



HAL
open science

Rôle du facteur de transcription Otx2 dans le développement normal et tumoral du cervelet

Salsabiel El Nagar

► **To cite this version:**

Salsabiel El Nagar. Rôle du facteur de transcription Otx2 dans le développement normal et tumoral du cervelet. Biologie cellulaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2017. Français. NNT : 2017AZUR4138 . tel-03092242

HAL Id: tel-03092242

<https://theses.hal.science/tel-03092242v1>

Submitted on 2 Jan 2021

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.

École doctorale Sciences de la Vie et de la Santé
Unité de recherche : CNRS UMR - 7277-Inserm U1091
Institut de Biologie Valrose - Equipe « Neurodéveloppement »

Thèse de doctorat

Présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de l'Université Côte d'Azur
Mention : Interaction moléculaires et cellulaires

Par

Salsabiel El Nagar

**Rôle du facteur de transcription
Otx2 dans le développement normal
et tumoral du cervelet**

**Dirigée par Thomas Lamonerie
Co-dirigée par Nathalie Billon**

Soutenue publiquement le mardi 19 décembre 2017
Devant le jury composé de :

Olivier Ayrault	DR2, CNRS	Rapporteur
Nathalie Billon	CR1, CNRS	Co-directeur de thèse
Olivier Chinot	Professeur, Université Aix-Marseille	Examineur
Béatrice Durand	CR1, CNRS	Rapporteur
Thomas Lamonerie	Professeur, Université Côte d'Azur	Directeur de thèse
Michèle Studer	DR1, INSERM	Président de jury

Remerciements

Tout d'abord je souhaite adresser mes remerciements les plus chaleureux à Nathalie et Thomas qui ont encadré mes travaux de thèse. Je remercie Nathalie pour m'avoir accueillie depuis mon master 1 et pour sa confiance immédiate. Le chemin parcouru depuis n'aurait pas été possible sans ses encouragements, sa disponibilité et son exigence qui m'ont poussé à me dépasser. Je la remercie pour la formation de valeur et la maturité scientifique qu'elle m'a permis d'acquérir. Enfin, je la remercie pour la patience, énorme, dont elle a fait preuve face à mon manque d'organisation. Je remercie Thomas pour sa disponibilité et l'enthousiasme scientifique qu'il a su me communiquer. Je pense avoir été chanceuse de bénéficier de leur encadrement et de leur soutien, en particulier durant la dernière et critique ligne droite.

Je remercie ensuite le Docteur Michèle Studer, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse ainsi que le Docteur Olivier Ayrault, le Docteur Béatrice Durand et le Professeur Olivier Chinot, rapporteurs et examinateur, d'avoir accepté de bien vouloir juger de mon travail de thèse.

Je souhaite également remercier tous les membres de l'équipe Lamonerie anciens ou actuels: Almahdi, avec qui j'ai commencé cette aventure et qui est devenu un ami sur lequel je peux toujours compter, Fabien pour ses conseils précieux autant sur le plan scientifique que sur un plan plus personnel. Bruno, Mika et Alex pour m'avoir accueilli et le climat de camaraderie qu'ils faisaient régner dans le labo, Nuria (et son tempérament espagnol) avec qui j'aime tellement rigoler, Annabelle, notre Chuck Norris, qui a rendu cette dernière année plus facile. Un merci à Joffrey et aux nouveaux doctorants Pasqualé et Malala, qui prennent la relève et qui, j'en suis sûre, feront une thèse brillante.

Cette aventure n'aurait pas été la même sans l'ambiance "folle" du 7ème étage. Je tiens donc à remercier tous les membres de l'étage, notamment Loli et Sophie pour leur gentillesse, Thomas Juan, mon vieil ami de galère et Vishnu, toujours souriant, qui a amené une touche d'innocence à notre groupe.

Je souhaite également remercier les membres actuels et anciens de l'équipe Studer. Durant mon master 2, j'ai découvert la convivialité et la générosité à la méditerranéenne, depuis le labo a été envahie par les italiens, mais il n'a rien perdu de son charme. Je voudrais remercier en particulier Maria-Anna (with a big hug), Michèle et Eya. Un grand merci à Torsten, qui partage avec moi le même sarcasme et qui fut un soutien sans faille durant cette dernière année : ton amitié est précieuse et ne s'arrête pas à cette thèse.

Pendant cette thèse, j'ai rencontré beaucoup de personnes qui ont tous, d'une certaine façon, contribué à mon épanouissement professionnel. Certains d'entre eux, sont passés de collègues à amis. Je pense en particulier à Charlie, Aurélie et Nouha, les inséparables et à Georges « Javel ». Leurs conseils et leurs encouragements ont été essentiels à certaines périodes de ma thèse.

Si j'ai fait énormément de nouvelles rencontres durant ma thèse, je ne peux pas oublier mais vieilles amies, celles qui me connaissent depuis toujours. Un merci à Hayet, à Valérie et un grand merci aussi à Asma que je considère comme une sœur.

Pour terminer, je remercie ma mère, qui a tant sacrifié pour ses enfants et à qui je dois entièrement d'en être arrivé là aujourd'hui ; mes deux frères, Mohamed et Omar, qui m'ont considérablement soutenu et conseillé, et qui sont tous les deux, de manière tellement différente, un exemple pour moi. Enfin j'ai une pensée, pour mon père, décédé, qui m'a appris à affronter sereinement la vie, toujours positive et débordant d'optimisme.

TABLE DES FIGURES.....	6
TABLE DES ABRÉVIATIONS.....	7
RÉSUMÉ.....	8
SUMMARY.....	9
INTRODUCTION.....	10
I. Le rhombencéphale	12
I.1. Organisation primaire du système nerveux central.....	12
I.2. Développement du rhombencéphale	15
I.2.1. Les rhombomères	15
I.2.2. Régionalisation génétique et moléculaire du rhombencéphale.....	16
I.2.3. Les plexus choroïdes	21
I.3. La lèvre rhombique.....	23
II. Le cervelet	27
II.1. Organisation du cervelet adulte.....	27
II.1.1. Morphologie.....	27
II.1.2. Histologie	29
II.1.2.a. La couche moléculaire.....	29
II.1.2.b. La monocouche des cellules de Purkinje	30
II.1.2.c. La couche granulaire interne	30
II.1.2.d. Les noyaux cérébelleux profonds.....	30
II.1.3. Connectivité	30
II.2. Le développement du cervelet.....	33
II.2.1. Mise en place du territoire présomptif du cervelet.....	33
II.2.1.a. Limite antérieure.....	33
II.2.1.b. Limite postérieure.....	34
II.2.2. Les zones germinatives.....	35
II.2.2.a. La zone ventriculaire.....	35
II.2.2.b. La lèvre rhombique.....	36
II.3. Les précurseurs des cellules granulaires.....	38
II.3.1. La couche de cellules granulaires externes.....	38
II.3.2. La prolifération des GCP	39
II.3.2.a. Les facteurs extrinsèques contrôlant la prolifération des GCP	39
II.3.2.b. Facteurs intrinsèques contrôlant la prolifération des GCP.....	43
II.3.3. De l'EGL à l'IGL.....	46
II.3.3.a. La différenciation des GCP	46
II.3.3.b. La migration radiale.....	47

III. Les médulloblastomes	48
III.1. Classification des MB.....	48
III.1.1. Classification histologique	48
III.1.2. Classification moléculaire	50
III.1.2.a. Le groupe WNT	51
III.1.2.b. Le groupe SHH.....	53
III.1.2.c. Le groupe 3.....	54
III.1.2.d. Le groupe 4.....	55
III.2. Les modèles murins pour comprendre les MB	56
III.2.1. Modèles de transplantation.....	56
III.2.2. Modèles de souris génétiquement modifiées	57
IV. Le facteur de transcription Otx2.....	62
IV.1. Biologie moléculaire du gène Otx2	62
IV.1.1. La famille Otx2	62
IV.1.2. Du gène à la protéine.....	63
IV.2. Otx2, un facteur clé dans le développement.....	65
IV.2.1. Mise en place de l'axe antéro-postérieur.....	66
IV.2.2. Maturation du cerveau antérieur et définition de la limite mésencéphale- métencéphale	66
IV.3. Otx2 dans le rhombencéphale.....	67
IV.3.1. Otx2 dans les plexus choroïdes	67
IV.3.2. Otx2 dans le développement normal et tumoral du cervelet.....	68
IV.4. Un modèle murin pour étudier les fonctions d'Otx2	71
OBJECTIFS.....	72
RESULTATS ET DISCUSSIONS	74
Projet 1 : Étude de la fonction d'Otx2 dans la prolifération normale et tumorale des précurseurs des cellules granulaires du cervelet	75
Discussion.....	96
1) Les précurseurs des cellules granulaires présents dans le cervelet pendant la période périnatale forment une population hétérogène.....	96
2) Otx2 contrôle la prolifération des GCP en favorisant la transition G1-S du cycle cellulaire, et indépendamment de la voie de signalisation Shh.....	97
3) Otx2, dispensable pour la formation mais indispensable pour le maintien des MB Shh.....	99
4) Otx2, une cible thérapeutique.....	102
Projet 2 : Etude de l'antagonisme Otx2-Hoxa2 dans la compétence de la lèvre rhombique à produire des dérivés prolifératifs et sensibles à la tumorigenèse Shh- dépendante.....	103

Projet 3 : Caractérisation d'un nouveau modèle murin de cancer pédiatrique, les carcinomes des plexus choroïdes.....	105
Discussion.....	133
1) Un modèle murin qui ne mime pas la formation de MB du groupe 3	133
2) Un nouveau modèle de carcinomes des plexus choroïdes	134
3) Mécanisme par lequel c-Myc induit la formation de carcinomes des plexus choroïdes	135
CONCLUSION.....	137
BIBLIOGRAPHIE	139
ANNEXE	160

TABLE DES FIGURES

Figure 1: L'organisation primaire du système nerveux central	14
Figure 2: Organisation génomique des gènes <i>Hox</i> chez la drosophile, l'homme, la souris et leur ancêtre	17
Figure 3: Expression des gènes <i>Hox</i> dans le rhombencéphale	19
Figure 4: Spécification moléculaire des neurones du rhombencéphale selon l'axe dorso-ventral	21
Figure 5: Les plexus choroïdes	23
Figure 6: Subdivision de la lèvre rhombique et ses dérivés	26
Figure 7: Morphologie du cervelet	29
Figure 8: Organisation cellulaire du cervelet et sa connectivité	32
Figure 9: Définition du territoire présomptif du cervelet	35
Figure 10: Les zones germinatives du cervelet	37
Figure 11: Les précurseurs des cellules granulaires prolifèrent en réponse au mitogène Shh	42
Figure 12: Schéma du cycle cellulaire et de ses principaux composants	44
Figure 13: La classification histologiques de médulloblastomes	49
Figure 14: Caractéristiques des différents groupes moléculaires de médulloblastomes	51
Figure 15: La voie de signalisation Wnt canonique	53
Figure 16: Les techniques permettant d'obtenir des modèles murins de médulloblastomes	59
Figure 17: La mutation totale d'<i>Otx2</i> conduit à un phénotype "sans tête" à E8,5 dans les embryons de souris	63
Figure 18: Organisation et expression du locus <i>Otx2</i> chez la souris	65
Figure 19: <i>Otx2</i> dans le développement normal et tumoral du cervelet	70
Figure 20: L'expression de <i>MycT58A</i> dans les cellules <i>Otx2</i> positives n'induit pas la formation de médulloblastome	106

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 :

- ADN** - acide désoxyribonucléique
- ARN** - acide ribonucléique
- ChP** - plexus choroïde
- CNS** - système nerveux central
- CSF** - fluide cérébro-spinal
- E** - jour embryonnaire
- ER** - récepteur à l'oestrogène
- EGL** - couche granulaire externe
- GC** - cellules granulaires
- GCP** - précurseurs des cellules granulaires
- IGL** - couche granulaire interne
- IsO** - organisateur isthmique
- KO** - knock-out, ablation d'un gène
- LRL** - lèvre rhombique inférieur
- MB** - médulloblastomes
- ML** - couche moléculaire
- P** - jour postnatal
- PL** - couche de cellules de Purkinje
- R** - rhombomère
- RL** - lèvre rhombique
- UBC** - cellules unipolaires en brosse
- URL** - lèvre rhombique supérieur
- V** - ventricule
- VZ** - zone ventriculaire

RÉSUMÉ

Les médulloblastomes (MB) sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes en pédiatrie. Ils apparaissent au cours du développement dans la partie postérieure du cerveau, principalement au niveau du cervelet. Ils peuvent être stratifiés en quatre groupes : les groupes WNT et SHH, où ces voies de signalisation sont activées de façon aberrante, et les groupes 3 et 4, présentant des anomalies chromosomiques et amplifications multiples, dont c-Myc (groupe 3) et N-Myc (groupe 4). L'une des altérations génétiques les plus retrouvées dans les MB est la surexpression du facteur de transcription OTX2 (dans 75% des cas). Ce facteur, essentiel à la mise en place du système nerveux central, est exprimé dans les précurseurs des cellules granulaires (GCP) du cervelet, cellules d'origine de la majorité des MB. Pendant la période périnatale, les GCP subissent une phase de prolifération très intense en réponse au mitogène Sonic Hedgehog (SHH), ce qui les rendrait particulièrement sensibles à la tumorigenèse. Au cours de ma thèse, j'ai mené trois projets visant à comprendre le rôle d'Otx2 dans la genèse, la prolifération et la tumorigenèse des GCP, tous basés sur l'utilisation de souris génétiquement modifiées.

Dans le premier projet, j'ai analysé la fonction d'Otx2 au sein même des GCP du cervelet, durant leur phase postnatale de prolifération intense. J'ai montré que l'ablation conditionnelle d'Otx2 durant cette phase conduit à une atrophie du cervelet postérieur résultant d'un défaut de prolifération des GCP. En approfondissant l'analyse de ce phénotype, j'ai démontré qu'Otx2 stimule la prolifération de ces cellules parallèlement à la voie de signalisation Shh. Par ailleurs, l'ablation d'Otx2 dans un modèle de souris mimant la formation de médulloblastomes Shh-dépendants a donné des résultats très intéressants : alors qu'Otx2 ne semble pas requis pour la formation de ces tumeurs, il s'avère indispensable pour leur maintien à long terme.

Dans le second projet, j'ai tenté d'élucider la fonction d'Otx2 dans la génération de GCP à partir de la lèvre rhombique (RL). Cette structure se subdivise en trois domaines : cérébelleux, cochléaire et pré-cérébelleux. Seuls les domaines cérébelleux et cochléaires produisent des dérivés prolifératifs (les GCP) capables de répondre à la voie SHH et de former des médulloblastomes SHH-dépendants. Le domaine cochléaire se situe entre les domaines cérébelleux et pré-cérébelleux qui expriment respectivement Otx2 et Hoxa2. Nous avons déterminé le rôle de ces deux gènes dans la capacité de la lèvre rhombique à générer des dérivés prolifératifs et sensibles à la tumorigenèse.

Ces deux projets ont permis d'interroger la fonction d'Otx2 dans les GCP, depuis leur source, la RL, jusqu'à leur amplification, dans le cervelet. Ils ont révélé le rôle central d'Otx2 dans la génération des cellules d'origine des MB SHH-dépendants, ainsi que dans le maintien de ces tumeurs. Ces résultats ont totalement modifié notre compréhension du rôle oncogénique d'Otx2, à la fois dans les MB SHH-dépendants où il était jusqu'ici insoupçonné, mais également dans les trois autres groupes, où sa surexpression pourrait compenser l'absence d'activation de la voie SHH.

Enfin, dans un troisième projet, j'ai tenté de créer un nouveau modèle murin mimant la formation de médulloblastomes du groupe 3. Dans ce groupe, deux altérations sont majoritairement retrouvées : la surexpression et/ou l'amplification de c-Myc et d'Otx2. Le croisement de lignées de souris appropriées nous a permis d'exprimer, pendant la période postnatale, un dominant actif de c-Myc dans les cellules exprimant Otx2. Cette approche a dévoilé des résultats inattendus, puisque des carcinomes des plexus choroïdes (CPC), et non des MB, ont été obtenus. L'analyse de nombreux cas a révélé une pénétrance de 100%, avec une espérance de survie d'environ quatre mois. Les CPC sont des tumeurs pédiatriques extrêmement agressives, pour lesquelles il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle murin. Ainsi la caractérisation moléculaire, histologique et fonctionnelle de ce modèle unique de CPC a permis d'émettre de nouvelles hypothèses sur la formation et le fonctionnement de ces tumeurs et pourrait permettre, à terme, de développer des thérapies ciblées.

SUMMARY

Medulloblastomas (MB) are the most common brain tumors in paediatrics. They appear during development in the posterior part of the brain, mainly in cerebellum. MB can be stratified in four groups: the WNT and SHH groups, where these signalling pathways are aberrantly activated, and the groups 3 and 4, which display chromosomal abnormalities and multiple amplifications, including c-Myc (group 3) and N-Myc (group 4). One of the most frequent genetic alteration in MB is the overexpression of the Otx2 transcription factor (in 75% of cases). This factor, which is essential for central nervous system development, is expressed in granule cell precursors (GCP) of the cerebellum, which represent the cell of origin of the majority of MB. During the perinatal period, GCPs undergo intense proliferation in response to Sonic Hedgehog (SHH), making them particularly susceptible to tumorigenesis. During my thesis, I conducted three projects to understand the role of Otx2 in genesis, proliferation and tumorigenesis of GCPs, all based on the use of genetically modified mice models.

In the first project, I have analyzed the function of Otx2 directly within GCP of the cerebellum, during their postnatal phase of intense proliferation. I have shown that conditional ablation of Otx2 during this phase leads to an atrophy of the posterior cerebellum resulting from a GCP proliferation defect, and that Otx2 stimulates proliferation of these cells independently of the Shh signaling pathway. Moreover, ablation of Otx2 in a mice model of Shh-dependent medulloblastomas yielded very interesting results: while Otx2 does not seem to be required for the initiation of these tumours, it is essential for their long-term maintenance.

In the second project, I have tried to elucidate the function of Otx2 in the generation of GCPs from the rhombic lip (RL). This structure is subdivided in three domains: cerebellar, cochlear and pre-cerebellar. Only the cerebellar and cochlear domains produce proliferative derivatives (the GCPs) able to respond to the SHH-signaling pathway and to form Shh-dependant medulloblastoma. The cochlear domain lies between the cerebellar and pre-cerebellar domains, which express Otx2 and Hoxa2, respectively. We have determined the role of these two genes in the capacity of the rhombic lip to generate proliferative derivatives sensitive to tumorigenesis.

These two projects allowed to interrogating the function of Otx2 in GCPs, from their source in the RL, until their amplification in the cerebellum. They revealed the central role of Otx2 in the generation of the cell-of-origin of SHH-dependent medulloblastomas, as well as in the maintenance of these tumours. These results have completely modified our understanding of the oncogenic role of Otx2 not only in Shh-dependent medulloblastomas, where it was previously unsuspected, but also in the other MB subgroups, where its overexpression could compensate for the absence of Shh pathway activation.

Finally, in a third project, I tried to create a new murine model for the MB group 3. In this subtype, two alterations are frequently observed: overexpression and/or amplification of c-Myc and Otx2. Combination of appropriate mouse lines allowed us to express, during the postnatal period, an active dominant of c-Myc in Otx2-positive cells. This approach uncovered unexpected results, since choroid plexus carcinomas (CPC) were obtained, instead of MB. Analysis of several cases revealed a penetrance of 100%, with a life expectancy of about four months. CPCs are extremely aggressive paediatric tumours, for which there is currently no murine model. Molecular, histological and functional characterization of this unique CPC model enabled to formulate new hypotheses on the formation of these tumours and could lead to the development of improved targeted therapies.

INTRODUCTION

Les médulloblastomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'enfant. Elles apparaissent dans le cerveau postérieur durant son développement, et dérivent de populations spécifiques de neurones immatures. L'observation que les médulloblastomes se forment à partir de progéniteurs, présents dans le cerveau en développement, suggère que la formation de médulloblastomes et le développement du système nerveux central partagent des mécanismes communs. L'étude et la compréhension de la mise en place du système nerveux central, et plus particulièrement celle du cerveau postérieur, appelé rhombencéphale, semblent donc indispensables dans la recherche de nouvelles thérapies pour lutter contre les médulloblastomes. Le facteur de transcription Otx2 est un excellent candidat pour cette étude. En effet, il est surexprimé dans 75% des médulloblastomes, et représente un facteur clé pour le développement du système nerveux central. Sa fonction dans les précurseurs des cellules granulaires, cellules d'origine de nombreux médulloblastomes, reste, cependant, encore un mystère.

Ce travail de thèse vise à mieux comprendre le rôle d'Otx2 dans la genèse, la prolifération et la tumorigenèse des précurseurs des cellules granulaires. Dans ce but, trois projets ont été menés :

- _ L'étude du rôle d'Otx2 dans la prolifération intense des précurseurs des cellules granulaires pendant le développement normal et tumoral du cervelet
- _ L'étude de la fonction d'Otx2 dans la spécification des dérivés de laèvre rhombique, structure d'où émergent les précurseurs granulaires
- _ La génération et l'analyse d'un nouveau modèle de médulloblastomes ayant pour cellules d'origine les cellules exprimant Otx2.

Dans ce cadre, l'introduction de cette thèse détaillera dans une première partie le développement du cerveau postérieur puis se focalisera, dans une seconde partie, sur l'une de ses structures, le cervelet, en insistant sur la production et la prolifération des précurseurs des cellules granulaires. Dans la troisième partie, les médulloblastomes, pathologies affectant souvent les précurseurs des cellules granulaires, seront expliqués avec une vision générale des classifications de ces tumeurs. L'apport des modèles murins à la compréhension de ces cancers sera détaillé. Enfin, la quatrième partie présentera l'importance du gène Otx2 dans la formation du système nerveux ainsi que dans le développement normal et tumoral du cervelet sera présentée.

I. Le rhombencéphale

L'embryogenèse de la majorité des invertébrés et des vertébrés s'effectue en quatre étapes : la fécondation, la segmentation, la gastrulation et l'organogénèse.

- La fécondation consiste en la fusion des gamètes mâles et femelles, respectivement les spermatozoïdes et les ovules, pour former la cellule œuf.
- La segmentation ou clivage correspond à la phase durant laquelle la cellule œuf puis l'embryon subit plusieurs divisions sans augmenter son volume. A la fin de cette phase, l'embryon est une masse cellulaire, souvent sphérique.
- La gastrulation est caractérisée par des mouvements cellulaires aboutissant à la formation de trois feuillets embryonnaires : l'endoderme (le plus interne), le mésoderme et l'ectoderme (le plus externe). Chacun de ces feuillets sera à l'origine de structures distinctes. La gastrulation est donc une étape de différenciation majeure de l'embryon.
- L'organogénèse est le processus durant lequel les différents organes se forment successivement.

I.1. Organisation primaire du système nerveux central

Durant la gastrulation, une fois que les trois feuillets embryonnaires sont établis, le développement du système nerveux central (CNS, pour central nervous system) débute. Les expériences menées au début du siècle dernier ont permis d'identifier l'ectoderme dorsal comme étant à l'origine du système nerveux sous l'induction du mésoderme. En effet Spemann et Mangold ont montré, chez la salamandre, que la transplantation du mésoderme de la lèvre dorsale du blastopore, appelé par la suite l'organisateur de Spemann, d'une gastrula donneuse, dans la zone ventrale d'une gastrula receveuse, aboutissait à la formation d'un axe embryonnaire surnuméraire, incluant le développement d'un cerveau, des yeux et d'une moelle épinière dans la partie ventrale (Figure 1A). Des expériences de marquage cellulaire ont montré que cet axe surnuméraire était issu de l'ectoderme ventral de la gastrula receveuse. Ces expériences suggèrent donc que l'ectoderme ventral, destiné à devenir de l'épiderme, pourrait donner un système nerveux au contact de l'organisateur de Spemann. Ainsi ce dernier, caractérisé chez les vertébrés sous le nom de nœud de Hensen, joue le rôle d'inducteur neural et permet à l'ectoderme dorsal de se différencier en neuro-ectoderme qui donnera plus tard le

système nerveux (Spemann, 1938; Hamburger, 1969; Shih and Fraser, 1996). Une fois spécifié, le neuro-ectoderme va se refermer sur lui-même pour former le tube neural dans un processus nommé neurulation. Durant ce processus, les cellules du neuro-ectoderme s'allongent pour former une structure monocellulaire appelée plaque neurale. Cette dernière va alors prendre une forme de gouttière en se creusant en son centre alors que ses bords s'épaississent et se soulèvent pour former des bourrelets. Le soulèvement et l'enroulement progressif de ces bourrelets creusent la plaque jusqu'à ce qu'ils viennent fusionner dorsalement. Un tube neural parallèle à l'axe antéro-postérieur est ainsi formé (Figure 1B). Chez les vertébrés, la majeure partie du tube neural va donner la moelle épinière tandis que l'extrémité antérieure s'élargit pour former les trois vésicules primaires à l'origine du cerveau : le prosencéphale (ou cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur). Le prosencéphale et le rhombencéphale donnent ensuite naissance respectivement au télencéphale, diencéphale et au métencéphale, myélocéphale (Figure 1C) (Shimamura et al., 1995; Rubenstein et al., 1994; Lumsden and Krumlauf, 1996). Le système nerveux antérieur comprend alors cinq vésicules. Le télencéphale formera les hémisphères cérébraux, les bulbes olfactifs et les ganglions de la base. En plus de générer le thalamus et l'hypothalamus, le diencéphale forme la rétine, le nerf optique ainsi que les cellules pigmentaires de l'œil. Le mésencéphale participera à la formation des colliculi supérieurs et inférieurs. Enfin les deux vésicules du rhombencéphale formeront le cervelet, le pont et le bulbe rachidien (ou médulla) (Shimamura et al., 1997; Swanson, 2000; Puelles and Rubenstein, 2003; Hoch et al., 2009).

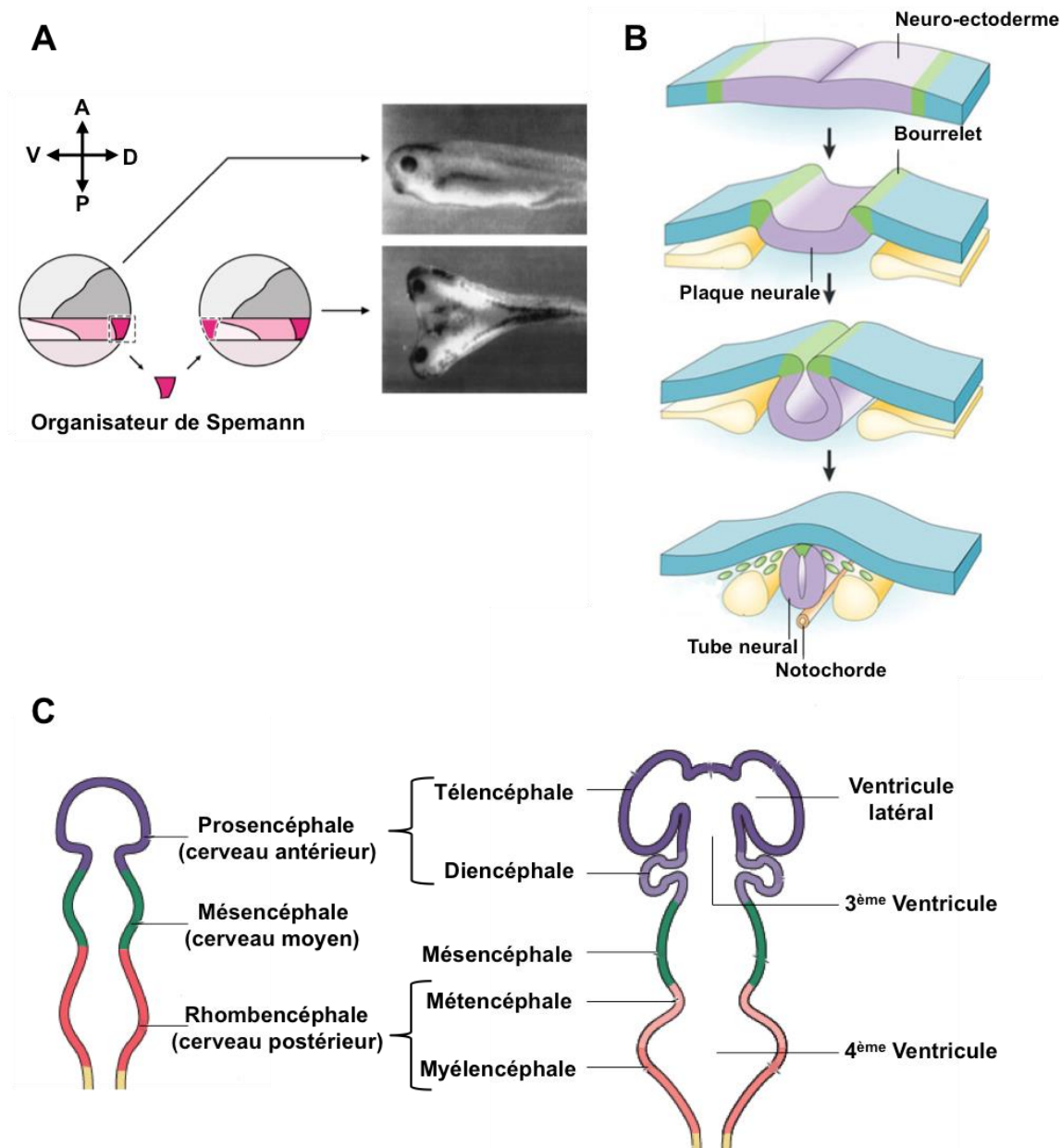


Figure 1: L'organisation primaire du système nerveux central

(A) L'expérience de Spemann et Mangold. L'organisateur de Spemann (mésoderme dorsal) d'un embryon donneur est implanté dans la partie ventrale d'un embryon receveur. Un axe surnuméraire complet est formé dans l'embryon receveur. (B) La neurulation. Le neuro-ectoderme se creuse par le soulèvement de ses bords (en vert) et devient la plaque neurale. L'enroulement des bourrelets creuse cette plaque jusqu'à qu'ils viennent fusionner dorsalement formant le tube neural. (C) Le tube neural antérieur va donner le cerveau. Il se régionalise selon l'axe antéro-postérieur à travers la formation de trois puis cinq vésicules : le prosencéphale, qui donnera le télencéphale et diencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale qui donnera à son tour le métencéphale et le myélocéphale. Adapté de Honoré et Hemmati-Brivanlou (1997), de Gamill et Bronner-Fraser (2003) et d'après Purves, Neurosciences, troisième édition.

I.2. Développement du rhombencéphale

Le cerveau postérieur ou rhombencéphale adulte est composé de trois principales structures : dans la partie dorsale antérieure se trouve le cervelet, dans la partie ventrale antérieure, le pont et dans la partie postérieure, le bulbe rachidien (ou médulla). Au sein de ces structures il existe une multitude de noyaux de neurones et de ganglions associés aux nerfs crâniens. Le développement du rhombencéphale, à l'origine de cette organisation, est un processus qui a été pendant longtemps la source d'une grande confusion, du fait que la subdivision embryonnaire ne reflète pas l'organisation anatomique du cerveau postérieur adulte.

I.2.1. Les rhombomères

Durant le développement, au moment de la fermeture du tube neural, le rhombencéphale se subdivise, en fonction de l'espèce, en sept à huit segments le long de l'axe antéro-postérieur. Ces segments, appelés rhombomères (R), sont numérotés de R1, le plus antérieur, à R7-R8, les plus postérieurs (Gräper, 1913 ; Vaage, 1969; Lumsden and Keynes, 1989). Cette segmentation est un phénomène transitoire, observable chez la souris entre les jours embryonnaires (E) 8,5 et 10,5, qui résulte de l'alternance de renflements délimités par des constriction du neuro-épithélium. Mais cette subdivision n'est pas uniquement anatomique puisque les rhombomères représentent des « territoires » de développement distincts dans la mesure où les cellules mitotiques de chaque rhombomère peuvent se mélanger librement entre elles, mais quasiment pas avec les cellules des rhombomères adjacents, même après que le rhombencéphale ait perdu sa segmentation physique. Ainsi, chaque rhombomère possède un destin développemental différent (Guthrie and Lumsden, 1991; Wingate and Lumsden, 1996; Birgbauer and Fraser, 1994). Cependant, une fois la prolifération terminée, les cellules post-mitotiques sont capables de traverser les frontières entre rhombomères durant leur migration (Wingate and Lumsden, 1996). Le rhombomère R1 donnera le cervelet, que nous détaillerons dans le chapitre suivant, et les rhombomères R2 à R7-R8 donneront naissance au pont et au bulbe rachidien. Ces deux dernières structures sont peuplées de neurones regroupés en noyaux, aux fonctions aussi diverses que les mouvements du cou et de la face, la mastication, la déglutition, le contrôle du rythme cardiaque et de la respiration ou encore de la pression artérielle. C'est également au niveau de ces structures que naissent la majorité des nerfs crâniens (Sotelo, 2004). Les nerfs crâniens forment l'ensemble des afférences et efférences neuronales reliant l'organisme au

système nerveux central. Les mammifères en possèdent 12 paires numérotées de I à XII selon l'emplacement antéro-postérieur d'où ils prennent leur origine. Les neuf derniers nerfs crâniens naissent au niveau du rhombencéphale. Les neurones qui projettent vers chaque nerf crânien sont spécifiquement localisés dans un ou deux rhombomères adjacents (Figure 3) (Lumsden and Keynes, 1989). Par exemple, les précurseurs des cellules du R2 et R3 projettent dans le nerf trijumeau (V) qui innerve la mâchoire, les précurseurs du R4 et R5 projettent dans le nerf facial (VII) et le nerf auditif (VIII) qui, respectivement, innerve les muscles de la face et contrôle l'audition, alors que les précurseurs de R6 et R7 génèrent les neurones du nerf glosso-pharyngien (IX) qui gère la déglutition (Glover, 2003; Pasqualetti et al., 2007; Sieber et al., 2007).

La segmentation du rhombencéphale en rhombomères semble donc être indispensable à l'organisation anatomique et fonctionnelle du cerveau postérieur.

I.2.2. Régionalisation génétique et moléculaire du rhombencéphale

Dans le rhombencéphale, l'identité régionale des précurseurs neuronaux, selon l'axe antéro-postérieur, influence leur devenir. Cette régionalisation repose largement sur l'expression des gènes homéotiques *Hox*. Ces gènes homéotiques ont été génétiquement caractérisés pour la première fois chez la drosophile comme des gènes dont la mutation conduit à la transformation homéotique d'un segment spécifique le long de l'axe antéro-postérieur (Lewis, 1978). Chez la drosophile, il y a 8 gènes *Hox* répartis en deux complexes ou clusters (Antennapedia et Bithorax), eux-mêmes situés en deux régions distinctes du chromosome 3. Tous ces gènes possèdent une séquence ADN (acide désoxyribonucléique) de 183 paires de bases qui code pour un homéodomaine, faisant donc d'eux des facteurs de transcription (Gehring, 1987). La caractéristique la plus frappante de ces gènes *Hox* est leur remarquable degré de conservation à travers l'évolution. En effet, des clusters de gènes homéotiques, similaires à ceux présents chez la drosophile, ont été identifiés dans la majorité des classes principales d'animaux. Chez la souris, comme chez tous les mammifères, 39 gènes *Hox* ont été identifiés. Ils peuvent être divisés en quatre clusters, situés sur des chromosomes différents, nommés Hox-A, Hox-B, Hox-C et Hox-D et constituent, sans doute, le produit de deux duplications d'un complexe ancestral (Figure 2) (Favier and Dollé, 1997; McGinnis and Krumlauf, 1992; Zeltser et al., 1996). Au sein de chaque cluster, chaque gène *Hox* fait partie d'un des treize groupes de gènes paralogues. Ces gènes paralogues peuvent être présents sur un ou plusieurs clusters, et sont tous reliés à un gène *Hox* de la drosophile. Par exemple, le groupe paralogue 4 correspond au gène *Dfd* (*Deformed*) de la drosophile et est présent sur les 4 clusters

chez les mammifères (*Hoxa4*, *Hoxb4*, *Hoxc4* et *Hoxd4*) alors que le paralogue 2, qui correspond à *pb* (*proboscipedia*), n'est présent que sur les clusters Hox-A et Hox-B (*Hoxa2* et *Hoxb2*). La position des gènes *Hox* au sein d'un cluster reflète leur pattern d'expression dans l'organisme : la limite d'expression de chaque gène est d'autant plus antérieure que le gène est situé plus en 3' dans le cluster (Duboule and Dollé, 1989; Duboule, 2007).

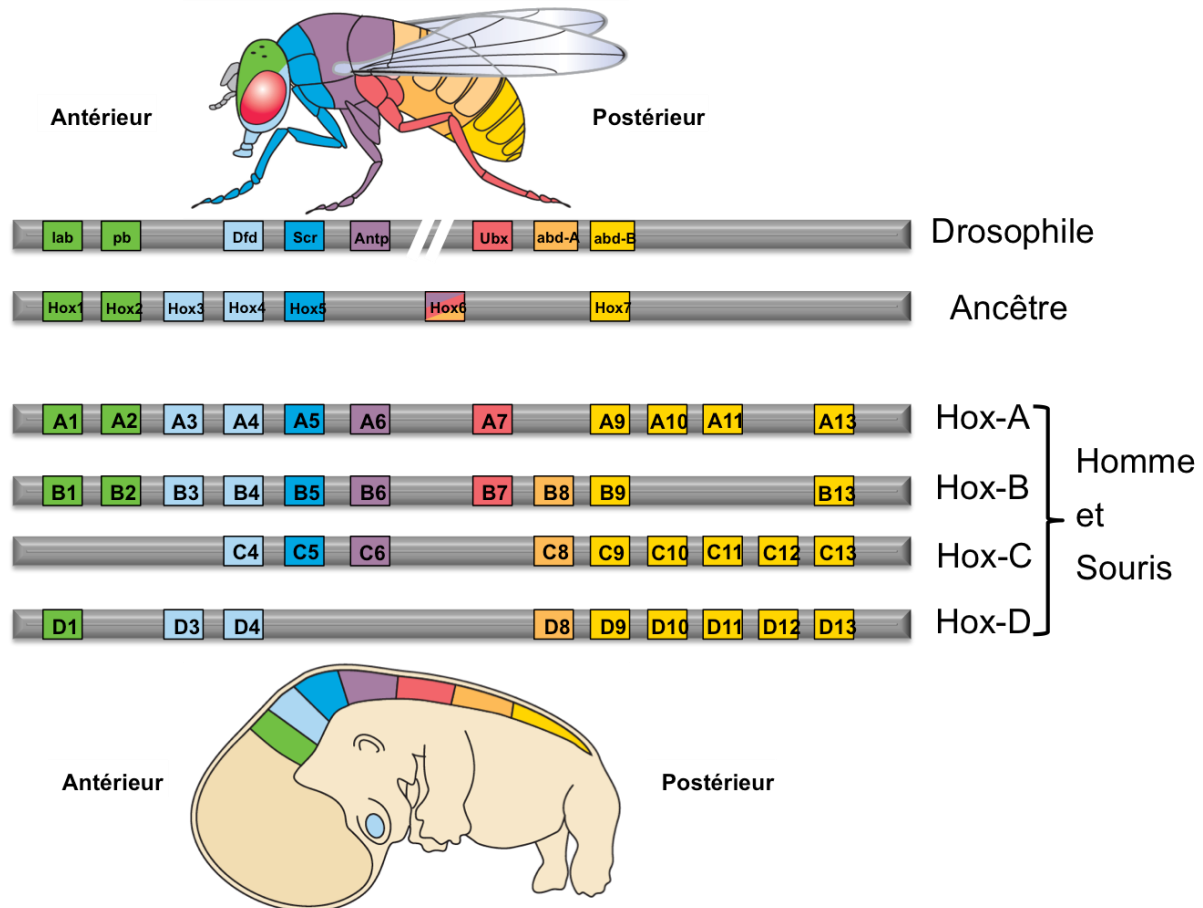


Figure 2: Organisation génomique des gènes *Hox* chez la drosophile, l'homme, la souris et leur ancêtre

Les gènes *Hox* sont organisés en cluster et sont divisés en 13 gènes paralogues. L'expression métamérique de chaque *Hox* est représentée sur les schémas de drosophile et d'embryon humain. Adaptée de Purves, Neurosciences, troisième édition.

Dans le rhombencéphale, les différents patterns d'expression des gènes *Hox* positionnent les frontières inter-rhombomères (Figure 3). En réalité, l'expression de ces gènes précède la formation morphologique des rhombomères, puisqu'elle apparaît entre E7,5 et E8,5, d'abord dans la partie postérieure, puis s'antériorise et régionalise le rhombencéphale. Chaque rhombomère exprime une combinaison spécifique et unique de gènes *Hox*, qui va lui conférer

son identité, à l'exception du R1 où aucun gène *Hox* n'est exprimé (Grapin-Botton et al., 1997; Dupé and Lumsden, 2001; Aldinger et al., 2009). De nombreuses études de perte ou de gain de fonction ont été menées sur différents modèles tel que le poisson zèbre, le poulet ou encore la souris pour comprendre comment les gènes *Hox* spécifiaient chaque rhombomère. Parmi les plus fameuses, se trouvent les études menées sur le gène *Hoxb1*. *Hoxb1* ne s'exprime qu'au niveau du R4. Sa délétion chez la souris ou chez le poisson zèbre conduit le R4 à montrer les mêmes caractéristiques que le R2. De plus, les neurones moteurs du R4, qui vont former le nerf facial (VII), ne migrent plus postérieurement vers le R6, mais migrent antérieurement comme le font les neurones moteurs du nerf trijumeau (V) du R2. Inversement, l'expression ectopique de *Hoxb1* dans le R2 du poulet conduit ce dernier à prendre l'identité du R4 (Studer et al., 1996; Goddard et al., 1996; Bell et al., 1999). Prises ensemble, ces études indiquent que *Hoxb1* est le gène qui confère son identité au R4. La mutation du paralogue de *Hoxb1*, *Hoxa1*, qui est le gène *Hox* qui s'exprime le plus tôt dans le rhombencéphale, cause en plus d'une altération de l'identité des rhombomères, l'absence de certains d'entre eux. En effet, l'ablation homozygote de *Hoxa1*, chez la souris, cause une anomalie, variable, de la segmentation du rhombencéphale avec l'absence quasi-totale du R5 et l'absence partielle du R4 qui fusionne avec le R5, quand il en reste, et prend une identité R2/R3. Ce mutant présente également des altérations de R3, R6 et R7/R8. *Hoxa1* est donc à la fois important pour initier la régionalisation du rhombencéphale et pour définir l'identité des rhombomères. Dans les mutants *Hoxa1*, les cellules du R4 échouent à activer un niveau suffisant de *Hoxb1* et sont donc ré-spécifiées en cellules de rhombomères plus antérieurs (Rijli et al., 1998; Helmbacher et al., 1998; Gavalas et al., 2003). Chez les souris ayant une mutation du gène *Hoxa2*, le seul à être exprimé dans le R2 en temps normal, la frontière R1-R2 est absente, le rhombomère R2-R3 est réduit et le R1 est élargi, conduisant à une expansion postérieure du territoire présomptif du cervelet. Ces résultats suggèrent que le R2 et le R3, en partie, prennent une identité R1 (Gavalas et al., 1997; Davenne et al., 1999; Barrow et al., 2000). De plus l'expression ectopique de *Hoxa2* induit des neurones moteurs identiques à ceux de nerf trijumeau (V) dans le R1, où il n'y a normalement pas de neurones moteurs (Jungbluth et al., 1999). Ainsi, tout comme *Hoxb1* spécifie R4, *Hoxa2* spécifie R2. Toutes les mutations de gènes *Hox* n'affectent pas la segmentation du rhombencéphale. C'est le cas pour l'ablation de *Hoxb2*, car cette mutation est complètement masquée par la présence de *Hoxa2* dans le R3. En revanche, dans le double mutant *Hoxa2-Hoxb2*, les altérations observées dans le mutant *Hoxa2* sont aggravées, et les frontières R2-R3 et R3-R4 sont absentes. Les mutations des gènes *Hox* d'un même groupe paralogue peuvent donc avoir un effet synergique, comme c'est le cas ici pour le groupe 2 (Barrow and Capecchi,

1996; Davenne et al., 1999). Enfin, l'expérience menée par Waskiewicz et collègues a montré que l'inhibition de l'expression des gènes *Pbx2* et *lzf/Pbx4*, qui codent des partenaires obligatoires de toutes les protéines Hox, dans le rhombencéphale du poisson zèbre, grâce à la combinaison de mutations génétiques et d'injection d'oligonucléotides anti-sens, conduisait à la formation d'un rhombencéphale « à l'état fondamental » qui est par défaut le R1 : tous les rhombomères du R2 au R6 sont transformés en un long rhombomère 1 (Waskiewicz et al., 2002).

