformer un signal lumineux en activité électrique et en message nerveux : c'est la phototransduction.

On compte environ 20 bâtonnets pour un cône dans une rétine murine (*Masland, 2001*), et les mécanismes moléculaires de la phototransduction ont donc principalement été étudiés à partir de ce sous-type de photorécepteur. Le principe est néanmoins le même pour les cônes, et a pour point de départ un pigment visuel, membre de la famille des opsines. Cette protéine est associée à l'état normal au *11-cis-rétinal*, et située au niveau des disques des segments externes. Au repos, un photorécepteur libère en permanence du glutamate. Lorsqu'un photon vient frapper un pigment visuel, il lui transmet son énergie vibratoire et conduit au changement de configuration du rétinol, qui passe sous la forme *tout-trans*, et déclenche ainsi un ensemble de modifications de la conformation du pigment visuel. Le pigment peut alors activer une protéine G, la transducine, qui active à son tour une phosphodiesterase. Cette dernière va hydrolyser la GMPc en GMP, et ainsi abaisser la concentration de GMPc intracellulaire. Une partie des canaux sodiques activés par la GMPc vont alors se fermer et conduire à l'hyperpolarisation de la membrane ; en conséquence de quoi, la libération de glutamate par le photorécepteur va diminuer (**Figure 34**). Ainsi, par phototransduction, les cônes et les bâtonnets peuvent modifier leur activité électrique et leur transmission synaptique en

réponse à un signal lumineux. La grande force de ce système est sa capacité d'amplification : au sein d'un bâtonnet, un seul pigment visuel stimulé peut activer 800 molécules de transducine qui mèneront chacune à l'hydrolyse de six molécules de GMPc. On estime ainsi qu'un seul photon peut mener à la fermeture de 2% des canaux sodiques d'un bâtonnet (*Purves et al., 2004*).

Comment les photorécepteurs arrêtent-ils de répondre au signal lumineux ? Autrement dit, comment reviennent-ils à leur potentiel de repos ? Les canaux sodiques affectés par la concentration interne en GMPc sont également perméables au calcium ; leur fermeture entraîne donc une diminution de la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$ . Cette dernière mène à son tour à l'activation de la guanylyl cyclase qui rétablit la concentration intracellulaire à GMPc, menant ainsi à l'extinction du message (**Figure 34**). L'activité spécifique du pigment visuel est interrompue par plusieurs protéines dont l'arrestine ; il se dissocie ensuite du rétinol.



**Figure 34 : Mécanismes moléculaires de la phototransduction dans les photorécepteurs**

Par souci de simplicité, et pour être représentatif de l'état ancestral commun aux cônes et bâtonnets, tous les composants interagissent au niveau de la même bicouche lipidique. *PDE* : phosphodiésterase 6, *CNG* : cyclic nucleotide ion channel, *GUCA/GCAP* : protéine activatrice de la guanylyl cyclase (*guanylyl cyclase activating protein*).



Bien que cette cascade de transduction soit commune à tous les PR, les cônes et les bâtonnets présentent cependant une spécialisation fonctionnelle, attribuable en grande partie au pigment visuel qu'ils expriment. Les bâtonnets expriment la rhodopsine, et leur capacité d'amplification du signal a déjà été abordée : ils sont capables de fonctionner à des niveaux d'éclairement très bas, auxquels ils assurent la vision scotopique. Les cônes, qui expriment des opsines, sont approximativement cent fois moins sensibles aux stimuli lumineux : ils assurent la vision photopique aux hauts niveaux d'éclairement. Par ailleurs, deux types d'opsine existent chez la souris, sensibles à des photons de longueurs d'onde différentes (c'est-à-dire de «couleur» différente). Selon celles qu'ils expriment, les cônes réagiront plus facilement à une longueur d'ondes données ; ils sont donc responsables de la vision en couleur.

Les photorécepteurs permettent donc la transformation des informations lumineuses en un message compréhensible par le système nerveux central. Cependant, la spécialisation extrême qu'entraîne leur fonction les empêche d'assurer l'homéostasie du milieu et le recyclage des composants nécessaires à leur fonction : c'est le rôle du RPE.

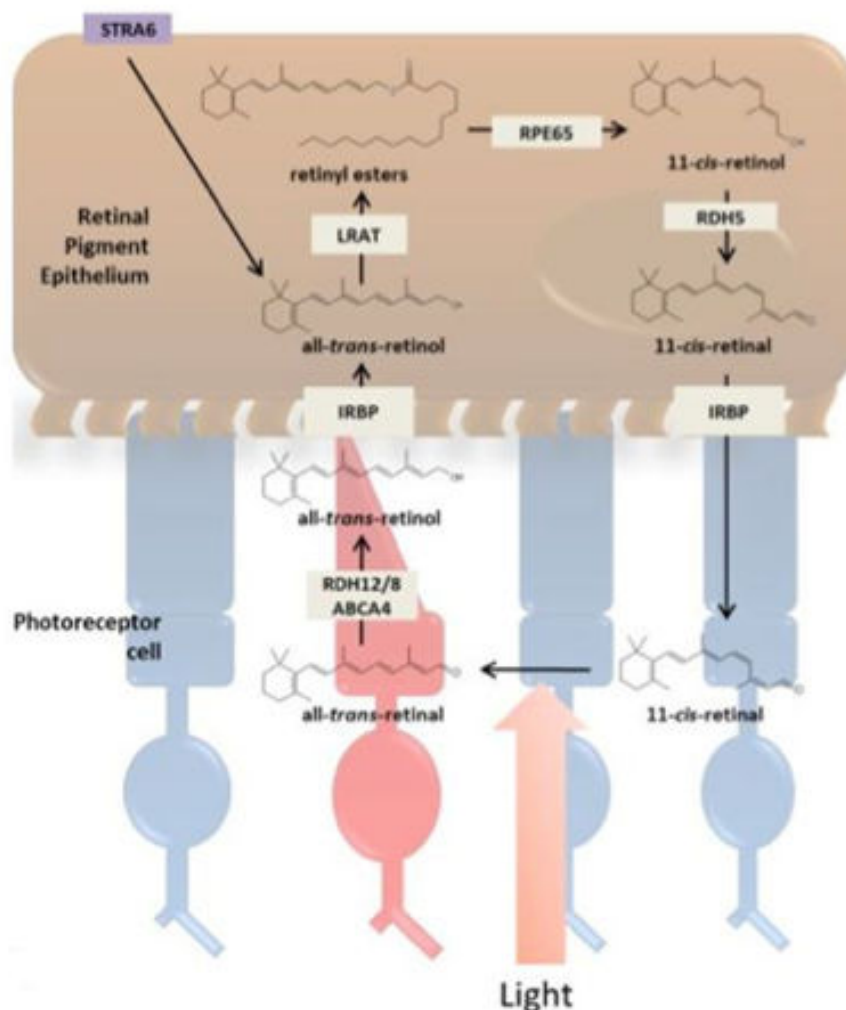
#### III.1.2.2. Le RPE, auxiliaire essentiel des photorécepteurs

Étroitement associées aux segments externes des photorécepteurs à leur pôle apical, les cellules du RPE ont pour rôle essentiel d'assurer le fonctionnement correct et continu de ces derniers. Elles y parviennent de plusieurs façons différentes : la concentration importante en mélanine de leur milieu intracellulaire, tout d'abord, leur permet d'absorber l'énergie lumineuse en excédent qui n'aurait pas été captée par les photorécepteurs. Elles limitent ainsi la diffusion lumineuse au fond de l'oeil et empêchent donc d'éventuels signaux parasites pour les photorécepteurs.

Accolées à la choriocapillaris à leur pôle basal, les cellules du RPE participent également à la barrière hématorétinienne et sont un intermédiaire indispensable des échanges entre sang et photorécepteurs. Elles déversent des ions, de l'eau et des déchets métaboliques issus de l'activité des photorécepteurs dans la circulation sanguine, et y prélèvent des nutriments, qu'elles fournissent aux photorécepteurs au pôle apical.

Elles sont qui plus est fortement impliquées dans le maintien de l'excitabilité et de l'activité moléculaire des PR, et ce d'au moins deux manières. Elles stabilisent d'une part

la composition ionique du milieu extracellulaire subrétinien. L'activité phototransductrice des photorécepteurs dépendant de l'activité de canaux sodiques dont le flux ionique est fonction de la différence de potentiel (et donc des gradients ioniques) de la membrane, le maintien d'une composition ionique extracellulaire stable est essentielle pour garantir leur activité. Elles assurent d'autre part le recyclage du rétinol ; après sa dissociation des pigments visuels, les photorécepteurs sont incapables d'assurer eux-mêmes le retour du *tout-trans*-rétinal en *11-cis*-rétinal pour permettre sa réutilisation. Ce sont les cellules du RPE qui effectuent ce changement de conformation *via* une série de réaction



**Figure 35 : Le cycle visuel**

Le *11-cis*-rétinal, transformé en *all-trans*-rétinal par l'action de la lumière, est réduit en rétinol par RDH12/8 et transporté hors des photorécepteurs par ABCA4. Il diffuse dans les cellules du RPE, aidé par la glycoprotéine IRBP, et subit alors une série de transformations enzymatiques : estérification par LRAT (*lecithin retinol acetyltransferase*), isomérisation par RPE65, et enfin oxydation en *11-cis*-rétinal par RDH5. Ce dernier peut alors retourner dans les photorécepteurs pour régénérer les pigments visuels.

D'après Perusek et Maeda, 2013

enzymatiques après acheminement du *tout-trans*-rétinal en leur sein, et réapprovisionnent les photorécepteurs en *11-cis*-rétinal (**Figure 35**) : c'est le cycle visuel.

Le RPE est enfin un acteur majeur du remplacement des disques des segments externes des photorécepteurs. Ces structures hautement spécialisées et fortement actives sont en effet sujettes à un renouvellement permanent. On estime qu'un photorécepteur de primate renouvelle l'intégralité de son segment externe en douze jours. De nouveaux disques sont constamment générés à la base des segments, et les anciens desquament en parallèle à l'extrémité distale avant d'être phagocytés et lysés par le RPE (*Young, 1967, revue par Kevany et al., 2010*). Les disques phagocytés rejoignent des lysosomes à l'intérieur des cellules épithéliales et sont digérés. Ce processus dynamique et à grande échelle (pour permettre le recyclage de 10% des segments externes par jour) génère une grande quantité de radicaux libres, désactivés par des molécules anti-oxydantes produites par le RPE.

La rétine pigmentée est donc une structure indispensable à la pérennité des photorécepteurs, et le dysfonctionnement d'un des processus dont elle est responsable peut avoir des effets drastiques. En effet, de nombreuses pathologies rétiniennes comme la rétinite pigmentaire ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge peuvent provenir d'anomalies au niveau du RPE.

### III.1.2.3. La neurorétine, premier lieu de traitement de l'information visuelle

Une fois la transduction de l'information lumineuse effectuée par les PR, les quatre autres types de neurones de la neurorétine assurent à la fois un premier traitement du message nerveux ainsi que son transport jusqu'au cerveau. De façon schématique, le message nerveux émis par les photorécepteurs est médié par les cellules bipolaires pour au final atteindre les cellules ganglionnaires, dont les axones forment le nerf optique. Chaque étape du processus est une occasion de moduler le message pour en fournir une première analyse.

En réponse à un signal lumineux, un photorécepteur s'hyperpolarise et diminue sa libération de glutamate (cf III.1.2.1) ; ce processus est modulé par l'activité

phototransductrice des PR voisins *via* les cellules horizontales. Formant une population minoritaire des cellules de la neurorétine (moins de 5%, *Jeon et al., 1998*), ces dernières forment des synapses avec les segments internes de plusieurs PR ; elles exercent une activité hyperpolarisante sur ces derniers, tandis que le glutamate qu'ils libèrent dépolarise (et donc active) les cellules horizontales. Lorsqu'un PR isolé reçoit un signal lumineux, ses voisins libèrent toujours une quantité massive de glutamate. Les cellules horizontales sont donc fortement activées, et hyperpolarisent encore davantage le PR stimulé. Lorsqu'au contraire plusieurs récepteurs voisins reçoivent des stimuli simultanés, leur libération de glutamate diminue de concert et les cellules horizontales ne sont pas dépolarisées. Leur activité hyperpolarisante disparaît et la réponse des photorécepteurs à la lumière diminue donc. Ainsi, les cellules horizontales sont capables de moduler la réponse d'un PR à un même signal lumineux en fonction de l'information reçue par les voisins. Elles vont intensifier la réponse des photorécepteurs dont l'activité diffère de celles de leur voisin, et augmentent ainsi la sensibilité de la rétine au contraste de luminance.

Les variations dans la libération du glutamate par les photorécepteurs vont directement influencer l'activité électrique des cellules bipolaires, qui sont l'étape intermédiaire de transmission du signal visuel. A l'instar des cellules horizontales, les bipolaires forment des synapses avec les segments internes des photorécepteurs ; il en existe deux grands types, ON et OFF, qui composent à eux deux 40% des neurones intégrateurs de la neurorétine (*Jeon et al., 1998*). Les synapses des cellules bipolaires OFF possèdent des récepteurs glutamatergiques de type AMPA et/ou kaïnate à l'activité dépolarisante. Leur activité est par conséquent maximale dans le noir, et diminue en même temps que la libération de glutamate des PR à la lumière.

Les cellules bipolaires ON ont la particularité rare d'être hyperpolarisées par le glutamate. Elles le doivent au récepteur qu'elles expriment, *mGluR6*, dont l'activation mène à une baisse de la concentration de GMPc intracellulaire et ainsi à la fermeture du canal sodique *Trpm1* sensible au GMPc (*Nawy et Jahr, 1990, Shiells et Falk, 1990, Purves et al., 2004*). A l'obscurité, le glutamate libéré par les PRs maintient donc ces cellules dans un état hyperpolarisé inactif. La lumière, en modulant cette libération, diminue l'activité des *mGluR6* et permet l'ouverture des canaux sodiques, menant à la dépolarisation de la cellule.

Les cellules bipolaires forment toutes par la suite les mêmes types de synapses avec les cellules ganglionnaires. Ainsi, à l'obscurité, les cellules bipolaires OFF vont activer leurs cellules ganglionnaires, et augmenter la fréquence de leur potentiel d'action ;

les bipolaires ON ont le même effet sur leur ganglionnaires à la lumière. Ainsi, la détection ou non d'un signal lumineux par un photorécepteur mènera dans tous les cas à l'augmentation de la fréquence des potentiels d'action d'un sous-ensemble de cellules ganglionnaires, ce qui permettra par la suite au système visuel de toujours interpréter le même type de signal (une augmentation de fréquence) quel que soit le stimulus de départ.

Les cellules ganglionnaires reçoivent des informations de plusieurs cellules bipolaires, et donc de plusieurs PR ; on estime que chaque cellule ganglionnaire réceptionne et combine les signaux de 4 cônes, ou de 70 bâtonnets en moyenne (*via* les cellules bipolaires, *Jeong et al., 1998*). Leur activité est de plus modulée par les cellules amacrines qui, connectées à plusieurs cellules ganglionnaires, ont entre autres la capacité de corréliser leurs activités électriques. Les messages nerveux émis par les photorécepteurs sont interprétés dans les ganglionnaires dans un tout premier traitement de l'information avant d'être envoyés au système visuel le long de leurs axones qui forment le nerf optique.

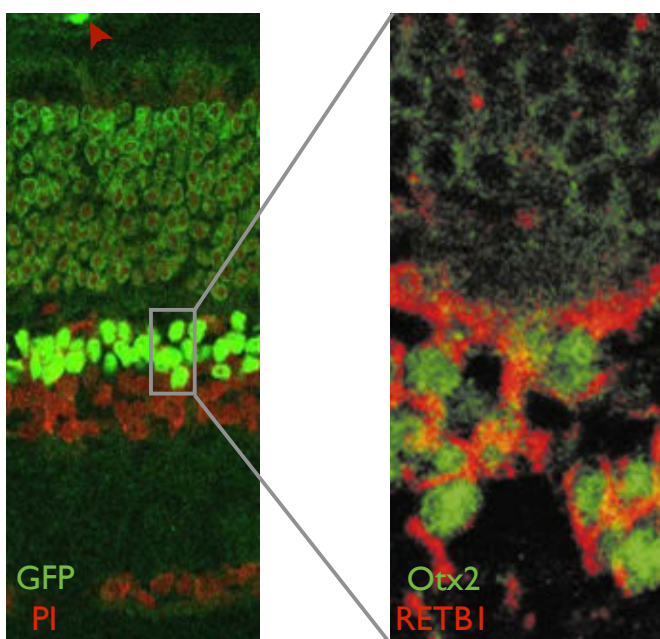
La NR permet ainsi le transfert vers le système visuel et la première analyse des photons transduits en activité électrique par les photorécepteurs. Son anatomie fonctionnelle relativement simple ne doit pas occulter sa complexité sous-jacente : les dernières analyses estiment qu'elle serait composée de plus de 55 sous-types cellulaires (*Masland, 2001*), qui diffèrent par la morphologie et le niveau de projection terminale de leur arborisation et par la combinatoire de gènes qu'elles expriment. On compterait notamment 29 types d'amacrines (*MacNeil et Masland 1998* pour 22 d'entre elles, *MacNeil et al., 1999, Masland, 2001* pour une revue), 10 à 15 types de cellules ganglionnaires (*Kong et al., 2005* pour 11 d'entre elles chez la souris), et une dizaine de bipolaires (*Masland, 2001*). Cette multiplicité morphologique correspond probablement à une multiplicité fonctionnelle qui viendrait encore renforcer le potentiel de traitement du signal de la neurorétine ; par exemple, les cellules amacrines de type «starburst» sont spécifiquement impliquées dans la sélectivité de direction (*He et al., 1997, Yoshida et al., 2001*).

Les bâtonnets et le système neuronal qui leur est rattaché occupent une place intéressante dans la NR, et leur signal nerveux ne suit pas tout à fait le même chemin que celui des cônes décrit ci-dessus. Si les bâtonnets sont eux aussi associés à des bipolaires

qui leur sont d'ailleurs spécifiques, ces dernières ne sont pas directement en contact avec les cellules ganglionnaires. Elles forment à la place des synapses avec un sous-type spécialisé de cellules amacrines, les AII, qui vont à leur tour mettre en place des connections nerveuses avec les segments internes des cônes. Le système nerveux des bâtonnets vient ainsi se «greffer» à la voie canonique de transmission du signal visuel au niveau des cônes. Par ailleurs, des études moléculaires suggèrent que la rhodopsine, pigment visuel spécifique des bâtonnets, dériverait en fait évolutivement des opsines propres aux cônes (*Okano et al., 1992*). L'ensemble de ces données histologiques comme moléculaire laisse donc penser que, bien qu'ils soient présents en écrasante majorité au sein de la rétine, les bâtonnets en seraient en fait une structure dérivée.

### III.1.3 Expression d'Otx2 dans la rétine de souris adulte

A la différence de la plupart des tissus dans lesquels il apparaît (cf I.2), l'expression d'Otx2 dans la rétine, qui commence très tôt pendant le développement embryonnaire, persiste à l'âge adulte. En effet, des immunomarquages dirigés contre *Otx2* chez une souris sauvage (*Baas et al., 2000*), ainsi que l'étude d'une souris exprimant une protéine de fusion Otx2-GFP (*Otx2<sup>+/Otx2-GFP</sup>*, *Fossat et al., 2007*) a permis de révéler qu'Otx2 était présent dans les deux couches de la rétine à P30 (RPE et NR). Toutes les cellules épithéliales du RPE sont positives pour l'expression du gène, tandis que la NR l'exprime au niveau des cellules bipolaires et des photorécepteurs (**Figure 36**). La protéine Otx2 est



**Figure 36 : Expression d'Otx2 dans la rétine adulte**

L'expression d'Otx2 est révélée à gauche en vert par une immunofluorescence α-GFP sur une rétine exprimant une protéine de fusion Otx2-GFP. Un marquage à l'iodure de propidium vient confirmer sa présence nucléaire. Otx2 est exprimé dans les photorécepteurs de l'ONL, dans des cellules de l'INL, ainsi que dans le RPE (flèche rouge).

Un zoom sur l'INL (à droite) montre qu'Otx2 marque les mêmes cellules que RETB1, protéine membranaire caractéristique des bipolaires. Otx2 ne colocalise avec aucun autre marqueur, il est donc exprimé uniquement dans les bipolaires de l'INL.

D'après *Baas et al., 2000, Fossat et al., 2007*.

à chaque fois nucléaire, mais elle est cantonnée à la face interne de la membrane nucléaire dans les PR. Ceci est probablement dû à l'organisation très particulière du noyau de ces derniers : l'hétérochromatine y est concentrée au centre, et l'euchromatine, où a lieu la transcription et sa régulation, est rejetée en bordure (*Kizilyaprak et al., 2010*).

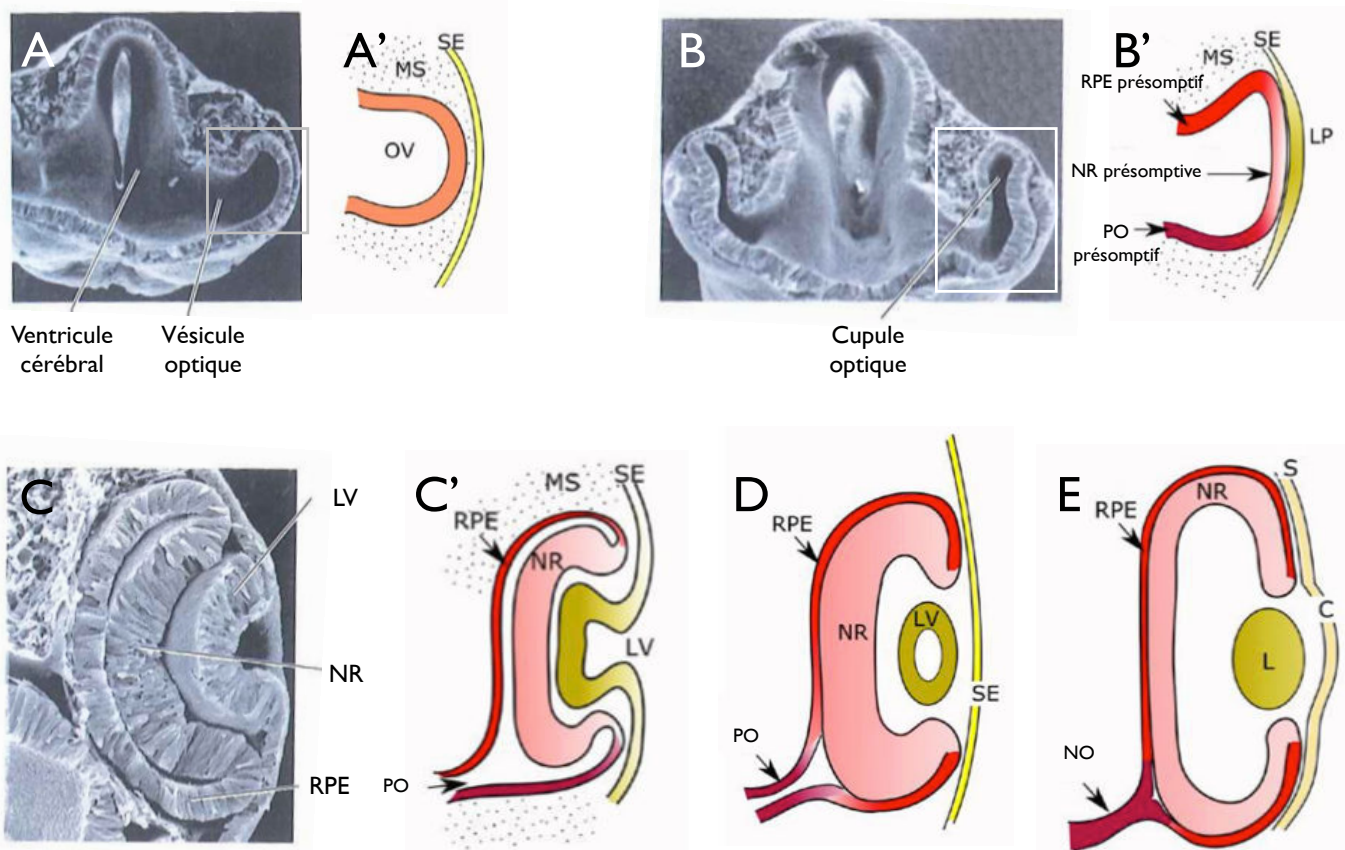
Comme c'est le cas dans chacune de ses zones d'expression (cf I.2.), *Otx2* a une importance majeure au niveau de la rétine. La plupart des études menées jusque là ont surtout permis de dégager les fonctions qu'il joue à plusieurs étapes du développement de cet organe ; elles seront décrites dans la partie suivante. Plus récemment, la mise en place de modèles génétiques originaux ont mis en lumière un rôle essentiel de cet homéogène dans le maintien de la rétine adulte, qui sera abordé en III.3.

### III.2. Rôles d'*Otx2* dans le développement de la rétine

Après un bref aperçu des processus qui mènent à la mise en place de la rétine, cette sous-partie se concentrera sur les différentes étapes auxquelles *Otx2* intervient. On constatera qu'il fonctionne la plupart du temps en coopération avec un autre gène de la famille *Otx*, que ce soit *Otx1* pour la spécification du RPE ou *Crx* pour la différenciation des photorécepteurs.

#### III.2.1. Le développement de la rétine

La rétine est une structure du système nerveux central qui dérive donc du tube neural ; son développement commence précocément durant le développement embryonnaire et se poursuit jusqu'au delà de la naissance (P20). Il existe dès E8 un champ optique dans la plaque neurale, destiné à former l'oeil, comme le prouvent les expériences de Lopashov et Stroeva : la culture d'un explant de plaque neurale de salamandre prélevé à la position appropriée aboutit à la formation d'un oeil histologiquement normal (*Lopashov et Stroeva, 1964*). Au moment de la fermeture du tube neural (après E8,5), des vésicules optiques vont émerger à partir de ce champ optique, situé au niveau des vésicules antérieures de l'encéphale (**Figure 37**). Des facteurs intrinsèques vont spécifier les différentes parties des vésicules en RPE, NR et pédoncule optique présomptifs, identifiables chacun par des marqueurs spécifiques (**Figure 37**). Les



### Figure 37 : Développement de l'oeil de Vertébré

(A-A') Une évagination du ventricule cérébral télencéphalique donne naissance à la vésicule optique. (A), image par microscopie électronique à balayage (MEB) d'un embryon humain de 4mm exposant le processus, schématisé en (A').

(B-B') Différents territoires présomptifs sont définis au sein de la vésicule optique au contact de l'ectoderme de surface, future placode cristallinienne : ceux du RPE, de la neurorétine, et du pédoncule optique. La vésicule commence à s'invaginer. (B) et (B') sont organisés comme (A) et (A') ; (B) est une image par MEB d'un embryon humain de 4,5mm

(C-C') Après son invagination, la vésicule optique forme la cupule optique. La vésicule cristallinienne se forme également par invagination, à partir de la placode cristallinienne. (C) et (C') sont organisés comme (A) et (A') ; (C) est une image par MEB d'un embryon humain de 5mm.

(D-E) Maturation de la cupule optique. Le RPE et la NR entrent en contact, le pédoncule optique forme l'enveloppe du nerf optique, et l'ectoderme de surface donne la cornée.

C : cornée, LP : placode cristallinienne (*lens placode*), LV : vésicule cristallinienne (*lens vesicle*), MS : mésenchyme, PO : pédoncule optique, NO : nerf optique, NR : neurorétine, OV : vésicule optique, RPE : épithélium pigmenté rétinien, SE : ectoderme de surface.

D'après Purves et al., 2004, Canto-Soler et al., 2006

vésicules vont continuer à croître jusqu'à entrer en contact avec l'ectoderme de surface. Elles s'invaginent alors en leur centre pour former la cupule optique (E10,5), pendant que l'ectoderme, lui, s'épaissit et devient la placode cristallinienne. La cupule va par la suite



continuer à croître, le RPE en formation entre en contact avec la future NR, et le globe oculaire sera formé à E13,5 par fermeture de la fissure choroïde (**Figure 37**).

Une fois spécifiée, la NR entame sa différenciation et commence la mise en place des différents types cellulaires qui forment sa structure stratifiée (**Figure 33**). Leur installation définitive s'achève à P20 environ.

L'homéogène *Otx2* assure plusieurs fonctions à différentes étapes de ce processus, depuis la mise en place du champ optique à la différenciation de certains types neurones de la NR.

### III.2.2. Mise en place du champ optique et *Otx2*

Chez les Vertébrés, le champ optique, site d'initiation de la future vésicule optique, semble délimité par le territoire de coexpression de sept gènes (*ET, Rx1, Pax6, Six3, Lhx2, Tl1, Otx2/Six6*), comme le démontrent des expériences chez le Xénope (*Zuber et al., 2003*). En effet, l'injection d'un cocktail d'ARNm de ces sept gènes est souvent capable d'induire la formation d'un oeil ectopique ; l'efficacité du cocktail augmente jusqu'à 100% si on y ajoute des ARNm *Otx2*.

L'expression de six de ces sept gènes est activée par la noggine au niveau du champ optique, tandis qu'elle y réprime le plus précoce, *ET*. Le rôle d'*Otx2* serait en fait d'empêcher cette répression pour permettre l'expression d'*ET* et ainsi aboutir à la combinatoire nécessaire à l'installation du champ optique. Son expression dès le début de la formation de la plaque neurale en fait donc un facteur de compétence pour l'induction de territoire de la rétine présomptive (*Zuber et al., 2003*).

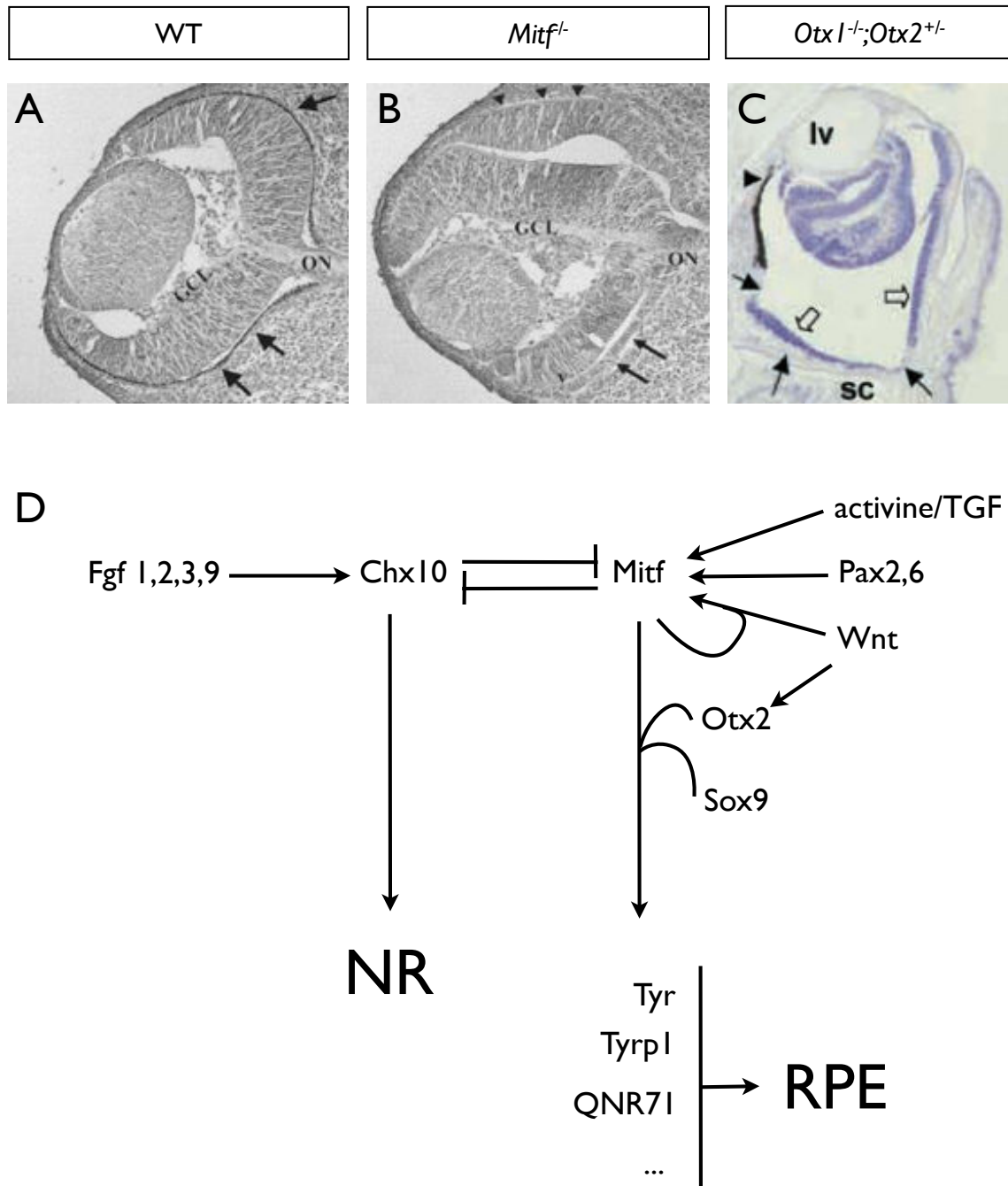
### III.2.3. Spécification du RPE et *Otx2/Otx1*

Trois acteurs principaux participent à la spécification du RPE : *Otx2, Otx1* et le *microphthalmia transcription factor, Mitf*. Ce dernier code pour plusieurs isoformes d'un facteur de transcription bHLH, dont les formes A-, J-, H- et D-Mitf sont présentes au niveau de la rétine, et dont les fonctions dans la spécification et le fonctionnement du RPE sont assurés par H- et D-Mitf (*Bharti et al., 2008*).

Des mutations constitutives de *Mitf* ont très tôt été associés à des phénotypes de microphthalmie (d'où son nom) assortis d'une perte de pigmentation de la peau et de l'oeil (*Hodgkinson et al., 1996*). D'abord exprimé dans toute la vésicule optique, il est rapidement restreint au RPE présomptif, laissant la place à une plage d'expression de *Chx10* au niveau de la neurorétine. Une étude plus approfondie des mutants *Mitf* y révèle une transdifférenciation du RPE en neurorétine *Chx10*-positive (**Figure 38**, *Nguyen et Arnheiter, 2000, Bumsted et Barnstable, 2000*). A l'inverse, une expression plus large de *Mitf* est invariablement corrélée à une extension du RPE sur le territoire de la NR (*Nguyen et Arnheiter, 2000*). Enfin, *Mitf* est capable d'activer nombre de gènes spécifiques du RPE, notamment ceux de la mélanogenèse (*Nakayama et al., 1998, Widlund et Fisher 2003, Esumi et al., 2009*). Ainsi, *Mitf* apparaît nécessaire à la spécification du RPE.

Son activité et l'étendue de son expression sont modulées par plusieurs facteurs. Il serait d'une part activé par un signal de type activine en provenance du mésenchyme extraoculaire, ainsi que par un signal *Wnt* d'origine encore inconnue (*Fuhrmann et al., 2000, Westenskow et al., 2009*). En effet, des explants de vésicule optique n'expriment *Mitf* qu'en présence de mésenchyme extraoculaire ou d'activine (*Fuhrmann et al., 2000*). Par ailleurs, la cascade de signalisation  $\beta$ -caténine/TCF/LEF est active dans le futur RPE (notamment dorsal), et son inactivation entraîne la disparition de *Mitf* et la transdifférenciation du RPE dorsal en NR (*Westenskow et al., 2009, 2010*). MITF interagirait d'ailleurs lui-même avec LEF-1 pour réguler son propre promoteur (*Yasumoto et al., 2002, Saito et al., 2002*).

D'autre part, il serait réprimé dans la neurorétine par un signal *Fgf* Ras-dépendant en provenance tout d'abord de l'ectoderme à l'aplomb de la vésicule optique puis de la neurorétine elle-même (*Pittack et al., 1997, Hyer et al., 1998, Nguyen et Arnheiter, 2000, Zhao et al., 2001*). Les gènes *Fgf2* et *Fgf3* sont exprimés au niveau de l'ectoderme de surface (*Pittack et al., 1997, Hyer et al., 1998*) ; ils sont rejoint plus tardivement par l'expression de *Fgf9* au niveau de la neurorétine (*Zhao et al., 2001*). L'ablation de l'ectoderme de surface, ou l'inhibition de la voie *Fgf*, aboutit toujours à une extension de l'expression de *Mitf* associée à une disparition totale ou partielle de la neurorétine, qui se transdifférencie en RPE (*Pittack et al., 1997, Hyer et al., 1998, Nguyen et Arnheiter, 2000*). A l'inverse, une activation ectopique ou ubiquitaire de la voie *Fgf* mène à une transdifférenciation du RPE en NR ; le territoire cellulaire arrête d'exprimer *Mitf* et se met à exprimer *Chx10* (*Hyer et al., 1998, Nguyen et Arnheiter, 2000*). La voie *Fgf* réprime donc le destin cellulaire «RPE» et active le destin «neurorétine». Son action est médiée par *Chx10*, qui entretiendrait une relation de répression mutuelle avec *Mitf*. En effet, si une



**Figure 38 : Spécification des territoires rétiniens par *Otx2***

(A-C) *Mitf*, *Otx1* et *Otx2* spécifient le RPE aux dépens de la neurorétine. (A), rétine sauvage, (B), rétine *Mitf<sup>-/-</sup>*, (C), rétine *Otx1<sup>-/-</sup>;Otx2<sup>+/-</sup>*. Le RPE des mutants *Mitf* comme *Otx1/2* est respécifié en neurorétine.

(D) Réseau de régulation génétique à l'origine de la mise en place des territoires du RPE et de la neurorétine. Une répression mutuelle entre *Chx10* et *Mitf* va délimiter l'extension de leurs domaines d'expression, qui mettront ensuite en place des programmes développementaux distincts. *Otx2*, *Sox9* et *Mitf* coopèrent pour induire l'expression des gènes RPE-spécifiques.

*GCL* : couche ganglionnaire (*ganglion cell layer*), *lv* : vésicule cristallienne (*lens vesicle*), *ON* : nerf optique. D'après *Bumsted et Barnstable, 2000, Martinez-Morales et al., 2003*

mutation de *Mitf* [resp. *Chx10*] transforme le RPE en NR [resp. la NR en RPE] à l'instar d'une suractivation [resp. inactivation] de la voie Fgf, la structure histologique générale des rétines doubles mutantes *Mitf<sup>-/-</sup>;Chx10<sup>-/-</sup>* est normale (*Horsford et al., 2005*), signe que l'un des gènes est nécessaire à la transdifférenciation en cas d'absence de l'autre. Par ailleurs, le gène *Chx10* est activé *via Shp2* par la signalisation Fgf-Ras (*Cai et al., 2010*).

Ainsi, la spécification du RPE et de la NR sont étroitement liées lors du développement de la rétine. Les voies activine/TGF et Wnt activent l'expression de *Mitf*, qui entre dans une relation de répression mutuelle avec *Chx10*, lui-même activé par la voie Fgf. L'opposition réciproque entre ces deux gènes ainsi que leurs capacités activatrices respectives sont ensuite responsables du positionnement et du développement du RPE d'un côté et de la NR de l'autre (**Figure 38**).

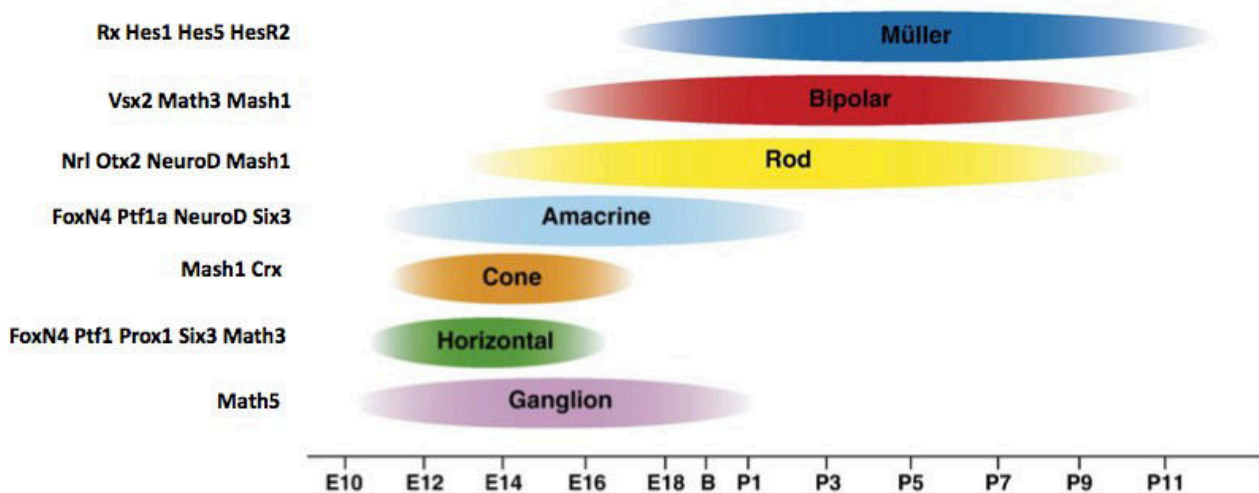
Le gène *Otx2*, en coopération avec *Otx1*, joue un rôle extrêmement semblable à celui de *Mitf*. Dans une étude de 2001, Martinez-Morales et al. ont observé que 30% des souris d'un génotype *Otx1<sup>+/-</sup>;Otx2<sup>+/-</sup>*, et la quasi-totalité des souris *Otx1<sup>-/-</sup>;Otx2<sup>+/-</sup>* présentent un phénotype extrêmement semblable à celui des mutantes *Mitf*. Le RPE s'y transdifférencie notamment en neurorétine, structurellement comme moléculairement (**Figure 38**, *Martinez-Morales et al., 2003*). Une dose minimale de protéines Otx est par conséquent nécessaire à la spécification du RPE. Inversement, l'expression d'*Otx2* dans des cultures de progéniteurs rétiniens est suffisante pour les différencier en cellules pigmentées caractéristiques du RPE, et la protéine Otx2 peut elle aussi activer les gènes de la mélanogénèse (*Martinez-Morales et al., 2003*). Enfin, l'expression d'*Otx2* est également affectée par une dérégulation de la voie Wnt, dont les effecteurs peuvent se fixer en amont du gène (*Westenskow et al., 2009*).

De manière intéressante, *Otx2* ne régule pas le promoteur de *Mitf* à lui seul, et réciproquement (*Martinez-Morales et al., 2003*, *Westenskow et al., 2010*). *Mitf* et *Otx1/2* seraient donc deux types de facteurs de transcription exprimés en parallèle et responsables à eux trois de la spécification du RPE. Des études moléculaires ont permis de formuler une nouvelle hypothèse : capables d'interagir physiquement entre eux (*Martinez-Morales et al., 2003*), les protéines Otx2 et MITF formeraient un complexe tripartite avec SOX9 (*Masuda et Esumi, 2009*) aux capacités transactivatrices démultipliées et capable de réguler les gènes spécifiques du RPE (**Figure 38**, *Esumi et al., 2009*, *Masuda et Esumi, 2010*).

### III.2.4. Différenciation de la NR et *Otx2/Crx*

La neurorétine spécifiée est constituée d'une couche neuroblastique de précurseurs rétiniens multipotents (*Livesey et Cepko, 2001*). Une fois leur identité acquise, ces derniers vont entrer dans une phase proliférative avant leur différenciation post-mitotique et leur échelonnement en couches. Leur différenciation est initiée au centre de la rétine par un signal Fgf (*Martinez-Morales et al., 2005*) et se propage vers la périphérie en réponse à une vague de signalisation Shh (*Neumann et Nüsslein-Volhard, 2000, Zhang et Yang, 2001*). Une décalage spatio-temporel est ainsi mis en place durant le processus de différenciation : à chaque instant la rétine centrale est plus avancée que la rétine périphérique.

Les différents types cellulaires se mettent en place par vagues successives et chevauchantes, qu'on peut classer en deux grandes phases (**Figure 39**, *Cayouette et al., 2006*) : la première commence par la différenciation des cellules ganglionnaires à E11, suivies des cellules horizontales, amacrines et des cônes. La seconde voit la mise en place des cellules bipolaires et de Müller, ainsi que des bâtonnets, dont la différenciation s'achève extrêmement tardivement. La répartition cellulaire dans les différents voies de



**Figure 39 : Différenciation par vagues 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 génétiques de ces types cellulaires sont indiqués à gauche.

D'après *Ohsawa et Kageyama, 2008*

différenciation s'achève à P7, et une phase de maturation et d'arborisation vient achever le processus jusqu'à maturité de la rétine à P21.

La détermination du type neuronal adopté par un progéniteur dépend de l'expression d'une combinatoire de facteurs de transcription qui l'orienteront dans une voie de différenciation particulière (**Figure 39**). Certains facteurs sont essentiels et probablement suffisants à la différenciation d'un unique type cellulaire. C'est par exemple le cas de *Nrl*, en l'absence duquel aucun bâtonnet n'est formé, et dont l'expression peut rediriger des cônes présomptifs dans une différenciation de type bâtonnet (*Mears et al., 2001, Oh et al., 2007*). *Chx10* et *Math5/Atoh7* sont de leur côté essentiels au développement des cellules bipolaires et ganglionnaires, respectivement (*Burmeister et al., 1996, Brown et al., 2001*). Mais la différenciation correcte de tous les types neuronaux requiert tout de même l'action combinée de plusieurs facteurs. Le gène *Chx10*, si essentiel au développement des cellules bipolaires, mène à lui seul à la formation de divers neurones de l'INL ; l'expression additionnelle de *Ascl1* et *NeuroD4* est nécessaire pour faire de ces neurones des bipolaires (*Hatakeyama et al., 2001*). Cette observation, parmi d'autres, a amené l'hypothèse d'une bi/multimodalité de la différenciation : l'expression d'une combinatoire de plus en plus grande de gènes restreint petit à petit leur différenciation, d'abord à leur couche cellulaire de destination puis à leur type neuronal (*Ohsawa et Kageyama, 2008* pour la bimodalité).

La famille *Otx* est impliquée dans la différenciation de deux types neuronaux particuliers, les photorécepteurs et les cellules bipolaires. *Crx* en est le premier membre dont l'importance dans la différenciation de la rétine a été avéré ; dès 1997, Furukawa et al. montraient que l'expression d'un dominant négatif de *Crx* dans les PR menaient à la dégénérescence de leur segments externes alors que la surexpression de *Crx* sauvage augmentait la proportion des photorécepteurs aux dépens des cellules amacrines (*Furukawa et al. 1997*). Ces observations ont été confirmés par l'étude de souris *Crx*<sup>-/-</sup> : les photorécepteurs de ces animaux n'ont pas de segments externes, dégénèrent, et sont incapables d'assurer leur fonction de génération d'un courant électrique en réponse à la lumière (*Furukawa et al., 1999*). *Crx* est qui plus est capable d'activer un grand nombre de gènes spécifiques aux photorécepteurs, dont la plupart des gènes de la phototransduction (*Chen et al., 1997, Livesey et al., 2000*), et peut à lui seul différencier des cultures de cellules d'iris en photorécepteurs (*Akagi et al., 2005*).

Cependant le gène *Otx2* est également impliqué dans la différenciation des photorécepteurs. Un KO d'*Otx2* spécifique à la neurorétine (*Crx-Cre, Otx2<sup>lox/lox</sup>*) entraîne lui aussi un déficit en photorécepteurs, remplacés par des amacrines (*Nishida et al., 2003*) ; les défauts de dégénérescence sont par ailleurs aggravés dans des souris *Otx2<sup>+/-</sup> Crx<sup>-/-</sup>* par rapport aux simples mutants (*Koike et al., 2007*). Enfin, *Otx2* est capable tout comme son orthologue de différencier des cultures de cellules d'iris en PR (*Akagi et al., 2004*).

Ainsi, *Otx2* et *Crx* déterminent à eux deux le destin «photorécepteurs». Toutefois, en l'absence d'*Otx2* l'expression de *Crx* n'est jamais observée (*Nishida et al., 2003*), indice que le premier serait responsable de l'induction du second. Selon le modèle actuel, *Otx2* initierait par conséquent la différenciation des photorécepteurs et induirait l'expression de *Crx* dont le rôle est d'assurer leur différenciation terminale et leur fonctionnement correct dans la rétine mature.

Les gènes *Otx2* et *Crx*, tous deux exprimés dans les cellules bipolaires, sont également impliqués dans la différenciation de ce type cellulaire. Un KO postnatal d'*Otx2* spécifique des bipolaires (souris *L7-Cre; Otx2<sup>fl/fl</sup>*) entraîne la diminution de l'expression de certains marqueurs comme PKC- $\alpha$  (*Koike et al., 2007*) et des défauts fonctionnels des cellules, révélés à l'électrorétinogramme. Cependant, les cellules bipolaires ne dégèrent pas ; le même KO dans des souris mutantes par sucroît pour *Crx* aboutit au contraire à une diminution du nombre de cellules bipolaires (*Koike et al., 2007*). De la même façon, la réduction de l'expression de plusieurs marqueurs des bipolaires (*Grm6, Cabp5* et *Chx10*) observable dans des souris *Otx2<sup>+/-</sup>* est accentuée dans des animaux *Otx2<sup>+/-</sup>; Crx<sup>-/-</sup>* (*Kim et al., 2008*). Ces marqueurs possèdent d'ailleurs des séquences TAATCC dans leurs régions promotrices, auxquelles *Otx2* et *Crx* peuvent se fixer pour assurer leurs fonctions transactivatrices (*Kim et al., 2008*). Enfin, un KO postnatal d'*Otx2* entraîne la dérégulation rapide, et donc probablement directe, de 9 gènes spécifiques des bipolaires (*Housset et al., 2013*).

*Otx2*, en coopération avec son orthologue *Crx*, assure donc la différenciation et le fonctionnement correct des cellules bipolaires en régulant un ensemble de gènes qui leur sont essentiels.

On peut ici s'étonner que les deux mêmes gènes soient capables d'induire deux destins différents. Qu'est-ce qui différencie les cellules *Otx2*- et *Crx*- positives destinées à donner des PR de celles destinées à donner les bipolaires ? La présence d'autres facteurs

de transcription exprimés en combinaison avec ces deux homéogènes dans les précurseurs rétiniens prend alors toute son importance. En plus de *Crx*, *Otx2* peut activer le gène *Blimp1*, dont l'expression sera ensuite conservée ou non dans les cellules qui l'induisent (Brzezinski et al., 2010, 2013). Tous les progéniteurs qui conservent l'expression de *Blimp1* donneront des photorécepteurs, et le KO de ce gène diminue le nombre de PR générés au profit des bipolaires (Brzezinski et al., 2010, Katoh et al., 2010). L'expression maintenue de *Blimp1* dans les précurseurs *Otx2*- et *Crx*-positifs détermine donc l'orientation qu'ils prendront. Deux études récentes du laboratoire de Constance Cepko viennent confirmer cette hypothèse, en plus d'impliquer *Otx2* dans la différenciation d'un nouveau type cellulaire, les cellules horizontales. En effet, la différenciation des cellules horizontales et des cônes dépendrait de l'expression conjointe de *Otx2* et *Onecut1/2* (Emerson et al., 2014). Leur présence garantit la mise en place de ces cellules, au détriment des bâtonnets. Selon un modèle analogue, l'expression simultanée de *Chx10* et *Otx2* aboutit au développement de cônes ou de cellules bipolaires (Wang et al., 2014). Leurs résultats suggèrent, dans ces deux cas, que les concentrations relatives des facteurs de transcription permettent d'orienter les progéniteurs de la rétine vers plusieurs destins différents.

La famille *Otx* est donc impliquée à plusieurs moments clés du développement de la rétine, et est à chaque fois représentée au moins par *Otx2*. A la différence de bon nombre de structures cependant, la rétine mature conserve l'expression d'*Otx2* et *Crx*. Or le premier s'avère jouer un rôle majeur et non-cellule-spécifique dans le maintien de l'intégrité des photorécepteurs de la rétine adulte, comme le montrera la partie suivante.

### III.3. Importance majeure d'*Otx2* dans le maintien de la rétine de souris adulte.

La totalité des études menées avant 2010 sur le rôle d'*Otx2* dans la rétine utilisaient des souris dans lesquels l'inactivation totale ou partielle du gène avait lieu pendant le développement rétinien. Elles ne permettaient donc pas d'examiner les rôles spécifiques d'*Otx2* à l'âge adulte.

Une stratégie de self-KO conditionnel a été mise en place pour s'attaquer à cette question, qui repose sur l'utilisation de souris *Otx2<sup>CreERT2/lox</sup>*. Dans ces animaux, une des

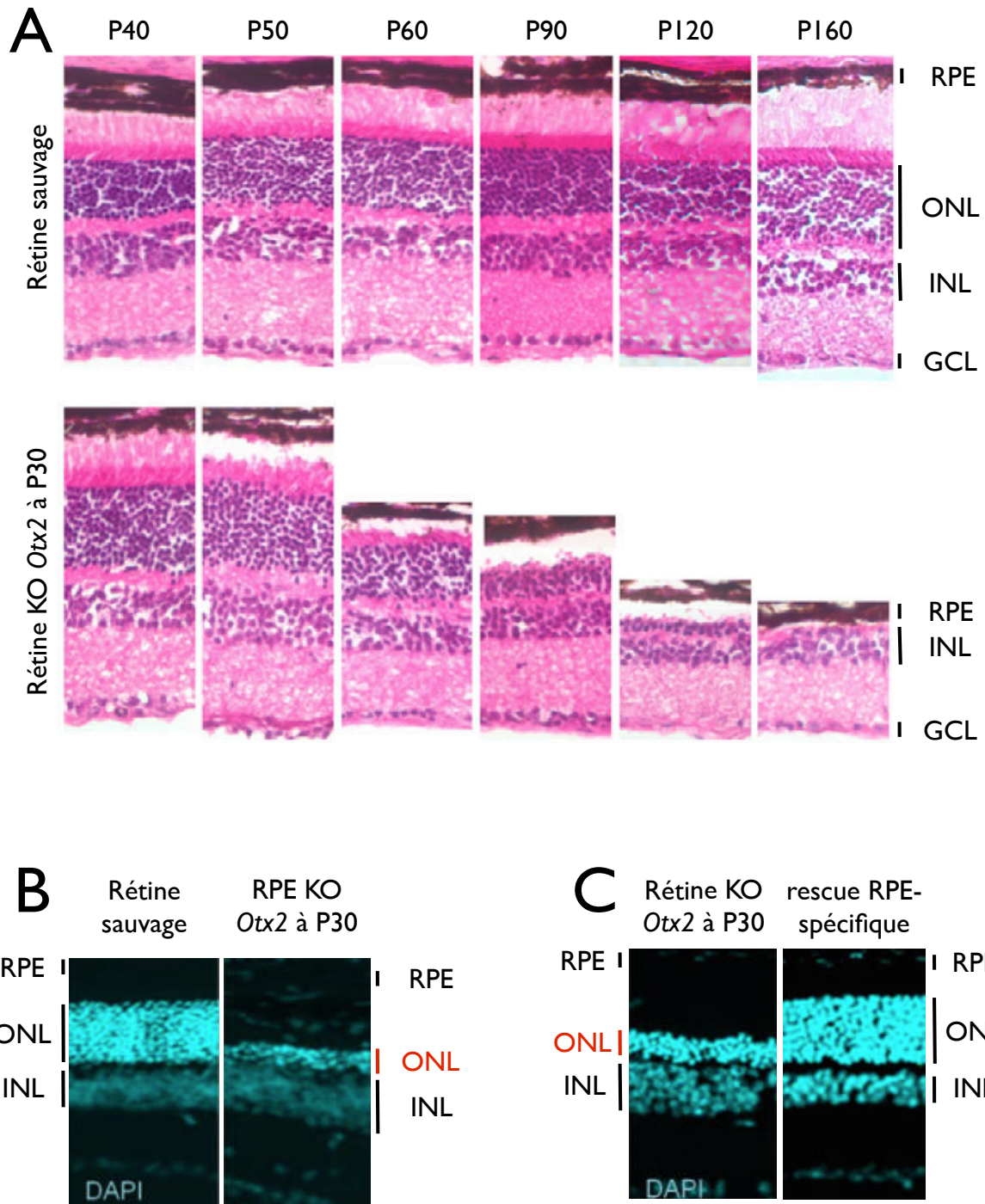


deux copies du gène *Otx2* a été remplacée par une *Cre* inducible au tamoxifène, tandis que l'exon 2 de l'autre copie (qui contient l'homéodomaine, cf I.1) a été flanqué de sites lox. En l'absence de tamoxifène, la CRE exprimée par les cellules *Otx2*-positives est inactive et l'allèle *Otx2<sup>lox</sup>* est donc conservé tel quel : l'animal est un hétérozygote fonctionnel. L'injection de tamoxifène active la CRE et provoque l'excision de l'exon 2 de l'allèle *Otx2<sup>lox</sup>*, de telle sorte que l'animal devient fonctionnellement KO pour *Otx2*. Dans le cadre de l'étude de son rôle dans la rétine, l'expression d'*Otx2* peut ainsi être conservée tout au long du développement avant d'être éteinte dans les cellules qui l'expriment encore à l'âge adulte, permettant ainsi d'isoler les rôles spécifiques d'*Otx2* dans cette situation.

L'induction du KO d'*Otx2* à l'âge adulte (P40) en utilisant cette stratégie expérimentale mène rapidement à une disparition de l'expression d'*Otx2* dans les cellules du RPE, les PR et les bipolaires (Béby *et al.*, 2010). Les conséquences phénotypiques de cette ablation sont drastiques : une dégénérescence des segments externes des PR est observable dès 10 jours après induction, suivie à 20 jours d'un amincissement de l'ONL. Cet amincissement s'accompagne d'une apoptose massive ; on peut donc supposer que les photorécepteurs des rétines KO pour *Otx2* dégèrent totalement. Trois à quatre mois après le KO, on ne retrouve plus aucune trace de l'ONL (**Figure 40A**, Béby *et al.*, 2010). Les autres cellules de la rétine, y compris celles où *Otx2* est normalement exprimé, comme les bipolaires ou le RPE, paraissent intactes. Le KO d'*Otx2* est donc à l'origine d'une mort massive et spécifique des PR : *Otx2* est essentiel à l'âge adulte pour le maintien et la survie de ce type cellulaire.

Bien qu'il mène à la dégénérescence des PRs, les premières conséquences phénotypiques du KO concernent étonnamment le RPE. Les cellules de ce dernier se vacuolisent, leurs mélanosomes sont réduits en nombre et concentrés au pôle apical, et elles s'affinent au point de finir par perdre contact avec les segments externes des photorécepteurs (Béby *et al.*, 2010). Un électrorétinogramme révèle qui plus est que ce sont les premières à montrer un dysfonctionnement électrique, et les gènes dont l'expression est dérégulée précocément par le KO d'*Otx2* (Housset *et al.*, 2013).

Il s'avère en fait que ce sont les anomalies engendrés par le KO au niveau du RPE qui sont responsables de la mort des PR. En effet, l'inactivation spécifique d'*Otx2* au niveau du RPE par injection subrétinienne de Cre dans des souris *Otx2<sup>lox/lox</sup>* est suffisante



**Figure 40 : *Otx2* est nécessaire dans le RPE pour assurer la survie des photorécepteurs**

(A) Conséquences d'un KO d'*Otx2* dans la rétine adulte. Le KO a été induit à P30 par injection de tamoxifène à des animaux *Otx2CreERT2/flox*. Contrairement à des rétines sauvages (*en haut*), la couche nucléaire externe des photorécepteurs des animaux KO dégénère rapidement (*en bas*). Le contact entre photorécepteurs et RPE est aboli 20 jours après induction (P50), les segments externes des premiers dégèrent, puis une mort cellulaire massive entraîne la disparition de l'ONL au bout de 4 à 5 mois (P120/P160).

(B) Un KO d'*Otx2* spécifique au RPE est suffisant pour induire la dégénérescence des photorécepteurs. A P120, l'ONL de rétines dont seul le RPE est KO pour *Otx2* dégénère (*à droite*).

(C) Dans une rétine adulte KO pour *Otx2*, une expression d'*Otx2* dans le RPE est suffisante pour protéger les photorécepteurs. Lorsqu'*Otx2* est restauré dans le RPE d'une rétine KO (*à droite*), l'ONL ne dégénère pas à P120 (comparer (C) à droite avec (B) à gauche), alors qu'elle a pratiquement disparu dans les KO (*à gauche*).

pour entraîner la dégénérescence des PR. A l'inverse, un «rescue» de souris KO pour *Otx2* par une expression d'*Otx2* spécifique au RPE (après injection subrétinienne également) permet à la rétine de conserver son intégrité (**Figure 40B,C**, *Housset et al., 2013*). L'expression d'*Otx2* dans le RPE est donc nécessaire et suffisante au maintien des PR. *Otx2* jouerait un rôle dans la régulation d'un bon nombre des fonctions de soutien qu'assure le RPE.

Ainsi, l'homéogène *Otx2* a un effet non-cellule-spécifique dans la rétine adulte. Plus étonnant encore, bien qu'il soit exprimé à la fois dans la NR et dans le RPE, son expression dans les PR semble ne pas importer pour le maintien de ces derniers. Quels sont les caractéristiques moléculaires de son action qui permettraient d'expliquer la relativité de son importance dans deux tissus voisins ?

Une explication possible serait qu'il régule deux répertoires de gènes différents dans le RPE et la NR ; pour que l'effet de son KO dans ces deux tissus soit aussi asymétrique, l'importance des gènes qu'il y régule devrait également l'être. La dernière sous-partie s'intéressera aux mécanismes moléculaires qui permettraient de mieux comprendre la fonction d'*Otx2* dans la rétine adulte.

#### III.4. Modalités d'action d'*Otx2* dans la rétine adulte

##### III.4.1. Une asymétrie des capacités régulatrices d'*Otx2*

Pour mieux comprendre les effets précoces du KO d'*Otx2* dans la rétine à l'âge adulte, une analyse transcriptomique a été menée immédiatement après induction. Les variations d'expression de l'ensemble des gènes exprimés dans la rétine ont été suivies jusqu'à 8 jours après ablation du gène pour isoler les gènes immédiatement affectés par l'inactivation d'*Otx2*. Étonnamment, 71 gènes rétiniens seulement sont dérégulés après KO d'*Otx2* ; les trois-quarts d'entre eux voient leur expression diminuer de façon immédiate ou progressive. Le dernier quart a une expression augmentée, de façon tardive. *Otx2* serait donc globalement un facteur activateur dans la rétine adulte (*Housset et al., 2013*).

L'analyse ontologique de cet ensemble de gènes dérégulés en révèle deux autres particularités : les gènes activés par le KO tout d'abord sont principalement des marqueurs de stress ou d'inflammation, ce qui laisse sous-entendre qu'ils ne seraient que des conséquences collatérales du KO associées au début de la dégénérescence des PR. Mais surtout, aucun gène affecté par l'ablation d'*Otx2* n'est caractéristique des PR : l'intégralité des gènes dérégulés spécifiques d'un type cellulaire sont associés soit au RPE, soit aux cellules bipolaires. L'inactivation d'*Otx2* n'aurait donc pas de conséquences moléculaires dans les photorécepteurs. Une ontologie fonctionnelle cette fois-ci révèle que les gènes qu'*Otx2* régule au niveau du RPE sont notamment impliqués dans les fonctions de soutien de celui-ci, comme le cycle visuel, la régulation du pH et la mélanogénèse (*Housset et al., 2013*)

Ainsi, au niveau moléculaire comme phénotypique, le KO d'*Otx2* dans la rétine adulte a des conséquences précoces spécifiques au RPE, qui entraîneront par la suite la dégénérescence des PR. *Otx2* régule un ensemble de fonctions spécifiques au RPE dont le dysfonctionnement s'avère de fait fatal aux cellules fragiles que sont les photorécepteurs.

Le plus frappant reste néanmoins l'asymétrie de fonction d'*Otx2* dans les différents types rétinien. Il semble en effet réguler tout un répertoire de gènes dans le RPE et les bipolaires, et n'avoir aucun rôle dans les PR adultes. Les raisons moléculaires de cette asymétrie restent à explorer, et elles peuvent être de plusieurs sortes.

#### III.4.2. Des sites de fixation différents

Les gènes *Otx2* et *Crx* sont capables de se fixer à la même séquence nucléotidique et sont coexprimés au niveau des photorécepteurs et des cellules bipolaires. Ils sont tous deux d'ailleurs capables de réguler les mêmes gènes caractéristiques de ces dernières (*Kim et al., 2008*). Une redondance des fonctions transactivatrices de ces deux gènes est donc envisageable au sein des photorécepteurs : après inactivation du gène *Otx2*, les séquences nucléotidiques normalement occupées par *Otx2* seraient fixées par *Crx* qui assurerait ainsi la transcription normale des gènes-cibles d'*Otx2* dans les photorécepteurs. *Crx* n'étant cependant pas exprimé au niveau du RPE, il ne peut pas y pallier l'inactivation d'*Otx2*.

Le répertoire entier des sites de fixation de *Crx* dans la neurorétine a été déterminé par CHIP-seq (*Corbo et al., 2010*). Son analyse a permis d'esquisser les mécanismes par lesquels ce gène exerce sa régulation. Plusieurs sites de fixation existent en général à proximité de chaque gène-cible ; l'un d'entre eux est déterminant pour son activation et les suivants permettent de moduler l'activité transactivatrice de *Crx*.

Une analyse systématique des sites de fixation d'*Otx2* permettrait d'une part de comparer les répertoires de sites occupés dans le RPE et dans la NR. Ces répertoires sont-ils différents ? En quoi ces différences consistent-elles ? Au niveau du RPE, est-il possible de corrélérer certains sites de fixation d'*Otx2* (voire la plupart d'entre eux) à ses gènes-cibles ? On peut supposer qu'une majorité des gènes dont l'expression change rapidement après induction du KO d'*Otx2* sont directement régulés par l'homéogène, et que leurs promoteurs contiennent donc des sites fixés par *Otx2*. Plus intéressant encore, l'étude de l'ensemble des sites de fixation d'*Otx2* au niveau de la NR pourrait nous permettre d'y mieux comprendre l'absence apparente de fonction de ce gène. Plusieurs hypothèses sont envisageables et peuvent facilement être testées par cette analyse : *Otx2* pourrait par exemple se fixer sur des sites non-pertinents à la régulation fonctionnelle de la rétine. De façon alternative, il pourrait en fait partager une grande majorité de ses sites de fixation avec son orthologue *Crx*, ce qu'une comparaison de leurs deux répertoires permettrait immédiatement de vérifier. L'inactivation d'*Otx2* n'aurait alors aucun effet dans les photorécepteurs du fait de la similitude dans les sites de fixation pour *Otx2* et *Crx*, qui mènerait à une redondance fonctionnelle. Une expérience de CHIP-seq sur *Otx2* a été menée au laboratoire pour mieux comprendre les modalités de fixation d'*Otx2* à l'ADN dans la neurorétine et le RPE ; les résultats en seront exposés dans le second chapitre de cette thèse.

#### III.4.3. Des partenaires protéiques potentiellement différents.

Le contexte cellulaire est un autre paramètre qui pourrait permettre d'expliquer l'absence apparente de fonction spécifique d'*Otx2* dans la neurorétine, comparée à son importance majeure dans le RPE. En effet, les interactions protéiques développées par un facteur de transcription peuvent modifier ses capacités de fixation et de transactivation. L'interactome d'*Otx2* dans l'un de ces tissus ou les deux nous permettrait sans doute de mieux comprendre les modalités de son action.

Les partenaires d'Otx2 sont, de façon générale, encore relativement méconnus. Les exemples qui ont été décrits permettent cependant déjà d'observer quelques caractéristiques intéressantes de l'interactome de cette protéine. Comme cela a été mentionné dans les parties I et II, il interagirait avec TLE/Groucho au niveau de la barrière mésencéphale/métencéphale, et de façon plus antérieure avec Meis2 (*Heimbucher et al., 2006, Agoston et al., 2009*). Le premier complexe protéique fait de la protéine Otx2 un répresseur transcriptionnel, ce qui lui permet de réprimer les acteurs du développement métencéphalique (et notamment *Fgf*). Le second lui donne des capacités activatrices, grâce auxquelles il peut induire le programme développemental du mésencéphale. La compétition entre ces interacteurs potentiels confère donc à Otx2 des propriétés moléculaires complètement différentes et complémentaires, essentielles à son fonctionnement correct au cours du développement.

Otx2 interagit également avec lui-même ainsi qu'avec Lim1 et HNF-3 $\beta$  (*Nakano et al., 2000, Briata et al., 1999*) au niveau de l'AVE. Plus intéressant, l'analyse des interactions de ces trois protéines a permis de dégager les domaines potentiels de liaison protéine-protéine d'Otx2 : le facteur de transcription se lierait à d'autres protéines via son homéodomaine et sa partie C-terminale (en amont de la queue Otx). Il est à noter qu'en plus de s'homodimériser, la protéine Otx2 est capable d'interagir avec *Otx3/Dmbx1*, membre putatif de la famille *Otx* (*Kimura et al., 2005*).

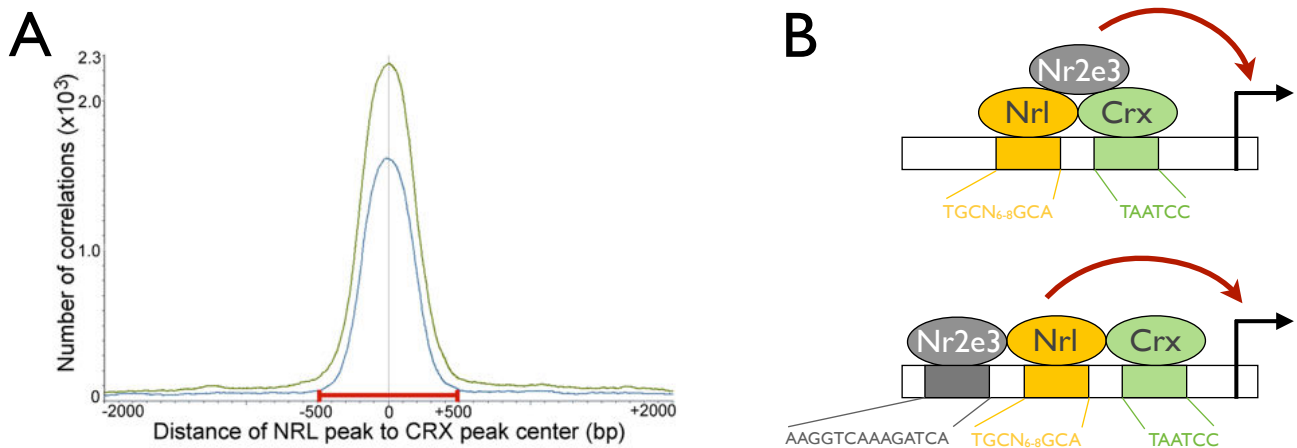
Un crible de l'ensemble des facteurs de transcription humains et murins en double hybride dans l'ovule de hamster a identifié de façon systématique sept partenaires potentiels d'Otx2 : *Dmrtd2, Mixl1, Tlx3, Emx1, HoxB13 et Zbtb3* (*Ravasi et al., 2010*). Certains d'entre eux n'ont pas encore été montrés comme étant co-exprimés avec Otx2, et sont peut-être des artefacts (*HoxB13, Zbtb3, Mixl1, Dmrtd2*) 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*). Un lien génétique avait d'ailleurs été précédemment identifié entre *Otx2* et *Alx4* dans les phénotypes d'otocéphalie (*Hide et al., 2002*).

Au niveau spécifique de la rétine, seules deux interactions ont été identifiées. La protéine Otx2 se lierait tout d'abord à Sox2 chez le Xénope pour activer le gène *Rax* essentiel au développement rétinien (*Danno et al., 2008*). Elle forme par ailleurs un complexe avec MITF et SOX9 au niveau du RPE pour y réguler des gènes spécifiques tels que *Best1* (*Martinez-Morales, 2003, Masuda et Esumi, 2010*). Il semble donc qu'Otx2 soit capable de former divers complexes protéiques dans la rétine.

Enfin, une seule interaction non-nucléaire a à ce jour été postulée, avec eIF4E, qui pourrait conférer un rôle de régulateur traductionnel à la protéine homéotique (*Nédélec et al., 2004*).

Comme la partie I.1. le montre, les protéines Otx présentent entre elles une forte homologie. Les protéines Crx forment une exception à cette règle chez les Mammifères, où elles présentent des séquences assez divergentes de celles des autres membres de la famille *Otx* (*Plouhinec et al., 2003*). Cependant, la protéine Crx murine continue de présenter des similitudes non-négligeables avec Otx2 : elles partagent 44% de leurs acides aminés, et leurs homéodomaines sont à 88% identiques (*Chen et al., 1997, Furukawa et al., 1997*). Les protéines connues pour interagir avec Crx dans la rétine pourraient donc être des interacteurs potentiels d'Otx2.

Plusieurs complexes protéiques impliquant Crx ont déjà été identifiés. Comme pour Otx2, l'homéodomaine et la partie C-terminale du peptide sont importantes pour ses interactions protéine-protéine. Crx interagit avec Nrl, Nr2e3, SP1, SP3 et SP4 *via* son homéodomaine (*Mitton et al., 2000, Lerner et al., 2005, Peng et al., 2005*), et avec P300/CBP grâce à son extrémité C-terminale (*Yanagi et al., 2000*). De la même façon que pour Otx2 également, les partenaires protéiques de Crx peuvent modifier son activité : sa liaison avec P300/CBP ainsi qu'avec SP4 en font un activateur tandis que SP1 et SP3 le transforment en répresseur. Enfin, ses interactions avec Nrl et Nr2e3 sont d'un intérêt particulier, du fait de l'importance de ces deux protéines dans le fonctionnement de la rétine. Les KO *Nrl*<sup>-/-</sup> et *Nr2e3*<sup>-/-</sup> présentent les mêmes caractéristiques : les rétines des animaux mutants sont dépourvues de bâtonnets, et sont enrichies en cellules semblables à des cônes (*Mears et al., 2001, Haider et al., 2001, Haider et al., 2006*). Ces deux gènes semblent donc impliqués dans la différenciation des photorécepteur, et assurent la production correcte des bâtonnets. *Nr2e3* est par ailleurs directement régulé par *Nrl*, ce qui suggère que leurs fonctions développementales seraient séquentielles (*Oh et al., 2008*). Qui plus est, ces deux facteurs de transcription sont capables de réguler positivement l'expression de gènes spécifiques aux bâtonnets (*Rehemtulla et al., 1996, Yoshida et al., 2004, Cheng et al., 2004*), et négativement celle de gènes cônes-spécifiques (*Yoshida et al., 2004, Chen et al., 2005, Haider et al., 2006*) ; ils auraient ainsi une importance dans la composition moléculaire et le fonctionnement corrects de la rétine. Cette hypothèse est confirmée pour *Nrl* : le *knockdown in vivo* de ses gènes-cibles aboutit à une dégénérescence ou à un dysfonctionnement de ses gènes-cibles (*Hao et al., 2012*). Enfin, leurs capacités transactivatrices entrent en synergie avec celle de *Crx* : une



**Figure 41 : Crx interagit fonctionnellement avec Nrl et Nr2e3**

(A) Fréquence d'apparition d'un site de fixation Nrl en fonction de la distance à un site de fixation Crx. Une expérience de ChIP-seq contre Crx a été menée, ainsi que deux contre Nrl (bleu : séquençage Illumina, vert : séquençage ABI). La distance de chaque pic Nrl au pic Crx le plus proche a été mesurée et la courbe des fréquences est représentée ici. On voit que la plupart des sites Nrl occupés se retrouvent à moins de 500bp de sites Crx occupés, ce qui traduit une étroite association fonctionnelle, et vient renforcer les données déjà connues sur leur interaction physique.

(B) Schémas structurels possible du complexe régulateur des photorécepteurs : Nrl, Nr2e3 et Crx interagissent tous les trois, et ont une activité transactivatrice synergique. Les sites de fixation pour Nrl et Crx sont le plus souvent retrouvés à proximité l'un de l'autre (voir (A)). Ces deux facteurs se fixeraient donc à l'ADN et interagiraient avec le troisième facteur, Nr2e3, sous sa forme fixée ou non, pour réguler les gènes spécifiques des photorécepteurs.

D'après *Hao et al., 2012*

combinaison de plusieurs de ces trois gènes est plus efficace qu'un seul d'entre eux (*Mitton et al., 2000, Cheng et al., 2004, Peng et al., 2005*). L'ensemble de ces données combiné à la capacité de Nr2e3 et Nrl à se lier à Crx suggère que ces trois facteurs de transcription pourraient former un complexe régulateur majeur de la fonction des bâtonnets. Et de fait, la majorité (48 à 65%) des sites de fixation à l'ADN du facteur Nrl dans la neurorétine sont situés à moins de 500 paires de base de sites de fixation occupés par Crx (*Hao et al., 2012, Figure 41A*), et des sites de fixation pour Nr2e3 sont également retrouvés à proximité moins immédiate. Ces facteurs pourraient donc tous trois se fixer à l'ADN sous forme d'un complexe qui régulerait ensuite le fonctionnement des photorécepteurs (**Figure 41B**) .

L'étude de l'interactome de la protéine Otx2 dans la rétine permettrait de mieux comprendre son rôle. Il serait par exemple possible de vérifier s'il partage les partenaires de Crx (signe ici aussi d'une redondance fonctionnelle) ou s'il développe des interactions



différentes de son orthologue. Plus généralement, l'ensemble des liaisons protéine-protéine d'*Otx2* donnerait un aperçu de son rôle potentiel au sein d'un tissu bien délimité. Le troisième chapitre des résultats de cette thèse rapportera la démarche entreprise au laboratoire pour répondre à cette question : une souris exprimant à son locus une version taggée d'*Otx2* a été construite, et a permis d'explorer l'interactome de cet homéogène dans la neurorétine.

# RESULTATS

## I. L'expression ubiquitaire d'*Otx2* déplace l'organiseur isthmique vers le pôle antérieur de l'embryon

Le facteur de transcription *Otx2* a de nombreuses fonctions tout au long du développement : antériorisation de l'endoderme distal, spécification du neurectoderme antérieur, régionalisation et différenciation du système nerveux central, développement et entretien des organes sensoriels. Son expression est à elle seule capable de spécifier un territoire ou un destin cellulaire particulier, ce qui implique qu'elle doit être étroitement régulée dans l'embryon.

Pour mieux comprendre comment la régulation de son expression permet à *Otx2* d'assurer ses fonctions en relation avec d'autres programmes développementaux, son rôle dans le positionnement de l'organiseur isthmique a été étudié. Ce centre organisateur responsable de la spécification et de la polarisation des mésencéphale et métencéphale est mis en place à la frontière postérieure d'expression qu'adopte *Otx2* à la fin de la gastrulation. Cette frontière est issue d'une restriction antérieure à E7,5 de l'expression d'*Otx2*, initialement présente (de E3,5 à E7) dans l'intégralité de l'épiblaste, et est par la suite maintenue par les interactions mutuellement répressives de *Gbx2* et *Otx2*. Ainsi, la régulation de l'expression d'*Otx2* au cours de la gastrulation semble directement responsable de la position de l'organiseur isthmique, et par conséquent des tailles respectives du mésencéphale et du métencéphale. Cependant les relations exactes entre l'antériorisation d'*Otx2* et la mise en place de l'isthme sont encore peu claires : est-elle nécessaire à l'expression du réseau génétique de l'organiseur ? Etant donné que l'expression d'*Otx2* était au départ uniforme dans l'épiblaste, existe-t-il une zone de compétence maximale à l'installation de l'isthme, ou la frontière postérieure d'*Otx2* dictera-t-elle toujours son émergence ?

L'étude du lignage cellulaire des cellules *Otx2*-positives a tout d'abord été menée chez l'embryon précoce dans des animaux *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>R26R/+</sup>*. Dans la lignée *ROSA26<sup>R26R</sup>*, la transcription du gène rapporteur *lacZ* dépend de la recombinaison d'une cassette par l'action d'une Cre. L'exposition d'embryons *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>R26R/+</sup>* au tamoxifène permet d'induire l'activité Cre dans les cellules *Otx2*-positives, et va donc y

entraîner l'expression de la  $\beta$ -galactosidase, ainsi que dans toute leur descendance. Le lignage des cellules qui exprimaient *Otx2* au moment de l'induction de la recombinaison peut donc s'observer à n'importe quel moment par révélation de l'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase. Le lignage des cellules *Otx2*-positives entre E6,5 (*i.e.* avant antériorisation) et E8,5 (*i.e.* après antériorisation) a ainsi pu être étudié. Cette analyse révèle que l'antériorisation de l'expression d'*Otx2* coïncide avec l'apparition d'une restriction de lignage : à partir de E7,5 les cellules exprimant *Otx2*, et donc situées dans la partie antérieure de l'embryon, ne sont plus jamais retrouvées dans le métencéphale. Ainsi, non contente de déterminer la position de l'IsO, la frontière postérieure d'expression d'*Otx2* délimite un compartiment développemental. Pour commencer à étudier son lien avec la régionalisation correcte de l'embryon, un modèle murin dans lequel la restriction antérieure d'*Otx2* peut être remplacée de façon inductible par une expression uniforme de l'homéogène au cours du développement a été développé. Ce modèle repose sur l'utilisation de la lignée *ROSA26<sup>Otx2-GFP</sup>*, qui permet l'induction conditionnelle de l'expression d'*Otx2* et de la GFP par la recombinaison de sites loxP effectuée à l'aide de la recombinase Cre. Des animaux *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>; ROSA26<sup>Otx2-GFP</sup>* exposés au tamoxifène à E6,5, lorsque l'expression d'*Otx2* est encore uniforme, expriment alors *Otx2* de manière ubiquitaire dans tout l'embryon. Dans ces embryons, le réseau de régulation génétique de l'isthme est correctement activé ; cependant, contrairement aux prédictions du modèle actuel, il s'établit à une position plus antérieure. Les relations spatiales entre les zones d'expression des différents acteurs du réseau sont conservées, ce qui suggère que les interactions génétiques qu'ils développent ne sont pas perturbées. Il semble qu'il est encore fonctionnel, car son déplacement antérieur coïncide avec un agrandissement du métencéphale putatif au détriment du mésencéphale.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un manuscrit qui sera très prochainement soumis à publication : «Ubiquitous expression of *Otx2* leads to anterior displacement of the midbrain-hindbrain boundary», par Bruno Fant, Antonio Simeone et Thomas Lamonerie.

## Ubiquitous expression of *Otx2* leads to anterior displacement of the midbrain-hindbrain boundary

Bruno Fant<sup>1</sup>, Antonio Simeone<sup>2,3</sup>, Thomas Lamonerie<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biologie Valrose, University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences, (CNRS, UMR7277, Inserm, U1091. Nice, F-06108, France.

<sup>2</sup>Institute of Genetics and Biophysics “Adriano Buzzati-Traverso”, CNR, Via P. Castellino 111, 80131 Naples, Italy. <sup>3</sup>IRCCS Neuromed, 86077 Pozzilli (IS), Italy.

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](mailto:lamonerie@unice.fr)

Keywords: *Otx2* , MHB, isthmic organizer, anterior patterning

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

### Acknowledgements:

We thank Michaël Delhorbe for expert handling of mice. This work was supported by grants from the CNRS to TL. BF was supported by a fellowship from French Research Ministry.

## ABSTRACT

The midbrain-hindbrain boundary (MHB) is a well-described organizing centre responsible for the specification and polarization of the mesencephalon and metencephalon. It is also a lineage restriction boundary that delineates two separate developmental compartments. The activity of a complex genetic regulatory network at the level of the MHB results in the establishment of non-overlapping domains of *Wnt1* and *Fgf8* on either side of the boundary that are essential for its properties. Previous studies have shown that this network is positioned at the expression boundary of *Otx2* and *Gbx2*, mutually repressive homeogenes expressed in the mid-/forebrain and anterior hindbrain, respectively. While *Otx2* is initially expressed throughout the epiblast, it becomes restricted to the anterior part of the embryo to give rise to the MHB at the level of its posterior limit of expression. Here we address the link between this anteriorization and the positioning of the MHB. Using cell lineage tracing experiments we first show that the *Otx2*-expressing territory is a separate early developmental compartment. We then demonstrate that in a mouse model where *Otx2* anteriorization is prevented, contrary to expectations, the MHB genetic network is conserved but shifted toward an anterior position. This leads to early respecification of embryonic territories. Our findings raise new hypotheses that are needed to improve the current model of MHB positioning.

## INTRODUCTION

During early development, the vertebrate neural plate is subdivided into distinct territories under the action of instructive signals such as Wnts, FGFs and retinoic acid. Each territory will then undergo a largely separate developmental program ; their establishment is critical to generate diversity during brain development. Along the anterior-posterior axis, three neuromeric compartments arise in the vertebrate brain: the forebrain, the midbrain and the hindbrain. The midbrain-hindbrain boundary (MHB) is a fundamental division of the nervous system and a major neuroanatomical division of the mature brain. Specification and differentiation of the midbrain and hindbrain are under the control of a potent secondary organizing center located at this boundary (*Marin anduelles, 1994*).

The MHB is a source of *Wnt1* and *Fgf8* signals, respectively expressed in narrow zones on the midbrain and hindbrain sides of the MHB (*Millet et al., 1996*). Both signals, and especially *Fgf8*, are necessary for the development of posterior midbrain and cerebellum (*Bally-Cuif et al., 1995, Crossley et al., 1996, Reifers et al., 1998, Jaszai et al., 2003, Chi et al. 2003, Panhuysen et al., 2004*). FGF8a and FGF8b are able to respectively induce midbrain development on the anterior side of the MHB, and to restrict it to promote hindbrain fate on the posterior side (*Liu et al., 2003*). Signalling from the MHB

also prevents cell migration between the midbrain and the hindbrain, thus creating in the mouse embryo a lineage restriction at the level of the MHB as soon as E8.5 (Zervas *et al.*, 2004, Langenberg and Brand, 2006, Sunmonu *et al.*, 2011). Establishment and maintenance of the signals conferring its function to the MHB are tightly regulated by a genetic regulatory network involving *Wnt1*, *Fgf8* and a set of transcription factors: *En1/2*, *Pax2/5*, *Otx2* and *Gbx2* (reviewed in Joyner, 2000, Raible and Brand, 2004).

*Otx2* and *Gbx2* are of paramount importance to position the MHB. *Otx2* is expressed first, throughout the epiblast, and is progressively restricted to the anterior third of the embryo at the end of gastrulation (Ang *et al.*, 1994). *Gbx2* expression starts at this time, in an area immediately posterior (Wassarman *et al.*, 1997, Millet *et al.*, 1999), and the MHB then arises at their mutual border of expression (Millet *et al.*, 1996). *Otx2* anteriorization and *Gbx2* induction are thought to be independent (Millet *et al.*, 1999, Acampora *et al.*, 1998). They are however not required to induce the MHB program, but the subsequent mutual repressive relationship they establish then ensures the precise positioning of the MHB (Li and Joyner, 2001, Millet *et al.*, 1999, Broccoli *et al.*, 1999); Lineage tracing experiments combined with induced knockout of *Gbx2* indicate that the two transcription factors also might be the first regulators of a lineage restriction between midbrain and hindbrain (Sunmonu *et al.*, 2011). Thus, the posterior border of expression of *Otx2* at the end of gastrulation sets the position of the MHB, and by extension the relative size of the midbrain and the hindbrain as well as the allocation of whole cell lineages to different territories. Evolutionarily, variations in the location of this border might have functional consequences as prospective neurons are then oriented towards a different fate. However, the link between *Otx2* anteriorization and establishment of the MHB remains unclear. Although it is known that a border between an *Otx2*-positive and a *Gbx2*-positive territory is sufficient to induce the establishment of an MHB (Hidalgo-Sanchez *et al.*, 1999, Irving *et al.*, 1999), the extent of competent areas for this process remains unknown.

Here we address the relationship between *Otx2* restriction to the anterior part of the embryo and establishment of the MHB using lineage tracing and genetic tools to maintain *Otx2* expression in prospective posterior regions. We show that the posterior limit of *Otx2* expression coincides with a lineage restriction boundary. Inducing permanent *Otx2* expression throughout the epiblast at 6.5 results in early embryonic lethality, as well as

morphological abnormalities at the midbrain-hindbrain level. Unexpectedly, expression of MHB actors is significantly anteriorized without perturbed interactions of the MHB gene network. This MHB anteriorization leads to an anterior extension of the hindbrain territory in our model. Therefore, as simple mutual repression between *Otx2* and *Gbx2* is not sufficient to explain MHB positioning, we propose new hypotheses.

## MATERIAL AND METHODS

*Generation and maintenance of transgenic mice.* Mice were housed with a 12-hours light/dark cycle. All mouse strains were maintained in 129/SV background. The *ROSA26<sup>Otx2-GFP/Otx2-GFP</sup>* line was obtained from A.Simeone (Di Salvio *et al.*, 2010) and maintained in an homozygous state. Females were crossed with *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>* males to obtain *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* animals. Those were in turn crossed with *ROSA26<sup>Otx2-GFP/Otx2-GFP</sup>* mice resulting in *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/Otx2-GFP</sup>* males, which were used to generate our embryos. The *ROSA26<sup>R26R/R26R</sup>* was maintained in an homozygous state. *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>R26R/R26R</sup>* males were obtained by crossing females with *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>* males to obtain *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* animals, which were in turn crossed with *ROSA26<sup>R26R/R26R</sup>* mice resulting in *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>R26R/R26R</sup>* males. Genotyping was performed by PCR on DNA extracted from digit tissue using the following primers (annealing temperature: 60°C): for *Otx2<sup>CreERT2</sup>* allele, forward: 5'--3', reverse: 5'-GACCGACGATGAAGCATGTT-3'; for *ROSA26<sup>Otx2-GFP</sup>* allele, forward: 5'-TGATGTATAGTGCCTTGACTAGAG-3', reverse: 5'-AGGTTGTTGGAGGCGCGCCGAT-3'; for *ROSA26<sup>R26R</sup>* allele, forward: 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTATCAG-3' reverse: 5'-CACACACCAGGTTAGCCTTTAAGC-3'. Animals were handled according to French regulation and the European Communities Council Directive. 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.

*Tamoxifen administration and embryo collection.* To generate *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos, *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/Otx2-GFP</sup>* males were mated with wild-type OF1 females in order to ensure maximum yield. The expected fraction of *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos in this setup was 50%. Vaginal plugs were checked daily; day of vaginal plug was taken as E0.5. For induction of CRE activity, tamoxifen was injected intraperitoneally to the pregnant female at 1 mg per 20 g of body weight at 2:00 PM. Control embryos received no injection. Embryos were also collected at 2:00 PM. All embryonic envelopes were removed and used for genotyping using the same primers as for mouse lines. Embryos were then fixed overnight at 4°C in 2% paraformaldehyde, and dehydrated with growing concentrations of methanol for stocking at -20°C. *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>R26R/+</sup>* embryos were generated by mating *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>R26R/R26R</sup>* males with wild-type females. Tamoxifen injection and embryo collection were similar, but embryos were processed immediately after dissection.

*LacZ staining.* In toto X-gal staining was performed as follows: dissected embryos were fixed for 2 hours in cold 2% paraformaldehyde, 1 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS at 4°C, washed several times in cold PBS, incubated 16h in X-gal staining solution (1mg/mL X-gal, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl, in PBS) at 30°C, and stored at 4°C in PBS-Methanol 1:1..

*Whole-mount in situ hybridization.* *En-1*, *Krox-20*, *Otx2*, *Gbx2*, *Fgf8*, *Wnt1*, *Shh*, *ephrinB2* and *EphB1* probes were gifts from M. Frohman, A. Joyner, A. McMahon, A. Neubüser, J. Rossant and D. Wilkinson. Whole-mount in situ hybridizations were carried as described by Wilkinson, 1992. For observation, embryos were dehydrated overnight in methanol after NBT/BCIP revelation. They were transferred in BABB (benzyl alcohol:benzyl benzoate 1:2) the next day for transparency and observed.

## RESULTS

### *Otx2* posterior limit of expression delineates a developmental compartment

We first asked whether the limit of *Otx2* expression was representative of a lineage restriction and could mark the border of a developmental compartment. To test this, we performed cell lineage tracing experiments using the *Otx2*<sup>CreERT2/+</sup>;*ROSA26*<sup>R26R/+</sup> reporter line. In this model, cells expressing *Otx2* at the time of tamoxifen injection, as well as their descendants, will express *LacZ*. When Cre activity was induced between E6.0 and E7.0, at a time when *Otx2* expression is ubiquitous (**Fig. 2**), descendants of *Otx2*-positive cells contributed to the whole embryo (**Fig.1A,B**). However, the induction of Cre activity at E7.25, when *Otx2* expression begins to be anteriorized, revealed that descendants of *Otx2*-positive cells in the posterior part of the embryo were far less numerous, although evenly distributed (**Fig.1C**). Finally, at E7.5 and later, descendants of *Otx2*-positive cells could only be found in the anterior-most part of the embryo. They could be observed in the first and second branchial arches when Cre activation occurred before E8.5, as well as in the forebrain and midbrain, with a sharp border at the MHB (**Fig. 1D-F**). This area coincides with the anterior area of *Otx2* expression at E9.5 (**Fig.1G**). Thus, *Otx2*-positive cells and their descendants are contained at all times in the *Otx2*-positive portion of the embryo. Together, these results indicate that the posterior limit of *Otx2* expression is a developmental compartment border.