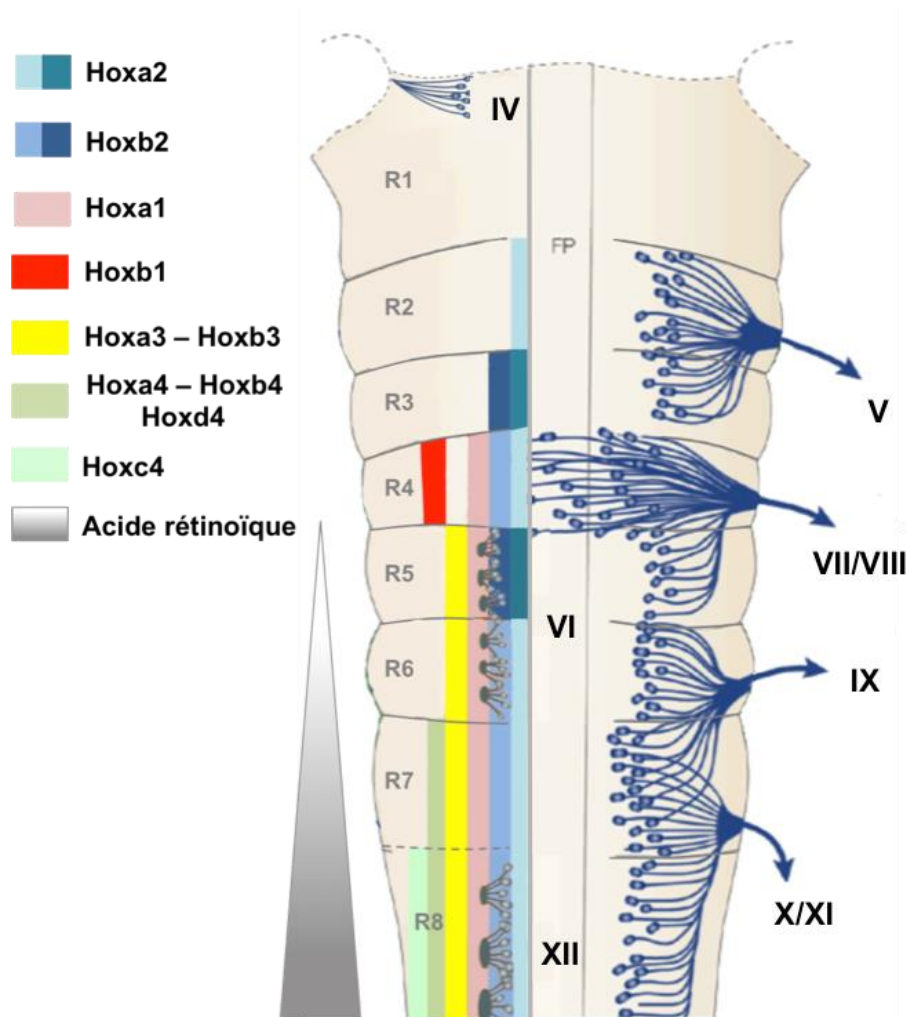


Figure 3: Expression des gènes *Hox* dans le rhombencéphale

Représentation schématique du rhombencéphale de vertébré. Sur la droite, les noyaux neuronaux qui projettent dans les nerfs crâniens efférents. Sur la gauche, le pattern d'expression des gènes *Hox* dans les différents rhombomères. Pour les gènes Hoxa2 et Hoxb2, les régions foncées correspondent à une expression élevée de ces gènes. Adapté de Kiecher et Lumsden, 2005.

Un autre facteur impliqué dans la spécification des rhombomères est l'acide rétinoïque. Cette molécule, synthétisée à partir de la vitamine A, est sécrétée et diffuse dans le rhombencéphale jusqu'à la frontière R2-R3 puis régresse progressivement vers la frontière R4-R5 (Sirbu et al., 2005), formant un gradient postéro-antérieur (Figure 3). Des expériences ont montré que le manque d'acide rétinoïque, induit par la privation maternelle en vitamine A, conduit à l'absence du rhombencéphale postérieur, du R5 au R8. A l'inverse, le traitement d'embryons avec de l'acide rétinoïque induit une postériorisation du rhombencéphale (Maden et al., 1996; White et al., 1998; Conlon and Rossant, 1992). De plus, l'utilisation de doses croissantes d'antagonistes de l'acide rétinoïque sur des embryons de poulet en culture a révélé que le rhombencéphale postérieur nécessite une concentration plus élevée d'acide rétinoïque pour être correctement spécifié (Maves and Kimmel, 2005). Ainsi, des concentrations plus élevées en acide rétinoïque conduisent à un phénotype de postériorisation du rhombencéphale, alors que des concentrations plus faibles induisent, au contraire, une antériorisation. Par ailleurs, les molécules Fgf (fibroblast growth factor), exprimées entre autre au niveau de la frontière mésencéphale-rhombencéphale, sont capables d'induire l'expression de marqueurs antérieurs en s'opposant aux effets de l'acide rétinoïque (Marín and Charnay, 2000; Bel-Vialar et al., 2002).

Outre la spécification des progéniteurs selon l'axe antéro-postérieur, il existe également une spécification de ces derniers selon l'axe dorso-ventral. En effet, au sein des rhombomères, des sous-types neuronaux proviennent de positions distinctes sur l'axe dorso-ventral. Cette spécification est mise en place par deux gradients de morphogènes : Sonic Hedgehog (Shh) et Bone morphogenetic protein/wingless-type (BMP/Wnt). Sonic Hedgehog est produit à partir de la plaque du plancher, la partie la plus ventrale du tube neural, et de la notochorde, une structure cartilagineuse formée à partir du mésoderme, située sous le tube neural. Le gradient BMP/Wnt est lui, produit au pôle dorsal, par l'ectoderme dorsal et la plaque du toit (Jessell, 2000; Ulloa and Martí, 2010). La concentration de ces signaux, servant à ventraliser ou à dorsaliser, contrôle l'expression de plusieurs facteurs de transcription sur l'axe dorso-ventral (Figure 4). Comme pour les rhombomères sur l'axe antéro-postérieur, les différentes combinaisons de ces facteurs spécifient des domaines singuliers sur l'axe dorso-ventral. Chaque domaine aura une combinaison unique de facteurs de transcription qui définira l'identité des progéniteurs neuronaux, qui, à leur tour, formeront un sous-type spécifique de neurones (Wurst and Bally-Cuif, 2001; Di Bonito and Studer, 2017).

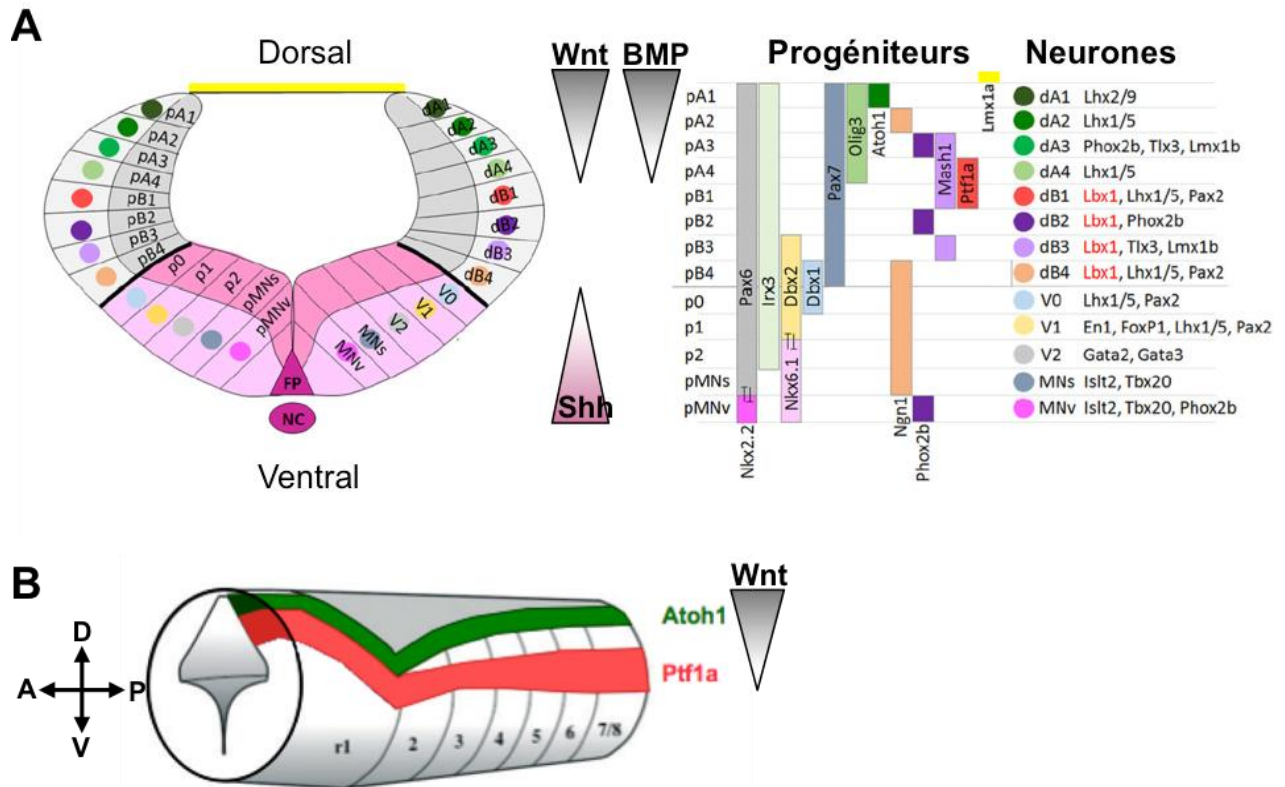


Figure 4: Spécification moléculaire des neurones du rhombencéphale selon l'axe dorso-ventral

(A) Schéma d'une coupe coronale du rhombencéphale montrant l'organisation dorso-ventrale d'un rhombomère. Chaque domaine est formé d'une zone de progéniteurs (interne) et d'une zone de dérivés (zone la plus latérale). Trois morphogènes contrôlent l'expression des facteurs de transcription le long de l'axe dorso-ventral : Wnt et BMP exprimés à partir de l'ectoderme dorsale et de la plaque du toit (en jaune), et Shh exprimé à partir de la notochorde (NC) et de la plaque du plancher (FP) (en rose). (B) Expression des facteurs de transcription Atoh1 et Ptf1a dans les différents rhombomères. Les domaines Atoh1 et Ptf1a sont séparés par un, deux ou trois domaines dans les rhombomères postérieurs (R2 à R7/8) mais sont directement en contact dans le rhombomère1. Adaptée de Di Bonito et Studer (2017) et Hoshino (2012).

I.2.3. Les plexus choroïdes

Au niveau du quatrième ventricule (IV^{ème} V), mais également des ventricules latéraux (Lat V) et du troisième ventricule (III^{ème} V), flottent les plexus choroïdes (ChP pour choroid plexus). Ces derniers sont des tissus spécialisés dans la production du fluide cérébro-spinal (CSF pour cerebro-spinal fluid). Ils constituent un épithélium, en continuité avec l'épendyme qui couvre les ventricules, formé de cellules connectées par des jonctions serrées entourant un tissu conjonctif hautement vascularisé. Ce tissu vascularisé, contrairement au reste des vaisseaux sanguins présents dans le cerveau, est fortement fenestré, laissant fuir les petites molécules et l'eau présentes dans le sang et nécessaires à la production du CSF (Redzic and

Segal, 2004). Sur le côté basal, vers la lumière du ventricule, les cellules des plexus choroïdes présentent des microvillosités qui favorisent la circulation du CSF (Figure 5A) (Lun et al., 2015).

La formation des plexus choroïdes débute peu après la fermeture tube neural. Une fois formé, et recouvert dorsalement par la plaque du toit, la lumière de ce tube s'étend pour former les différents ventricules : les deux ventricules latéraux au niveau de télencéphale, le troisième ventricule, au niveau du diencephale et le quatrième ventricule au niveau du rhombencéphale. Au niveau de ce dernier ventricule, la plaque du toit est tapissée par une couche pseudo-stratifiée de cellules épithéliales. Ces cellules vont subir, à partir de E9,5 une série, en quatre étapes, de changements morphologiques pour se transformer en épithélium de plexus choroïde mature, exprimant le marqueur Transthyrétine (Ttr), sans multiplication cellulaire (Sturrock, 1979; Dziegielewska et al., 2001). Suite à cette transformation, des cellules progénitrices, situées à la périphérie des plexus choroïdes, prennent le relais pour venir alimenter en cellules l'épithélium du plexus choroïde (Figure 5B). Ces cellules demeurent dans un état prolifératif de E12,5 jusqu'à un stade tardif du développement. Elles prolifèrent en réponse au mitogène Shh exprimé par les cellules adjacentes du plexus choroïde, déjà matures (Huang et al., 2009).

Les plexus choroïdes jouent un rôle crucial dans le développement embryonnaire du cerveau. Ils sécrètent dans le CSF des facteurs nécessaires au bon développement du cerveau tel que l'acide rétinoïque, les molécules Slit2, Slit3 et Sema3F, qui permettent de guider la migration des neurones, ou encore des molécules de la famille Fgf (Yamamoto et al., 1996; Gonzalez et al., 1995; Redzic et al., 2005). Cependant, bien que morphologiquement identiques, les quatre plexus choroïdes expriment et sécrètent une série de facteurs de signalisation différents au sein du CSF (Lun et al., 2015; Kaur et al., 2016). Chez l'adulte, les plexus choroïdes ont des rôles multiples tels que la protection et la régulation de l'environnement interne du cerveau via la barrière sang-CSF, la sécrétion et la modulation de la composition du CSF à travers l'activité des cellules épithéliales du plexus choroïde, ou encore l'élimination des déchets et des métabolites à travers la production continue de CFS et l'absorption de ce dernier vers la circulation périphérique.

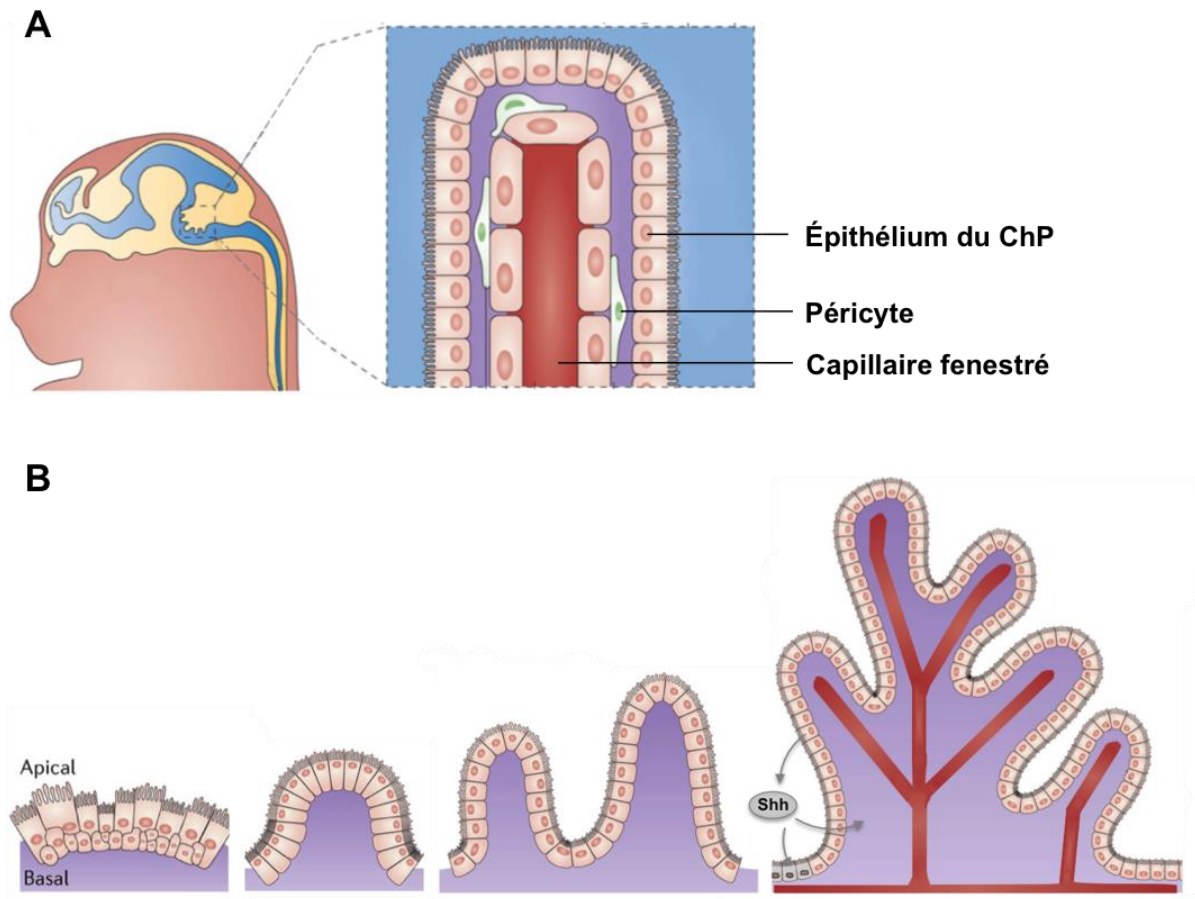


Figure 5: Les plexus choroïdes

(A) Schémas du plexus choroïde mature du quatrième ventricule. L'épithélium du plexus choroïde (ChP) entoure des capillaires sanguins hautement fenestrés permettant le passage de petites molécules nécessaires à la formation du liquide cérébro-spinal. Comme dans les autres tissus, des péricytes sont retrouvés autour des cellules endothéliales. (B) Maturation des plexus choroïdes en quatre étapes. Les cellules du ChP apparaissent d'abord en couche pseudo-stratifiée puis elles s'étalent pour former une monocouche. Par la suite, les cellules du ChP prennent une forme de plus en plus cubique et l'épithélium se replie sur lui-même formant des villosités. A la fin de la dernière étape, les ChP possèdent de nombreuses villosités et les cellules sont cubiques avec leur noyau dans la région basale. Les cellules matures sécrètent le mitogène Shh, permettant aux progéniteurs (cellules grises) de proliférer. Adapté de Lun et al (2015).

I.3. La lèvre rhombique

À la fin du XIX^{ème} siècle, Wilhelm His identifie une région hautement proliférative au niveau de l'épithélium dorsal qui entoure le quatrième ventricule chez les embryons humains de dix semaines. Il nomme cette zone germinative *rautenlippe* ou lèvre rhombique à cause de sa forme en losange autour du IV^{ème} ventricule, comme les lèvres d'une bouche ouverte (His, 1891 ;Ray and Dymecki, 2009). Anatomiquement, cette zone se divise en deux : la lèvre rhombique supérieure (URL pour upper rhombic lip) et la lèvre rhombique inférieure (LRL

pour *lower rhombic lip*). L'URL est la partie de la lèvre rhombique correspondant au rhombomère 1. Elle génère différents types neuronaux qui migreront, pour la très grande majorité, au niveau du cervelet (Machold and Fishell, 2005; Wang et al., 2005). La LRL se subdivise à son tour en deux domaines : le domaine recouvrant les rhombomères R2 à R5, qui va générer les cellules des noyaux cochléaires, et le domaine recouvrant les rhombomères R6 à R7/8 qui va générer les neurones des noyaux pré-cérébelleux (Figure 6) (Harkmark, 1954; Di Bonito and Studer, 2017; Rodriguez and Dymecki, 2000; Altman and Bayer, 1987a, 1987b, 1987c, 1987d; Farago et al., 2006). La définition claire de la lèvre rhombique le long de l'axe dorso-ventral est un peu plus floue. La vaste bibliographie sur le développement du cervelet définit la lèvre rhombique comme le domaine exprimant le facteur de transcription *Atoh1*, aussi connu sous le nom de *Math1* (mouse atonal homologue 1), à la limite de la plaque du toit qui elle est définie par l'expression du facteur de transcription *Lmx1a* (Helms and Johnson, 1998; Wingate, 2001; Wang et al., 2005). Cependant, dans les différentes publications sur les dérivés neuronaux des rhombomères R2 à R7/R8, la lèvre rhombique est cette fois définie comme la région exprimant le facteur sécrété *Wnt1*. Dans cette région, la partie exprimant *Atoh1* ne représente qu'un sous-domaine (Awatramani et al., 2003; Landsberg et al., 2005; Farago et al., 2006; Nichols and Bruce, 2006). Cette dernière définition englobe donc aussi le domaine *Lmx1a*, duquel va dériver le plexus choroïde du IV^{ème} V, mais également le domaine exprimant le facteur de transcription *Ptf1a* (pancreatic specific transcription factor 1a) (Figure 4B) (Hoshino et al., 2005). Cette définition ne peut correspondre à la définition de la lèvre rhombique dans le R1, puisque le domaine *Ptf1a* correspond à la seconde zone germinative, opposée à la lèvre rhombique. Nous définirons dans ces travaux la lèvre rhombique comme la région dorsale, exprimant fortement *Wnt1*, et dont les dérivés activeront le gène *Atoh1*.

Commençant à s'exprimer à E9,5 dans les dérivées de l'URL, le gène *Atoh1* marque d'abord un flux de cellules qui vont migrer vers l'avant, dans une région située entre le rhombencéphale et le mésencéphale (Machold and Fishell, 2005; Wang et al., 2005). Toutes les cellules *Atoh1* générées par la suite à partir de l'URL formeront le cervelet et seront détaillées plus amplement dans le chapitre sur le cervelet. Concernant la LRL, les cellules exprimant *Atoh1* provenant des rhombomères R2 à R5 vont migrer pour former la grande majorité du noyau cochléaire ventral et une partie du noyau cochléaire dorsal. En plus de former ces régions, la RL des rhombomères R2 et R3 vont également fournir les précurseurs de cellules granulaires (GCP pour *granular cell precursors*), semblables à ceux retrouvés dans le cervelet, qui après s'être différenciés formeront l'enveloppe granulaire du noyau cochléaire (Wang et al., 2005;

Farago et al., 2006; Nichols and Bruce, 2006; Fujiyama et al., 2009; Di Bonito and Studer, 2017). Les dérivés des rhombomères R6 à R8 exprimant *Atoh1* vont former les neurones à fibres moussues qui projettent dans le cervelet et qui sont présents dans quatre des cinq noyaux pré-cérébelleux : le noyau réticulaire latéral, le noyau cunéiforme, le noyau pontique basal et le noyau réticulaire du tegmentum (Wang et al., 2005). Contrairement à ces derniers, les neurones à fibres grimpantes, présents au niveau du noyau olivaire inférieur, ne dérivent pas du domaine *Atoh1*, mais des domaines *Wnt1* sous-jacents (Ray and Dymecki, 2009; Wang et al., 2005).

L'expression d'*Atoh1* est transitoire dans tous ces dérivés, qui arrêtent de produire ce facteur de transcription juste après avoir quitté la lèvre rhombique, à l'exception des précurseurs des cellules granulaires du cervelet et des noyaux cochléaires, qui eux, le maintiennent jusqu'à leur différenciation. Ainsi, les précurseurs granulaires sont les seuls à passer par un stade de prolifération après avoir quitté la lèvre rhombique et les seuls à maintenir l'expression du gène *Atoh1*. Ces caractéristiques avaient amené à suggérer que ce facteur de transcription était nécessaire à leur prolifération. En 2009, Flora et collègues en font la démonstration : grâce à l'utilisation de souris transgéniques, ces auteurs montrent que l'inhibition de l'expression du gène *Atoh1* dans les précurseurs granulaires favorise leur différenciation et empêche la mise en place de la réponse au mitogène *Shh*, principal inducteur de la prolifération des précurseurs granulaires du cervelet (Flora et al., 2009; Wechsler-Reya and Scott, 1999; Lewis et al., 2004).

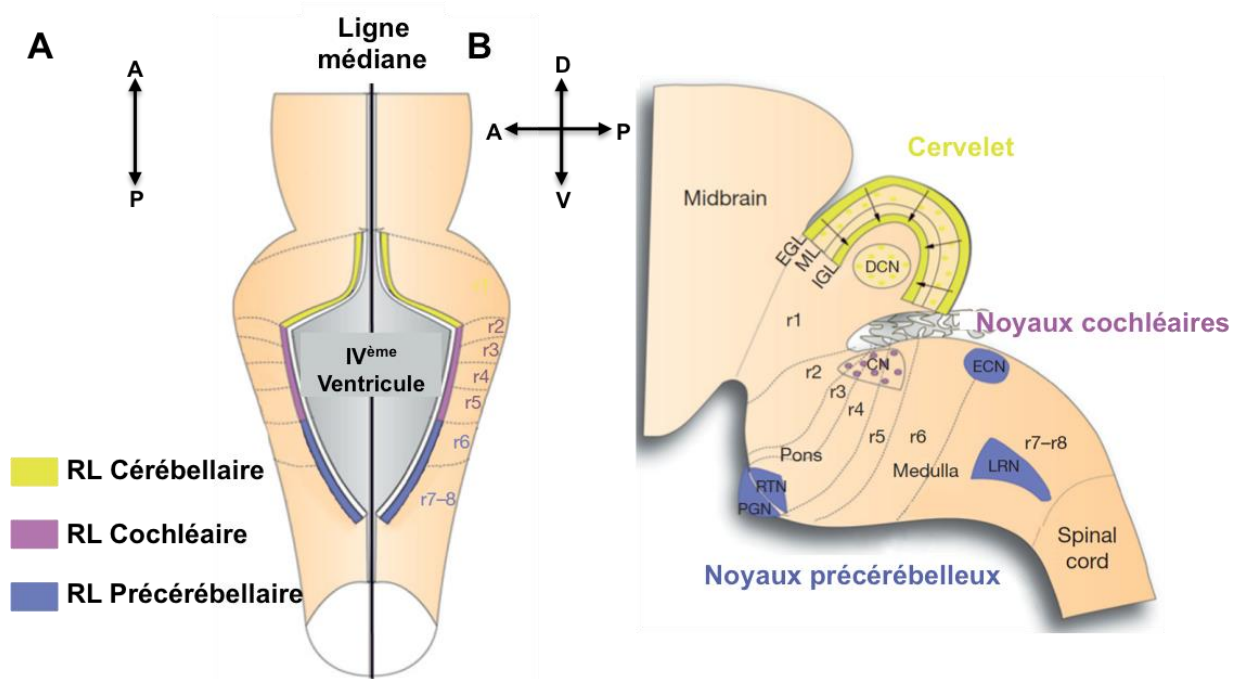


Figure 6: Subdivision de la lèvre rhombique et ses dérivés

(A) Subdivision de la lèvre rhombique tôt au cours du développement. Le domaine le plus dorsal du rhombocéphale correspond à la lèvre rhombique (RL) et se subdivise selon l'axe antéro-postérieur en trois régions : le domaine cérébelleux au niveau du rhombomère 1 (jaune), le domaine cochléaire du rhombomère 2 au rhombomère 5 (violet) et le domaine pré-cérébelleux du rhombomère 6 au rhombomère 7/8 (bleu). (B) Devenir des dérivés de la lèvre rhombique. La RL cérébelleuse va donner tous les neurones activateurs du cervelet, incluant les neurones qui vont migrer dans les noyaux profonds cérébelleux (DCN), les cellules unipolaires en brosse qui vont migrer dans la couche moléculaire (ML) et les précurseurs des cellules granulaires qui vont d'abord former la couche granulaire externe (EGL) avant de se différencier et de migrer dans la couche granulaire interne (IGL). La RL cochléaire formera différentes sous-populations de neurones des noyaux cochléaires, en plus des cellules granulaires. La RL pré-cérébelleuse va donner les neurones à fibres moussues de quatre des cinq noyaux pré-cérébelleux : le noyau réticulaire latéral (LRN), le noyau cunéiforme (ECN), le noyau pontique basal (PGN) et le noyau réticulaire du tegmentum (RTN). Adapté de Di Meglio et Rijli, *Cellular migration and formation of neuronal connections*, première édition, Chapitre 21.

Le rhombocéphale désigne le cerveau postérieur et regroupe, chez l'adulte, le cervelet, le pont et le bulbe rachidien qui vont assurer, ensemble, la plus grande partie des processus vitaux inconscients. Chez les vertébrés, son développement met en place un processus de segmentation le long de l'axe antéro-postérieur principalement contrôlé par l'expression des gènes Hox. Le long de l'axe dorso-ventral, le gradient des morphogènes Wnt, BMP et Shh subdivise le rhombocéphale en territoires exprimant des facteurs de transcription distincts. Ainsi la subdivision selon les deux axes va générer des domaines uniques à l'origine de précurseurs neuronaux différents. La lèvre rhombique est le territoire dorsal, situé juste en dessous de la plaque du toit, et est définie par la production de dérivés Atoh1. Un sous type de ces dérivés, les précurseurs de cellules granulaires, passe par une étape de prolifération intense avant de se différencier. Cette étape, extrêmement sensible à la tumorigenèse, permet au cervelet adulte de contenir à lui seul 50% des cellules du système nerveux central.

II. Le cervelet

Le cervelet, du latin « cerebellum » qui signifie petit cerveau, constitue la partie la plus antérieure du rhombencéphale et contient à lui seul plus de 50% des neurones du système nerveux central (Butts et al., 2013). Alors que le rôle du cervelet dans le contrôle de l'équilibre, la coordination fine des mouvements ou encore dans le réflexe vestibulo-oculaire est depuis longtemps connu, des études plus récentes ont révélé un rôle pour le cervelet dans un large éventail de fonctions cognitives incluant l'apprentissage du langage, la mémoire spatiale et les émotions (du Lac et al., 1995; Middleton and Strick, 1998; Boyden et al., 2004; Schmahmann and Caplan, 2006; Roussel and Hatten, 2011). La simplicité de son architecture fait du cervelet un modèle attractif pour l'étude du développement du CNS chez les mammifères mais également au cours de l'évolution. En effet, les caractéristiques basiques du cervelet sont présentes chez des espèces primitives comme la myxine et la lamproie (de la super-classe des Agnathes) qui possèdent une structure appelée « pseudo-cervelet » (cerebellum-like) (Larsell, 1947). Le pseudo-cervelet de ces espèces est, de par sa composition et son origine cellulaire, similaire à la couche moléculaire du cervelet des mammifères. Dans sa revue sur les similarités et les différences entre cervelet et pseudo-cervelet, Montgomery suggère que le pseudo-cervelet est l'ancêtre du cervelet. L'étude de ces deux structures dans la phylogénie amène à penser que le cervelet a développé une architecture bâtie selon une relation hiérarchique, où chaque module apparaissant au cours de l'évolution est venu ajouter de la complexité à la fonction fondamentale déjà existante (Butts et al., 2014; Montgomery et al., 2012). Par souci de clarté, nous nous focaliserons sur le cervelet des mammifères.

II.1. Organisation du cervelet adulte

II.1.1. Morphologie

Le cervelet des mammifères est caractérisé par un vermis central entouré de chaque côté par les paravermis. Plus latéralement, se trouvent les hémisphères qui, chez la souris, ont chacun la même taille que le vermis. Les paraflocculus et les flocculus sont des extensions latérales de ces hémisphères (Figure 7A) (Larsell, 1952; Sillitoe and Joyner, 2007; White and Sillitoe, 2013). Sur l'axe antéro-postérieur, le cervelet est subdivisé en lobes, eux-mêmes subdivisés en lobules. Cette subdivision diffère sur l'axe medio-latéral entre le vermis et les hémisphères. Même les paraflocculus et les flocculus ont leur propre foliation. Le cervelet adulte est divisé en 10 lobules primaires numérotés de I, le plus antérieur, à X le plus postérieur dans le vermis,

et seulement en 8 lobules dans les hémisphères. Chaque lobule primaire est ensuite divisé en lobules secondaires et tertiaires selon le niveau de foliation. Alors que la foliation primaire est très conservée chez les mammifères, les foliations secondaires et tertiaires sont très variables d'une espèce à l'autre. Même au sein d'une espèce, certaines différences existent. C'est le cas par exemple entre les souches murines C57/BL6 et FVB/N. Cette dernière possède une foliation secondaire sur le lobule VI, absente de la souche C57/BL6 (Figure 7C) (Inouye and Oda, 1980; Chizhikov and Millen, 2003).

En se basant sur la développement et les fonctions du cervelet, ce dernier peut être divisé en trois lobes, regroupant un ou plusieurs lobules, séparés par deux fissures, une fissure transversale « primaire » et une fissure ventrale « flocculo-nodulaire » (Figure 7B):

- Le lobe antérieur aussi appelé le paléo-cervelet (lobules I-V), impliqué dans le tonus musculaire et la coordination des extrémités.
- Le lobe postérieur ou néo-cervelet (lobules VI-IX), phylogénétiquement la portion la plus récente, impliqué dans les mouvements conscients et volontaires.
- Le lobe flocculo-nodulaire ou archéo-cervelet (lobules X), phylogénétiquement la portion la plus ancienne, impliqué dans l'équilibre. En réalité, sa principale fonction est de réguler le système vestibulaire (situé dans l'oreille interne), et plus principalement de permettre l'adaptation dans les cas où ce système est endommagé.

Les rôles différents de ces lobes résultent principalement de connections afférentes distinctes. En effet le lobe antérieur est principalement connecté à la moelle épinière, le lobe postérieur à la moelle épinière et aux centres visuels et auditifs, alors que le lobe flocculo-nodulaire est relié à l'oreille interne via les canaux semi-circulaires et les noyaux vestibulaires (Sillitoe and Joyner, 2007).

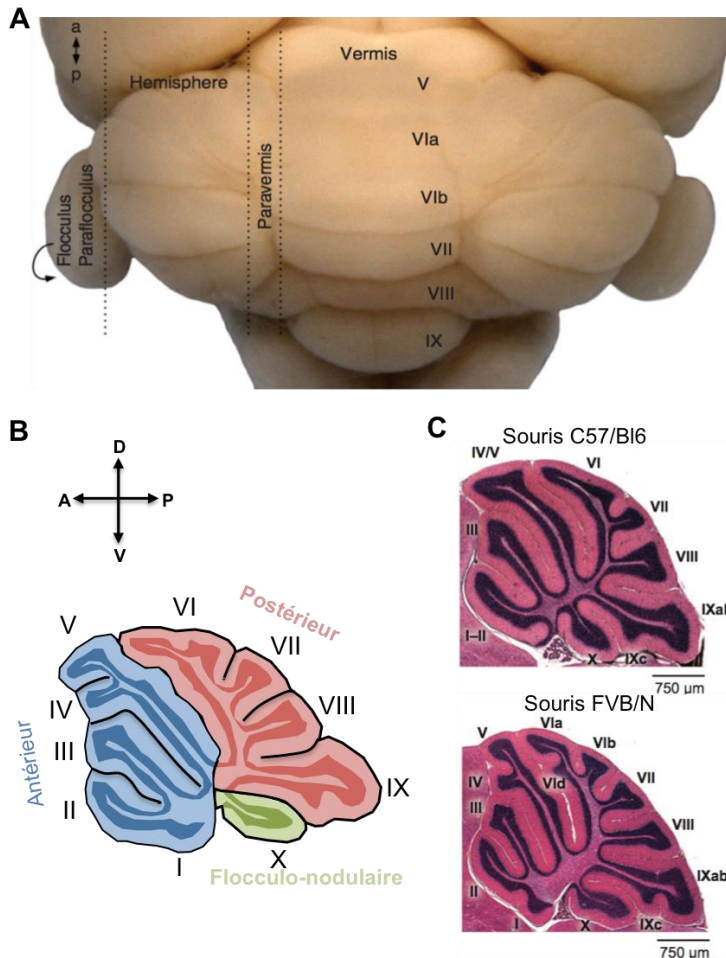


Figure 7: Morphologie du cervelet

(A) Vue dorsale d'un cervelet de souris adulte. Sur l'axe médio-latéral, il se subdivise en vermis, paravermis, hémisphères, paraflocculus et flocculus. (B) Subdivision phylogénétique du cervelet. Le cervelet se divise en trois lobes : le lobe antérieur, du lobule I à V, le lobe postérieur du lobule VI à IX et le lobe flocculo-nodulaire qui contient le lobule X. (C) La foliation en dix lobules est présente chez tous les mammifères, cependant la foliation secondaire et tertiaire diffère entre les espèces et au sein d'une même espèce, comme par exemple entre les souches de souris C57/bl6 et FVB/N. Cette dernière présente une foliation secondaire supplémentaire au niveau du lobule VI. Adapté de Silitoe et Joyner (2007)

II.1.2. Histologie

Sur le plan histologique le cervelet est extrêmement simple et, contrairement aux autres structures du CNS, contient relativement peu de types neuronaux. Ces derniers sont retrouvés dans le cortex cérébelleux entourant la matière blanche. Le cortex est divisé en trois couches comprenant chacune des types neuronaux distincts : la couche moléculaire (ML pour molecular layer), la monocouche des cellules de Purkinje (PL pour Purkinje layer) et la couche granulaire interne (IGL pour internal granular layer) (Figure 8A). En plus de ce cortex, le cervelet est aussi constitué des neurones des noyaux cérébelleux profonds situés dans la matière blanche.

II.1.2.a. La couche moléculaire

La couche moléculaire est la couche la plus externe du cortex, située juste en dessous de la pie-mère. Elle contient les cellules en étoile et les cellules à corbeille (Figure 8B) (Sultan and Bower, 1998; Lainé and Axelrad, 1998).

II.1.2.b. La monocouche des cellules de Purkinje

La couche des cellules de Purkinje se situe entre la couche moléculaire et la couche granulaire interne. Elle contient, comme son nom l'indique, les corps cellulaires des cellules de Purkinje empilés comme des dominos les uns devant les autres sur une seule monocouche. En plus d'un corps cellulaire très volumineux, d'environ 20 μ m, ces cellules sont caractérisées par leur arbre dendritique très élaboré qui projette dans la couche moléculaire. Dans cette monocouche, on retrouve également les corps cellulaires des cellules en chandelier et des neurones de la glie de Bergmann (Figure 8B) (Lainé and Axelrad, 1994; Voogd and Glickstein, 1998).

II.1.2.c. La couche granulaire interne

La couche granulaire interne est la couche la plus interne du cortex, directement au contact de la substance blanche. Elle est principalement composée des cellules granulaires (GC pour granular cell). Ces dernières, dotées d'un petit corps cellulaire rond d'environ 5 μ m, constituent une population très dense au point d'être le type cellulaire le plus abondant du cervelet et du CNS en général. Dans l'IGL, on trouve également les cellules de Lugaro, les cellules de Golgi et les cellules unipolaires en brosse (UBC pour unipolar brush cell) (Figure 8B) (Voogd and Glickstein, 1998; Mugnaini et al., 1997; Lainé and Axelrad, 2002; Mugnaini et al., 2011).

II.1.2.d. Les noyaux cérébelleux profonds

Les noyaux cérébelleux profonds sont intégrés dans la substance blanche. Ils sont au nombre de quatre (noyau dentelé, noyau emboliforme, globule et noyau fastigial) pairs et symétriques par rapport à la ligne médiane du cervelet. Chez certains mammifères, incluant l'homme et la souris, il n'y a pas de distinction entre le noyau emboliforme et le globule qui sont fusionnés en un noyau nommé noyau interposé. Ainsi chez la souris les trois paires de noyaux dentelés, interposés et fastigiaux sont respectivement situées dans les hémisphères, les paravermis et le vermis (Voogd and Glickstein, 1998; Fink et al., 2006; Habas, 2010).

II.1.3. Connectivité

Les différentes cellules du cervelet sont connectées entre elles, mais également à d'autres structures du système nerveux. Cela forme le réseau de connexions du cervelet. Les neurones peuvent être divisés en deux classes : ceux qui utilisent l'acide gamma-amino-

butyrique (GABA) comme principal neurotransmetteur, exerçant donc une action inhibitrice, et ceux qui utilisent le glutamate, qui exercent une action activatrice. La majorité des neurones du cervelet sont GABAergiques (inhibiteurs) à l'exception des GC, des UBC et de certains neurones des noyaux cérébelleux profonds qui sont glutamatergiques (activateurs) (Hashimoto and Hibi, 2012; Hibi et al., 2017). Le type cellulaire central du circuit cérébelleux est la cellule de Purkinje (inhibitrice). Elle projette, d'une part, un arbre dendritique dans la couche moléculaire qui s'étend sur 300 à 400 μm et qui est perpendiculaire aux fibres parallèles (ou en T) des GC, et d'autre part un axone sur les cellules des noyaux profonds (Palay and Chan-Palay, 1976). Elle reçoit des signaux activateurs des GC et des signaux inhibiteurs des cellules en étoile et des cellules à corbeilles qui projettent toutes dans la couche moléculaire. L'intégration de ces signaux permet aux cellules de Purkinje de transmettre une réponse appropriée aux informations sensorielles, reçues par le cervelet, via leur projection axonale dans les noyaux profonds, qui eux communiquent avec la moelle épinière et le reste du cerveau. Ces informations sensorielles proviennent du système pré-cérébelleux par deux voies principales : les fibres moussues et les fibres grimpantes (Palay and Chan-Palay, 1976). Chaque cellule de Purkinje est innervée par une seule fibre grimpante originaire de l'olive inférieure mais une fibre grimpante possède des centaines de synapses et peut innover plusieurs cellules de Purkinje. Elle peut aussi projeter dans les noyaux profonds. Contrairement aux fibres grimpantes, les fibres moussues sont originaires de plusieurs noyaux pré-cérébelleux et excitent les noyaux profonds, les GC, les UBC et les cellules de Golgi (Figure 8B). En résumé, le cervelet reçoit comme afférences, des informations sensorielles relayées par les noyaux pré-cérébelleux et répond grâce aux cellules de Purkinje qui projettent leur axone dans les noyaux profonds, voie efférente du cervelet (Cerminara et al., 2015).

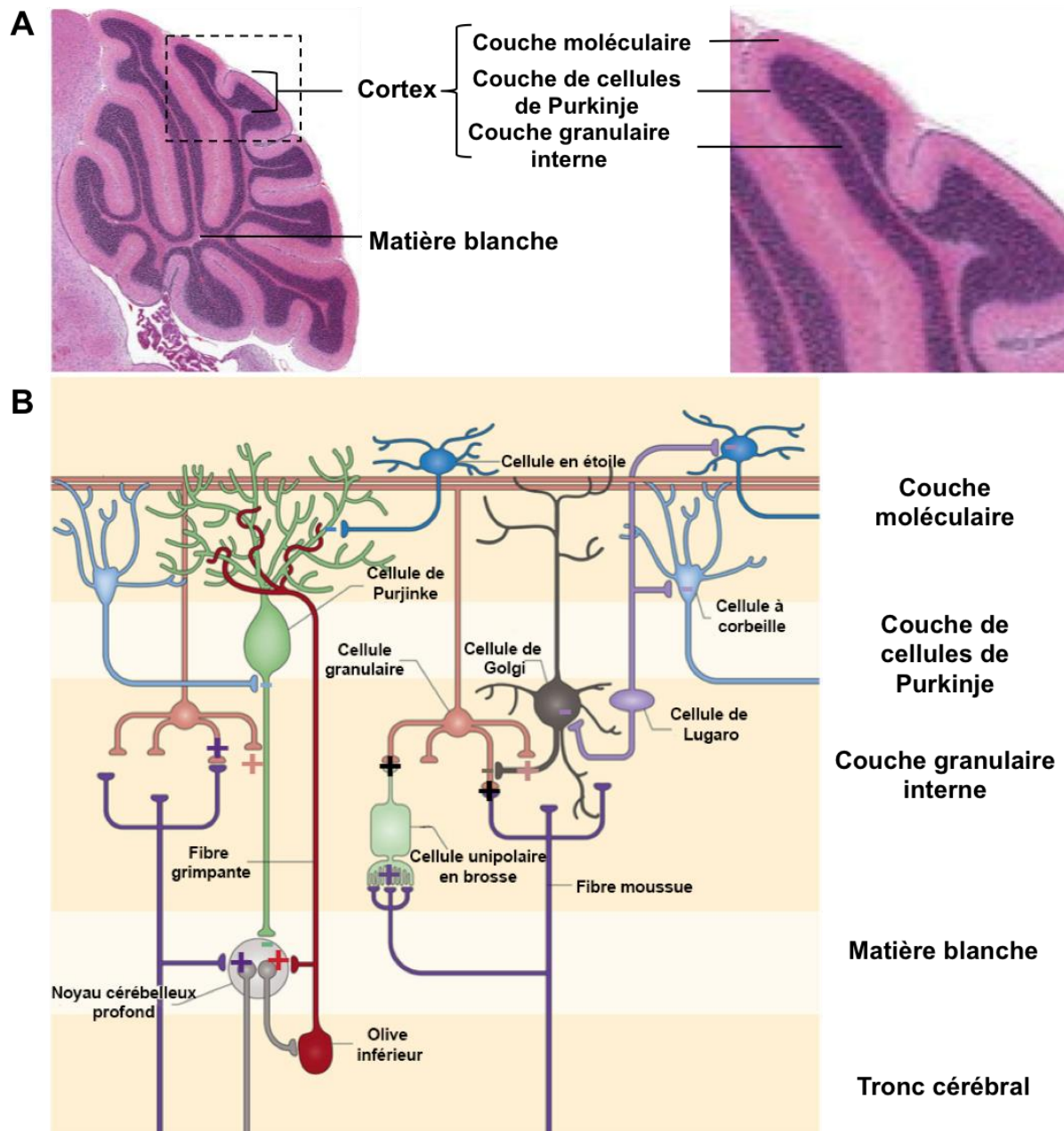


Figure 8: Organisation cellulaire du cervelet et sa connectivité

(A) Coupe sagittale au niveau de la ligne médiane (vermis) du cervelet de souris. Le cervelet est composé de trois couches cellulaires recouvrant la matière blanche : la couche moléculaire, la couche de cellules de Purkinje et la couche granulaire interne. (B) Schéma représentant le microcircuit du cervelet. Les différents types cellulaires du cervelet sont connectés entre eux et transmettent des signaux via l'acide GABAergique (inhibiteur, -) et le glutamate (activateur, +). Le cervelet communique avec le reste du système nerveux par la voie efférente des noyaux profonds cérébelleux et par les voies afférentes des noyaux pré-cérébelleux qui projettent des fibres mousseuses et grimpantes dans le cervelet. Adapté de Cerminara et al. (2015).

II.2. Le développement du cervelet

Alors que la morphologie du cervelet adulte a été bien comprise au cours du dernier siècle (Ramon y Cajal, 1911), les mécanismes moléculaires qui conduisent au développement du cervelet n'ont commencé à être élucidés que plus récemment. L'analyse d'organismes modèles comme le poulet et la souris, alliée au développement de technologies génétiques permettant de cartographier le destin cellulaire, ont permis de clarifier la relation entre les populations de cellules différenciées et les progéniteurs neuronaux.