### ***Otx2* expression can be maintained posteriorly in *Otx2Cre*<sup>ERT2/+</sup>;*ROSA26*<sup>Otx2-GFP/+</sup> embryos**

In wild-type embryos, *Otx2* is initially expressed throughout the epiblast, and becomes anteriorized between E7.5 and E8.5 (**Fig.2A,B**). Since its limit of expression after anteriorization separates two developmental compartments and is believed to be instrumental in positioning the isthmus organizer, we sought to abolish it. To this end, we took advantage of the *ROSA26*<sup>Otx2-GFP</sup> mouse line, in which expression of the coding sequences of *Otx2* and *GFP* can be induced by excision of a *STOP* cassette through Cre activity (*Di Salvio et al., 2010*). In *Otx2Cre*<sup>ERT2/+</sup>;*ROSA26*<sup>Otx2-GFP/+</sup> embryos, *Otx2* expression can be induced and indefinitely maintained in cells expressing *Otx2* at the time of tamoxifen injection. In order to achieve ubiquitous *Otx2* expression, we induced Cre recombination in those embryos by injecting tamoxifen at E6.5, and tracked the expression of the *ROSA26* allele by monitoring *GFP* expression. At E6.5, immediately after injection, no *GFP* transcripts could be observed in embryos (**Fig.2D**). However, at E7.5, *GFP* was expressed throughout the epiblast, and was maintained in the whole embryo at E8.5 (**Fig. 2F**). The *ROSA26*<sup>Otx2-GFP</sup> allele is therefore expressed in an ubiquitous fashion by E7.5 in *Otx2Cre*<sup>ERT2/+</sup>;*ROSA26*<sup>Otx2-GFP/+</sup> embryos. *In situ* hybridization using the *Otx2* coding



sequence as a probe revealed that *Otx2* mRNA expression was however lower in the posterior part of the embryo, i.e. under the control of the *ROSA26* promoter, than in the anterior part, under the control of its own promoter (*data not shown*). Thus, *Otx2* expression is maintained throughout these embryos.

### **Embryonic lethality and morphological abnormalities in embryos ubiquitously expressing *Otx2***

*Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos displayed early embryonic lethality when Cre activity was induced at E6.5. Whereas in control litters that received no tamoxifen, the observed frequency of *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos was around the expected Mendelian ratio of 50% (**Fig.3A**) throughout development up until birth, it rapidly dropped in tamoxifen-injected litters. *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos were present at the expected frequency in those litters at E8.5 ( $f=0.5\pm0.03$ , **Fig.3A**), indicating the absence of immediate toxicity of tamoxifen treatment. However, their observed ratio was dramatically reduced at E9.5 ( $f=0.15\pm0.05$ ) and E10.5 ( $f=0.12\pm0.03$ , **Fig.3A**) compared to control embryos ( $f=0.5\pm0.025$  and  $f=0.48\pm0/03$  respectively). Only few injected *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos reached birth ( $f=0.07\pm0.02$ ), and died rapidly afterwards. The ubiquitous expression of *Otx2* therefore leads to embryonic lethality.

Moreover, all surviving *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos in tamoxifen-injected litters displayed morphological abnormalities varying in intensity. We separated these abnormalities into two categories of severity (**Fig.3B**). Compared to wild-type, *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos from the «mild» category at E9.5 displayed an enlarged midbrain-hindbrain area with no visible isthmic constriction. At E10.5, the anterior hindbrain was far less well-delineated and the isthmic constriction was less marked (**Fig. 3B**); they were also hypervascularized and their telencephalon was slightly asymmetrical along the left-right axis (*data not shown*). Embryos from the «severe» category displayed a far more drastic phenotype: their neural tube always failed to close and no morphological landmarks could be observed in the anterior brain region (**Fig.3B**). The ubiquitous expression of *Otx2* therefore induces morphological abnormalities, especially in the midbrain-hindbrain area.

### **MHB transcription factors are expressed in an anteriorized fashion in embryos ubiquitously expressing *Otx2***

To investigate how the abolition of *Otx2* posterior limit of expression, which determines the position of the MHB, indeed leads to morphological defects in the midbrain-hindbrain region, we examined the expression of the transcription factors involved in the MHB genetic regulatory network in injected *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos. Since these embryos have never ceased to express *Otx2* in prospective posterior areas, from a locus that cannot be repressed by *Gbx2* activity, according to the model of *Otx2*/*Gbx2* mutual repression, we expected either disappearance or posteriorization of the MHB markers. The expression of *En-1* and *Gbx2* could be observed (**Fig.4A**), indicating that their activation is independent from *Otx2* repression during normal development. However, and to our surprise, compared to normal embryos, the expression of those two factors extended further towards the anterior pole of the embryo, (**Fig.4A**). We then sought to determine if the repression of the native *Otx2* genes by *Gbx2* was conserved in our model; by using an *in situ* probe containing large portions of the 3'UTR, we were able to clearly detect only the native expression of *Otx2*, and to confirm that it was indeed restricted to a smaller anterior region by *Gbx2* activity (**Fig.4A**). The expression of a more posterior marker of the hindbrain, *Krox-20*, as well as the pattern of forebrain marker *BF-1*, were however unchanged in injected *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos (**Fig.4A** and data not shown), suggesting that the patterning problems created by *Otx2* ubiquitous expression are restricted to the midbrain-hindbrain junction area.

To test whether the defects we observed were quantitatively significant, we performed several measurements on control and gain-of-function embryos. We took the *Krox-20* anterior stripe of expression that is not modified in embryos ubiquitously expressing *Otx2*, as a reference point. For *Gbx2* and *En-1*, we measured the distance from this reference point to the anterior limit of expression of the gene of interest, and normalized it using the total size of the head (A/B ratio, **Fig.4B**). Anteriorization of the considered limit of expression results in an increase of the A/B ratio. Using this method, we were able to show that *Gbx2* and *En-1* expression were significantly anteriorized (**Fig.4B**, A/B ratio for *Gbx2*= 0.62±0.01 in *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos vs. 0.44±0.02 in control, A/B ratio for *En-1*= 0.69±0.02 vs. 0.59±0.01, p<0.01, Student's *t*-test for small samples). For *Otx2*, we considered A the distance from the reference point to its posterior limit of expression: the A/B ratio was also significantly increased in injected *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos, showing that native *Otx2* was restricted even further in those embryos (**Fig.4B**, A/B ratio= 0.42±0.02 in *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos vs. 0.28±0.04 in control, p<0,01, Student's *t*-test for small samples). In embryos

where *Otx2* is ubiquitously expressed, therefore, the transcription factor regulatory network of the MHB is anteriorly displaced.

### **Antero-posterior, but not dorso-ventral signalling is affected in embryos ubiquitously expressing *Otx2***

We then wished to verify whether the relatively intact MHB regulatory network shifted anteriorly in injected *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos conserved its ability to position the *Wnt1* and *Fgf8* signals. In wild-type embryos, the *Fgf8* and *Wnt1* expression areas are respectively immediately posterior and immediately anterior to the common border of *Otx2/Gbx2* expression. If the positioning ability of the MHB network is conserved, the respective anterior and posterior border of *Fgf8* and *Wnt1* expression should also be displaced towards the anterior pole in embryos ubiquitously expressing *Otx2*. That was indeed the case (**Fig.5A**), as was confirmed by A/B ratio measurements performed as previously (**Fig.5B**, A/B ratio for *Fgf8*=  $0.56\pm 0.01$  in *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos vs.  $0.43\pm 0.03$  in control, A/B ratio for *Wnt1*=  $0.32\pm 0.005$  vs.  $0.26\pm 0.02$ ,  $p < 0,01$ , Student's *t*-test for small samples). *Fgf8* expression at the MHB was moreover far less well-delineated; it was also markedly increased at the level of the anterior neural ridge (**Fig. 5A**). Even in ubiquitously expressing *Otx2* embryos, therefore, *Fgf8* and *Wnt1* signals are positioned according to the *Gbx2* anterior limit of expression, and the positioning ability of the MHB is conserved.

Antero-posterior signalling is thus affected in injected *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos, at least at the level of the MHB. However, *Otx2* can also act as a regulator of dorso-ventral signalling through its repression of *Shh* (Puelles et al., 2003). In our model, *Shh* expression appeared unchanged between control and tamoxifen-injected *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos (**Fig.5A**, and data not shown). Dorso-ventral signalling does therefore not appear modified in embryos where *Otx2* anteriorization is abolished.

### **Early metencephalic identity is extended into the midbrain in embryos ubiquitously expressing *Otx2***

Since the genes involved in MHB function are displaced in *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos after Cre activation we wanted to ascertain whether metencephalic and mesencephalic identity were shifted accordingly. We used *ephrinB2* as a metencephalic marker, and *EphB1* as a marker of the extension of midbrain territory; *EphB1*-positive cells indeed span the entire midbrain and will shortly after E9.5

exactly mark the position of the MHB. Compared to control embryos, tamoxifen-injected *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos displayed an extended area of *ephrinB2* expression, and the posterior limit of *EphB1* is markedly anteriorized (**Fig.6A**). Measurements using the same method and reference point as before show that the expression border between *ephrinB2* and *EphB1* is significantly shifted towards the anterior end of the embryo (**Fig.6B**, A/B ratio for *ephrinB2*= 0.49±0.03 in *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos vs. 0.39±0.015 in control, A/B ratio for *EphB1*= 0.40±0.01 vs. 0.31±0.025,  $p < 0,01$ , Student's *t*-test for small samples). In embryos ubiquitously expressing *Otx2*, metencephalic identity is therefore extended anteriorly at the expense of mesencephalic identity.

## DISCUSSION

The *Otx2* posterior limit of expression after its anteriorization positions the midbrain-hindbrain boundary. We find that this limit also delineates a developmental compartment and is therefore instrumental to early brain regionalisation. Surprisingly, in embryos where this limit of *Otx2* expression is abolished by ubiquitous expression of the homeogene, the gene regulatory network of the MHB still emerges, but is displaced toward the anterior pole. This leads to early respecification of the midbrain-hindbrain area. New hypotheses are thus needed to better understand the initiation of the MHB organizing center.

### ***Otx2* expression delineates a developmental compartment**

Our lineage tracing experiments confirmed that cells expressing *Otx2*, as well as their descendants, do not leave the *Otx2*-positive anterior part of the embryo (**Fig.1**). Studies of *Wnt1*-positive-cell lineages had already shown that, by E9.5, mesencephalic cells in the dorsal part of the neural tube rarely crossed the already established MHB (Zervas *et al.*, 2004). *In vivo* time course analyses of cell movements at the level of the zebrafish MHB also suggested that a lineage restriction border exists between *Otx2*-positive and *Otx2*-negative cells (Langenberg and Brand, 2006). Finally, a recent study showed that *Gbx2*-positive cells are restricted to the anterior hindbrain, first in a *Gbx2*-dependent and then in a *Fgf8*-dependent manner (Sunmonu *et al.*, 2011). Our results prove that early-expressing *Otx2* cells are likewise confined to the anterior part of the embryo, and do not cross the MHB. Taken together, these results indicate that a conserved mechanism exists in zebrafish and mouse, by which both *Otx2* and *Gbx2* delineate very precocious developmental compartments. The lineage restriction boundary indeed seems to exist in mice as soon as E7.5, before the end of gastrulation. The

molecular processes by which *Otx2* and *Gbx2* mediate this cell segregation remain to be investigated. The *Otx* family is however known to modulate cellular adhesion properties, as well as the expression of various adhesion molecules (*Rhinn et al., 1999, Zakin et al., 2000, Housset et al., 2013*). It is therefore possible that *Otx2* and *Gbx2* mediate a differential affinity segregation process between cells of the prospective hindbrain and cells of the future midbrain by conferring different adhesive properties to the cells they are expressed in.

### **Morphological abnormalities in embryos ubiquitously expressing *Otx2***

Cre activation at E6.5 in *Otx2Cre<sup>ERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos results in often drastic morphological abnormalities, and even in early lethality. Most notably, in all embryos, even the less severely affected, the demarcation between midbrain and hindbrain is much less apparent (**Fig.3**); this is certainly due to the fact that the early mesencephalon displays markers of the metencephalon (**Fig.6**), indicating a respecification of the territory. Thus the observed enlarged vesicle may be a domain with a single identity. The same phenotype can be observed in embryos consistently expressing *Gbx2* in the whole mes/r1 region (*Sunmonu et al., 2009*), where the region subsequently fails to correctly specify. However, the MHB organizing center does not arise in this mouse model, indicating different underlying process. Contrary to what we report, moreover, neural tube closure occurs normally in these embryos and they do not display any embryonic lethality. These processes do therefore not result from a patterning defect, and should be specifically attributed to the ubiquitous expression of *Otx2*. Failure of neural tube closure could be explained by a perturbation of the cell adhesion properties. As mentioned previously, *Otx2* can regulate the set of adhesion molecules expressed at the membrane of the cell. It is possible that its ubiquitous expression modifies the adhesive properties of key cell populations and therefore perturbs the neural tube closure process.

### **MHB genetic network induction is independent from *Otx2* anteriorization**

The induction of all the actors of the MHB is thought to be independent from its positioning process by *Otx2* and *Gbx2*. Indeed, only their spatial relationships, and not their relative activations, are affected in *Otx2* and *Gbx2* simple mutants (*Martinez-Barbera et al., 2001, Wassarman et al., 1997, Millet et al., 1999*): they simply are expressed in a different embryonic territory. Even in embryos deficient for both *Otx2* and *Gbx2*, all the other genes involved in the establishment and maintenance of the MHB are expressed, but they do not undergo refinement of expression and remain active in a large

undifferentiated area (*Li and Joyner, 2001, Martinez-Barbera et al., 2001, Su et al., 2014*). However, when either *Gbx2* or *Otx2* was expressed, activation of the MHB network always occurred at their expression border. It was therefore unknown whether *Otx2* anteriorization was a necessary condition for the expression of the various actors of the future MHB. The results obtained by our model demonstrate that their induction is indeed independent from *Otx2* expression, and that the mutual relationships that constitute the isthmus organizer regulatory network only arise after separate induction of all its components.

### **Causes of MHB network anteriorization in embryos ubiquitously expressing *Otx2***

The main result provided by our genetic model is that the MHB position is paradoxically shifted anteriorly when *Otx2* is ubiquitously expressed in the embryo (**Fig. 4,5**). This phenotype is analogous to the one found in *Otx*-deficient embryos (*Acampora et al., 1997, Puellas et al., 2003*), and runs contrary to previous studies where *Otx2* and *Gbx2* were shown to position the isthmus organizer through mutual repression (*Millet et al., 1999, Broccoli et al., 1999, Martinez-Barbera et al., 2001*). In particular, when *Otx2* is expressed under the control of the *En-1* promoter, the whole MHB genetic network is appropriately activated at a more posterior position (*Broccoli et al., 1999*). Our model differs in two ways from the former: firstly, the level of expression of *Otx2*, as mediated by the *ROSA26* promoter, is lower than the one elicited by *En-1*. Secondly, and by design, there does not exist a posterior border of expression of *Otx2* at which the MHB network should arise. These differences could explain the different outcomes; nonetheless, our results call for new hypotheses concerning the mutual relationship between *Otx2* and *Gbx2* to position the MHB. Mutual repression between these homeogenes can indeed not account for the anteriorization of the whole MHB network, and in particular of *Gbx2*, shown in our experiments. One hypothesis is that *Gbx2* is only repressed at the level of sharp OTX concentration thresholds, in the absence of which its expression keeps anteriorizing, either by auto-activation or through a positive feedback loop with *Fgf8*. Thus, in our model where such a gradient does not exist, or in knock-out mice where the OTX protein concentration is not sufficient to establish such a threshold, *Gbx2* is expressed at a more anterior position. A corollary hypothesis is that low levels of OTX proteins might activate *Gbx2*, whereas high levels repress it. It is the case in *Xenopus*, where the injection of low doses of *Xgbx2* mRNA activate *Xgbx2*, while high doses repress the same gene (*Tour et al., 2002a, 2002b*). Therefore, in our model, low levels of *Otx2* in the anterior hindbrain

activate *Gbx2*, which is then anteriorized until the compound concentration of OTX proteins is enough to repress it, a scenario which may also occur in *Otx*-deficient mice. Finally, a less likely hypothesis is that *Otx2* expression maintenance in the posterior part of the embryo might further activates a pre-existing signalling pathway, leading to over-activation of *Gbx2*. *Gbx2* is activated by, and mediates, *Wnt8* and retinoic acid signalling (Bouillet et al., 1995, Li and Joyner, 2001, Rhinn et al., 2005, 2009): *Otx2* may be an activator of one of those pathways, by transcriptional activation of the genes they involve. Further experiments will try to discriminate between these hypotheses; should the latter be true, it would be interesting to study the relevance of these interactions during normal development.

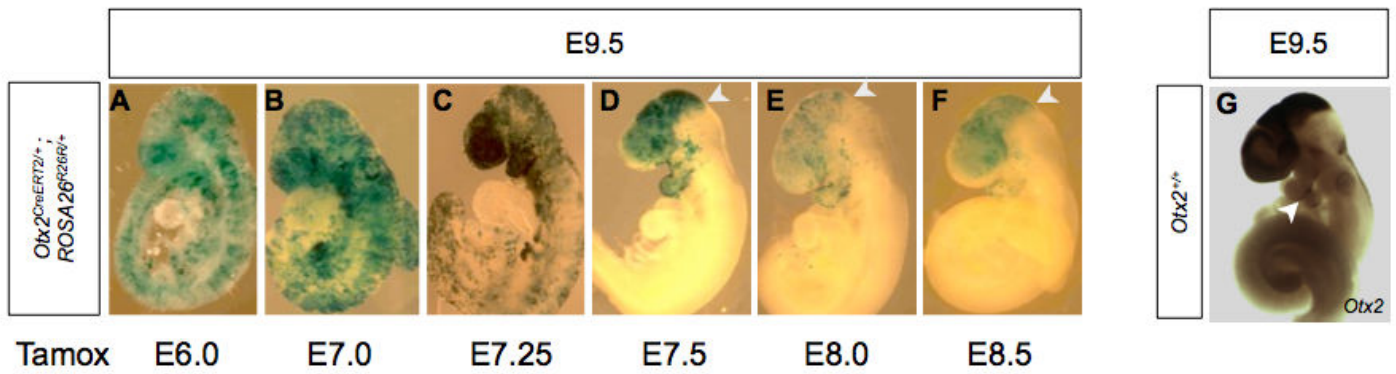
## REFERENCES

- Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Simeone A**, Genetic control of brain morphogenesis through *Otx* gene dosage requirement, 1997, *Development* **124**:3639-3650.
- Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Briata P, Corte G, Simeone A**, Visceral endoderm-restricted translation of *Otx1* mediates recovery of *Otx2* requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation, 1998, *Development* **125**:5091-5104
- Ang S-L, Conlon R A, Jin Ou, Rossant J**, Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse *Otx2* in ectoderm explants, 1994, *Development* **120**:2979-2989
- Bally-Cuif L, Cholley B, Wassef M**, Involvement of *Wnt-1* in the formation of the mes/metencephalic boundary, 1995, *Mech Dev* **53**(1):23-34
- Bouillet P, Chazaud C, Oulad-Abdelghani M, Dollé P, Champon P**, Sequence and expression pattern of the *Stra-7* (*Gbx-2*) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells, 1995, *Dev Dyn* **204**(4):372-382
- Broccoli V, Boncinelli E, Wurst W**, The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmus organizer, 1999, *Nature* **401**:164-168
- Chi C L, Martinez S, Wurst W, Martin G R**, The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum, 2003, *Development* **130**(12):2633-2644
- Crossley P H, Martinez S, Martin G R**, Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo, 1996, *Nature* **380**:66-68
- Di Salvio M, Di Giovannantonio L G, Acampora D, Prospero R, Omodei D, Prakash N, Wurst W, Simeone A**, *Otx2* controls neuron subtype identity in ventral tegmental area and antagonizes vulnerability to MPTP, 2010, *Nat Neurosci* **13**(12):1481-1488
- Hidalgo-Sanchez M, Simeone A, Alvarado-Mallart R-M**, *Fgf8* and *Gbx2* induction concomitant with *Otx2* repression is correlated with midbrain-hindbrain fate of caudal prosencephalon, 1999, *Development* **126**(14): 3191-3203
- Housset M, Samuel A, Ettaiche M, Bemelmans A, Béby F, Billon N, Lamonerie T**, Loss of *Otx2* in the adult retina disrupts retinal pigment epithelium function, causing photoreceptor degeneration, 2013, *J Neuro* **33**(24):9890 –9904

- Irving C, Mason I**, Regeneration of isthmic tissue is the result of a specific and direct interaction between rhombomere 1 and midbrain, 1999, *Development* **126(18)**:3981-3989
- Jaszai J, Reifers F, Picker A, Langenberg T, Brand M**, Isthmus-to-midbrain transformation in the absence of midbrain-hindbrain organizer activity, 2003, *Development* **130(26)**:6611-6623
- Joyner A J, Liu A, Millet S**, *Otx2*, *Gbx2* and *Fgf8* interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer, 2000, *Curr Opin Cell Biol* **12**:736-741
- Langenberg T, Brand M**, Lineage restriction maintains a stable organizer cell population at the zebrafish midbrain-hindbrain boundary, 2006, *Development* **132(14)**:3209-3216
- Li J Y H, Joyner A L**, *Otx2* and *Gbx2* are required for refinement and not induction of mid- hindbrain gene expression, 2001, *Development* **128**:4979-4991
- Liu A, Li J Y H, Bromleigh C, Lao Z, Niswander L A, Joyner A L**, FGF17b and FGF18 have different midbrain regulatory properties from FGF8b or activated FGF receptors, 2003, *Development* **130(25)**: 6175-6185
- Marin F, Puelles L**, Patterning of the embryonic avian midbrain after experimental inversions: a polarizing activity from the isthmus, 1994, *Dev Biol* **163**:19-37
- Martinez-Barbera J P, Signore M, Pilo Boyl P, Puelles E, Acampora D, Gogoi R, Schubert F, Lumsden A, Simeone A**, Regionalisation of anterior neuroectoderm and its competence in responding to forebrain and midbrain inducing activities depend on mutual antagonism between OTX2 and GBX2, 2001, *Development* **128**:4789-4800
- Millet S, Bloch-Gallego E, Simeone A, Alvarado-Mallart R-M**, The caudal limit of *Otx2* gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using in situ hybridisation and chick/quail homotopic grafts, 1996, *Development* **122**:3785-3797
- Millet S, Campbell K , Epstein D J, Losos K, Harris E, Joyner A L**, A role for *Gbx2* in repression of *Otx2* and positioning of the mid/hindbrain organizer, 1999, *Nature* **401**:161-164
- Panhuisen M, Vogt Weisenhorn D M, Blanquet V, Brodski C, Heinzmann U, Beisker W, Wurst W**, Effects of *Wnt1* signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region, 2004, *Mol Cell Neurosci* **26(1)**:101-111
- Puelles E, Acampora D, Lacroix E, Signore M, Annino A, Tuorto F, Filosa S, Corte G, Wurst W, Ang S-L, Simeone A**, *Otx* dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain, 2003, *Nat Neurosci* **6(5)**:453-460
- Raible F, Brand M**, *Divide et Impera* – the midbrain–hindbrain boundary and its organizer, 2004, *Trends Neurosci* **27(12)**:727-734
- Reifers F, Böhl H, Walsh E C, Crossley P H, Stainier D Y R, Brand M**, *Fgf8* is mutated in zebrafish *acerebellar (ace)* mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis, 1998, *Development* **125**:2381-2395
- Rhinn M, Dierich A, Le Meur M, Ang S-L**, Cell autonomous and non-cell autonomous functions of *Otx2* in patterning the rostral brain, 1999, *Development* **126**:4295-4304
- Rhinn M, Lun K, Luz M, Werner M, Brand M**, Positioning of the midbrain-hindbrain boundary organizer through global posteriorization of the neuroectoderm mediated by *Wnt8* signaling, 2005, *Development* **132(6)**:1261-1272
- Rhinn M, Lun K, Ahrendt R, Geffarth M, Brand M**, Zebrafish *gbx1* refines the Midbrain-Hindbrain Boundary border and mediates the Wnt8 posteriorization signal, 2009, *Neural Dev* **4**:12

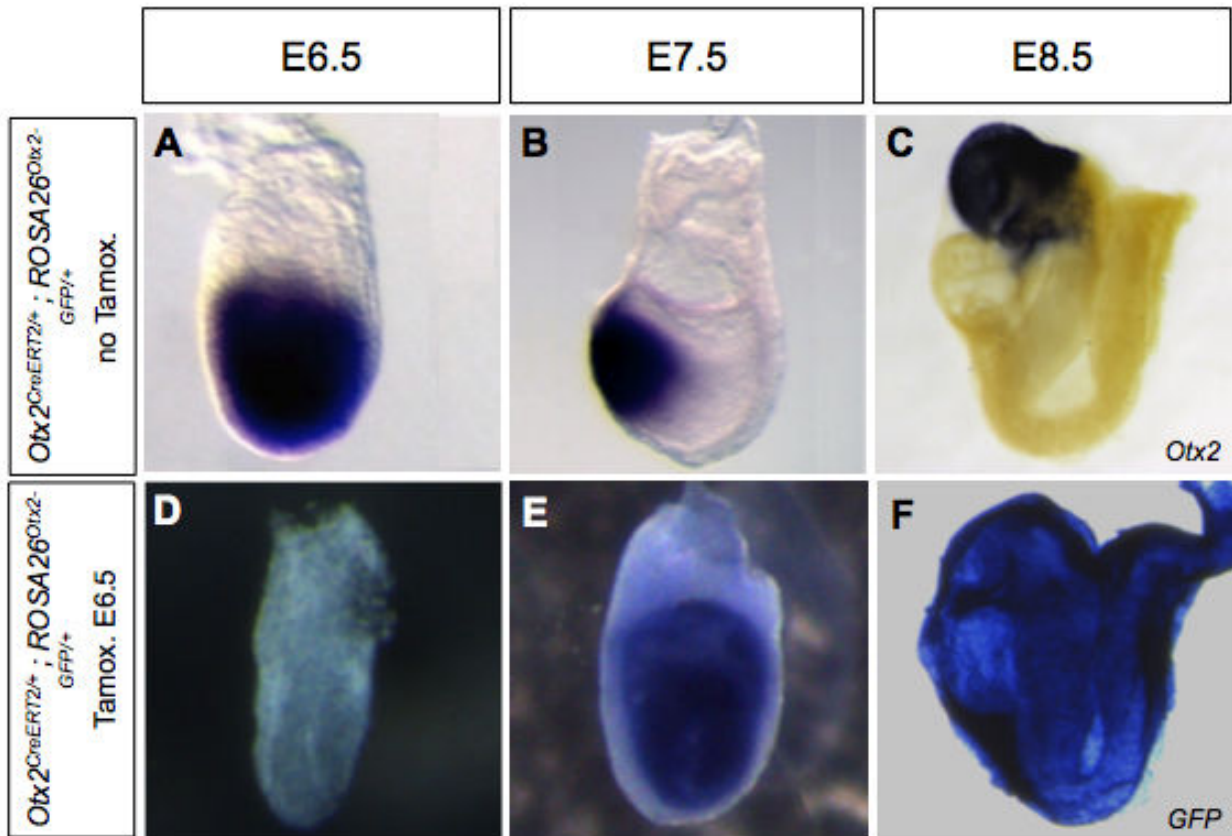


- Su C-Y, Kemp H A, Moens C B**, Cerebellar development in the absence of *Gbx* function in zebrafish, 2014, *Dev Biol* **386(1)**:181-190
- Sunmonu N A, Li C, Li J Y H**, Misexpression of *Gbx2* throughout the mesencephalon by a conditional gain-of-function transgene leads to deletion of the midbrain and cerebellum in mice, 2009, *Genesis* **47(10)**: 667-673
- Sunmonu N A, Li K, Guo Q, Li J Y H**, *Gbx2* and *Fgf8* are sequentially required for formation of the midbrain-hindbrain compartment boundary, 2011, *Development* **138(4)**:725-734
- Tour E, Pillemer G, Gruenbaum Y, Fainsod A**, *Otx2* can activate the isthmic organizer genetic network in the *Xenopus* embryo, 2002a, *Mech Dev* **110**:3-13
- Tour E, Pillemer G, Gruenbaum Y, Fainsod A**, *Gbx2* interacts with *Otx2* and patterns the anterior–posterior axis during gastrulation in *Xenopus*, 2002b, *Mech Dev* **112(1-2)**:141-151
- Wassarman K M, Lewandoski M, Campbell K, Joyner A L, Rubenstein J L R, Martinez S, Martin G R**, Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on *Gbx2* gene function, 1997, *Development* **124**:2923-2934
- Zakin L, Reversade B, Virlon B, Rusniok C, Glaser P, Elalouf J-M, Brûlet P**, Gene expression profiles in normal and *Otx2*<sup>-/-</sup> early gastrulating mouse embryos, 2000, *PNAS* **97(26)**:14388-14393
- Zervas M, Millet S, Ahn S, Joyner A L**, Cell Behaviors and Genetic Lineages of the Mesencephalon and Rhombomere 1, 2004, *Neuron* **43(3)**:345-357



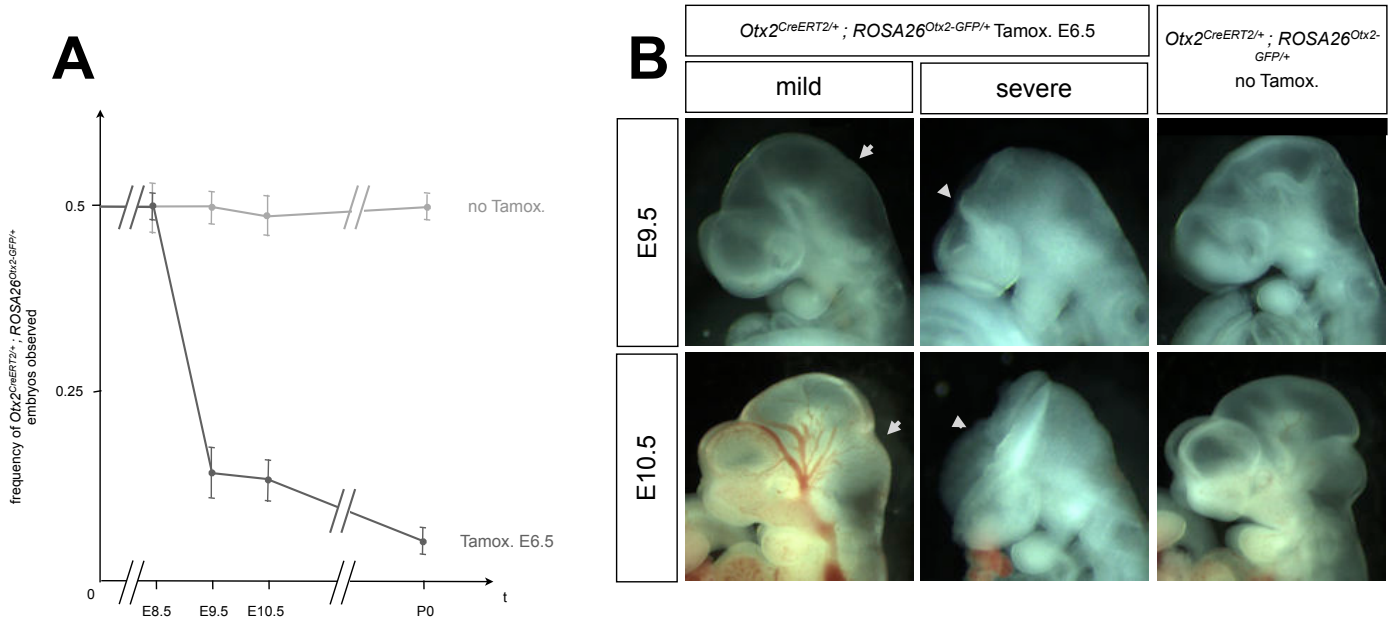
**Fig.1: the *Otx2* limit of expression is a compartment boundary**

Anterior is to the left. (A-F), LacZ staining of E9.5 *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;Rosa26<sup>R26R/+</sup>* embryos from litters injected with tamoxifen at (A) E6.0, (B) E7.0, (C) E7.25, (D)E7.5, (E) E8.0, (F) E8.5. The arrowheads in (D-F) mark the midbrain-hindbrain boundary. Descendants of *Otx2*-positive cells are restricted to the anterior part of the embryo concomitantly to *Otx2* anteriorization. (G), *Otx2* expression in E9.5 embryos revealed by *in situ* hybridization. The arrowhead points to *Otx2* expression in the branchial arches.

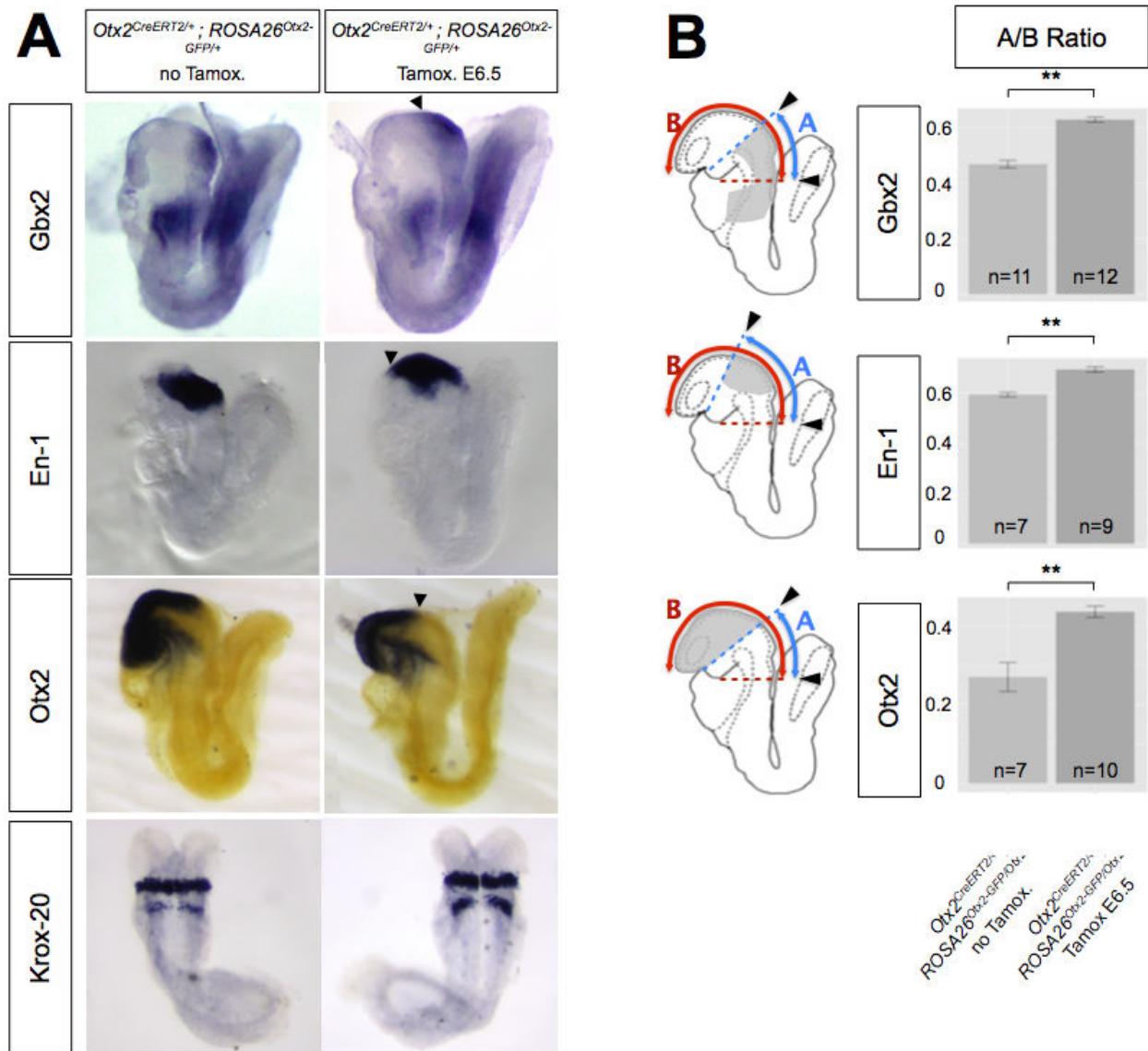


**Fig.2: *Otx2* anteriorization can be abolished in *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos**

(A-C) Expression of *Otx2* in control (no Tamox.) *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos, (D-F) Expression of *GFP* in *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos exposed to tamoxifen at E6.5 (Tamox. E6.5). *GFP*, and therefore *Otx2*, are expressed throughout the epiblast by E7.5 when Cre activity is induced at E6.5.

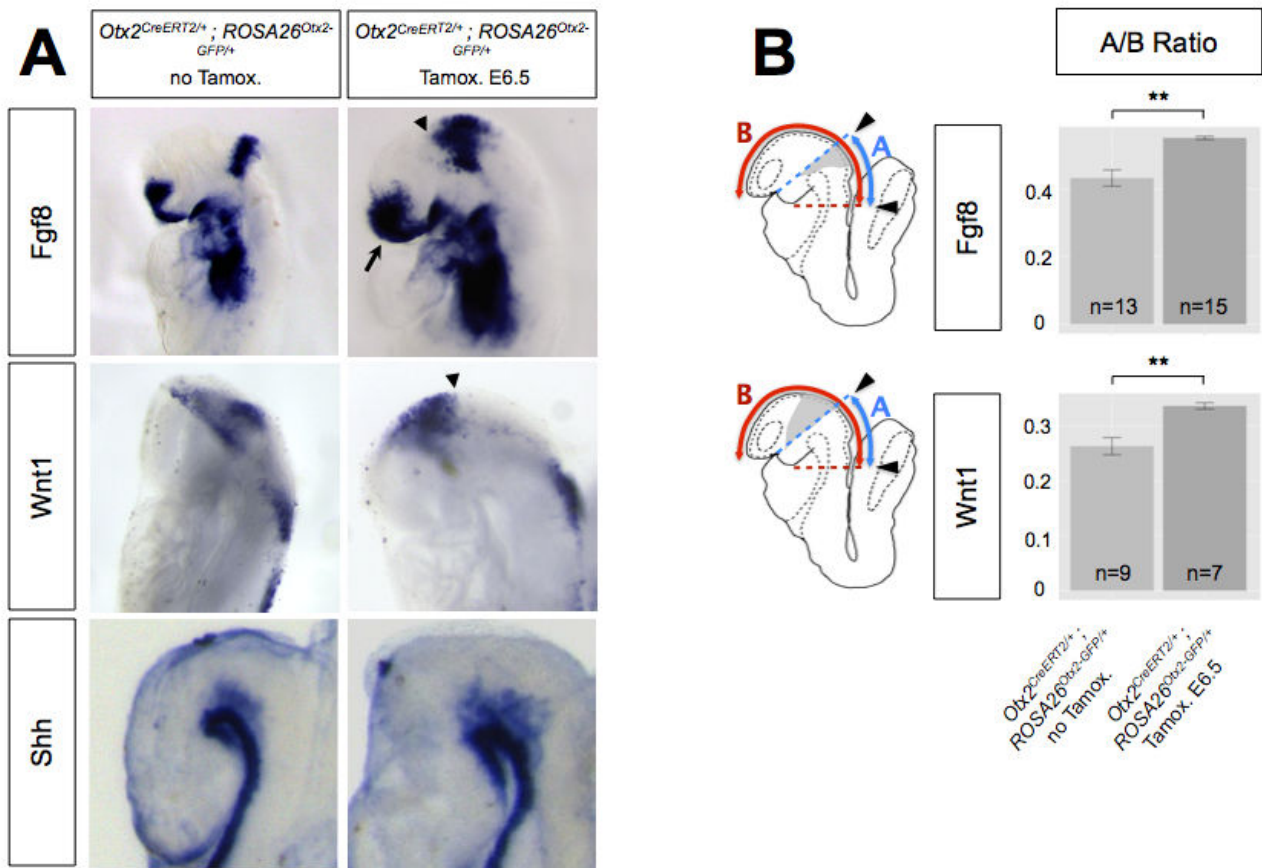


**Fig.3: Embryonic lethality and morphological abnormalities in embryos ubiquitously expressing *Otx2***  
 (A) Observed frequency of *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>; ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos in injected (*Tamox. E6.5*) vs control (*no Tamox.*) littered, as a function of time. Expected Mendelian frequency is 0.5 from a *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>; ROSA26<sup>Otx2-GFP/Otx2-GFP</sup> × WT* cross. Error bars = s.d. (B) Lateral views, anterior to the left, of control (*no Tamox.*) or E6.5 tamoxifen-exposed (*Tamox. E6.5*) *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>; ROSA26<sup>Otx2-GFP/+</sup>* embryos. Embryos were observed at E9.5 (*top*) or E10.5 (*bottom*). All tamoxifen-exposed embryos display morphological abnormalities, among which poor regionalization of the midbrain-hindbrain area and failure of the neural tube closure; their phenotypes can be divided into «mild» and «severe» categories. Arrows in the «mild» category points to the poorly-defined isthmus constriction. Arrowheads in



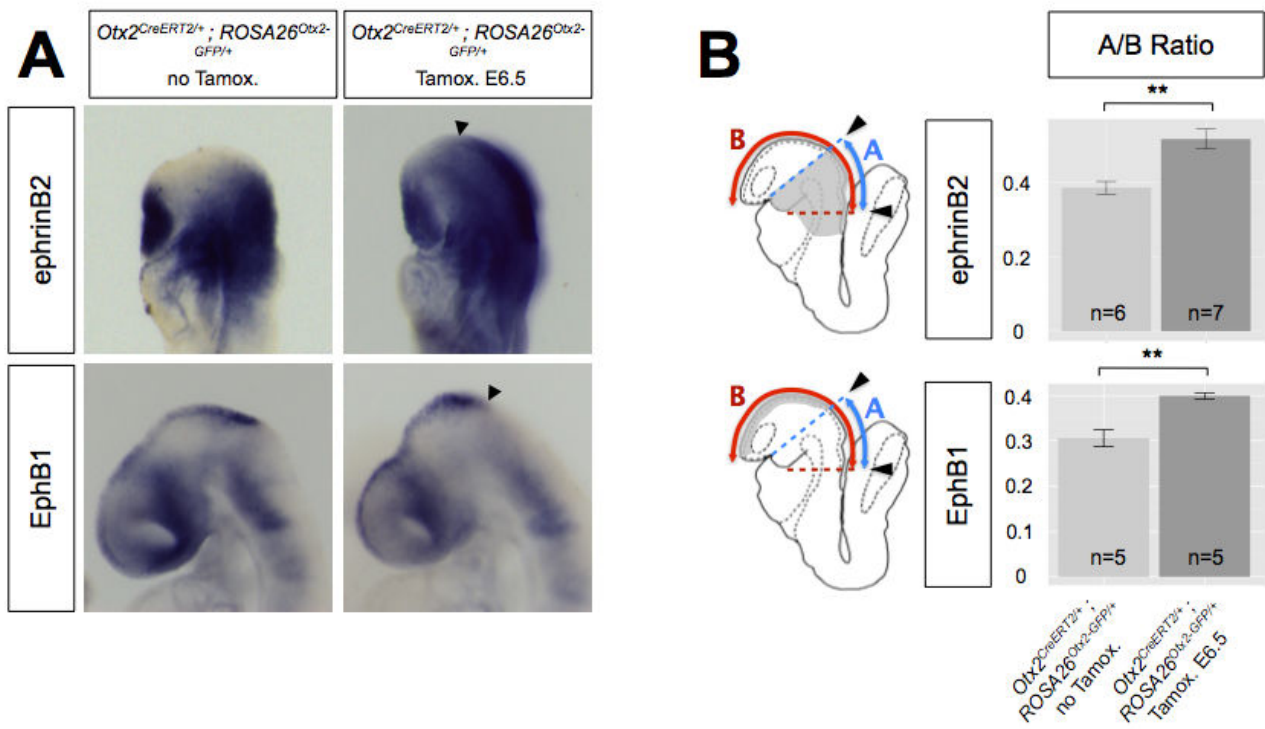
**Fig.4: The MHB genetic network transcription factors are anteriorized in embryos ubiquitously expressing *Otx2***

(A) RNA *in situ* hybridizations with the gene indicated on the left, condition shown at the top. The expression of the MHB transcription factor network is displaced toward the anterior pole of the embryo, whereas hindbrain patterning is not affected. (B) Quantification of the expression displacement on embryos hybridized with the appropriate probe. For each gene on the left are indicated the A and B distances measured on the embryos. The B distance is always the distance from r3 to the anterior end, the A distance is the distance from r3 to the anterior (for *Gbx2* and *En-1*) or posterior (for *Otx2*) limit of expression. Mean and s.d. of resulting A/B ratios are shown on the right (conditions indicated at the bottom, number of embryos measured for each condition/gene pair indicated as n). The measurements indicate that all expressions are significantly shifted towards the anterior pole (\*\*: p<0.01, Student's t-test for small samples)



**Fig.5: Antero-posterior, but not dorso-ventral signalling, is affected in embryos ubiquitously expressing *Otx2***

(A) RNA *in situ* hybridizations with the gene indicated on the left, condition shown at the top. The expression of the antero-posterior patterning signals is displaced toward the anterior pole of the embryo, whereas dorso-ventral signalling is unaffected. (B) Quantification of the expression displacement on embryos hybridized with the appropriate probe. Measurements were made as in Fig.4, the A distance is the distance from r3 to the anterior (for *Fgf8*) or posterior (for *Wnt1*) limit of expression. Mean and s.d. of resulting A/B ratios are shown on the right (conditions indicated at the bottom, number of embryos measured for each condition/gene pair indicated as *n*). The measurements indicate that all expressions are significantly shifted towards the anterior pole (\*\*:  $p < 0.01$ , Student's t-test for small samples)



**Fig.6: The early mesencephalon is respecified into metencephalon in embryos ubiquitously expressing *Otx2***

(A) RNA *in situ* hybridizations with the gene indicated on the left, condition shown at the top. The expression of the metencephalic marker *ephrinB2* significantly extends into the putative midbrain, at the expense of the expression of the mesencephalic marker *EphB1*. (B) Quantification of the expression displacement on embryos hybridized with the appropriate probe. Measurements were made as in Fig.4, the A distance is the distance from r3 to the anterior (for *ephrinB2*) or posterior (for *EphB1*) limit of expression. Mean and s.d. of resulting A/B ratios are shown on the right (conditions indicated at the bottom, number of embryos measured for each condition/gene pair indicated as *n*). The measurements indicate that all expressions are significantly shifted towards the anterior pole (\*\*:  $p < 0.01$ , Student's t-test for small samples)

## II. *Otx2* occupe des répertoires de sites de fixation distincts dans la rétine neurale et la rétine pigmentée

L'étude du rôle d'*Otx2* dans la régionalisation du mésencéphale et métencéphale a donc permis de démontrer que la régulation spatio-temporelle de son expression était un élément essentiel à sa fonction, et à son intégration au sein de processus développementaux plus larges. Cependant, d'autres mécanismes moléculaires doivent être à l'oeuvre pour expliquer la multiplicité de ses fonctions. Le contexte cellulaire des différents tissus où il est exprimé, et notamment les sites de fixation qu'il occupe et les partenaires protéiques qu'il développe, jouent sans doute un rôle important dans la modulation de son activité. Pour étudier ce rôle, les mécanismes moléculaires associés aux fonctions d'*Otx2* dans la rétine adulte ont été étudiés. Ce modèle est particulièrement adapté car il offre l'opportunité de comparer deux tissus stables, sortis du développement et de toute dynamique temporelle à moyen terme, dans lesquels *Otx2* occupe des rôles potentiellement très différents.