II.2.1. Mise en place du territoire présomptif du cervelet

Les études embryologiques de chimères caille-poulet basées sur la greffe de régions morphologiques du tube neural avaient suggéré que le cervelet recevait une contribution à la fois du mésencéphale et du métencéphale (Alvarez Otero et al., 1993; Hallonet and Le Douarin, 1993). Par la suite, d'autres expériences de transplantation utilisant des marqueurs moléculaires et des expériences de lignage dans des embryons de souris ont démontré que le cervelet dérive entièrement du rhombomère 1 (Wingate and Hatten, 1999; Zervas et al., 2004).

II.2.1.a. Limite antérieure

Le développement du cervelet commence très tôt, à E8,5 chez la souris, quand la frontière mésencéphale-rhombencéphale se met en place établissant la limite antérieure du territoire présomptif du cervelet. Cette frontière est déterminée par la limite d'expression des gènes *Otx2* et *Gbx2*, exprimés respectivement dans le CNS antérieur et dans le rhombencéphale, et qui se répriment mutuellement (Figure 9) (Broccoli et al., 1999; Liu and Joyner, 2001). Dès lors, au niveau de la frontière mésencéphale-rhombencéphale, apparaît un centre de signalisation transitoire appelé organisateur isthmique (IsO pour *isthmus organizer*) (Nakamura et al., 2008). Le principal médiateur de l'IsO est la molécule sécrétée Fgf8 (fibroblast growth factor 8) qui est indispensable au maintien de la frontière mésencéphale-rhombencéphale et du territoire cérébelleux. En effet des expériences de gain de fonction dans des embryons de poulet et de souris ont révélé que l'expression ectopique de Fgf8 dans le diencéphale ou le mésencéphale induit une diminution de l'expression d'*Otx2* et la formation d'un tissu similaire au métencéphale dont la structure ressemble fortement à celle du cervelet (Crossley et al., 1996; Martinez et al., 1999). De plus l'inactivation de Fgf8 conduit à la perte du cervelet et à une extension postérieure d'*Otx2* dans le R1 (Meyers et al., 1998; Chi et al., 2003). Cette expérience démontre que Fgf8 est requis pour induire la formation du cervelet, mais pas de manière directe,

puisque chez le poisson-zèbre, la répression du gène *Otx2* dans le rhombencéphale des mutants *Fgf8* est suffisante pour sauver le phénotype « sans cervelet » (Foucher et al., 2006). La capacité de *Fgf8* à induire différentes structures ne dépend pas seulement de la force de son signal mais également de sa durée. Par exemple, une expression transitoire de *Fgf8* entre E8,5 et E10 est suffisante pour induire la formation des hémisphères du cervelet mais pas la formation du vermis (Figure 9B) (Sato and Joyner, 2009).

Plusieurs autres gènes sont impliqués dans le développement et le maintien du territoire cérébelleux, comme *Wnt1* et le gène *Lmx1b* codant un facteur de transcription à homéodomaine de type LIM. Ce dernier est exprimé dans le domaine d'expression d'*Otx2* le plus postérieur, juste antérieurement à *Fgf8*. Les cellules *Lmx1b* positives inhibent *Fgf8* et activent la sécrétion de la molécule *Wnt1* qui va, elle, induire l'expression de *Fgf8* dans les cellules adjacentes. Cette boucle de régulation est complétée par la régulation positive de *Lmx1b* par la molécule sécrétée *Fgf8*. Tout comme pour le mutant *Fgf8*, la perte de *Wnt1* a pour conséquence une délétion du territoire cérébelleux (Thomas and Capecchi, 1990). Ainsi l'activité des gènes *Gbx2*, *Fgf8* et *Wnt1* induit le développement du cervelet à partir du rhombomère r1, alors que l'activité des gènes *Otx2* et *Lmx1b* le réprime.

II.2.1.b. Limite postérieure

La limite postérieure du territoire cérébelleux correspond à la frontière r1/r2, marquée par la limite antérieure du domaine d'expression du gène *Hoxa2* (Figure 9A) (Eddison et al., 2004). Cette frontière est importante pour la définition du domaine du cervelet puisqu'une mutation de *Hoxa2* entraîne une extension postérieure du cervelet (Gavalas et al., 1997).

En résumé, le cervelet émerge du rhombomère 1, une région délimitée antérieurement par l'expression du gène *Otx2*, postérieurement par celle du gène *Hoxa2* et qui exprime *Gbx2*. Entre E9,5 et E12,5, le rhombomère 1 va subir une rotation de presque 90° convertissant l'axe antéro-postérieur en un axe médio-latéral (Figure 9C). La partie médiale de l'axe (anciennement la plus antérieure de r1) formera le vermis et la partie latérale formera les hémisphères (Sgaier et al., 2005). La délimitation dorso-ventrale du territoire présomptif est, comparée à la délimitation antéro-postérieure, moins bien comprise du point de vue moléculaire. Cependant, des expériences de transplantation caille-poulet ont permis de déterminer que le cervelet dérive de la partie dorsale de r1 (Figure 9A) (Hallonet and Le Douarin, 1993).

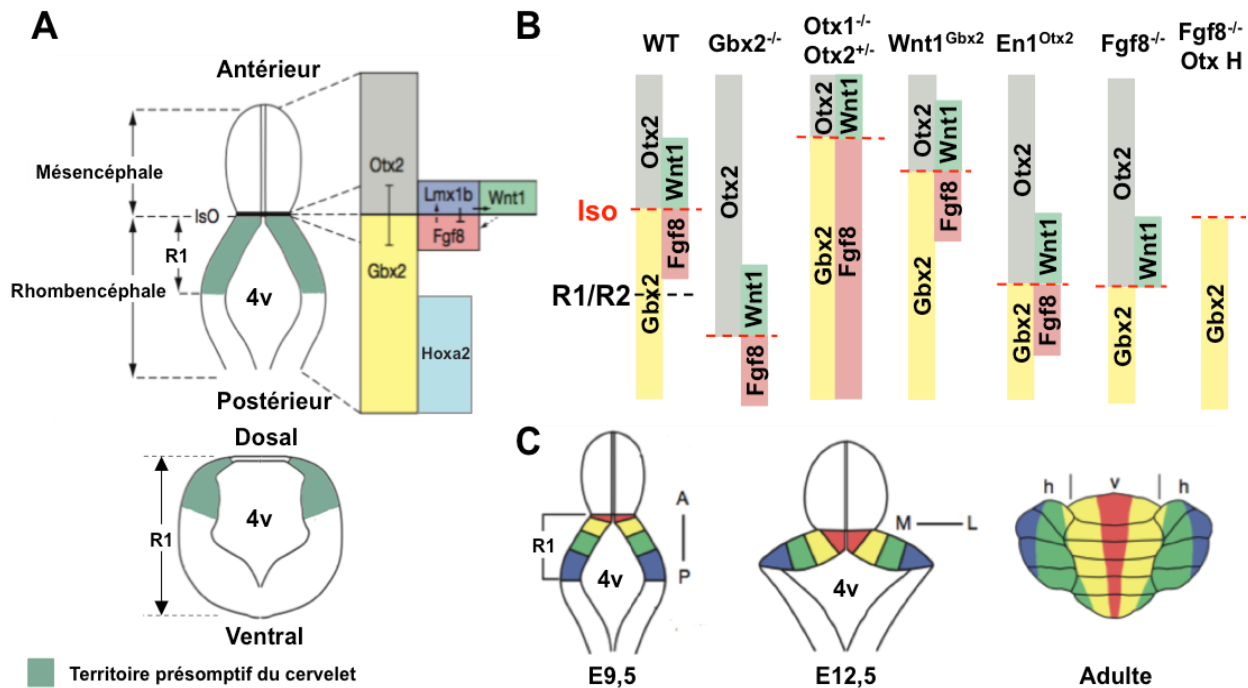


Figure 9: Définition du territoire présomptif du cervelet

(A) Schéma en vue dorsale (panel du haut) et coronale (panel du bas) d'un embryon. La zone verte représente le territoire présomptif du cervelet, exprimant *Gbx2* et juxtaposée entre les domaines d'expression des gènes *Otx2* et *Hoxa2*. (B) Schéma d'expression d'*Otx2*, *Gbx2*, *Wnt1* et *Fgf8* dans différents mutants. En rouge, la position de l'IsO dépend de l'expression de ces gènes et redéfinit le territoire présomptif du cervelet. (C) Entre E9,5 et E12,5, le rhombomère 1 va subir une rotation latérale de 90°. La région la plus antérieure donnera le vermis et les paravermis (rouge et jaune) et la région postérieure donnera les hémisphères, les paraflocculi et les flocculi (vert et bleu). 4v : quatrième ventricule, Iso : organisateur isthmique, h : hémisphère, v : vermis. Adapté de Chizhikov et Millen, *Patterning and cell type specification in the developing CNS and PNS*, première édition, chapitre 22.

II.2.2. Les zones germinatives

Une fois le territoire cérébelleux établi, deux zones germinatives, distinctes au plan anatomique et moléculaire, se forment : la zone ventriculaire et la lèvre rhombique, à partir desquelles vont dériver tous les neurones et toutes les cellules gliales du cervelet (Figure 10).

II.2.2.a. La zone ventriculaire

La zone ventriculaire (VZ pour ventricular zone) est localisée le long du revêtement dorsal du 4^{ème} ventricule. Elle donne naissance à tous les neurones GABAergiques (inhibiteurs) et est caractérisée par l'expression du facteur de transcription *Ptf1a* (Hoshino et al., 2005). Ce dernier est indispensable à la spécification de ces neurones puisque sa délétion conduit à la

perte totale des neurones GABAergiques, devenus glutamatergiques (Pascual et al., 2007). A l'inverse, son expression ectopique dans la lèvre rhombique conduit à la production de neurones GABAergiques (Yamada et al., 2014). Chez la souris, les cellules de Purkinje naissent entre E10,5 et E13,5, les neurones GABAergiques des noyaux profonds cérébelleux entre E10,5 et E11,5 et les cellules de Golgi apparaissent approximativement entre E13,5 et la naissance (Hallonet and Le Douarin, 1993). Une seconde vague de production de cellules neuronales, incluant les cellules à corbeille et en étoile, a lieu un peu plus tard avec un pic autour de la naissance (Figure 10) (Yamada et al., 2014). Une fois les mitoses de leurs précurseurs finies, les cellules de Purkinje migrent radialement le long des fibres gliales vers la surface. Initialement, les cellules de Purkinje sont disposées sur plusieurs couches, et n'adopteront la disposition en monocouche qu'après la naissance (Xu et al., 2013). Tout comme les cellules de Purkinje, tous les neurones dérivés de précurseurs de la ZV migrent radialement, à partir de celle-ci, dans le primordium du cervelet situé juste au-dessus.

II.2.2.b. La lèvre rhombique

La seconde zone germinative du cervelet est la portion de la lèvre rhombique contenue dans le rhombomère 1, aussi appelée lèvre rhombique supérieure (URL) (Machold and Fishell, 2009). Elle exprime le facteur de transcription *Atoh1*. Pendant longtemps on a pensé qu'elle n'était à l'origine que des cellules granulaires (Altman and Bayer, 1978). On sait aujourd'hui que des neurones des noyaux profonds et les UBC dérivent également de l'URL (Mugnaini et al., 2011). Chez la souris, les premières cellules du cervelet à dériver de l'URL, entre E10,5 et E12,5, sont les neurones glutamatergiques des noyaux profonds cérébelleux, qui vont migrer tangentiellement le long de la surface avant de migrer radialement pour rejoindre leur position finale. A partir de E12,5 et jusqu'à E17, les GCP naissent et suivent la même migration tangentielle pour créer la couche granulaire externe (EGL pour external granular layer). Récemment, une étude a démontré qu'il existe une sous-population de GCP n'exprimant pas *Atoh1*, représentant entre 3 et 5% des GCP totaux, qui ne dérive pas de l'URL mais plutôt de la zone ventriculaire (Li et al., 2013). Les caractéristiques de cette sous-population, exprimant le marqueur Nestin, sont encore très mal comprises, c'est pourquoi nous définirons ici les GCP comme la population dérivée de la lèvre rhombique et définie par le marqueur *Atoh1*. La troisième population cellulaire qui dérive de l'URL constitue les UBC qui naissent à partir de E13,5 avec un pic de production entre E15,5 et E17,5 (Figure 10) (Ben-Arie et al., 1997; Machold and Fishell, 2005; Fink et al., 2006). Ainsi l'URL donne naissance à toutes les cellules excitatrices du cervelet. Elles expriment toutes *Atoh1* et l'éteignent quand elles migrent à

l'exception des GCP qui le maintiennent dans l'EGL jusqu'à leur différenciation. Tout comme pour *Ptf1a*, des expériences ont montré que le KO de *Atoh1* conduit à la perte des cellules glutamatergiques du cervelet (Wang and Zoghbi, 2001; Machold and Fishell, 2005). De plus, l'expression ectopique de *Atoh1* dans la zone ventriculaire conduit à la production de cellules glutamatergiques à partir de celle-ci suggérant que, comme pour *Ptf1a* et les neurones GABAergiques, l'expression de *Atoh1* est nécessaire et indispensable à la production des neurones glutamatergiques (Yamada et al., 2014).

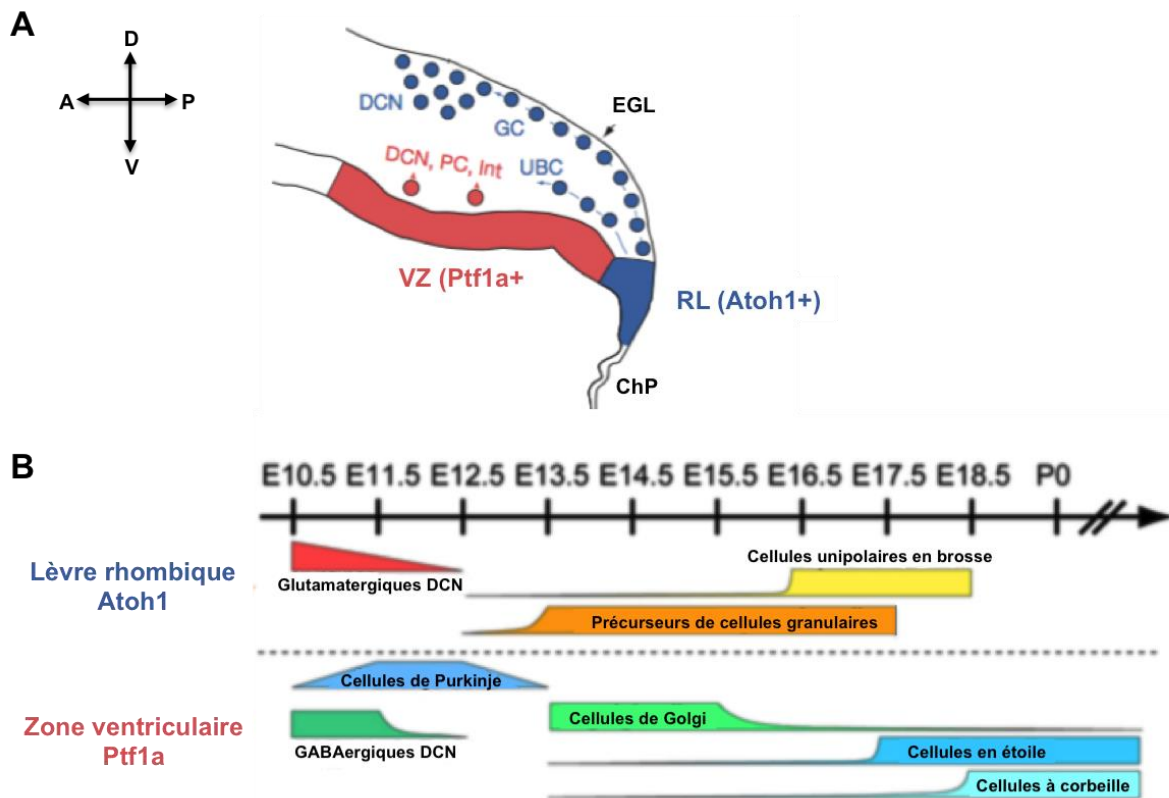


Figure 10: Les zones germinatives du cervelet

(A) La zone ventriculaire (en rose) et la lèvre rhombique (en bleu) sont à l'origine de toutes les cellules du cervelet qui naissent à partir de E10,5 et jusqu'à après la naissance (B) Calendrier temporel de la neurogenèse des différents types neuronaux du cervelet à partir de la lèvre rhombique et de la zone ventriculaire. ChP : plexus choroïde, DCN : noyaux profonds cérébelleux, RL : lèvre rhombique, VZ : zone ventriculaire. Adapté de Chizhikov et Millen, *Patterning and cell type specification in the developing CNS and PNS*, première édition, chapitre 22 et de Yamada et al. (2014).

II.3. Les précurseurs des cellules granulaires

II.3.1. La couche de cellules granulaires externes

Entre E12,5 et E17, les précurseurs des cellules granulaires quittent la lèvre rhombique pour migrer tangentiellement à la surface du primordium du cervelet, pour former la couche granulaire externe (Wingate, 2001). Le lignage des cellules *Atoh1* a permis de déduire que l'EGL présente une organisation chronotopique selon l'axe antéro-postérieur, où les premiers dérivés qui quittent la RL occupent sa partie antérieure et les derniers, sa partie postérieure (Machold and Fishell, 2005). Les molécules contrôlant la migration tangentielle des précurseurs incluent des facteurs attractifs et répulsifs permettant de garder les précurseurs à la surface de l'EGL et de les orienter vers l'antérieur. L'exemple de *Cxcl12* (C-X-C motif chemokine ligand 12) est l'un des plus connus : des études *in vitro* ont montré que cette chimiokine exprimée par les méninges attire les précurseurs, qui eux expriment le récepteur *Cxcr4* (CXC-receptor 4) (Zhu et al., 2004). Les Slits sont un autre groupe de molécules de guidage exprimées par la lèvre rhombique. Quand les précurseurs des cellules granulaires quittent la lèvre rhombique, ils commencent à exprimer *Robo2* (Roundabout guidance receptor 2) sur lequel Slit a un effet répulsif. Ainsi, les GCP auront tendance à s'éloigner de la lèvre rhombique (Gilthorpe et al., 2002). L'expression de différents récepteurs et la présence de molécules soit attractives soit répulsives permettent aux GCP de se positionner dans l'EGL. Cette dernière est une zone germinative secondaire, qui va subir une intense prolifération autour de la naissance, à l'origine de l'extrême abondance des cellules granulaires. Cette zone germinative commence à disparaître à partir de E18 pour ne plus du tout exister à la fin de la seconde semaine postnatale. Ainsi l'EGL est définie par un caractère transitoire et prolifératif (Flora et al., 2009). Dans sa première description de cervelet, Ramon y Cajal avait été capable de distinguer un EGL supérieur qui contenait les précurseurs en prolifération et un EGL inférieur comprenant les précurseurs qui avaient terminé leur division et commencé le processus de différenciation et de migration vers la couche granulaire interne (Ramón y Cajal and Azoulay, 1894). Dans cette même étude, Ramon y Cajal définit le processus qui a lieu dans l'EGL comme l'étape clé du développement du cervelet chez les mammifères et les oiseaux, et où l'EGL est une zone germinative transitoire permettant aux précurseurs qui dérivent de la lèvre rhombique de proliférer pour générer la plus grande population de neurones présente dans le CNS que sont les cellules granulaires. Une étude plus récente a cependant démontré que la structure de l'EGL n'est pas indispensable puisque chez certaines espèces, comme le requin, les précurseurs prolifèrent après avoir quitté la lèvre rhombique sans passer par la formation d'une structure

transitoire (Chaplin et al., 2010). Dans cette étude, Chaplin conclut que l'EGL est une adaptation évolutive chez les amniotes qui permet de générer en un laps de temps très court, un nombre de cellules très élevé.

II.3.2. La prolifération des GCP

L'activité proliférative qui a lieu dans l'EGL est responsable de l'extraordinaire croissance du cervelet et permet d'aboutir à la production d'environ 100 millions de cellules granulaires chez la souris et de 80 milliards chez l'homme (Fujita et al., 1966; Butts et al., 2011). Ce processus est fondamental pour la formation d'un cervelet de taille normale. Une diminution du nombre de cellules granulaires conduit à un cervelet atrophié et à un défaut de foliation. A l'inverse une sur-prolifération anormale des précurseurs est à la base de la formation de tumeurs appelées médulloblastomes. Une analyse clonale menée par Espinosa et Luo a révélé que chaque précurseur granulaire donnait en moyenne 250 neurones, avec des variations, certains pouvant en donner jusqu'à 4000 (Espinosa and Luo, 2008). La division des précurseurs commence dès qu'ils se sont positionnés dans l'EGL et se poursuit jusqu'à la seconde semaine postnatale, avec un pic entre les jours postnataux (P) 4 et 8. De nombreuses études ont démontré que l'étape d'expansion clonale, qui passe principalement par des divisions symétriques, n'est pas homogène le long de l'EGL. Marino *et al.* ont mis en évidence que certaines cellules avaient un cycle cellulaire rapide alors que d'autres ont un cycle beaucoup plus lent. Puis Espinosa et Luo ont démontré une corrélation entre le fait que les précurseurs soient dans leur dernier cycle de division et la durée de ce cycle : lors de leur dernière division, les précurseurs ont un cycle plus rapide (Marino et al., 2003; Espinosa and Luo, 2008).

Les mécanismes moléculaires contrôlant la prolifération des GCP ont été bien caractérisés, en partie grâce à la possibilité de les maintenir en culture. Ils impliquent des facteurs intrinsèques et extrinsèques.

II.3.2.a. Les facteurs extrinsèques contrôlant la prolifération des GCP

Durant la période périnatale, de multiples voies de signalisation contrôlent la prolifération intense des GCP. Le mitogène Shh, produit par les PC, est le moteur principal de cette amplification. Une seconde voie de signalisation, la voie Notch, est également nécessaire à cette amplification. Les GCP expriment le récepteur Notch2 qui reconnaît la molécule sécrétée Jagged 1. *In vitro*, la présence de ce ligand en quantité élevée inhibe la différenciation des GCP via la surexpression du facteur de transcription Hes1, et leur prolifération est augmentée de 3 à 5 fois. De plus, des études génétiques ont démontré qu'un des mécanismes

d'action de la voie Notch est de contrecarrer la voie de signalisation BMP, connue pour favoriser la différenciation, et de réguler positivement l'expression d'*Atoh1* (Zhao et al., 2008; Machold et al., 2007). Cependant, le fait que la réduction du signal Shh conduise à une régulation négative de la voie Notch, et que l'expression de *Hes1* soit induite par la voie Shh, suggèrent que la voie de signalisation Notch est également, en partie, sous le contrôle de la voie Sonic hedgehog (Dakubo et al., 2006).

Le gène Hedgehog (Hh) a été découvert en 1980 par Nüsslein-Volhard et Wieschaus suite à des analyses menées sur la drosophile (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Au début des années 90, trois gènes homologues de Hh ont été découverts chez les vertébrés : Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog et Desert Hedgehog. Shh est le plus puissant de ces ligands et le plus largement exprimé à la fois durant le développement et dans les tissus adultes (Roelink et al., 1994; Kawahira et al., 2003; Ingham and McMahon, 2001).

Une fois sécrété, Shh se lie et inactive la protéine transmembranaire Patched1 (Ptch1) qui, en temps normal, inhibe l'activité de la protéine transmembranaire Smoothed (Smo). En présence du ligand Shh, l'inhibition de Smo par Ptch1 dans le cil primaire, qui concentre les principaux composants de la voie Shh, est abolie et conduit à l'activation des facteurs de transcription Gli. Chez les vertébrés, il existe 3 membres de la famille Gli : Gli1, Gli2 et Gli3. Contrairement à Gli1, qui joue un rôle uniquement activateur, Gli2 et Gli3 agissent soit comme activateurs (Gli-A) soit comme répresseurs (Gli-R). En absence de Shh, Sufu (Suppressor of Fused) régule négativement la voie en se liant à Gli2 et Gli3. Cette séquestration permet deux processus : la dégradation de Gli2 et le clivage de Gli3 rendant ce dernier répresseur (Gli3R). Gli3R se libère de Sufu et peut alors être transporté dans le noyau pour inhiber l'expression des gènes cibles. En présence de Shh, Smo recrute le complexe Sufu-Gli dans le cil puis libère les Gli convertis en Gli-A. Une fois libérés, les Gli peuvent entrer dans le noyau afin de réguler l'expression des gènes cibles de la voie Shh et en particulier activer l'expression de Gli1 (Figure 11) (Varjosalo and Taipale, 2008; Cheng and Bishop, 2002; Sasaki et al., 1999; Amakye et al., 2013).

Tôt au cours du développement du cervelet, Shh est sécrété par les cellules du plexus choroïde et transporté par le fluide cérébrospinal. Il est indispensable à la génération des précurseurs GABAergiques dérivant de la zone ventriculaire. Par ailleurs, des observations faites dans des mutants murins naturels, ont conduit à la découverte de la sécrétion de Shh par les cellules de Purkinje à partir de E17,5 et de sa nécessité pour la prolifération des GCP. En

effet chez les mutants *lurcher* (gain de fonction de GluRA2), *staggerer* (perte de la fonction de RORalpha) et *reeler* (déficiência en reelin), le développement des cellules de Purkinje est affecté et est toujours associé à une réduction du nombre de cellules granulaires (Sotelo, 2004; Vogel et al., 2007; Mitsumura et al., 2011). Cette combinaison de phénotypes a conduit à l'hypothèse que les cellules de Purkinje sécrètent un mitogène important pour la prolifération de GCP et que la perturbation des cellules de Purkinje a donc un effet indirect sur la formation de l'IGL. Ce mitogène est Shh (Figure 11). Le KO conditionnel de Shh dans les cellules de Purkinje entraîne l'absence quasi-totale d'IGL, alors que la surexpression de Shh prolonge la prolifération des GCP et augmente la taille du cervelet (Lewis et al., 2004; Corrales et al., 2004). Une fois la voie Shh activée dans les GCP, elle induit, via une boucle rétroactive, la surexpression de Ptch1 et de Gli2 ainsi que l'expression de Gli1. Dans les GCP, Gli2 semble être le principal effecteur de la voie. La perte de fonction de Gli2 diminue la prolifération des GCP, alors que l'ablation de Gli1 et Gli3 n'a pas d'effet. De plus dans le mutant Gli2, la présence de Gli1 n'est pas détectée dans les GCP suggérant que Gli2 est indispensable pour transduire le signal Shh dans ces cellules (Corrales et al., 2004).

L'analyse transcriptomique menée par Oliver *et al.* a identifié *N-Myc* comme l'un des tout premiers gènes à être activés par la voie Shh. Dans cette même étude, les auteurs montrent l'importance de ce facteur de transcription pour la réponse à Shh : l'expression d'un dominant négatif de N-Myc dans des précurseurs en culture est capable de réduire la prolifération induite par Shh (Oliver et al., 2003). Plus tard, une autre étude a montré que l'ablation de N-Myc pouvait contrecarrer l'hyper-prolifération et la tumorigenèse induites par l'expression d'une forme dominante active de Smo (Hatton et al., 2006). De plus, *in vitro*, la surexpression de N-Myc dans des GCP induit l'expression du facteur de transcription Mad3, qui est en temps normal exprimé dans l'EGL supérieur, et augmente la prolifération des GCP. Réciproquement, la surexpression de Mad3 *in vitro* induit l'expression de N-Myc et également l'augmentation de la prolifération des GCP, même en absence de Shh. Ces résultats ont amené Yun et collègues à postuler que N-Myc et Mad3 coopèrent pour transduire la voie de signalisation Shh dans les GCP (Yun et al., 2007).

Enfin, il existe une hypothèse suggérant que la sécrétion de Shh par les cellules de Purkinje pourrait être négativement régulée par les GCP. Cette hypothèse a été proposée à la suite de l'analyse du mutant Kif3a où les cellules de Purkinje produisent une quantité plus élevée de Shh alors que les GCP, dont les cils primaires sont défectueux, prolifèrent beaucoup moins (Spassky et al., 2008).

En plus de ces voies de signalisation, viennent s'ajouter, dans la catégorie des facteurs extrinsèques régulant la proliférations des GCP, les composants de la matrice extracellulaire comme l'intégrine bêta-1, exprimée dans tout l'EGL, et la laminine et ses récepteurs intégrines alpha-6, exprimés uniquement dans l'EGL supérieur. Ces composants augmentent de manière significative la prolifération des GCP induite par Shh *in vitro* (Pons et al., 2001).

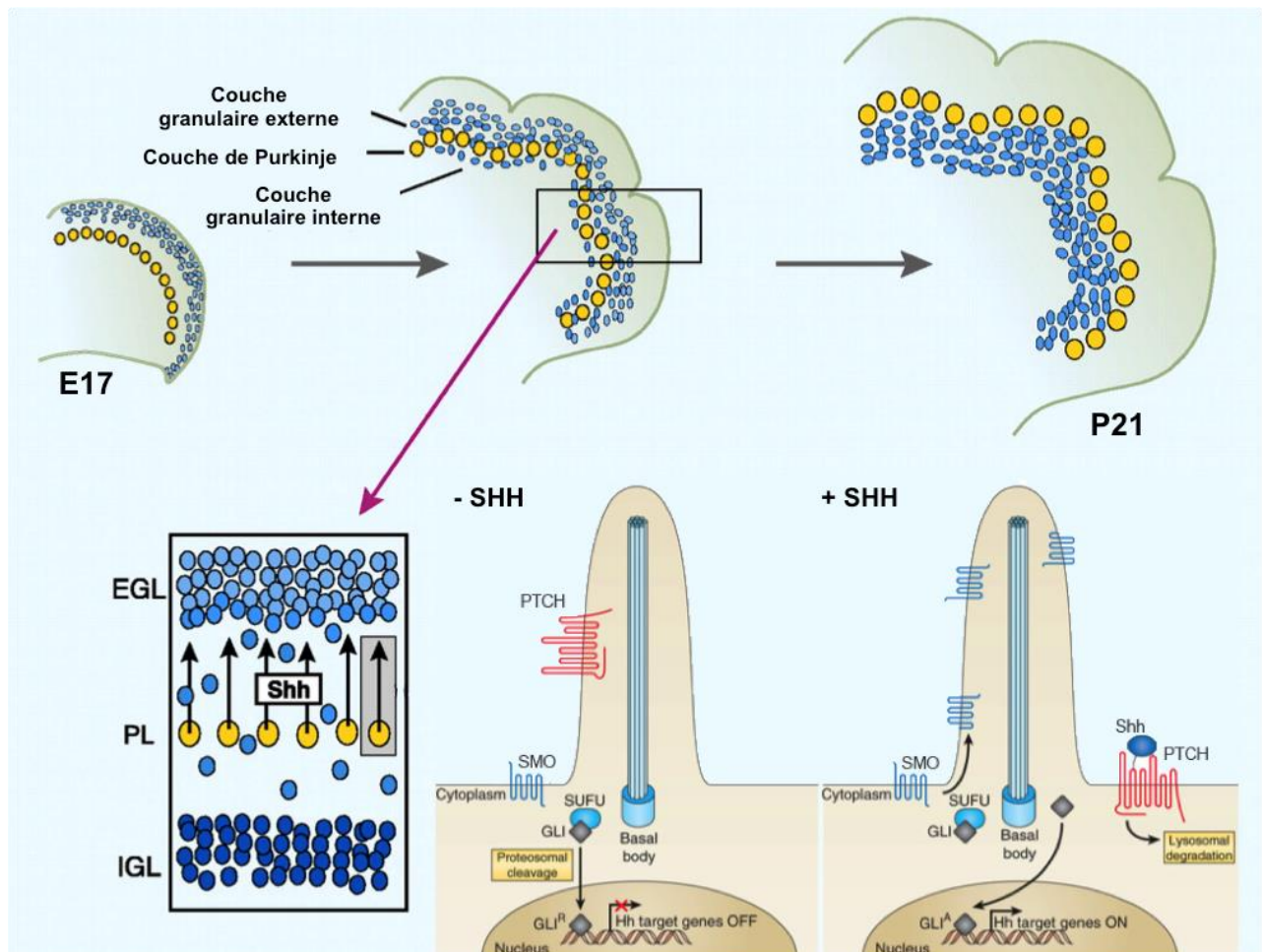


Figure 11 : Les précurseurs des cellules granulaires prolifèrent en réponse au mitogène Shh

Une fois installés dans la couche granulaire externe, les précurseurs des cellules granulaires prolifèrent intensément en réponse au mitogène Shh produit par les cellules de Purkinje. En absence de Shh, les protéines Gli2 et Gli3 sont séquestrées par SUFU. En présence de Shh, Smo peut librement se déplacer dans le cil primaire, inhibant la séquestration des protéines Gli qui peuvent alors être transloquées dans le noyau, activées et vont permettre l'expression des cibles de la voie Shh. EGL : couche granulaire externe, PL : couche de Purkinje, IGL : couche granulaire interne. Adapté de Romer et Curran (2005) et de Amakye et al. (2013).

II.3.2.b. Facteurs intrinsèques contrôlant la prolifération des GCP

Les principaux facteurs intrinsèques sont les régulateurs du cycle cellulaire. Ce dernier est un mécanisme très finement régulé, qui met en jeu une succession d'évènements liés qui conduisent à la division d'une cellule mère en deux cellules filles. La fonction la plus basique du cycle cellulaire est de dupliquer avec précision l'ADN de la cellule mère puis de le séparer de manière à ce que les cellules filles soient identiques. Le cycle cellulaire se divise en quatre phases : la phase G1, la phase S de synthèse d'ADN, la phase G2 et la phase M qui correspond à la division des noyaux puis des cytoplasmes. Pour s'assurer qu'elles répliquent tout leur ADN à l'identique, ainsi que leurs organelles, les cellules eucaryotes possèdent un réseau complexe de protéines régulatrices. Ces dernières garantissent que chaque événement d'une phase a été achevé correctement avant l'entrée dans la phase suivante. L'activité de ces protéines est hautement régulée par la cellule. Les kinases dépendantes des cyclines (CDK pour cyclin-dependant kinase) sont le cœur du système de contrôle du cycle cellulaire. Elles sont activées seulement au moment approprié du cycle puis sont rapidement inactivées. CDK1, 2, 4 et 6 sont impliquées de manière directe en phosphorylant des substrats intervenant dans la transition des différentes phases (Arellano and Moreno, 1997; Obya and Sedivy, 2002). La mise en marche et l'arrêt de l'activité enzymatique de ces CDK dépend des cyclines, dont la concentration dans la cellule varie de manière cyclique durant le cycle cellulaire. C'est ce changement cyclique de concentration qui permet aux CDK d'être activées, en formant un complexe cycline-CDK, uniquement au moment opportun. Les principales cyclines du cycle cellulaire sont les cyclines A, B, D et E. Chez les mammifères, il existe 3 cyclines D : D1, D2 et D3. Alors que l'activité des CDK est stimulée par la formation de complexes avec les cyclines, cette activité peut également être régulée de façons négatives par leur liaison à des inhibiteurs de CDK (CDKi pour cyclin-dependant kinase inhibitor), capables de bloquer l'assemblage ou l'activité des complexes cycline-CDK. On distingue deux familles de CDKi : la famille INK4, qui comprend les gènes *CDKN2B* (*p15*), *CDKN2A* (*p16*), *CDKN2C* (*p18*) et *CDKN2D* (*P19*), et la famille CIP/KIP, qui contient les gènes *CDK1A* (*p21*), *CDKN1B* (*p27*) et *CDKN1C* (*p57*) (Nurse, 2000).

La transition de la phase G1 à la phase S (G1/S) est contrôlée par deux familles de cyclines : les cyclines D et E. La cycline D est exprimée au début de la phase G1. La formation des complexes cycline D-CDK4 et cycline D-CDK6 permet la phosphorylation de la protéine de rétinoblastome (Rb), essentielle à la transition G1/S. La cycline E est exprimée au milieu de la phase G1 et atteint son maximum lors de la transition G1/S. L'association de de la cycline E

avec CDK2 permet également la phosphorylation de Rb. Quand elle est hyper-phosphorylée, Rb se dissocie du facteur de transcription E2F et promeut l'entrée en phase S. Par la suite, les complexes cycline A-CDK2 et cycline A-CDK1 permettent l'avancement en phase S et la transition S/G2. Enfin la transition G2/M se fait grâce au complexe cycline B-CDK1 (Figure 12).

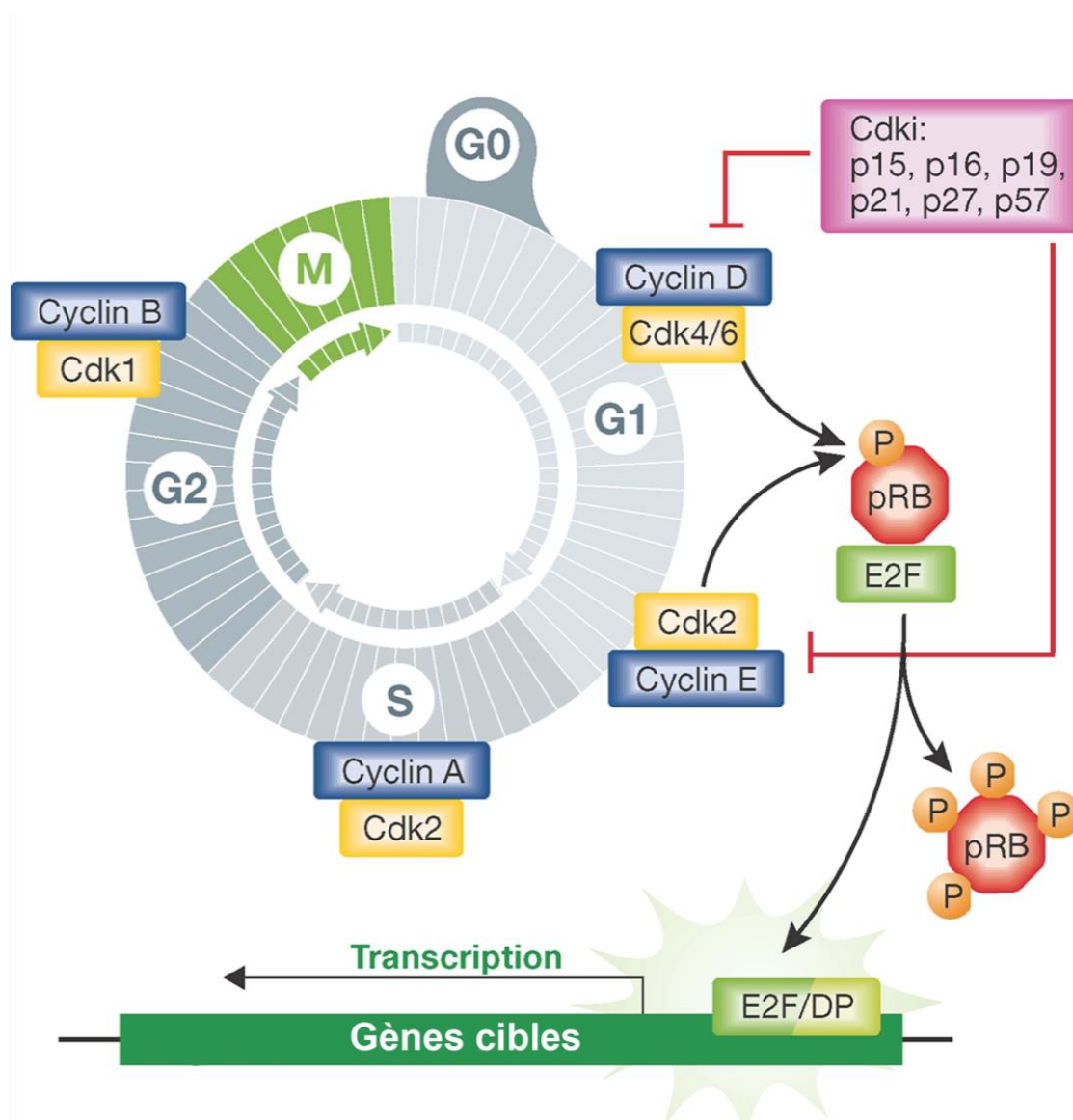


Figure 12: Schéma du cycle cellulaire et de ses principaux composants

Le cycle cellulaire se divise en quatre phases : la phase G1, S, G2 et M, et sa progression est régulée par les complexes cyclines/CDK. La transition G1-S se fait grâce à l'hyperphosphorylation de Rb par les complexes cycline D-CDK4/6 et cycline E/CDK2, qui libère le facteur de transcription E2F. Les CDKi, quant à eux, inhibent l'activité de ces complexes et s'opposent à la progression du cycle.

De nombreuses études ont révélé le caractère essentiel de plusieurs acteurs de cycle cellulaire dans la prolifération des GCP. Par exemple, l'inactivation conditionnelle de Rb, sous le contrôle du promoteur GFAP, conduit au maintien de l'EGL chez des souris âgées de 20 jours et à la présence d'une prolifération ectopique dans l'IGL (Shakhova et al., 2006). L'inhibition d'autres facteurs de la famille de Rb, comme P107, n'a pas d'effet seule, mais alliée à celle de Rb, donne un phénotype plus sévère, comparé à celui obtenu chez les souris mutantes pour Rb (Cobrinik et al., 1996; Lee et al., 1996; Marino et al., 2003). La protéine p27, un inhibiteur de CDK, est également un acteur majeur dans le contrôle de la prolifération des GCP. Cette protéine agit pour prévenir l'entrée en phase S. En temps normal, cette protéine est exprimée dans la couche inférieure de l'EGL et dans l'IGL. Cependant, la délétion de p27 repousse la sortie du cycle cellulaire et la différenciation des GCP dans l'EGL. Il en résulte un cervelet hypertrophié (Miyazawa et al., 2000). De manière intéressante, la délétion de p21 ou de p57, qui font partie de la même famille de CDKi que p27, ne cause aucun défaut cérébelleux (Deng et al., 1995; Yan and Ziff, 1997; Zhang et al., 1997).

Des expériences ont démontré que l'ablation de *Ccnd1* (cycline D1) ou de *Ccnd2* (cycline D2), qui favorisent la progression au sein de la phase G1 du cycle cellulaire, conduit précocement à un EGL plus fin, et plus tard, à un cervelet atrophié. Ces phénotypes sont la conséquence d'un défaut de prolifération des GCP et de leur différenciation précoce (Huard et al., 1999; Pogoriler et al., 2006). L'expression temporelle de ces deux protéines n'est pas la même. En effet, la cycline D1 est détectée dans l'EGL durant la phase embryonnaire et n'est plus retrouvée dans l'EGL de souris à P12. À l'inverse, la cycline D2 n'est exprimée que durant la période postnatale. D'ailleurs les effets de l'ablation de la cycline D2 ne sont observables qu'à partir de P3. Ces résultats suggèrent que la prolifération des GCP est différemment régulée durant le développement embryonnaire et postnatal.

En amont de ces protéines régulatrices du cycle cellulaire, certains gènes favorisent la prolifération des GCP. C'est le cas du facteur de transcription N-Myc ou encore du complexe polycomb, dont le principal composant est Bmi1. Ainsi, la mutation d'un de ces facteurs conduit à une atrophie du cervelet et à une diminution de la prolifération des GCP. Dans le cas du mutant N-Myc, cette atrophie est extrêmement sévère alors qu'aucune augmentation de l'apoptose ne peut être observée, suggérant que ce phénotype résulte entièrement du défaut de prolifération des GCP. Des études *in vitro* ont montré que N-Myc était capable d'induire l'expression des cyclines D. Ces résultats suggèrent que la voie Shh régule le cycle cellulaire

des GCP en agissant sur l'expression des cyclines D (Ciemerych et al., 2002; Knoepfler et al., 2002; Leung et al., 2004; Zindy et al., 2006).

II.3.3. De l'EGL à l'IGL

La différenciation et la migration des GCP de l'EGL vers l'IGL débutent vers la naissance et l'IGL est totalement formé à la fin de la troisième semaine après la naissance.

II.3.3.a. La différenciation des GCP

La transition des GCP de la prolifération vers la différenciation commence alors que Shh est encore présent au niveau de l'EGL. Le mécanisme par lequel ces précurseurs, de manière individuelle, deviennent insensibles au mitogène Shh et commencent à se différencier, est encore mal compris. Cependant un grand nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques, favorisant cette transition, ont d'ores et déjà été identifiés. Parmi les facteurs extrinsèques, dominant deux voies de signalisation reconnues pour être impliquées dans la régulation négative de la prolifération : la voie non canonique Wnt et la voie BMP. Par exemple, Wnt3 et Bmp4 sont capables, indépendamment l'un de l'autre, de diminuer la prolifération des GCP en s'opposant au signal Shh et en inhibant l'expression de *Atoh1* (Anne et al., 2013; Zhao et al., 2008; Ayrault et al., 2010; Berenguer et al., 2013). Le récepteur GRP3 (récepteur couplé aux protéines G) est également un antagoniste de la voie Shh. Les mutants *GRP3* présentent un IGL plus épais, dû à une prolifération accrue des GCP. GRP3 rendrait donc possible la différenciation des précurseurs en les insensibilisant contre le mitogène Shh (Tanaka et al., 2009). Un changement du pattern d'expression des GCP est également associé à leur différenciation. C'est le cas par exemple des gènes du cycle cellulaire. Alors que les GCP en prolifération expriment les *Cycline D1* et *D2* et *N-Myc*, les précurseurs qui migrent dans l'EGL inférieur régulent négativement ces derniers et expriment à la place l'inhibiteur de CDK p27.

Tout comme elle régule leur prolifération, la matrice extracellulaire est également impliquée dans la différenciation des GCP. La vitronectine, comme la laminine, peuvent moduler la réponse à Shh des GCP. En culture, les GCP prolifèrent activement en présence de Shh sur de la laminine, présente dans l'EGL supérieur, mais pas sur de la vitronectine, qui est normalement en contact des précurseurs dans l'EGL inférieur (Pons et al., 2001).