*Otx2* est en effet exprimé dans le RPE ainsi que dans les photorécepteurs et les cellules bipolaires de la rétine adulte (cf. partie III de l'introduction). Son importance est cependant très variable selon le tissu considéré. Si son expression dans le RPE est essentielle à la survie des photorécepteurs, son *knock-out* dans la neurorétine semble ne pas avoir d'effets délétères. Pour tenter d'expliquer cette importance relative, on peut faire l'hypothèse que les fonctions d'*Otx2* dans la neurorétine, potentiellement très différentes que celles qu'il assure dans le RPE, soient compensées par l'action d'un autre facteur de transcription.

La recherche des sites de liaison d'*Otx2*, qui sont des marqueurs importants de son activité dans un tissu, a ainsi été réalisée dans chacune des deux couches de la rétine par immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage de masse (ChIP-seq). Cette approche a été menée sur deux modèles murins impliquant deux anticorps différents. Elle a ainsi permis d'isoler des ensembles de sites de liaisons robustes et fiables, car identifiés dans les deux modèles.

Leur analyse a été menée en deux temps : la comparaison des ensembles de sites de fixation occupés par *Otx2* dans la neurorétine d'un côté, et le RPE de l'autre, a d'abord permis de révéler que cette homéoprotéine se lie à des endroits extrêmement différents



dans les deux tissus, y compris lorsque c'est à proximité des mêmes gènes. Cette observation nous permet de supposer que la fonction d'*Otx2* dans la neurorétine est très différente du rôle qu'il joue dans le RPE, puisqu'il se fixe à proximité de répertoires distincts de gènes dans ces deux tissus. Par ailleurs, l'ensemble des sites de fixation d'*Otx2* dans la neurorétine a été comparé à celui trouvé pour *Crx* dans une étude précédente. Leur fort recouvrement indique qu'*Otx2* et *Crx* occupent majoritairement les mêmes endroits du génome dans la neurorétine, et régulent donc potentiellement le même répertoire de gènes. L'absence de phénotype discernable dans la rétine neurale des souris KO pour *Otx2* est donc très probablement liée à un phénomène de redondance fonctionnelle : *Crx* serait capable d'assurer les mêmes fonctions qu'*Otx2* dans la neurorétine, et l'absence seule de ce dernier ne suffit pas à perturber le fonctionnement correct des photorécepteurs.

L'ensemble de ces résultats a été publié dans le journal *PLoS ONE* sous le titre «*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

Alexander Samuel<sup>1</sup>, Michael Housset<sup>1</sup>, Bruno Fant, Thomas Lamonerie\*

Institut de Biologie Valrose, University of Nice Sophia Antipolis, CNRS UMR7277, Inserm U1091, Nice, France

## Abstract

During mouse 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 mouse *Otx2* activities in the neural retina, we performed chromatin-immunoprecipitation followed by massively parallel sequencing (ChIP-seq) on *Otx2*. Using two independent ChIP-seq assays, we identified consistent sets of *Otx2*-bound cis-regulatory elements. Comparison with our previous RPE-specific *Otx2* ChIP-seq data shows 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 non-essential 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.

**Citation:** Samuel A, Housset M, Fant B, Lamonerie T (2014) *Otx2* ChIP-seq Reveals Unique and Redundant Functions in the Mature Mouse Retina. PLoS ONE 9(2): e89110. doi:10.1371/journal.pone.0089110

**Editor:** Thomas Langmann, University of Cologne, Germany

**Received:** December 3, 2013; **Accepted:** January 17, 2014; **Published:** February 18, 2014

**Copyright:** © 2014 Samuel et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from the CNRS to UMR 7277, ARC-projet 2011–2013 and Retina France-2012 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, BF was supported by a fellowship from French Research Ministry. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: lamonerie@unice.fr

These authors contributed equally to this work.

## 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 dystrophy 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 eye. 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 cell-autonomously 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 in the neural retina and comparison with *Otx2* binding sites in the RPE

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 immunoprecipitation 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 compare 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<sup>Otx2-GFP/+</sup>* 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 preliminary description of RPE Otx2-ChIP-seq was previously published [12]. These RPE data were subjected to in-depth analysis and comparison with neural retina ChIP-seq datasets. A total of  $4\text{--}16 \times 10^6$  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 contained 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

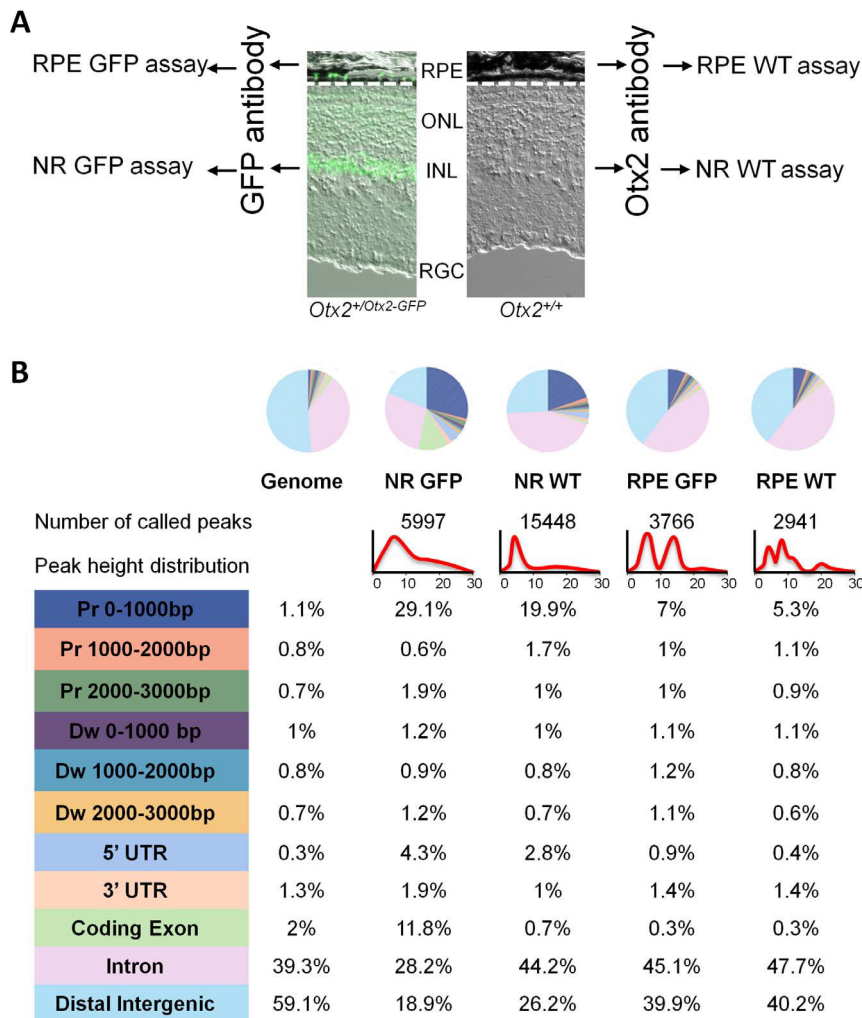
showed a unimodal shape, with a moderate height. By contrast, the distribution was bimodal in both RPE assays with two distinguishable populations of low- and medium-height (Fig. 1B). The finding of NR and RPE-specific OBR signature with different global characteristics suggests that Otx2-mediated gene 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 ( $p = 9.9 \times 10^{-15}$ , Fisher Exact P-value), sensory perception of light stimulus ( $p = 1.6 \times 10^{-14}$ ), vision ( $p = 2.6 \times 10^{-11}$ ), detection of light stimulus ( $p = 1.1 \times 10^{-6}$ ), response to light stimulus ( $p = 8.2 \times 10^{-6}$ ). 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 ( $p = 2.3 \times 10^{-5}$ ), cell junction ( $p = 1.0 \times 10^{-5}$ ), metal-ion binding ( $p = 3.5 \times 10^{-4}$ ), eye development ( $p = 2.2 \times 10^{-3}$ ), melanocyte differentiation ( $p = 2.4 \times 10^{-3}$ ) whereas these enrichments were absent or strongly reduced ( $p > 8.8 \times 10^{-3}$ ) 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 Tables S1 and S2). In the NR, all methods called the preferred Otx2 binding site TAATCC [14] with flexible T/G sequence specificity 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 flexible sequence specificity 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



**Figure 1. Tissue-specific Otx2 genome binding in the retina. A.** Experimental design: four independent ChIP experiments were performed. RPE and neural retina (NR) nuclei of  $Otx2^{+/Otx2-GFP}$  mice were subjected to the GFP assays using a GFP antibody, and RPE and NR nuclei of  $Otx2^{+/+}$  mice were subjected to the WT assays using an Otx2 antibody. **B.** Genome distribution of Otx2 bound regions (OBRs). Upper panel: colour-coded pie chart showing peak distribution of each ChIP-seq assay compared to global genome distribution. Below, number of OBRs and peak height distribution of each assay are shown. Lower panel: percentage of peaks in defined functional domains of the genome for each assay. Colour-code is as in pie charts.

doi:10.1371/journal.pone.0089110.g001

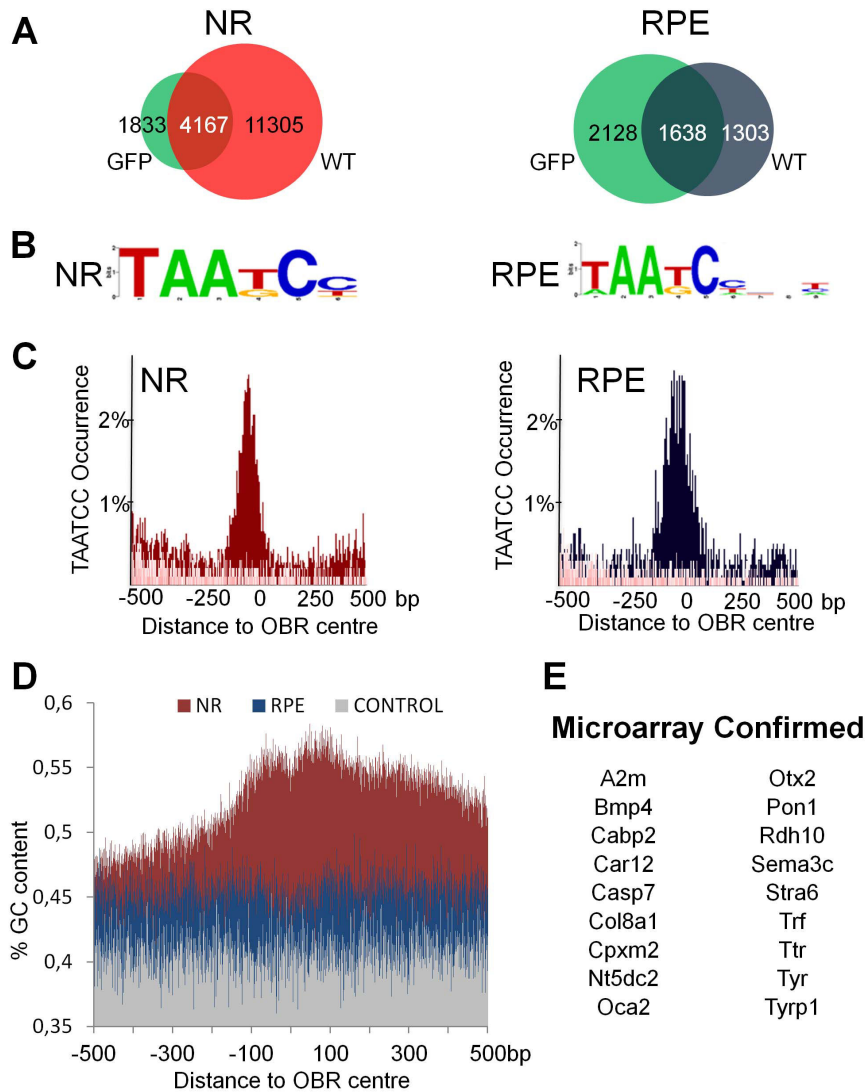
Otx2 preferentially binds to GC rich regions. In the RPE, the increase was evenly distributed around the OBRs and appeared modest (about 3%). In the NR, the GC percentage close to the OBRs was highly increased. It culminated over 55% GC in two symmetrical peaks flanking the centre of the OBRs, which 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, representing 78% of the RPE specific target genes identified by microarray (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. Figure 3B shows that only sequence conservation led to a mean rank ratio above 1, indicating a lower mean rank of the selected genes. For all other criteria, the relative



**Figure 2. Dual ChIP-seq assays identify relevant neural retina and RPE OBR core sets.** **A.** Venn diagrams showing the overlap of peaks identified in both ChIP-seq assays in each tissue. Intersections of GFP (green) and WT (red in NR, blue in RPE) assays represent two core sets of 4167 and 1638 binding sites in the NR and in the RPE, respectively. **B.** Motif enrichment analysis on the core datasets. Shown is the highest enriched TAATCC Otx2 binding consensus motif. **C.** Distribution of the TAATCC motif in 1 kb of genomic sequence around the centre of the core set of OBRs. **D.** GC content 1 kb around the centre of Otx2 bound regions in NR (red) and RPE (blue) compared to a random selection of 1000 regions in the genome (grey). **E.** RPE specific microarray confirmed genes with a called peak in their vicinity. doi:10.1371/journal.pone.0089110.g002

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.  $\chi^2$  tests supported the statistical significance of these results. Hence, filtering the most conserved OBRs also distinguishes relevant genes in the NR.

### Otx2-bound regions control different 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 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

**Table 1.** Ontology term enrichment in core and non-core set of the neuroretina.

Gene Ontology term	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

doi:10.1371/journal.pone.0089110.t001

and RPE core datasets shared only 426, indicating that Otx2 occupancy is largely distinct in the two 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 few 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, several PR specific genes have been shown to bear important cell-specific regulatory elements very close to their transcription start site (TSS) [16–19]. 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 TSS for all OBRs located from –10 kb to +10 kb 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 20 kb. 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. In contrast, 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 we 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. As Sp1 sites are GC rich, we thought their enrichment might be artificially increased due to random appearance in CpG islands where Otx2 is bound. However, we found Sp1 sites were still enriched in OBRs not located in CpG islands ( $p = 1 \times 10^{-32}$ ), supporting the significance of this result.

**Table 2.** Ontology term enrichment in core and non-core set of the RPE.

Gene Ontology term	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

doi:10.1371/journal.pone.0089110.t002

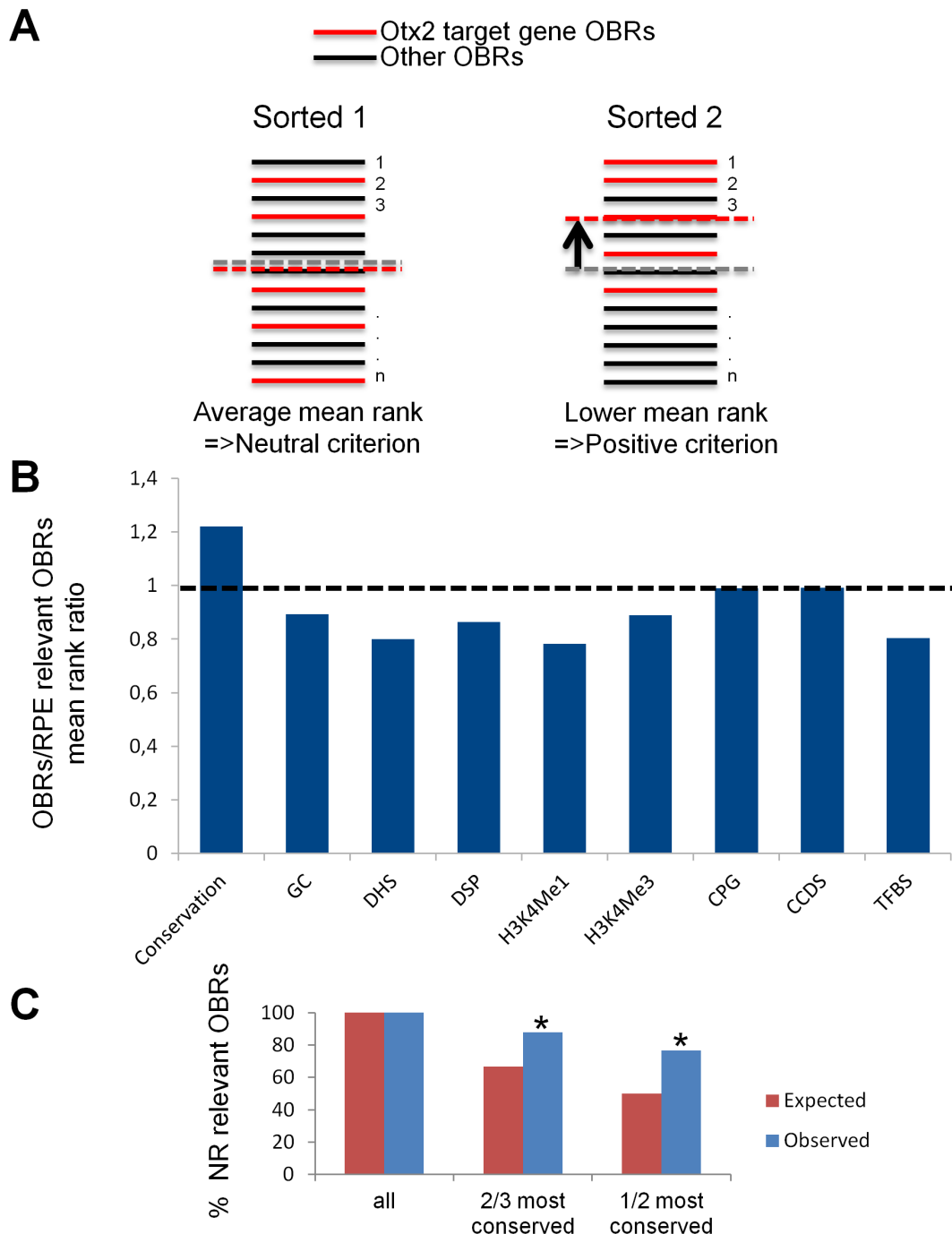
Other enhancer sites for GFY and NFY were enriched to a lesser degree (Table S1). In the RPE, an enrichment of Nkx2-5 (29.7% of OBRs), Lhx3 (24.5% of OBRs) and Pax7 (3.0% of OBRs) transcription factor binding site was found in Otx2 bound regions (Table S2). To further characterize the relationship between the enriched motifs and the Otx2 binding motif, we examined the distribution of Sp1 and Nkx2-5 motifs 1 kb 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 motifs 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 (Table S3) 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 lack of function 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 [17] 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.

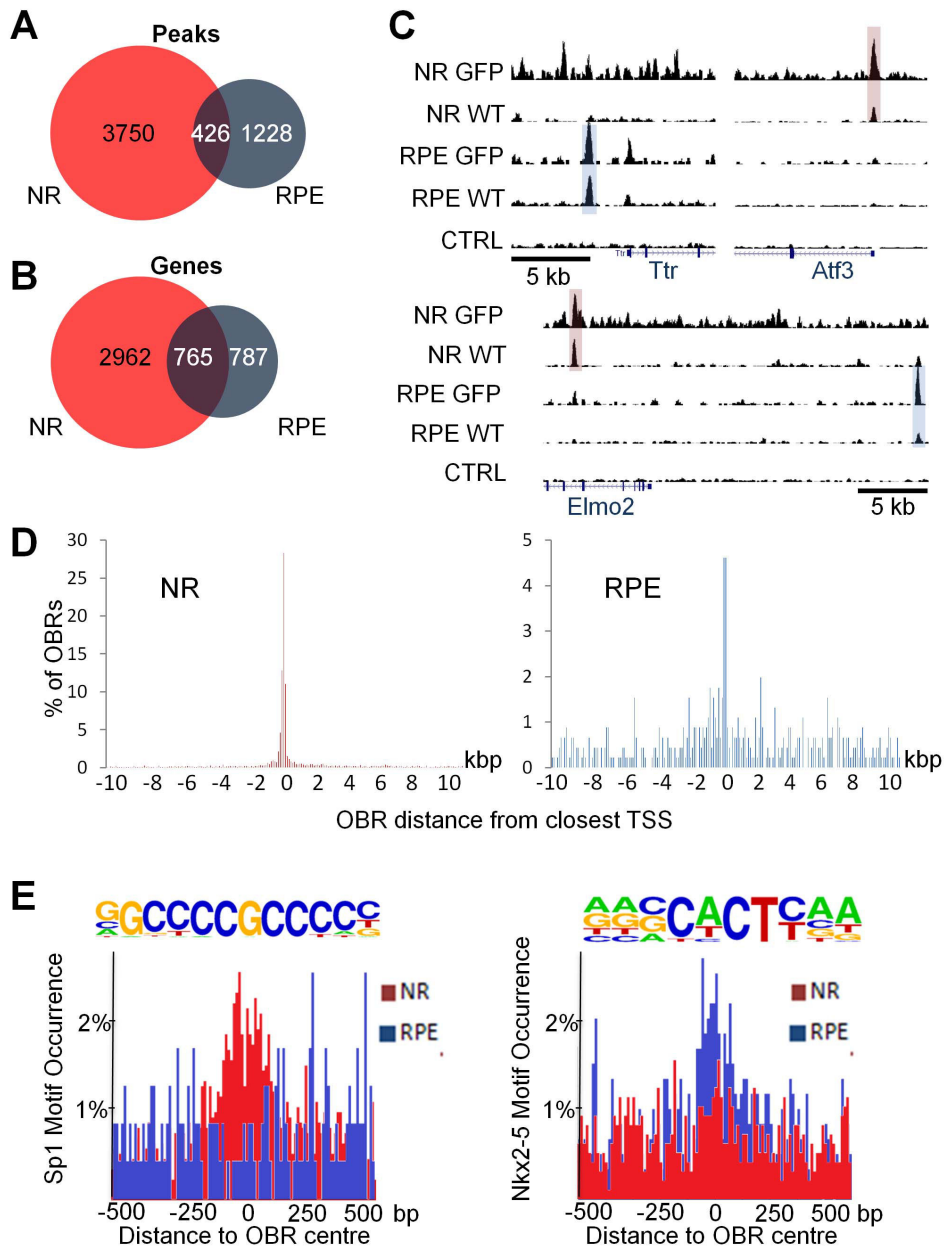
First, a global comparative analysis of Otx2 and Crx raw ChIP-seq data was carried out using the bioconductor DiffBind tool, clustering multiple ChIP-Seq experiments together into a correlation heatmap (Fig. 5A). Both Otx2 RPE WT and GFP ChIP-seq data clustered together in a very close group, and the two Crx replicates also clustered together in another close group. Interestingly, in this analysis, the Otx2 NR WT and GFP ChIP-seq data



**Figure 3. Evolutionary conservation marks OBR relevance.** **A.** Principle of the relevance assay method: OBRs are sorted according to a given criterion and the mean rank of OBRs close to Otx2 target genes (red) is compared to the average mean rank of all called OBRs according to this criterion. A similar rank indicates a neutral criterion and a lower rank indicates a relevant criterion. **B.** Shown is the ratio of all OBRs mean rank to the mean rank of OBRs close to microarray confirmed Otx2 target genes according to evolutionary conservation, GC content, DNase hypersensitivity (DHS) DNase sensibility and sensibility peaks (DSP), histone H3 lysine 4-mono- and tri-methylation (H3K4Me1, H3K4Me3), CpG islands (CPG), Consensus Coding sequences (CCDS) and known transcription factor bound regions (TFBS). The dashed line at the value of 1 represents the neutrality of all criteria. **C.** Application of the conservation criterion to the NR: expected and observed percentage of OBRs close to genes relevant to neural retina Gene Ontology terms among the 2/3 and 1/2 most conserved OBRs.  
doi:10.1371/journal.pone.0089110.g003

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 than 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



**Figure 4. Contrasted Otx2 genome occupancy in neuroretina and RPE.** **A.** Venn diagram showing the overlap of OBR core sets in NR (red) and RPE (blue). **B.** Venn diagram showing the overlap of the closest genes to core set OBRs. **C.** Representative examples of OBR localization in RPE-specific (Ttr), NR-specific (Atf3) and common (Elmo2) genes. Shown are browser captures for the 4 ChIP-seq assays and control. The gene is indicated in blue at the bottom. **D.** Distribution of distance from the closest transcription start site (TSS) in NR and RPE for all OBRs lying within 10 kb from a known TSS. **E.** Distribution of Sp1 and Nkx2-5 motif occurrence 1 kb around the centre of OBRs in the NR (red) and the RPE (blue). doi:10.1371/journal.pone.0089110.g004

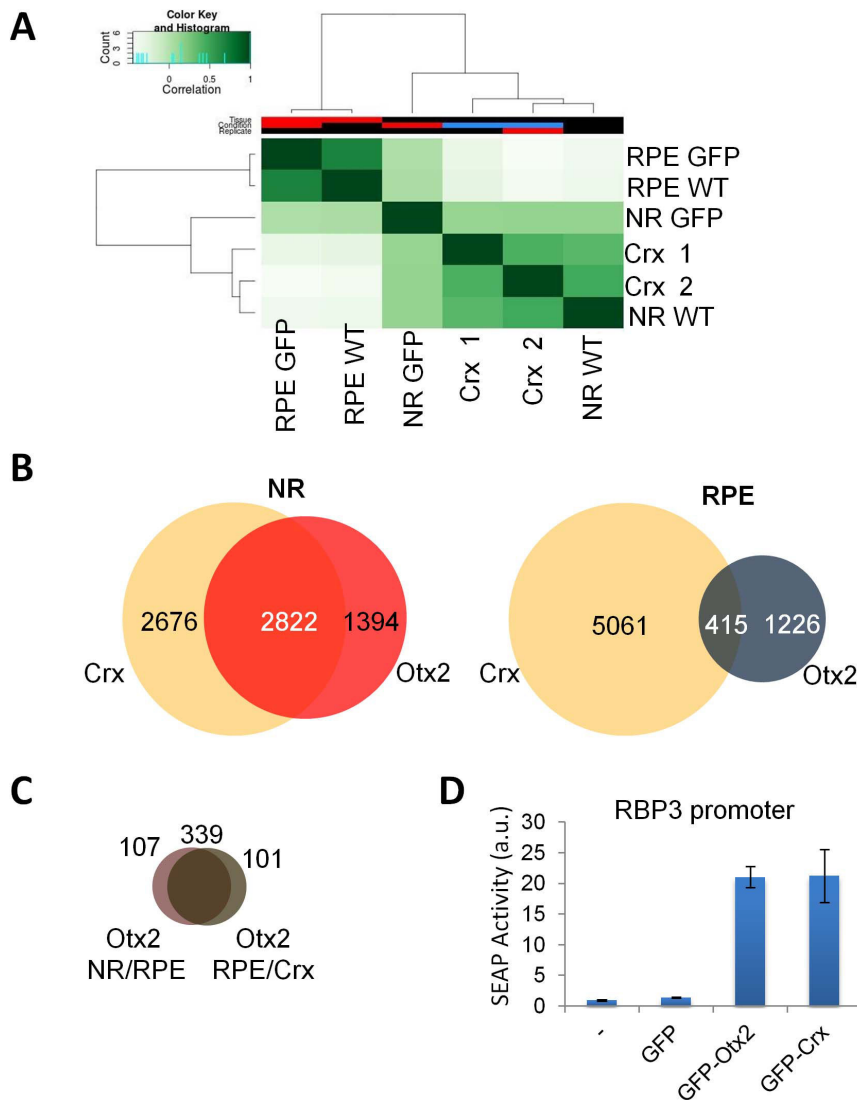
Crx only shared 415 peaks, 339 of which already belonged to the intersection of NR and RPE peaks (as shown in Fig. 4A) and were thus not RPE specific ones (Fig. 5C). Finally, in the RPE, only 101 genome sites representing 6% of OBRs were common with Crx bound regions whereas in the NR, 67.7% of Otx2 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





**Figure 5. Otx2 and Crx redundancy in the neuroretina.** **A.** Heatmap and dendrogram representation of Diffbind clustering of the indicated ChIP-seq experiments. **B.** Venn diagrams showing overlapping Crx bound regions (CBRs) and OBRs in the NR and in the RPE. CBRs represented the intersection of both Crx ChIP-seq replicates. **C.** Venn diagram showing the overlap between the above 415 common OBRs/CBRs in the RPE (grey) and the 426 OBRs common to RPE and NR (purple) shown in Fig. 4A. **D.** Otx2 and Crx transactivation of the *RBP3* promoter. doi:10.1371/journal.pone.0089110.g005

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 present strong evidence that this transcription factor regulates mostly non-overlapping gene sets in both retinal compartments.

Otx2 mainly acts as a transcriptional activator. This is supported by the fact that early deregulated genes after Otx2 knockout are almost all down-regulated [12], and by previous studies [21,22]. Therefore, to perform distinct functions in both NR and RPE, Otx2 must activate different target genes. 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 eye, 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 eye. First, chromatin structure may influence gene accessibility [23]. Rod photoreceptors have very specific chromatin architecture [24,25] 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. Although we identified binding sites for Lhx3 and Nkx2.5 in the RPE, the cognate transcription factors remain to be determined, as other RPE-expressed transcription factors might share similar binding motifs. 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 phosphodiesterase-beta and rod opsin genes [26]. 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*<sup>-/-</sup>; *Otx2*<sup>+/-</sup> embryos, upon low dosage of Otx proteins, RPE cells adopt an NR identity [6,27]. On the contrary, Otx2 overexpression in the NR activates an RPE-specific gene network [28]. 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 [29]. Although human pluripotent stem cells can be cultured to induce photoreceptor differentiation [30], and rat ciliary-derived cells can be transformed into cells showing a photoreceptor phenotype [31], the cellular plasticity of mammalian retinal cells is by far not as potent as in Zebrafish [32] or Goldfish [33]. 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 cannot easily be reconciled with the fine-tuned gene expression observed in complex organisms. It is therefore important to find out diagnostic elements that can help predict functional binding sites. One study has explored whether specific features of the primary sequences bound by Crx have informative value [34]. 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 [35].

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 hotspots. 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 [36]. 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 [37]. Symmetrically, Otx2 rescues epilepsy and corticogenesis abnormalities in *Otx1* knockout mice but fails to recover the lateral semicircular canal of the inner ear [38]. Whether Crx is able to replace Otx1 or Otx2 activities has not been tested so far. In the adult mouse, 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 argue in favour of their redundancy in the neural retina and hence bring a simple explanation for the absence of photoreceptor specific *Otx2* knockout phenotype.

## Methods

### Ethics Statements

All experiments were conducted under UE guidelines approved by local and state ethical committees. TL received the authorization to experiment #06-261 from the DDPP of the Préfecture des Alpes Maritimes, France, and protocols used in this study were approved by the local ethical committee CIEPAL-Azur (permit #Nce/2011-25).

### Chromatin Immunoprecipitation

For RPE ChIP, 40 mouse eyes were dissected to remove cornea, lens and neural 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 (around 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). 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, the eyes of 6 mice were dissected in ice-cold PBS. Cornea and lens were removed. RPE and neural retina were mechanically separated at the level of photoreceptor outer segment, avoiding nuclei cross-contamination between both tissues. 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<sup>Otx2–GFP/+</sup> mice in the GFP assay, respectively. An antibody raised against Laminin B (Santa-Cruz, California) and the antibody raised against GFP were applied to wild type chromatin and used as controls for WT and Otx2–GFP assays, respectively. The final DNA precipitates were dissolved in 20 µl of TE (20 mM Tris–HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).

### ChIP-seq, clustering of sequence reads and identification of OBRs

ChIP-seq experiments were performed according to standard protocols as previously described [39]. 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, 10 ng of DNA was used to generate ChIP–DNA library. Libraries were analyzed by bio-analyzer 2100 (Agilent), then, 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. All data were deposited on GEO, under accession number GSE54084.

Clustering for WT and Otx2–GFP assays was performed by first generating density (.wig format files) counting the number of tags in a 25bp sliding window for each ChIP-seq data set. Peak detection was performed using the MACS software (<http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/>) [40] 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 [41] was used to map called peaks on genomic regions. Further comparative analysis were yielded using R [42]. Proportional Venn diagrams were plotted using made4 [43] and VennDiagram [44] packages. ChIP-seq clustering was performed using Diffbind tool [45].

### Peak Ranking

Motiflab tool [46] 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. Conservation score was gathered from the multiz30way UCSC track, consisting of a multiple alignments of 30 vertebrate species from mouse to zebrafish. Sequences were sorted according to the mean Phastcons score [47] of the OBR. The DNaseHS peaks, H3K4me1 and H3K4me3 scores were based on peak regions from many different cell types, and the TFBS ChIP-seq score was based on data for many different transcription factors. 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.

### ChIP-seq motif Analysis

Three independent motif enrichment methods were used on the neural retina and RPE specific overlapping “core” set : MEME–ChIP software Version 4.9.0 [48], Homer 4.3 [49] and Motiflab [46]. The latter tool was also used for OBR ranking and GC content analysis. For Sp1 motif, correlation with CpG was studied by splitting the dataset in three subsets: i) close to the promoter (1 kb) with CpG island; ii) close to the promoter (1 kb) without CpG island; iii) distal OBR (>1 kb).

### Cell Culture

HeLa cells were cultured at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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 2 mM 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<sup>5</sup> HeLa cells per well were seeded in 24 wells plates and transfected by the CaPO<sub>4</sub> 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.

### Supporting Information

**Table S1** HOMER enriched motifs in the NR. (XLSX)

**Table S2** HOMER enriched motifs in the RPE. (XLSX)

**Table S3** Closest genes lists. (XLSX)

### Acknowledgments

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.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AS MH TL. Performed the experiments: AS MH TL. Analyzed the data: AS MH BF TL. Contributed reagents/materials/analysis tools: AS MH BF TL. Wrote the paper: AS TL.

## References

- Pires-daSilva A, Sommer RJ (2003) The evolution of signalling pathways in animal development. *Nat Rev Genet* 4: 39–49.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hennig AK, Peng GH, Chen S (2008) Regulation of photoreceptor gene expression by Crx-associated transcription factor network. *Brain Res* 1192: 114–133.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Tillo D, Hughes TR (2009) G+C content dominates intrinsic nucleosome occupancy. *BMC Bioinformatics* 10: 442.
- 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.
- 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.
- 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.
- Young JE, Vogt T, Gross KW, Khani SC (2003) A short, highly active photoreceptor-specific enhancer/promoter region upstream of the human rhodopsin kinase gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4076–4085.
- 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.
- Kusakabe T, Suzuki N (2001) A cis-regulatory element essential for photoreceptor cell-specific expression of a medaka retinal guanylyl cyclase gene. *Dev Genes Evol* 211: 145–149.
- Spieler D, Baumer N, Stebler J, Koprunner M, Reichman-Fried M, et al. (2004) Involvement of Pax6 and Otx2 in the forebrain-specific regulation of the vertebrate homeobox gene ANF/Hex1. *Dev Biol* 269: 567–579.
- Apostolou E, Hochedlinger K (2013) Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* 502: 462–471.
- Solovei I, Kreysing M, Lancot C, Kosem S, Peichl L, et al. (2009) Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137: 356–368.
- 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.
- Lerner LE, Peng GH, Gribova 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Marotte LR (1980) Goldfish retinotectal system: continuing development and synaptogenesis. *J Comp Neurol* 193: 319–334.
- 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.
- Loots GG (2008) Genomic identification of regulatory elements by evolutionary sequence comparison and functional analysis. *Adv Genet* 61: 269–293.
- 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.
- 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.
- Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Barone P, Perera M, et al. (1999) Differential transcriptional control as the major molecular event in generating Otx1<sup>-/-</sup> and Otx2<sup>-/-</sup> divergent phenotypes. *Development* 126: 1417–1426.
- 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 Kit as a novel regulated target gene. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 404–418.
- Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y, Liu XS (2012) Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nat Protoc* 7: 1728–1740.
- Ji X, Li W, Song J, Wei L, Liu XS (2006) CEAS: cis-regulatory element annotation system. *Nucleic Acids Res* 34: W551–554.
- R Development Core Team (2013) R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Culhane AC, Thioulouse J, Perriere G, Higgins DG (2005) MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. *Bioinformatics* 21: 2789–2790.
- Chen H, Boutros PC (2011) VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* 12: 35.
- 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.
- Klepper K, Drablos F (2013) MotifLab: a tools and data integration workbench for motif discovery and regulatory sequence analysis. *BMC Bioinformatics* 14: 9.
- Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, et al. (2005) Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* 15: 1034–1050.
- Machanic P, Bailey TL (2011) MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* 27: 1696–1697.
- 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.

### III. L'analyse de l'interactome d'*Otx2* dans la neurorétine y éclaire son rôle et révèle de nouvelles fonctions potentielles de l'homéogène

Comme la partie précédente l'a montré, *Otx2* se fixe dans la rétine à des ensembles de sites différents selon son tissu d'expression, qui corrélerent avec des importances relatives (et donc des fonctions) distinctes. Cette observation est par ailleurs potentiellement généralisable à l'ensemble de ses zones d'expression. Plusieurs paramètres permettraient d'expliquer la sélectivité tissulaire de fixation de ce facteur. Outre l'accessibilité variable des motifs TAATCC, qui peuvent par exemple se retrouver compactés dans l'hétérochromatine au sein de certains types cellulaires, l'interactome que développe *Otx2* dans chaque tissu peut jouer un rôle important dans la régulation de son activité. Les partenaires protéiques d'*Otx2* sont en effet capables de modifier ses capacités de transrégulation, et pourraient également influencer sur son affinité envers certains de ses sites de fixation.

Une nouvelle lignée de souris a été construite qui permettra de répondre à ces questions. Dans ces animaux, un tag conçu pour permettre la purification protéique (le TAP-tag) a été ajouté par recombinaison homologue à la fin du gène *Otx2* endogène. Les souris *Otx2*<sup>CTAP-tag</sup> expriment donc une protéine de fusion *Otx2* étiquetée, sous le contrôle de ses propres séquences régulatrices, et qui permet la purification des complexes protéiques dans lesquels elle est engagée.

L'utilisation de cette lignée a permis l'établissement de l'interactome exhaustif d'*Otx2* dans la neurorétine de souris adulte. Dans ce tissu, *Otx2* se lie à un grand nombre de protéines impliquées dans la régulation de la transcription. Cependant, il ne développe aucune des interactions connues de son paralogue *Crx* avec les autres régulateurs de la phototransduction et du fonctionnement des photorécepteurs. Bien qu'il partage le même répertoire potentiel de gènes cibles que son paralogue, il en diffère donc par son interactome : les capacités régulatrices des deux membres de la famille *Otx2* dans la neurorétine sont potentiellement différentes. Plus qu'une redondance, c'est une complémentarité qui existerait donc entre les deux paralogues.

L'analyse plus avancée de l'interactome d'*Otx2* révèle qui plus est des résultats surprenants : ce facteur de transcription a également pour partenaires un grand nombre de protéines impliquées dans l'épissage des ARN, leur maturation et leur export, ainsi que

dans la régulation de la traduction. Ces résultats suggèrent un nouveau rôle pour *Otx2* selon lequel il suivrait et régulerait l'ensemble des étapes d'expression de certains gènes depuis l'ADN jusqu'à la protéine, et pourrait ainsi étroitement contrôler leur niveau dans la cellule.

Ces résultats ont fait l'objet d'un manuscrit qui sera très prochainement soumis à publication : «Comprehensive interactome of *Otx2* in the adult neural retina», par Bruno Fant, Alexander Samuel, Stéphane Audebert et Thomas Lamonerie.

## Comprehensive interactome of *Otx2* in the adult neural retina

Bruno Fant<sup>1\*</sup>, Alexander Samuel<sup>1\*</sup>, Stéphane Audebert<sup>2</sup>, Thomas Lamonerie<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biologie Valrose, University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences, (CNRS, UMR7277, Inserm, U1091. Nice, F-06108, France.

<sup>2</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, INSERM U1068/Institut Paoli-Calmettes, 13273 Marseille CEDEX 9, France

\*Authors have contributed equally to this work

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](mailto:lamonerie@unice.fr)

Keywords: *Otx2* , interactome, retina, TAP-tag

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

### Acknowledgements

We thank the PBES facility in Lyon for the generation of chimera mice, and for expert handling of the mouse line. This work was supported by grants from the CNRS and Retina France to TL. BF was supported by a fellowship from French Research Ministry. AS was supported by a fellowship from French Research Ministry and the Université de Nice Sophia Antipolis.

## SUMMARY

The OTX2 homeoprotein is able to regulate different sets of genes in the course of its many functions. The protein partners of OTX2 have been shown to modulate its activity, and the interactome of this transcription factor may therefore play a key role in determining its function in a specific tissue. To address this question we report here the generation of a new recombined *Otx2*<sup>CTAP-tag</sup> mouse line, which expresses a tagged version of *Otx2* suitable for protein complexes purification. We validated this mouse line by establishing the comprehensive OTX2 interactome in the adult neural retina. In this tissue, *Otx2* function remains to be elucidated, and it is thought to be redundant with its paralogue *Crx*. The analysis of *Otx2* protein partners revealed that, contrary to *Crx*, *Otx2* did not develop interactions with factors known to be important for genetic regulation of phototransduction genes but showed specific partnership with factors involved in retina development. The relationship between *Otx2* and *Crx* in the neural retina should therefore be considered complementary rather than redundant. However, further study of the *Otx2* interactome revealed strong associations with the RNA processing and translation machineries, suggesting new potential roles for the protein: *Otx2* might be involved in the tight regulation of the expression of selected target genes all along the transcription/translation pathway. The *Otx2*<sup>CTAP-tag</sup> line appears suitable for a more systematic approach to *Otx2* protein-protein interactions.

The homeodomain transcription factor *Otx2* is an essential actor in various developmental processes. It is necessary for visceral endoderm anteriorization during gastrulation (Kimura *et al.*, 2000, Perea-Gomez *et al.*, 2001), for midbrain specification and differentiation (Broccoli *et al.*, 1999, Puellas *et al.*, 2003, Puellas *et al.*, 2004, Fossat *et al.*, 2006, Di Giovannantonio *et al.*, 2013) and for the development of sensory organs. It remains expressed in the adult eye where it is needed for photoreceptor maintenance (Beby *et al.*, 2010, Housset *et al.*, 2013). To confer these functions, different sets of target genes are regulated by *Otx2* activity depending on timing and tissue of expression (Zakin *et al.*, 2000, Housset *et al.*, 2013), through distinct sets of active binding sites (Samuel *et al.*, 2014, Yasuoka *et al.*, 2014). However, the molecular mechanisms underlying *Otx2* functional diversity remain largely unknown. Protein partners of this factor are known to vary among tissues (Nakano *et al.*, 2000, Masuda and Esumi, 2010), and are able to modify its binding (Yasuoka *et al.*, 2014) and transactivating (Yasuoka *et al.*, 2014, Heimbucher *et al.*, 2007, Agoston *et al.*, 2009) properties. OTX2 for instance interacts with co-activator MEIS2 to specify the mesencephalon (Agoston *et al.*, 2009), whereas it binds to TLE4 to repress metencephalic factors and position the isthmic organizer (Heimbucher *et al.*, 2007). The interactome of OTX2 in a given tissue may therefore be a key part of the explanation of its role.



To be able to comprehensively study the protein partners of OTX2 we developed a recombined mouse line called *Otx2<sup>CTAP-tag</sup>*. In this line the coding sequence of a tag designed for tandem-affinity protein purification (TAP-tag, *Bürckstümmer et al., 2006*) was inserted in frame with endogenous *Otx2* coding sequence (**Fig.1A**). Modified mice thus express a tagged version of *Otx2* under the control of its regulatory sequences. We chose a C-terminal TAP-tag fusion and put an excisable neo selection cassette immediately downstream the tag stop codon. Homologous recombination between the targeting vector and wild-type locus (**Fig.1A**) was carried out in ES cells and tested by Southern blot (**Fig. 1A**). Correct structure of the modified allele was assessed by PCR (**Fig.1B**) and sequencing after removal of the selection cassette by flp recombinase mediated excision. Mouse chimeras were generated by injection of recombinant ES cells into recipient blastocysts and used to transmit the *Otx2<sup>CTAP-tag</sup>* allele. The breeding of *Otx2<sup>CTAP-tag/+</sup>* mice only yielded 8% living *Otx2<sup>CTAP-tag/CTAP-tag</sup>* homozygous offsprings (8/97 animals scored), indicating that the *Otx2<sup>CTAP-tag</sup>* allele is hypomorphic. This phenotype resembles the *Otx2<sup>Otx2-GFP</sup>* mouse line (*Fossat et al., 2007*), which suggests that addition of a C-terminal sequence influences part of OTX2 activity. *Otx2<sup>CTAP-tag/+</sup>* animals were however perfectly viable and healthy, and were therefore used in this study.

To validate the *Otx2<sup>CTAP-tag</sup>* line we decided to investigate the interactome of *Otx2* in the adult neural retina, where its function remains to be elucidated. *Otx2*, which is essential for eye development (*Zuber et al., 2003, Nishida et al., 2003*), remains expressed in two tissues of the adult organ ; it is present in all the cells of the retinal pigmented epithelium (RPE) as well as in the photoreceptors and bipolar cells of the neural retina (*Fossat et al., 2007*). Its importance wildly varies in both tissues, however: whereas its expression in the RPE is absolutely essential for photoreceptor maintenance, we showed in a previous study that the induced knockout of *Otx2* in the adult neural retina does not seem to have any deleterous consequences on photoreceptor maintenance (*Housset et al., 2013*). ChIP-seq analysis of OTX2 binding sites in the latter tissue revealed that it shared most of its binding repertoire with its paralogue, *Crx* (*Samuel et al., 2014*), leading us to suggest a functional redundancy between those homeogenes. Many protein partners of CRX are already well-described ; we wished to see whether OTX2 shared these interactions, which would confirm our redundancy hypothesis.