II.3.3.b. La migration radiale

Une fois dans l'EGL inférieur, les précurseurs commencent à étendre leurs fibres parallèles et à migrer radialement le long des fibres de la glie de Bergmann, à travers la couche moléculaire, puis ils se détachent de la glie, deviennent sphériques et migrent radialement au sein de l'IGL sans aucune association à la glie (Edmondson and Hatten, 1987; Rakic, 1971; Jiang et al., 2008). Il est donc normal de retrouver parmi les facteurs importants pour la migration radiale, les protéines cruciales pour l'interaction neurone-glie tel que l'astrotactine, la profiline1 ou encore l'intégrine bêta1. La perte de l'astrotactin1 par exemple, conduit à une diminution de la migration des GC à la fois *in vivo* et *in vitro* due à une impossibilité pour les précurseurs de lier la glie de Bergmann (Adams et al., 2002).

Malgré ses fonctions complexes, le cervelet adulte possède une structure relativement simple, avec une anatomie bien définie, et hautement conservée chez les vertébrés. La mise en place de cette structure est un long processus finement régulé. Une fois le territoire présomptif du cervelet défini, deux zones germinatives vont engendrer la totalité des cellules du cervelet. La génération d'un nombre élevé de cellules granulaires nécessite l'ajout d'une étape transitoire d'amplification intense. Durant cette étape, le cervelet est extrêmement sensible et une altération du processus développemental peut avoir des conséquences graves telles que la formation de tumeurs appelées médulloblastomes.

III. Les médulloblastomes

Les médulloblastomes (MB) sont les tumeurs cérébrales infantiles les plus fréquentes et se développent principalement dans le cervelet, ainsi que dans le tronc cérébral. 150 nouveaux cas apparaissent chaque année en France dont 80% touchent des enfants âgés de moins de 15 ans. Approximativement un tiers de ces tumeurs produisent des métastases qui se propagent via le liquide cérébro-spinal, plaçant les MB dans la catégorie des tumeurs à « haut risque » associées à un mauvais pronostic. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent en moyenne 2 mois avant le diagnostic. Ils passent souvent inaperçus et ressemblent aux symptômes d'une grippe : léthargie, irritabilité et perte d'appétit. Chez les jeunes enfants, ils sont associés à une augmentation de la taille de la tête, et chez les adolescents et les adultes, à des maux de tête et à des vomissements. Les traitements par chirurgie, irradiation et chimiothérapie ont beaucoup amélioré la survie des patients. Cependant ces traitements ont souvent des effets secondaires lourds comme par exemple la perte de l'audition sur de jeunes patients encore en plein développement (Gajjar et al., 2006). La caractérisation moléculaire de ces tumeurs a permis de mettre en place des essais cliniques et de valider certaines drogues agissant directement sur les voies de signalisations impliquées. Elle donne ainsi de l'espoir pour le développement de nouvelles thérapies plus efficaces et plus adaptées à chaque patient.

III.1. Classification des MB

Depuis des décennies, les MB sont considérés comme un groupe de maladies extrêmement hétérogènes, et l'établissement d'une classification fut un défi. Il existe aujourd'hui deux types de classifications des MB : la classification histologique et la classification moléculaire.

III.1.1. Classification histologique

En 2007, la quatrième édition de l'Organisation mondiale de la santé (the World Health Organisation) a publié une classification des MB en fonction de la morphologie des cellules qui les constituent. Cette classification divise les MB en 4 catégories : les MB classiques, les MB desmoplastiques/nodulaires, les MB à nodularité extensive et les MB à grandes cellules (Figure13) (Yazigi-Rivard et al., 2008; Fuller and Scheithauer, 2007; Roussel and Hatten, 2011).

- Les médulloblastomes à histologie classique sont constitués de petites cellules rondes (basophiles) dont la taille du noyau est importante par

rapport à celle du cytoplasme. Ces cellules présentent une forte activité mitotique et apoptotique. Les MB à histologie classique représentent deux tiers des MB et touchent surtout l'enfant.

- Les médulloblastomes desmoplasiques / nodulaires sont constitués de nodules cellulaires séparés par des zones riches en fibres de réticuline. Ils surviennent le plus souvent dans les hémisphères cérébelleux chez les adolescents et les jeunes adultes. Cette catégorie de MB, qui représente 15% des MB, a le meilleur pronostic.
- Les médulloblastomes à nodularité extensive représentent une forme particulière des MB desmoplasiques qui touche surtout les jeunes enfants. Dans ce cas, les nodules contiennent des cellules monomorphes avec un aspect en flux sur un fond finement fibrillaire. Ils représentent également 15% des MB.
- Les médulloblastomes à grandes cellules représentent la forme la moins fréquente (2 à 4% des MB). Ils sont caractérisés par des cellules à gros noyaux ronds, pléomorphes, avec gros nucléole et cytoplasme abondant, des plages de nécroses et une activité mitotique importante.

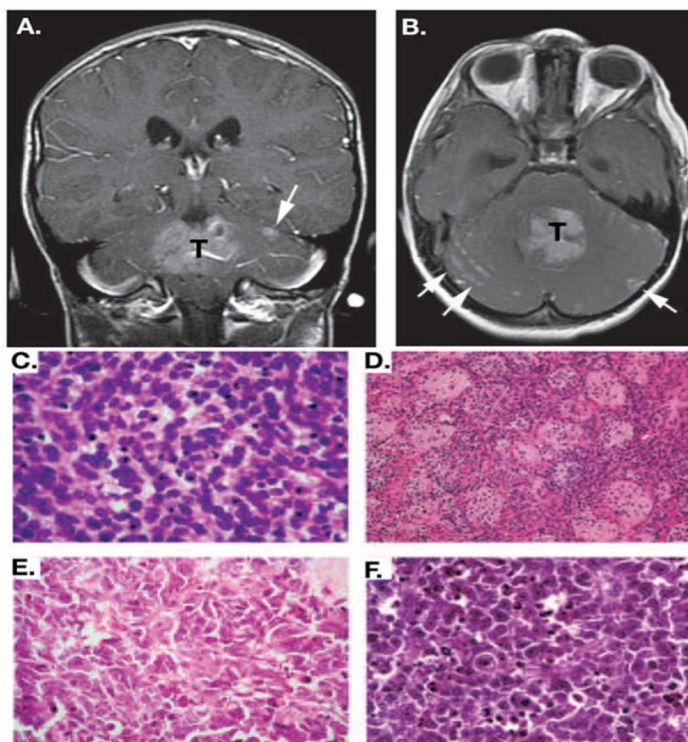


Figure 13: La classification histologique de médulloblastomes

(A) et (B) Images par résonance médicale montrant un médulloblastome et des métastases (flèches blanches). (C-F) Les quatre différents types histologiques de médulloblastomes colorés à l'éosine et à l'hématoxyline : classique (C), desmoplasique / nodulaire (D), médulloblastome à nodularité extensive (E) et médulloblastome à grandes cellules (F). D'après Hatten et Roussel (2011).

Avec l'avènement de la génomique, notre compréhension des bases moléculaires des MB a été révolutionnée et a amené la communauté scientifique à remplacer la classification histologique par une toute autre classification, la classification moléculaire.

III.1.2. Classification moléculaire

Quatre principales analyses génomiques ont influencé notre définition des sous-groupes moléculaires du médulloblastome. En 2006, Thompson et son équipe furent les premiers à introduire le concept moderne de la subdivision moléculaire des MB en décrivant 5 groupes distincts de MB basés sur l'analyse de 46 cas. Deux ans plus tard, Kool et ses collaborateurs récapitulent les travaux de Thompson avec l'étude de 62 autres cas. En 2010, deux études indépendantes menées dans les laboratoires de Michael Taylor et de Scott Pomeroy analysent 103 et 194 tumeurs primaires respectivement et subdivisent les MB en 4 et 6 sous-groupes (Thompson et al., 2006; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2011; Cho et al., 2011). Dans toutes ces études, deux sous-groupes sont toujours retrouvés : le sous-groupe WNT, où la voie signalisation WNT est dérégulée, et le sous-groupe SHH, où la voie de signalisation SHH est dérégulée. À la fin de l'année 2010, une réunion est organisée à Boston (Massachusetts, États Unis) afin de se mettre d'accord sur la classification moléculaire des MB. Les conclusions de cette réunion, publiées dans « Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus » par Taylor et al., sont que les MB peuvent être subdivisés en 4 sous-groupe principaux qui sont nommés : WNT, SHH, Groupe 3 et Groupe 4 (Figure 14). Il reste cependant évident qu'il existe, au sein de ces sous-groupes, des sous-types de MB dus à la grande hétérogénéité présente au sein même d'un sous-groupe, en particulier dans les groupes 3 et 4 (Taylor et al., 2012; Northcott et al., 2012).

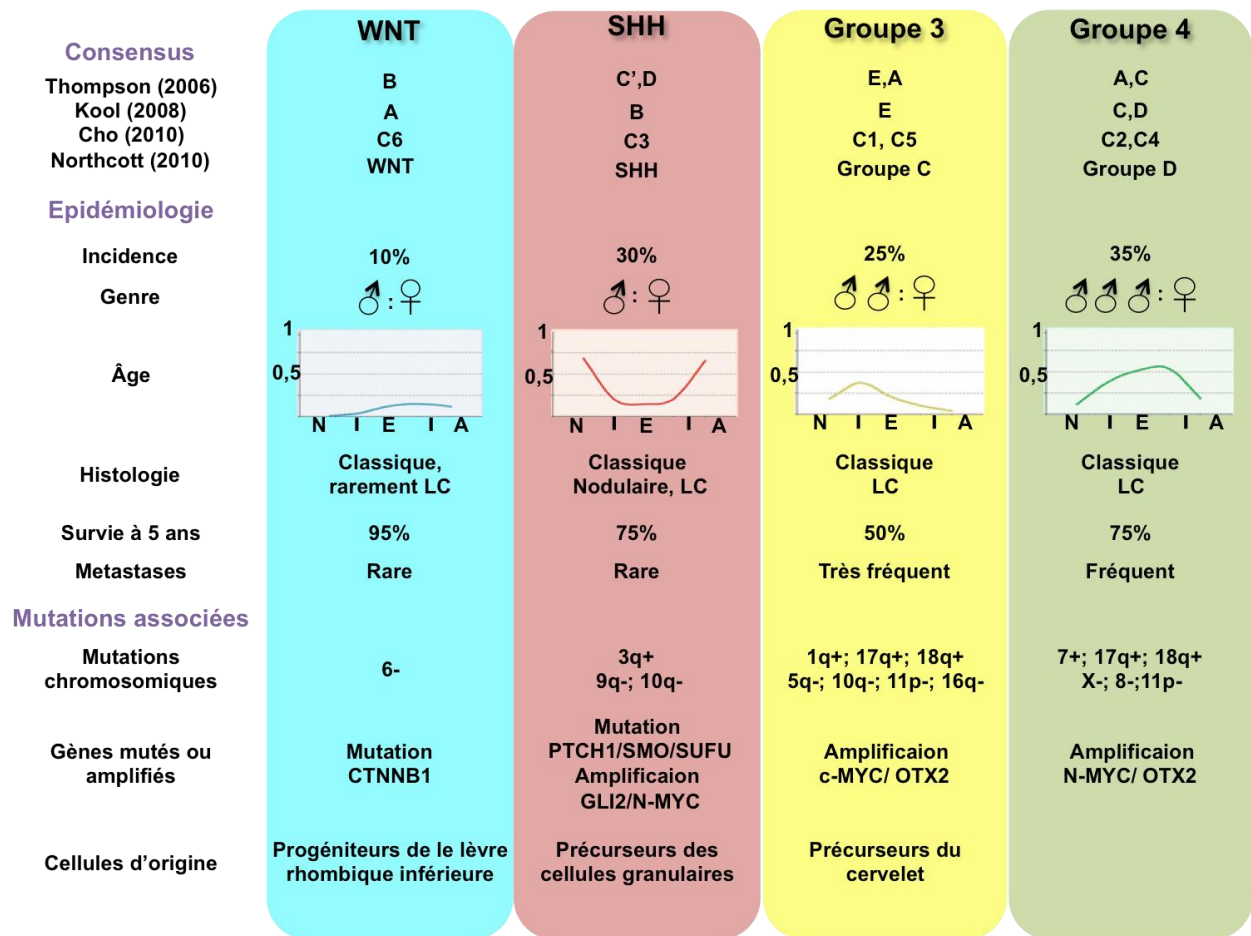


Figure 14: Caractéristiques des différents groupes moléculaires de médulloblastomes

Les caractéristiques de chaque groupe sont réparties en 3 catégories : leurs appellations dans les études précédant le consensus ; les données épidémiologiques et les mutations les plus fréquemment retrouvées. Pour les trois premiers groupes, l'origine soupçonnée, déduite de modèles murins, est également indiquée. A= adulte ; E= enfant ; LC : histologie à grandes cellules ; N= nouveau-né. Adapté de Taylor et al. (2011).

III.1.2.a. Le groupe WNT

➤ Données épidémiologiques

Le groupe WNT est le groupe de MB qui a le meilleur pronostic à long terme, avec un taux de survie supérieur à 95%. Les 5% de patients qui n'y survivent pas succombent le plus souvent de complications dues à la thérapie. Les tumeurs du groupe WNT représentent 10% des MB et présentent une histologie classique, rarement à grandes cellules (Kool et al., 2008).

➤ Mutations associées

Le groupe WNT est caractérisé par la mutation d'un ou plusieurs acteurs de la voie de signalisation WNT, conduisant à une surexpression de la voie. En absence du ligand WNT,

l'acteur principal de la voie WNT canonique, la β -caténine, est phosphorylée par la glycogène synthétase kinase 3 β (GSK3 β) et la caséine kinase 1 α (CK1 α) au sein d'un complexe contenant la protéine d'échafaudage AXIN et la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli), ce qui l'adresse au protéasome pour y être dégradée. En présence de WNT, la fixation du ligand au récepteur transmembranaire Frizzled libère la β -caténine du complexe, empêchant ainsi sa phosphorylation et sa dégradation. La β -caténine peut alors être transloquée dans le noyau pour s'associer aux facteurs de transcription TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) et activer la transcription des gènes cibles de la voie WNT parmi lesquels on retrouve les gènes *c-Myc* et *Cycline D1* (Figure 15) (MacDonald et al., 2009). L'analyse moléculaire de MB du groupe WNT montre couramment des mutations de *CTNNB1*, le gène qui code pour la β -caténine, au niveau des sites de phosphorylation, ce qui empêche celle-ci d'être dégradée, et favorise son accumulation dans le noyau (MacDonald et al., 2009; Bihannic and Ayrault, 2016). Des mutations affectant d'autres gènes codant des acteurs de la voie, comme *APC*, *AXIN1* et *AXIN2*, ainsi que *TP53* qui code pour la protéine suppresseur de tumeur p53, sont aussi souvent retrouvées. De plus les MB du groupe WNT sont associés à la perte d'un chromosome 6 dans 75% des cas (Kool et al., 2012). En dehors de la monosomie 6, il y a très peu d'autres régions du génome qui sont amplifiées ou délétées dans ce groupe.

➤ Cellules d'origine

Étant donné que les gènes de la voie WNT sont plus exprimés dans la lèvre rhombique inférieure et que les tumeurs WNT sont situées au niveau du 4^{ème} ventricule avec des infiltrations à la surface dorsale du tronc cérébral, l'hypothèse fut émise que l'origine cellulaire de ces tumeurs serait la lèvre rhombique inférieure. Cette hypothèse fut validée par deux études, impliquant toutes deux l'expression conditionnelle d'une forme résistante à la dégradation de la β -caténine, sous le contrôle du promoteur *Blbp* (Brain lipid-binding protein), et dans un contexte de délétion de *Trp53* (*Trp53*^{-/-}). Dans la première étude, Gibson et ses collègues démontrent que l'expression de la forme stabilisée de la β -caténine dans les cellules exprimant *Blbp* conduit à la formation de tumeurs Wnt dans 15% des cas. L'analyse de ces MB montre qu'ils sont formés à partir des cellules *Blbp*-*Olig3* positives (Gibson et al., 2010). Ces cellules correspondent aux précurseurs des neurones à fibres moussues présents dans le rhombencéphale postérieur entre E11,5 et E15,5 ou plus précisément, dans ce que nous avons décrit dans ce manuscrit comme le domaine pré-cérébelleux de la lèvre rhombique. En 2012, le laboratoire de Gilbertson utilise le même modèle et y ajoute l'expression d'une forme mutée de

PI3K (Phospho-inositide 3-kinase), identifiée dans des MB du groupe WNT. Il reproduit les résultats de Gilbson mais cette fois avec une pénétrance de 100% (Robinson et al., 2012).

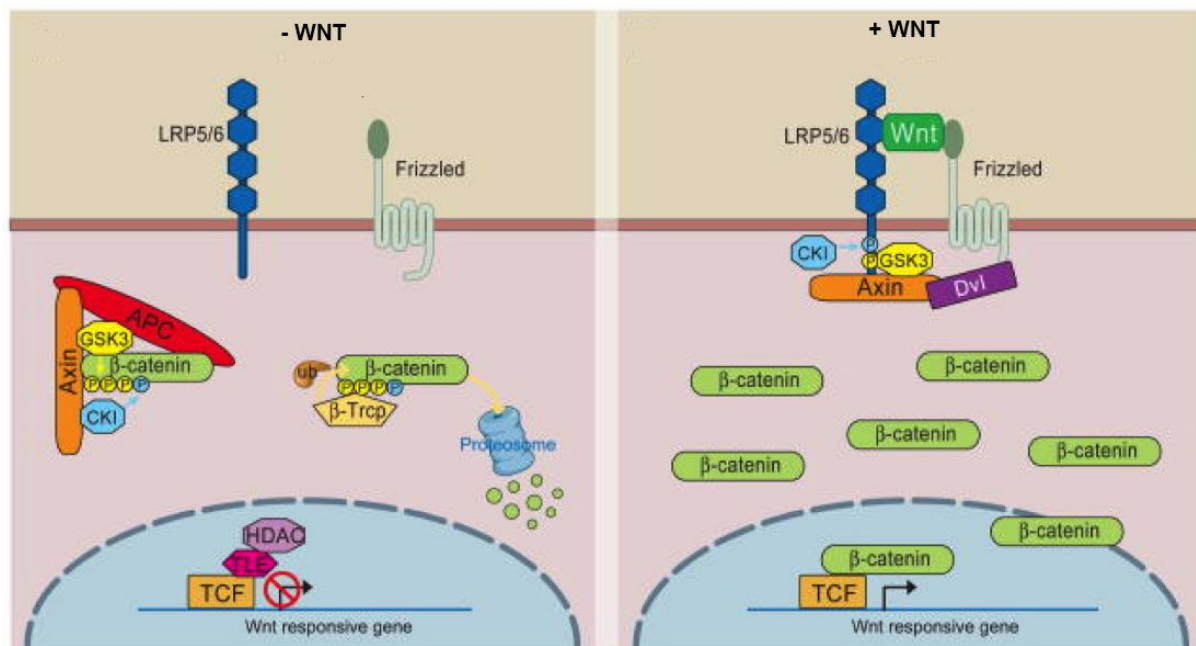


Figure 15: La voie de signalisation Wnt canonique

En absence de Wnt, la β -caténine forme un complexe avec l'Axin, l'APC, GSK3 et CK1. Sa phosphorylation par CK1 et GSK3 conduit à sa dégradation par le protéasome. En présence de Wnt, Dvl est recruté par Frizzled, LRP5/6 est phosphorylé et Axin est recruté libérant la β -caténine. Cette dernière peut alors se transloquer dans le noyau et servir de co-activateur des facteurs de transcription TCF permettant ainsi la transcription des gènes cibles de la voie Wnt. Adapté de Macdonald et al. (2009).

III.1.2.b. Le groupe SHH

➤ Données épidémiologiques

Le groupe SHH représente 30% des MB. Son pronostic de survie est intermédiaire, avec une survie de 75% à 5 ans. Cette tumeur affecte le plus souvent, soit des enfants âgés de moins de trois ans, soit de jeunes adultes. C'est la seule tumeur à présenter une histologie desmoplasique/nodulaire, en plus d'une histologie classique et à grandes cellules.

➤ Mutations associées

Ce groupe de tumeurs a été nommé ainsi parce qu'on y trouve systématiquement une dérégulation de la voie de signalisation SHH. Comme exposé plus tôt dans ce manuscrit, le mitogène SHH agit en se liant à son récepteur transmembranaire PTCH, cette fixation induisant

la levée d'inhibition de SMO qui libère alors GLI2 et GLI3 de l'emprise de SUFU et leur permet de réguler l'expression de gènes cible de la voie SHH. Dans les MB du groupe SHH, les principales mutations affectent les gènes codant des acteurs de la voie SHH, comme par exemple *PTCH*, *SUFU* et *SMO*. On retrouve également l'amplification des gènes *GLI1*, *GLI2* et *N-Myc* (Taylor et al., 2002; Northcott et al., 2011; Lam et al., 1999). Toutes ces mutations ont pour conséquence l'activation permanente de la voie SHH. D'un point de vue cytogénétique, le génome des tumeurs SHH présente plusieurs gains et délétions affectant principalement les régions 9q (chromosome 9 – bras long), où se situe le gène *PTCH*, 10q et également le chromosome 17.

➤ Cellules d'origine

De nombreux modèles mimant les MB du groupe SHH existent. Les principaux modèles de souris transgéniques consistent soit en la délétion du récepteur Ptch (*Ptch*^{+/-}), soit en l'expression conditionnelle d'une forme dominante active de Smo, SmoA2 ou SmoM2. L'induction de cette dernière mutation à l'aide d'une batterie de lignées de souris exprimant une recombinaise Cre dans tout ou partie des progéniteurs neuraux généraux (hGFAP-Cre) ou seulement dans les progéniteurs du cervelet (*Olig2*-Cre), ou encore seulement dans les GCP (*Atoh1*-Cre) a permis de démontrer que les GCP du cervelet mais également des noyaux cochléaires sont les seules cellules d'origine potentielles des MB Shh (Hatton et al., 2008; Schüller et al., 2008; Grammel et al., 2012).

III.1.2.c. Le groupe 3

➤ Données épidémiologiques

Les MB du groupe 3 représentent 25% des MB et sont les plus agressifs, avec un taux de survie à 5 ans après le diagnostic de seulement 50%. La majorité de ces tumeurs présente une histologie classique ou à larges cellules (Kool et al., 2012).

➤ Mutations associées

Les MB de type 3 sont caractérisés principalement par la surexpression et/ou l'amplification génomique de l'oncogène *c-MYC* et du facteur de transcription *OTX2*. On retrouve également dans le génome de ces tumeurs des répétitions de régions sur les parties chromosomiques 1q et 17q et des délétions des régions 10q, 16q et 17p (chromosome 17- bras court).

➤ Cellules d'origine

Des expériences de transplantations orthotopiques ont permis de montrer que les GCP peuvent être les cellules d'origine de ces tumeurs. En effet, le laboratoire de Martine Roussel, a réussi à mimer la formation de tumeurs ayant les mêmes caractéristiques histologiques et transcriptomiques que les MB humains du groupe 3 à partir de la transplantation de GCP génétiquement modifiés *in vitro*. Pour cela, des GCP (Atoh1 positifs) provenant de cervelet de souris (P6-P7) mutants pour la protéine Tp53 (*Tp53^{-/-}*) ont été infectés avec un virus permettant la surexpression de c-Myc, puis réinjectés dans le cortex cérébral de souris immunodéficientes. 100% de ces souris développent des tumeurs (Kawauchi et al., 2012). Parallèlement, une expérience semblable a été réalisée dans le laboratoire de Wechsler-Reya mais avec, cette fois l'utilisation des progéniteurs de la matière blanche (Ptf1a positifs) de souris *Tp53^{-/-}* dans lesquels est exprimée une forme dominante active de c-Myc (MycT58A). A nouveau, il y a eu formation de tumeurs du groupe 3 (Pei et al., 2012). Ceci indique que d'autres précurseurs que ceux des cellules granulaires peuvent être à l'origine de MB du groupe 3.

III.1.2.d. Le groupe 4

➤ Données épidémiologiques

Les médulloblastomes du groupe 4 sont les plus fréquents puisqu'ils représentent 35% des MB. Le pronostic de survie pour ces tumeurs est intermédiaire, similaire à celui des MB du groupe SHH, avec une survie à 5 ans de 75%. Les MB du groupe 4 ont une histologie soit de type classique soit à grandes cellules.

➤ Mutations associées

Tout comme pour les MB du groupe SHH et du groupe 3, on retrouve dans le génome de ce groupe des gains et délétions au niveau du chromosome 17 ainsi que la délétion du chromosome X chez la majorité des femmes atteintes par cette tumeur. Cette dernière caractéristique, alliée au fait que les hommes sont plus souvent atteints des MB de groupe 4, suggère l'existence d'un gène codant pour un suppresseur de tumeur sur le chromosome X (Taylor et al., 2012). Dans ce groupe, on retrouve également la surexpression et/ou l'amplification génomique des gènes *c-MYC* et *OTX2*, comme pour le groupe 3, mais surtout de *N-MYC* (Aldosari et al., 2002).

➤ Cellules d'origine

Malheureusement ces tumeurs sont encore très mal comprises, du fait qu'aucun modèle mimant spécifiquement la formation de MB de groupe 4 n'existe aujourd'hui. De ce fait, leurs cellules d'origine sont encore inconnues.

III.2. Les modèles murins pour comprendre les MB

Les récentes avancées dans la compréhension des MB ont permis de mettre en lumière la grande hétérogénéité de ces tumeurs. La classification moléculaire des MB, aujourd'hui bien acceptée des chercheurs et des cliniciens, est maintenant utilisée pour l'élaboration d'essais cliniques. Cependant de grandes zones d'ombre subsistent et le développement et l'utilisation de modèles adaptés restent indispensables à l'élaboration des progrès futurs.

Un modèle doit être généré pour chaque sous-groupe de MB. Pour être valide, il doit proprement mimer l'empreinte moléculaire et les caractéristiques cliniques du MB. Il doit également dériver de la bonne cellule d'origine et démontrer les mêmes altérations génétiques. Enfin et surtout, un bon modèle doit permettre de prédire la réaction d'un groupe de MB à une thérapie ciblée. Aucun des modèles existant à l'heure actuelle ne répond à toutes ces exigences. Cependant, la combinaison de plusieurs modèles a permis les avancées majeures réalisées au cours des trois dernières décennies dans notre compréhension du MB. Ces modèles peuvent être divisés en deux catégories : les modèles de transplantation et les modèles de souris génétiquement modifiées (Figure 16) (Neumann et al., 2017).

III.2.1. Modèles de transplantation

Les tout premiers modèles murins utilisés pour comprendre la biologie des MB ont consisté en la transplantation de lignées de cellules tumorales dans le crâne ou dans le flanc de souris immuno-déficientes. En effet à partir des années 80, les premières lignées permanentes de cellules dérivées de MB furent décrites (Friedman et al., 1988). Ces cellules peuvent être maintenues indéfiniment en culture et sont également capables de proliférer dans le corps de souris après transplantation. Malheureusement, l'analyse du transcriptome de ces lignées, qui dérivait initialement de différents sous-groupes de MB, a révélé que ces lignées dérivent génétiquement *in vitro* et finissent par se ressembler plus entre elles, qu'aux MB de leur groupe d'origine. Ainsi, le maintien prolongé de ces lignées cellulaires en culture et leurs passages répétés font qu'elles acquièrent des mutations non présentes dans les tumeurs d'origines et en perdent d'autres (Chlapek et al., 2017; Othman et al., 2014). C'est le cas par exemple de la lignée MED6, qui arbore une séquence sauvage de *CTNNB1* alors que la tumeur d'origine possédait une mutation du codon 37 du même gène.

Afin de palier à ce problème, des chercheurs ont cherché à transplanter directement dans la souris, sans passer par une étape de culture, des cellules primaires de patients humains atteints de MB. Cette méthode, appelée xénogreffe dérivée de la tumeur du patient (PDX pour patient derived xenograft), a permis de comprendre la réactivité des MB du groupe SHH et du groupe 3 à certaines thérapies (Kool et al., 2014; Sandén et al., 2017). Cependant, ce modèle semble ne pas fonctionner dans les cas de MB peu agressifs comme ceux du groupe WNT.

Enfin, il existe un troisième modèle de transplantation. Dans ce dernier modèle, il n'est plus question d'utiliser des cellules issues de tumeurs, mais plutôt de reproduire les altérations les plus fréquemment retrouvées dans les MB directement dans des cellules saines *in vitro*, avant de les transplanter. Par exemple, des cellules de souris « donneuses », le plus souvent des GCP, sont dissociées, manipulées en culture et réimplantées dans une souris « hôte » pour former des tumeurs. Le passage en culture est trop court pour permettre à ces cellules de muter, mais assez long pour pouvoir les transformer avec des vecteurs viraux permettant par exemple d'induire l'expression d'un gène d'intérêt. Les expériences menées par Kawauchi et al., et par Pei et al., citées plus tôt (Chapitre II.1.2.c) font intervenir ce modèle de souris. Dans ce cas, les souris « donneuses » sont déficientes en protéine Tp53. Leur cervelet est disséqué, les GCP ou les cellules souches cérébelleuses sont dissociés et transformés avec un vecteur viral permettant l'expression de *c-Myc* ou *c-MycT58A* puis réinjectés dans une souris « hôte » (Kawauchi et al., 2012; Pei et al., 2012).

III.2.2. Modèles de souris génétiquement modifiées

Le seul modèle permettant de suivre et d'observer la formation de tumeurs à partir de sa cellule d'origine est le modèle murin génétiquement modifié. Le premier de ces modèles, utilisé pour l'étude des MB, fut le modèle *Ptch1^{+/-}*, créé en remplaçant sur l'un des allèles *Ptch1* une partie de l'exon 1 et la totalité de l'exon 2 du gène *Ptch1* par une séquence codant la β -galactosidase (gène *lacZ*) (Goodrich et al., 1997). Ce modèle mime le syndrome de Gorlin-Goltz (Hahn et al., 1996). Les patients atteints de ce syndrome développent très souvent des tumeurs, y compris des MB. Depuis, ce type de modèle a été largement développé. Toujours pour le groupe *Shh*, l'utilisation du système Cre-lox a permis de générer des souris exprimant de manière conditionnelle une forme dominante active de Smoothened, *SmoA2* ou *SmoM2*. Ce système a également permis de générer un modèle murin pour les MB du groupe *Wnt* avec l'expression d'une forme dominante active de la β -caténine. Un grand nombre d'autres modèles de souris a été généré grâce à l'utilisation d'autres systèmes d'induction conditionnelle tels que

le système Tet (Tet-On et Tet-Off) qui permet soit d'induire, soit de stopper l'expression d'un gène d'intérêt de manière réversible. Ce système a d'ailleurs été utilisé pour montrer que la surexpression de N-Myc, dans les cellules Glt1 (Glutamate transporter 1) positives, induit la formation de tumeurs et que, de manière plus intéressante, l'arrêt de la surexpression de N-Myc, par injection de tétracycline, guérit totalement les souris, suggérant que ces tumeurs dépendent totalement de N-Myc pour leur prolifération (Swartling et al., 2010). Malheureusement, les tumeurs développées dans ce modèle ne miment pas un groupe de MB en particulier, puisque même si elles ressemblent fortement au MB du groupe 3, elles partagent également des caractéristiques avec les MB Shh, Wnt et du groupe 4.

Récemment, un autre système, le système RCAS/*tv-a* a permis de générer un modèle de souris génétiquement modifiées mimant la formation de MB du groupe 3 à grandes cellules dans le rhombencéphale. Dans ces souris, le récepteur *tv-a*, normalement absent chez les mammifères, est exprimé sous le contrôle du promoteur *Nestine*. L'expression de ce récepteur permet aux cellules *Nestine* positives d'être reconnues par le rétrovirus RCAS injecté dans le cerveau. Quand RCAS infecte ces cellules, la réplication du virus n'a pas lieu mais les ARN rétroviraux, codant pour la protéine c-Myc et pour la protéine anti-apoptotique Bcl-2, sont rétro-transcrits pour générer des séquences ADN qui seront intégrées dans le génome des cellules et exprimées de manière constitutive, conduisant à la formation de tumeurs. Les auteurs obtiennent le même résultat lorsqu'ils surexpriment c-Myc seul, mais dans des souris mutantes pour Tp53, confirmant la nécessité de bloquer l'apoptose simultanément à l'induction de c-Myc pour former des tumeurs (Fults, 2005; Jenkins et al., 2016). Ce modèle est le premier modèle murin génétiquement modifié qui mime la formation de MB du groupe 3.

Modèles de transplantation

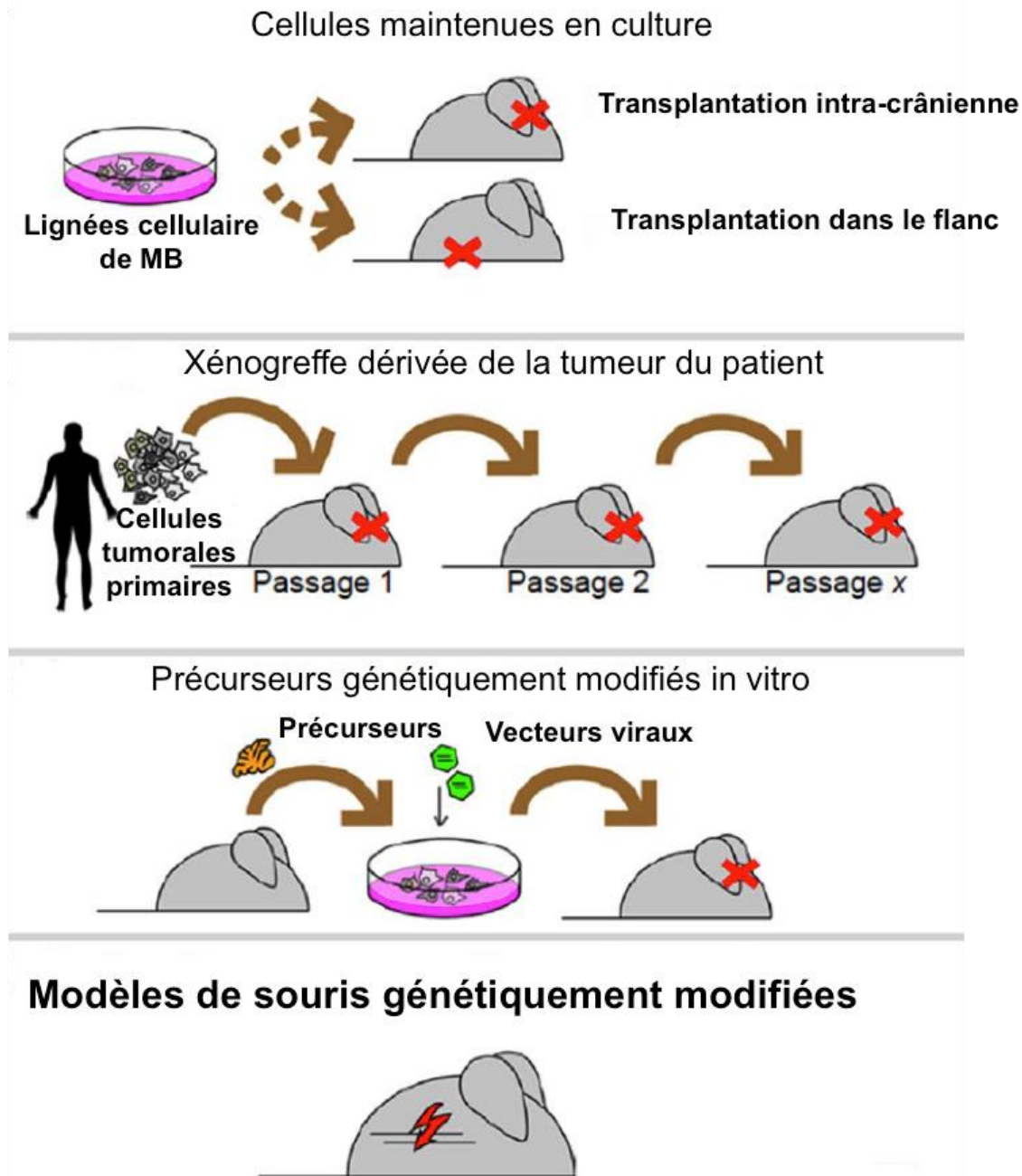


Figure 16: Les techniques permettant d'obtenir des modèles murins de médulloblastomes
Il existe deux types de modèles murins : les modèles de transplantation et les modèles de souris génétiquement modifiées. Adapté de Neumann et al. (2017).

La génération de modèles génétiquement modifiés constitue un progrès majeur pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la tumorigenèse et la production de nouveaux traitements. Par le passé, l'analyse de ces modèles a apporté des réponses précieuses sur le

fonctionnement de certains groupes de MB. En effet, jusqu'à très récemment, seuls les groupes WNT et SHH possédaient des modèles murins génétiquement modifiés mimant la formation de ces MB. Le groupe WNT, contrairement au groupe SHH, ne possède qu'un modèle généré par Gibson et al. en 2010 (Gibson et al., 2010). Cependant ce modèle a révolutionné notre compréhension des MB WNT. D'abord, il a permis de définir les cellules d'origines de ce groupe (les précurseurs de la lèvre rhombique inférieure) puis, plus tard ce même modèle a révélé que les vaisseaux sanguins des MB WNT présentaient une perméabilité anormale induisant l'accumulation des drogues thérapeutiques à l'intérieur des tumeurs. C'est sans doute pour cela que les patients atteints de ces tumeurs répondent le mieux aux thérapies et présentent le meilleur pronostic (Gibson et al., 2010; Phoenix et al., 2016).

Dans le cas des MB SHH, il existe plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées mais la plupart consistent soit en la mutation du récepteur Ptch1, soit en l'expression d'une forme dominante active de Smo, qui conduisent à l'activation constitutive de la voie Shh dans les cellules où la modification est présente. Ce dernier modèle a permis de définir les cellules d'origine des MB SHH comme étant les précurseurs des cellules granulaires du cervelet et du noyau cochléaire (Grammel et al., 2012). De plus, les modèles Shh ont également permis le développement d'essais de drogues thérapeutiques visant à inhiber la voie de signalisation Shh. Pour certains patients atteints de MB SHH, ces drogues ont déjà donné des résultats extrêmement favorables (Rudin et al., 2009; Robinson et al., 2015).

Pour les MB des groupes 3 et 4, les connaissances sont beaucoup plus restreintes. Pour le groupe 4, notre connaissance rudimentaire limite fortement la génération d'un modèle spécifique, pourtant indispensable pour mieux comprendre ces MB. Dans le cas du groupe 3, il existe, en plus des modèles de transplantation, depuis 2016, le modèle de souris génétiquement modifiée publié par Jenkins et al., faisant intervenir le système RCAS/*tv-a* (Jenkins et al., 2016). Même si ce modèle a apporté de nombreuses réponses sur le fonctionnement des MB du groupe, l'utilisation du promoteur de la *Nestine* pour diriger la surexpression de l'oncogène *c-Myc* ne permet pas de conclure quant à la cellule d'origine des MB du groupe 3.

Les médulloblastomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'enfant. Elles se développent à partir du cervelet ou des structures adjacentes. Les avancées récentes dans la compréhension de ces tumeurs ont permis de les stratifier en 4 groupes distincts qui possèdent des caractéristiques épidémiologiques et moléculaires différents. Pour la majorité de ces groupes, les chercheurs ont développé des modèles mimant la formation de MB similaires à ceux retrouvés chez l'homme. Cependant pour une meilleure compréhension de la biologie de

la maladie ainsi que pour une identification des événements qui transforment les cellules d'origine, ces modèles doivent être multipliés et améliorés en particulier pour les groupes 3 et 4 qui sont les MB les plus fréquents, les plus agressifs et pour lesquels on manque cruellement d'informations. Ces deux groupes partagent l'amplification génomique du facteur de transcription Otx2. Ce dernier est par ailleurs anormalement surexprimé dans 75% des MB. L'étude du rôle d'Otx2 dans les MB et son utilisation dans la génération de nouveaux modèles semble donc indispensable.

IV. Le facteur de transcription *Otx2*

Le facteur de transcription *Otx2* contrôle des fonctions essentielles au cours du développement mais assure également le maintien de certaines fonctions chez l'adulte.

IV.1. Biologie moléculaire du gène *Otx2*

IV.1.1. La famille *Otx2*

Le gène *Otx2* appartient à la famille des gènes *OTX*, présents dans tous les grands groupes du règne animal, depuis les cnidaires jusqu'aux vertébrés. Le premier gène de cette famille, *Otd*, fut caractérisé au début des années 90 par Finkelstein et al., qui recherchaient, suite à un crible chez la drosophile, des phénotypes aberrants au niveau de la tête (Finkelstein et al., 1990). Deux ans plus tard, l'équipe de Simeone caractérise les gènes *Otx*, *Otx1* et *Otx2*, chez la souris par homologie de séquence (Simeone et al., 1992). Un troisième membre de la famille, *CRX*, est découvert simultanément chez la souris et l'homme en 1997 (Chen et al., 1997). La famille des gènes *OTX* présente une forte conservation entre espèces (Simeone et al., 1992). Cette conservation de séquence reflète une forte conservation de fonction, à tel point qu'il est possible d'échanger certains gènes *OTX* d'une espèce par un gène *OTX* d'une autre espèce sans altérer les fonctions essentielles. Par exemple, les gènes humains *OTX1* et *OTX2* sont capables de prendre le relais chez la drosophile dont le gène *Otd* est mutant (Leuzinger et al., 1998). De la même manière, *Otd* peut corriger en grande partie les défauts des souris déficientes en *Otx1* (Acampora et al., 1998).

La partie de la protéine *OTX* la plus conservée au cours de l'évolution est l'homéodomaine, de type bicoïde, avec la présence, chez toutes les espèces, d'une lysine correspondant au neuvième acide aminé de la troisième hélice alpha, en position 50. De plus, sur les 60 acides aminés qui composent l'homéodomaine, au maximum une douzaine diffèrent entre les espèces dont la séquence est connue. Par exemple, l'homéodomaine des protéines humaines *OTX1*, *OTX2* et *CRX* présente respectivement 4, 2 et 10 acides aminés de différence avec celui de la protéine de drosophile *Otd* (Finkelstein et al., 1990). L'homéodomaine permet à la protéine *OTX2* de se lier à l'ADN en reconnaissant la séquence spécifique 5'-TAATCC-3' (Chatelain et al., 2006). La seule mutation de la lysine en position 50 perturbe la reconnaissance des membres de la famille *OTX* à l'ADN. Deux autres régions des protéines de la famille *OTX*, également assez conservées et présentes au moins chez tous les deutérostomiens, peuvent influencer l'activité de la protéine. La première est une séquence dupliquée de 12 à 13 acides

aminés située dans l'extrémité C-terminale et nommée « queue Otx ». Elle est impliquée dans l'activité transactivatrice du facteur de transcription (Zang et al., 2002). La seconde est le domaine WSP (Tryptophane, Sérine, Proline), retrouvé en position C-terminale de l'homéodomaine, qui semble également posséder une activité transactivatrice (Chau et al., 2000).

On distingue, chez la souris, trois membres de la famille *Otx* : *Otx1*, *Otx2* et *Crx*. Alors que les mutants *Otx1* et *Crx* présentent des défauts dans la formation de certains organes, du cortex cérébral, de l'oreille interne ou encore de l'œil, l'absence d'*Otx2* entraîne un phénotype « sans-tête » létal au huitième jour de la gestation (Figure 17) (Acampora et al., 1995; Simeone et al., 2002; Furukawa et al., 1999; Ang et al., 1996; Rhinn et al., 1998).

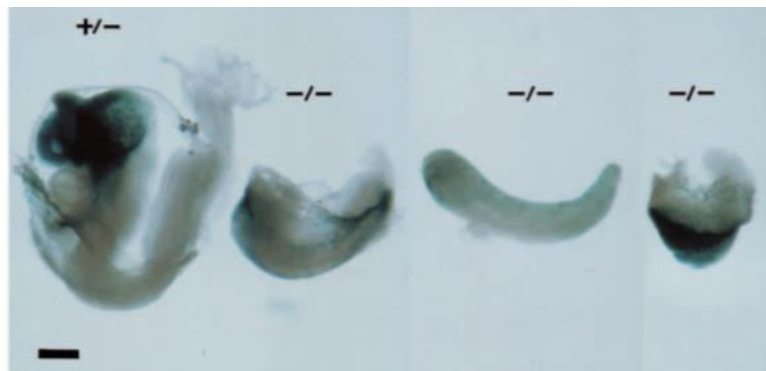


Figure 17: La mutation totale d'*Otx2* conduit à un phénotype "sans tête" à E8,5 dans les embryons de souris

Chez les mutant *Otx2*^{-/-}, le prosencéphale, le mésencéphale, ainsi que toutes les structures non-neurales de la tête sont absentes. D'après Acampora et al. (1995).

IV.1.2. Du gène à la protéine

Les gènes *Otx2* murin et humain possèdent 8 exons dont seuls les trois derniers sont codants (Figure 18A). L'étude des transcrits produits à partir du gène *Otx2* de souris, menée par Courtois et collègues, a révélé l'existence de 3 promoteurs alternatifs. En effet, 3 types de transcrits ont été identifiés, qui ne diffèrent que par leur séquence 5', laissant supposer que leurs sites d'initiation sont distincts (Courtois et al., 2003). Dans la suite de leur étude, Courtois et al. ont confirmé la présence de ces trois promoteurs, nommés A, B et C, du plus éloigné au plus proche de l'ATG initiant la séquence codante. Ces trois promoteurs ont une activité spatio-temporelle différente, parfois complémentaire. Les transcrits du promoteur C sont

majoritairement retrouvés dans les cellules souches embryonnaires mais l'activité de ce promoteur diminue au cours du développement. L'activité du promoteur A connaît une évolution inverse, et ses transcrits deviennent majoritaires chez l'adulte. Le promoteur B, à une activité tissu-spécifique dans les structures nerveuses sensorielles (rétine et bulbe olfactif) (Fossat et al., 2005).

En plus de posséder trois promoteurs, le gène *Otx2* est sujet à des épissages alternatifs, augmentant ainsi le nombre d'ARNm (ARN messenger) différents transcrits (Figure 18B). Cependant la traduction de ces ARNm aboutit uniquement à la production de 2 isoformes protéiques: *Otx2* et *Otx2L* de 289 et 297 acides aminés, respectivement. *Otx2L* possède 8 acides aminés (GPWASCPA) en plus par rapport à *Otx2*, situé 5 acides aminés en amont de l'homéodomaine (Figure 18C) (Courtois et al., 2003). Les deux formes OTX2 et OTX2L sont également présentes chez l'homme (). Le rôle de cette version longue, minoritaire, est encore à élucider.

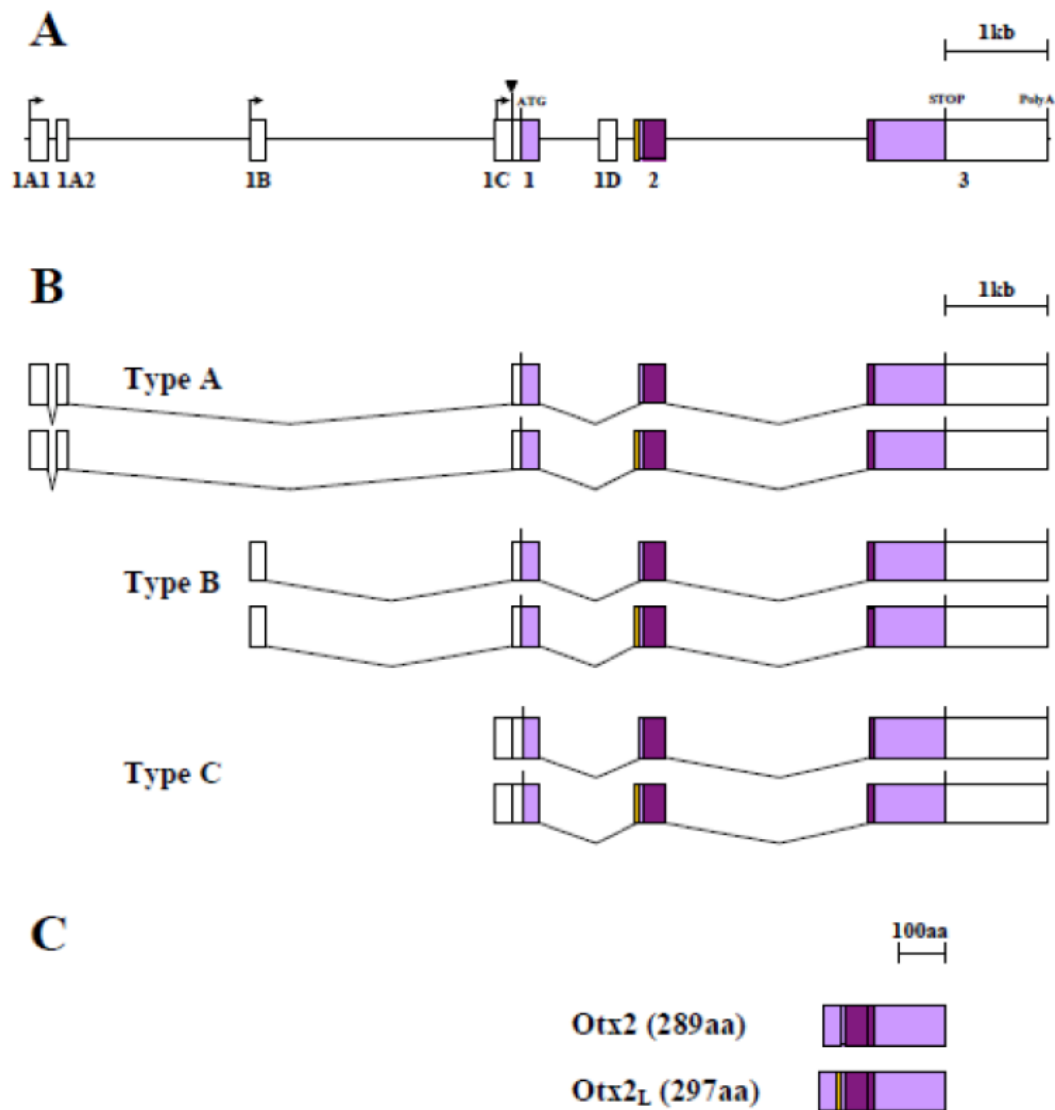


Figure 18: Organisation et expression du locus *Otx2* chez la souris

(A) Structure du locus *Otx2*. Les exons sont représentés par des rectangles dont les parties colorées figurent les régions codantes. Le rectangle jaune représente les 8 acides aminés supplémentaires de la protéine *Otx2L* et le rectangle violet foncé l'homéodomaine. (B) Les trois types d'ARNm produit à partir du locus *Otx2*. (C) La protéine *Otx2* et *Otx2L*. Adapté de Courtois et al. (2003).

IV.2. *Otx2*, un facteur clé dans le développement

Le facteur de transcription *Otx2* est impliqué dans un large panel de processus de développement, allant de la mise en place de l'axe antéro-postérieur durant les stades embryonnaires précoces à la formation tardive d'organes plus spécialisés tels que la rétine.

IV.2.1. Mise en place de l'axe antéro-postérieur

Les ARNm *Otx2* sont détectés chez la souris dès le stade E3,5 dans toutes les cellules de la masse interne de la blastula, cellules à partir desquelles l'embryon va se former (Kimura et al., 2001). Au stade E5,5, ils sont présents dans deux régions distinctes : l'endoderme viscéral et l'épiblaste. Dans l'endoderme viscéral, l'expression est plus forte du côté distal. Elle persiste dans les cellules de ce compartiment pendant qu'elles migrent antérieurement entre E5,5 et E6,5 (Kimura et al., 2000). A la fin de la gastrulation, l'expression d'*Otx2* est restreinte au tiers antérieur dans les trois feuilletts embryonnaires (Ang et al., 1994). Chez les mutants *Otx2*^{-/-} des défauts de morphologie sont visibles dès E7,5 et se caractérisent par la présence d'une constriction entre les parties embryonnaire et extra-embryonnaire. De plus les cellules de l'endoderme viscéral distal ne s'antériorisent pas. À E8,5, toutes les structures antérieures au rhombomère 3 sont manquantes et les embryons meurent. L'analyse de ces mutants a révélé qu'*Otx2* est indispensable à l'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'embryon et à l'induction du neuro-ectoderme antérieur à l'origine du prosencéphale, du mésencéphale et de la partie antérieure du rhombencéphale (Acampora et al., 1995; Ang et al., 1996).

IV.2.2. Maturation du cerveau antérieur et définition de la limite mésencéphale-métencéphale

Une fois l'axe antéro-postérieur défini, des centres organisateurs locaux se mettent en place, permettant de subdiviser le neuro-ectoderme. Le plus caractérisé de ces organisateurs est l'IsO localisé à la limite du mésencéphale et du rhombencéphale. À E8,5, *Otx2* est exprimé dans la partie antérieure à cette limite, dans l'ensemble du prosencéphale, qui deviendra le télencéphale, le diencephale et dans le mésencéphale. Ce patron d'expression est maintenu jusqu'à E10,5, stade où *Otx2* disparaît du télencéphale ventral, puis de la partie dorsale à E11,5. Dans le diencephale à E12,5, l'expression du gène *Otx2* se régionalise dans les territoires qui formeront l'hypophyse postérieure et l'épiphyse. Dans le mésencéphale, l'expression d'*Otx2* est homogène jusqu'à E11,5 puis elle se restreint pour n'être plus détectée que dans les futurs colliculi inférieurs et supérieurs (Acampora et al., 1995; Simeone et al., 1992; Mallamaci et al., 1996). Dans les différentes structures où il est présent, *Otx2* est nécessaire pour la formation des tissus définitifs comme l'ont montré des études sur les mutants hétérozygotes (Matsuo et al., 1995). Dans le mésencéphale, son rôle ne se limite pas à la formation des structures dérivées, puisqu'il est là indispensable au maintien de l'ISO, dont le positionnement a des conséquences à la fois sur le cerveau antérieur et médian mais également sur le cerveau postérieur, en particulier le cervelet. En effet, l'absence de la protéine *Otx2* dans un contexte mutant pour le

gène *Otx1* a pour conséquence le changement d'identité de mésencéphale et une partie du diencéphale en métencéphale (Acampora et al., 1997). Il semblerait donc qu'une dose complète de facteur de transcription *Otx* soit nécessaire pour le bon positionnement de l'IsO. De plus, l'induction ectopique d'*Otx2* dans le futur métencéphale grâce au promoteur *Engrailed 1* (*En1*) déplace l'IsO vers l'arrière conduisant à une postériorisation des colliculi et à la perte du vermis antérieur du cervelet (Broccoli et al., 1999).

IV.3. Otx2 dans le rhombencéphale

Alors que *Otx2* est exprimé uniquement dans le dans le cerveau antérieur, avec comme limite postérieure l'IsO tôt dans le développement, on observe l'induction de son expression plus tard dans la partie postérieure du CNS. En effet à E9,5, *Otx2* commence à être exprimé dans la plaque du toit qui couvre le 4^{ème} ventricule et qui donnera les plexus choroïdes. Chez la souris adulte, *Otx2* est retrouvé dans le cervelet postérieur ainsi que dans certaines cellules du pont (Courtois et al., 2003; Fossat et al., 2005).

IV.3.1. Otx2 dans les plexus choroïdes

Otx2 présente une expression marquée dans les plexus choroïdes durant leur développement. Il apparaît dans cette structure dès leur mise en place à E9,5 et s'y maintient jusqu'à l'âge adulte (Boncinelli et al., 1993; Simeone et al., 1993; Courtois et al., 2003; Fossat et al., 2007). La concentration de la protéine *Otx2* semble d'ailleurs particulièrement élevée dans ces structures (Fossat et al., 2007; Johansson et al., 2013). L'importance de l'expression d'*Otx2* dans les plexus choroïdes a été suspectée dès les années 90, après avoir remarqué que les souris *Otx2*^{+/-} présentaient des hydrocéphalies, en plus de certaines anomalies au niveau du SNC telles que des ventricules latéraux dilatés et un cervelet ballonné, dues à la présence d'un excès de liquide cérébro-spinal (Makiyama et al., 1997). Alors que les plexus de ces souris ne présentent pas d'anomalie morphologique, cette hydrocéphalie a amené les auteurs à supposer que la mutation d'*Otx2* pouvait affecter la qualité et la quantité du CSF sécrété par les plexus choroïdes. En 2013, Johansson et al, en font la démonstration. Grâce à l'utilisation du système Cre-lox, ils ont pu provoquer l'ablation du gène *Otx2* dans les plexus choroïdes à différents moments du développement. L'ablation tardive entraîne un 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 la prolifération des cellules corticales et, à long terme, sur la composition des couches du cortex cérébral. L'ablation précoce d'*Otx2*, vers E9,5, conduit, quant à elle, à l'absence totale des

plexus choroïdes (Johansson et al., 2013). *Otx2* est donc nécessaire à la fois à la formation des plexus choroïdes mais également à leur bon fonctionnement, dont l'altération affecte le développement de structures adjacentes.

IV.3.2. *Otx2* dans le développement normal et tumoral du cervelet

L'expression d'*Otx2* débute tardivement dans le cervelet en développement. A E14,5, son ARNm est présent dans la lèvre rhombique du R1 ainsi que dans les GCP les plus postérieurs, ayant quitté la RL tout récemment (Fossat et al., 2005). Juste avant la naissance, son expression est décrite dans les GCP de l'EGL postérieur du cervelet avec un gradient croissant antéro-postérieur allant du lobule VI au lobule X. Après la naissance, l'expression d'*Otx2* est maintenue dans les GCP pendant leur phase de prolifération intense, puis à un moindre niveau dans les cellules granulaires du cervelet postérieur, après leur différenciation et leur migration dans l'IGL (Figure 19A). A noter que la persistance de l'expression d'*Otx2* dans le cervelet adulte chez la souris n'est pas retrouvée chez l'homme. A l'exception d'une expérience montrant que le Knock out d'*Otx2* à E16,5 conduit à une atrophie du cervelet postérieur et à défaut de foliation, il n'existe aucune information concernant le rôle d'*Otx2* dans le développement du cervelet (Figure 19B) (Fossat et al., 2006). L'élucidation de la fonction d'*Otx2* dans le développement du cervelet semble donc aujourd'hui indispensable, ne serait-ce que pour comprendre comment son altération est liée à la formation de MB. En effet, chez l'homme, *OTX2* est anormalement surexprimé dans 75% des MB (de Haas et al., 2006). En plus de cette surexpression, une amplification génomique d'*OTX2* est retrouvée dans 21% des MB, en particulier dans les groupes 3 et 4 (Figure 19D). En réalité, l'amplification d'*OTX2* est l'amplification focale (moins de 10kb) la plus retrouvée dans les MB. Ce type d'amplification est d'autant plus intéressante qu'elle serait stratégiquement sélectionnée par les cellules tumorales pour accroître leur potentiel de prolifération (Adamson et al., 2010; Boon et al., 2005; de Haas et al., 2006; Di et al., 2005; Northcott et al., 2011). De manière surprenante, la surexpression et l'amplification focale d'*OTX2* ne sont pas observées dans les MB du groupe SHH (Adamson et al., 2010).

Le rôle oncogénique d'*OTX2* dans la formation de MB a été suggéré par de nombreuses expériences, conduites essentiellement dans des lignées cellulaires de médulloblastome. L'invalidation d'*OTX2* dans des lignées cellulaires dérivées de MB du groupe 3 ou 4, ou dans des cellules souches embryonnaires transformées, présentant toutes un niveau élevé de la protéine *OTX2*, conduit à un arrêt de la prolifération et à une augmentation de l'apoptose et de

la différenciation (Bunt et al., 2012; Kaur et al., 2015). De plus, une étude publiée par Adamson et collègues en 2010, montre que la xéno greffe de cellules surexprimant *OTX2* dans des souris immunodéficientes génère plus souvent des tumeurs que si cette greffe est réalisée avec des cellules ayant un niveau normal d'*OTX2*. Dans la même étude, les auteurs effectuent également la transplantation de cellules de la lignée D425, qui dérive de MB du groupe 3, après y avoir inhibé ou pas l'expression d'*OTX2* à l'aide de Sh-RNA (Short hairpin RNA). Alors que la transplantation des cellules D425 induit la formation de tumeurs dans 100% des cas, les cellules D425 préalablement transfectées avec les Sh-RNA anti-Otx2 forment des tumeurs beaucoup plus petites, et moins pénétrantes (Figure 19E). L'analyse moléculaire de ces tumeurs révèle que dans le cas où *OTX2* est inhibé, l'expression de *c-MYC* est diminuée, suggérant que ces deux facteurs pourraient participer à une voie commune de régulation. En ligne avec cette hypothèse, une étude suggère qu'*OTX2* et c-Myc partagent plusieurs sites de fixation situés en amont de régions promotrices, et que la population des gènes en aval de ces régions est enrichie en gènes spécifiques des médulloblastomes et des cellules souches. De plus *Otx2* est capable de se lier directement au promoteur de *c-MYC* et inversement (Bunt et al., 2011). A l'inverse, l'expression ectopique d'*OTX2* dans des cellules épithéliales immortalisées ou dans des progéniteurs neuronaux dérivés de cellules souches embryonnaires augmente leur prolifération et leur tumorigenèse (Adamson et al., 2010; Bunt et al., 2010; Kaur et al., 2015).

L'ensemble des expériences précédentes, suggère qu'à un niveau élevé d'expression, *Otx2* pourrait favoriser la prolifération et l'oncogenèse dans le contexte *in vitro*, dans des lignées cellulaires, ou après leur transplantation dans le cerveau. Il n'existe qu'une seule expérience, publiée par Wortham et collègues, qui a étudié l'effet de la surexpression ectopique d'*Otx2* dans un contexte totalement *in vivo*. Dans ces travaux, les auteurs surexpriment *Otx2* dans les cellules souches neurales de cerveaux de souris, grâce à l'utilisation d'une lignée pilote GFAP-Cre. Il en résulte une hyperplasie de cellules qui ressemblent fortement à des GCP au niveau du cervelet (Wortham et al., 2012).

En conclusion, l'ensemble de ces travaux suggère qu'*OTX2* pourrait stimuler la prolifération des GCP dans le cervelet et que l'expression aberrante de ce gène pourrait contribuer à leur tumorigenèse. Néanmoins, ces fonctions n'ont pas été clairement abordées dans le cadre du cervelet en développement. Par ailleurs, la question se pose toujours de savoir si la surexpression d'*Otx2* dans les MB est une cause de la formation de la tumeur, ou si elle est sélectionnée par les cellules tumorales pour favoriser leur maintien dans un état prolifératif. Enfin, il n'est pas encore compris pourquoi la surexpression d'*Otx2* n'est pas retrouvée dans

les MB du groupe Shh, alors que les seules cellules d'origine de ces tumeurs sont majoritairement les GCP.

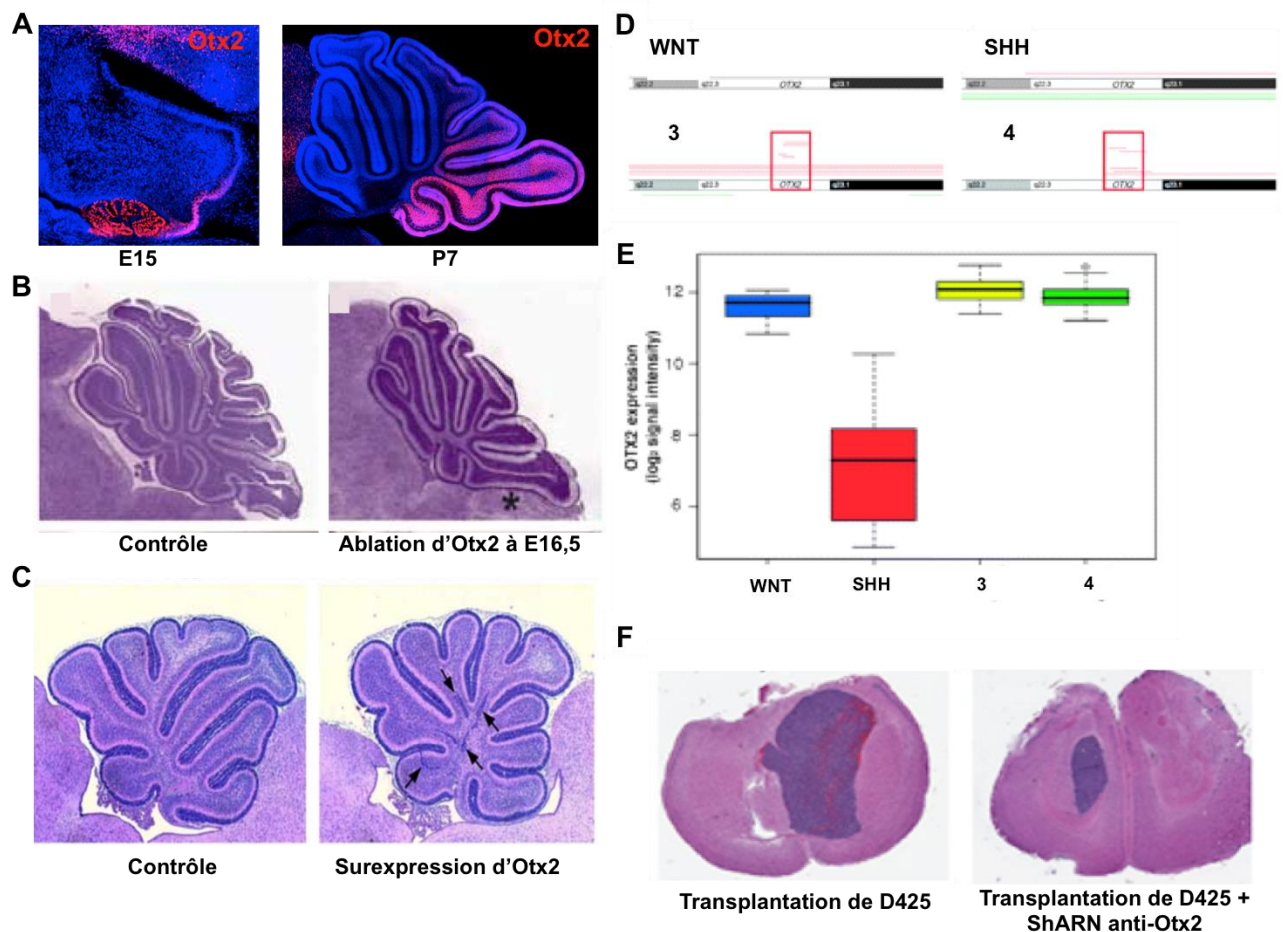


Figure 19: Otx2 dans le développement normal et tumoral du cervelet

(A) Expression d'Otx2 durant le développement du cervelet. La protéine Otx2 est détectée dans les précurseurs des cellules granulaires du cervelet postérieur à E15. À P7, Otx2 est présent à la fois dans les précurseurs des cellules granulaires et dans les cellules granulaires après leur différenciation et leur migration dans la couche granulaire interne. (B) et (C) Etudes *in vivo* de la fonction d'Otx2 dans le cervelet. Seules deux études ont abordé la fonction d'Otx2 dans le cervelet. (B) La première, menée par Fossat et collègues, a démontré que l'ablation conditionnelle d'Otx2 à E16,5 conduit à la formation d'un cervelet atrophie et à un défaut de foliation (étoile) observable à P10. (C) Dans la seconde, menée par Wortham et collègues, la surexpression d'Otx2 dans les précurseurs neuronaux du cervelet conduit à une hyperplasie de cellules (flèches noires) ressemblant fortement à des précurseurs de cellules granulaires. (D) Analyse de l'amplification génomique d'Otx2 dans les 4 groupes de MB. Seuls les groupes 3 et 4 présentent des amplifications focales d'Otx2. (E) L'ARNm d'Otx2 a été analysé dans un ensemble de médulloblastomes primaires. A l'exception du groupe Shh, tous les autres groupes présentent une surexpression d'Otx2. (F) L'inhibition d'Otx2 réduit considérablement la taille des tumeurs. La transplantation de cellules de la lignée tumorale D425 induit la formation de tumeurs dans le cerveau des souris. Le traitement de cette lignée avec des ShRNA anti-Otx2 avant la transplantation réduit fortement la taille de la tumeur. Adapté de Fossat et al., (2006), Wortham et al., (2012), Adamson et al., (2010).

IV.4. Un modèle murin pour étudier les fonctions d'Otx2

Afin de pouvoir explorer les fonctions du facteur de transcription Otx2 à différentes étapes du développement neural, mais également chez l'adulte, l'équipe de Thomas Lamonerie a généré un modèle de souris, qui repose sur le système *CreERT2/loxP*, où l'invalidation conditionnelle du gène *Otx2* est possible (Fossat et al., 2006). Dans ce but, les deux allèles *Otx2* ont été modifiés. Sur l'un des allèles, la région codante pour le gène *Otx2* a été remplacée par le gène recombinant *CreERT2*. Sur le second, l'exon codant la plus grande partie de l'homéodomaine est flanqué de sites *loxP*. Le gène *CreERT2* code la recombinase Cre fusionnée à un domaine du récepteur à l'estrogène (ER pour estrogen receptor) modifié de manière à lier, à la place des estrogènes, une molécule chimique : le tamoxifène. En temps normal, les cellules ayant leur promoteur Otx2 actif expriment, de manière hétérozygote, à la fois la protéine Otx2 et la protéine CreERT2, qui reste séquestrée dans le cytoplasme via la liaison du domaine ERT2 aux chaperones de type HSP70. Après injection de tamoxifène à un temps t, le domaine ERT2 change de conformation, ce qui libère la CreERT2, qui est alors transloquée dans le noyau où elle excise une partie du gène *Otx2* en effectuant une recombinaison entre les sites *loxP*. Il en résulte un KO (Knock Out) d'Otx2.

Ce modèle a l'avantage de permettre une invalidation temporelle et spatiale d'Otx2. En effet, seules les cellules exprimant *Otx2* au moment de l'injection de tamoxifène perdront définitivement leur capacité à exprimer Otx2.

Nous verrons par la suite que dans mes travaux de thèse, en plus d'utiliser ce modèle tel quel pour étudier le rôle d'Otx2 dans le développement normal du cervelet, je l'ai utilisé en combinaison avec plusieurs lignées murines permettant l'expression inductible de différents gènes d'intérêt : la YFP, pour réaliser le lignage des cellules exprimant Otx2, SmoM2, pour induire la formation de MB de type Shh, uniquement dans les cellules exprimant Otx2, ou le variant c-MycT58A, pour mimer la formation de MB du groupe 3, également dans cellules exprimant *Otx2*.

OBJECTIFS

Otx2 est un facteur de transcription exprimé dans les précurseurs des cellules granulaires du cervelet et surexprimé dans les MB Shh-indépendants. Son rôle oncogénique a été largement étudié *in vitro*. Cependant, sa fonction dans le développement des cellules à l'origine des médulloblastomes, ou encore les raisons pour lesquelles il n'est pas sélectionné et surexprimé dans les MB Shh-dépendants, reste un mystère. Cette thèse vise à élucider ce processus en répondant aux questions suivantes :

- Quelle est la fonction d'Otx2 dans le contrôle de la prolifération des précurseurs des cellules granulaires ?
- Otx2 a-t-il une fonction dans la tumorigenèse Shh-dépendante ?
- Comment Otx2 spécifie-t-il la production de GCP à partir de la lèvre rhombique ?

Enfin, un dernier objectif de cette thèse est de produire, pour la première fois, un modèle de souris génétiquement modifiée mimant la formation de médulloblastome du groupe 3, qui surexprime c-Myc et Otx2 et représente l'une des formes les plus agressives de la maladie.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Projet 1 : Étude de la fonction d'Otx2 dans la prolifération normale et tumorale des précurseurs des cellules granulaires du cervelet

Le développement du cervelet est caractérisé par une amplification mitotique des GCP qui conduit à la formation d'un nombre impressionnant de neurones granulaires dans le cervelet mature (80 milliards chez l'homme). Chez la souris, les GCP prolifèrent dans la couche granulaire externe du cervelet entre E17,5 et la fin de la seconde semaine après la naissance en réponse au mitogène Shh, sécrété par les cellules de Purkinje. Cette phase de prolifération intense rend les GCP particulièrement vulnérables à la tumorigenèse et explique sans-doute pourquoi ils constituent les cellules d'origine de différents groupes de MB.

Dans cette étude nous avons, dans une première partie, analysé le rôle d'Otx2 au sein même des GCP du cervelet pendant leur phase de prolifération intense. Cette approche, est basée sur l'utilisation de souris génétiquement modifiées permettant d'identifier et d'analyser les GCP exprimant Otx2 dans le cervelet en développement, puis de réaliser son ablation conditionnelle pendant la période postnatale. Elle nous a permis de démontrer, pour la première fois :

- qu'Otx2 est nécessaire à la prolifération d'une sous-population de GCP dans le cervelet postérieur
- qu'Otx2 stimule la prolifération de ces cellules parallèlement à la voie de signalisation Shh

Dans la seconde partie de cette étude, nous avons étudié les conséquences de l'ablation d'Otx2 dans le contexte de la formation des MB de type Shh, qui dérivent directement des GCP, et obtenu des résultats extrêmement intéressants : alors qu'Otx2 ne semble pas impliqué dans l'initiation de ces tumeurs, sa présence est indispensable à leur maintien. Cette dernière information révolutionne notre compréhension de la fonction d'Otx2 dans les MB Shh-dépendants, mais également dans les autres groupes.

L'ensemble de ces résultats font l'objet d'un article soumis dans le journal *Oncogene* sous le titre « Shh-independent control of proliferation of normal and tumoral granule cell precursors by Otx2 *in vivo* » par [Salsabiel El Nagar](#), Almahdi Chakroun, Coralie Le Greneur, Dominique Figarella-Branger, Thomas Di Meglio, Thomas Lamonerie et Nathalie Billon.

Shh-independent control of proliferation of normal and tumoral granule cell precursors by Otx2 *in vivo*

Salsabiel El Nagar ⁽¹⁾, Almahdi Chakroun ⁽¹⁾, Coralie Le Greneur ⁽¹⁾, Dominique Figarella-Branger ^(2, 3), Thomas Di Meglio ⁽⁴⁾, Thomas Lamonerie ⁽¹⁾*, Nathalie Billon ⁽¹⁾*

*Co-senior authors

(1) Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, France.

(2) Aix-Marseille Université, Inserm, CRO2 UMR_S 911, Marseille, France.

(3) APHM, Hôpital de la Timone, Service de Radiothérapie, Marseille, France.

(4) Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Espagne.

Corresponding author:

Nathalie Billon. Institut de Biologie Valrose (iBV), CNRS UMR7277, Inserm U1091, UCA - Bâtiment Sciences Naturelles, Faculté des sciences, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France. Phone: 33 (0)4.92.07.69.94. Fax: 33 (0)4 93 37 70 58. Mail : billon@unice.fr.

Running title:

Otx2 promotes GCP proliferation and type-2 MB maintenance

Authors Statements

The authors state that the present manuscript presents original research that has not been previously published and is not being considered for publication elsewhere. None of the authors declares any conflict of interest.

Abstract

The developmental gene *OTX2* is expressed by cerebellar granule cell precursors (GCPs), a cell population which undergo massive expansion during the early postnatal period in response to sonic hedgehog (Shh). GCPs are thought to be at the origin of most medulloblastoma, a devastating pediatric cancer that arises in the developing cerebellum. *OTX2* is overexpressed in the large majority of medulloblastoma, but intriguingly, such overexpression is never found in Shh-dependent type 2 medulloblastoma, although they arise from GCPs. This has led to the current view that *Otx2* is not involved in tumorigenesis of this subgroup. How *Otx2* might contribute to normal or tumoral development *in vivo* remains unresolved. Here we have investigated, for the first time, the physiological function of this factor in regulating proliferation and tumorigenesis in the developing mouse cerebellum. We first characterized *Otx2*-expressing cells in the early postnatal cerebellum and showed that they represent a unique subpopulation of highly proliferative GCPs. We next performed *in vivo* loss of function analysis to dissect out the role of *Otx2* in these cells and identified a novel, Shh-independent function for this factor in controlling postnatal GCP proliferation and cerebellum morphogenesis. Finally, we addressed the function of *Otx2* in the context of type 2 Medulloblastoma by directing Shh-dependent tumour formation in *Otx2*⁺ cells of the developing cerebellum and assessing the effects of *Otx2* ablation in this context. We unravel an unexpected, mandatory function for *Otx2* in sustaining cell proliferation and long-term maintenance of these tumours *in vivo*, therefore bringing unpredicted insight into the mechanisms of type 2 medulloblastoma subsistence. Together, these data pinpoint, for the first time, a crucial Shh-independent role for *Otx2* in the control of proliferation of normal and tumoral granule cell precursors *in vivo* and make it an attractive candidate for targeted therapy in both Shh-dependent and Shh-independent medulloblastomas.

Keywords: *Otx2*, medulloblastoma, proliferation, granule cell precursors, cerebellum, Sonic hedgehog

Introduction

Cerebellum development in mammals is characterized by post-natal transit amplification of granule cell precursors (GCPs), leading to tremendous numbers of granule neurons (80 billion in humans) in the mature cerebellum (1). In mice, GCP development proceeds along two phases: (1) between embryonic day 12.5 (E12.5) and 16.5, cells exiting the rhombic lip migrate at the surface of the cerebellum anlage to establish the external granule layer (EGL), and (2) after E16.5, GCPs proliferate intensely in the EGL up to postnatal day 15 (P15), before they exit the cell cycle and migrate inwards to take up their final position in the internal granular layer (IGL). This extended proliferation makes GCPs particularly vulnerable to malignant transformation, and explains why they constitute the cell of origin for different groups of medulloblastoma (2). GCPs proliferate in response to the mitogen Shh, secreted by the underlying Purkinje cells (3, 4). Shh binds to the trans-membrane receptor Patched (Ptch), relieving Ptch repression of the G-coupled receptor Smoothed (Smo) and thereby allowing activation of the transcription activator Gli2 and inhibition of the transcriptional repressor Gli3 (5). Translocation of Gli2 into the nucleus induces the transcription of pro-proliferative genes, such as the cell cycle regulators Cyclin-D1, Cyclin-D2 and Cyclin-E (6). Shh also stimulates the expression of the transcription factor N-Myc, which has recently been shown to exert a critical function in promoting GCP proliferation through up-regulation of cyclin-D2 expression (7-9).

Medulloblastoma mainly arise in the developing cerebellum, with a peak of incidence at the age of 7. Treatments are very debilitating and despite some progress, the overall mortality rate remains high, reaching 50% for certain forms. Genetic and molecular analyses of these tumours have identified dysfunction of signaling pathways that promote mitogenic stimulation of cerebellar precursors, or their growth arrest after transit amplification (10). For instance, mutations in *PTCH1*,

SMO, or *SUFU*, and somatic amplification of *GLI2* and *MYCN*, all deregulating Sonic hedgehog (SHH) signaling, define subgroup 2 medulloblastoma (or ‘SHH’ subgroup). Murine models harboring some of these alterations develop type-2 medulloblastoma, confirming that they constitute common drivers for tumour formation (10). Non-SHH medulloblastoma mouse models were also created by overexpressing c-Myc in proliferating precursors of the cerebellum, mimicking human subgroup 3 (11, 12), or through genetic manipulation of the WNT pathway, associated to human subgroup 1 (13).

Among recurrent genetic alterations found in medulloblastoma, one of the most frequent concerns the homeodomain OTX2 transcription factor. OTX2 is a developmental actor well known for its critical role in early central nervous system and sensory organ development (14). OTX2 is expressed by granule cell precursors throughout their massive expansion in the developing cerebellum (15). Examination of large cohorts has revealed that OTX2 is overexpressed in more than 75% of primary medulloblastomas, and often correlates with classic histology and vermis localization (16). Surprisingly, overexpression and focal gain of OTX2 were not observed in primary tumours and cell lines of the SHH subgroup (17-20). In contrast, OTX2 was found to be recurrently amplified in group 3 and group 4 medulloblastomas, the most aggressive albeit less understood forms of the disease (10). The oncogenic role of OTX2 in the formation of cerebellar tumours has been further supported by functional data showing that silencing of OTX2 expression in medulloblastoma cell lines reduces their proliferation potential *in vitro* and their tumorigenic properties (17, 18, 21, 22). Conversely, ectopic expression of OTX2 in immortalized epithelial cells or embryonic stem cell-derived neural precursors increases their proliferation and tumorigenicity (17, 19, 23). Finally, ectopic expression of Otx2 in the mouse hindbrain induces hyperplasia in the cerebellum and brainstem, with cerebellar proliferative foci evocative of GCPs (24). Together, these experiments suggest that the oncogenic function of Otx2 in tumorigenesis could be attributed, at least in part, to its ability to stimulate GCP proliferation. However, how Otx2 might influence GCP proliferation *in vivo* during normal cerebellum development, and how aberrant expression of Otx2 in these cells might contribute to medulloblastoma formation, is currently unknown. In particular, it is not clear whether the high frequency of Otx2 overexpression in medulloblastoma is a driving force for tumour formation, or if it is selected by tumour cells because it ensures their long-term maintenance. In addition, it is not understood why Otx2 overexpression is not found in type 2 medulloblastoma where the Shh pathway is over-activated, as this subtype is known to originate from GCPs.

Here we have used unique mice models to investigate the function of the developmental transcription factor Otx2 in the proliferation of normal and tumoral cerebellar granular cell precursors *in vivo*. We have identified a unique, Shh-independent function for this factor in controlling postnatal GCP proliferation and cerebellum morphogenesis. Most importantly, our findings also unexpectedly highlight, for the first time, a mandatory role for Otx2 in sustaining long-term GCP tumoral proliferation and maintenance of type 2-medulloblastoma *in vivo*.

Results

Otx2-expressing granule cell precursors have an increased proliferative index

We analyzed Otx2 expression in the postnatal mouse cerebellum between P1 and P7, since these stages cover the rise and peak of proliferation of granule cell precursors. Otx2 appeared restricted to the posterior cerebellum (Fig.1A). It was strongly expressed in Ki-67+/EdU+ proliferating GCPs of the outer EGL as well as in post-mitotic, granule cells of the inner EGL and of the IGL, although to a lesser extent (Fig.1B).

We next used an *Otx2*^{+/*Otx2*-GFP} knock-in mouse line to compare the proliferative potential of freshly purified Otx2+ and Otx2- GCPs (Fig.1C). This line expresses a functional fluorescent Otx2-GFP

fusion protein from the endogenous *Otx2* locus, and recapitulates normal *Otx2* expression and activity (25). *Otx2*⁺ and *Otx2*⁻ progenitors could readily be separated by FACS analysis based on GFP expression, with *Otx2*⁺ (GFP⁺) cells representing around 40% at P7 (Fig. 1D). *Otx2*⁺ GCPs showed a higher proliferative index, with a 20 to 40% increase of Ki67 expression and a 20 to 50% increase of EdU incorporation compared to their *Otx2*⁻ counterparts (Fig.1E), suggesting that *Otx2* may act as positive regulator of GCP proliferation in the developing cerebellum.

***Otx2* cell-autonomously controls GCP proliferation and development of the postnatal cerebellum**

To assess the function of *Otx2* in the regulation of GCP proliferation, we examined the effects of *Otx2* ablation in the early postnatal cerebellum using a conditional self-knockout (sKO) *Otx2*^{CreERT2/flox} mouse line (15). A “non-floxed” *Otx2*^{CreERT2/+} line was used as a control (Fig.2A). We triggered *Otx2* sKO through a single pulse of tamoxifen at P1, which led to complete *Otx2* invalidation (Fig.2B-C), and analyzed its short-term effect on GCP proliferation (Fig. 2D). Quantification of EdU incorporation in posterior lobules (that expressed *Otx2* before sKO) revealed a marked reduction in the number of proliferating GCPs in sKO mice at both P3 and P5 (Fig.2D-E), with a 18%, 14% and 38% decrease in lobules VIII, IX and X at P5, respectively (Fig.2E). In contrast, no significant change could be found in anterior lobules.

We next asked whether the reduction of GCP proliferation observed in *Otx2* sKO mice could affect cerebellum development and morphogenesis (Fig.3). While at P3, no significant defect could be observed, from P5, *Otx2* sKO cerebellum appeared smaller, with specific size alteration of the posterior lobules VIII, IX and X, and lacked the fissure of lobule IX characteristic of this stage of development (Fig.3A, upper panels). At the adult stage, mutant mice exhibited an even more severe phenotype, with their cerebella significantly atrophied (Fig. 3A, lower panels). Quantification showed an overall reduction of cerebellum size of 23% in mutants compared to controls (Fig.3B). This atrophy was still obvious at P30, suggesting that *Otx2* ablation caused an immediate proliferation defect that was maintained over into adulthood. The dramatic reduction in sKO cerebellum size was entirely attributable to an atrophy of posterior lobules VIII, IX and X (Fig.3C), since no significant change could be observed in the non-*Otx2* expressing anterior lobules (data not shown).

Together, these data suggest that *Otx2* is necessary for the correct development and morphogenesis of the cerebellum through a cell-autonomous regulation of GCP proliferation in the posterior cerebellum.

***Otx2* controls GCP proliferation independently of Shh**

To identify the molecular mechanisms underlying *Otx2*-mediated regulation of GCP proliferation and lobule morphogenesis, we assessed the consequences of *Otx2* sKO on the expression of a series of signaling molecules and cell cycle regulators. Since Shh is required both for the proliferative expansion of GCPs in the postnatal EGL and the correct patterning of the cerebellum, we first compared the expression of effectors of the Shh signaling pathway in control and *Otx2*-sKO cerebella at P3 and P5 (Fig.4). This analysis did not show any significant difference, indicating that *Otx2* does not stimulate proliferation through controlling the transcription of Shh pathway effectors (Fig. 4A). In contrast, *Cdkn2d* (p19), *Cdkn1b* (p27), and *Cdkn1c* (p57), three CDK inhibitors (CDKI) involved in blocking the G1 to S-phase transition, were up-regulated upon *Otx2* ablation at P3 and/or P5 (Fig.4B), suggesting that sKO-induced GCP hypoplasia could result from a block of the cell cycle. In accordance with this hypothesis, comparison of the cell-cycle distribution of P7 *Otx2*⁺ and *Otx2*⁻ GCPs by FACS analysis showed an increased proportion in G1-phase and a decreased proportion in S-phase in *Otx2*⁻ cells (Fig.4C,D).

Together, these data suggest that *Otx2* stimulates GCP proliferation independently of Shh by directly releasing the G1/S transition of the cell cycle.

***Otx2* is critical for long-term maintenance of Shh-dependent medulloblastoma**

The demonstration of a novel, Shh-independent control of GCP proliferation by Otx2 brought by the present work, as well as the fact that Otx2 overexpression is never found in Shh-dependent medulloblastoma, strongly suggest that Otx2 is not involved in tumorigenesis of this subtype. To definitely prove this hypothesis, we created a novel *in vivo* model of Shh-dependent medulloblastoma by directing constitutive expression of an activated form of Smoothed (SmoM2) (26) in Otx2+ GCPs ($Otx2^{CreERT2/+};R26^{SmoM2/SmoM2}$ line), and next investigated Otx2 function in tumour cell proliferation by simultaneous Otx2 ablation ($Otx2^{CreERT2/flox};R26^{SmoM2/SmoM2}$ sKO line).

Tamoxifen induction of SmoM2 in the early postnatal cerebellum resulted in a rapid over-proliferation of GCPs, followed by the formation of neoplastic lesions restricted to the posterior cerebellum in $Otx2^{CreERT2/+};R26^{SmoM2/SmoM2}$ line, reflecting Otx2 expression pattern (Fig.5). While at P11 the majority of cerebellar GCPs had already stopped dividing in control animals, their EGL being reduced to a few rows of cells, $Otx2^{CreERT2/+};R26^{SmoM2/SmoM2}$ displayed EGL hyperplasia and extended GCP proliferation, as shown by the persistence of several rows of EdU+ cells in posterior lobules (Fig. 5A). Quantification of Ki67+ cells by FACS analysis indicated that more than 75% of GCPs were still proliferating at P16 (data not shown), of which 20% were EdU+ (Fig.5B). By P30, these mice displayed diffuse tumours encompassing the posterior cerebellum. Tumour proliferation was often observed in the lepto-meningeal space, without invasion of the cerebellar parenchyma. Histological analysis revealed the presence of 'small round blue' pleomorphic cells with hyperchromatic nuclei, often associated with the 'classical' forms of medulloblastoma in humans, but no cell wrapping or marked nucleoli as seen in anaplastic or large cells medulloblastomas, respectively (Fig.5C). As expected, simultaneous ablation of Otx2 in the $Otx2^{CreERT2/flox};R26^{SmoM2/SmoM2}$ sKO line neither affected early EGL hyperplasia at P11 and P16 (Fig.5A-B), nor tumoral development at P30 (Fig.5C). In both lines, medulloblastoma developed in 100% of the mice, with a median survival of 134 days in $Otx2^{CreERT2/+};R26^{SmoM2/SmoM2}$ and of 118 days in $Otx2^{CreERT2/flox};R26^{SmoM2/SmoM2}$ mice (Fig.5D). At 6 months, survival rates were similar in the two lines (50% and 43% respectively). Together, these results indicate that Otx2 is not required to initiate medulloblastoma formation in Otx2+ granule cell precursors under constitutive SmoM2 stimulation.

In contrast, long-term follow-up of tumour development revealed striking effects of Otx2 ablation: while tumours kept growing and invaded the whole cerebellum space in $Otx2^{CreERT2/+};R26^{SmoM2/SmoM2}$ mice, leading to a survival rate of 0% at 12 months, 28% of $Otx2^{CreERT2/flox};R26^{SmoM2/SmoM2}$ KO mice survived normally (Fig.5D,E). Furthermore, tumours dramatically regressed in these mice, leaving only medulloblastoma remnants in external position after 20 months (Fig.5E), indicating that Otx2 ablation was sufficient to counteract SmoM2 mitogenic activity and long-term tumour maintenance.

Together, these data indicate that, while Otx2 does not act as a driver of type 2 medulloblastoma tumoral transformation, as suggested before, it unexpectedly plays a mandatory function in sustaining these tumours over time.

Discussion

Here we have address the physiological function of Otx2 in the context of the developing organism. We report that Otx2 is expressed in a sub-population of GCPs with higher proliferative index, located in the most-posterior part of the postnatal cerebellum and that Otx2 ablation in these cells impairs their proliferation through a Shh-independent, direct effect on the cell cycle. We next assessed whether Otx2 is truly devoid of role in the context of type 2 medulloblastoma development by directing constitutive expression of an activated form of Smoothed in Otx2+ GCPs of the postnatal cerebellum. We demonstrate that although Otx2 ablation in this context does not prevent the formation of tumours, it strongly impairs their long-term maintenance, demonstrating for the first time, the critical role of this factor in regulating proliferation and tumorigenesis in the perinatal

cerebellum. Our data point to the existence of two independent proliferation pathways in GCPs: a Shh-dependent pathway that is dominant for GCP proliferation and type 2 MB tumour formation, and an Otx2-dependent pathway that is critical for proliferation of Otx2-expressing GCP subpopulation, and that becomes mandatory for long term maintenance of type 2 MB tumor growth.