We therefore performed protein complex purification from protein extracts of *Otx2<sup>CTAP-tag/+</sup>* adult retina in the aim of identifying *Otx2* partners. The TAP-tag consists in the fusion of two immunoglobulins G with a streptavidin-binding protein (SBP), separated by a TEV cleavage site ; as such, it allows for one- or two-step purification processes (Bürckstümmer *et al.*, 2006). Given the improving sensitivity of new tandem mass-spectrometry (MS/MS) methods, we decided to use only one purification step. Pull-down by streptavidin-coated beads resulted in efficient purification of the tagged OTX2 proteins (**Fig.1C**). We also noticed the presence of remanent wild-type OTX2, possibly due to the homeodimerization abilities of the protein (Briata *et al.*, 1999, Nakano *et al.*, 2000). We then performed MS/MS analysis of the purified protein fraction, comparing it with similarly purified wild-type protein extracts for enrichment. Of the 421 proteins identified by this method in at least one of the samples, we extracted a list of high-confidence protein partners by applying the following curation based on the number of peptide-spectrum matches (PSM) detected for each protein : firstly, only proteins that were enriched more than two times in the *Otx2<sup>CTAP-tag/+</sup>* extracts were considered. Secondly, we eliminated all proteins for which less than 4 PSM were observed, a value corresponding to the false discovery rate threshold. Finally, we manually curated the list to eliminate all proteins that were not observed as expressed in the same cell type as OTX2 according to molecular signatures of mouse neural retina cell types (Siegert *et al.*, 2012). This yielded a list of 128 high-confidence partners of OTX2 in the neural retina, all of which apart from OTX2 itself were undescribed up to now (**Table 1**).

To gain insight on the biological processes associated with OTX2 partners, we performed Gene Ontology analyses on the set of 128 partners using two different softwares : DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) and g:profiler (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/index.cgi>). In accordance with its role as a transcription factor, a large proportion of OTX2 interactors were involved in regulation of transcription (29 to 33%, **Table 2, 3**). Strikingly, however, almost no interaction could be found between OTX2 and other important actors of the neural retina genetic regulation network. For instance, the transcription factors NR2E3, NRL, or SP1/3/4, which are major regulators in the photoreceptors (Lerner *et al.*, 2005, Mears *et al.*, 2001, Haider *et al.*, 2001, Haider *et al.*, 2006), were not detected by our method (**Table 3**). They however interact physically and display functional synergy with *Otx2* paralog *Crx* (Mitton *et al.*, 2000, Cheng *et al.*, 2004, Lerner *et al.*, 2005, Peng *et al.*, 2005), and NRL active binding sites are generally found in close proximity to *Otx2/Crx* active binding sites (Hao *et al.*, 2012). Although they interact with each other (**Table 1, 3**),

Otx2 and Crx therefore do not share the same interactome, and relevant interactions for the regulation of phototransduction genes seem to preferentially involve Crx. Rather than the functional redundancy we hypothesized, there seems to be a functional difference and complementarity between the two homeogenes, with Crx being the specialized actor in the adult phototransduction gene regulation. Given that 34% of Otx2 partners in the adult retina have gene ontologies relative to developmental processes (**Table 2**), and that its activity is essential for specification (Nishida et al, 2003) and for the correct differentiation of photoreceptors (*Emerson et al., 2014, Wang et al., 2014*), it is possible that *Otx2* expression and interactome in these cells represent specific developmental modules that are being reused for adult functions, yet to be uncovered.

Further ontological analysis of the 128 OTX2 protein partners, however, potentially reveals new molecular mechanisms involving this transcription factor. Firstly, as many as 33% of OTX2 interactors may play a role in cellular component organization and cell architecture (**Table 2**), which suggests that the subcellular localization of this homeoprotein is highly controlled ; OTX2 notably develops strong interactions with intermediate filaments proteins (*Krt16, Krt42, Krt72*). More interestingly, it also interacts with proteins involved in plasma membrane trafficking and exocytosis at the synaptic level, such as *Lin7a/c* and especially *Cplx3*, a photoreceptor- and bipolar-specific member of the complexin family involved in regulating the release of synaptic neurotransmitter vesicles in ribbon synapses (*Reim et al., 2005*). It has been suggested that OTX2 can travel along neural pathways of the visual system (*Sugiyama et al., 2008*) upon reception of a stimulus; it may do so by cooperation with the neurotransmitter release system.

Yet the most striking aspect of the OTX2 interactome is that, as well as transcription regulators, it also comprises proteins involved in RNA splicing and export, and even in translation processes (**Table 3**). OTX2 interacts with three splicing factors (U2AF1, U2AF2 and SFPQ), and its most-enriched partner, PDIP3, encoded by the *Poldip3* gene, functions in mRNA export and is a potent regulator of translation efficiency through recruitment of the S6K1 kinase (*Folco et al., 2014, Ma et al., 2008*). It also interacts with several other actors of the RNA export machinery, such as NXF1 and TREX complex member SARNP/ CIP29. Finally, it may be involved in the early steps of translation regulation as it binds to PABPC1 and EEF1A1, as well as to several ribosomal proteins (**Table 3**). It had already been suggested that *Otx2* may play a role in regulating translation in the axons of the olfactory systems (*Nédélec et al., 2004*). We propose here a larger model in which OTX2

might accompany the expression of certain target genes throughout all the steps of the transcription, translation, and subcellular localization processes, and may have a regulatory effect at every step of the way (**Figure 2**). More than a transcription factor, *Otx2* might therefore be in certain cases a tight regulator of the protein output resulting from transcriptional modulation of a gene. Further studies will aim at identifying which subset of target mRNAs is concerned by this intriguing mechanism.

In summary, we here report the generation of a novel *Otx2* tagged mouse line which allows for comprehensive analysis of the interactome of this homeogene. Validation of this line in the adult neural retina tissue revealed that *Otx2* plays a much different role than *Crx* in the photoreceptors, and that genetic regulation of phototransduction genes in this cell type may be mainly attributed to its paralogue *Crx*. The neuroretinal interactome of OTX2 also allowed us to postulate new functions of the protein, which may be able to regulate the gene-to-protein yield at several points of the transcriptional and translational process. The *Otx2*<sup>CTAP-tag/+</sup> mouse line will be an invaluable tool to further decipher *Otx2* function in mouse development and in all different adult tissues where it is expressed, as it will help us understand how the cellular context can influence its activity. In protein-rich tissues where the contamination probability increases, the double-step purification enabled by the TAP-tag will furthermore be of great interest to enhance the detection specificity of OTX2 protein partners; it may also allow for establishment of a conserved strong interactive core for OTX2 in all tissues where it is expressed.

## MATERIALS AND METHODS

### Mouse breeding and phenotyping

Animals were housed with a 12-hour light/dark cycle (7am-7pm) and allowed access to food and water *ad libitum*. The mouse line was maintained in a 129/sv background. Genotypes were determined by PCR analysis of digit DNA using three primers (annealing temperature : 60°C): 5'-GCTGGCTCAACTTCCTACT-3' was the forward primer, leading to the amplification of a 562 bp fragment on WT alleles with 5'-TTGGTTGCATGTCGCTAGAA-3', and to the amplification of a 357bp fragment on recombined alleles with 5'-CTTCTCGTCCATGAGATCCT-3'.

### Generation of *Otx2*<sup>CTAP-tag</sup> line

To generate the targeting vector, a 5-step cloning strategy was adopted. First, a *NheI/BamHI* fragment containing the coding sequence of the TAP-tag was inserted downstream of a mutated-stop codon *Otx2* cDNA coding sequence. This sequence was then digested with *EcoRI/BamHI* and concatenated with the 2.5kb 3' recombination arm. The *BglII/BamHI* neo selection cassette was inserted at the *BamHI* restriction site

immediately downstream from the TAP-tag. Finally, the 3.3kb 5' recombination arm was inserted as two consecutive fragments (*EcoRI/AatII* and *EcoRI/EcoRI*) respectively. The targeting vector was electroporated into ENS ES cells, and homologous recombinant clones were selected for 8 days in 300 µg/mL G418. Recombination was confirmed by PCR and Southern Blot (0.5kb probe, **Fig.1A**). The neo selection cassette was removed in one positive clone by transfection of a plasmid expressing the flp recombinase, and removal was assessed by PCR (using the genotyping primers) and sequencing. Mice were produced by standard blastocyst injection procedure.

### **Retina dissection and protein extraction**

For each condition, 70 mouse eyes were dissected. Cornea and lens were removed. RPE and neural retina were mechanically separated at the level of photoreceptor outer segment, avoiding cross-contamination between both tissues. Protein extraction was carried out as described in *Chatelain et al., 2006*, after mechanical separation of retinal cells by pipetting. This ensured enrichment of extracts in nuclear proteins to optimize OTX2 complexes purification.

### **Protein purification**

Protein purification was carried out following *Bailey et al., 2012* protocol, adapted for one-step purification. Briefly, protein extracts were incubated overnight at 4°C with 20 µL washed Ultralink Immobilized Streptavidin Beads (Pierce). Beads were pelleted at 1200 x *g* for 5 min and washed 5 times in cold lysis buffer. Elution of tagged protein complexes was carried out by addition of 500 µL cold PBS 1mM D-biotin and incubation overnight at 4°C. Beads were pelleted again and the supernatant was collected. Quality of purification was assessed by Western Blot (anti-*Otx2*, 1/500, R&D Systems) and silver nitrate coloring.

### **MS/MS analysis**

Reduced and alkylated purified protein complexes were trypsinated in 12.5 ng/mL trypsin overnight at 37°C and dried with SpeedVac. Dried pellets were resuspended in 1/6 saturated HCCA in 50% CH<sub>3</sub>CN, 50% H<sub>2</sub>O, 0.3% TFA before analysis. Tandem mass spectrometry was carried on a Maldi-Tof MS UltraFlex spectrometer (Bruker Daltronics). Raw spectrum data was analyzed by Mascot software (Matrix Science) resulting in peptide-spectrum matches (PSM).

## **REFERENCES**

- Agoston Z, Schulte D**, *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, 2009, *Development* **136(19)**:3311-3322
- Bailey D, Urena L, Thorne L, Goodfellow I**, Identification of Protein Interacting Partners Using Tandem Affinity Purification, 2012, *J Vis Exp* **60**:e3643
- Béby F, Housset M, Fossat N, Le Greneur C, Flamant F, Godement P, Lamonerie T**, *Otx2* gene deletion in adult mouse retina induces rapid RPE dystrophy and slow photoreceptor degeneration, 2010, *PLoS ONE* **5(7)**: e11673
- Briata P, Ilengo C, Bobola N, Corte G**, Binding properties of the human homeodomain protein OTX2 to a DNA target sequence, 1999, *FEBS Letters* **445**:160-164
- Broccoli V, Boncinelli E, Wurst W**, The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmic organizer, 1999, *Nature* **401**:164-168

**Bürckstümmer T, Bennett K L, Preradovic A, Schütze G, Hantschel O, Superti-Furga G, Bauch A**, An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells, 2006, *Nat Methods* **3**:1013-1019

**Chatelain G, Fossat N, Brun G, Lamonerie T**, Molecular dissection reveals decreased activity and not dominant negative effect in human OTX2 mutants, 2006, *J Mol Med* **84(7)**:604-615

**Cheng H, Khanna H, Oh E C T, Hicks D, Mitton K P, Swaroop A**, Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors, 2004, *Hum Mol Genet* **13(15)**: 1563-1575

**Di Giovannantonio L G, Di Salvio M, Omodei D, Prakash N, Wurst W, Pierani A, Acampora D, Simeone A**, *Otx2* cell-autonomously determines dorsal mesencephalon versus cerebellum fate independently of isthmic organizing activity, 2013, *Development* **141(2)**:377-388

**Emerson M M, Surzenko N, Goetz J J, Trimarch J, Cpeko C L**, *Otx2* and *Onecut1* promote the fates of cone photoreceptors and horizontal cells and repress rod photoreceptors, 2013, *Dev Cell* **26(1)**:doi:10.1016

**Folco E, Lee C-S, Dufu K, Yamasaki T, Reed R**, The Proteins PDIP3 and ZC11A Associate with the Human TREX Complex in an ATP-Dependent Manner and Function in mRNA Export, 2012, *PLoS ONE* **7(8)**: e43804

**Fossat N, Chatelain G, Brun G, Lamonerie T**, Temporal and spatial delineation of mouse *Otx2* functions by conditional self-knockout, 2006, *EMBO Rep* **7(8)**:824-830

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

**Haider N B, Mollema N, Gaule M, Yuan Y, Sachs A J, Nystuen A M, Naggert J K, Nishina P M**, *Nr2e3*-directed transcriptional regulation of genes involved in photoreceptor development and cell-type specific phototransduction, 2009, *Exp Eye Res* **89**:365–372

**Haider N B, DeMarco P, Nystuen A M, Huang X, Smith R S, McCall M A, Naggert J K, Nishina P M**, The transcription factor *Nr2e3* functions in retinal progenitors to suppress cone cell generation, 2006, *Visual Neurosci* **23(6)**:917-929

**Hao H, Kim D S, Klocke B, Johnson K R, Cui K, Gotoh N, Zang C, Gregorski J, Gieser L, Peng W, Fann Y, Seifert M, Zhao K, Swaroop A**, Transcriptional regulation of rod photoreceptor homeostasis revealed by in vivo NRL targetome analysis, 2012, *PLoS Genetics* **8(4)**:e1002649

**Heimbucher T, Murko C, Bajoghli B, Aghaallaei N, Huber A, Stebegg R, Eberhard D, Fink M, Simeone A, Czerny T**, *Gbx2* and *Otx2* Interact with the WD40 Domain of Groucho/Tle Corepressors, 2007, *Mol Cell Biol* **27(1)**:340-351

**Housset M, Samuel A, Ettaiche M, Bemelmans A, Béby F, Billon N, Lamonerie T**, Loss of *Otx2* in the adult retina disrupts retinal pigment epithelium function, causing photoreceptor degeneration, 2013, *J Neuro* **33(24)**:9890 –9904

**Kimura C, Yoshinaga K, Tian E, Suzuki M, Aizawa S, Matsuo I**, Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals, 2000, *Dev Biol* **225**:304-321

**Lerner L E, Peng G H, Gribanova Y E, Chen S, Farber D B**, *Sp4* is expressed in retinal neurons, activates transcription of photoreceptor-specific genes, and synergizes with *Crx*, 2005, *J Biol Chem* **280**:20642-50

**Ma X M, Yoon S-O, Richardson C J, Jülich K, Blenis J**, SKAR Links Pre-mRNA Splicing to mTOR/S6K1-Mediated Enhanced Translation Efficiency of Spliced mRNAs, 2008, *Cell* **133(2)**:303-313

**Masuda T, Esumi N**, SOX9, through interaction with microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and OTX2, regulates BEST1 expression in the retinal pigment epithelium, 2010, *J Biol Chem* **285(35)**: 26933-26944

**Mears A J, Kondo M, Swain P K, Takada Y, Bush R A, Saunders T L, Sieving P A, Swaroop A**, Nrl is required for rod photoreceptor development, 2001, *Nat Genet* **29**(4):447-452

**Mitton K P, Swain P K, Chen S, Xu S, Zack D J, Swaroop A**, The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation, 2000, *J Biol Chem* **275**:29794-9

**Nakano T, Murata T, Matsuo I, Aizawa S**, OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3beta, 2000, *Biochem Biophys Res Commun* **267**:64-70

**Nédélec S, Foucher I, Brunet I, Bouillot C, Prochiantz A, Trembleau A**, *Emx2* homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (*eIF4E*) in the axons of olfactory sensory neurons, 2004, *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(29):10815-10820

**Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, Furukawa T**, *Otx2* homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development, 2003, *Nat Neurosci* **6**(12):1255-1263.

**Peng G H, Ahmad O, Ahmad F, Liu J, Chen S**, The photoreceptor-specific nuclear receptor *Nr2e3* interacts with *Crx* and exerts opposing effects on the transcription of rod versus cone genes, 2005, *Hum Mol Genet* **14**:747-64

**Perea-Gomez A, Lawson K A, Rhinn M, Zakin L, Brûlet P, Mazan S, Ang S-L**, *Otx2* is required for visceral endoderm movement and for the restriction of posterior signals in the epiblast of the mouse embryo, 2001, *Development* **128**:753-765

**Puelles E, Acampora D, Lacroix E, Signore M, Annino A, Tuorto F, Filosa S, Corte G, Wurst W, Ang S-L, Simeone A**, *Otx* dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain, 2003, *Nat Neurosci* **6**(5):453-460

**Puelles E, Annino A, Tuorto F, Usiello A, Acampora D, Czerny T, Brodski C, Ang S-L, Wurst W, Simeone A**, *Otx2* regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain, 2004, *Development* **131**(9):2037-2048

**Reim K, Wegmeyer H, Brandstätter J H, Xue M, Rosenmund C, Dresbach T, Hofmann K, Brose N**, Structurally and functionally unique complexins at retinal ribbon synapses, 2005, *J Cell Biol* **169**(4):669-680

**Samuel A, Housset M, Fant B, Lamonerie T**, *Otx2* ChIP-seq reveals unique and redundant functions in the mature mouse retina, 2014, *PLoS One* **9**(2):e89110

**Siebert S, Cabuy E, Scherf B G, Kohler H, Panda S, Le Y-Z, Fehling H J, Gaidatzis D, Stadler M B, Roska B**, Transcriptional code and disease map for adult retinal cell types, 2012, *Nat Neurosci* **15**(3):487-495

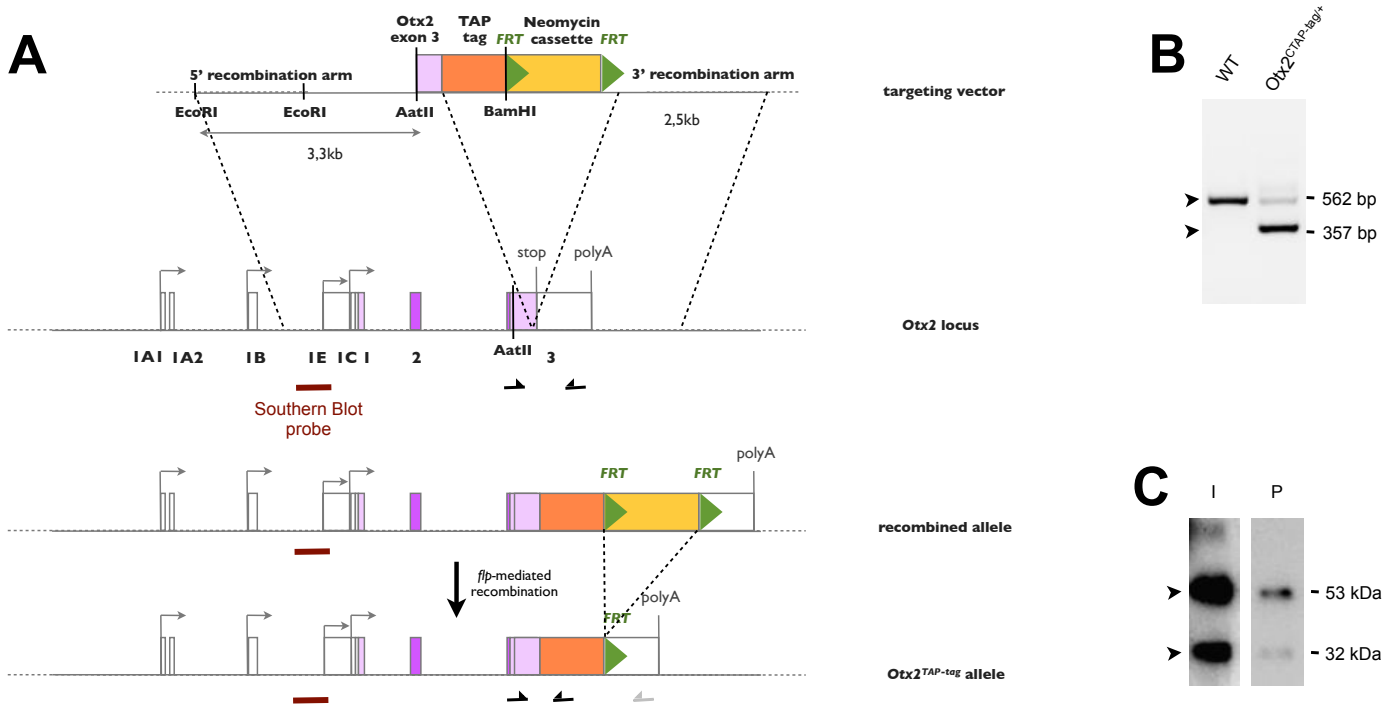
**Sugiyama S, Di Nardo A A, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch T K**, Experience-dependent transfer of *Otx2* homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity, 2008, *Cell* **134**:508-520

**Yasuoka Y, Suzuki Y, Takahashi S, Someya H, Sudou N, Haramoto Y, Cho K W, Asashima M, Sugano S, Taira M**, Occupancy of tissue-specific cis-regulatory modules by *Otx2* and *TLE/Groucho* for embryonic head specification, 2014, *Nat Comm* DOI: [10.1038/ncomms5322](https://doi.org/10.1038/ncomms5322)

**Wang S, Sengel C, Emerson M M, Cepko C L**, A gene regulatory network controls the binary fate decision of rod and bipolar cells in the vertebrate retina, 2014, *Dev Cell* **30**:513-527

**Zakin L, Reversade B, Virlon B, Rusniok C, Glaser P, Elalouf J-M, Brûlet P**, Gene expression profiles in normal and *Otx2*<sup>-/-</sup> early gastrulating mouse embryos, 2000, *PNAS* **97**(26):14388-14393

**Zuber M E, Gestri G, Viczian A S, Barsacchi G, Harris W A**, Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors, 2003, *Development* **130**(21):5155-5167



**Fig. 1 : The *Otx2<sup>CTAP-tag</sup>* mouse line allows for efficient purification of OTX protein complexes.**

(A) The structure of the targeting vector (first line), wild-type *Otx2* locus (second line) and *Otx2<sup>CTAP-tag</sup>* allele (bottom line). Pink boxes are *Otx2* coding regions (homeodomain is in purple), white boxes are *Otx2* 5'- and 3'-UTR regions, yellow box is *PGK-Neo* selection cassette, orange box is the TAP-tag coding sequence. Green triangles are *FRT* sites. Bent arrows represent the main transcription start sites known for *Otx2*. The Southern Blot probe used for confirming recombination is shown in red. Primers used for PCR in (B) are indicated by arrows. Black arrows primer couples will lead to an amplicon. The grey arrow antisense primer is too far from the sense primer to result in an amplicon. (B) PCR amplification on WT (left) and *Otx2<sup>CTAP-tag/+</sup>* (right) clones using the primers shown in (A). Only one 562bp amplicon is detected in WT clones, whereas *Otx2<sup>CTAP-tag/+</sup>* clones display the WT amplicon and the expected 357bp *Otx2<sup>CTAP-tag/+</sup>* amplicon. (C) Anti-*Otx2* Western Blot on adult retina protein extracts (I, input) or on the purified fraction after streptavidin-coated beads pull-down (P, purified fraction). The tagged OTX2 protein is detected at 53 kDa, the wild-type OTX2 at 32 kDa. Pull-down by streptavidin results in efficient purification of OTX2 complexes.



**Table 1 : List of high-confidence OTX2 protein partners in the adult neural retina.**

*Accession* is the UNIPROT database accession code. For each gene are shown the number of detected PSM in *Otx2*<sup>CTAP-tag</sup> purified protein extracts, the number of PSM in WT extracts, and the relative enrichment in the *Otx2*<sup>CTAP-tag</sup> condition

<b>Accession</b>		<b>Description</b>	<b>#PSM Otx2TAP-tag</b>	<b>#PSM WT</b>	<b>enrichment</b>
Q6IFX2	<i>Krt42</i>	Keratin . type I cytoskeletal 42	40	20	2
Q91XV3	<i>Basp1</i>	Brain acid soluble protein 1	18	9	2
Q60972	<i>Rbbp4</i>	Histone-binding protein	10	5	2
Q91YQ5	<i>Rpn1</i>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	8	4	2
Q9WV55	<i>Vapa</i>	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	8	4	2
Q8K2B3	<i>Sdha</i>	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit . mitochondrial	4	2	2
Q08288	<i>Lyar</i>	Cell growth-regulating nucleolar protein	4	2	2
Q9QZ28	<i>Six6</i>	Homeobox protein SIX6	4	2	2
Q60930	<i>Vdac2</i>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	17	8	2 .13
P35700	<i>Prdx1</i>	Peroxiredoxin-1	11	5	2 .2
Q5SUF2	<i>Luc7l3</i>	Luc7-like protein 3	11	5	2 .2
P62806	<i>Hist1h4a</i>	Histone H4	18	8	2 .25
P35564	<i>Canx</i>	Calnexin	9	4	2 .25
Q80ST9	<i>Lca5</i>	Lebercilin	9	4	2 .25
G5E870	<i>Trip12</i>	E3 ubiquitin-protein ligase	57	25	2 .28
Q8CGP6	<i>Hist1h2ah</i>	Histone H2A type 1-H	16	7	2 .29
Q9D0M5	<i>Dynll2</i>	Dynein light chain 2 . cytoplasmic	7	3	2 .33
Q9JJI8	<i>Rpl38</i>	60S ribosomal protein L38	31	13	2 .38
Q60932	<i>Vdac1</i>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	48	20	2 .4
Q501J6	<i>Ddx17</i>	Probable ATP-dependent RNA helicase	36	15	2 .4
Q9Z2K1	<i>Krt16</i>	Keratin . type I cytoskeletal 16	34	14	2 .43
P20357	<i>Map2</i>	Microtubule-associated protein 2	45	18	2 .5
Q8K2J0	<i>Picd3</i>	1-phosphatidylinositol 4 .5-bisphosphate phosphodiesterase delta-3	10	4	2 .5
Q99JF8	<i>Psip1</i>	PC4 and SFRS1-interacting protein	21	8	2 .63
P26369	<i>U2af2</i>	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	21	8	2.63
Q64523	<i>Hist2h2ac</i>	Histone H2A type 2-C	16	6	2.67
O70318	<i>Epb41l2</i>	Band 4.1-like protein 2	17	6	2.83
Q9Z1L4	<i>Rs1</i>	Retinoschisin	17	6	2.83
Q69Z99	<i>Znf512</i>	Zinc finger protein 512	12	4	3
Q61464	<i>Znf638</i>	Zinc finger protein 638	12	4	3
Q61656	<i>Ddx5</i>	Probable ATP-dependent RNA helicase	93	30	3 .1
P10126	<i>Eef1a1</i>	Elongation factor 1-alpha 1	38	12	3.17
O54751	<i>Crx</i>	Cone-rod homeobox protein	13	4	3 .25
Q8VCC9	<i>Spon1</i>	Spondin-1	20	6	3.33
Q5RJ54	<i>Zscan26</i>	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 26	7	2	3 .5
Q9JLM8	<i>Dclk1</i>	Serine/threonine-protein kinase	15	4	3 .75
Q9Z273	<i>Tulp1</i>	Tubby-related protein 1	24	6	4
P16381	<i>D1Pas1</i>	Putative ATP-dependent RNA helicase	16	4	4
Q8C9B9	<i>Dido1</i>	Death-inducer obliterator 1	8	2	4
Q5SSK3	<i>Tefm</i>	Transcription elongation factor . mitochondrial	9	2	4 .5
Q6PGN3	<i>Dclk2</i>	Serine/threonine-protein kinase	14	3	4.67
P80206	<i>Otx2</i>	Homeobox protein OTX2	19	4	4 .75
P28740	<i>Kif2a</i>	Kinesin-like protein	11	2	5 .5
Q8BG81	<i>Poldip3</i>	Polymerase delta-interacting protein 3	26	3	8.67
P62696	<i>Crybb2</i>	Beta-crystallin B2	42	0	N/A
Q9WVJ5	<i>Crybb1</i>	Beta-crystallin B1	24	0	N/A
P24622	<i>Cryaa</i>	Alpha-crystallin A chain	16	0	N/A
Q9QWH1	<i>Phc2</i>	Polyhomeotic-like protein 2	15	0	N/A
Q9DC28	<i>Csnk1d</i>	Casein kinase I isoform delta	14	0	N/A
P62821	<i>Rab1A</i>	Ras-related protein Rab-1A	13	0	N/A
P01868	<i>Ighg1</i>	Ig gamma-1 chain C region secreted form	13	0	N/A
Q6IME9	<i>Krt72</i>	Keratin . type II cytoskeletal 72	13	0	N/A
Q9JUJ9	<i>Crybb3</i>	Beta-crystallin B3	13	0	N/A
Q8C854	<i>Myef2</i>	Myelin expression factor 2	12	0	N/A
Q9JHN8	<i>Stk19</i>	Serine/threonine-protein kinase 19	12	0	N/A
P01837	<i>Igkc</i>	Ig kappa chain C region	10	0	N/A
O09167	<i>Rpl21</i>	60S ribosomal protein L21	10	0	N/A
Q8VD12	<i>Znf385a</i>	Zinc finger protein 385A	10	0	N/A
Q91V41	<i>Rab14</i>	Ras-related protein Rab-14	9	0	N/A
P19253	<i>Rpl13a</i>	60S ribosomal protein L13a	9	0	N/A
Q9CQE8	<i>Cn166</i>	UPF0568 protein C14orf166 homolog	9	0	N/A
P15655	<i>Fgf2</i>	Fibroblast growth factor 2	9	0	N/A
O08582	<i>Gtpbp1</i>	GTP-binding protein 1	9	0	N/A
P62918	<i>Rpl8</i>	60S ribosomal protein L8	8	0	N/A

**Table 1 (continued)**

Q9D8E6	<i>Rpl4</i>	60S ribosomal protein L4	8	0	N/A
Q8BHG9	<i>Cggbp1</i>	CGG triplet repeat-binding protein 1	8	0	N/A
Q9JJV1	<i>Cryba2</i>	Beta-crystallin A2	8	0	N/A
P23927	<i>Cryab</i>	Alpha-crystallin B chain	8	0	N/A
Q80WS3	<i>Fbll1</i>	rRNA/tRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar-like protein 1	8	0	N/A
Q99JX7	<i>Nxf1</i>	Nuclear RNA export factor 1	8	0	N/A
Q9ERU3	<i>Znf22</i>	Zinc finger protein 22	8	0	N/A
P46660	<i>Ina</i>	Alpha-internexin	8	0	N/A
P62274	<i>Rps29</i>	40S ribosomal protein S29	7	0	N/A
Q60749	<i>Khdrbs1</i>	KH domain-containing . RNA-binding . signal transduction-associated protein	7	0	N/A
P03930	<i>Mtatp8</i>	ATP synthase protein 8	7	0	N/A
P04344	<i>Crygb</i>	Gamma-crystallin B	7	0	N/A
P01831	<i>Thy1</i>	Thy-1 membrane glycoprotein	7	0	N/A
Q9R1R2	<i>Trim3</i>	Tripartite motif-containing protein 3	7	0	N/A
Q8BIF9	<i>Znf787</i>	Zinc finger protein 787	7	0	N/A
P62855	<i>Rps26</i>	40S ribosomal protein S26	6	0	N/A
P06151	<i>Ldha</i>	L-lactate dehydrogenase A chain	6	0	N/A
P80317	<i>Cct6a</i>	T-complex protein 1 subunit zeta	6	0	N/A
Q9WTX5	<i>Skp1</i>	S-phase kinase-associated protein 1	6	0	N/A
Q8BLQ9	<i>Cadm2</i>	Cell adhesion molecule 2	6	0	N/A
Q69ZA1	<i>Cdk13</i>	Cyclin-dependent kinase 13	6	0	N/A
P56564	<i>Slc1a3</i>	Excitatory amino acid transporter 1	6	0	N/A
P17095	<i>Hmga1</i>	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y	6	0	N/A
P01654		Ig kappa chain V-III region PC 2880/PC 1229	6	0	N/A
P63321	<i>Rala</i>	Ras-related protein Ral-A	6	0	N/A
Q8R1B8	<i>Rorb</i>	Nuclear receptor ROR-beta	6	0	N/A
O08547	<i>Sec22b</i>	Vesicle-trafficking protein SEC22b	6	0	N/A
Q3UQA7	<i>Selh</i>	Selenoprotein H Selh	6	0	N/A
Q3THE2	<i>My112b</i>	Myosin regulatory light chain 12B	5	0	N/A
P62915	<i>Gtf2b</i>	Transcription initiation factor IIB	5	0	N/A
P29341	<i>Pabpc1</i>	Polyadenylate-binding protein 1	5	0	N/A
Q9CWL2	<i>Casz1</i>	Zinc finger protein castor homolog 1	5	0	N/A
P12382	<i>Pfkf</i>	6-phosphofructokinase . liver type	5	0	N/A
P47911	<i>Rpl6</i>	60S ribosomal protein L6	5	0	N/A
P27659	<i>Rpl3</i>	60S ribosomal protein L3	5	0	N/A
Q61029	<i>Tmpo</i>	Lamina-associated polypeptide 2 . isoforms beta/delta/epsilon/gamma	5	0	N/A
Q6NVD9	<i>Bfsp2</i>	Phakinin	5	0	N/A
Q6A068	<i>Cdc5l</i>	Cell division cycle 5-like protein	5	0	N/A
Q61597	<i>Crygc</i>	Gamma-crystallin C	5	0	N/A
P06330		Ig heavy chain V region AC38 205.12	5	0	N/A
Q9D1P2	<i>Kat8</i>	Histone acetyltransferase KAT8	5	0	N/A
Q6PDM1	<i>Msl1</i>	Male-specific lethal 1 homolog	5	0	N/A
Q6DID5	<i>Mum1</i>	PWWP domain-containing protein MUM1	5	0	N/A
P70257	<i>Nfix</i>	Nuclear factor 1 X-type	5	0	N/A
Q9D1J3	<i>Sarnp</i>	SAP domain-containing ribonucleoprotein	5	0	N/A
P60335	<i>Pcbp1</i>	Poly(rC)-binding protein 1	4	0	N/A
P61979	<i>Hnrnpk</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	4	0	N/A
P32233	<i>Drg1</i>	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	4	0	N/A
P42932	<i>Cct8</i>	T-complex protein 1 subunit theta	4	0	N/A
Q61545	<i>Ewsr1</i>	RNA-binding protein EWS	4	0	N/A
Q9JJK2	<i>Lancl2</i>	LanC-like protein 2	4	0	N/A
P20443	<i>Sag</i>	S-arrestin	4	0	N/A
Q8R1B5	<i>Cplx3</i>	Complexin-3	4	0	N/A
Q61539	<i>Esrrb</i>	Steroid hormone receptor ERR2	4	0	N/A
P01864		Ig gamma-2A chain C region secreted form	4	0	N/A
P01644		Ig kappa chain V-V region HP R16.7	4	0	N/A
Q8JZS0	<i>Lin7a</i>	Protein lin-7 homolog A	4	0	N/A
O88952	<i>Lin7c</i>	Protein lin-7 homolog C	4	0	N/A
Q03141	<i>Mark3</i>	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	4	0	N/A
Q8VIJ6	<i>Sfpq</i>	Splicing factor . proline- and glutamine-rich	4	0	N/A
Q9Z2R6	<i>Unc119</i>	Protein unc-119 homolog A	4	0	N/A
Q9D883	<i>U2af1</i>	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	4	0	N/A
Q8K3G5	<i>Vrk3</i>	Inactive serine/threonine-protein kinase VRK3	4	0	N/A
Q3US17	<i>Znf48</i>	Zinc finger protein 48	4	0	N/A

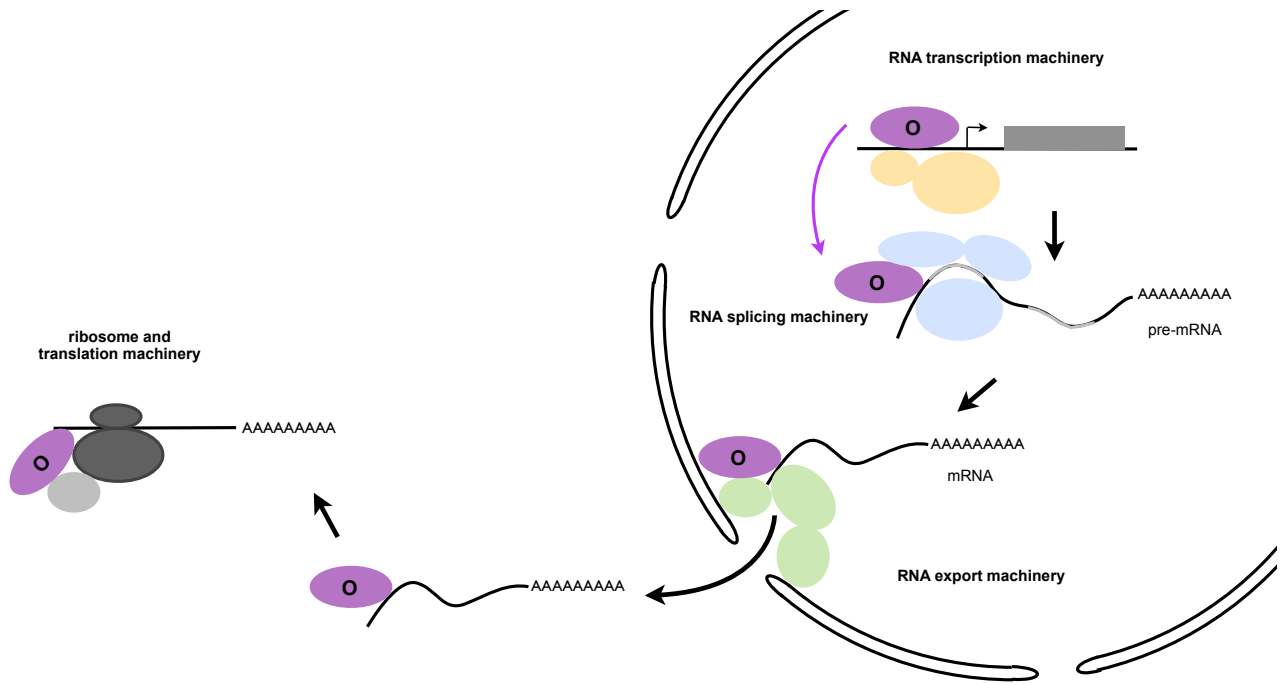
**Table 2: List of gene ontologies associated with OTX2 protein partners**

*p*-values attributed to each category by both Gene Ontology softwares are indicated.

Gene ontology	Number of genes in category	p-value DAVID	p-value g:profiler
developmental process	45 (34%)		4.96e-03
development of camera-type eye	7-13 (5-10%)	6.8e-04	3.55e-06
cellular component organization	36-41 (29-33%)	6.9e-10	2.24e-03
regulation of transcription	28-31 (21-24%)	2.0e-02	2.45e-02
translation and regulation of translation	13 (10%)	1.1e-05	1.40e-03
RNA processing and export	10 (8%)	9.5e-03	2.55e-02

**Table 3 : List of OTX2 protein partners associated with gene expression-related ontologies**

Accession		Description
<b>Regulation of transcription</b>		
Q91XV3	<i>Basp1</i>	Brain acid soluble protein 1
Q9CWL2	<i>Casz1</i>	Zinc finger protein castor homolog 1
Q6A068	<i>Cdc5l</i>	Cell division cycle 5-like protein
Q69ZA1	<i>Cdk13</i>	Cyclin-dependent kinase 13
Q8BHG9	<i>Cggbp1</i>	CGG triplet repeat-binding protein 1
Q9CQE8	<i>Cn166</i>	UPF0568 protein C14orf166 homolog
O54751	<i>Crx</i>	Cone-rod homeobox protein
Q501J6	<i>Ddx17</i>	Probable ATP-dependent RNA helicase
Q61656	<i>Ddx5</i>	Probable ATP-dependent RNA helicase
Q8C9B9	<i>Dido1</i>	Death-inducer obliterator 1
Q61539	<i>Essrb</i>	Steroid hormone receptor ERR2
Q61545	<i>Ewsr1</i>	RNA-binding protein EWS
P15655	<i>Fgf2</i>	Fibroblast growth factor 2
P62915	<i>Gtf2b</i>	Transcription initiation factor IIB
P61979	<i>Hnmpk</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
Q9D1P2	<i>Kat8</i>	Histone acetyltransferase KAT8
Q60749	<i>Khdrbs1</i>	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1
Q9JK2	<i>Lancl2</i>	LanC-like protein 2
P70257	<i>Nfix</i>	Nuclear factor 1 X-type
P29341	<i>Pabpc1</i>	Polyadenylate-binding protein 1
Q8BG81	<i>Poldip3</i>	Polymerase delta-interacting protein 3
Q60972	<i>Rbbp4</i>	Histone-binding protein RBBP4
Q8R1B8	<i>Rorb</i>	Nuclear receptor ROR-beta
Q8VIJ6	<i>Sfpq</i>	Splicing factor, proline- and glutamine-rich
Q9QZ28	<i>Six6</i>	Homeobox protein SIX6
Q61029	<i>Tmpos</i>	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma
G5E870	<i>Tripl2</i>	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
Q9ERU3	<i>Znf22</i>	Zinc finger protein 22
Q8VD12	<i>Znf385a</i>	Zinc finger protein 385A
Q3US17	<i>Znf48</i>	Zinc finger protein 48
Q69Z99	<i>Znf512</i>	Zinc finger protein 512
Q61464	<i>Znf638</i>	Zinc finger protein 638
Q8BIF9	<i>Znf787</i>	Zinc finger protein 787
Q5RJ54	<i>Zscan26</i>	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 26
<b>RNA processing and export</b>		
Q6A068	<i>Cdc5l</i>	Cell division cycle 5-like protein
Q69ZA1	<i>Cdk13</i>	Cyclin-dependent kinase 13
P61979	<i>Hnmpk</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
Q60749	<i>Khdrbs1</i>	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1
Q5SUF2	<i>Lc7l3</i>	Luc7-like protein 3
Q99JX7	<i>Nxf1</i>	Nuclear RNA export factor 1
P29341	<i>Pabpc1</i>	Polyadenylate-binding protein 1
P60335	<i>Pcbp1</i>	Poly(rC)-binding protein 1
Q8BG81	<i>Poldip3</i>	Polymerase delta-interacting protein 3
Q99JF8	<i>Psip1</i>	PC4 and SFRS1-interacting protein
Q9D1J3	<i>Samp</i>	SAP domain-containing ribonucleoprotein
Q8VIJ6	<i>Sfpq</i>	Splicing factor, proline- and glutamine-rich
Q9D883	<i>U2af1</i>	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit
P26369	<i>U2af2</i>	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit
<b>Translation regulation</b>		
P10126	<i>Eef1a1</i>	Elongation factor 1-alpha 1
P29341	<i>Pabpc1</i>	Polyadenylate-binding protein 1
P19253	<i>Rpl13a</i>	60S ribosomal protein L13a
O09167	<i>Rpl21</i>	60S ribosomal protein L21
P27659	<i>Rpl3</i>	60S ribosomal protein L3
Q9JJI8	<i>Rpl38</i>	60S ribosomal protein L38
Q9D8E6	<i>Rpl4</i>	60S ribosomal protein L4
P47911	<i>Rpl6</i>	60S ribosomal protein L6
P62918	<i>Rpl8</i>	60S ribosomal protein L8
P62855	<i>Rps26</i>	40S ribosomal protein S26
P62274	<i>Rps29</i>	40S ribosomal protein S29



**Fig. 2 : A model for *Otx2* activity based on its protein partners.**

Given that OTX2 interacts with proteins implicated in transcription regulation, mRNA splicing and export, as well as in translation processes, the OTX2 protein might accompany select target genes from transcription to translation and tightly regulate each step.

## DISCUSSION - PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de mieux caractériser l'importance de la régulation spatio-temporelle de l'expression d'*Otx2* pour l'intégration correcte de son activité au sein d'un processus plus large, la régionalisation précoce du SNC. Ils ont notamment permis de montrer que la frontière postérieure d'expression d'*Otx2* constituait un compartiment développemental très précoce, et ont souligné l'insuffisance du modèle actuel de mise en place de l'IsO. La discussion de ces résultats sera effectuée dans une première partie.

Ils ont également permis d'explorer les mécanismes moléculaires qui lui permettraient d'assurer ses fonctions si diverses : il se fixerait à des ensembles de sites de fixation différents, en amont de répertoires génétiques distincts. Cette spécificité tissulaire de fixation pourrait s'expliquer en partie par l'interactome qu'il développe dans ces tissus : les partenaires protéiques d'*Otx2*, en créant un microenvironnement de haute affinité pour l'homéoprotéine au niveau de certains lui confèreraient alors des affinités distinctes vis-à-vis de motifs TAATCC particuliers. La création d'une souris recombinée apte à la purification protéique des complexes incluant *Otx2* a permis l'étude de son interactome dans la neurorétine. L'ensemble de ces résultats nous permet de suggérer un modèle de fonctionnement d'*Otx2* dans la rétine de souris adulte, qui sera discuté dans la deuxième partie.

Plus largement, l'utilisation de la lignée *Otx2*<sup>CTAP-tag</sup> ouvre les portes à une approche systématique de l'interactome d'*Otx2* au cours de ses nombreuses fonctions, qui pourrait avoir une portée aussi bien fondamentale qu'appliquée. Les perspectives en seront étudiées dans la troisième partie de cette discussion.

Enfin, l'étude des complexes protéiques impliquant *Otx2* dans la rétine de souris adulte en a révélé des partenaires inattendus, qui suggèrent des nouvelles fonctions régulatrices de l'homéogène. La dernière partie de la discussion présentera ces nouvelles fonctions potentielles, ainsi que les stratégies expérimentales qui peuvent être mises en place pour s'y intéresser.

## **I. Un nouveau modèle nécessaire pour la mise en place de l'organisateur isthmique à la frontière de deux compartiments cellulaires.**

I.1. Mécanismes moléculaires de la compartimentation entre mésencéphale et métencéphale.

Comme les expériences de suivi de lignage cellulaire l'ont montré (cf. Résultats, partie I), les descendantes des cellules *Otx2*-positives ne quittent plus la partie antérieure de l'embryon, qui continue d'exprimer *Otx2*, à partir de E7,25. Des expériences analogues utilisant un modèle semblable avaient prouvé que réciproquement, le lignage des cellules *Gbx2*-positives ne s'aventurait jamais dans le mésencéphale (*Sunmonu et al., 2011*). La frontière commune entre *Otx2* et *Gbx2* délimite donc bien deux compartiments qui se mettent en place de façon extrêmement précoce. Cette compartimentation se perpétue au niveau dorsal jusque tardivement dans le développement : l'immense majorité des cellules mésencéphaliques à E8.5 n'ont pas donné de descendantes métencéphaliques à E18.5 (*Zervas et al., 2004*). Au niveau ventral, si les contraintes sur les mouvements cellulaires semblent plus lâches dans les premiers temps, la même restriction de lignage s'observe (*Zervas et al., 2004*).