Otx2 exerts a direct, Shh-independent pro-proliferative role in a subset of granule cell precursors

Here we have disclosed a novel important function of Otx2 in regulating proliferation in a specific population of GCPs *in vivo*. Otx2-KO GCPs display an increased expression of CDK inhibitors that block the G1/S transition of the cell cycle, suggesting that Otx2 stimulates GCP proliferation by repressing S-phase entry brakes. This role of Otx2 in GCP proliferation poses the question of its relationship with Shh signaling, the major pathway responsible for GCP transit amplification. In postnatal GCPs, Shh signaling induces up-regulation of N-Myc, a transcription factor that is essential to stimulate cell proliferation (9, 27). Interestingly, loss of function experiments in postnatal GCPs show that N-Myc acts by controlling cyclin D2 expression without affecting CDKI expression (8). On the contrary, we show here that Otx2 loss-of-function has an opposite effect, i.e. deregulation of CDKI but not of cyclin expression, and has no incidence on N-Myc expression. Thus, we suggest that both N-Myc and Otx2 control GCP proliferation through parallel and complementary pathways, Shh-dependent for N-Myc and Shh-independent for Otx2. Our finding that Otx2 ablation does not affect the expression of Shh-downstream effectors, including its main target Gli1, confirms that Otx2 is not part of the Shh signaling network. Of note, Shh^{-/-} mice are not totally devoid of cerebellum, and anti-Shh treated mice still possess an EGL, supporting the idea that GCP proliferation relies on additional mechanisms (28, 29). We suggest that Otx2 acts through the repression of CDK inhibitors, and particularly p27, which is the CDK inhibitor expressed at the highest and most significant level in postnatal GCPs (30). The action of p27 appears to be dominant over proliferative signaling as even in the presence of saturating amounts of Shh, granule cells that progressively accumulate sufficient levels of p27 stop dividing and differentiate. Negative control of such a strong cell cycle inhibitor by Otx2 therefore appears as a powerful way to increase the proliferation rate and extend the proliferation window of GCPs. This might explain why, despite entering the EGL later, posterior GCPs generate as many granule cell progeny as anterior GCPs, in a shorter period, providing the cerebellum its homogeneous histology all along the anterior-posterior axis. Whether the regulation of p27 transcription by Otx2 is direct or not remains to be investigated.

Otx2 expression is dispensable *in vivo* for early, but not long-term Shh-induced tumour growth

The existence of a novel, Shh-independent control of GCP proliferation by Otx2 we report here suggests, as previously assumed, that Otx2 is not involved in tumorigenesis of this type 2 medulloblastoma. To address this hypothesis, we have developed a novel tumour model of type 2 medulloblastoma by inducing constitutive Shh signaling in Otx2⁺ GCPs of the postnatal cerebellum and assessing the effect of Otx2 loss of function in this model. It was previously shown that permanent activation of the Shh pathway requires acquisition of a granular cell fate to promote tumour formation (32). Consistently, in our model, we observe a massive proliferation of the external layer of the developing posterior cerebellum while the neighboring choroid plexus, which also expresses Otx2, hence SmoM2, remains perfectly normal. Of note, the localization, growth rate and histology of tumours induced in Otx2⁺ GCPs correspond to *bona fide* classical type of Shh medulloblastomas. The fact that 100% of the mice develop pre-neoplastic lesions, regardless of the presence of Otx2, indicates that Otx2 is dispensable for tumoral initiation and suggests that, at early stages of tumour development, the amount of Shh signal delivered by SmoM2 constitutive expression overrides the Otx2 parallel pathway.

In contrast, prolonged absence of Otx2 causes a totally different evolution, as specific regression of tumour development is observed in sKO animals, therefore unraveling an unexpected,

mandatory function for Otx2 in sustaining long-term maintenance of type-2 medulloblastoma *in vivo*. These findings suggest that Shh signaling no longer fully operates in these aging tumours, which progressively become dependent on Otx2 to sustain proliferation. During normal development, EGL cells naturally lose their responsiveness to Shh when they differentiate (around the third postnatal week in mice). It is conceivable that this loss of Shh responsiveness also occurs in the tumour, albeit with a delay due to the over-activation of Shh signaling. A minimal level of Otx2 could then become necessary to maintain tumour cell proliferation. This implies that Otx2 is able to block the mechanisms that normally allow EGL cells to stop proliferating. Again, inhibition of p27 accumulation in tumour cells appears as a plausible mechanism to prevent their exit from the cell cycle.

Why is human Shh medulloblastoma the only type that does not show Otx2 over expression?

We show here that Otx2 is an important regulator of GCP proliferation. It seems contradictory, at first, that Otx2 overexpression is found in all types of medulloblastomas except in Shh-type, as the latter is known to originate from GCPs. Again, the existence of two parallel and independent pathways controlling GCP proliferation, as we report here, brings a simple explanation to this apparent paradox. In such a situation, deregulation (over-activation) of one of these two pathways would be sufficient to promote tumour formation. In accordance with this proposal, over-activation of the Shh pathway in the present *Otx2^{CreERT2/+};R26^{SmoM2/SmoM2}* murine model, is sufficient to induce type 2 medulloblastoma, in the complete absence of Otx2, and only modest Otx2 signaling is required to sustain tumour cell proliferation in the long term. Extrapolation of this observation to human type 2 medulloblastoma would imply that deregulation of SHH signaling does not require more than normal OTX2 levels to ensure tumour cell growth. Conversely, one would expect that in other types of medulloblastoma with granule precursor as the cell-of-origin, but where the Shh pathway is not deregulated, proliferation would mostly rely on the Otx2 alternative pathway. This might explain why amplification and/or over-expression of Otx2 need to be selected, together with other genetic alterations, to ensure sustained proliferation of Shh-independent medulloblastomas. A model recapitulating our findings and how Shh and Otx2 pathways control normal and tumoral proliferation of GCPs is presented in Figure 6. In accordance with this model, OTX2 overexpression is observed in more than 75% of medulloblastoma, and OTX2 is among the most frequent targets of focal copy-number gain reported in these tumours, accounting for approximately 10% of all cases, these aberrations being restricted to the Group 3 and Group 4 medulloblastomas (17).

Otx2 as a target to inhibit medulloblastoma progression

If our model is correct, Otx2 is selected in most non-Shh medulloblastoma because it is essential to support tumour cell proliferation in the absence of Shh deregulation. This makes Otx2 a major target for therapeutic treatment of these diseases. It is even possible that treatments aiming at reducing Otx2 expression could be useful in Shh-dependent type 2 medulloblastoma, since, as we show here, OTX2 function becomes mandatory for long-term tumour growth. Unfortunately, specific OTX2 inhibitors are not presently available, nor are really understood the signals that positively regulate its expression in GCPs. It will be of great benefit to study the regulatory pathways that control OTX2 expression in order to develop or use specific drugs to reduce OTX2 gene activity in the tumours. So far, only *in vitro* knockdown using siRNA and retinoic acid treatment have been achieved (33), but demonstration of their feasibility and efficiency *in vivo* is still awaited. The data presented here urge to tackle these critical questions, as OTX2 appears as an attractive candidate for molecularly targeted therapy in a large fraction of medulloblastomas.

Materials and methods

Mouse breeding and injections

All animal experimentations were approved by local and French Ministry ethical committees. All mouse strains were maintained in 129/Sv background. *Otx2^{+/Otx2-GFP}*, *Otx2^{CreERT2/+}* (Control) and *Otx2^{CreERT2/flox}* (sKO) mouse lines were described previously (15). *Gt(ROSA)26Sor^{tm1(Smo/EYFP)Amc/}* (*R26^{SmoM2/SmoM2}*) mice were obtained from the Jackson Laboratory and crossed with *Otx2^{CreERT2/+}* or *Otx2^{CreERT2/flox}* to get *Otx2^{CreERT2/+};R26^{SmoM2/SmoM2}* and *Otx2^{CreERT2/flox};R26^{SmoM2/SmoM2}*, respectively. Genotypes were determined by PCR analysis using primers described in Supplementary Table 1. Intraperitoneal injection of tamoxifen (40µg/g of body weight, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was performed at P1 or at P2 and P5 unless otherwise indicated. Intraperitoneal injection of 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (25µg/g, Sigma-Aldrich) was performed 1h before euthanasia.

Granular Cell Precursor purification and fluorescence activated cell-sorting (FACS) analysis

Cerebella were dissociated using papain/DNAse enzymatic digestion following manufacturer's instruction (Worthington, Lakewood, NJ, USA) and GCPs were purified using Percoll gradient separation as previously described (34). For FACS analysis, GCPs were fixed for 40 min at 4°C in TF fixation buffer (Transcription Factor Buffer Set, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), incubated for 40 min at 4°C with anti-GFP (Alexa Fluor (AF) 488 -conjugated; 1:500; Invitrogen, Waltham, MA, USA) and anti-Ki67 (PE-conjugated, 1:600; Biolegend, San Diego, CA, USA) antibodies. EdU was revealed using Click-it EdU AF488 Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen). Cell cycle repartition was analysed using FxCycle™ DNA staining (Invitrogen) and the percentage of cell in each phase was calculated using the Modfit mathematical modelling software (version 3.3, VSH, Topsham, ME, USA). Cells were analysed using a LSR Fortessa flow cytometer (BD biosciences).

RNA isolation and qRT-PCR

Cerebella were triturated in TRI-Reagent (Sigma-aldrich). Total RNA was extracted using miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). First-stand cDNA was synthesized using Super Script III reverse transcriptase (Invitrogen). For real-time PCR, 25 ng of cDNA was used per reaction and amplified using PowerSYBR Green PCR mix and Step One Plus apparatus and software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Gene to GAPDH ratios were determined using $\Delta\Delta CT = 1 + E_{GAPDH}^{(CT_{SKO} - CT_{control})} / 1 + E_{gene}^{(CT_{SKO} - CT_{control})}$ formula, where E represents the primer efficiency. Primers are listed in Sup. Table 1.

Immunocytochemistry and histological analysis

For immunocytochemistry, cerebella were fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C, protected in 30% PBS-sucrose and frozen in Tissue-Tek OCT at -80°C (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sagittal sections of 12 µm (± 300 µm from the midline) were cut on a Microm HM550 cryostat, mounted on SuperFrost + slides (Fisher Scientific) and blocked 1h in PBST (PBS with 0,4% gelatin, 2% DMSO, 0,2% Triton X-100 and 10% donkey serum). Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies and 1h at RT with secondary antibodies. Primary antibodies were: goat anti-Otx2 (1:200, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), rabbit anti-Ki67 (1:100, Thermo Scientific, clone SP6), rabbit anti-GFP (1:500, Abcam, Cambridge, UK). Secondary antibodies were: anti-goat Cy3 (1:1000), anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:1000). EdU was revealed using Click-it Edu Alexa Fluor 647 Imaging kit (Invitrogen). Nuclei were counterstained with Hoeschst 33342 (40µg/ml, Promega, Madison, WI, USA). The percentage of EdU positive cells was estimated by counting the total number of nuclei and of EdU+ cells in 3 different regions of the EGL of lobules I, II, III, VIII, IX and X. For pathological examination, tissue blocks were paraffin-embedded, cut into coronal 4-µm sections, and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) using standard methods. Images were generated on Zeiss 710 Confocal (Zeiss, Oberkochen, Germany) and Leica M205 FA microscopes. Areas were estimated using Image J software (NIH, Bethesda, MA, USA) and normalized to mouse body weight.

Statistical analysis

Statistics were performed using two-tailed Student's t-test with a p value < 0.05 considered as significant. Results are presented as the mean \pm SEM. Mice Survival was analysed using Kaplan-Meier curves and the significance of the results was assessed by log-rank test.

Conflict of Interest

None of the authors declares any conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Agnès Loubat for her invaluable advice and support in FACS analysis. S.E.N. and A.C. received fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer and the French Research Ministry, respectively. This work was supported by grants from Cancéropôle PACA and the fondation pour la recherche sur le Cancer (ARC).

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

REFERENCES

1. Butts T, Chaplin N, Wingate RJ. Can clues from evolution unlock the molecular development of the cerebellum? *Mol Neurobiol.* 2011;43(1):67-76.
2. Roussel MF, Hatten ME. Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol.* 2011;94:235-82.
3. Choi Y, Borghesani PR, Chan JA, Segal RA. Migration from a mitogenic niche promotes cell-cycle exit. *J Neurosci.* 2005;25(45):10437-45.
4. Spassky N, Han YG, Aguilar A, Strehl L, Besse L, Laclef C, et al. Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Dev Biol.* 2008;317(1):246-59.
5. De Luca A, Cerrato V, Fuca E, Parmigiani E, Buffo A, Leto K. Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(2):291-303.
6. Kenney AM, Rowitch DH. Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol.* 2000;20(23):9055-67.
7. Hatton BA, Knoepfler PS, Kenney AM, Rowitch DH, de Alboran IM, Olson JM, et al. N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer Res.* 2006;66(17):8655-61.
8. Ma M, Wu W, Li Q, Li J, Sheng Z, Shi J, et al. N-myc is a key switch regulating the proliferation cycle of postnatal cerebellar granule cell progenitors. *Sci Rep.* 2015;5:12740.

9. Kenney AM, Cole MD, Rowitch DH. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development*. 2003;130(1):15-28.
10. Northcott PA, Jones DT, Kool M, Robinson GW, Gilbertson RJ, Cho YJ, et al. Medulloblastomas: the end of the beginning. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(12):818-34.
11. Kawauchi D, Robinson G, Uziel T, Gibson P, Rehg J, Gao C, et al. A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. *Cancer cell*. 2012;21(2):168-80. Epub 2012/02/22.
12. Pei Y, Moore CE, Wang J, Tewari AK, Eroshkin A, Cho YJ, et al. An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer cell*. 2012;21(2):155-67. Epub 2012/02/22.
13. Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currle DS, Eden C, et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*. 2010;468(7327):1095-9.
14. Beby F, Lamonerie T. The homeobox gene *Otx2* in development and disease. *Experimental eye research*. 2013;111:9-16.
15. Fossat N, Chatelain G, Brun G, Lamonerie T. Temporal and spatial delineation of mouse *Otx2* functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep*. 2006;7(8):824-30.
16. de Haas T, Oussoren E, Grajkowska W, Perek-Polnik M, Popovic M, Zadavec-Zaletel L, et al. OTX1 and OTX2 expression correlates with the clinicopathologic classification of medulloblastomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2006;65(2):176-86.
17. Adamson DC, Shi Q, Wortham M, Northcott PA, Di C, Duncan CG, et al. OTX2 is critical for the maintenance and progression of Shh-independent medulloblastomas. *Cancer Res*. 2010;70(1):181-91. Epub 2009/12/24.
18. Boon K, Eberhart CG, Riggins GJ. Genomic amplification of orthodenticle homologue 2 in medulloblastomas. *Cancer Res*. 2005;65(3):703-7.
19. Bunt J, de Haas TG, Hasselt NE, Zwijnenburg DA, Koster J, Versteeg R, et al. Regulation of cell cycle genes and induction of senescence by overexpression of OTX2 in medulloblastoma cell lines. *Molecular cancer research : MCR*. 2010;8(10):1344-57.
20. Michiels EM, Oussoren E, Van Groenigen M, Pauws E, Bossuyt PM, Voute PA, et al. Genes differentially expressed in medulloblastoma and fetal brain. *Physiol Genomics*. 1999;1(2):83-91.
21. Bunt J, Hasselt NA, Zwijnenburg DA, Koster J, Versteeg R, Kool M. OTX2 sustains a bivalent-like state of OTX2-bound promoters in medulloblastoma by maintaining their H3K27me3 levels. *Acta neuropathologica*. 2012.
22. Bai RY, Staedtke V, Lidov HG, Eberhart CG, Riggins GJ. OTX2 represses myogenic and neuronal differentiation in medulloblastoma cells. *Cancer Res*. 2012;72(22):5988-6001.
23. Kaur R, Aiken C, Morrison LC, Rao R, Del Bigio MR, Rampalli S, et al. OTX2 exhibits cell-context-dependent effects on cellular and molecular properties of human embryonic neural precursors and medulloblastoma cells. *Dis Model Mech*. 2015;8(10):1295-309.
24. Wortham M, Jin G, Sun JL, Bigner DD, He Y, Yan H. Aberrant *Otx2* expression enhances migration and induces ectopic proliferation of hindbrain neuronal progenitor cells. *PLoS One*. 2012;7(4):e36211.
25. Fossat N, Le Greneur C, Beby F, Vincent S, Godement P, Chatelain G, et al. A new GFP-tagged line reveals unexpected *Otx2* protein localization in retinal photoreceptors. *BMC Dev Biol*. 2007;7(1):122.
26. Mao J, Ligon KL, Rakhlin EY, Thayer SP, Bronson RT, Rowitch D, et al. A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway. *Cancer Res*. 2006;66(20):10171-8.
27. Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev*. 2002;16(20):2699-712.
28. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*. 1996;383(6599):407-13.
29. Wallace VA. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol*. 1999;9(8):445-8.

30. Miyazawa K, Himi T, Garcia V, Yamagishi H, Sato S, Ishizaki Y. A role for p27/Kip1 in the control of cerebellar granule cell precursor proliferation. *J Neurosci.* 2000;20(15):5756-63.
31. Larsen KB, Lutterodt MC, Mollgard K, Moller M. Expression of the homeobox genes OTX2 and OTX1 in the early developing human brain. *J Histochem Cytochem.* 2010;58(7):669-78.
32. Schuller U, Heine VM, Mao J, Kho AT, Dillon AK, Han YG, et al. Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer cell.* 2008;14(2):123-34.
33. Di C, Liao S, Adamson DC, Parrett TJ, Broderick DK, Shi Q, et al. Identification of OTX2 as a medulloblastoma oncogene whose product can be targeted by all-trans retinoic acid. *Cancer Res.* 2005;65(3):919-24.
34. Uziel T, Zindy F, Xie S, Lee Y, Forget A, Magdaleno S, et al. The tumor suppressors Ink4c and p53 collaborate independently with Patched to suppress medulloblastoma formation. *Genes Dev.* 2005;19(22):2656-67. Epub 2005/11/02.

Figure Legends

Figure 1: Identification and analysis of the proliferation potential of Otx2+ GCPs in the early postnatal cerebellum. (A) Expression of Otx2 in the posterior murine cerebellum at P1, P3, P5 and P7. Otx2 protein was detected by immunofluorescence staining (red) on cerebellar sagittal sections. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Last picture on the right is an enlargement of lobule X at P7. (B) Detection of Otx2 and proliferating cells in lobule X at P5. Mice were injected with EdU 1h before sacrifice. Ki67 (green) and Otx2 (red) were detected by immunostaining, while EdU (yellow) was revealed with a fluorescent azide. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). EGL can be subdivided into two parts (white dashed line): an outer proliferative zone and an inner non-proliferative zone. (C) Co-expression of Otx2 and GFP in the cerebellum of Otx2^{+/Otx2-GFP} transgenic mice at P7. Otx2 (red) and GFP (green) were detected by immunostaining, while nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Merge of the two images shows a perfect overlap between Otx2 and GFP expression. (D) FACS analysis of GCPs purified from P7 Otx2^{+/Otx2-GFP} cerebella. GFP, Ki67 and EdU incorporation were detected by fluorescence staining on dissociated GCPs and analysed by FACS. Two populations of GCPs (Otx2+ and Otx2-) can be identified based on the expression of GFP. (E) Quantification of Ki67 expression and EdU incorporation in these two populations at P3, P5 and P7 indicate that Otx2+ GCPs have a higher proliferative potential than Otx2- GCPs. SSC= Side Scatter; P= postnatal day. Scale bar: 200 μ m (A, C) and 50 μ m (B). Data are represented as mean \pm sem. * p <0.05, ** p <0.005.

Figure 2: Effect of Otx2 ablation on GCP proliferation in the early postnatal cerebellum. (A) Schematic representation of the two Otx2 alleles in Otx2^{CreERT2/+} (control) and Otx2^{CreERT2/flox} (sKO) mice, before and after tamoxifen injection. (B) Expression of Otx2 RNA in control and sKO cerebella. Otx2 RNA was detected by PCR 0, 2 and 4 days (P1, P3 and P5 respectively) after tamoxifen injection. (C) Expression of Otx2 protein in control and sKO cerebella. Otx2 was detected by immunostaining (red) on sagittal section of lobule X, 2 days (P3) after tamoxifen injection. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). (D) Detection of replicating cells in Control and sKO cerebella at P3. Mice were injected with EdU 1h before euthanasia and EdU incorporation was detected by fluorescence staining on sagittal sections of cerebellar lobule X (yellow). Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). (E) Quantification of EdU positive cells in the EGL of cerebellar lobules I, II, III (anterior), and VIII, IX and X (posterior) at P3 and P5, showing reduced numbers of proliferating GCPs in the posterior lobules of sKO cerebella. P= postnatal day; sKO= self-Knock-Out. Scale bar: 100 μ m. Data are represented as mean \pm sem. * p <0.05, ** p <0.01.

Figure 3: Effect of Otx2 ablation on cerebellum expansion and foliation at perinatal and adult stages. (A) Morphogenesis defects in Otx2 sKO cerebellum at perinatal and adult stages. Mid-sagittal sections of control and sKO cerebella were stained with Hoechst to visualize their structure and foliation at P5 and P30. Yellow dotted line indicates the size of the control posterior cerebellum. Yellow arrow shows the foliation between lobule IXa and lobule IXb in the control, and its absence in sKO, respectively. (B-C) Measurements of areas of total cerebella (B) and of posterior lobules VIII, IX and X (C) in control and sKO mice at P3, P5 and P30, indicating a severe atrophy in sKO animals. Areas were normalized on mouse body weight and expressed as arbitrary units (AU). P= postnatal day; sKO= self-Knock-Out. Scale bar: 200 μ m. Data are represented as mean \pm sem. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

Figure 4: Effect of Otx2 ablation on Shh-signaling pathway and cell cycle gene expression

(A) Regulation of Shh-signaling pathway effector genes upon Otx2 ablation. Expression of the indicated genes was monitored using real-time *quantitative PCR* and normalized to GAPDH expression. Results are displayed as the fold change between sKO and control cerebella at P3, or P5. None of the tested genes were significantly modified (p > 0.05). (B) Relative expression of the cell cycle inhibitors Cdkn2d (p19), Cdkn1b (p27), and Cdkn1c (p57) in Otx2 sKO and control cerebella at P1, P3 and P5, indicating up-regulation upon Otx2 ablation. (C) Cell cycle analysis of Otx2+ and Otx2- GCPs. GCPs were

purified from $Otx2^{+/Otx2-GFP}$ cerebella at P7 and analysed by FACS as in Fig.1D. Proliferating populations were identified by Ki67 staining and their DNA content was analysed using the DNA intercalating FxCycle™ fluorescent dye. (D) Distribution of $Otx2^+$ and $Otx2^-$ GCPs in each phase of the cell cycle was calculated using the Modfit program. P= postnatal day; sKO= self-Knock-Out. Data are displayed as mean \pm sem. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 5: Effect of Otx2 ablation on Shh medulloblastoma formation and their maintenance. $Otx2^{+/+}$ (WT), $Otx2^{CreERT2/+};R26^{SmoM2/SmoM2}$ (allowing SmoM2 conditional expression), and $Otx2^{CreERT2/flox};R26^{SmoM2/SmoM2}$ (allowing SmoM2 conditional expression and concomitant Otx2 ablation) mice were injected with tamoxifen at P2 and P5 and analysed at different stages. (A) Detection of proliferating cells in P11 cerebella. Mice were injected with EdU 1h before euthanasia. Detection of Otx2 expression (red), EdU incorporation (yellow) and nuclei (blue) on lobule X (white boxes) shows a massive hyperplasia regardless of the presence of Otx2. (B) FACS quantification of EdU+ cells at P7, P11 and P15 in the GCP fraction of the 3 color-coded genotypes. (C) Upper panels: Hematoxylin and Eosin staining of posterior cerebella at P30 (coronal sections), showing the presence of classical medulloblastoma. Lower panels: magnification of areas boxed in white in the images above. (D) Survival curve of WT, $Otx2^{CreERT2/+};R26^{SmoM2/SmoM2}$ and $Otx2^{CreERT2/flox};R26^{SmoM2/SmoM2}$ mice. Log-rang test did not reveal any significant difference between the two curves ($p > 0.05$). M1, M2 and M3 correspond to mice presented in panel E. (E) Long-term follow-up of the 3 indicated genotypes. Upper panels: Bright-field dorsal views of posterior brain (red lines delimit the cerebellum). Lower panels: Hoechst staining of mid-sagittal cerebellar sections, showing persisting EGL-like with dramatic tumour regression in $Otx2^{CreERT2/flox};R26^{SmoM2/SmoM2}$ mice. Insets: magnification of boxed areas at the level of lobules IX and X. Arrowhead points to tumour remnants in external position in $Otx2^{CreERT2/flox};R26^{SmoM2/SmoM2}$ cerebellum. P= postnatal day. Scale bar: 300 μ m (A) and 1000 μ m (E). Data are displayed as mean \pm sem. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 6: Model for Shh and Otx2-mediated regulation of cerebellar GCP proliferation in the context of normal development and medulloblastoma formation. (A) During normal development, both Shh and Otx2 stimulate GCP proliferation through parallel signaling pathways (involving N-Myc, and p27, respectively). Ablation of Otx2 in this context, by shutting down of one of these pro-proliferative pathways, significantly impairs GCP proliferation, and leads to posterior cerebellum atrophy. (B) In the context of SmoM2 constitutive activation, forced Shh stimulation results in GCP overproliferation and the formation of type 2 medulloblastoma. This occurs whether Otx2 is present or absent, indicating that over-activation of the Shh pathway is dominant on the Otx2 pathway and is sufficient to promote tumour initiation in this context. (B') As they age, tumour cells become less responsive to Shh pathway signaling and more dependent on Otx2 signaling to sustain proliferation. Ablation of Otx2 in this context impairs cell proliferation and causes tumour regression. (C) In other (Shh-independent) types of medulloblastoma originating from GCPs, where the Shh pathway is not overactivated, such as type 3 medulloblastoma, proliferation mainly relies on the Otx2 alternative pathway: overexpression of Otx2 is frequently selected to ensure sustained proliferation of tumour cells.

Figure 1 El Nagar et al.

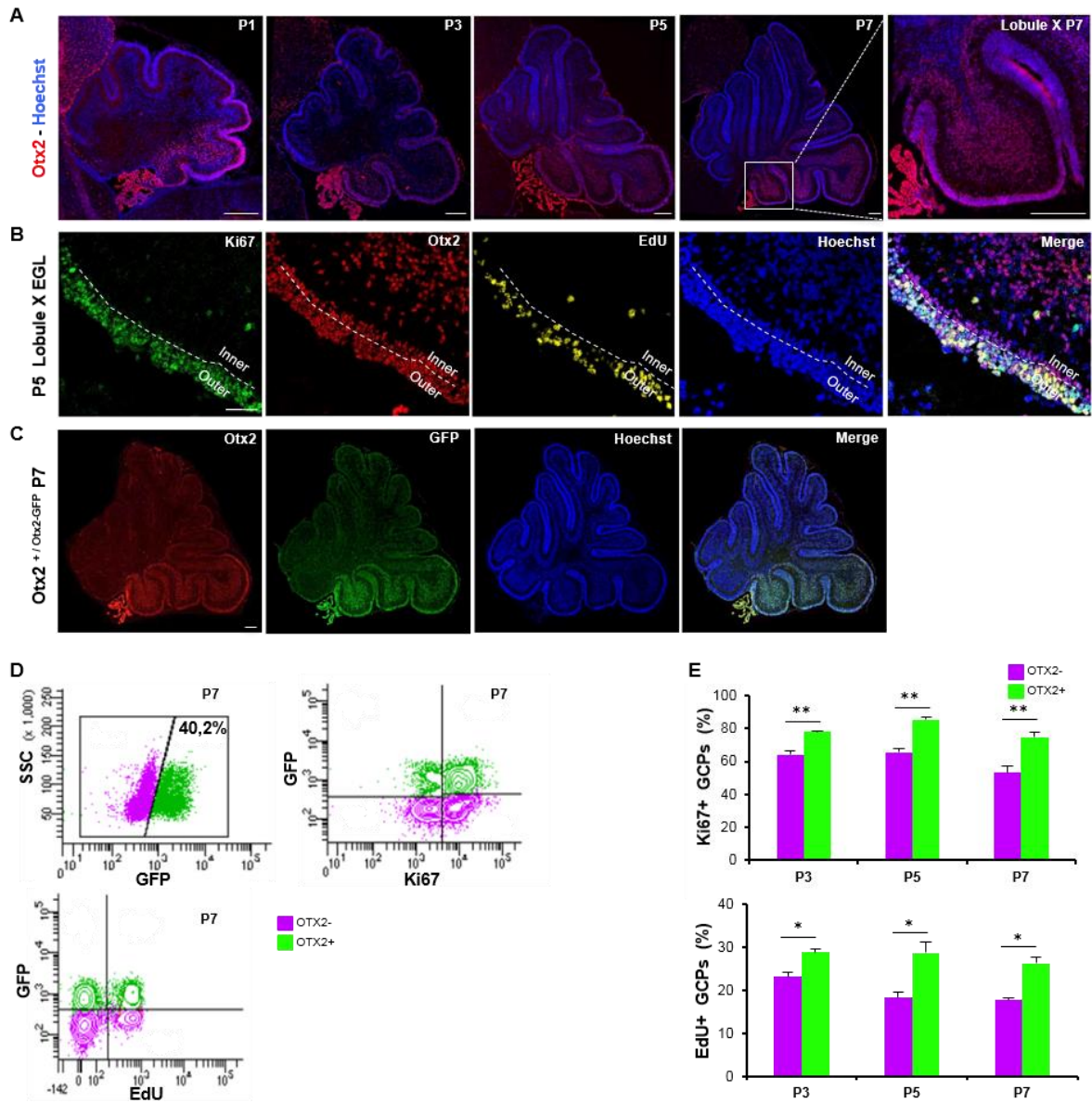


Figure 2 El Nagar et al.

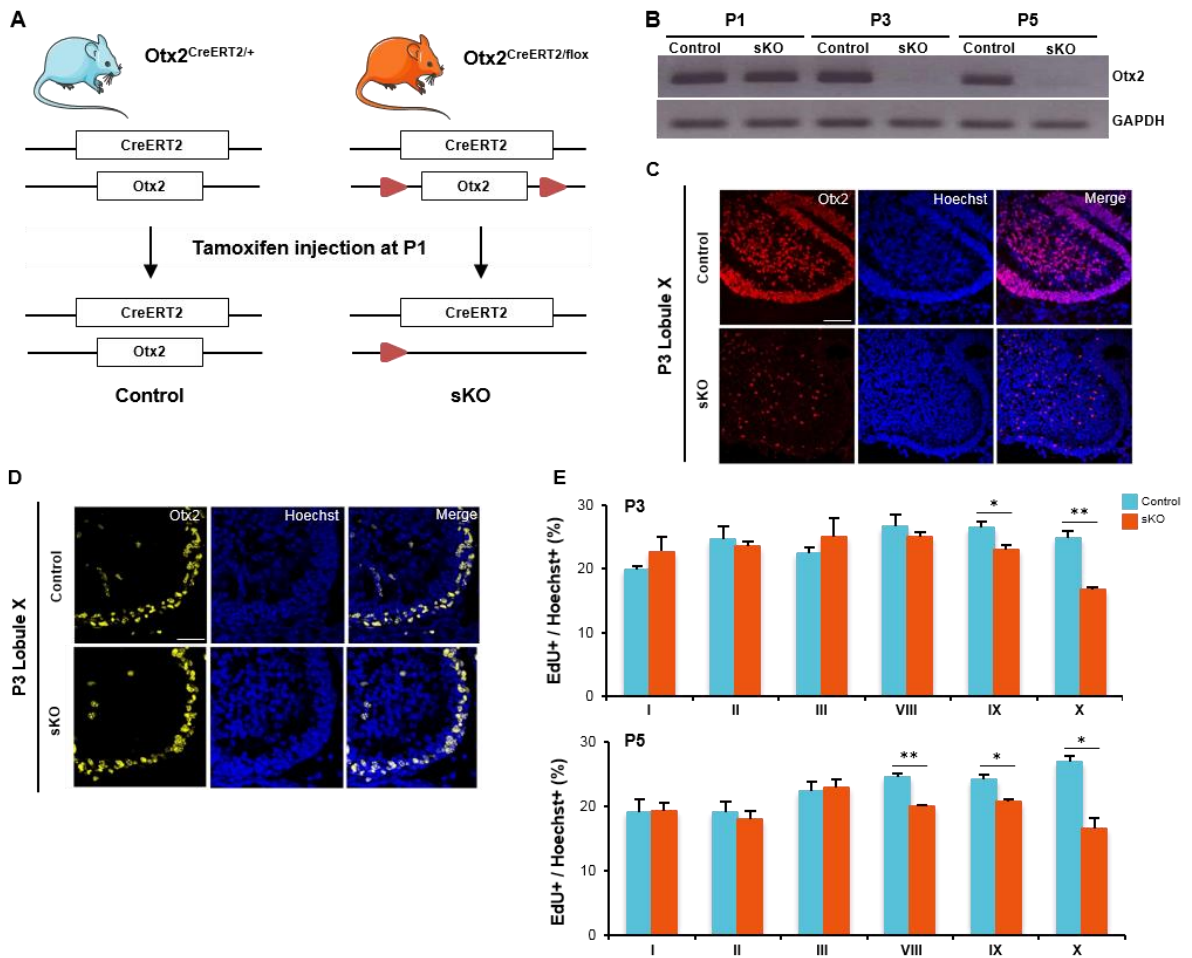


Figure 3 El Nagar et al.

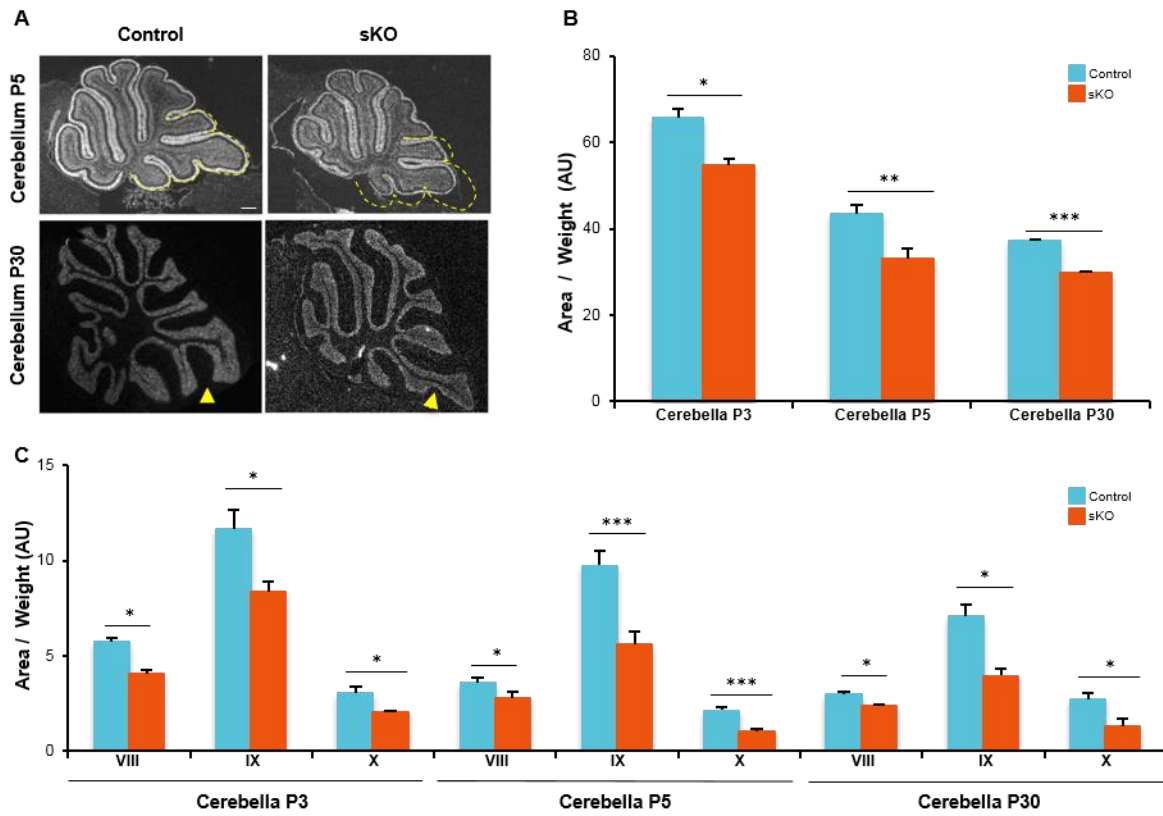


Figure 4 El Nagar et al.

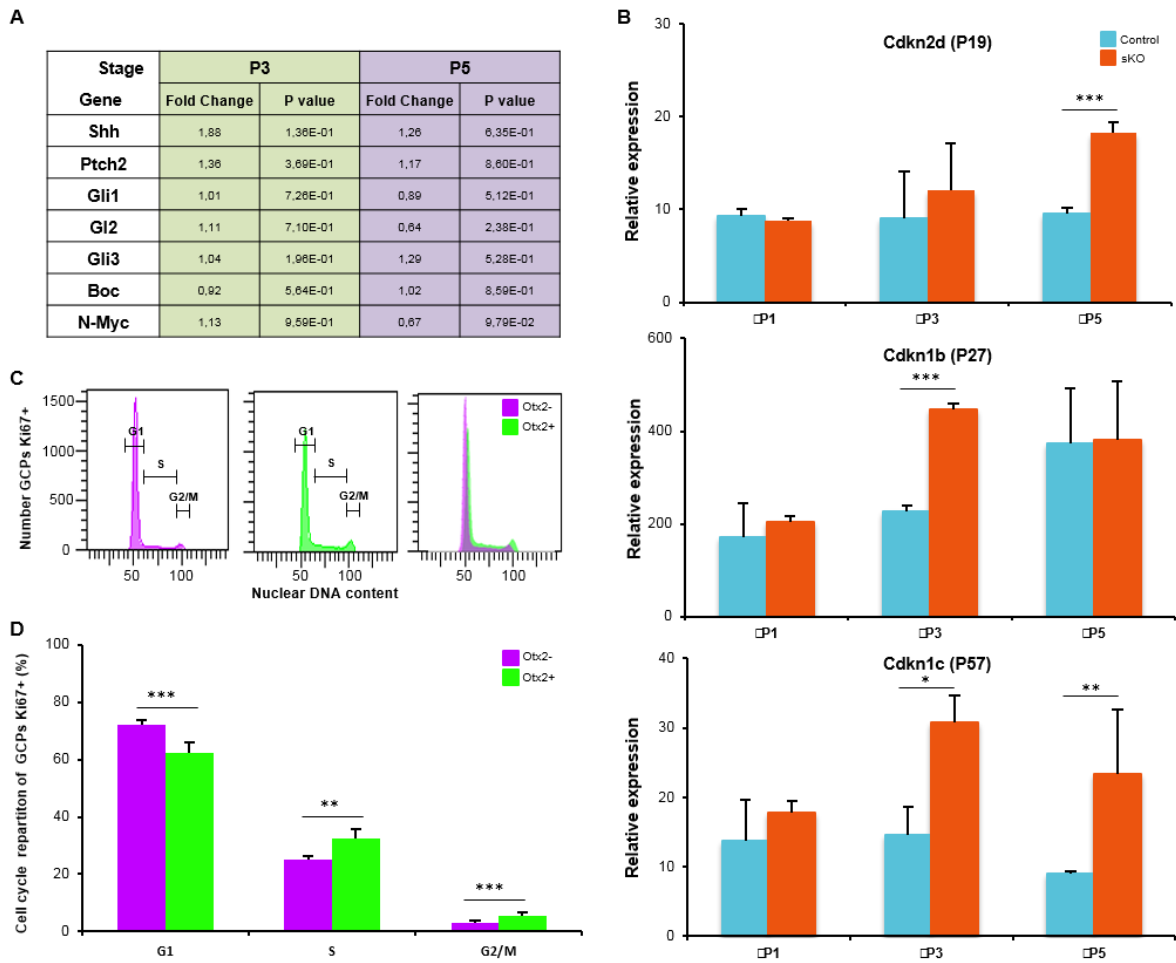


Figure 5 El Nagar et al.

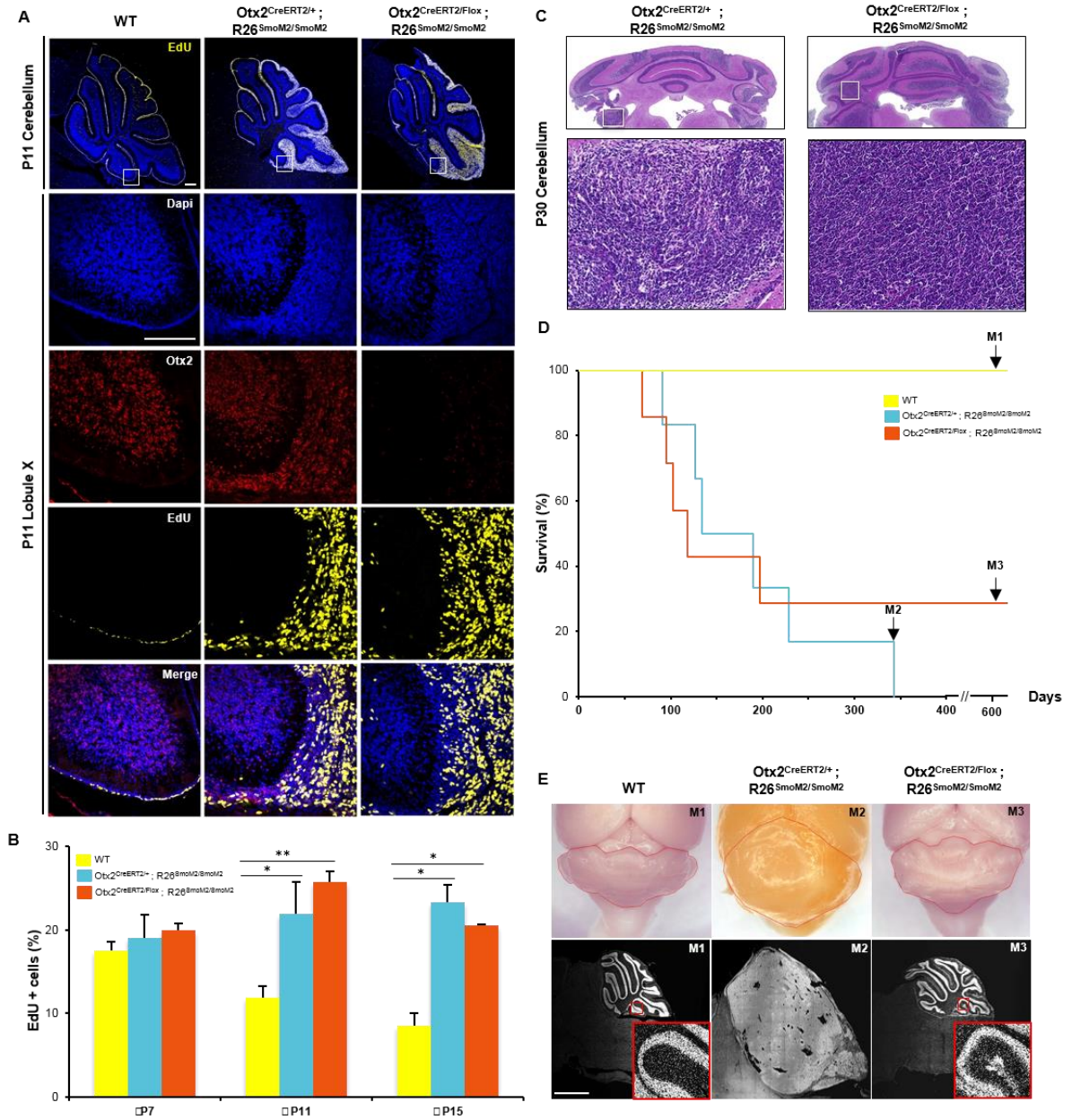
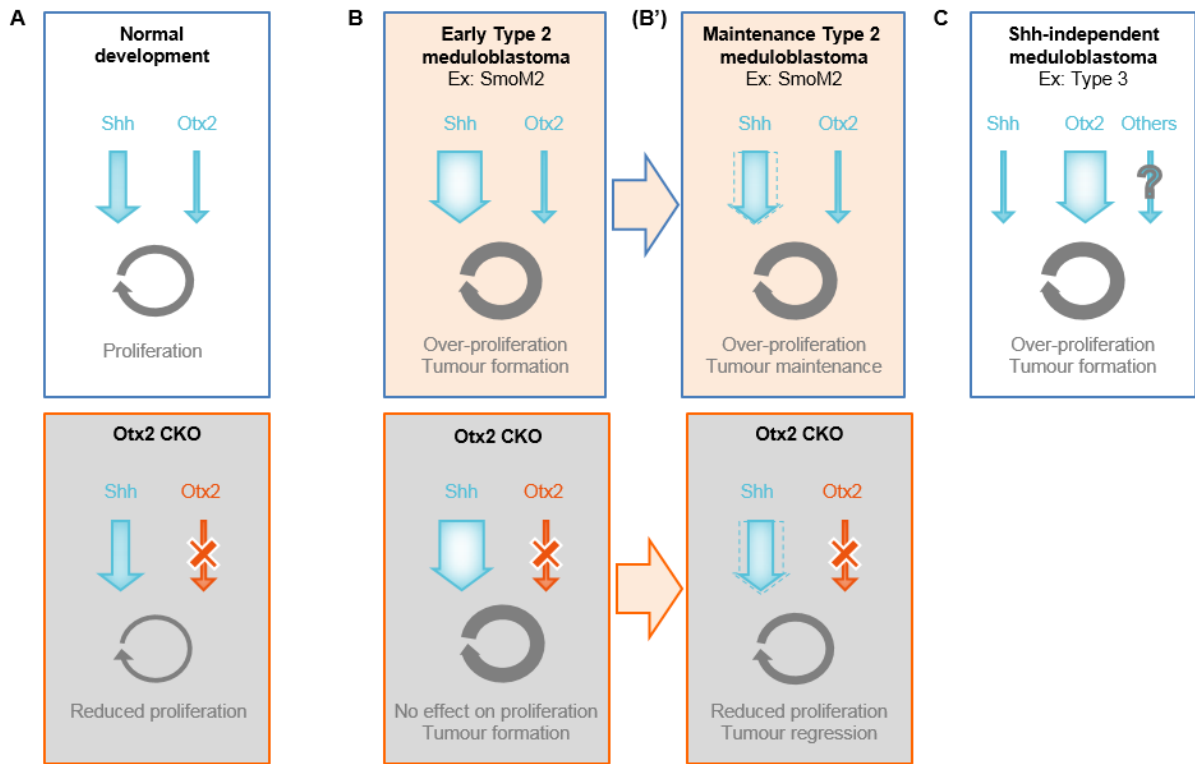


Figure 6 El Nagar et al.