Pourtant, les mécanismes moléculaires qui caractérisent la mise en place et l'entretien de ces compartiments sont encore inconnus. Des cellules dans lesquelles la voie FGF est constitutivement active forment des agrégats compacts lorsqu'elles sont présentes dans un territoire exprimant *Otx2* (*Sunmonu et al., 2011*). Le signal *Fgf8*, exprimé en position métencéphalique, serait donc capable d'induire une ségrégation cellulaire, à la base de la restriction de lignage, de façon cellule-autonome à la MHB. Il n'est cependant pas actif avant E8.5, période à laquelle les territoires *Otx2*- et *Gbx2*-positifs forment déjà des compartiments (*Sunmonu et al., 2011*). Deux processus consécutifs doivent donc se relayer pour assurer l'existence de la frontière de restriction entre mésencéphale et métencéphale.

### I.1.1. Compartimentation précoce et affinité différentielle des cellules

Les populations de cellules exprimant *Otx2* et *Gbx2* ne se mélangeront jamais au cours du développement. En effet, dès l'apparition de l'expression de *Gbx2* dans une zone complémentaire à l'expression d'*Otx2*, elles forment deux territoires distincts à la frontière infranchissable. L'homéogène *Otx2*, à l'instar des autres membres de la famille *Otx* (cf. I. 1.1.3.), est capable de réguler les propriétés d'adhésion des cellules qui l'expriment. Dans le mésencéphale précoce il régule notamment l'expression d'*ephrinA2* et *R-cadherin* (*Rhinn et al., 1999*). Il est possible que les cellules qui l'expriment aient une chemoaffinité plus grande entre elles qu'avec des cellules négatives pour *Otx2*, ce qui mènerait à une ségrégation cellulaire par affinité différentielle, et donc à une restriction des lignages. Ce cas de figure a été décrit pour *Otx1* chez le poisson-zèbre : son expression mosaïque dans l'embryon provoque l'agrégation des cellules qui l'expriment (*Bellipanni et al., 2000*). Pour renforcer ce mécanisme, *Gbx2* pourrait de façon complémentaire induire, par la régulation d'un autre ensemble de cellules d'adhésion, une forte affinité entre les cellules qui l'expriment, ce qui expliquerait la dépendance de la restriction de lignage à son expression. Cette affinité différentielle entre cellules d'un même territoire d'un côté, et cellules de deux territoires distincts de l'autre, permettrait de rapidement mener à la formation de deux compartiments développementaux.

Une étude vient cependant contredire cette théorie : l'agrégation par mise en contact forcée de cellules du r1 (exprimant *Gbx2*) et du mésencéphale (exprimant *Otx2*) ne montre pas de différence particulière d'affinité entre ces deux types cellulaires (*Jungbluth et al., 2001*). On peut alors formuler plusieurs hypothèses pour accommoder ces résultats. Il est tout d'abord possible qu'*Otx2*, et éventuellement *Gbx2*, ne dictent dans l'embryon précoce que des affinités transitoires. L'analyse d'agrégation précédemment citée a été menée à partir de cellules d'embryons dans lesquels la constriction isthmique était déjà visible. Or on a vu plus haut que la restriction de lignage cellulaire entre mésencéphale et métencéphale était un processus en deux étapes, et passait sous le contrôle d'un signal isthmique une fois ce dernier installé. Les différences d'affinités éventuellement induites par *Otx2/Gbx2* en début de développement pourraient alors disparaître sans perturber la compartimentation, et donc n'être plus observables au moment de l'expérience. Il est également possible que la compartimentation cellulaire précoce de l'embryon repose sur un mécanisme actif encore non-décrit, qui se mettrait en



place à la frontière entre *Otx2* et *Gbx2* dès son apparition, avant l'établissement de l'isthme. La voie Notch en est un candidat probable (cf I.3).

### I.1.2. Compartimentation sous le contrôle de l'isthme

Une fois le signal Fgf mis en place au niveau de la MHB, il semble être responsable, au moins en partie, de la ségrégation des lignages cellulaires du mésencéphale et du métencéphale (*Sunmonu et al., 2011*). Les mécanismes moléculaires potentiels par lesquels l'isthme, *via Fgf8* notamment, pourrait contrôler de façon étroite les mouvements cellulaires au niveau de la MHB sont multiples et seront brièvement discutés ici.

#### I.1.2.1. Une analogie avec les rhombomères ?

Il est possible que le mécanisme à l'oeuvre dans la compartimentation mésencéphale/métencéphale soit analogue à celui qui prend place dans des structures voisines, les rhombomères. Il existe chez ces derniers un processus actif de ségrégation cellulaire, démontré chez le poisson-zèbre et médié par les ephrines et leurs récepteurs. Les rhombomères pairs (r2/r4/r6) du poisson-zèbre expriment différentes ephrines, tandis que les rhombomères impairs (r3/r5) expriment leurs récepteurs correspondants, les gènes *Eph*. Une inhibition de contact répulsive a lieu de façon active entre des cellules *ephrin*-positives et *Eph*-positives, et le patron d'expression alterné de ces deux types de molécules médie donc la compartimentation des rhombomères (*Xu et al., 1999, Mellitzer et al., 1999*).

Une compartimentation mésencéphale/métencéphale selon un processus au moins en partie *ephrin*-dépendant est également envisageable. Le métencéphale antérieur exprime *ephrin-B2* (cf. Résultats), tandis qu'une mince bande de cellules au niveau de la MHB est *EphB1*-positive dès E10.5 (*Chenaux et Henkemeyer, 2011*). Il est donc possible que les cellules du métencéphale y restent cantonnées par l'action répulsive des cellules de la MHB. De fait, l'observation d'embryons de souris KO pour *ephrin-B2*, mais dans lesquels l'activité du locus endogène reste observable par fluorescence de la GFP, révèle la présence de cellules au locus *ephrin-B2* actif dans le diencéphale et mésencéphale alors qu'elles en sont activement exclues sinon (*Davy et Soriano, 2007*). A l'inverse, cependant, des embryons KO pour *EphB1* n'ont pas de défaut de régionalisation flagrant

de la région mésencéphale/métencéphale (*M. Henkemeyer, communication personnelle*). La signalisation *ephrin/Eph* pourrait donc être un acteur de la ségrégation cellulaire au niveau de la MHB, mais pas à elle seule.

#### I.1.2.2. Un autre mécanisme possible montré chez le poulet

Une série d'études menées chez le poulet suggère une seconde possibilité très intrigante quant à la restriction du lignage assurée par la MHB. Selon un phénomène semblable à celui de la régionalisation disque alaire chez la *Drosophile*, l'équipe de Carol Irving a pu mettre en évidence l'existence d'une signalisation Notch au niveau de la MHB (*Tossell et al., 2011a*). Une activation constitutive mosaïque de la voie Notch dans le métencéphale entraîne l'exclusion des cellules actives aux frontières du compartiment, ce qui suggère que la signalisation Notch médie la ségrégation cellulaire à la MHB (*Tossell et al., 2011a*). La perturbation de l'activité de *Lrrn1*, gène capable de moduler la signalisation Notch, permet quant à elle aux cellules du mésencéphale de migrer dans le métencéphale (*Tossell et al., 2011b*). La voie Notch pourrait donc être un acteur majeur de la compartimentation au niveau de la MHB.

#### I.1.2.3. Le maintien d'un processus antérieur ?

Enfin, la fonction de l'isthme dans le contrôle des lignages cellulaires pourrait simplement être de stabiliser, sous le contrôle d'autres facteurs, un processus préexistant. Le réseau de régulation génétique qui caractérise l'IsO, dont l'effecteur principal est *Fgf8*, assure l'entretien de la structure et l'organisation spatiale de l'expression de ses propres acteurs. Par définition, il est donc capable de maintenir indéfiniment des processus déjà présents à son installation, que ce soit l'affinité différentielle potentiellement fournie par *Otx2/Gbx2* ou un autre mécanisme de contrôle des mouvements cellulaires.

### I.1.3. Un lien possible entre restriction des lignages cellulaires et mise en place de l'isthme

A la limite d'expression entre *Gbx2* et *Otx2* émergent donc à la fois une frontière développementale et un réseau de régulation génétique aux capacités organisatrices ; l'activité de la voie Notch permettrait éventuellement d'établir un lien entre ces deux événements. Déjà mentionnée en I.1.2.2. pour sa capacité à réguler les mouvements cellulaires, elle est également nécessaire (mais pas suffisante) chez le poulet à l'expression des différents acteurs du réseau génétique de la MHB (*Tossell et al., 2011a*). Elle est à l'inverse insensible à l'action de ce réseau, ou en tout cas au signal *Fgf8*, dont l'expression ectopique n'en active pas les gènes (*Tossell et al., 2011a*). L'ensemble de ces informations suggère qu'elle agirait en amont du réseau de l'organisateur pour son activation à la frontière entre mésencéphale et métencéphale. La voie Notch est donc potentiellement à même de coupler la régulation de deux caractéristiques principales de la frontière d'expression *Otx2/Gbx2*, de façon indépendante et temporellement antérieure à l'installation de l'isthme. Or l'expression spatiale de ses différents constituants est étroitement corrélée à la position de cette même frontière : ses ligands *Ser1* et *Ser2* d'un côté, et *Delta1* de l'autre, y sont exprimés de part et d'autre, d'une manière analogue à *Wnt1* et *Fgf8*. Si leur expression ne dépend pas de l'activité de l'organisateur isthmique, il serait intéressant d'étudier les éventuelles relations épistatiques qu'ils entretiennent avec *Otx2* et *Gbx2*. Le rôle de ces deux homéogènes à la fin de la gastrulation serait alors d'organiser la mise en place de l'activité Notch à leur frontière commune pour permettre à la fois la compartimentation précoce du SNC et l'activation correcte des gènes de l'IsO.

Le simple rôle de positionnement de l'organisateur par répression mutuelle qui leur est actuellement attribué est de toutes façons insuffisant, ce qui sera discuté dans la partie suivante.

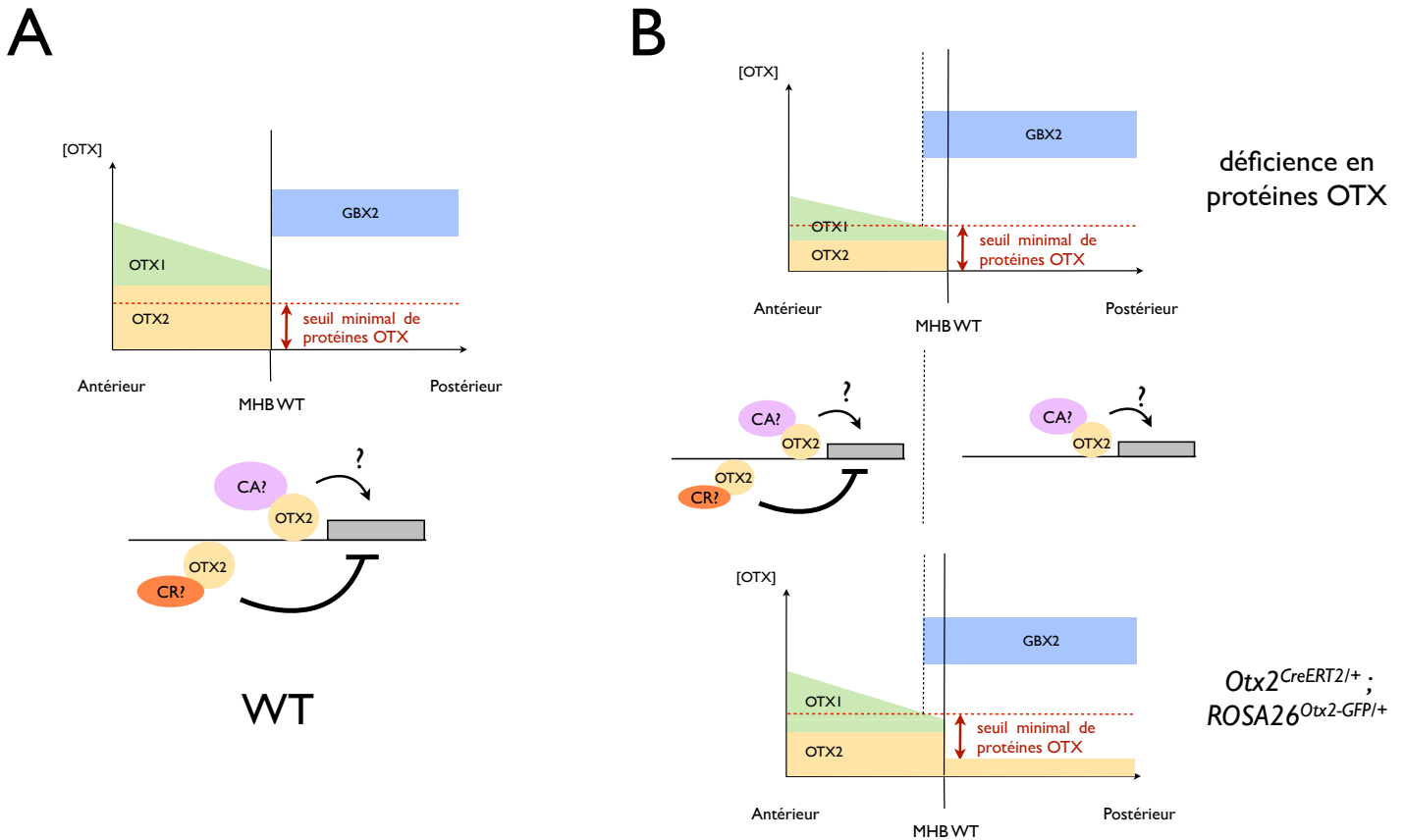
### I.2. Insuffisance du modèle actuel de mise en place de l'isthme

L'étude des premières souris transgéniques permettant de modifier artificiellement les limites d'expression d'*Otx2* et de *Gbx2* pendant la mise en place de l'isthme avaient permis de mettre au point un modèle selon lequel une répression mutuelle entre ces deux

homéogènes positionnerait leur frontière d'expression commune, et par là même l'organiseur isthmique (cf II.2.1.1., *Broccoli et al., 1999, Millet et al., 1999*). Les résultats décrits en I. de cette thèse viennent s'ajouter à d'autres expériences qui pointent du doigt l'insuffisance de ce modèle pour décrire la relation qu'entretiennent *Otx2* et *Gbx2* dans le processus de mise en place de l'organiseur. Dans une étude publiée en 2010, l'équipe de J. Li a employé une stratégie semblable à celle de S.Millet, et quasiment symétrique à celle de V.Broccoli en 1999 : ils ont activé dans une nouvelle lignée de souris l'expression d'un allèle gain-de-fonction pour *Gbx2* via une *Cre* exprimée sous le contrôle du locus *En1* (*Sunmonu et al., 2009*). Contrairement aux prédictions du modèle actuel, l'organiseur isthmique n'est pas déplacé antérieurement dans ces animaux : il semble tout simplement ne pas se mettre en place. De même, dans la stratégie expérimentale du laboratoire, l'expression ubiquitaire d'*Otx2*, même à bas niveau, devrait selon toute attente réprimer celle de *Gbx2*, voire la repousser au moins jusqu'à la limite qu'elle atteignait chez des embryons *En1<sup>Otx2LacZ</sup>* ; or c'est le contraire qui a lieu. Il est donc nécessaire de raffiner le modèle actuel de mise en place de l'organiseur isthmique. Cette sous-partie sera consacrée aux explications qui peuvent être avancées pour mieux expliquer les phénotypes obtenus dans la partie I. des résultats.

### I.2.1. Nécessité d'un seuil abrupt de concentration d'Otx ?

La caractéristique frappante des résultats obtenus et décrits en I. de cette thèse est qu'ils ressemblent fortement à ceux issus de l'analyse d'animaux déficients en protéines Otx. Le même déplacement antérieur du réseau de régulation génétique de l'isthme est en effet observable chez des embryons qui expriment *Otx2* de manière ubiquitaire et chez des embryons *Otx1<sup>-/-</sup>;Otx2<sup>+/-</sup>*, *Otx1<sup>+/-</sup>;Otx2<sup>+/-</sup>* ou *Otx1<sup>Cre/+</sup>;Otx2<sup>lox/lox</sup>* (*Acampora et al., 1997, Suda et al., 1998, Puellas et al., 2003*), dont l'étude avait laissé supposer au départ qu'une concentration minimale de protéines Otx était nécessaire au positionnement correct de l'IsO. L'absence d'un seuil abrupt de concentration en protéines est en fait un point commun à tous ces modèles murins. Dans les embryons *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>; ROSA26<sup>Otx2-GFP</sup>* décrits ici, une expression d'*Otx2* est toujours présente dans la partie postérieure de l'embryon, et le gradient antéro-postérieur de concentration d'*Otx2* au niveau de la MHB n'est pas binaire (**Figure 42B**). De même, dans les embryons déficients pour plusieurs membres de la famille *Otx*, la différence entre les concentrations de chaque côté de la



**Figure 42 : Modèle de fonctionnement d’*Otx2* au niveau de la MHB**

Description schématique du patron d’expression de *Gbx2* en fonction de la concentration de protéines *Otx* présente dans des embryons : (A) WT, (B) déficients en protéines *Otx* (*en haut*) ou exprimant *Otx2* de manière ubiquitaire (*en bas*). Un seuil minimal de protéines *Otx* entre compartiment postérieur et compartiment antérieur doit être présent pour permettre l’installation de la frontière *Otx/Gbx2*. En deçà de ce seuil l’expression de *Gbx2* s’antériorise jusqu’à l’avoir atteint. Il est possible qu’*Otx2* (en jaune) régule différemment le gène *Gbx2* (boîte grise) en fonction de sa concentration et de possibles co-répresseurs (CR, en orange) ou coactivateurs (CA, en violet).

(A) Dans un animal WT, la concentration d’*Otx2* au niveau de la MHB excède dès le départ le seuil minimal requis. Dans cette situation, la MHB se met normalement en place. S’il existe une transactivation de *Gbx2* par *Otx2*, elle est négligeable devant l’effet répresseur de ce dernier.

(B) Dans des animaux déficients en protéines *Otx*, la différence de concentration n’est pas suffisante entre compartiments postérieur et antérieur ; c’est le même cas de figure chez des embryons qui maintiennent l’expression d’*Otx2* dans la partie postérieure de l’embryon. L’expression de *Gbx2* progresse alors antérieurement (en réprimant petit à petit celle d’*Otx2*) jusqu’à ce que le seuil minimal de protéines *Otx* soit atteint. Les mécanismes moléculaires sous-jacents pourraient être les suivants : à des concentrations faibles ou moyennes, l’affinité d’*Otx2* pour certains de ses sites de fixation et/ou certains de ses partenaires protéiques corépresseurs n’est pas suffisante. Il peut cependant transactiver *Gbx2* en se liant à des sites de forte affinité, et/ou en interagissant avec des coactivateurs. Aux fortes concentrations cependant, il retrouve ses capacités répressives.

MHB est réduite (**Figure 42B**). Il est possible que l’existence d’un seuil important de concentration en protéines *Otx* soit en fait l’élément essentiel pour positionner l’organisateur isthmique : tant qu’une différence suffisante en protéines *Otx* de part et d’autre de la limite antérieure de *Gbx2* n’est pas atteinte, ce dernier continue à s’antérioriser (**Figure 42**).

L'étude d'une série de modèles génétiques dans lesquels une concentration variable d'*Otx2* peut être induite, à l'image de ceux utilisés par l'équipe d'A. Simeone pour étudier l'effet d'*Otx2* sur la différenciation neuronale de manière semi-quantitative (*Di Salvio et al., 2010*), permettrait de valider cette hypothèse.

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ce processus sont encore inconnus. On peut cependant formuler l'hypothèse suivante : alors qu'à forte concentration *Otx2* (ainsi qu'éventuellement son homologue *Otx1*) est capable de réprimer *Gbx2*, il pourrait activer ce même gène à faible concentration. C'est le cas chez le Xénope (*Tour et al., 2002a, 2002b*). Un phénomène analogue à celui observé dans la partie II. des résultats, mais dépendant de la concentration cette fois-ci, pourrait même se produire : la protéine *Otx2* pourrait se fixer à des endroits différents en *cis* du gène *Gbx2* en fonction de sa concentration, et ainsi avoir un effet variable sur son expression. A faible quantité de protéines *Otx*, seul un site est occupé sur l'ADN, et *Otx2* a un effet transactivateur ; lorsque la quantité de protéines dépasse un certain seuil, *Otx2* peut alors se lier à un second site de moindre affinité qui lui confère des capacités de répression de la transcription envers *Gbx2*. Des partenaires protéiques différents, dont par exemple TLE/Groucho, pour lesquels *Otx2* aurait des affinités (biochimiquement dépendantes de sa concentration) distinctes, et capables de modifier ses capacités de fixation et de transactivation, pourraient même médier ce processus (**Figure 42**). Les outils et les méthodes systématiques développés dans les parties II et III des résultats pourraient être donc être appliqués ici avec succès.

### I.2.2. Effet collatéral de l'expression ubiquitaire d'*Otx*

Un autre mécanisme, sans doute moins probable, permettrait d'expliquer le phénotype obtenu dans les embryons *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>; ROSA26<sup>Otx2-GFP</sup>*. Il est effectivement possible qu'un effet collatéral, et non direct, du maintien ubiquitaire de l'expression d'*Otx2* dans l'embryon soit responsable de l'antériorisation observée de l'organisateur isthmique. Comme l'a décrit la partie II.2.2. de l'introduction, les positions relatives initiales d'*Otx2* et de *Gbx2* issues de la dynamique d'expression qui prend place à la fin de la gastrulation sont sous le contrôle de signaux externes, notamment la voie *Wnt8*, et possiblement celles

de Notch et de l'acide rétinoïque (RA). L'expression maintenue d'*Otx2* dans la partie postérieure de l'embryon pourrait perturber, ou augmenter l'activité de l'une de ces voies, ce qui agirait par la suite indirectement sur l'expression de *Gbx2* en l'antériorisant. *Otx2* est par exemple capable d'activer l'expression de la rétinol déshydrogénase *Rdh10* dans certains tissus (Housset et al., 2013). Il pourrait dans le modèle *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>; ROSA26<sup>Otx2-GFP</sup>* augmenter la transcription de cette enzyme et ainsi augmenter l'action postériorisante du signal RA.

Cette hypothèse est considérée comme moins probable car de telles modifications dans l'activité des voies de signalisation auraient des conséquences plus larges sur la signalisation de l'embryon (notamment au niveau du métencéphale), qui sont absentes des embryon *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>; ROSA26<sup>Otx2-GFP</sup>*. Il serait néanmoins intéressant d'étudier l'expression des acteurs de ces différentes voies dans notre modèle.

## II. Fonctions d'*Otx2* dans la rétine adulte

Si la première partie des résultats a étudié l'importance de la régulation de l'expression d'*Otx2* dans le contrôle de sa fonction, les autres chapitres se sont quant à eux intéressés aux mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer la différence d'importance d'*Otx2* dans deux tissus voisins, le RPE et la neurorétine adultes. Une étude précédente du laboratoire a pu montrer qu'*Otx2* était essentiel dans le RPE à la survie des photorécepteurs, et y avait donc un rôle non-cellule autonome, mais sa fonction dans la neurorétine restait inconnue. Les travaux présentés ici suggèrent qu'il régulerait des ensembles très différents de gènes dans ces deux tissus, phénomène qui serait à la base de son activité différentielle. Ils nous permettent également de formuler une hypothèse quant à son rôle dans la neurorétine adulte

II.1. *Otx2* régule deux répertoires différents de gènes-cibles dans le RPE et la neurorétine.

II.1.1. Une dynamique différente de fixation d'*Otx2* dans les deux tissus de la rétine adulte

Le très faible recouvrement des ensembles de sites de liaison d'*Otx2* dans les deux tissus est remarquable : des 5805 motifs au total auxquelles la protéine se lie dans la rétine, seuls 426 sont communs, ce qui représente seulement 10% de ses sites dans la neurorétine, et 25% de ceux dans le RPE. Le profil d'occupation génomique d'*Otx2* est également variable selon le tissu considéré. Une partie conséquente de ses sites de fixation dans la neurorétine est en effet située dans des régions promotrices, alors que leur distribution est plus uniforme (sans pour autant pouvoir être attribuée uniquement au hasard) dans le RPE. Ainsi, la protéine *Otx2* a une dynamique de fixation à l'ADN très spécifique en fonction du tissu considéré.



#### II.1.1.1. Une activité régulatrice d'*Otx2* par conséquent différente

Lorsqu'on associe chaque site de fixation d'*Otx2* à son gène le plus proche (stratégie dont la pertinence sera discutée plus bas en II.1.2.), le recouvrement reste minimal entre l'activité régulatrice potentielle d'*Otx2* dans la neurorétine et celle qu'il aurait dans le RPE. Il est donc vraisemblable qu'il assure des fonctions très différentes dans les deux couches de la rétine, en y régulant des processus cellulaires distincts. 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 les rôles de ce facteur de transcription aient très peu d'aspects communs entre les types cellulaires.

Il est particulièrement frappant de noter que dans certains cas, *Otx2* se fixe à proximité du même gène mais au niveau de sites différents dans le RPE et la NR : c'est par exemple le cas d'*Elmo2*, impliqué dans la polarité cellulaire (*Ho et al., 2009*). Il pourrait alors avoir des capacités de régulation de ce gène différentes selon le tissu. Ainsi, le contrôle de l'expression des rares gènes en commun pourrait varier entre la RPE et la NR, ce qui conférerait à *Otx2* des activités régulatrices globales complètement différentes d'un type cellulaire à l'autre.

Il est pourtant au premier abord difficile de concevoir qu'un même facteur de transcription, à la structure et donc aux propriétés biochimiques quasi-constantes à travers les tissus (les deux isoformes de la protéine ne différant que de façon minimale), puisse se lier de façons si diverses pour réguler des répertoires si variables. Les mécanismes qui peuvent expliquer un tel phénomène sont d'au moins deux sortes, et seront explorés dans les sous-parties suivantes.

#### II.1.1.2. Structure de la chromatine et fixation d'*Otx2*

La structure de la chromatine est capable de rendre certains gènes plus accessibles que d'autres (*Apostolou et Hochedlinger 2013*). En fonction du type cellulaire et de l'état de la chromatine, *Otx2* aura donc des facilités plus ou moins grandes à se lier à

certaines de ses sites, et son profil de fixation en sera par conséquent affecté. Etant donné la structure très particulière de la chromatine des photorécepteurs (cf Introduction III.1.3.), différent de celles de toute autre cellule, et les histoires développementales distinctes de la NR et du RPE, qui ont pu laisser leurs traces au niveau de la chromatine, il est possible que ce mécanisme explique au moins en partie la différence de dynamique d'*Otx2* entre eux. Il serait à ce titre intéressant d'étudier, *via* l'analyse de marqueurs de l'hétérochromatine par exemple, l'état chromatinien dans un des tissus des sites de fixation normalement occupés par *Otx2* dans l'autre.

Cependant, ce processus pourrait difficilement expliquer la fixation différentielle d'*Otx2* en amont d'un même gène selon le tissu considéré. Une seconde hypothèse, non exclusive, serait alors que les partenaires protéiques d'*Otx2*, variables en fonction du tissu considéré, lui confèrent des affinités distinctes pour certains sites de fixation.

#### II.1.1.3. Interactome d'*Otx2* et sites de fixation

On sait déjà que les partenaires protéiques d'*Otx2* peuvent faire varier ses capacités transactivatrices (Agoston *et al.*, 2009). Mais une étude très récente suggère qu'ils pourraient également moduler sa dynamique de fixation à l'ADN. Au niveau de l'organisateur de la tête du Xénope, en effet, *Otx2* formerait deux types de complexes protéiques, le premier activateur avec LIM-1, le second répresseur avec Gsc. Ces deux complexes ont des répertoires différents de sites de fixation, et leur action complémentaire permettrait la mise en place correcte de la tête (Yasuoka *et al.*, 2014). En fonction de ses partenaires, *Otx2* se fixerait donc à des endroits différents du génome.

Il est donc possible que dans le RPE l'homéoprotéine *Otx2* ait un interactome substantiellement différent de celui qu'elle développe dans la NR, ce qui aboutirait à sa fixation au niveau d'ensemble distincts de sites. L'obtention de l'interactome d'*Otx2* dans le RPE permettrait d'étudier la validité de cette hypothèse par comparaison à celui à présent connu de la NR. Il est cependant important de noter ici les difficultés techniques d'une telle entreprise : le RPE consistant en une seule couche de cellules, l'extraction de suffisamment de matériel protéique pour permettre l'analyse par MS/MS demande une quantité actuellement déraisonnable d'animaux. Les progrès de résolution et de sensibilité

des techniques de spectrométrie sont cependant tels que la démarche proposée ici deviendra rapidement envisageable.

Si les raisons sous-jacentes restent encore à explorer, l'approche à grande échelle qu'est le ChIP-seq a par conséquent permis d'établir les bases moléculaires expliquant la différence phénotypique de fonction d'*Otx2* dans les deux tissus de la rétine adulte. L'analyse de ses résultats nécessite cependant d'effectuer des associations prédictives dont la pertinence doit être discutée.

## II.1.2. Pertinence de l'association entre sites de fixation et régulation de gènes proches

### II.1.2.1. Relation d'un site de fixation à un gène proche

La stratégie la plus courante utilisée pour déduire l'activité régulatoire d'un facteur de transcription à partir de l'ensemble de ses sites de fixation consiste à en rechercher les gènes les plus proches et à les recenser ; c'est celle qui a été adoptée pour l'analyse du ChIP-seq d'*Otx2*. Théoriquement cependant, certains enhanceurs peuvent se trouver à de très longues distances du gène qu'ils régulent, voire sur des chromosomes différents. Il est donc possible qu'une stratégie purement linéaire telle que celle employée ici résulte en des mésappariements site de fixation/gène-cible. Le problème ne se pose pas vraiment pour les sites occupés par *Otx2* et très proches du TSS (*transcription start site*), qui constituent une grande partie de son profil dans la neurorétine, qui sont très probablement impliqués dans la régulation du gène immédiatement adjacent ; il est cependant beaucoup plus prégnant pour des sites de fixation d'*Otx2* présents au niveau des régions intergéniques, pour lesquelles l'association avec le gène le plus proche est beaucoup plus lâche.

Des relations plus exactes entre les sites de fixation d'*Otx2* et les gènes qu'ils régulent pourraient sans doute être obtenus grâce aux nouvelles techniques de capture de la conformation des chromosomes (3C/4C/5C/6C), qui dévoilent l'association entre

séquences d'ADN parfois éloignées qui résultent de la conformation tridimensionnelle de la chromatine dans les noyaux. Ces techniques peuvent être accompagnées de ChIP (comme dans le cas de la ChIP3C ou e4C, *Sexton et al., 2012*) et permettent alors d'étudier les séquences avec lesquelles des sites de fixation connus d'une protéine d'intérêt se retrouvent en contact *in vivo*. Une telle technique permettrait de vérifier si certains sites de fixation intergéniques d'*Otx2*, considérés ici par défaut comme régulant le gène le plus proche, ne se retrouveraient en fait pas à proximité de séquences nucléiques de promoteurs proches d'un autre gène. On pourrait alors corriger l'association site de fixation/gène-cible en considérant qu'*in vivo* l'effet potentiel d'*Otx2* se ferait en fait ressentir sur ce second candidat.

#### II.1.2.2. Prédiction de l'activité régulatrice d'un site de fixation

Il existe un deuxième obstacle à l'association qui est faite en site de fixation et régulation d'un gène-cible : quand bien même chaque site serait correctement apparié au bon gène-cible, rien ne garantit qu'il ait une quelconque activité régulatrice, et encore moins un rôle fonctionnel majeur. Dans une étude similaire à celle présentée ici, l'équipe de J. Corbo avait montré que Crx se fixait à plusieurs endroits en amont d'un même gène ; or un seul de ces sites de fixation était essentiel à l'activité transactivatrice de Crx. Les autres n'avaient qu'un rôle de modulation plus ou moins fort, voire pas de rôle du tout (*Corbo et al., 2010*). Les résultats de la partie II, lorsqu'ils sont confrontés aux études précédentes menées au laboratoires, mènent à une conclusion similaire. *Otx2* se fixe en effet à 1638 sites distincts dans le RPE, et son KO dans le même tissu ne mène cependant à la dérégulation que de 25 gènes (*Housset et al., 2013*). Il est donc statistiquement très improbable que tous les sites de fixation détectés pour *Otx2* dans le RPE aient un effet régulateur.

Pourtant, la prédiction de la fonctionnalité des sites de fixation d'un facteur de transcription est dans cette approche à grande échelle un élément fondamental à la compréhension fine de son rôle. Il est donc essentiel de trouver des critères fiables qui permettraient d'extraire de bons candidats d'un ensemble de sites actifs. En étudiant ce qui différenciait les sites occupés par *Otx2* en amont des gènes qu'il régule de façon certain dans le RPE du reste de son profil de fixation, nous avons pu conclure que la

conservation évolutive d'un motif était un indice fort de son caractère fonctionnel. La sélection de sites occupés par *Otx2* selon leur conservation dans d'autres espèces est donc à même de fournir des candidats intéressants pour l'étude de la fonction de ce facteur de transcription. Cette stratégie est déjà souvent déployée à l'échelle du génome entier (sans ChIP-seq), et ce avec succès, pour trouver des enhancers susceptibles de jouer un rôle régulateur important (*Wang et al., 2014*).

Dans une étude récente, l'équipe de J. Corbo était revenue sur les résultats de leur ChIP-seq *Crx*, et avaient pour leur part conclu que les sites de fixation fonctionnels de *Crx* (et donc d'*Otx2* puisqu'ils partagent le même ensemble de motifs dans la neurorétine) étaient pour leur part caractérisés par une forte proportion en GC (*White et al., 2013*). Cette conclusion ouvre une possibilité intrigante : on sait que l'homéoprotéine *Crx* se lie aux facteurs SP1/SP3/SP4 et développe avec eux une synergie pour la transactivation de ses gènes-cibles. Or le motif de fixation potentiel de chacun de ces facteurs est très riche en GC. Il est donc possible que la richesse en GC qui caractérise les motifs de fixation fonctionnels de *Crx* soit due à la présence de sites de fixation pour SP1/SP3/SP4 : la capacité de formation de complexes protéiques à leur niveau serait l'élément déterminant de la fonctionnalité des sites de fixation.

Cette hypothèse expliquerait d'ailleurs pourquoi la richesse en GC n'est pas un critère prédictif correct pour la fonctionnalité des sites de fixation d'*Otx2* dans le RPE. En effet, l'interactome d'*Otx2* dans la neurorétine a permis de révéler qu'au contraire de son paralogue, ce facteur de transcription ne se lie pas à SP1/3/4. La présence de sites de fixation de ces facteurs à proximité d'une séquence TAATCC n'est donc pas la marque de la formation d'un complexe protéique, et n'a aucun raison d'avoir une portée fonctionnelle.

Ce concept pourrait cependant être utilisé de manière fructueuse pour prédire l'activité d'*Otx2* dans un tissu quelconque. Une fois son interactome connu au niveau de ce tissu (par l'utilisation de la lignée *Otx2<sup>CTAP-tag</sup>*), il serait possible d'en extraire les facteurs de transcription au motif de liaison à l'ADN connu. Il suffirait alors de recenser, dans l'ensemble des sites de fixation trouvés par ChIP-seq pour *Otx2*, ceux qui présentent à proximité des motifs de liaison de ses partenaires. On obtiendrait alors une liste potentiellement très fiable de *hotspots* de l'activité d'*Otx2*, qui pourrait encore être raffinée par le critère de conservation évolutive exposé plus haut.

La validation ultime des enhancers putatifs découverts par une telle méthode reste l'analyse des conséquences de leur KO. A ce niveau, le rendement et la rapidité

impressionnants du nouveau système CRISPR/Cas (*Yang et al., 2013*) commencent à permettre une approche quasi-systématique de l'étude fonctionnelle des enhancers. Les approches utilisées dans les parties II. et III. des résultats peuvent donc potentiellement être combinées pour arriver à l'étude presque exhaustive des bases moléculaires de l'activité de régulation génétique d'*Otx2* ; elles ont déjà permis ici d'étudier plus avant son rôle dans la neurorétine.

## II.2. *Otx2* dans la neurorétine de souris adulte

II.2.1. *Otx2* ou *Crx* dans la rétine adulte : redondance, déséquilibre fonctionnel ou complémentarité ?

La comparaison du profil de fixation d'*Otx2* à l'ADN dans la neurorétine avec celui de *Crx* révèle un énorme recouvrement : les deux homéogènes de la famille *Otx* partagent plus de 50% de leurs sites occupés, et 65% des sites occupés par *Otx2* le sont aussi par *Crx*. Par ailleurs, l'étude du transcriptome rétinien après ablation d'*Otx2* révèle que son *knockout* n'affecte à lui seul l'expression d'aucun gène dans la neurorétine. L'ensemble de ces résultats suggère qu'*Otx2* et *Crx* présentent une certaine équivalence fonctionnelle dans ce tissu : ils se fixent aux mêmes endroits, régulent donc potentiellement les mêmes gènes, ce qui permettrait à l'un des membres de la famille d'assurer intégralement les fonctions de l'autre en son absence.

Cependant, l'étude de l'interactome d'*Otx2* a pu montrer qu'il n'avait pas de partenaires protéiques en commun avec son paralogue. Plusieurs études (détaillées en III. 4.3. de l'Introduction) ont en effet prouvé que *Crx* développait des interactions physiques fonctionnellement importantes avec un certain nombre de facteurs de transcriptions essentiels au développement des photorécepteurs et à la régulation de la phototransduction. Aucune de ces interactions n'existe avec *Otx2*. Au niveau des sites de fixation qu'ils ont en commun dans la neurorétine, *Otx2* et *Crx* forment donc autour d'eux des complexes protéiques totalement différents, aux capacités régulatrices potentiellement distinctes également. Deux hypothèses peuvent alors être formulées quant à leurs rôles respectifs dans la neurorétine.

Tout d'abord, on peut imaginer un fort déséquilibre fonctionnel entre *Otx2* et *Crx*. Dans ce cas de figure, *Crx* serait le régulateur principal de la rétine adulte, qui développe les interactions protéiques pertinentes au fonctionnement des photorécepteurs dans le système visuel, et *Otx2* n'y aurait qu'une importance très limitée. L'expression de ce dernier facteur dans la neurorétine pourrait alors n'être due qu'au maintien de sa transcription depuis des étapes antérieures du développement, moment auquel il joue un rôle par contre essentiel (cf. Introduction III.2.). Il est cependant étrange que l'expression d'un facteur de transcription aux capacités aussi diverse qu'*Otx2* ne soit alors pas éteinte à la fin de la différenciation de la neurorétine, comme c'est le cas pour d'autres comme *Blimp1* par exemple (Brzezinski et al., 2010). Alternativement, et toujours dans le cadre de cette hypothèse, la fonction principale d'*Otx2* en tant que facteur de transcription pourrait être de servir de cofacteur à *Crx* (avec qui il interagit bien, cf. III des Résultats) notamment dans le maintien de l'expression des autres régulateurs des photorécepteurs. Les deux membres de la famille *Otx*, ainsi que *RORβ*, coopèrent effectivement dans l'activation de l'expression de *Nrl* (Montana et al., 2011) ; l'interaction physique maintenant avérée entre *Otx2* et *Crx* d'une part, et *Otx2* et *RORβ* d'autre part permet de supposer qu'ils agissent sous forme d'un complexe protéique. En généralisant cette observation, dans la neurorétine adulte, le rôle d'*Otx2* pourrait donc être de moduler la fonction de son paralogue. Enfin, il est tout à fait possible qu'une des nouvelles fonctions potentielles d'*Otx2* dans la neurorétine, discutées en IV, soit en fait la principale raison de son expression, et que son activité de facteur de transcription n'en soit qu'un corollaire.

La construction d'une lignée *Crx* floxée, qui permettrait l'invalidation de ce gène par l'activité d'une recombinase *Cre* permettrait de vérifier, ou au contraire d'invalider cette hypothèse. En effet, en cas de prépondérance de *Crx* dans la neurorétine adulte, l'induction du KO de ce facteur de transcription dans la rétine de souris *Otx2<sup>CreERT2/+</sup>;*Crx<sup>fl/fl</sup>*, selon une stratégie semblable à celle déjà en place au laboratoire, devrait avoir des conséquences phénotypiques prononcées dans la NR.*

Il est toutefois également possible que les complexes protéiques distincts formés par *Otx2* et *Crx* assurent des fonctions complémentaires dans la neurorétine de souris adulte. Selon cette hypothèse, bien qu'ils soient capables de se remplacer mutuellement, les deux membres de la famille *Otx* seraient dans une rétine sauvage effectivement responsables de la régulation de processus distincts. Les complexes protéiques *Crx*-positifs seraient affectés au contrôle de la phototransduction, tandis que les complexes *Otx2*-positifs joueraient le même rôle vis-à-vis d'autres processus encore à déterminer.

Dans ce cas de figure, l'induction du KO de *Crx* dans le nouveau modèle murin proposé au paragraphe précédent n'aurait pas plus de conséquences que celui d'*Otx2* dans la neurorétine adulte.

L'étude de l'interactome d'*Otx2* a donc permis de conclure que les deux membres de la famille *Otx* dans la neurorétine occupaient certes les mêmes sites de fixation, mais au sein de complexes protéiques différents. Au vu de ces résultats, on peut écarter l'idée d'une simple redondance d'*Otx2* et de *Crx* dans ce tissu.

II.2.2. Pourquoi *Otx2* et *Crx* ne partagent-ils pas leurs partenaires protéiques ?

Comme l'expliquait la partie III.2. de l'introduction, l'homéodomaine de *Crx* est son principal domaine apparent d'interaction avec les facteurs *Nrl*, *Nr2e3*, et *SP1/3/4* ; il est en tout cas essentiel et suffisant à la formation de ces complexes. Or on a pu voir que la famille *Otx* faisait preuve d'une étonnante conservation de séquence, et les homéodomains de *Crx* et d'*Otx2* présentent 87% de similitude chez la souris. Comment expliquer alors qu'*Otx2* ne puisse pas interagir avec les partenaires de *Crx* ?

Il est bien sûr possible que la légère divergence de séquence entre *Crx* et *Otx2*, déjà non négligeable à l'échelle de conservation de l'homéodomaine dans la famille protéique (à titre de comparaison il n'y a qu'un acide aminé de différence entre les domaines d'*Otx2* et d'*Otx1*), suffise à expliquer cette différence d'affinité. Une hypothèse alternative et non-exclusive serait de supposer un rôle au reste de la séquence protéique des deux facteurs dans la modulation de leur affinité pour d'autres protéines. *Otx2* et *Crx* se lieraient à leurs partenaires *via* leurs homéodomains, mais le reste de leur structure secondaire pourrait modifier l'accessibilité et le microenvironnement de ces derniers. Chez les Mammifères notamment, la séquence protéique de *Crx* hors de l'homéodomaine diverge assez fortement de celle des autres membres de la famille *Otx* (*Plouhinec et al., 2005*) : cette particularité a pu lui conférer une affinité nouvelle ou supérieure pour ses partenaires spécifiques.



### III. Vers une approche systématique de l'interactome d'Otx2

Par l'analyse de l'interactome d'*Otx2* dans la neurorétine de souris adulte, la lignée *Otx2*<sup>CTAP-tag</sup> a permis d'y éclaircir la fonction de cet homéogène. Mais c'est également un outil puissant qui permettra de mieux comprendre les fonctions d'*Otx2*. La démarche adoptée dans la rétine est effectivement généralisable à l'ensemble des tissus qui expriment *Otx2* au cours du développement, et ouvre la voie à une analyse systématique de son interactome. Cette sous-partie s'attachera à décrire les perspectives théoriques et appliquées offertes par une telle analyse.

#### III.1. Noyau de partenaires et interactions tissus-spécifiques

L'étude systématique de l'interactome d'*Otx2* en offrirait tout d'abord bien sûr un aperçu général. Il serait ainsi possible d'étudier la fréquence d'observation et la spécificité tissulaire des différents partenaires d'*Otx2*. Existe-t-il certaines protéines avec lesquels *Otx2* interagira quel que soit sa zone d'expression ? Auquel cas, quelles sont les fonctions jusque là accordées à ces protéines ? Et à l'inverse, peut-on trouver des partenaires d'*Otx2* spécifiques à un tissu particulier ? La première catégorie de protéines constituerait le «noyau» de partenaires d'*Otx2*, et elle formerait avec lui un complexe protéique ubiquitaire qu'il faudrait alors considérer comme une unité fonctionnelle. Il serait dans ce cas intéressant d'étudier en quelle mesure ce noyau de partenaires contribue à l'activité propre de l'homéoprotéine. Les partenaires permanents d'*Otx2* pourraient en effet être des acteurs-clés de sa fonction transactivatrice, que l'homéoprotéine recruterait pour assurer ce rôle ; elle apporterait alors principalement au complexe protéique dont elle fait partie sa capacité à se lier à l'ADN. Les modalités biochimiques de formation d'un tel complexe seraient également du plus haut intérêt : l'étude par simple double hybride de l'état de l'interactome d'*Otx2* en fonction d'une série de mutations dirigées de la protéine suffirait à dégager ses domaines d'interaction protéique majeurs.

La seconde catégorie de protéines, aux interactions tissu-spécifiques, permettrait sans doute de mieux comprendre la multiplicité des rôles que peut assurer le facteur de transcription *Otx2*. Ces partenaires seraient en effet à même de modifier l'activité de la protéine *Otx2* dans leur tissu d'expression : des partenaires différents génèreraient des profils de fixation différents du facteur de transcription, et donc des répertoires différents de gènes-cibles. Comme on l'a vu dans le II.1.2.2., leur connaissance nous permettrait éventuellement de prédire avec plus d'efficacité les sites de fixation fonctionnels de

l'homéogène dans un tissu donné ; elle pourrait même nous donner une idée du type d'action, activatrice ou répressive, qu'il aurait sur le réseau génétique en place.