Supplementary table 1: List of primer sequences used for mice genotyping and for RT-qPCR analysis.

Genes	Primers	Sequences
Genotyping Primers		
Otx2-CreERT2	Foward	CCAAATCTACCCACCAAGGA
	Reverse	GACCGACGATGAAGCATGTT
Otx2-Flox	Foward	GAACAAACGTCCCTGTGGTG
	Reverse	AGGAGCCACAATTCCCATC
Otx2-GFP	Foward	GCTGGCTCAACTTCCTACT
	Reverse	ACCCTCTCCACTGACAGAA
Rosa26-Stop flox	Foward	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
	Reverse	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC
Real time qPCR Primers		
Otx2	Foward	CCAAATCTACCCACCAAGGA
	Reverse	AGAGCTTCCAGAACGTCCGAG
Cdkn2d (p19)	Foward	AATGTGACCCAAGGCCACT
	Reverse	TTTCCTCTTTTGTGACAAGTAACC
Cdkn1b (p27)	Foward	GAGCAGTGTCCAGGGATGAG
	Reverse	TCTGTTCTGTTGGCCCTTTT
Cdkn1c (p57)	Foward	CGCAAACGTCTGAGATGAGT
	Reverse	CCCAGAGTTCTTCCATCGTC
Shh	Foward	CCAACGTAGCCGAGAAGACC
	Reverse	CTTGTCTTTGCACCTCTGAGTC
Patch2	Foward	CCTAGAACAGCTCTGGGTAGAAGT
	Reverse	CCCAGCTTCTCCTTGGTGTA
Gli1	Foward	CAGGGTCCCAGGGTTATGG
	Reverse	AGGTCGAGGCTGGCATCAG
Gli2	Foward	TCCCCGACCCAGGGAAAAA
	Reverse	CCCTCCTGGTGTCTCATGTC
Gli3	Foward	AGAGTGCCTCCAGGTGAAGA
	Reverse	GTTGCTGATGGGGGACTGTT
Boc	Foward	GCTACCAGTGCCATACCTCC
	Reverse	CGGGCCTCTCATATACACGG
Mycn (Nmyc)	Foward	TGTGTCTGTTCCAGCTACTGC
	Reverse	CTTCCTCCTCGTCATCCTCA
GAPDH	Foward	CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA
	Reverse	TGCCTGCTTCACCACCTTCT

Discussion

Dans cet article, nous avons étudié la fonction du facteur de transcription Otx2 dans la prolifération des GCP du cervelet, dans un contexte de développement normal ou dans le cadre de la formation de médulloblastomes de type Shh.

1) Les précurseurs des cellules granulaires présents dans le cervelet pendant la période périnatale forment une population hétérogène

Les observations réalisées à l'aide de la souris Otx2^{Otx2-GFP/+} montrent que les GCP exprimant Otx2 ont un potentiel prolifératif plus élevé que les autres. Ces résultats, en plus de suggérer une corrélation potentielle entre Otx2 et la prolifération, que nous démontrons plus loin dans notre publication via l'ablation d'Otx2, remettent en avant un concept de plus en plus étayé qui est que les GCP du cervelet forment une population extrêmement hétérogène, à la fois au niveau de leur pattern d'expression, mais également par leurs caractéristiques fonctionnelles. L'analyse d'environ 600 lignées de souris transgéniques durant le projet GENSAT (Gene Expression Nervous System Atlas) avait démontré l'expression unique de certains gènes par des sous-populations distinctes de GCP et leurs dérivés. La question s'était alors posée de savoir si ces sous-catégories de GCP avaient des propriétés différentes, et si elles étaient à l'origine de différents sous-groupes de MB (Gong et al., 2003; Hatten and Roussel, 2011; Gilbertson and Ellison, 2008). Dans notre étude, nous mettons en évidence des caractéristiques prolifératives distinctes dans deux sous-populations de GCP : les GCP exprimant Otx2, présents dans la partie postérieure du cervelet, prolifèrent plus que leurs homologues antérieurs. Il serait intéressant d'analyser d'autres critères liés à la prolifération, comme la durée du cycle cellulaire, par exemple, ainsi que les paramètres de différenciation, ou encore de migration cellulaire, de ces deux populations de GCP Otx2⁺ et Otx2⁻. L'exemple de la durée de cycle n'est pas anodin. Il provient d'une observation que nous avons faite : les rapports entre le nombre de cellules exprimant le marqueur de prolifération Ki67 et le nombre de cellules incorporant l'analogue de base EdU, ne sont pas les mêmes dans les populations Otx2⁺ et Otx2⁻. Or l'EdU marque uniquement les cellules en phase S, donc une sous-population des cellules exprimant le marqueur Ki67. Cette différence de rapport pourrait ainsi s'expliquer par une différence de la durée de la phase S et/ou de la durée du cycle cellulaire. Une telle information serait d'autant plus intéressante que l'on sait qu'il existe une corrélation entre la durée du cycle cellulaire et l'arrêt de la prolifération dans les GCP. En effet, Espinosa et collègues ont démontré que le

dernier cycle de prolifération de ces cellules, juste avant leur différenciation, était plus court (Espinosa and Luo, 2008).

La comparaison des deux populations de GCP, exprimant Otx2 ou pas, que l'on peut trier et remettre en culture séparément, apporterait des réponses sur leurs propriétés prolifératives (durée de cycle) ainsi que sur leur potentiel tumoral. On pourrait imaginer reproduire des expériences de Kawauchi et al., en transformant ces deux populations de GCP avec un vecteur permettant l'expression de c-Myc, puis on les transplanterait, séparément, dans le cerveau de souris immuno-déficientes. Quels seraient les résultats ? Les tumeurs seraient-elles les mêmes ? Auraient-elles la même pénétrance ? Enfin, que se passerait-il si l'on induisait l'expression d'Otx2 dans les GCP ne l'exprimant pas ?

Il semble clair ici que ces sous-populations ont des propriétés différentes, et peut-être aussi une sensibilité différente à la tumorigenèse. On pourrait alors s'attendre à ce que chaque MB présente à la fois une combinaison d'altérations génétiques uniques, mais également une cellule d'origine unique, provenant d'une sous population de GCP par exemple.

2) Otx2 contrôle la prolifération des GCP en favorisant la transition G1-S du cycle cellulaire, et indépendamment de la voie de signalisation Shh

La comparaison des propriétés prolifératives des GCP exprimant ou pas Otx2 dans le cervelet suggère qu'Otx2 pourrait stimuler la prolifération des GCP. L'ablation conditionnelle d'Otx2 dans le cervelet postnatal, pendant la phase intense de prolifération des GCP, nous a permis de démontrer cette hypothèse. En effet, cette ablation provoque un défaut de prolifération des GCP du cervelet postérieur, donc de manière cellule-autonome, conduisant à la formation d'un cervelet atrophié et anormalement folié.

Étant donné l'importance de la voie Shh pour la prolifération de ces cellules, il paraissait normal de se demander si une relation entre Otx2 et Shh existe. L'analyse de l'expression d'une trentaine de gènes, parmi lesquels figuraient les principaux acteurs de la voie Shh, et les gènes directement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, nous a permis de conclure qu'Otx2 n'interagissait pas avec la voie Shh, mais qu'il contrôlait la prolifération des GCP en inhibant les Cdk1 impliqués dans la transition G1-S. Ces résultats sont extrêmement intéressants car ils étayaient une hypothèse déjà formulée : la voie Shh n'est pas la seule cascade de signalisation impliquée dans la prolifération des GCP. En effet, les souris *Shh*^{-/-} ne sont pas totalement dépourvues de cervelet, et les souris traitées avec des anticorps anti-Shh possèdent une couche granulaire externe où les GCP prolifèrent encore. Il est de même dans les souris KO pour *Gli2* (Chiang et al., 1996; Wallace, 1999; Corrales et al., 2006). Ainsi dans ces mutants, les GCP du

cervelet continuent à proliférer, malgré l'absence de signalisation par Shh. Nos résultats, impliquant l'existence d'une seconde voie de régulation dans la prolifération des GCP, Otx2-dépendante, pourrait expliquer ce phénomène, au moins en ce qui concerne le cervelet postérieur. Cependant, qu'en est-il du cervelet antérieur ? A ce niveau aussi les GCP continuent de proliférer en absence de signalisation Shh, suggérant que dans ces cellules, une troisième voie, Shh-indépendante et Otx2-indépendante, existe.

Nos résultats suggèrent que la prolifération Otx2-dépendante des GCP passe par la régulation de l'expression des inhibiteurs de CDK p19, p27 et p57, tous les trois impliqués dans la transition G1-S. L'inhibiteur p27 est de loin celui qui est le plus exprimé dans le cervelet postnatal. Il est défini dans la littérature comme un marqueur de l'EGL interne, car il y est exprimé uniquement par les cellules post-mitotiques (Miyazawa et al., 2000). Son expression est ensuite maintenue dans les neurones granulaires différenciés, après leur migration dans l'IGL. L'action de p27 semble dominante par rapport au signal de prolifération induit par la présence de Shh. En effet, les GCP qui accumulent p27 arrêtent de proliférer bien qu'ils se positionnent dans l'EGL interne, situé juste au-dessus des cellules de Purkinje, où le signal Shh est sans doute le plus fort. De plus, de nombreuses études fonctionnelles ont révélé le potentiel anti-prolifératif de p27 dans le cervelet. Par exemple, chez les souris mutantes *p27^{-/-}*, les GCP sont maintenus dans un état prolifératif plus longtemps. Il en résulte un cervelet hypertrophié (Miyazawa et al., 2000). Dans notre cas, l'inactivation d'Otx2 conduit à la surexpression de p27 et au phénotype inverse, c'est à dire, une réduction de la prolifération et la formation d'un cervelet atrophié. On peut alors supposer qu'en absence d'Otx2, p27 s'accumulerait plus rapidement dans les GCP et favoriserait leur sortie du cycle cellulaire.

L'inhibiteur p57 est, tout comme p27, un CDKi de la famille CIP/KIP (Pateras et al., 2009). Mais contrairement à p27, sa mutation ne semble avoir aucun effet sur la formation du cervelet (Yan and Ziff, 1997). Il en est de même avec la mutation de p19 (Zindy et al., 1997). Cependant, on peut supposer que la surexpression de ces facteurs, observée lors de l'ablation d'Otx2, puisse renforcer l'action anti-proliférative de p27.

La surexpression de ces trois CDKi dans notre mutant Otx2 suggère qu'en temps normal, Otx2 inhibe l'expression de ces trois protéines. Il serait intéressant de rechercher dans la région promotrice des gènes *Cdkn2d* (p19), *Cdkn1b* (p27) et *Cdkn1c* (p57) des sites de liaison d'Otx2, et de manière plus générale, de définir si la régulation de ces gènes par Otx2 est directe.

Une cible majeure de la voie Shh dans les GCP est le facteur de transcription N-Myc (Kenney et al., 2003). La surexpression de N-Myc renforce la prolifération des GCP, même en absence de Shh, alors que son ablation conditionnelle dans le cervelet durant le développement

embryonnaire entraîne une déficience sévère en cellules granulaires. (Knoepfler et al., 2002). L'analyse du mutant N-Myc avait montré que N-Myc agissait en contrôlant l'expression de la cycline D2 sans affecter l'expression des CDKi (Ma et al., 2015). Dans notre étude, l'analyse de l'expression de N-Myc et des cyclines montre que l'inactivation d'Otx2 n'affecte pas l'expression de ces gènes. Les résultats obtenus par Knoepfler et collègues sur N-Myc, alliés à ceux que nous avons obtenus ici, confortent l'idée que Shh, via N-Myc, et Otx2, via p27, agissent en parallèle sur la prolifération des GCP.

3) Otx2, dispensable pour la formation mais indispensable pour le maintien des MB Shh

Le fait qu'Otx2 contrôle la prolifération des GCP de manière Shh-indépendante suggère qu'Otx2 n'est pas impliqué dans la tumorigenèse des MB Shh. Cette hypothèse est soutenue par l'absence de la surexpression et/ou de l'amplification d'Otx2 dans ce groupe. De plus, la surexpression d'Otx2 dans des lignées cellulaires dérivées de MB du groupe Shh (MED8A et DAOY) conduit à leur sénescence *in vitro* (Bunt et al., 2010). Cependant, le rôle d'Otx2 dans les MB Shh, à un niveau d'expression normal, similaire à celui retrouvé dans les GCP, n'a jamais été questionné. Pour répondre à cette question, nous avons développé un nouveau modèle de MB Shh, $Otx2^{CreERT2/+}; R26^{SmoM2/SmoM2}$, en induisant l'activation constitutive de la voie Shh, via l'expression de SmoM2, dans les GCP exprimant Otx2, durant leur période de prolifération intense. Afin d'accéder à la fonction d'Otx2 dans ces tumeurs, nous avons induit, de manière concomitante, l'activation de la voie Shh et l'inactivation d'Otx2 grâce à la souris $Otx2^{CreERT2/fl}; R26^{SmoM2/SmoM2}$.

Tout d'abord, l'activation de la voie Shh seule dans les GCP Otx2+ provoque la formation de tumeurs similaires aux MB du groupe SHH dans 100% des cas. Ces résultats, attendus, prouvent que la sous-population de GCP exprimant Otx2 est capable de former des tumeurs Shh. Ce résultat vient appuyer l'étude de Schüller et al., qui avait montré qu'une identité GCP était requise pour former des médulloblastomes. L'induction de SmoM2 dans les GCP exprimant le gène *Tlx3*, qui partage un pattern d'expression postérieur quasi identique à celui d'Otx2, conduit d'ailleurs à un phénotype identique à celui que nous observons ici. Dans cette même étude, l'induction de SmoM2 à P14, dans les rares GCP encore indifférenciés, forme également des MB (Schüller et al., 2008). Il semble donc clair que toutes les cellules avec une identité GCP peuvent former des MB Shh. Cependant, qu'en est-il de l'évolution de ces tumeurs ? Est-elle la même quel que soit le précurseur d'origine ?

Chez les souris $Otx2^{CreERT2/fl}; R26^{SmoM2/SmoM2}$, l'injection de tamoxifène induit la formation de tumeurs avec la même pénétrance que chez les souris $Otx2^{CreERT2/+}; R26^{SmoM2/SmoM2}$. Ainsi, l'ablation d'Otx2 n'affecte pas la formation de tumeurs. Ces résultats indiquent qu'Otx2 est dispensable pour l'initiation de la tumeur et suggèrent que, durant les stades précoces du développement tumoral, la quantité de signal Shh délivrée par l'expression constitutive de SmoM2 est telle qu'elle rend négligeable la signalisation induite par Otx2, d'où l'absence d'effet de l'ablation d'Otx2.

En revanche, durant les stades plus tardifs, l'absence prolongée d'Otx2 conduit à la régression quasi-totale de la tumeur. Cette observation expose une fonction nouvelle et inattendue du facteur de transcription Otx2 : il devient indispensable au maintien à long terme des MB Shh. Cette découverte suggère qu'après un certain temps, la signalisation Shh n'opère plus suffisamment dans les cellules tumorales, dont la prolifération devient alors progressivement dépendante d'Otx2. À quel moment la voie de signalisation Shh n'est-elle plus dominante ? L'observation de la courbe de survie de chaque lignée montre que les deux courbes diffèrent aux environs de 200 jours. La survie maximale des souris $Otx2^{CreERT2/+}; R26^{SmoM2/SmoM2}$ est d'environ un an, et toutes présentent de grosses tumeurs, alors que toutes les souris $Otx2^{CreERT2/fl}; R26^{SmoM2/SmoM2}$ ayant passé le stade des 200 jours survivent autant que des souris sauvages, et ont vu leurs tumeurs régresser. C'est donc sans doute autour de ce stade des 200 jours que la voie Otx2 devient dominante sur la voie Shh et que l'absence d'Otx2 conduit à un arrêt de prolifération des cellules tumorales. L'analyse de l'expression des principaux acteurs de la voie Shh dans les cellules tumorales des cervelets de souris exprimant SmoM2 devrait nous permettre d'identifier exactement à quel moment la voie de signalisation Shh s'affaiblit. Cette analyse devra être faite en parallèle sur des souris sauvages et mutantes exprimant SmoM2. On ne peut, cependant, pas s'empêcher de se demander comment des cellules qui expriment SmoM2 et donc, qui miment l'activation constitutive de la voie Shh, cessent d'y répondre. Des études ont montré que la mutation de certains gènes pouvait contrecarrer cette activation. C'est le cas par exemple de la mutation de Kif3a. Chez ce mutant, l'absence de formation du cil primaire dans les GCP les empêche de répondre à la signalisation Shh, même en présence de SmoM2 (Han et al., 2009). On pourrait émettre l'hypothèse que dans notre cas, après une longue période, les cellules tumorales perdent leur cil primaire. Une seconde hypothèse serait que ces cellules arrêtent d'exprimer des facteurs qui définissent leur identité de GCP, tels que Atoh1. En effet, l'ablation de Atoh1 est capable de prévenir la formation de tumeurs chez les souris exprimant SmoM2 (Flora et al., 2009). Cela se produit probablement

parce que Atoh1 est capable d'activer l'expression de Gli2, le principal effecteur de la voie Shh (Klisch et al., 2011).

Si notre hypothèse concernant la voie Shh s'avère vraie, cela suggère que chez les modèles murins développant des MB Shh, après environ 200 jours, les tumeurs devraient être limitées au cervelet postérieur, seule région à pouvoir soutenir leur prolifération du fait de l'expression du gène Otx2. Il n'existe pas dans la bibliographie d'information concernant la prépondérance des MB en fonction de leur position le long de l'axe antéro-postérieur à des stades avancés. La distribution de la position des MB, en particulier de ceux survenant au-delà des stades infantiles, mériterait d'être étudiée afin de tester cette idée.

A nouveau si notre hypothèse d'un affaiblissement progressif de l'efficacité de la signalisation Shh s'avère vraie, cela implique que la voie de signalisation Otx2 dépendante ne prend le relais qu'à des stades tardifs de la tumorigenèse. Afin de prouver qu'Otx2 n'est essentiel que tardivement, il faudrait pouvoir induire son ablation tardivement, bien après que les MB se soient formés. Notre modèle murin ne nous permet pas d'induire de manière séparée l'expression de SmoM2 et l'ablation d'Otx2. Cependant, on peut proposer deux expériences qui permettent d'invalider Otx2 dans des tumeurs déjà formées. La première, *in vitro*, consisterait à mettre en culture les cellules tumorales issues de souris $Otx2^{CreERT2/+}; R26^{SmoM2/SmoM2}$ âgés de 200 jours, et d'inhiber l'expression d'Otx2 avec des si-RNA ou ShRNA, puis mesurer le potentiel tumoral de ces cellules par des expériences de transplantation orthotopique. La seconde, *in vivo*, consisterait en l'invalidation d'Otx2, toujours chez des souris $Otx2^{CreERT2/+}; R26^{SmoM2/SmoM2}$ âgés de 200 jours, par injection d'acide rétinoïque, puisque des études ont montré que ce dernier était capable de réprimer l'expression d'Otx2, puis de suivre la taille des tumeurs ainsi que la survie des souris (Di et al., 2005).

Enfin, si cette hypothèse se confirme, il sera alors clair que la prolifération normale et tumorale des GCP s'appuie sur deux voies de signalisation parallèles, une Shh-dépendante et l'autre Otx2-dépendante. Cela donnera alors une explication simple au fait qu'Otx2 soit retrouvé surexprimé/amplifié dans tous les groupes de MB à l'exception des MB Shh : la dérégulation (sur-activation) d'une seule des deux voies pourrait être suffisante pour promouvoir la formation de tumeurs. D'ailleurs, la sur-activation de la voie Shh, via l'expression de SmoM2, est suffisante pour former des MB Shh, même en absence d'Otx2, et une modeste signalisation Otx2 n'est requise que pour maintenir ces tumeurs à long terme. L'extrapolation de ces observations aux MB SHH humains expliquerait pourquoi Otx2 n'y est

jamais surexprimé, la dérégulation de la voie Shh ne nécessitant pas davantage qu'un niveau normal du facteur OTX2 pour assurer la croissance tumorale des cellules. Dans les autres cas de MB où les GCP sont les cellules d'origine et où la voie Shh n'est pas dérégulée, Otx2 devrait être sélectivement surexprimé/amplifié pour promouvoir la prolifération tumorale.

4) Otx2, une cible thérapeutique

La surexpression ou l'amplification du gène *Otx2* dans la plupart des MB Shh-indépendants en faisait déjà une cible thérapeutique majeure pour le traitement de cette maladie. Nos résultats suggèrent ici qu'*Otx2* pourrait également être une excellente cible dans le traitement des MB Shh-dépendants. En effet, nous avons montré ici qu'un niveau normal de protéine Otx2 est indispensable au maintien à long terme des tumeurs Shh.

Projet 2 : Etude de l'antagonisme Otx2-Hoxa2 dans la compétence de la lèvre rhombique à produire des dérivés prolifératifs et sensibles à la tumorigenèse Shh-dépendante.

Dans l'étude précédente, nous avons mis en évidence le rôle d'Otx2 dans la période postnatale de prolifération intense des GCP, ainsi que son importance dans le maintien des MB Shh-dépendants. Nous savons également qu'Otx2 est exprimé plus précocement, dans les progéniteurs des GCP présents dans la lèvre rhombique. Dans cette seconde étude, nous avons étudié de quelle manière Otx2 spécifie ces progéniteurs de la lèvre rhombique, et lui permet de générer des dérivés sensibles à la tumorigenèse Shh-dépendante. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du docteur Thomas Di Meglio (Centro de Biologie Molecular Severo Ochoa, Madrid, Espagne).

La lèvre rhombique peut se subdiviser en trois domaines le long de l'axe antéro-postérieur : le domaine cérébelleux, le domaine cochléaire et le domaine pré-cérébelleux. Les GCP dérivent uniquement des domaines cérébelleux et cochléaire. Les GCP dérivant de la lèvre rhombique cérébelleuse (aussi connue comme la lèvre rhombique supérieure), situés au niveau de R1, migrent pour former la couche granulaire externe de cervelet. Une fois dans cette structure transitoire, ils vont fortement proliférer en réponse au mitogène Shh produit par les cellules de Purkinje. Dans ma première étude, j'ai démontré qu'une voie de prolifération alternative à Shh existe dans une sous-population de GCP cérébelleux, impliquant le contrôle direct du cycle cellulaire par Otx2.

Nos connaissances concernant la prolifération des GCP des noyaux cochléaires, qui migrent à partir des rhombomères R2 et R3, sont beaucoup plus restreintes. Ils sont, tout comme les GCP du cervelet, sensibles à la tumorigenèse et capables de former des MB Shh. Cependant, les mécanismes à l'origine de la prolifération normale et tumorale de ces cellules sont encore inconnus.

Contrairement à ces deux domaines, cérébelleux et cochléaire, la lèvre rhombique pré-cérébelleuse ne génère que des dérivés post-mitotiques, incompetents à la formation de MB Shh.

La manière dont se comporte le domaine cochléaire semble donc paradoxale. En effet, bien que partageant avec le domaine pré-cérébelleux l'expression de gènes Hox (et en

particulier du facteur de transcription *Hoxa2*), alors que le domaine cérébelleux en est dépourvu, la RL cochléaire se comporte comme celle du domaine cérébelleux, en générant des dérivés prolifératifs (les GCP) sensibles à la formation de MB Shh.

L'observation du pattern d'expression d'*Otx2* et du gène *Hoxa2* dans le domaine cochléaire suggère fortement qu'*Otx2* n'est pas étranger à ce paradoxe.

D'une part, des études de pattern d'expression d'*Otx2* et d'*Hoxa2* ainsi que des études fonctionnelles, à l'aide de mutants perte de fonction *Otx2* et gain de fonction *Hoxa2*, ont été menées pour expliquer ce paradoxe, et d'autre part, l'allèle conditionnel *R26^{SmoM2}* a été employé dans les mêmes études fonctionnelles afin de démontrer le rôle de ces deux gènes dans la capacité des dérivés cérébelleux et cochléaires à former des médulloblastomes.

L'ensemble de cette analyse fait l'objet d'un premier article qui sera soumis très prochainement à publication, intitulé « *Otx2* and *Hoxa2* antagonism coordinates the spatial and temporal production of lower rhombic lip cellular lineages, par Salsabiel El Nagar, Alicia Leblond, Sébastien Ducret, Francisco Nieto Lopez, Beatrice Marcos, Nathalie Vilain, Filippo Rijli, Nathalie Billon, Thomas Lamonerie et Thomas Di Meglio. » et d'un second article en cours de préparation.

Projet 3 : Caractérisation d'un nouveau modèle murin de cancer pédiatrique, les carcinomes des plexus choroïdes

Les médulloblastomes sont les tumeurs du système nerveux les plus fréquentes et les plus dévastatrices chez l'enfant. L'analyse génomique d'une large cohorte de médulloblastomes a permis une meilleure stratification de ce cancer en 4 groupes moléculaires bien distincts : le groupe Wnt, le groupe Shh, le groupe 3 et le groupe 4. La modélisation des deux premiers groupes (WNT et SHH), chez la souris, a joué un rôle fondamental dans la compréhension des processus de tumorigenèse à l'origine de ces cancers, et a également permis le développement de nouvelles thérapies dont certaines ont déjà pu être utilisées chez des patients atteints par ces tumeurs. En revanche, les altérations génomiques et l'origine des MB de type 3 et 4, qui constituent les formes les plus fréquentes (60%) et les plus agressives de la maladie, restent très mal définies. Parmi les aberrations moléculaires fréquemment retrouvées dans les MB du groupe 3, la surexpression et/ou amplification génomique des facteurs c-MYC et OTX2 constituent des événements prépondérants.

Dans ce projet, nous avons tenté d'établir l'un des tout premiers modèles murins génétiquement modifiés mimant la formation de MB du groupe 3, en ciblant la production de l'oncogène c-Myc dans les GCP exprimant Otx2. En effet, bien que la cellule d'origine des MB du groupe 3 n'ait pas encore été formellement identifiée *in vivo*, il semble que les GCP isolés à partir de cervelet de souriceaux, puis modifiés *in vitro* pour sur-exprimer c-Myc, soient capables de former des tumeurs similaires aux MB humains du groupe 3 après transplantation dans le cerveau de souris immunodéficiences. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Professeur Martine Roussel (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, MN, Etats-Unis)

Nous avons décidé d'orienter l'expression de l'oncogène c-Myc uniquement dans les GCP exprimant Otx2, afin de pouvoir ensuite étudier le rôle d'Otx2 dans la formation des tumeurs. Pour cela, nous avons combiné l'utilisation de trois lignées murines : la première est la lignée Otx2^{CreERT2/+} déjà mentionnée plus haut. La seconde permet l'expression conditionnelle d'une forme oncogénique de c-Myc (MycT58A, forme résistante à la dégradation). L'inhibition de l'effet pro-apoptotique de c-Myc via l'inhibition de la protéine suppresseur de tumeurs p53 étant par ailleurs nécessaire pour sa fonction tumorale, une

troisième lignée est utilisée, dans laquelle le gène *Tp53* est flanqué de deux sites loxP (*Tp53*flox), permettant son ablation conditionnelle. Dans les souris issues de ce croisement (*Otx2*^{CreERT2/+} ; *R26*^{MycT58A/MycT58A} ; *Tp53*^{fl/fl}), l'injection de tamoxifène conduira donc, de façon concomitante, à l'expression de *MycT58A* et à l'ablation de *Tp53*, uniquement dans les cellules exprimant *Otx2*, mimant ainsi l'altération génétique majoritairement retrouvée dans les MB du groupe 3 chez l'homme. L'injection de tamoxifène au cours de la première semaine post-natale permettra de cibler la période correspondant au pic de prolifération des GCP, et donc un stade où ces dernières sont extrêmement vulnérables à la tumorigénèse.

Les analyses préliminaires réalisées sur ce modèle ont rapidement indiqué que la totalité des souris traitées au tamoxifène présentaient des signes d'atteinte tumorale cérébrale (hydrocéphalie) et succombaient entre 4 et 5 mois après la naissance. Cependant, de manière très inattendue, l'analyse histo-pathologique des cerveaux de ces souris montre l'absence de médulloblastomes (Figure 20). En revanche, 100% des cas présentent des carcinomes des plexus choroïdes.

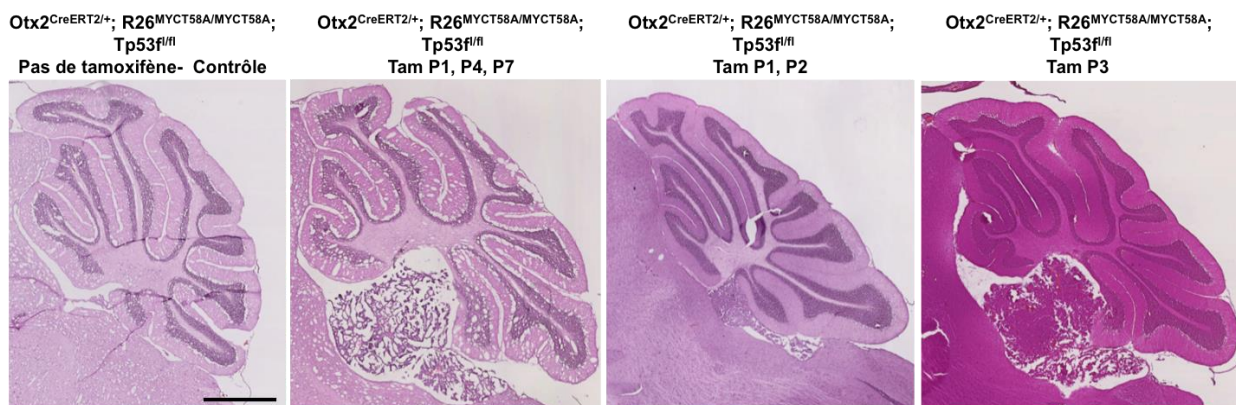


Figure 20: L'expression de *MycT58A* dans les cellules *Otx2* positives n'induit pas la formation de médulloblastome

L'analyse préliminaire des souris *Otx2*^{CreERT2/+} ; *R26*^{MYCT58A/MYCT58A} ; *Tp53*^{fl/fl}, non injectées au tamoxifène (contrôles) et injectées durant la première semaine postnatale, montre que l'expression de *c-MYCT58A* n'induit pas la formation de médulloblastomes mais la formation de carcinomes des plexus choroïdes, visualisables ici au niveau du 4^{ème} ventricule.

Les carcinomes des plexus choroïdes sont, tout comme les médulloblastomes du groupe 3, des tumeurs très agressives qui touchent principalement des enfants. Ils sont associés à un mauvais pronostic avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 40%. Très peu de choses sont connues sur ces tumeurs, pour lesquelles il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle murin.

L'obtention d'un nouveau modèle murin de CPC pourrait permettre une meilleure compréhension des processus de tumorigenèse et le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour combattre ce cancer pédiatrique très agressif. Nous avons donc décidé de caractériser le modèle *Otx2^{CreERT2/+}; Tp53^{F/F}; ROSA26^{MycT58A/MycT58A}* obtenu de manière fortuite dans ce volet de ma thèse, afin de le valider en tant que nouveau modèle de carcinomes des plexus choroïdes.

L'ensemble de cette caractérisation fait l'objet d'un article qui sera prochainement soumis à publication, intitulé « A new genetically engineered mouse model of choroid plexus carcinoma » par Salsabiel El Nagar, Frederique Zindy, Charlotte Moens, Luc Martin, Martine Roussel, Thomas Lamonerie et Nathalie Billon

A new genetically engineered mouse model of choroid plexus carcinoma

Salsabiel El Nagar ⁽¹⁾, Frederique Zindy ⁽²⁾, Charlotte Moens ⁽¹⁾, Luc Martin ⁽¹⁾, Damien Plassard ⁽³⁾, Martine Roussel ⁽²⁾, Thomas Lamonerie ⁽¹⁾, and Nathalie Billon ⁽¹⁾

(1) Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, Nice, France.

(2) Department of Tumor Cell Biology, St. Jude Children's Research Hospital, 262 Danny Thomas Place, Memphis, TN 38105, USA

(3) Plateforme GenomEast, IGBMC, Illkirch, France

Abstract

Choroid plexus carcinomas (CPCs) are highly malignant brain tumours predominantly found in children. Despite intensive therapy, they are associated to a very poor prognosis. Improved therapy for these cancers depends on the generation of animal models, to study tumour biology and for preclinical testing. Here we have created a novel mouse model of CPC by crossing mice engineered to conditionally express a stabilised form of c-Myc (MycT58A) and inactivate p53 (p53flox) with mice expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase in choroid plexus (Otx2-CreERT2). Early postnatal activation of Cre in the resulting mice provoked aberrant proliferation of choroid plexus epithelial cells, leading to aggressive tumour development and death within 150 days. Choroid plexus tumours occurred with a complete penetrance and were observed within all brain ventricles, with prevalence in the lateral and fourth ventricles. Histological and cellular analysis indicated that these tumours were CPCs resembling their human counterparts. Comparison of gene expression profiles of choroid plexus carcinomas and non-neoplastic tissues revealed that these tumours displayed profound alterations in cell cycle regulation and DNA damage responses, suggesting that dysregulation of cell division and DNA checkpoints pathways may represent key features of CPC. The novel animal model we present here therefore provides an invaluable tool to understand the mechanism of CPC tumourigenesis and develop successful therapies against this devastating pediatric cancer.

Introduction

Choroid plexus tumours (CPT) are intracranial brain tumours predominantly occurring in children, accounting for up to 20% of brain tumours in children under one year of age. They are classified into three prognostically relevant histological categories - choroid plexus papillomas (CPP), atypical choroid plexus papillomas (ACPP) and choroid plexus carcinomas (CPC). While CPP and ACPP are relatively benign, CPC represent extremely aggressive brain tumours (World Health Organization [WHO] grade III) associated with a 5-year survival rate of approximately 40%. Genome-wide analysis of large cohorts of paediatric choroid plexus tumours has recently revealed that this heterogeneity in terms of survival prognostic was reflected at the molecular level, since molecular signatures of CPC were shown to differ strongly from those of CPP/aCPP, which might represent a single-tumour entity (Merino et al 2015, Tabori et al 2010).

CPC are believed to derive from a specific epithelium, which differentiates from the roof plate to form

the choroid plexus (CP), a secretory tissue that produces cerebrospinal fluid (CSF) in each ventricle of the brain (Lun et al 2015). CPC occur predominantly in the lateral and fourth ventricles. Less often, they can also be found in the third ventricle, or at multiple ventricle sites (Paulus and Brander 2007, Rickert and Paulus 2001). These tumours have been associated with obstruction of the cerebrospinal fluid pathways and, potentially, overproduction of cerebrospinal fluid, leading to hydrocephalus and increased intracranial pressure (Rickert and Paulus 2001).

CPC are characterized by numerous chromosomal additions and deletions (Paulus and Brander 2007, Rickert et al 2002, Ruland et al 2014), but the oncogenes and suppressor genes responsible for their pathogenesis are poorly understood since these large alterations involve thousands of genes, and very few focal alterations were evidenced when sequencing these paediatric cancers.

CPC were initially found among other brain tumours in transgenic mice expressing SV40 T antigen, suggesting that alteration of Tp53 and/or Rb function might be involved in choroid plexus tumourigenesis (Brinster et al 1984, Saenz Robles et al 1994). Subsequent studies showed that Rb inactivation was required for tumour initiation, while p53 predominantly affected apoptosis of tumour cells once the lesions were formed (Symonds et al 1994). The crucial role of TP53 alterations in CPC was later confirmed in humans. Indeed, CPC are associated with Li-Fraumeni syndrome, a familial cancer syndrome associated to TP53 germline mutations, and CPC tumours displaying somatic TP53 mutations are associated with increased genetic tumour instability and worse prognosis (Merino et al 2015, Tabori et al 2010).

To better define the genetic alterations that drive CPC, Gilbertson et al. recently compared chromosomal amplifications in a cohort human CPC and in tumours derived from a mouse model harbouring loss of Tp53 and Rb function, and of Pten, which was shown to collaborate with Tp53 and Rb ablation to increase CPC tumour penetrance. This cross-species, genome-wide analysis identified a group of concurrently gained oncogenes in human and mouse CPC that cooperate in the formation of these tumours. These genes (TAF12, NFYC and RAD54L) co-localised on human and mouse chromosomes 1 and 4, respectively, and were shown to be involved in tumour initiation and progression. TAF12 and NFYC are transcription factors that regulate the epigenome and DNA metabolism, whereas RAD54L plays a central role in DNA repair, suggesting that dysregulation of DNA maintenance and/or repair is necessary for CPC formation (Tong et al 2015).

Finally, recent examination of a large cohort of human choroid plexus tumours uncovered c-MYC overexpression in more than 43% of cases, suggesting that dysregulation of this factor could play a major function in CPC tumourigenesis (Merve et al 2017). The c-MYC oncoprotein is a pleiotropic transcription factor involved in controlling many cellular functions, including cell proliferation, genome stability and cell death. It is overexpressed in various malignancies, including paediatric brain tumours such as medulloblastoma and glioma, and high expression of c-MYC can drive tumourigenesis in animal models (Pelengaris et al 2002, Wang et al 2011). However, as other oncogenes, c-MYC-induced tumourigenesis is restrained by its ability to activate apoptotic tumour suppressor pathways, and has to be combined to the activation of anti-apoptotic events, such as p53 loss, to fully operate (Momota et al 2008).

The mechanisms underlying choroid plexus formation remain largely unknown, mostly due to the lack of pertinent animal models faithfully reproducing the genetic alterations associated to these cancers in the developing organism. Here, we conditionally overexpressed c-Myc and delete Tp53 in choroid plexus of new-born mice, which led to aberrant growth of choroid plexus cells and to the formation of aggressive carcinoma resembling their human counterparts, thus providing a new precious model to apprehend these devastating paediatric cancer.

Results

Myc activation in postnatal choroid plexus leads to choroid plexus carcinoma

To assess the effects of Myc activation combined to Tp53 ablation in postnatal choroid plexus, we crossed mice harbouring Cre-inducible alleles of a stabilised form of c-Myc (MycT58A) (Wang et al 2011) and Cre-deletable alleles of p53 (p53flox) (Donehower et al 1992, Marino et al 2000) with mice expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase in choroid plexus (Otx2-CreERT2, Fossat 2006), creating *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MYCT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* animals (Fig.1A). Otx2 was chosen to drive Cre expression since it is strongly expressed in the telencephalic, diencephalic, and hindbrain choroid plexus epithelial cells present at the level of the lateral, the third, and the fourth brain ventricles, respectively (Fig. 1B).

We first assessed the recombination efficiency of the Cre recombinase in Otx2-expressing cells upon tamoxifen induction by crossing the Otx2-CreER mouse line with a ROSA26-EYFP Cre reporter strain. When the resulting *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{EYFP/EYFP}* mice were injected with tamoxifen during the first postnatal week, the majority of cells present in the telencephalic, diencephalic, and hindbrain plexus choroid of adult mice expressed enhanced yellow fluorescent protein (EYFP), confirming efficient recombination in the postnatal choroid plexus (Fig. 1C).

We next induced concomitant expression of c-MycT58A and p53 ablation in *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MYCT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* animals by single, double or triple injection of tamoxifen during the first postnatal week. This resulted in aggressive tumour formation with a 100% penetrance. After 100 days, half of the treated mice had succumbed from hydrocephalus, and all of them had died by 150 days (Fig.2A). Pathological analysis of mutant mice at the time of sacrifice revealed the presence of choroid plexus carcinoma in all cases, with tumours mainly located at the level of the 4th ventricle and lateral ventricles, and less frequently in the third ventricle (Fig. 2B). Repeating Tamoxifen induction during the first postnatal week had no incidence on the frequency of tumour formation or the survival rate of induced *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MYCT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* animals, confirming that efficient recombination could be obtained via a single postnatal injection (Fig. 2B).

Immunohistological analysis of the tumours formed in our *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MYCT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* model indicated that they recapitulated typical features of the human plexus choroid carcinoma, such as pronounced enlargement of the tissues, increased cellularity, nuclear pleomorphism, and high vascularization (Fig.2C). Mouse CPC expressed the LIM homeobox transcription factor 1 alpha (Lmx1a), a choroid plexus marker, suggesting that they kept their initial lineage identity. They also expressed the epithelial differentiation markers aquaporin 1 (Aqp1) and transthyretin (Ttr), although to a lower extent than in normal tissues, indicating that Myc-induced carcinogenesis might interfere with differentiation of choroid plexus cells. In line with these findings, sustained mitotic activity could be observed in tumours, as revealed by the presence of many cells expressing the Ki-67 proliferation marker. By contrast, Glial fibrillary acidic protein (GFAP), which has been shown to display variable expression in CPC, could not be detected in our model (Fig. 2D) (Gopal et al 2008).

Enhanced proliferation in Myc-induced CPC tumours

To assess the early effects of MycT58A induction and Tp53 ablation on cell proliferation, we measured the incorporation of the modified nucleoside EdU into replicating DNA in control and *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MYCT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* plexus choroid at P9 (Figure 3A). While at this stage, the mean proliferation index in wild type plexus choroid oscillated between 0,5% in the fourth ventricle, to 2% in the third and lateral ventricles, the rate of division was increased by 2,5 to 10-fold in the choroid plexus of age-matched, recombined *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MYCT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}*, regardless of their location (Fig.3B).

Sustained proliferation affected choroid plexus size, with tumoural tissues being 5 to 20% larger than their healthy counterparts (data not shown). Therefore, c-Myc activation and Tp53 ablation in *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MYCT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* mice caused aberrant growth, transforming postnatal choroid plexus into aggressive CPC tumours.

Comprehensive gene expression profiling reveals abnormal cell division and DNA checkpoints pathways in CPC tumour cells

To identify signals that drive CPC tumorigenesis in our model, we compared transcriptional profiles of tumours and non-neoplastic (control) choroid plexus using next-generation RNA-sequencing. This analysis was performed at P9, shortly after c-MycT58A induction and p53 ablation in *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MYCT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* mice, so that we could capture the early events associated to tumour formation. Tumours and CPs clustered apart in principal component analysis, pinpointing divergent molecular profiles (Fig.4A). Tumour cells displayed 191 differentially expressed genes (DEGs), of which 145 genes were upregulated and 46 genes were downregulated (absolute log₂ fold change ≥ 2 and adj. p-value $< 0,05$) (Fig.4B; sup.Fig.1). Inspection of the “diseases and functions” gene ontology (GO) terms enriched in DEGs disclosed a strong association to “Cancer, Organismal Injury and Abnormalities”, with similarities to other forms of epithelial cancers such as lung, pancreatic, hepatic, gastrointestinal, and uterine carcinoma (Fig.4C, Sup.Table 1). Further GO enrichment analysis revealed “DNA replication, recombination and repair”, “chromosomal instability”, “cell cycle”, and “proliferation of cancer cells” as mostly enriched categories in CPC (Fig.4B).

We next assigned DEGs to pathways composed of curated groups of related genes from multiple databases and evaluated the significance of these pathways, according to the number of DEGs found in the pathway and their position within the pathway, using Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen). This approach identified several signalling and metabolic cascades involved in cell division, DNA damage-induced cell cycle checkpoint regulation, and DNA maintenance and/or repair, as significantly over-represented in tumour cells (Fig. 4D).

Closer examination of the expression of individual members these pathways in CPC versus normal tissues confirmed that many pro-mitotic cell cycle regulators were strongly overexpressed in CPC, such as cyclin B1, cyclin B2, cyclin A1, cdc25, and cdk1, all involved in mitosis, suggesting that tumour cells were actively dividing (sup. Table 2). In line with these findings, enhanced EdU incorporation, denoting abnormal hyperproliferation, was observed in choroid plexus cells of induced *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MYCT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* mice (Fig.3).

This analysis also uncovered that CPC exhibited hallmarks of genomic instability and DNA damage responses. For instance, the tumour suppressor BRCA1, which associates to double-strand DNA breaks (DSBs) and plays a crucial role in DNA repair and cell cycle checkpoints activation allowing cells to have enough time to restore damaged DNA, was strongly upregulated in CPC (sup. Table 2) (Wu et al 2010). We also noticed significant upregulation of the Aurora kinase (AurA) and the polo-like kinase 1 (PLK1), which play pivotal roles in the progression of many cancers by promoting mitotic abnormality and genetic instability, leading to defects in centrosome function, spindle assembly, chromosome alignment, and cytokinesis (Fu et al 2007, Tan et al 2013).

We next compared the transcriptomic signature of our new *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MYCT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* CPC model to other mouse models of plexus choroid tumours (Fig.5). To do so, we first overlapped the list of transcripts differentially expressed in our model with those found modulated in CPC samples derived from *Tp53/Rb/Pten* null mice choroid plexus epithelium (CPE) cells when compared to either normal embryonic or adult CPE (Tong et al 2015). We found that 115 out of 191 (60%) of the *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MYCT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* DEGs were also deregulated in the *Tp53/Rb/Pten*, model, suggesting that they exhibit striking resemblances (Fig.5A). Interrogating the list of transcripts commonly modulated

in these two models using ingenuity pathway functional analysis revealed marked enrichment and regulation of signalling pathways involved in cell proliferation and DNA damage-responses, implicating that modification of these cascades represent core features of CPC tumourigenesis (Fig.5B).

DISCUSSION

One major barrier to the successful implementation of efficient therapy for many childhood cancers is the lack of appropriate preclinical models. Here we describe the generation of a novel, unique mice model of choroid plexus carcinoma, a very aggressive paediatric brain tumour associated with frequent overexpression of the *c-MYC* oncogene. This model was created by expressing a stabilised form of *c-Myc* (T58A) directly into the choroid plexus of new-born mice through an *Otx2*-driven inducible Cre recombinase, in a P53 null background. This led to aberrant growth of choroid plexus epithelial cells and aggressive carcinoma formation in 100% of the mice, offering a unique preclinical model for discovering tumour vulnerabilities and identifying potential therapeutic targets.