### III.2. Applications pratiques à l'étude de pathologies

La connaissance de l'interactome d'Otx2 a également une portée appliquée. Chez l'Homme, des mutations de ce facteur de transcription sont en effet à l'origine de pathologies développementales, telles que des anophtalmies/microphtalmies, des colobomes oculaires, ou des déficiences hormonales multiples (*Ragge et al., 2005, Wyatt et al., 2008, Tajima et al., 2009, Henderson et al., 2009, Schilter et al., 2011, Dateki et al., 2008, 2010, Diaczok et al., 2008*). Pour une grande majorité d'entre elles, les causes moléculaires de la pathologie sont aisément identifiables : la mutation cause une délétion partielle ou totale d'Otx2, l'empêche de se fixer à l'ADN, ou même d'être transporté au noyau (*Chatelain et al., 2006*). Dans certains cas cependant, notamment pour des mutations faux-sens, les mécanismes moléculaires sont moins claires (*Chatelain et al., 2006, Diaczok et al., 2008*) : deux mutations faux-sens en particulier, en position 133 et 134 de la protéine, semblent n'avoir aucun effet sur la localisation subcellulaire, sur la capacité à se fixer à l'ADN ou sur le potentiel transactivateur d'Otx2 (*Chatelain et al., 2006*). Il est possible que ce type de mutations pathogènes affecte en fait des domaines cruciaux à l'interaction protéine-protéine de l'homéogène, et l'empêche ainsi de former des complexes protéiques cruciaux à son fonctionnement. Une fois l'interactome du tissu concerné connu, il serait donc intéressant d'observer son état en cellules ou *in vitro* dans le cas d'une protéine Otx2 mutée : on pourrait ainsi vérifier si les mutations entraînent la perte de certaines interactions.

A l'inverse, mais avec une pertinence plus faible, l'interaction d'Otx2 avec ses partenaires pourrait servir de test à la fonctionnalité de ces derniers. On peut retrouver dans les membres de l'interactome d'Otx2 dans la neurorétine adulte deux protéines dont le rôle exact n'est pas encore bien caractérisé mais dont les mutations sont à l'origine de maladies : LCA5, et surtout TULP1 (*den Hollander et al., 2007, Mataftsi et al., 2007*). Si la mutation faux-sens de la première semble être à l'origine d'une ciliopathie aux effets pléiotropes, la simple duplication de deux acides aminés de la seconde est à l'origine d'une dégénérescence rétinienne. Il serait intéressant de voir si cette mutation empêche son interaction avec Otx2 ; plus qu'une véritable cause moléculaire de la pathologie, ce serait alors un signe que la mutation de Tulp1 affecte ses capacités de liaison protéine-

protéine. Une approche systématique ou par partenaires-candidats (parmi lesquels on pourrait d'ailleurs compter Crx) permettrait en ce cas de déterminer les interactions cruciales à la fonction de TULP1.

L'étude systématique de l'interactome d'Otx2 ouvre donc la voie vers une connaissance plus fine du fonctionnement de cette protéine dans la cellule malade ou pathologique. Elle pourrait même suggérer de nouveaux rôles pour la protéine Otx2, comme cela a été le cas dans la neurorétine.

#### **IV. De nouvelles fonctions potentielles de l'homéoprotéine Otx2 ?**

Les résultats les plus intéressants issus de l'analyse de l'interactome d'Otx2 dans la neurorétine restent les associations nouvellement découvertes de ce facteur de transcription avec des protéines non seulement nucléaires mais aussi cytoplasmiques, qui en suggèrent de nouvelles fonctions.

##### **IV.1. Une sécrétion de l'homéogène *Otx2* ?**

Une série de travaux du laboratoire d'A. Prochiantz, centrée sur l'étude des facteurs de transcription à homéodomaine *Engrailed*, avaient montré que la protéine EN serait capable de passer d'une cellule à une autre, suivant un mécanisme de type sécrétoire (*Joliot et al., 1997, 1998, revue dans Joliot et Prochiantz, 2005*). Le même laboratoire avait proposé qu'Otx2 pourrait lui aussi être sécrété dans le milieu extracellulaire puis recapté par d'autres cellules : des protéines Otx2 s'accumulent en effet dans les neurones à parvalbumine du système visuel alors que le gène n'y est pas exprimé. Ces protéines pourraient provenir du plexus choroïde ou voyager le long des axones du système visuel (cf. Introduction 1.2.9). Le mécanisme moléculaire qui permettrait la sécrétion des homéogènes est cependant encore largement inconnu. Or on peut relever parmi les partenaires d'Otx2 dans la rétine un certain nombre de protéines impliquées dans la régulation de la localisation subcellulaire et dans les processus d'exocytose, soit spécifiques aux photorécepteurs et bipolaires (comme la complexin-3, associée à la régulation de la libération synaptique au niveau des synapses en ruban), soit plus ubiquitaires (comme *lin7a/c* et *Ral-a*). Ces différents peptides constituent autant de points

de départ possibles pour étudier les bases moléculaires de la sécrétion d'*Otx2* dans la rétine, et sa portée dans d'autres modèles cellulaires.

#### IV.2. *Otx2* pourrait réguler l'intégralité des étapes d'expression de certains gènes

Il est également frappant de remarquer qu'une part non négligeable des partenaires d'*Otx2* a des rôles spécifiques dans l'épissage des ARNm et leur export, ainsi que dans la régulation de la traduction. La protéine la plus enrichie dans notre expérience de spectrométrie de masse, PDIP3, est par exemple une protéine qui se met en place sur l'ARN en fin d'épissage, peut moduler son export en tant que membre du complexe TREX, et même réguler l'efficacité de sa traduction (*Ma et al., 2008, Folco et al., 2014*). Indépendamment de cette interaction forte, *Otx2* se lie aussi à des protéines plus spécialisées dans chacune des étapes : les facteurs d'épissage U2AF1/2, la protéine NXF1, chargée de l'export des ARN, le facteur d'initiation de la traduction Eef1a1 et même une série de protéines ribosomales.

La protéine *Otx2*, en plus de ses capacités de régulation de la transcription, est donc capable de former des interactions avec la plupart des machineries cellulaires impliquées en aval de la transcription dans l'expression génétique. Certaines de ces interactions (avec la machinerie d'export nucléaire par exemple) sont totalement nouvelles, alors que d'autres avaient déjà été suggérées : à l'instar d'EMX2, *Otx2* avait été montré comme capable d'interagir avec eIF4E (*Nédélec et al., 2004*). La possibilité d'une régulation de la traduction par les homéoprotéines avait alors été formulée.

La découverte de ces nouvelles interactions pose à présent de nombreuses questions, les premières en étant bien sûr la portée fonctionnelle et le mécanisme biochimique. La présence de la protéine *Otx2* au niveau des complexes protéiques d'épissage ou de traduction a-t-elle un effet régulateur ? Si oui, selon quel mécanisme moléculaire ? Il se pourrait par exemple que ce facteur de transcription se fixe sur certains ARN et facilite ainsi leur traitement jusqu'à la traduction en stabilisant à leur niveau par ses interactions les complexes protéiques des diverses machineries cellulaires. Il se pourrait également que son rôle n'ait plus rien à voir avec ses capacités de fixation aux acides nucléiques. En plus de pouvoir se lier à l'ADN, on a pu voir que l'homéodomaine

des protéines Otx/Crx était un domaine privilégié d'interaction protéique (cf. Introduction III.2.) ; c'est peut-être par ce biais qu'Otx2 accomplit ses nouvelles fonctions éventuelles. Il pourrait par exemple être important pour faciliter le recrutement de certains facteurs au niveau des gros complexes d'épissage et de traduction.

En parallèle avec la question de la fonctionnalité des interactions d'Otx2 découvertes dans la rétine se pose celle de leur universalité, du point de vue moléculaire comme cellulaire. D'un point de vue cellulaire, on peut tout d'abord se demander si ces nouvelles fonctions d'Otx2, ou du moins les partenaires protéiques qui les caractérisent, se retrouvent dans tous les types cellulaires qui expriment l'homéogène au cours du développement, ou si elles sont restreintes à une certaine catégorie de tissus. La neurorétine, étudiée ici, est un tissu adulte formé de neurones matures, et la seule autre interaction du même type suggérée pour Otx2 avait été observée au bout des axones des neurones olfactifs de souris adultes (*Nédélec et al., 2004*). Il est possible que les processus entrevus dans ces tissus soient restreints aux neurones matures, pour y assurer par exemple une traduction efficace ou modulable au vol des protéines au niveau des structures dynamiques que sont les terminaisons d'axone ; mais il est également envisageable qu'ils soient ubiquitaires dès les premiers moments du développement.

D'un point de vue moléculaire, on peut s'intéresser à l'identité des ARN éventuellement concernés par ces nouvelles fonctions d'Otx2 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génétique. C'est un problème qui a plusieurs aspects ; on peut tout d'abord se demander si les ARN régulés post-transcriptionnellement par Otx2 sont les mêmes que ceux dont la transcription déjà est assurée par l'homéoprotéine. Cela signifierait qu'Otx2 est capable d'accompagner les produits de ses gènes-cibles pour continuer leur régulation. Dans ce cas, l'intégralité des gènes-cibles d'Otx2 est-elle concernée par ce processus, ou seul un sous-ensemble de ces derniers est-il sujet à ces étapes secondaires de contrôle ? De façon corollaire, Otx2 accompagne-t-il alors les mêmes ARN tout au long de leur expression, jusqu'à la synthèse protéique, ou différents sous-ensembles sont-ils concernés par chaque étape de régulation supplémentaire ?

La caractérisation et la dissection moléculaire de ces nouvelles fonctions potentielles de la protéine Otx2 posera de nombreux défis, mais plusieurs approches complémentaires sont envisageables pour approcher le problème. Il est tout d'abord très important de s'assurer *in vivo* de la colocalisation des protéines dont notre approche protéomique a montré l'interaction. Une étape d'analyse fine, par immunofluorescence

confocale par exemple, de la localisation subcellulaire d'Otx2 est par conséquent indispensable, pour vérifier notamment qu'on le retrouve bien au niveau de particules ribonucléiques ou de ribosomes. L'analyse systématique de l'interactome d'Otx2, proposée en III, permettrait en parallèle de fournir une idée de la portée des processus étudiés, en recherchant la présence des partenaires caractérisés dans la rétine au niveau d'autres tissus. Une seconde étape extrêmement intéressante serait ensuite de recenser l'ensemble des ARNs associés à Otx2 (au sein d'un complexe protéique plus large) dans un type cellulaire, pour d'une part vérifier que cette homéoprotéine peut être associée à des ARNs en cours de traitement, et pour obtenir d'autre part une liste de gènes candidats à cette nouvelle fonction potentielle d'Otx2. La méthode de RIP-seq permet d'effectuer avec l'ARN natif d'une cellule ce que le ChIP-seq effectue avec l'ARN : elle permet de purifier et de séquencer les ARN associés à une protéine particulière (*Zhao et al., 2010*). Une stratégie analogue à celle utilisée dans la partie II. des résultats de cette thèse pourrait donc être mise en place afin d'extraire un ensemble fiable de gènes potentiellement régulé post-transcriptionnellement par Otx2. Enfin, forte de cette liste de candidats, une troisième étape sur culture de cellules, modèle dans lequel la concentration d'Otx2 peut facilement être modulée (surexpression par transfection, *knock-down* par siRNA, etc.) pourrait s'intéresser aux mécanismes moléculaires du processus en étudiant les variations d'efficacité de transcription et de traduction des gènes-candidats en fonction de la concentration d'Otx2. Alternativement, l'étape de RIP-seq pourrait être remplacée par une étude plus systématique de l'exome et de la traduction dans le modèle de culture cellulaire.

# CONCLUSION

Le facteur de transcription *Otx2* est impliqué dans de nombreux processus du développement embryonnaire, et est capable de réguler des répertoires de gènes distincts pour jouer ses différents rôles. Pour mieux comprendre les mécanismes qui lui permettent d'assurer des fonctions aussi multiples de façon cohérente avec les autres processus développementaux à l'oeuvre, le travail présenté ici a étudié l'importance de la régulation spatio-temporelle de son expression ainsi que celle du contexte cellulaire dans la mise en place des bases moléculaires de son activité.

L'étude de son rôle dans le positionnement de l'isthme a d'abord été étudié. Dans un modèle murin dans lequel l'expression d'*Otx2* est maintenue ubiquitaire, plutôt que d'être antériorisée, l'expression des différents acteurs d'un organisateur isthmique fonctionnel est déplacée en position antérieure, contrairement aux prédictions du modèle actuel. Ces résultats suggèrent qu'une régulation fine du facteur par d'autres acteurs du développement est nécessaire à sa fonction, mais que les modalités de cette régulation sont encore inconnues. Une hypothèse serait qu'un seuil net de concentration en protéines Otx est nécessaire à la mise en place de l'isthme.

Le rôle du contexte cellulaire a pour sa part été étudié dans la rétine de souris adulte, modèle qui présente l'avantage d'être moins dynamique à moyen terme. *Otx2* est exprimé dans deux tissus adjacents de cette structure, la neurorétine et le RPE, dans lesquels son importance apparente varie fortement. La comparaison des profils de fixation de cet homéogène à l'ADN dans les deux tissus de la rétine révèle que son occupation du génome, et donc sa fonction potentielle, dépend du type cellulaire. Le contexte cellulaire influe donc sur les capacités de fixation d'*Otx2*.

Les interactions que ce facteur de transcription développe avec des partenaires différents en fonction du type cellulaire constituent une des caractéristiques potentiellement variables du contexte cellulaire. Une nouvelle lignée murine a donc été développée qui permet l'exploration de l'interactome de la protéine Otx2. La validation de cette lignée a mené au recensement exhaustif des partenaires de cette homéoprotéine dans la neurorétine de

souris adulte, et son analyse systématique permettra d'étudier l'importance des interactions qu'elle développe dans la régulation de sa fonction.

L'analyse couplée de l'interactome et du profil de fixation d'*Otx2* dans la neurorétine ont déjà permis de constater une asymétrie fonctionnelle entre ce dernier et son paralogue *Crx* : ces deux membres de la famille *Otx* se fixent à des endroits identiques de l'ADN, mais au sein de complexes protéiques différents. La teneur exacte de cette asymétrie reste à déterminer. Enfin, la découverte de partenaires protéiques inattendus de la protéine *Otx2*, impliqués notamment dans l'épissage des ARN, leur export, et leur traduction, suggèrent des fonctions nouvelles pour ce facteur de transcription, qui devront également être étudiées.



# BIBLIOGRAPHIE

## A

**Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A, Brûlet P,** Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*<sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation, 1995, *Development* **121**:3279-3290

**Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Simeone A,** Genetic control of brain morphogenesis through *Otx* gene dosage requirement, 1997, *Development* **124**:3639-3650.

**Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Briata P, Corte G, Simeone A,** Visceral endoderm-restricted translation of *Otx1* mediates recovery of *Otx2* requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation, 1998a, *Development* **125**:5091-5104

**Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Barone P, Reichert H, Finkenstein R, Simeone A,** Murine *Otx1* and *Drosophila otd* genes share conserved genetic functions required in invertebrate and vertebrate brain development, 1998b, *Development* **125**:1691-1702

**Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, Barone P, Perera M, Choo D, Wu D, Corte G, Simeone A,** Differential transcriptional control as the major molecular event in generating *Otx1*<sup>-/-</sup> and *Otx2*<sup>-/-</sup> divergent phenotypes, 1999, *Development* **126**:1417-1426

**Acampora D, Boyl P P, Signore M, Martinez-Barbera J P, Ilengo C, Puelles E, Annino A, Reichert H, Corte G, Simeone A,** OTD/OTX2 functional equivalence depends on 5' and 3' UTR-mediated control of *Otx2* mRNA for nucleo-cytoplasmic export and epiblast-restricted translation, 2001, *Development* **128**:4801-4813.

**Acampora D, Annino A, Puelles E, Alfano I, Tuorto F, Simeone A,** OTX1 compensates for OTX2 requirement in regionalisation of anterior neuroectoderm, 2003, *Gene Expression Patterns* **3(4)**:497-501

**Acampora D, Annino A, Tuorto F, Puelles E, Lucchesi W, Papalia A, Simeone A,** *Otx* genes in the evolution of the vertebrate brain, 2005, *Brain Res Bull* **66**:410-420

**Acampora D, Di Giovannantonio L G, Di Salvio M, Mancuso P, Simeone A,** Selective inactivation of *Otx2* mRNA isoforms reveals isoform-specific requirement for visceral endoderm anteriorization and head morphogenesis and highlights cell diversity in the visceral endoderm, 2009, *Mech Dev* **126**:882-897

**Adachi Y, Nagao T, Saiga H, Furukubo-Tokunaga K,** Cross-phylum regulatory potential of the ascidian *Otx* gene in brain development in *Drosophila melanogaster*, 2001, *Dev Genes Evol* **211**:269-80.

**Adamson DC, Shi Q, Wortham M, Northcott PA, Di C, Duncan CG, Li J, McLendon RE, Bigner DD, Taylor MD, Yan H, OTX2 is critical for the maintenance and progression of *Shh*-independent medulloblastomas, 2010, *Cancer Res* 70(1):181-91**

**Agoston Z, Schulte D, *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, 2009, *Development* 136(19):3311-3322**

**Akagi T, Mandai M, Ooto S, Hiramami Y, Osakada F, Kageyama R, Yoshimura N, Takahashi M, *Otx2* homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue, 2004, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(12):4570-4575**

**Akagi T, Akita J, Haruta M, Suzuki T, Honda Y, Inoue T, Yoshiura S, Kageyama R, Yatsu T, Yamada M, Takahashi M, Iris-derived cells from adult rodents and primates adopt photoreceptor-specific phenotypes, 2005, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(9):3411-3419**

**Alfano G, Vitiello C, Cacciopoli C, Caramico T, Carola A, Szego M J, McInness R R, Auricchio A, Banfi S, Natural antisense transcripts associated with genes involved in eye development, 2005, *Hum Mol Genet* 14(7):913-923**

**Alvarado-Mallart R M, Martinez S, Lance-Jones C, Pluripotentiality of the 2-day-old avian germinative neuroepithelium, 1990, *Dev Biol* 139:75-88**

**Ang S-L, Conlon R A, Jin Ou, Rossant J, Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse *Otx2* in ectoderm explants, 1994, *Development* 120:2979-2989**

**Ang S-L, Jin O, Rhinn M, Daigle N, Stevenson L, Rossant J, A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain, 1996, *Development* 122:243-252**

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

**Ashkenazi-Hoffnung L, Lebenthal Y, Wyatt A W, Ragge N K, Dateki S, Fukami M, Ogata T, Philip M, Gat-Yablonski G, A novel loss-of-function mutation in *OTX2* in a patient with anophthalmia and isolated growth hormone deficiency, 2010, *Hum Genet* 127(6):721-729**

## B

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

**Bally-Cuif L, Gulisano M, Broccoli V, Boncinelli E, *c-otx2* is expressed in two different phases of gastrulation and is sensitive to retinoic acid treatment in chick embryo, 1995, *Mech Dev* 49:49-63**

- Bally-Cuif L, Cholley B, Wassef M**, Involvement of *Wnt-1* in the formation of the mes/metencephalic boundary, 1995, *Mech Dev* **53(1)**:23-34
- Béby F, Housset M, Fossat N, Le Greneur C, Flamant F, Godement P, Lamonerie T**, *Otx2* gene deletion in adult mouse retina induces rapid RPE dystrophy and slow photoreceptor degeneration, 2010, *PLoS ONE* **5(7)**: e11673
- Beddington R S, Robertson E J**, Axis development and early asymmetry in mammals, 1999, *Cell* **96**:195-209.
- Bellipanni G, Murakami T, Doerre O G, Andermann P, Weinberg E S**, Expression of *Otx* homeodomain proteins induces cell aggregation in developing Zebrafish embryos, 2000, *Dev Biol* **223(2)**:339-353.
- Bely A E, Wray G A**, Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from *engrailed*- and *orthodenticle*-class gene expression,, *Development* **128**: 2781-2791
- Bertrand V, Hudson C, Caillol D, Popovici C, Lemaire P**, Neural tissue in ascidian embryos is induced by FGF9/16/20, acting via a combination of maternal GATA and Ets transcription factors, 2003, *Cell* **115**:615-27
- Beurdeley M, Spatazza J, Lee H H C, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo A A, Hensch T K, Prochiantz A**, *Otx2* binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex, 2012, *J Neurosci* **32(27)**:9429-9437
- Bharti K, Liu W, Csermely T, Bertuzzi S, Arnheiter H**, Alternative promoter use in eye development: the complex role and regulation of the transcription factor MITF, *Development* **135(6)**:1169-1178
- Blitz I L, Cho K W**, Anterior neurectoderm is progressively induced during gastrulation: the role of the *Xenopus* homeobox gene *orthodenticle*, 1995, *Development*, **121**:993-1004
- Boncinelli E, Gulisano M, Broccoli V**, *Emx* and *Otx* homeobox genes in the developing mouse brain, 1993, *J Neurobiol* **24(10)**:1356-1366
- Boon K, Eberhart C G, Riggins G J**, Genomic amplification of *Orthodenticle* homologue 2 in medulloblastoma, 2005, *Cancer Res* **65**:703-707
- Bouillet P, Chazaud C, Oulad-Abdelghani M, Dollé P, Champon P**, Sequence and expression pattern of the *Stra-7 (Gbx-2)* homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinomal cells, 1995, *Dev Dyn* **204(4)**:372-382
- Boyl P P, Signore M, Acampora D, Martinez-Barbera J P, Ilengo C, Annino A, Corte G, Simeone A**, Forebrain and midbrain development requires epiblast-restricted *Otx2* translational control mediated by its 3' UTR, 2001, *Development* **128**:2989-3000
- Brand M, Heisenberg C-P, Jiang Y-J, Beuchle D, Lun K, Furutani-Seiki M, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M, Kane D A, Kelsh R N, Mullins M C, Odenthal J, van Eeden F J M, Nüsslein-Volhard C**, Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain, 1996, *Development* **123(1)**:179-190
- Briata P, Ilengo C, Bobola N, Corte G**, Binding properties of the human homeodomain protein OTX2 to a DNA target sequence, 1999, *FEBS Letters* **445**:160-164

**Broccoli V, Boncinelli E, Wurst W**, The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmus organizer, 1999, *Nature* **401**:164-168

**Brown N L, Patel S, Brzezinski J, Glaser T**, *Math5* is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation, 2001, *Development* **128(13)**:2497-508

**Bruce A E E, Shankland M**, Expression of the head gene *Lox22-Otx* in the leech *Helobdella* and the origin of the Bilaterian body plan, 1998, *Dev Biol* **201**:101–112

**Brzezinski J A, Lamba D A, Reh T A**, Blimp1 controls photoreceptor versus bipolar cell fate choice during retinal development, 2010, *Development* **137(4)**:619-629

**Brzezinski J A, Uoon Park K, Reh T. A**, *Blimp1 (Prdm1)* prevents re-specification of photoreceptors into retinal bipolar cells by restricting competence, 2013, *Dev Biol* **384**:194-204

**Bumsted K M, Barnstable C J**, Dorsal retinal pigment epithelium differentiates as neural retina in the Microphthalmia (*mi/mi*) mouse, 2000, *Inv Ophth V* **41(3)**:903-908

**Bunt J, de Haas T G, Hasselt N E, Zwijnenburg D A, Koster J, Versteeg R, Kool M**, Regulation of cell cycle genes and induction of senescence by overexpression of *OTX2* in medulloblastoma cell lines, 2010, *Mol Cancer Res* **8**:1344-1357

**Bunt J, Hasselt N E, Zwijnenburg D A, Hamdi M, Koster J, Versteeg R, Kool M**, *Otx2* directly activates cell cycle genes and inhibits differentiation in medulloblastoma cells, 2012, *Int J Cancer* **131(2)**:E21-32

**Burgess S, Reim G, Chen W, Hopkins N, Brand M**, The zebrafish spiel-ohne-grenzen (*spg*) gene encodes the POU domain protein *Pou2* related to mammalian *Oct4* and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis

**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, McInnes R R**, Ocular retardation mouse caused by *Chx10* homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation, 1996, *Nat Genet* **12(4)**:376-384

## C

**Cai Z, Feng G S, Zhang X**, Temporal requirement of the protein tyrosine phosphatase *Shp2* in establishing the neuronal fate in early retinal development, 2010, *J Neurosci* **30(11)**:4110-9

**Cañestro C, Bassham S, Postlethwait J**, Development of the central nervous system in the larvacean *Oikopleura dioica* and the evolution of the chordate brain, 2005, *Dev Biol* **285**:298 – 315

**Canto-Soler M V, Adler R**, Optic cup and lens development requires *Pax6* expression in the early optic vesicle during a narrow time window, 2006, *Dev Biol* **294(1)**:119-32

**Cantos R, Cole L K, Acampora D, Simeone A, Wu D K**, Patterning of the mammalian cochlea, 2002, *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11707-11713

- Cayouette M, Poggi L, Harris W A**, Lineage in the vertebrate retinae, 2006, *Trends Neurosci* **29(10)**:563-570
- Chatelain G, Fossat N, Brun G, Lamonerie T**, Molecular dissection reveals decreased activity and not dominant negative effect in human OTX2 mutants, 2006, *J Mol Med* **84(7)**: 604-615
- Chau K Y, Chen S, Zack D J, Ono S J**, Functional domains of the cone-rod homeobox (CRX) transcription factor, 2000, *J Biol Chem* **275**:37264-70.
- Chen S, Wang Q-L, Nie Z, Sun H, Lennon G, Copeland N G, Gilbert D J, Jenkins N A, Zack D J**, *Crx*, a novel *Otx*-like *Paired*-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes, 1997, *Neuron* **19**:1017–1030
- Chen S, Wang Q L, Xu S, Liu I, Li L Y, Wang Y, Zack D J**, Functional analysis of cone-rod homeobox (CRX) mutations associated with retinal dystrophy, 2002, *Hum Mol Genet* **11**:873-84.
- Chen J, Rattner A, Nathans J**, The rod photoreceptor-specific nuclear receptor *Nr2e3* represses transcription of multiple cone-specific genes, 2005, *J Neurosci* **25(1)**:118-129
- Chen Y, Mohammadi M, Flanagan J G**, Graded levels of FGF protein span the midbrain and can instruct graded induction and repression of neural mapping labels, 2009, *Neuron* **62(6)**:773-780
- Chenau G, Henkemeyer M**, Forward signaling by EphB1/EphB2 interacting with ephrin-B ligands at the optic chiasm is required to form the ipsilateral projection, 2011, *Eur J Neurosci* **34(10)**:1620-1633
- Cheng H, Khanna H, Oh E C T, Hicks D, Mitton K P, Swaroop A**, Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors, 2004, *Hum Mol Genet* **13(15)**:1563-1575
- Chi C L, Martinez S, Wurst W, Martin G R**, The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum, 2003, *Development* **130(12)**: 2633-2644
- 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, Langmann T**, CRX ChIP-seq reveals the cis-regulatory architecture of mouse photoreceptors, 2010, *Genome Res* **20(11)**: 1512-1525
- Coolen M, Sauka-Spengler T, Nicolle D, Le-Mentec C, Lallemand Y, Da Silva C, Plouhinec J-L, Robert B, Wincker P, Shi D-L, Mazan S**, Evolution of axis specification mechanisms in jawed Vertebrates: insights from a chondrichthyan, 2007, *PLoS ONE* **2(4)**: e374.
- Courtois V, Chatelain G, Han Z-Y, Le Novère N, Brun G, Lamonerie T**, New *Otx2* mRNA isoforms expressed in the mouse brain, 2003, *J Neurochem* **84**:840-853
- Crossley P H, Martinez S, Martin G R**, Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo, 1996, *Nature* **380**:66-68

# D

**Danielian P S, McMahon A P**, *Engrailed-1* as a target of the *Wnt-1* signalling pathway in vertebrate midbrain development, 1996, *Nature* **383(6598)**:332-334

**Danno H, Michiue T, Hitachi K, Yukita A, Ishiura S, Asashima M**, Molecular links among the causative genes for ocular malformation: *Otx2* and *Sox2* coregulate *Rax* expression, 2008, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105(14)**:5408-5413

**Davidson E H, Rast J P, Oliveri P, Ransick A, Calestani C, Yuh C-H, Minokawa T, Amora G, Hinman V, Arenas-Mena C, Otim O, Brown C T, Livi C B, Lee P Y, Revilla R, Schilstra M J, Clarke P J C, Rust A G, Pan Z, Arnone M I, Rowen L, Cameron A R, McClay D R, Hood L, Bolouri H**, A Provisional Regulatory Gene Network for Specification of Endomesoderm in the Sea Urchin Embryo, 2002, *Dev Biol* **246**:162-190

**Davy A, Soriano P**, Ephrin-B2 forward signaling regulates somite patterning and neural crest cell development, 2007, *Dev Biol* **304(1)**:182-193

**Dateki S, Fukami M, Sato N, Muroya K, Adachi M, Ogata T**, OTX2 mutation in a patient with anophthalmia, short stature, and partial Growth Hormone deficiency: functional studies using the IRBP, HESX1, and POU1F1 promoters, 2008, *J Clin Endocr Metab* **93(10)**

**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, Ogata T**, Heterozygous orthodonticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype, 2010, *J Clin Endocr Metab* **95(2)**

**Del Bianco D G, Romero C J, Diaczok D, de Graaf L C G, Radovick S, Hokken-Koelega Anita C S**, A novel *OTX2* mutation in a patient with combined pituitary hormone deficiency, pituitary malformation, and an underdeveloped left optic nerve, 2012, *Eur J Endocrinol* **167**:441-452

**den Hollander A I, Koenekoop R K, Mohamed M D, Arts H H, Boldt K, Towns K V, Sedmak T, Beer M, Nagel-Wolfrum K, McKibbin M, Dharmaraj S, Lopez I, Ivings L, Williams G A, Springell K, Woods C G, Jafri H, Rashid Y, Strom T M, van der Zwaag B, Gosens I, Kersten F F J, van Wijk E, Veltman J A, Zonneveld M N, van Beersum S E C, Maumenee I H, Wolfrum U, Cheetham M E, Ueffing M, Cremers F P M, Inglehearn C F, Roepman R**, Mutations in *LCA5*, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis, 2007, *Nat Genet* **39(7)**:889-895

**Di Giovannantonio L G, Di Salvio M, Omodei D, Prakash N, Wurst W, Pierani A, Acampora D, Simeone A**, *Otx2* cell-autonomously determines dorsal mesencephalon versus cerebellum fate independently of isthmus organizing activity, 2013, *Development* **141(2)**:377-388

**Di Salvio M, Di Giovannantonio L G, Acampora D, Prospero R, Omodei D, Prakash N, Wurst W, Simeone A**, *Otx2* controls neuron subtype identity in ventral tegmental area and antagonizes vulnerability to MPTP, 2010, *Nat Neurosci* **13(12)**:1481-1488

**Diaczok D, Romero C, Zunich J, Marshall I, Radovick S**, A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency, 2008, *J Clin Endocr Metab* **93(11)**'é

**Diaczok D, DiVall S, Matsuo I, Wondisford F E, Wolfe A M, Radovick S**, Deletion of *Otx2* in GnRH neurons results in a mouse model of hypogonadotropic hypogonadism, 2011, *Mol Endocrinol* **25(5)**:833–846

**Ding J, Yang L, Yan Y T, Chen A, Desai N, Wynshaw-Boris A, Shen M M**, *Cripto* is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo, 1998, *Nature* **395**, 702-7.

**Dziegielewska K M, Ek J, Habgood M D, Saunders N R**, Development of the choroid plexus, 2001, *Microsc Res Techniq* **52(1)**:5-20E

## E

**Emerson M M, Surzenko N, Goetz J J, Trimarch J, Cpeko C L**, *Otx2* and *Onecut1* promote the fates of cone photoreceptors and horizontal cells and repress rod photoreceptors, 2013, *Dev Cell* **26(1)**:doi:10.1016

**Engelkamp D, Rashbass P, Seawright A, van Heynigen V**, Role of Pax6 in development of the cerebellar system, 1999, *Development* **126**:3585-3596

**Esumi N, Kachi S, Hackler Jr L, Masuda T, Yang Z, Campochiaro P A, Zack D J**, BEST1 expression in the retinal pigment epithelium is modulated by OTX family members, 2009, *Hum Mol Genet* **18(1)**:128-141

## F

**Farhy C, Elgart M, Shapira Z, Oron-Karni V, Yaron O, Menuchin Y, Rechavi G, Ashery-Padan R**, Pax6 is required for normal cell-cycle exit and the differentiation kinetics of retinal progenitor cells, 2013, *PLoS ONE* **8(9)**:e76489

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

**Finkelstein R, Smouse D, Capaci T M, Spradling A C, Perrimon N**, The *orthodenticle* gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the *Drosophila* nervous system and ocellar visual structures, 1990, *Gene Dev* **4**:1516-1527

**Folco E, Lee C-S, Dufu K, Yamasaki T, Reed R**, The Proteins PDIP3 and ZC11A Associate with the Human TREX Complex in an ATP-Dependent Manner and Function in mRNA Export, 2012, *PLoS ONE* **7(8)**: e43804

**Force A, Lynch M, Pickett B, Amores A, Yan Y, Postlethwait J**, Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations, 1999, *Genetics* **151(4)**: 1531-1545

**Fossat N, Courtois V, Chatelain G, Brun G, Lamonerie T**, Alternative usage of *Otx2* promoters during mouse development, 2005, *Dev Dyn* **233**:154-160

**Fossat N, Chatelain G, Brun G, Lamonerie T**, Temporal and spatial delineation of mouse *Otx2* functions by conditional self-knockout, 2006, *EMBO Rep* **7(8)**:824-830

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

**Foucher I, Mione M, Simeone A, Acampora D, Bally-Cuif L, Houart C**, Differentiation of cerebellar cell identities in absence of *Fgf* signalling in zebrafish *Otx* morphants, 2006, *Development* **133**:1891-1900

**Frantz G D, Weimann J M, Levin M E, McConnell S K**, *Otx1* and *Otx2* define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum, 1994, *J Neurosci* **14**:5725-5740

**Freund C L, Gregory-Evans C Y, Furukawa T, Papaioannou M, Looser J, Ploder L, Bellingham J, Ng D, Herbick J-A S, Duncan A, Cherer S W, Tsui L-C, Loutradis-Anagnostou A, Jacobson S G, Cepko C L, Bhattacharya S S, McInnes R R**, Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (*CRX*) essential for maintenance of the photoreceptor, 1997, *Cell* **91(4)**:543-553

**Fuhrmann S, Levine E M, Reh T A**, Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick, 2000, *Development*, **127(21)**:4599-4609

**Furukawa T, Morrow E M, Cepko C L**, *Crx*, a novel *otx*-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation, 1997, *Cell* **91**:531-41.

**Furukawa T, Morrow E M, Li T, Davis F C, Cepko C L**, Retinopathy and attenuated circadian entrainment in *Crx*-deficient mice, 1999, *Nat Genet* **23(4)**:466-470

**Furukawa A, Koike C, Lippincott P, Cepko C L, Furukawa T**, The Mouse *Crx* 5'-Upstream Transgene Sequence Directs Cell-Specific and Developmentally Regulated Expression in Retinal Photoreceptor Cells, 2002, *J Neurosci* **22(5)**:1640-1647

## G

**Germot A, Lecointre G, Plouhinec J-L, Le Mentec C, Girardot F, Mazan S**, Structural evolution of *Otx* genes in Craniates, 2001, *Mol Biol Evol* **18(9)**:1668-1678.

**Gherzi R, Briata P, Boncinelli E, Ponassi M, Querze G, Viti F, Corte G, Zardi L**, The human homeodomain protein OTX2 binds to the human tenascin-C promoter and transrepresses its activity in transfected cells, 1997, *DNA Cell Biol* **16**:559-567

**Glavic A, Gomez-Skarmeta J L, Mayor R**, The homeoprotein *Xiro1* is required for midbrain-hindbrain boundary formation, 2002, *Development* **129(7)**:1609-1621



**Grandel H, Lun K, Rauch G-J, Rhinn M, Piotrowski T, Houart C, Sordino P, Kuchler A M, Schulte-Merker S, Geisler R, Holder N, Wilson S W, Brand M,** Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud, 2002, *Development* **129**:2851-2865

## H

**Haider N B, Mollema N, Gaule M, Yuan Y, Sachs A J, Nystuen A M, Naggert J K, Nishina P M,** *Nr2e3*-directed transcriptional regulation of genes involved in photoreceptor development and cell-type specific phototransduction, 2009, *Exp Eye Res* **89**:365–372

**Haider N B, DeMarco P, Nystuen A M, Huang X, Smith R S, McCall M A, Naggert J K, Nishina P M,** The transcription factor *Nr2e3* functions in retinal progenitors to suppress cone cell generation, 2006, *Visual Neurosci* **23(6)**:917-929

**Halilagic A, Zile M H, Studer M,** A novel role for retinoids in patterning the avian forebrain during presomite stages, 2003, *Development* **130**:2039-2050

**Halilagic A, Ribes V, Ghyselinck N B, Zile M H, Dollé P, Studer M,** Retinoids control anterior and dorsal properties in the developing forebrain, 2007, *Dev Biol* **303(1)**:362-375

**Hanover J L, Huang Z J, Tonegawa S, Stryker M P,** Brain-derived neurotrophic factor overexpression induces precocious critical period in mouse visual cortex, 1999, *J Neurosci* **19**:RC40

**Hao H, Kim D S, Klocke B, Johnson K R, Cui K, Gotoh N, Zang C, Gregorski J, Gieser L, Peng W, Fann Y, Seifert M, Zhao K, Swaroop A,** Transcriptional regulation of rod photoreceptor homeostasis revealed by in vivo NRL targetome analysis, 2012, *PLoS Genetics* **8(4)**:e1002649

**Harada Y, Okai N, Taguchi S, Tagawa K, Humphreys T, Satoh N,** Developmental expression of the hemichordate *otx* ortholog, 2000, *Mech Dev* **91**:337-339

**Harden M V, Newton L A, Lloyd R C, Whitlock K E,** Olfactory imprinting is correlated with changes in gene expression in the olfactory epithelia of the zebrafish, 2006, *J Neurobiol* **66(13)**:1452-1466.

**Hatakeyama J, Tomita K, Inoue T, Kageyama R,** Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type, 2001, *Development* **128(8)**:1313-1322

**He S, Masland R,** Retinal direction selectivity after targeted laser ablation of starburst amacrine cells, 1997, *Nature* **389**:378-382

**Heimbucher T, Murko C, Bajoghli B, Aghaallaei N, Huber A, Stebegg R, Eberhard D, Fink M, Simeone A, Czerny T,** *Gbx2* and *Otx2* Interact with the WD40 Domain of Groucho/Tle Corepressors, 2007, *Mol Cell Biol* **27(1)**:340-351

**Henderson R H, Williamson K A, Kennedy J S, Webster A R, Holder G E, Robson A G, FitzPatrick D R, van Heyningen V, Moore A T,** A rare de novo nonsense mutation in *OTX2* causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction, 2009, *Mol Vis* **15**:2442–2447

- Hidalgo-Sanchez M, Simeone A, Alvarado-Mallart R-M**, *Fgf8* and *Gbx2* induction concomitant with *Otx2* repression is correlated with midbrain-hindbrain fate of caudal prosencephalon, 1999, *Development* **126(14)**:3191-3203
- Hidalgo-Sanchez M, Alvarado-Mallart R-M, Alvarez I S**, *Pax2*, *Otx2*, *Gbx2* and *Fgf8* expression in early otic vesicle development, 2000, *Mech Dev* **95**:225-229
- Hide T, Hatakeyama J, Kimura-Yoshida C, Tian E, Takeda N, Ushio Y, Shiroishi T, Aizawa S, Matsuo I**, Genetic modifiers of otocephalic phenotypes in *Otx2* heterozygous mutant mice, 2002, *Development* **129**:4347-4357
- Hinman V F, Nguyen A T, Davidson E H**, Expression and function of a starfish *Otx* ortholog, *AmOtx*: a conserved role for OTX proteins in endoderm development that predates divergence of the eleutherozoa, 2003a, *Mech Dev* **120**:1165–1176
- Hinman V F, Nguyen A T, Davidson E H**, Developmental gene regulatory network architecture across 500 million years of echinoderm evolution, 2003b, *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:13356-13361.
- Hirth F, Kammermeier L, Frei E, Walldorf U, Noll M, Reichert H**, An urbilaterian origin of the tripartite brain: developmental genetic insights from *Drosophila*, 2003, *Development* **130**:2365-2373
- Ho E, Irvine T, Vilk G J, Lajoie G, Ravichandran K S, D'Souza S J, Dagnino L**, Integrin-linked kinase interactions with ELMO2 modulate cell polarity, 2009, *Mol Biol Cell* **20(13)**: 3033-3043.
- Hodges M D, Vieira H, Gregory-Evans K, Gregory-Evans C Y**, Characterization of the genomic and transcriptional structure of the *CRX* Gene: substantial differences between human and mouse, 2002, *Genomics* **80(5)**:531-542
- Hodgkinson C A, Moore K J, Nakayama A, Steingrimsson E, Copeland N G, Jenkins N A, Arnheiter H**, Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein, 1993, *Cell*, **74(2)**: 395-404
- Holland L Z, Carvalho J E, Escrava H, Laudet V, Schubert M, Shimeld S M, Yu J-K**, Evolution of bilaterian central nervous systems: a single origin?, 2013, *EvoDevo* **4**:27
- Hoodless P A, Pye M, Chazaud C, Labbé E, Attisano L, Rossant J, Wrana J L**, *FoxH1* (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse, 2001, *Genes Dev* **15(10)**:1257-1271
- Horsford D J, Nguyen M T, Sellar G C, Kothary R, Arnheiter H, McInnes R R**, *Chx10* repression of *Mitf* is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity, 2005, *Development* **132(1)**:177-187
- Housset M, Samuel A, Ettaiche M, Bemelmans A, Béby F, Billon N, Lamonerie T**, Loss of *Otx2* in the adult retina disrupts retinal pigment epithelium function, causing photoreceptor degeneration, 2013, *J Neuro* **33(24)**:9890 –9904

**Huang Z J, Kirkwood A, Pizzorusso T, POrciatti V, Morales B, Bear M F, Maffei L, Tonegawa S**, BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex, 1999, *Cell* **98**:739-755

**Hyer J, Mima T, Mikawa T**, FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain, 1998, *Development* **125(5)**:869-977

## I

**Imai K S, Satoh N, Satou Y**, Region specific gene expressions in the central nervous system of the ascidian embryo, 2002, *Mech Dev* **119**:275–277

**Inoue F, Kurokawa D, Takahashi M, Aizawa S**, *Gbx2* directly restricts *Otx2* expression to forebrain and midbrain, competing with Class III POU factors, 2012, *Mol Cell Biol* doi: **10.1128**

**Irving C, Mason I**, Regeneration of isthmus tissue is the result of a specific and direct interaction between rhombomere 1 and midbrain, 1999, *Development* **126(18)**:3981-3989

**Itoh M, Kudoh T, Dedekian M, Kim C-H, Chitnis A B**, A role for *iro1* and *iro7* in the establishment of an anteroposterior compartment of the ectoderm adjacent to the midbrain-hindbrain boundary, 2002, *Development* **129(10)**:2317-2327

## J

**Jaszai J, Reifers F, Picker A, Langenberg T, Brand M**, Isthmus-to-midbrain transformation in the absence of midbrain-hindbrain organizer activity, 2003, *Development* **130(26)**:6611-6623

**Jeon C-J, Strettoi E, Masland R H**, The major cell populations of the mouse retina, 1998, *J Neurosci* **18(21)**:8936-8946

**Johansson P A, Irmeler M, Acampora D, Beckers J, Simeone A, Götz M**, The transcription factor *Otx2* regulates choroid plexus development and function, 2013, *Development* **140**:1055-1066

**Joliot A, Trembleau A, Raposo G, Calvet S, Volovitch M, Prochiantz A**, Association of Engrailed homeoproteins with vesicles presenting caveolae-like properties, 1997, *Development* **124(10)**:1865-1875

**Joliot A, Maizel A, Rosenberg D, Trembleau A, Dupas S, Volovitch M, Prochiantz A**, Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein, 1998, *Curr Biol* **8(15)**:856-863

**Joliot A, Prochiantz A**, Cell-Cell transport of homeoproteins: with or without channels?, 2005, *Eurekah Biosci* **1(7)**:558-560

**Joyner A L**, *Engrailed*, *Wnt* and *Pax* genes regulate midbrain-hindbrain development, 1996, *Trends Genet* **12**:15-20

**Jungbluth S, Larsen C, Wizenmann A, Lumsden A**, Cell mixing between the embryonic midbrain and hindbrain, 2001, *Curr Biol* **11(3)**:204-207

## K

**Kablar B, Vignali R, Menotti L, Pannese M, Andreazzoli M, Polo C, Giribaldi M G, Boncinelli E, Barsacchi G**, *Xotx* genes in the developing brain of *Xenopus laevis*, 1996, *Mech Dev* **55(2)**:145–158

**Katahira T, Sato T, Sugiyama S, Okafuji T, Araki I, Funahashi J-I, Nakamura H**, Interaction between *Otx2* and *Gbx2* defines the organizing center for the optic tectum, 2000, *Mech Dev* **91(1-2)**:43-52

**Katoh K, Omori Y, Onishi A, Sato S, Kondo M, Furukawa T**, *Blimp1* suppresses *Chx10* expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper photoreceptor development, 2010, *J Neurosci* **30(19)**:6515-6526

**Kelley C G, Lavgogna G, Clark M E, Boncinelli E, Mellon P L**, The *Otx2* homeoprotein regulates expression from the gonadotropin-releasing hormone proximal promoter, 2000, *Mol Endocrinol* **14**:1246-1256

**Kevany B M, Palczewski K**, Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors, 2010, *Physiology(Bethesda)* **25(1)**:8-15.

**Kim H H, Wolfe A, Cohen R N, Eames S C, Johnson A L, Wieland C N, Radovick S**, In vivo identification of a 107-base pair promoter element mediating neuron-specific expression of mouse gonadotropin-releasing hormone, 2007, *Mol Endocrinol* **21(2)**:457–471

**Kim D S, Matsuda T, Cepko C L**, A core paired-type and POU homeodomain-containing transcription factor program drives retinal bipolar cell gene expression, 2008, *J Neurosci* **28(31)**:7748-64

**Kim N, Acampora D, Dingli F, Loew D, Simeone A, Prochiantz A, Di Nardo A D**, Immunoprecipitation and mass spectrometry identify non-cell autonomous *Otx2* homeoprotein in the granular and supragranular layers of mouse visual cortex, 2014, *F1000Research* **3**:178

**Kimura C, Takeda N, Suzuki M, Oshimura M, Aizawa S, Matsuo I**, Cis-acting elements conserved between mouse and pufferfish *Otx2* genes govern the expression in mesencephalic neural crest cells, 1997, *Development* **124**:3929-3941

**Kimura C, Yoshinaga K, Tian E, Suzuki M, Aizawa S, Matsuo I**, Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals, 2000, *Dev Biol* **225**:304-321

**Kimura C, Shen M M, Takeda N, Aizawa S, Matsuo I**, Complementary functions of *Otx2* and *Cripto* in initial patterning of mouse epiblast, 2001, *Dev Biol* **235**:12-32.

- Kimura J, Suda Y, Kurokawa D, Hossain Z M, Nakamura M, Takahashi M, Hara A, Aizawa S**, *Emx2* and *Pax6* function in cooperation with *Otx2* and *Otx1* to develop caudal forebrain primordium that includes future archipallium, 2005, *J Neurosci* **25**:5097-5108
- Kimura K, Miki T, Shibasaki T, Zhang Y, Ogawa M, Saisho H, Okuno M, Iwanaga T, Seino S**, Functional analysis of transcriptional repressor *Otx3/Dmbx1*, 2005, *FEBS Letters* **579(13)**:2926-2932
- Kimura-Yoshida C, Kitajima K, Oda-Ishii I, Tian E, Suzuki M, Yamamoto M, Suzuki T, Kobayashi M, Aizawa S, Matsuo I**, Characterization of the pufferfish *Otx2* cis-regulators reveals evolutionarily conserved genetic mechanisms for vertebrate head specification, 2004, *Development* **131**:57-71
- Kimura-Yoshida C, Nakano H, Okamura D, Nakao K, Yonemura S, Belo J A, Aizawa S, Mastui Y, Mastuo I**, Canonical Wnt signaling and its antagonist regulate anterior-posterior axis polarization by guiding cell migration in mouse visceral endoderm, 2005, *Dev cell* **9**:639-650
- Kimura-Yoshida C, Tian E, Nakano H, Amazaki S, Shimokawa K, Rossant J, Aizawa S, Matsuo I**, Crucial roles of *Foxa2* in mouse anterior–posterior axis polarization via regulation of anterior visceral endoderm-specific genes, 2007, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104(14)**:5919-5924
- Kiyama T, Akasaka K, Takata K, Mitsunaga-Nakatsubo K, Sakamoto N, Shimada H**, Structure and function of a sea urchin *orthodenticle*-related Gene (*HpOtx*), 1998, *Dev Biol* **193**:139-145
- Kizilyaprak C, Spehner D, Devys D, Schultz P**, *In vivo* chromatin organization of mouse rod photoreceptors correlates with histone modifications, 2010, *PLoS ONE* **5(6)**:e11039
- Klimova L, Kozmik Z**, Stage-dependent requirement of neuroretinal Pax6 for lens and retina development, 2014, *Development* **141(6)**:1292-1302
- Knight R D, Schilling T F**, Cranial neural crest and development of the head skeleton, *Neural Crest Induction and Differentiation* Chapter 7:120-133, Springer, Boston MA
- Kobayashi A, Akasaka K, Kawaichi M, Kokubo T**, Functional interaction between TATA and upstream CACGTG elements regulates the temporally specific expression of *Otx* mRNAs during early embryogenesis of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, 2002, *Nucleic Acids Res* **30(14)**:3034-3044
- Koike C, Nishida A, Ueno S, Saito H, Sanuki R, Sato S, Furukawa A, Aizawa S, Matsuo, Suzuki N, Kondo M, Furukawa T**, Functional roles of *Otx2* transcription factor in postnatal mouse retinal development, 2007, *Mol Cell Biol* **27(23)**:8318-8329
- Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S**, Developmental patterning and evolution of the mammalian viscerocranium: genetic insights into comparative morphology, 1997, *Dev Dyn* **209**:139-155.
- Kuroda H, Hayata T, Eisaki A, Asashima M**, Cloning a novel developmental regulating gene, *Xotx5*: Its potential role in anterior formation in *Xenopus laevis*, 2000, *Dev Growth Differ* **42(2)**:87-93

**Kurokawa D, Takasaki N, Kiyonari H, Nakayama R, Kimura-Yoshida C, Matsuo I, Aizawa S**, Regulation of *Otx2* expression and its functions in mouse epiblast and anterior neuroectoderm, 2004a, *Development* **131**:3307-3317

**Kurokawa D, Kiyonari H, Nakayama R, Kimura-Yoshida C, Matsuo I, Aizawa S**, Regulation of *Otx2* expression and its functions in mouse forebrain and midbrain, 2004b, *Development* **131**:3319-3331

**Kurokawa D, Sakurai Y, Inoue A, Nakayama R, Takasaki N, Suda Y, Miyake T, Amemiya C T, Aizawa S**, Evolutionary constraint on *Otx2* neuroectoderm enhancers-deep conservation from skate to mouse and unique divergence in teleost, 2006, *Proc Natl Acad Sci U S A* **103(51)**:19350-19355

**Kurokawa D, Ohmura T, Ogino H, Takeuchi M, Inoue A, Inoue F, Suda Y, Aizawa S**, Evolutionary origin of the *Otx2* enhancer for its expression in visceral endoderm, 2010, *Dev Biol* **342**:110-120

**Kurokawa D, Ohmura T, Sakurai Y, Inoue K, Suda Y, Aizawa S**, *Otx2* expression in anterior neuroectoderm and forebrain/midbrain is directed by more than six enhancers, 2014, *Dev Biol* **387**:203-213

**Kurokawa D, Ohmura T, Akasaka K, Aizawa S**, A lineage specific enhancer drives *Otx2* expression in teleost organizer tissues, 2012, *Mech Dev* **128**:653-661

## L

**Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst A O, Landthaler M, Lin C, Socci N D, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Müller A U, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir D B, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter H-I, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler C E, Nagle J W, Ju J, Papavasiliou F N, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein M J, Bosio A, Borkhardt A, Russo J J, Sander C, Zavolan M, Tuschl T**, A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing, 2007, *Cell* **129(7)**:1401-1414

**Langenberg T, Brand M**, Lineage restriction maintains a stable organizer cell population at the zebrafish midbrain-hindbrain boundary, 2006, *Development* **132(14)**:3209-3216

**Lanjuin A, VanHoven M K, Bargmann C I, Thompson J K, Sengupta P** *Otx/otd* homeobox genes specify distinct sensory neuron identities in *C. elegans.*, 2003, *Dev Cell* **5**:621-33

**Larder R, Mellon P L**, *Otx2* induction of the Gonadotropin-releasing Hormone promoter is modulated by direct interactions with Grg co-repressors, 2009, *J Biol Chem* **284**:16966-16978

**Larder R, Kimura I, Meadows J, Clark D D, Mayo S, Mellon P L**, Gene dosage of *Otx2* is important for fertility in male mice, 2013, *Mol Cell Endocrinol* **377**:16-22

**Larhammar D, Nordström K, Larsson T A**, Evolution of vertebrate rod and cone phototransduction genes, 2009, *Phil Trans R Soc, B* **364**:2867-2880

**Lebel M, Agarwal P, Cheng C W, Kabir M G, Chan T Y, Thanabalasingham V, Zhang X, Cohen D R, Husain M, Cheng C H, Bruneau B G, Hui C-C**, the *Iroquois* homeobox Gene *Irx2* is not essential for normal development of the heart and midbrain-hindbrain boundary in mice, 2003, *Mol Cell Biol* **23(22)**: 8216–8225

**Lee S M K, Danielian P S, Fritsch B, McMahon A P**, Evidence that FGF8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain, 1997, *Development* **124(5)**:959-969

**Lerner L E, Peng G H, Gribanova Y E, Chen S, Farber D B**, *Sp4* is expressed in retinal neurons, activates transcription of photoreceptor-specific genes, and synergizes with *Crx*, 2005, *J Biol Chem* **280**:20642-50.

**Leuzinger S, Hirth F, Gerlich D, Acampora D, Simeone A, Gehring W J, Finkelstein R, Furukubo-Tokunaga K, Reichert H**, Equivalence of the fly *orthodenticle* gene and the human OTX genes in embryonic brain development of *Drosophila*, 1998b, *Development* **125**:1703-1710

**Lewis B P, Burge C B, Bartel D P**, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, 2005, *Cell* **120**:15-20.

**Li B, Kuriyama S, Moreno M, Mayor R**, The posteriorizing gene *Gbx2* is a direct target of *Wnt* signalling and the earliest factor in neural crest induction, 2009, *Development* **136(19)**:3267-3278

**Li J Y H, Joyner A L**, *Otx2* and *Gbx2* are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression, 2001, *Development* **128**:4979-4991

**Li X, Chuang C-K, Mao C-A, Angerer L M, Klein W H**, Two Otx proteins generated from multiple transcripts of a single gene in *Strongylocentrotus purpuratus*, 1997, *Dev Biol* **187**:253–266

**Li Y, Allende M L, Finkelstein R, Weinberg E S**, Expression of two zebrafish *orthodenticle*-related genes in the embryonic brain, 1994, *Mech Dev* **48**:229-244

**Li Y, Brown S J, Hausdorf B, Tautz D, Denell R E, Finkelstein R**, Two *orthodenticle*-related genes in the short-germ beetle *Tribolium castaneum*, 1996, *Dev Genes Evol* **206**:35–45

**Lin Z, Cantos R, Patente M, Wu D K**, *Gbx2* is required for the morphogenesis of the mouse inner ear: a downstream candidate of hindbrain signaling, 2005, *Development* **132**:2309-2318.

**Liu A, Losos K, Joyner A L**, FGF8 can activate *Gbx2* and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain fate, 1999, *Development* **126(21)**:4827-4838

**Liu A, Joyner A L**, EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region, 2001, *Development* **128**:181-191

**Liu A, Li J Y H, Bromleigh C, Lao Z, Niswander L A, Joyner A L**, FGF17b and FGF18 have different midbrain regulatory properties from FGF8b or activated FGF receptors, 2003, *Development* **130(25)**:6175-6185

**Liu Y, Shen Y-C, Rest J S, Raymond P A, Zack D J**, Isolation and characterization of a zebrafish homologue of the cone rod homeobox gene, 2001, *Invest Ophth Vis Sci* **42(2)**: 481-487

**Livesey F J, Furukawa T, Steffen M A, Church G M, Cepko C L**, Microarray analysis of the transcriptional network controlled by the photoreceptor homeobox gene *Crx*, 2000, *Curr Biol* **10(6)**:301-310

**Livesey R, Cepko C**, Neurobiology. Developing order, 2001, *Nature* **413(6855)**:471-473

**Lopashov G V, Stroeveva O G**, Development of the eye : experimental studies, 1964, *Israel program for scientific translations, Jerusalem*

**Lun K, Brand M**, A series of *no isthmus (noi)* alleles of the zebrafish *pax2.1* gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary, 1998, *Development* **125(16)**:3049-3062

## M

**Ma X M, Yoon S-O, Richardson C J, Jülich K, Blenis J**, SKAR Links Pre-mRNA Splicing to mTOR/S6K1-Mediated Enhanced Translation Efficiency of Spliced mRNAs, 2008, *Cell* **133(2)**:303-313

**MacNeil M A, Masland R H**, Extreme diversity among amacrine cells: implications for function, 1998, *Neuron* **20(5)**:971-982

**MacNeil M A, Heussy J K, Dacheux R F, Raviola E, Masland R H**, The shapes and numbers of amacrine cells: matching of photofilled with Golgi-stained cells in the rabbit retina and comparison with other mammalian species, 1999, *J Comp Neurol* **413**:305-326

**Makiyama Y, Shoji S, Mizusawa H**, Hydrocephalus in the *Otx2*<sup>+/-</sup> mutant mouse, 1997, *Exp Neurol* **148**:215-21

**Mallamaci A, Di Blas E, Briata P, Boncinelli E, Corte G**, OTX2 homeoprotein in the developing central nervous system and migratory cells of the olfactory area, 1996, *Mech Dev* **28(1-2)**:165-178

**Mao C A, Wikramanayake A H, Gan L, Chuang C K, Summers R G, Klein W H**, Altering cell fates in sea urchin embryos by overexpressing SpOtx, an orthodenticle-related protein, 1996, *Development* **122**:1489-1498

**Marin F, Puelles L**, Patterning of the embryonic avian midbrain after experimental inversions: a polarizing activity from the isthmus, 1994, *Dev Biol* **163**:19-37

**Martinez S, Wassef M, Alvarado-Mallart R M**, Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*, 1991, *Neuron* **6**:971-981



- Martinez S, Crossley P H, Cobos I, Rubenstein J L R, Martin G R**, FGF8 induces formation of an ectopic isthmus organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression, 1999, *Development* **126**:1189-1200
- Martinez-Barbera J P, Signore M, Pilo Boyl P, Puelles E, Acampora D, Gogoi R, Schubert F, Lumsden A, Simeone A**, Regionalisation of anterior neuroectoderm and its competence in responding to forebrain and midbrain inducing activities depend on mutual antagonism between *OTX2* and *GBX2*, 2001, *Development* **128**:4789-4800
- Martinez-Morales J R, Dolez V, Rodrigo I, Zaccarini R, Leconte L, Bovolenta P, Saule S**, *OTX2* activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation, 2003, *J Biol Chem* **278(24)**:21721-21731
- Martinez-Morales J R, Del Bene F, Nica G, Hammerschmidt M, Bovolenta P, Wittbrodt, J**, Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center, 2005, *Dev Cell* **8(4)**:565-74
- Masland R H**, Neuronal diversity in the retina, 2001, *Curr Opin Neurobiol* **11(4)**:431-436
- Masland R H**, The fundamental plan of the retina, 2001, *Nat Neurosci* **4(9)**:877-886
- Masuda T, Esumi N**, *SOX9*, through interaction with microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*) and *OTX2*, regulates *BEST1* expression in the retinal pigment epithelium, 2010, *J Biol Chem* **285(35)**:26933-26944
- Mataftsi A, Schorderet D F, Chachoua L, Boussalah M, Nouri M T, Barthelmes D, Borruat F X, Munier F L**, Novel *TULP1* mutation causing leber congenital amaurosis or early onset retinal degeneration, 2007, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48(11)**:5160-5167
- Matsuo I, Kuratani S, Kimura C, Takeda N, Aizawa S**, Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head, 1995, *Genes Dev* **9**:2646-2658.
- Mazan S, Jaillard D, Baratte B, Janvier P**, *Otx1* gene-controlled morphogenesis of the horizontal semicircular canal and the origin of the gnathostome characteristics, 2000, *Evol Dev* **2**:186-193
- Mears A J, Kondo M, Swain P K, Takada Y, Bush R A, Saunders T L, Sieving P A, Swaroop A**, *Nrl* is required for rod photoreceptor development, 2001, *Nat Genet* **29(4)**:447-452
- Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson D G**, Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication, 1999, *Nature* **400**:77-81
- Mercier P, Simeone A, Cotelli F, Boncinelli E**, Expression pattern of two *otx* genes suggests a role in specifying anterior body structures in zebrafish, 1995, *Int J Dev Biol* **39(4)**:559-573
- Michiels E M, Oussoren E, Van Groenigen M, Pauws E, Bossuyt P M, Voûte P A, Baas F**, Genes differentially expressed in medulloblastoma and fetal brain, 1999, *Physiol Genomics* **1(2)**:83-91
- Millet S, Bloch-Gallego E, Simeone A, Alvarado-Mallart R-M**, The caudal limit of *Otx2* gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using in situ hybridisation and chick/quail homotopic grafts, 1996, *Development* **122**:3785-3797

**Millet S, Campbell K, Epstein D J, Losos K, Harris E, Joyner A L**, A role for *Gbx2* in repression of *Otx2* and positioning of the mid/hindbrain organizer, 1999, *Nature* **401**:161-164

**Mitsunaga-Nakatsubo K, Akasaka K, Sakamoto N, Takata K, Matsumara Y, Kitajima T, Kusunoki S, Shimada H**, Differential expression of sea urchin *Otx* isoform (*HpOtx<sub>E</sub>* and *HpOtx<sub>L</sub>*) mRNAs during early development, 1998, *Int J Dev Biol* **42**:645-651

**Mitton K P, Swain P K, Chen S, Xu S, Zack D J, Swaroop A**, The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation, 2000, *J Biol Chem* **275**:29794-9.

**Montana C L, Lawrence K A, Williams N L, Tran N M, Peng G H, Chen S, Corbo J C**, Transcriptional regulation of neural retina leucine zipper (Nrl), a photoreceptor cell fate determinant, 2011, *J Biol Chem* **286**(42):36921-31

**Moroz L B, Kocot K M, Citarella M R, Dosung S, Norekian T P, Povolotskaya I S, Grigorenko A P, Dailey C, Berezikov E, Buckley K M, Ptitsyn A, Reshetov D, Mukherjee K, Moroz T P, Bobkova Y, Yu F, Kapitonov V V, Jurka J, Bobkov Y V, Swore J J, Girardo D O, Fodor A, Gusev F, Sanford R, Bruders R, Kittler E, Mills C E, Rast J P, Derelle R, Solovyev V V, Kondrashov F A, Swalla B J, Sweedler J V, Rogaev E I, Halanych K E, Kohn A B**, The ctenophore genome and the evolutionary origins of neural systems, 2013, *Nature* **510**:109–114

**Morgan R, Hooiveld M H W, Pannese M, Dati G, Broders F, Delarue M, Thiery J-P, Boncinelli E, Durston A J**, Calponin modulates the exclusion of *Otx*-expressing cells from convergence extension movements, 1999, *Nat Cell Biol* **1**(7):404-408

**Morsli H, Tuorto F, Choo D, Postiglione M P, Simeone A, Wu D K**, *Otx1* and *Otx2* activities are required for the normal development of the mouse inner ear, 1999, *Development* **126**:2335-2343

**Mortensen A H, Schade V, Lamonerie T, Camper S A**, Deletion of OTX2 in neural ectoderm delays anterior pituitary development, 2014, *Hum Mol Genet*:doi:10.1093/hmg/ddu506

**Müller P, Yanze N, Schmid V, Spring J**, The homeobox gene *Otx* of the jellyfish *Podocoryne carnea*: role of a head gene in striated muscle and evolution, 1999, *Dev Biol* **216**: 582–594

## N

**Nagao T, Leuzinger S, Acampora D, Simeone A, Finkelstein R, Reichert H, Furukubo-Tokunaga K**, Developmental rescue of *Drosophila* cephalic defects by the human *Otx* genes, 1998, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3737-3742.

**Nakano T, Murata T, Matsuo I, Aizawa S**, OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3beta, 2000, *Biochem Biophys Res Commun* **267**:64-70.

**Nakayama A, Nguyen M-T T, Chen C C, Opdecamp K, Hodgkinson C A, Arnheiter H**, Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF,

affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently, 1998, *Mech Dev* **70(1-2)**:155-166

**Nawy S, Jahr C E**, Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells, 1990, *Nature* **346(6281)**:269-271

**Nédélec S, Foucher I, Brunet I, Bouillot C, Prochiantz A, Trembleau A**, *Emx2* homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (*eIF4E*) in the axons of olfactory sensory neurons, 2004, *Proc Natl Acad Sci USA* **101(29)**:10815-10820

**Nederbragt A J, te Welscher P, van den Driesche S, van Loon A E, Dictus W J A G**, Novel and conserved roles for *orthodenticle/otx* and *orthopedia/otp* orthologs in the gastropod mollusc *Patella vulgata*, 2002, *Dev Genes Evol* **212**:330–337

**Neumann C J, Nüsslein-Volhard C**, Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity, 2000, *Science* **289**:2137–2139

**Nguyen M-T T, Arnheiter H**, Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF, 2000, *Development* **127(16)**:3581-3591

**Nguyen Ba-Charvet K T, von Boxberg Y, Guazzi S, Boncinelli E, Godement P**, A potential role for the OTX2 homeoprotein in creating early 'highways' for axon extension in the rostral brain, 1998, *Development* **125**:4273-4282.

**Nguyen Ba-Charvet K T, von Boxberg Y, Godement P**, The mouse homeodomain protein OTX2 regulates NCAM promoter activity, 1999, *Brain Res Mol Brain Res* **67**:292-295

**Niederreither K, Vermot J, Schuhbauer B, Chambon P, Dollé P**, Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo, 2000, *Development* **127**:75-85

**Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, Furukawa T**, *Otx2* homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development, 2003, *Nat Neurosci* **6(12)**:1255-1263.

**Northcott P A, et al.**, Subgroup-specific structural variation across 1000 medulloblastoma genomes, 2012, *Nature* **488**:49-56

## O

**Oda-Ishii I, Saiga H**, Genomic organization and promoter and transcription regulatory regions for the expression in the anterior brain (sensory vesicle) of *Hroth*, the *otx* homologue of the ascidian, *Halocynthia roretzi*, 2003, *Dev Dyn* **227(1)**:104-113

**Oda-Ishii I, Bertrand V, Matsuo I, Lemaire P, Saiga H**, Making very similar embryos with divergent genomes: conservation of regulatory mechanisms of *Otx* between the ascidians *Halocynthia roretzi* and *Ciona intestinalis*, 2005, *Development* **132**:1663-1674

**Oh E C T, Khan N, Novelli E, Khanna H, Strettoi E, Swaroop A**, Transformation of cone precursors to functional rod photoreceptors by bZIP transcription factor NRL, 2007, *Proc Natl Acad Sci USA* **104(5)**:1679-1684

**Oh E C T, Cheng H, Hao H, Jia L, Khan N W, Swaroop N**, Rod differentiation factor NRL activates the expression of nuclear receptor NR2E3 to suppress the development of cone photoreceptors, 2008, *Brain Res* **1236**:16-29

**Ohsawa R, Kageyama R**, Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors, 2008, *Brain Res* **1192**:90-98

**Ohtoshi A, Nishijima I, Justice M J, Behringer R R**, *Dmbx1*, a novel evolutionarily conserved *paired*-like homeobox gene expressed in the brain of mouse embryos, 2002, *Mech Dev* **110**:241–244

**Okafuji T, Funahashi J-I, Nakamura H**, Roles of *Pax-2* in initiation of the chick tectal development, 1999, *Dev Brain Res* **116(1)**:41-49

**Okano T, Kojima D, Fukada Y, Shichida Y, Yoshizawa T**, Primary structures of chicken cone visual pigments: vertebrate rhodopsins have evolved out of cone visual pigments, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* **89(13)**:5932-5936

**Omodei D, Acampora D, Mancuso P, Prakash N, Di Giovannantonio L G, Wurst W, Simeone A**, Anterior-posterior graded response to *Otx2* controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon, 2008, *Development* **135**:3459-3470

**Oonuma K, Hirose D, Takatori N, Saiga H**, Continuous expression of *Otx* in the anterior neural lineage is supported by different transcriptional regulatory mechanisms during the development of *Halocynthia roretzi*, 2014, *Develop Growth Differ* **56(2)**:189-198

## P

**Panhuisen M, Vogt Weisenhorn D M, Blanquet V, Brodski C, Heinzmann U, Beisker W, Wurst W**, Effects of *Wnt1* signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region, 2004, *Mol Cell Neurosci* **26(1)**:101-111

**Pannese M, Polo C, Andreazzoli M, Vignali R, Kablar B, Barsacchi G, Boncinelli E**, The *Xenopus* homologue of *Otx2* is a maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions, 1995, *Development* **121**:707-720

**Peng G H, Ahmad O, Ahmad F, Liu J, Chen S**, The photoreceptor-specific nuclear receptor *Nr2e3* interacts with *Crx* and exerts opposing effects on the transcription of rod versus cone genes, 2005, *Hum Mol Genet* **14**:747-64.

**Perea-Gomez A, Shawlot W, Sasaki H, Behringer R R, Ang S**, *HNF3 $\beta$*  and *Lim1* interact in the visceral endoderm to regulate primitive streak formation and anterior-posterior polarity in the mouse embryo, 1999, *Development* **126**:4499-4511.

**Perea-Gomez A, Lawson K A, Rhinn M, Zakin L, Brûlet P, Mazan S, Ang S-L**, *Otx2* is required for visceral endoderm movement and for the restriction of posterior signals in the epiblast of the mouse embryo, 2001, *Development* **128**:753-765

**Perusek L, Maeda T**, Vitamin A derivatives as treatment options for retinal degenerative diseases, 2013, *Nutrients* **5(7)**:2646-66.

**Pittack C, Grunwald G B, Reh T A**, Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos, 1997, *Development* **124(4)**:805-816.

**Plouhinec J L, Sauka-Spengler T, Germot A, Le Mentec C, Cabana T, Harrison G, Pieau C, Sire J-Y, Véron G, Mazan S**, The mammalian *Crx* genes are highly divergent representatives of the *Otx5* gene family, a gnathostome orthology class of orthodenticle-related homeogenes involved in the differentiation of retinal photoreceptors and circadian entrainment, 2003, *Mol Biol Evol* **20(4)**:513-521

**Plouhinec J L, Leconte L, Sauka-Spengler S, Bovolenta P, Mazan S, Saule S**, Comparative analysis of gnathostome *Otx* gene expression patterns in the developing eye: implications for the functional evolution of the multigene family, 2005, *Dev Biol* **278(2)**: 560-575

**Poliakov A, Cotrina M, Wilkinson D G**, Diverse Roles of Eph Receptors and Ephrins in the Regulation of Cell Migration and Tissue Assembly, 2004, *Dev Cell* **7**:465–480

**Prakash N, Puelles E, Freude K, Trümbach D, Omodei D, Di Salvio M, Sussel L, Ericson J, Sander M, Simeone A, Wurst W**, *Nkx6-1* controls the identity and fate of red nucleus and oculomotor neurons in the mouse midbrain, 2009, *Development* **136(15)**: 2545-2555

**Puelles E, Acampora D, Lacroix E, Signore M, Annino A, Tuorto F, Filosa S, Corte G, Wurst W, Ang S-L, Simeone A**, *Otx* dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain, 2003, *Nat Neurosci* **6(5)**:453-460

**Puelles E, Annino A, Tuorto F, Usiello A, Acampora D, Czerny T, Brodski C, Ang S-L, Wurst W, Simeone A**, *Otx2* regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain, 2004, *Development* **131(9)**:2037-2048

**Purves D, Augustine G J, Fitzpatrick D, Hall W C, LaMantia A-S, McNamara J O**, *Neurosciences*, 3ème édition, 2005, De Boeck

## R

**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, Hanson I M**, Heterozygous mutations of *OTX2* cause severe ocular malformations, 2005, *Am J Hum Genet* **76(6)**:1008-1022

**Ranade S S, Yang-Zhou D, Kong S W, McDonald E C, Cook T A, Pignoni F**, Analysis of the *Otd*-dependent transcriptome supports the evolutionary conservation of CRX/OTX/OTD functions in flies and vertebrates, 2008, *Dev Biol* **315(2)**:521-534

**Rath M F, Muñoz E, Ganguly S, Morin F, Shi Q, Klein D C, Moller M**, Expression of the *Otx2* homeobox gene in the developing mammalian brain: embryonic and adult expression in the pineal gland, 2006, *J Neurochem* **97(2)**:556-566

**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, Hayashizaki Y,** An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man, 2010, *Cell* **140(5): 744-752**

**Rehemtulla A, Warwar R, Kumar R, Ji X, Zack D J, Swaroop A,** The basic motif-leucine zipper transcription factor *Nrl* can positively regulate rhodopsin gene expression, 1996, *Proc Natl Acad Sci USA* **93(1):191-195**

**Reifers F, Böhli H, Walsh E C, Crossley P H, Stainier D Y R, Brand M,** *Fgf8* is mutated in zebrafish *acerebellar (ace)* mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis, 1998, *Development* **125:2381-2395**

**Reim G, Brand M,** *Spiel-ohne-grenzen/pou2* mediates regional competence to respond to *Fgf8* during zebrafish early neural development, 2002, *Development* **129(4):917-933**

**Rhinn M, Dierich A, Shawlot W, Behringer R R, Le Meur M, Ang S-L,** Sequential roles for *Otx2* in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification, 1998, *Development* **125:845-856**

**Rhinn M, Dierich A, Le Meur M, Ang S-L,** Cell autonomous and non-cell autonomous functions of *Otx2* in patterning the rostral brain, 1999, *Development* **126:4295-4304**

**Rhinn M, Lun K, Luz M, Werner M, Brand M,** Positioning of the midbrain-hindbrain boundary organizer through global posteriorization of the neuroectoderm mediated by *Wnt8* signaling, 2005, *Development* **132(6):1261-1272**

**Rhinn M, Lun K, Ahrendt R, Geffarth M, Brand M,** Zebrafish *gbx1* refines the Midbrain-Hindbrain Boundary border and mediates the *Wnt8* posteriorization signal, 2009, *Neural Dev* **4:12**

**Rhinn M, Schuhbaur B, Niederreither K, Dollé P,** Involvement of retinol dehydrogenase 10 in embryonic patterning and rescue of its loss of function by maternal retinaldehyde treatment, 2011, *Proc Natl Acad Sci USA* **108(40):16687-16692**

**Rovsing L, Rath M F, Lund-Andersen C, Klein D C, Moller M,** A neuroanatomical and physiological study of the non-image forming visual system of the cone-rod homeobox gene (*Crx*) knock out mouse, 2010, *Brain Res* **1343:54-65**

**Rovsing L, Clokie S, Bustos D M, Rohde K, Coon S L, Litman T, Rath M F, Moller M, Klein D C,** *Crx* broadly modulates the pineal transcriptome, 2011, *J Neurochem* **119(2): 262-274**

**Rowitch D H, McMahon A P,** *Pax-2* expression in the murine neural plate precedes and encompasses the expression domains of *Wnt-1* and *En-1*, 1995, *Mech Dev* **52(1):3-8**

# S

**Sanchez-Calderon H, Martin-Partido G, Hidalgo-Sanchez M**, Differential expression of *Otx2*, *Gbx2*, *Pax2*, and *Fgf8* in the developing vestibular and auditory sensory organs, 2002, *Brain Res Bull* **57(3-4)**:321-323

**Sandell L L, Sanderson B W, Moiseyev G, Johnson T, Mushegian A, Young K, Rey J-P, Ma J-X, Staehling-Hampton K, Trainor P A**, *RDH10* is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development, 2007, *Genes & Dev* **21(9)**:1113-1124

**Saito H, Yasumoto K, Takeda K, Takahashi K, Fukuzaki A, Orikasa S, Shibahara S**, Melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform activates its own gene promoter through physical interaction with lymphoid-enhancing factor I, 2002, *J Biol Chem* **277(32)**:28787-28794

**Sakurai Y, Kurokawa D, Kiyonari H, Kajikawa E, Suda Y, Aizawa S**, *Otx2* and *Otx1* protect diencephalon and mesencephalon from caudalization into metencephalon during early brain regionalization, 2010, *Dev Biol*

**Sanchez-Calderon H, Martin-Partido G, Hidalgo-Sanchez M**, Differential expression of *Otx2*, *Gbx2*, *Pax2*, and *Fgf8* in the developing vestibular and auditory sensory organs, 2002, *Brain Res Bull* **57(3-4)**:321-323

**Sanchez-Calderon H, Martin-Partido G, Hidalgo-Sanchez M**, *Otx2*, *Gbx2*, and *Fgf8* expression patterns in the chick developing inner ear and their possible roles in otic specification and early innervation, 2004, *Gene Expr Patterns* **4**:659-669.

**Sato T, Joyner A L**, The duration of *Fgf8* isthmic organizer expression is key to patterning different tectal-isthmo-cerebellum structures, 2009, *Development* **136(21)**:3617-3626

**Satterlee J S, Sasakura H, Kuhara A, Berkeley M, Mori I and Sengupta P**, Specification of thermosensory neuron fate in *C. elegans* requires *ttx-1*, a homolog of *otd/Otx*, 2001, *Neuron* **31**:943-56.

**Sauka-Spengler T, Baratte B, Shi D L, Mazan S**, Structure and expression of an *Otx5*-related gene in the dogfish *Scyliorhinus canicula*: evidence for a conserved role of *Otx5* and *Crx* genes in the specification of photoreceptors, 2001, *Dev Genes Evol* **211**:533-544

**Sauka-Spengler T, Germot A, Shi D L, Mazan S**, 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, 2002, *Dev Genes Evol* **212**:380–387

**Schilter K F, Schneider A, Barkadjian T, Soucy J-F, Tyler R C, Reis L M, Semina E V**, *OTX2* microphthalmia syndrome: four novel mutations and delineation of a phenotype, 2011, *Clin Genet* **79(2)**:158-168.

**Schwarz M, Alvarez-Bolado G, Dressler G, Urbanek P, Busslinger M, Gruss P**, *Pax2/5* and *Pax6* subdivide the early neural tube into three domains, 1999, *Mech Dev* **82(1-2)**: 29-39

- Sexton T, Kurukuti S, Mitchell J A, Umlauf D, Nagano T, Fraser P**, Sensitive detection of chromatin coassociations using enhanced chromosome conformation capture on chip, 2012, *Nat Protoc* **7(7)**:1335-1350
- Shiells R A, Falk G**, Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein, 1990, *Proc Biol Sci* **242(1304)**:91-94
- Sikes J M, Bely A E**, Making heads from tails: Development of a reversed anterior–posterior axis during budding in an acoel, 2010, *Dev Biol* **338**:86–97
- Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E**, Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain, 1992, *Nature* **358**:687-690
- Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, Rosaria d’Apice M, Nigro V, Boncinelli E**, A vertebrate gene related to *orthodenticle* contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo, 1993, *EMBO J* **12(7)**:2735:2747
- Smith K M, Gee L, Blitz I L, Bode H R**, CnOtx, a Member of the Otx Gene Family, Has a Role in Cell Movement in Hydra, 1999, *Dev Biol* **212**: 392–404
- Spatazza J, Lee H H C, Di Nardo A A, Tibaldi L, Joliot A, Hensch T K, Prochiantz A**, Choroid-plexus-derived Otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity, 2013, *Cell Rep* **3**:1815-1823
- Sprecher SG, Pichaud F, Desplan C**, Adult and larval photoreceptors use different mechanisms to specify the same *Rhodopsin* fate, 2001, *Genes & Dev* **21**:2182-2195
- Steinmetz P R H, Urbach R, Posnien N, Eriksson J, Kostyuchenko R P, Brena C, Guy K, Akam M, Bucher G, Arendt D**, *Six3* demarcates the anterior-most developing brain region in bilaterian animals, 2010, *EvoDevo* **1**:14
- Steventon B, Mayor R, Streit A**, Mutual repression between *Gbx2* and *Otx2* in sensory placodes reveals a general mechanism for ectodermal patterning, 2012, *Dev Biol*, doi: 10.1016/j.ydbio.2012.04.025
- Su C-Y, Kemp H A, Moens C B**, Cerebellar development in the absence of *Gbx* function in zebrafish, 2014, *Dev Biol* **386(1)**:181-190
- Suda Y, Matsuo I, Kuratani S, Aizawa S**, *Otx1* function overlaps with *Otx2* in development of mouse forebrain and midbrain, 1996, *Genes Cells* **1**:1031-1044
- Suda Y, Matsuo I, Aizawa S**, Cooperation between *Otx1* and *Otx2* genes in developmental patterning of rostral brain, 1997, *Mech Dev* **69**:125-141
- Suda Y, Hossain Z M, Kobayashi C, Hatano O, Yoshida M, Matsuo I, Aizawa S**, *Emx2* directs the development of diencephalon in cooperation with *Otx2*, 2001, *Development* **128**:2433-50
- Suda Y, Kurokawa D, Takeuchi M, Kajikawa E, Kuratani S, Amemiya C, Aizawa S**, Evolution of *Otx* paralogue usages in early patterning of the vertebrate head, 2009, *Developmental Biology* **325**:282–295



**Sugiyama S, Di Nardo A A, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch T K**, Experience-dependent transfer of *Otx2* homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity, 2008, *Cell* **134**:508-520

**Sunmonu N A, Chen L, Li J Y H**, Misexpression of *Gbx2* throughout the mesencephalon by a conditional gain-of-function transgene leads to deletion of the midbrain and cerebellum in mice, 2009, *Genesis* **47(10)**:667-673

**Sunmonu N A, Li K, Guo Q, Li J Y H**, *Gbx2* and *Fgf8* are sequentially required for formation of the midbrain-hindbrain compartment boundary, 2011, *Development* **138(4)**: 725-734

**Swain P K, Chen S, Wang Q-L, Affatigato L M, Coats C L, Brady K D, Fishman G A, Jacobson S G, Swaroop A, Stone E, Sieving P A, Zack D J**, Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration, 1997, *Neuron* **19(6)**:1329-1336

**Swaroop A, Kim D, Forrest, D**, Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina., 2010, *Nat Rev Neurosci* **11(8)**:563-76

## T

**Tahayato A, Sonnevile R, Pichaud F, Warnet M F, Papatsenko D, Beaufils P, Cook T A, Desplan C**, *Otd/Crx*, a dual regulator for the specification of ommatidia subtypes in the *Drosophila* retina, 2003, *Dev Cell* **5**:391–402

**Tajima T, Ohtake A, Hoshino M, Amemiya S, Sasaki N, Ishizu K, Fujieda K**, OTX2 loss of function mutation causes anophthalmia and combined pituitary hormone deficiency with a small anterior and ectopic posterior pituitary, 2009, *J Clin Endocrinol Metab* **94**:314 –319

**Takasaki N, Kurokawa S, Nakayama R, Nakayama J-I, Aizawa S**, Acetylated YY1 regulates *Otx2* expression in anterior neuroectoderm at two *cis*-sites 90 kb apart, 2007, *EMBO J* **26**:1649-1659

**Tian E, Kimura C, Takeda N, Aizawa S, Matsuo I**, *Otx2* is required to respond to signals from anterior neural ridge for forebrain specification, 2002, *Dev Biol* **242**:204-223

**Tossell K, Kiecker C, Wizenmann A, Lang E, Irving C**, Notch signalling stabilises boundary formation at the midbrain-hindbrain organiser, 2011a, *Development* **138(17)**: 3745-3757

**Tossell K, Andrae L C, Cudmore C, Lang E, Muthukrishnan U, Lumsden A, Gillingham J D, Irving C**, *Lrrn1* is required for formation of the midbrain–hindbrain boundary and organiser through regulation of affinity differences between midbrain and hindbrain cells in chick, 2011b, *Dev Biol* **352(2)**:341-352

**Tomsa J M, Langeland J A**, *Otx* expression during lamprey embryogenesis provides insights into the evolution of the Vertebrate head and jaw, 1999, *Dev Biol* **207**:26–37

**Tour E, Pillemer G, Gruenbaum Y, Fainsod A**, *Otx2* can activate the isthmic organizer genetic network in the *Xenopus* embryo, 2002a, *Mech Dev* **110**:3-13

**Tour E, Pillemer G, Gruenbaum Y, Fainsod A**, *Gbx2* interacts with *Otx2* and patterns the anterior–posterior axis during gastrulation in *Xenopus*, 2002b, *Mech Dev* **112(1-2)**:141-151

## U

**Ueki T, Kuratanu S, Hirano S, Aizawa S**, *Otx* cognates in a lamprey, *Lampetra japonica*, 1998, *Dev Genes Evol* **208(4)**:223-228

**Umesono Y, Watanabe K, Agata K**, Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes, 1999, *Dev Genes Evol* **209**:31–39

## V

**Vandendries E R, Johnson D, Reinke R**, *orthodenticle* is required for photoreceptor cell development in the *Drosophila* eye, 1996, *Dev Biol* **173**:243–255

**Vaquerizas J M, Kummerfeld S K, Teichmann S A, Luscombe N M**, A census of human transcription factors: function, expression and evolution, 2009, *Nat Rev Genet* **10**:252-263

**Veilleux H D, van Herwerden L, Cole N J, Don E K, Santis C, Dixon D L, Wenger A S, Munday P L**, *Otx2* expression and implications for olfactory imprinting in the anemonefish, *Amphiprion percula*, 2013, *Biology Open* **000**:1–9

**Vernay B, Koch M, Vaccarino F, Briscoe J, Simeone A, Kageyama R, Ang S-L**, *Otx2* Regulates Subtype Specification and Neurogenesis in the Midbrain, 2005, *J Neurosci* **25(19)**:4856-4867

**Vignali R, Colombetti S, Lupo G, Zhang W, Stachel S, Harland R M, Barsacchi G**, *Xotx5b*, a new member of the *Otx* gene family, may be involved in anterior and eye development in *Xenopus laevis*, 2000, *Mech Dev* **96**:3-13

## W

**Wada S, Tokuoka M, Shoguchi E, Kobayashi K, Di Gregorio A, Spagnuolo A, Branno M, Kohara Y, Rokhsar D, Levine M, Saiga H, Satoh N, Satou Y**, A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis* - II: Genes for homeobox transcription factors, 2003, *Dev Genes Evol* **213**:222-234

**Wada S, Katsuyama Y, Sato Y, Itoh C, Saiga H**, *Hroth*, an *orthodenticle*-related homeobox gene of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: its expression and putative roles in the axis formation during embryogenesis, 1996, *Mech Dev* **60**:59-71

**Wang S, Sengel C, Emerson M M, Cepko C L**, A gene regulatory network controls the binary fate decision of rod and bipolar cells in the vertebrate retina, 2014, *Dev Cell* **30**:513-527

**Wassarman K M, Lewandoski M, Campbell K, Joyner A L, Rubenstein J L R, Martinez S, Martin G R**, Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/

hindbrain organizer is dependent on *Gbx2* gene function, 1997, *Development* **124**:2923-2934

**Westenskow P, Piccolo S, Fuhrmann S**, Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating *Mitf* and *Otx2* expression, 2009, *Development* **136(15)**:2505-2510.

**Westenskow P D, McKean J B, Kubo F, Nakagawa S, Fuhrmann S**, Ectopic *Mitf* in the embryonic chick retina by co-transfection of beta-catenin and *Otx2*, 2010, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51(10)**:5328-35.

**White M A, Myers C A, Corbo J C, Cohen B A**, Massively parallel in vivo enhancer assay reveals that highly local features determine the *cis*-regulatory function of ChIP-seq peaks, 2013, *Proc Natl Acad Sci USA* **110(29)**:11952-11957

**Widlund H R, Fisher D E**, Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival, 2001, *Oncogene* **22(20)**:3035-3041

**Williams N A, Holland P W H**, Gene and Domain Duplication in the Chordate *Otx* Gene Family: Insights from *Amphioxus Otx*, 1998, *Mol Biol Evol* **15(5)**:600–607

**Wortham M, Jin G, Sun J L, Bigner D D, He Y, Yan H**, Aberrant *Otx2* expression enhances migration and induces ectopic proliferation of hindbrain neuronal progenitor cells, 2012, *PLoS ONE* **7(4)**: e36211

**Wray S, Grant P, Gainer H**, Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode, 1989, *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:8132–8136

**Wyatt A, Bakrania P, Bunyan D J, Osborne R J, Crolla J A, Salt A, Ayuso C, Newsbury-Ecob R, Abou-Rayyah Y, Collin J R O, Robinson D, Ragge N**, Novel heterozygous *OTX2* mutations and whole gene deletions in anophthalmia, microphthalmia and coloboma, 2008, *Hum Mutat* **29(11)**:E278-E283

## X

**Xu Q, Mellitzer G, Robinson V, Wilkinson D G**, In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins, 1999, *Nature* **399(6733)**: 267-271

**Xu Q, Mellitzer G, Wilkinson D G**, Roles of Eph receptors and ephrins in segmental patterning, 2000, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**:993-1002

## Y

**Yanagi Y, Masuhiro Y, Mori M, Yanagisawa J, Kato S**, p300/CBP acts as a coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor, 2000, *Biochem Biophys Res Commun* **269**:410-4.

**Yang H, Wang H, Shivalila C S, Cheng A W, Shi L, Jaenisch, R,** One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas- mediated genome engineering, 2013, *Cell* **154(6)**:1370-1379

**Yasumoto K, Takeda K, Saito H, Watanabe K, Takahashi K, Shibahara S,** Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling, 2002, *EMBO J* **21(11)**:2703-2714

**Yasuoka Y, Suzuki Y, Takahashi S, Someya H, Sudou N, Haramoto Y, Cho K W, Asashima M, Sugano S, Taira M,** Occupancy of tissue-specific cis-regulatory modules by *Otx2* and *TLE/Groucho* for embryonic head specification, 2014, *Nat Comm* DOI: **10.1038/ncomms5322**

**Yokota N, Mainprize T G, Taylor M D, Kohata T, Loreto M, Ueda S, Dura W, Grajkowska W, Kuo J S, Rutka J T,** Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization, 2004, *Oncogene* **23(19)**:3444-3453

**Yoshida K, Watanabe D, Ishikane H, Tachibana M, Pastan I, Nakanishi S,** A key role of amacrine starburst cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement, 2001, *Neuron* **30(3)**:771-780

**Yoshida S, Mears A J, Friedman J S, Carter T, He S, Oh E, Jing Y, Farjo R, Fleury G, Barlow C, Hero A O, Swaroop A,** Expression profiling of the developing and mature *Nrl*<sup>-/-</sup> mouse retina: identification of retinal disease candidates and transcriptional regulatory targets of *Nrl*, 2004, *Hum Mol Genet* **13(14)**:1487-1503

**Young R W,** The renewal of photoreceptor cell outer segments, 1967, *J Cell Biol* **33**:61-72

**Yuh C-H, Brown C T, Livi C B, Rowen L, Clarke P J C, Davidson E H,** Patchy interspecific sequence similarities efficiently identify positive cis-regulatory elements in the sea urchin, 2002, *Dev Biol* **246**:148-161

**Yuh C-H, Dorman E R, Howard M L, Davidson E H,** An *otx* cis-regulatory module: a key node in the sea urchin endomesoderm gene regulatory network, 2004, *Dev Biol* **269**:536-551

## Z

**Zervas M, Millet S, Ahn S, Joyner A L,** Cell Behaviors and Genetic Lineages of the Mesencephalon and Rhombomere 1, 2004, *Neuron* **43(3)**:345-357

**Zakin L, Reversade B, Virlon B, Rusniok C, Glaser P, Elalouf J-M, Brûlet P,** Gene expression profiles in normal and *Otx2*<sup>-/-</sup> early gastrulating mouse embryos, 2000, *PNAS* **97(26)**:14388-14393

**Zhang Y, Miki T, Iwanaga T, Koseki Y, Okuno M, Sunaga Y, Ozaki N, Yano H, Koseki H, Seino S,** Identification, Tissue Expression, and Functional Characterization of *Otx3*, a Novel Member of the *Otx* Family, 2002, *J Biol Chem* **277**:28065-28069

**Zhang X M, Yang X J,** Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog, 2001, *Development* **128**:943–957

**Zhao S, Hung F C, Colvin J S, White A, Dai W, Lovicu F J, Ornitz D M, Overbeek P A**, Patterning the optic neuroepithelium by FGF signaling and Ras activation, 2001, *Development* **128(24)**:5051-5060

**Zuber M E, Gestri G, Viczian A S, Barsacchi G, Harris W A**, Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors, 2003, *Development* **130(21)**: 5155-5167