***Otx2*^{CreER/+}; *ROSA*^{MYCT58A/MycT58A}; *Tp53*^{fl/fl} mice, a bona fide model of CPC**

The new tumoral model we generated recapitulates many features of human CPC, such as association to hydrocephalus, pleomorphic epithelioid cytology, increased mitotic figures, and preponderance of tumors in the lateral and the fourth ventricles (Gopal et al 2008). Moreover, in humans, this pathology is often associated with the mutation of *Tp53* (Merino et al 2015, Tabori et al 2010), and recent examination of a large cohort of human choroid plexus tumours uncovered *c-MYC* overexpression in more than 43% of cases, suggesting that dysregulation of this factor could play a major function in CPC tumourigenesis (Merve et al 2017). The novel mouse model of CPC that we developed here therefore provides an invaluable *in vivo* system to recapitulate this large subgroup of human CPCs and decipher the mechanisms that contribute to cancer initiation and progression of this subgroup.

Tumour tropism for choroid plexus

Dysregulation of *c-MYC* is found in various malignancies, including several paediatric brain tumours. As in CPC, *c-MYC* amplification is frequently observed in Group3 medulloblastoma (MBG3), another childhood brain cancer with a dismal prognostic. Orthotopic transplant models of *MYC*-driven MBG3 were developed in mice by *in vitro* overexpressing *c-Myc* and functionally inactive *TP53* in progenitor cells of the postnatal cerebellum and transplanting these cells back into the brain of immune-compromised mice (Hanaford et al 2016, Kawauchi et al 2012). Novel mice models of *MYC*-driven medulloblastoma were also recently created by *in utero* electroporation of different sub-populations of embryonic cerebellar progenitors (Kawauchi et al 2017). In all these models, concomitant loss of *Trp53* was required to overcome cell death caused by excessive *Myc* expression. Interestingly, a significant part of the mice electroporated to express *c-Myc* in *Atoh1*⁺ precursors developed CPCs in the fourth ventricle, instead of medulloblastoma in the cerebellum. This was attributed to expression of *Atoh1* in a low proportion of cells of the fourth ventricle choroid plexus, in addition to its predominant expression in granule cell precursors of the cerebellum. These findings demonstrate that the same oncogenic insult can drive different brain cancer types depending on the nature of its cell of origin. In the novel *Otx2*^{CreER/+}; *ROSA*^{MYCT58A/MycT58A}; *Tp53*^{fl/fl} murine model we created here, *c-Myc* expression was driven by an *Otx2*-dependent Cre recombinase (*Otx2*-CreER) in new-born mice. At this stage, *Otx2* is strongly expressed in the telencephalic, diencephalic, and hindbrain choroid plexus, but also in *Atoh1*⁺ granule cell precursors of the developing cerebellum. Intriguingly, however, these mice

only develop plexus choroid carcinoma, and no medulloblastoma. Tumour tropism for the choroid plexus was not due to restricted activation of Otx2-mediated recombination in plexus choroid, since active Cre recombinase could easily be detected in the postnatal cerebellum after tamoxifen induction (data not shown). Furthermore, we have recently used the same Otx2-CreER mouse line to drive constitutive expression of an activated form of the Smoothed (SmoM2) Shh receptor in postnatal GCPs and shown that this led to a rapid over-proliferation of GCPs and the formation of type 2 medulloblastoma (El Nagar *et al.*, submitted to publication). However, it is conceivable that the selective development of choroid plexus tumors in our model reflects different sensitivity of GCP versus choroid plexus cells to c-Myc activation. Here we used a stabilized form of c-Myc, MycT58A, under the control of the relatively weak ROSA26 promoter. While moderate expression of c-Myc is sufficient to induce tumorigenesis in epithelial cells of the choroid plexus, it may not be high enough to induce group 3 medulloblastomas formation in GCPs. In line with this hypothesis, c-Myc-driven medulloblastoma described by Kawaushi *et al.* (2017) could only be achieved through the use of the strong CAG synthetic promoter, allowing intense expression of c-Myc. In addition, the kinase and phosphatase content of targeted cells might influence the outcome of c-Myc expression. The c-Myc protein serine 62 is phosphorylated by ERK, which enhances its stability, and dephosphorylated by PP2A, while phosphorylation on threonine 58 by GSK3 β enhances its degradation through targeting c-Myc to the proteasome (Henriksson *et al.* 1993, Lutterbach and Hann 1994, Pulverer *et al.* 1994, Sears *et al.* 2000). As the MycT58A variant can only be phosphorylated on serine 62, its stability mostly relies on the balance between ERK-dependent phosphorylation and PP2A dephosphorylation of this residue. It would be interesting to compare the level of ERK and PP2A activity in choroid plexus cells and cerebellum granule cell precursors to determine if this could differentially influence the half-life of c-Myc protein in both cell types. Further investigation will be required to understand why our *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MycT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* mice exclusively develop plexus choroid carcinoma. Nevertheless, the exclusion of other neoplastic lesions in this model places it in a privileged position for preclinical testing and the successful implementation of individualized therapy against Myc-induced CPC.

Mechanisms of c-Myc-induced choroid plexus carcinoma formation

c-MYC has been shown to contribute to tumorigenesis by overstimulating cell proliferation and causing genomic instability (Classon *et al.*, 1987; Pelengaris *et al.*, 2002) in part through its role in facilitating the initiation of DNA replication (Cole and Cowling, 2008; Dominguez-Sola *et al.*, 2007; Sankar *et al.*, 2009). Myc overexpression leads to an aberrant activation of several origins of replication and to premature origin firing, causing asymmetrical DNA fork progression and DNA damage, an event defined as “replication stress” (RS) (Srinivasan, Dominguez-Sola, Wang, Hyrien and Gautier, 2013). As a source of genome instability, RS plays a prominent role in tumorigenesis, and constitutes a feature of pre-cancerous and cancerous cells (Gaillard *et al.* 2015). As a first step to understand the mechanism of c-Myc-induced choroid plexus carcinogenesis in our novel model, we performed large-scale gene expression analysis of normal and neoplastic tissues shortly after transformation. This analysis identified deregulation of cell proliferation, as well as of several pathways involved in maintaining genome stability upon DNA damage, as critical events of early tumorigenesis. This concept was supported by the findings that CPC display marked increase in the expression of many pro-mitotic cell cycle regulators, as well as of DNA damage/repair genes, indicating that they might accumulate genomic alterations through bypassing DNA-damage-induced cell cycle checkpoints. These findings suggest that, as in other types of cancers, c-Myc might accelerate CPC progression by promoting genetic instability in choroid plexus cells (Vafa *et al.* 2002). Other murine models of CPC, as well as primary human CPC, were also shown to exhibit hallmarks of genomic instability and aberrant DNA metabolism, indicating that deregulation of DNA maintenance and/or repair may represent key features for CPC tumorigenesis (Tong *et al.* 2015). The genome-wide molecular characterisation of the *Otx2^{CreER/+}; ROSA^{MycT58A/MycT58A}; Tp53^{fl/fl}* model we performed here should help identifying the precise mechanisms by which c-Myc expression and Tp53 ablation contribute to the development of

aggressive choroid plexus tumours in neonates. Interestingly, pharmacological inhibition of AurA and PLK1, two kinases strongly upregulated in our model, has recently gathered great interest as potential therapy for treating pediatric cancers (Pezuk et al 2016).

It is therefore expected that the new animal model we created here can be used not only to elucidate the basic biology of CPC, but can also serve as a platform for discovering tumor vulnerabilities and validating potential therapeutic targets.

Matériels and methods

Mouse breeding and injection

Otx2^{CreERT2/+}, *ROSA^{mycT58A/mycT58A}*, and *Trp53^{fl/fl}* mouse lines (Fossat et al 2006, Marino et al 2000, Wang et al 2011), were crossed together to obtain *Otx2^{CreERT2/+}; ROSA^{mycT58A/mycT58A}; Trp53^{fl/fl}* animals.

Tamoxifen (40ug/g of body weight) was administrated by intraperitoneal injection (IP) during the first postnatal week (single injection at P3 or double injection at P1 and P2 or triple injection at P1, P4 and P7). IP injection of 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (25ug/g of body weight) was performed 1h before sacrifice.

Immunocytochemistry and histological analysis

Brain were fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C, protected in 30% PBS-sucrose and frozen in Tissue-Tek OCT at -80°C (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sagittal and coronal sections of 16 um were cut on a Microm HM550 cryostat, mounted on SuperFrost + slides (Fisher Scientific). For coloration, sections were dehydrated overnight in ethanol-chloroform (1:1 volume) and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) using standard methods. Images were generated on Axio Scan.Z1 slide scanner (Zeiss, Oberkochen, Germany) and analysed with NDP.view2 Viewing software (Hamamatsu, Shizuoka, Japon). For immunostaining, sections were blocked 1h in PBST (PBS with 2% gelatin, 0, 2% Triton and 10% donkey serum), incubated overnight at 4°C with primary antibodies and 1h at room temperature with secondary antibodies. Primary antibodies were: goat anti-Otx2 (1:200, R&D Systems, Minneapolis, USA), rabbit anti-GFP (1:500, Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-Ki67 (1:100, Thermo Scientific, clone SP6), rabbit anti-Ttr (1:100, Abbiotec, San Diego, USA), mouse anti-Aqpr1 (1:200, Abcam), rabbit anti-GFAP (1:1000), goat anti-lmx1a (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, clone C-17), anti-mouse H2aX (1:100). Secondary antibodies were: anti-goat Cy3 (1:1000), anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:1000), anti-mouse Cy3 (1:1000). EdU was revealed using Click-it Edu Alexa Fluor 647 Imaging Kit (Invitrogen, Waltham, USA). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 10ug/ml, Sigma-Aldrich). Images were generated on Zeiss 710 Confocal (Zeiss). The percentage of EdU positive cells was estimated by counting the total number of nuclei and EdU+ cells in choroid plexus on 3 different sections per sample.

RNA isolation, RNA sequencing and bioinformatic analysis

Tissues were triturated in TRI-Reagent (Sigma-Aldrich). Total RNA was extracted using miRNeasy Mini Kit (Quagen, Hilden, Germany). All samples were sequenced on the GenomEast genomic platform (IGBMC, Illkirch, France) on the flow cells HS315 in 50-length Single-Read. Reads were mapped onto the mm10 assembly of the *Mus musculus* genome using Tophat 2.0.10 (Anders and Huber 2010, Kim et al 2013) and bowtie version 2-2.1.0 (Langmead et al 2009). Quantification of gene expression has

been performed using HTSeq-0.6.1 (with annotations coming from Ensembl 84). Read counts have then been normalized across libraries with the median-of-ratios method proposed by Anders and Huber (Anders and Huber 2010). Comparisons of interest were performed using the statistical method proposed by Anders and Huber (Anders and Huber 2010). The Wald test was used to estimate the p-values and they were adjusted for multiple testing with the Benjamini and Hochberg method (Benjamini et al 2001). Differentially expressed genes (DEGs) were defined as those with an absolute $\log_2 FC \geq 2$ and an adjusted $pvalue \leq 0,05$ s. Clustering of DEGs was calculated using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) with the Euclidean distance. The functional and pathway analyses of DEGs were generated through the use of Qiagen Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Qiagen) (Kramer et al 2014).

Statistical analysis

Statistics were performed using two-tailed Student's t-test with a p value < 0.05 considered as significant. Results are presented as the mean \pm SEM.

Acknowledgements

S.E.N. received fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer. This work was supported by grants from Cancéropôle PACA.

REFERENCES

- Anders S, Huber W (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* **11**: R106.
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural brain research* **125**: 279-284.
- Brinster RL, Chen HY, Messing A, van Dyke T, Levine AJ, Palmiter RD (1984). Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors. *Cell* **37**: 367-379.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS *et al* (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**: 215-221.
- Fossat N, Chatelain G, Brun G, Lamonerie T (2006). Temporal and spatial delineation of mouse Otx2 functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep* **7**: 824-830.
- Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C (2007). Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Molecular cancer research : MCR* **5**: 1-10.
- Gaillard H, Garcia-Muse T, Aguilera A (2015). Replication stress and cancer. *Nature reviews Cancer* **15**: 276-289.

- Gopal P, Parker JR, Debski R, Parker JC, Jr. (2008). Choroid plexus carcinoma. *Archives of pathology & laboratory medicine* **132**: 1350-1354.
- Hanaford AR, Archer TC, Price A, Kahlert UD, Maciaczyk J, Nikkhah G *et al* (2016). DiSCoVERing Innovative Therapies for Rare Tumors: Combining Genetically Accurate Disease Models with In Silico Analysis to Identify Novel Therapeutic Targets. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **22**: 3903-3914.
- Henriksson M, Bakardjiev A, Klein G, Luscher B (1993). Phosphorylation sites mapping in the N-terminal domain of c-myc modulate its transforming potential. *Oncogene* **8**: 3199-3209.
- Kawauchi D, Robinson G, Uziel T, Gibson P, Rehg J, Gao C *et al* (2012). A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. *Cancer cell* **21**: 168-180.
- Kawauchi D, Ogg RJ, Liu L, Shih DJH, Finkelstein D, Murphy BL *et al* (2017). Novel MYC-driven medulloblastoma models from multiple embryonic cerebellar cells. *Oncogene* **36**: 5231-5242.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome biology* **14**: R36.
- Kramer A, Green J, Pollard J, Jr., Tugendreich S (2014). Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* **30**: 523-530.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* **10**: R25.
- Lun MP, Johnson MB, Broadbelt KG, Watanabe M, Kang YJ, Chau KF *et al* (2015). Spatially heterogeneous choroid plexus transcriptomes encode positional identity and contribute to regional CSF production. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**: 4903-4916.
- Lutterbach B, Hann SR (1994). Hierarchical phosphorylation at N-terminal transformation-sensitive sites in c-Myc protein is regulated by mitogens and in mitosis. *Molecular and cellular biology* **14**: 5510-5522.
- Marino S, Vooijs M, van Der Gulden H, Jonkers J, Berns A (2000). Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes & development* **14**: 994-1004.
- Merino DM, Shlien A, Villani A, Pienkowska M, Mack S, Ramaswamy V *et al* (2015). Molecular characterization of choroid plexus tumors reveals novel clinically relevant subgroups. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **21**: 184-192.
- Merve A, Acquati S, Hoeck J, Jeyapalan J, Behrens A, Marino S (2017). TMOD-01. CMYC OVEREXPRESSION INDUCES CHOROID PLEXUS TUMOURS THROUGH MODULATION OF INFLAMMATORY PATHWAYS. *Neuro-Oncology* **19**: iv48-iv48.
- Momota H, Shih AH, Edgar MA, Holland EC (2008). c-Myc and beta-catenin cooperate with loss of p53 to generate multiple members of the primitive neuroectodermal tumor family in mice. *Oncogene* **27**: 4392-4401.
- Paulus W, Brander S (2007). Choroid plexus tumors. In: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system (Louis, D. N. *et al.*). *Acta neuropathologica* **114**: 97-109.

- Pelengaris S, Khan M, Evan G (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nature reviews Cancer* **2**: 764-776.
- Pulverer BJ, Fisher C, Vousden K, Littlewood T, Evan G, Woodgett JR (1994). Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated in vivo. *Oncogene* **9**: 59-70.
- Rickert CH, Paulus W (2001). Tumors of the choroid plexus. *Microscopy research and technique* **52**: 104-111.
- Rickert CH, Wiestler OD, Paulus W (2002). Chromosomal imbalances in choroid plexus tumors. *The American journal of pathology* **160**: 1105-1113.
- Ruland V, Hartung S, Kordes U, Wolff JE, Paulus W, Hasselblatt M (2014). Choroid plexus carcinomas are characterized by complex chromosomal alterations related to patient age and prognosis. *Genes, chromosomes & cancer* **53**: 373-380.
- Saenz Robles MT, Symonds H, Chen J, Van Dyke T (1994). Induction versus progression of brain tumor development: differential functions for the pRB- and p53-targeting domains of simian virus 40 T antigen. *Molecular and cellular biology* **14**: 2686-2698.
- Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & development* **14**: 2501-2514.
- Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz Robles M, Jacks T, Van Dyke T (1994). p53-dependent apoptosis in vivo: impact of p53 inactivation on tumorigenesis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **59**: 247-257.
- Tabori U, Shlien A, Baskin B, Levitt S, Ray P, Alon N *et al* (2010). TP53 alterations determine clinical subgroups and survival of patients with choroid plexus tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**: 1995-2001.
- Tan J, Li Z, Lee PL, Guan P, Aau MY, Lee ST *et al* (2013). PDK1 signaling toward PLK1-MYC activation confers oncogenic transformation, tumor-initiating cell activation, and resistance to mTOR-targeted therapy. *Cancer discovery* **3**: 1156-1171.
- Tong Y, Merino D, Nimmervoll B, Gupta K, Wang YD, Finkelstein D *et al* (2015). Cross-Species Genomics Identifies TAF12, NFYC, and RAD54L as Choroid Plexus Carcinoma Oncogenes. *Cancer cell* **27**: 712-727.
- Wang X, Cunningham M, Zhang X, Tokarz S, Laraway B, Troxell M *et al* (2011). Phosphorylation regulates c-Myc's oncogenic activity in the mammary gland. *Cancer research* **71**: 925-936.
- Wu J, Lu LY, Yu X (2010). The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein & cell* **1**: 117-123.

Figures legends

Figure 1: A new genetically-engineered mouse model of choroid plexus carcinoma. (A) Schematic representation of the genome of $Otx2^{creER/+}$; $Rosa^{MYCT58A/MycT58A}$; $Tp53^{fl/fl}$ mice before and after Tamoxifen induction. Alleles of *Otx2*, *Tp53* and *Rosa26* are displayed. This new model was created by combining mice expressing Cre-inducible alleles of a stabilised form of c-Myc (*MycT58A*) from the *Rosa26* locus ($Rosa^{MYCT58A/MycT58A}$) and Cre-deletable alleles of p53 ($Tp53^{fl/fl}$) with mice expressing tamoxifen-inducible Cre from the *Otx2* locus ($Otx2^{creER/+}$). Tamoxifen injection of $Otx2^{creER/+}$; $Rosa^{MYCT58A/MycT58A}$; $Tp53^{fl/fl}$ newborns leads to concomitant expression of c-MycT58A and *Tp53* ablation in *Otx2*-expressing choroid plexus cells. (B) Expression of *Otx2* in the lateral, third and fourth ventricles choroid plexus of a wild type mouse at P5. *Otx2* protein was detected by immunofluorescence staining (red) on sagittal (lateral and fourth ventricles) or coronal (third ventricle) sections. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). (C) Expression of the recombined $ROSA^{YFP}$ fluorescent lineage tracing allele in the lateral, third and fourth ventricle choroid plexus of an $Otx2^{CreERT2/+}$; $Rosa^{EYFP/EYFP}$ adult mice injected with tamoxifen at P3. Massive expression of YFP (green) could be detected, indicating that postnatal choroid plexus cells were fully recombined. Scale bar: 50 μ m.

Figure 2: Histopathological analysis of choroid plexus carcinomas in $Otx2^{creER/+}$; $Rosa^{MYCT58A/MycT58A}$; $Tp53^{fl/fl}$ mice. (A) Kaplan-Meier survival curves of $Otx2^{creER/+}$; $Rosa^{MYCT58A/MycT58A}$; $Tp53^{fl/fl}$ newborn mice injected (pink) or not (green) with tamoxifen. By 120 days, 50% of injected mice were dead, and none of them survived more than 150 days. (B) Summary of CPC incidence and location. Tumor development occurred with a complete penetrance and predominantly in the choroid plexus of the lateral, and fourth ventricles. Single, double, or triple injection of tamoxifen during the first postnatal week had no effect on the incidence, or the location of CPC. (C) Hematoxylin and Eosin staining of the lateral and fourth ventricles of adult mice injected with tamoxifen at P3, or in their non-injected control littermates. 5X, 25X, and 40X Brain sections enlargements are displayed to show the location and histological features of CPCs in the mutant mice. (D) Expression of *Lmx1a*, *Transtyretin (TTR)*, *Aquaporin1 (Aqp1)*, *GFAP* and *Ki67* in representative neoplastic or normal choroid plexus of the lateral ventricle choroid from control (no tamoxifen) or mutant (tamoxifen) adult mice. Indicated antigens were detected by immunostaining on sagittal sections (red), while nuclei were counterstained with DAPI (blue). While *Lmx1a*, *Ttr*, *Aqp1* and *Ki67* could be detected in CPC cells, *GFAP* was almost absent from both normal and tumoral tissues (white arrow shows the only positive cell present on this picture). CPC= choroid plexus carcinoma; lat= lateral; OB= olfactory bulbs; P= postnatal day. Scale bar: 2,5 mm (C, 1.25X), 500 μ m (C, 5X), 100 μ m (C, 40X) and 25 μ m (D).

Figure 3: CPC tumorigenesis in $Otx2^{creER/+}$; $Rosa^{MYCT58A/MycT58A}$; $Tp53^{fl/fl}$ mice is associated to an early hyperproliferation of CP cells. (A) Detection of replicating cell in the fourth ventricle choroid plexus of representative control (no tamoxifen) or mutant (tamoxifen) mice at P9. Mice were injected with EdU 1h before sacrifice and EdU incorporation was detected by fluorescence staining on sagittal sections (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). (B) Quantification of EdU positive cells in the choroid plexus of lateral, third and fourth ventricle, showing increased number of proliferating cells in neoplastic choroid plexus of injected mice. P= postnatal. Scale bar: 25 μ m. Data are represented as mean +/- sem. *p<0.05.

Figure 4: Molecular characterisation of CPCs in $Otx2^{creER/+}$; $Rosa^{MYCT58A/MycT58A}$; $Tp53^{fl/fl}$ by RNA seq transcriptomic analysis. (A) Principal component analysis (PCA) of choroid plexus carcinomas (CPC, blue dots) and wild type choroid plexus (WT, red dots) at P9 (n= 4 specimens per group). PCA was based on normalized and stabilized gene expression levels and performed with the FactoMiner and Factoextra R packages. The ellipse represents the 95% confidence of the barycenter for each condition. (B) Heat map representation and hierarchical clustering of genes differentially expressed in CPC versus normal tissues (\log_2 FC ≥ 2 or ≤ -2 ; and p-adjusted value < 0.05). Expression values and \log_2 FC are

represented based on the RNA seq. results obtained from 4 tumor (CPC1-CPC4) and 4 control (C1-C4) tissues. (C) IPA Functional analysis of genes differentially expressed (DEGs) in CPC. DEGs were defined as the genes with an absolute fold change (FC) ≥ 2 and an adjusted pvalue $< 0,05$. The most enriched biological functions were highlighted with different colors and displayed upon their levels of significance (z score up to 1 and below -1). Bar color correspond to IPA diseases and functions categories. (D) IPA pathways analysis of genes differentially expressed in CPC. The canonical pathways that were most significant to DEGs are displayed as nodes whose size is correlated to the number of DEGs in the pathway and the color is a function of the Ingenuity activation z score. Blue indicates predicted negative activation of the pathway, red indicates predicted positive activation, while grey indicates that no prediction could be drawn out from the analysis. Edge width between pathways indicates number of shared differentially expressed genes (1 to 4). Representation was performed with the Cytoscape software.

Figure 5: Meta-analysis of the transcriptomic signature of $Otx2^{creER/+}$; $Rosa^{MYCT58A/Myct58A}$; $Tp53^{fl/fl}$ CPC to other mice models of CPC. (A) Overlapping of the sets of genes differentially expressed in our model versus CPC samples derived from $Tp53/RB/Pten$ null mice (Tong et al 2015), revealing marked similarities. 2 sets of DEGs were derived from the $Tp53/RB/Pten$ CPC model since tumour cells were compared to either control embryonic choroid plexus, or adult choroid plexus. (B) IPA functional pathway analysis of the genes commonly regulated in these 2 models suggesting that abnormal regulation of cell division and DNA maintenance represent core features of CPC tumourigenesis.

Supplementary Figures

Sup. Table 1: List of differentially expressed genes (DEGs) in choroid plexus of induced versus control $Otx2^{creER/+}$; $Rosa^{MYCT58A/Myct58A}$; $Tp53^{fl/fl}$ mice at P9. Genes with a \log_2 fold-change ≥ 2 or ≤ -2 and a p-adjusted value < 0.05 were selected based on RNA-sequencing of 4 control and 4 CPC samples.

Sup. Table. 2: IPA Functional analysis of genes differentially expressed (DEGs) in CPC. This analysis identifies biological functions and/or diseases that are most significant to the data set. p-value determines the probability that each biological function and/or disease assigned to that data set is due to chance alone.

Sup. Table. 3: IPA pathways analysis of genes differentially expressed (DEGs) in CPC. This analysis identifies the top canonical pathways that are most significant to the data set. The ranking was based on the p values derived from the Fisher's exact test.

Figure 1 El Nagar et.al

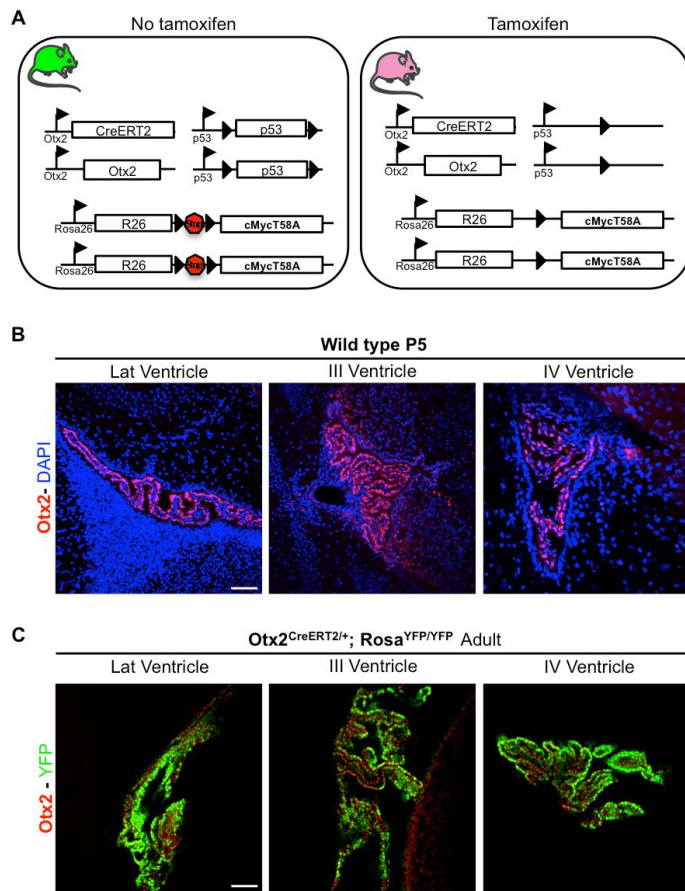


Figure 2 El Nagar et.al

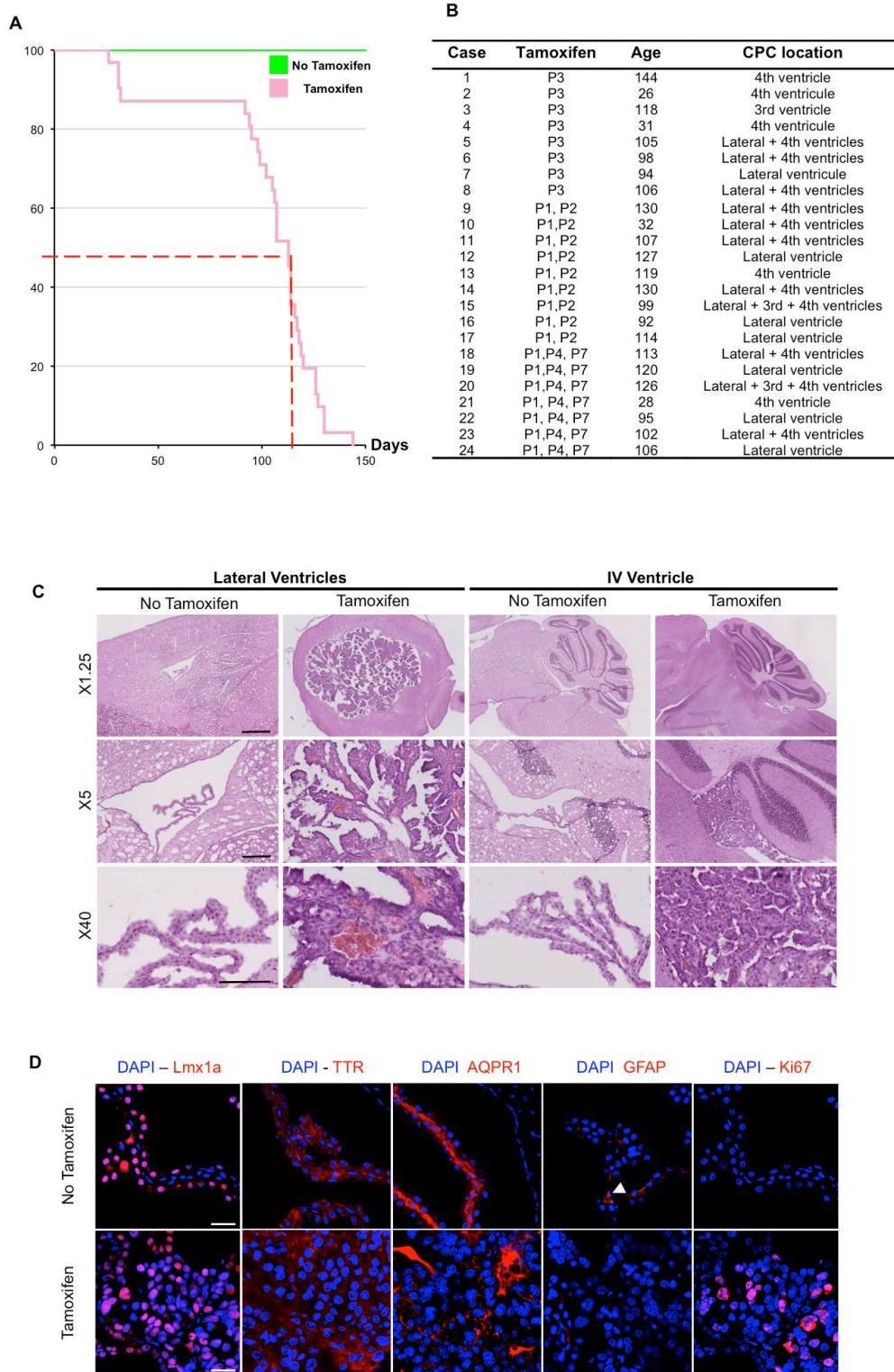


Figure 3 El Nagar et.al

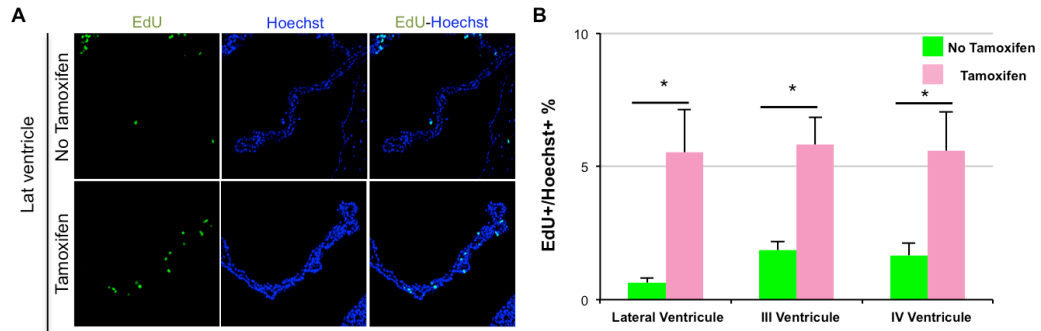


Figure 4 El Nagar et.al

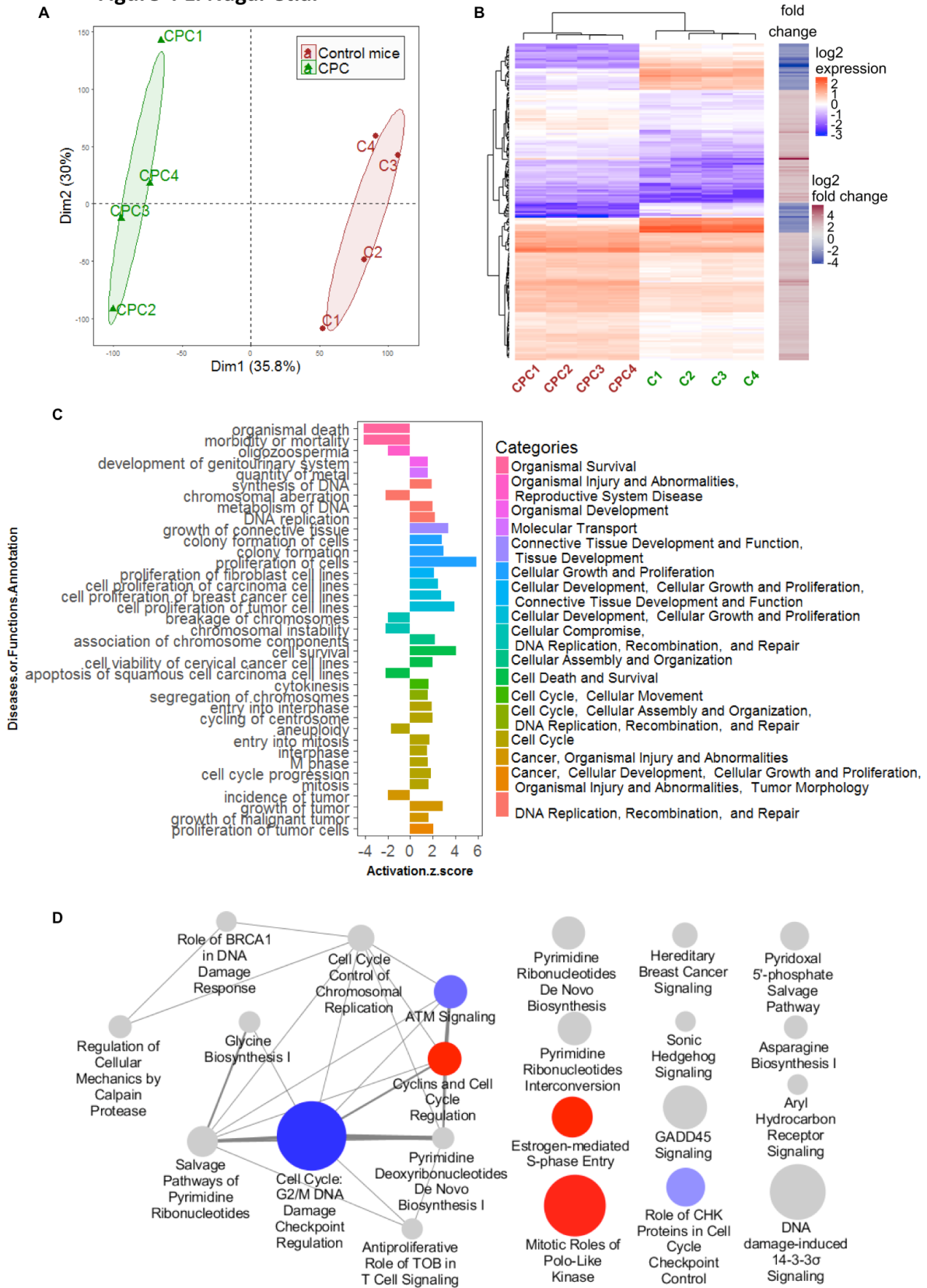
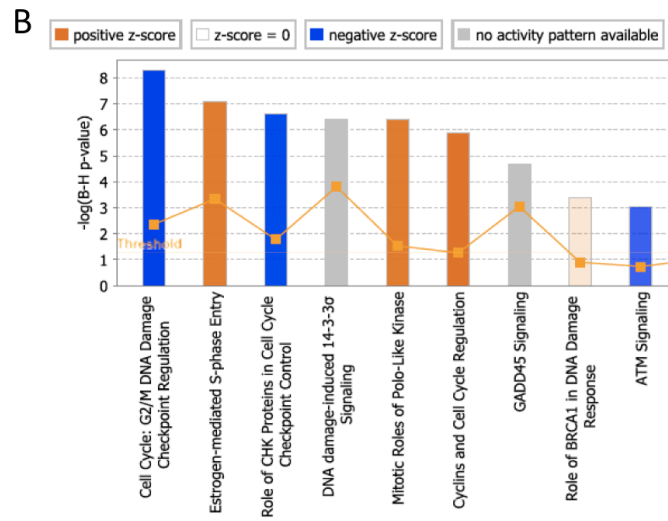
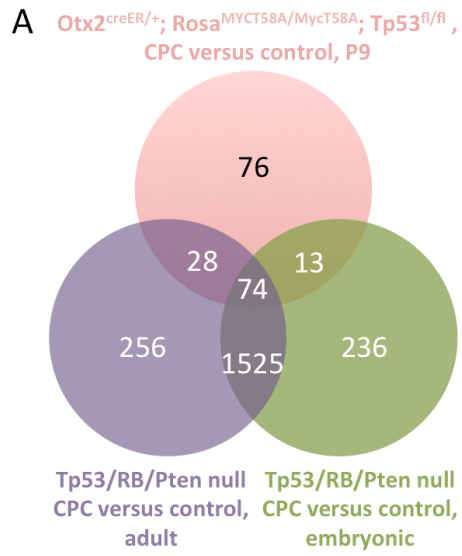


Figure 5 El Nagar et.al



Sup. Table 1 El Nagar et al.

Ensembl gene id	Gene name	mean normal	mean tumor	(log2(FC) tumor vs CrP-value	tumor vs Adjusted p-value	tumor vs Control
ENSMUSG00000020534	Shmt1	193,1196197	1940,08513	3,261759089	1,3896E-123	4,281E-119
ENSMUSG00000039977	Ccdc67	503,0071434	2649,43273	2,369690467	4,8568E-109	7,4814E-105
ENSMUSG00000041608	Entpd3	2110,381978	291,88702	-2,795091307	4,60547E-90	4,72951E-86
ENSMUSG00000037544	Dlgap5	109,2380392	961,152474	3,044521141	4,01716E-80	3,09402E-76
ENSMUSG00000019942	Cdk1	999,8511204	4455,02957	2,125445793	1,06229E-76	6,54543E-73
ENSMUSG00000039092	Sptlc3	398,3133106	14,0381363	-4,478899056	6,94437E-73	3,5657E-69
ENSMUSG00000078926	Cdc20b	170,1020281	828,511206	2,246532069	1,93229E-72	8,50427E-69
ENSMUSG00000020649	Rrm2	273,3130995	2123,87631	2,868398123	2,40516E-67	9,26227E-64
ENSMUSG00000020080	Hkdc1	1051,459827	86,9909566	-3,437243326	6,87947E-65	2,35492E-61
ENSMUSG00000028600	Podn	2038,975418	372,860041	-2,398599815	2,89686E-62	8,92464E-59
ENSMUSG00000021175	Cdca7l	91,06414021	465,844847	3,035249207	6,09067E-62	1,70583E-58
ENSMUSG00000028718	Stil	185,2609546	809,202205	2,086993106	8,18212E-61	2,10062E-57
ENSMUSG00000079465	Col4a3	5751,530828	919,914849	-2,574707343	1,80002E-60	4,26577E-57
ENSMUSG00000037572	Wdhd1	204,0071377	1079,12008	2,345768576	5,56688E-58	1,22503E-54
ENSMUSG000000058523	Mup5	2,267373777	465,844848	5,9981106	8,34815E-58	1,55221E-54
ENSMUSG000000057541	Pus7	450,7327879	1880,42401	2,023880925	1,2987E-57	2,22281E-54
ENSMUSG00000041431	Ccnb1	136,4202539	794,105043	2,470108621	4,70582E-56	7,63036E-53
ENSMUSG00000072845	Tmprss11a	459,7738237	17,187732	-4,321261763	5,40071E-56	8,31926E-53
ENSMUSG000000067158	Col4a4	5621,296973	910,793167	-2,551731613	1,73278E-55	2,54206E-52
ENSMUSG00000023505	Cdca3	273,1449097	1575,86888	2,458223732	3,8467E-55	5,38678E-52
ENSMUSG00000030495	Slc7a10	8215,341805	1550,55477	-2,34780058	7,0722E-55	9,47306E-52
ENSMUSG00000020185	E2f7	302,7098283	1372,33033	2,137538572	1,00762E-53	1,19395E-50
ENSMUSG00000074578	Zfas1	951,5053272	6406,74409	2,661266473	9,41948E-53	1,03641E-49
ENSMUSG00000016942	Tmprss6	133,8389387	1282,15885	3,113646707	1,58179E-52	1,68041E-49
ENSMUSG00000026605	Cenpf	376,9288485	1952,20862	2,311605092	2,84896E-52	2,92569E-49
ENSMUSG000000037474	Dtl	185,7437011	1350,25953	2,754875154	1,00516E-50	9,98931E-48
ENSMUSG000000051728	4930563D23Rik	330,3241651	30,3638069	-3,262544885	8,77475E-50	8,44789E-47
ENSMUSG00000002068	Ccne1	91,04063028	492,794535	2,35973687	3,34716E-48	3,03292E-45
ENSMUSG000000031004	Mki67	998,8776702	5737,30683	2,442755898	8,96822E-47	7,46738E-44
ENSMUSG00000032218	Ccnb2	185,2849776	1155,60303	2,546388376	3,12559E-46	2,46905E-43
ENSMUSG00000022033	Pbk	139,5934135	969,182491	2,68277109	3,56705E-46	2,74734E-43
ENSMUSG000000086841	2410006H16Rik	491,8425852	2166,61744	2,087944952	3,26909E-45	2,39796E-42
ENSMUSG000000020140	Lgr5	76,00390133	414,259805	2,379014783	9,73665E-45	6,97597E-42
ENSMUSG00000032400	Zwilch	241,6097106	1128,44392	2,162048326	1,15977E-43	7,76746E-41
ENSMUSG00000048922	Cdca2	123,3876564	603,942539	2,223297665	1,98801E-42	1,27597E-39
ENSMUSG000000027496	Aurka	118,5433089	740,615474	2,537801164	3,32183E-42	2,04678E-39
ENSMUSG000000028678	Kif2c	112,6582681	603,572345	2,338473495	3,28093E-42	2,04678E-39
ENSMUSG00000039748	Exo1	50,69191641	370,112059	2,733233414	7,82053E-42	4,54594E-39
ENSMUSG00000020330	Hmmr	121,6219745	808,259644	2,618191728	1,06725E-41	5,97817E-39
ENSMUSG000000039004	Bmp6	4927,089885	955,001208	-2,294306853	1,06494E-41	5,97817E-39
ENSMUSG00000024552	Slc14a2	113,7510879	1990,05768	3,749810278	1,06134E-40	5,63757E-38
ENSMUSG00000025068	Gsto1	472,9311916	2687,99823	2,418829998	3,67179E-40	1,88534E-37
ENSMUSG000000048776	Pthlh	144,6185979	810,191433	2,391284709	6,65222E-38	3,15295E-35
ENSMUSG000000097159	Gm26517	9,188834743	142,874854	3,590461645	1,79868E-37	8,39601E-35
ENSMUSG00000029752	Asns	146,8870493	948,939598	2,565679778	1,22755E-36	5,40261E-34
ENSMUSG000000045328	Cenpe	181,075212	785,151577	2,053274927	2,97781E-36	1,29212E-33
ENSMUSG000000091402	Rd3l	464,1879192	97,4083775	-2,175674614	1,11136E-35	4,62688E-33
ENSMUSG00000070645	Ren1	86,10744469	471,578366	2,364095044	5,17168E-35	2,09644E-32
ENSMUSG00000019768	Esr1	15,42861768	228,884046	3,491022711	7,90012E-35	3,16087E-32
ENSMUSG00000027654	Fam83d	106,5385238	832,248757	2,790007494	8,12529E-35	3,20928E-32
ENSMUSG000000028702	Rad54l	99,92121001	582,4677	2,429320467	2,17971E-34	8,39405E-32
ENSMUSG00000040658	Dnph1	84,8204349	530,143848	2,512716559	2,04697E-33	7,24864E-31
ENSMUSG000000092090	Gm3294	894,8763287	172,530934	-2,282736181	2,79691E-33	9,68172E-31
ENSMUSG000000031562	Dctd	127,6110012	820,290696	2,545220895	3,31307E-33	1,1341E-30
ENSMUSG000000003779	Kif20a	247,6778371	1295,41856	2,289768403	5,48959E-33	1,8383E-30
ENSMUSG00000039055	Eme1	36,57764585	230,567451	2,519281319	6,1271E-33	2,02972E-30
ENSMUSG000000044201	Cdc25c	35,46932162	215,412446	2,470264034	1,20128E-32	3,93712E-30
ENSMUSG000000027331	Knstrn	166,7139951	1061,83685	2,534307304	1,32944E-32	4,3113E-30
ENSMUSG00000097769	Snhg4	77,46720171	784,928937	3,082091358	3,0814E-32	9,68692E-30
ENSMUSG00000007080	Pole	269,2256734	1323,94185	2,2082542	4,00553E-32	1,24649E-29
ENSMUSG00000024992	Pde6c	190,4390905	11,0147925	-3,620005693	2,24388E-31	6,77739E-29
ENSMUSG00000006398	Cdc20	240,955947	1091,06789	2,096992812	1,10531E-30	3,18247E-28
ENSMUSG00000006585	Cdt1	215,9696095	953,77088	2,064485341	2,3539E-30	6,53323E-28
ENSMUSG00000038537	Mc3r	248,0399256	19,9799336	-3,274021273	3,97276E-30	1,07362E-27
ENSMUSG000000025574	Tk1	203,0251506	1181,95986	2,410542201	1,58571E-29	4,10524E-27
ENSMUSG00000021965	Ska3	59,91776459	329,37289	2,33373738	3,81134E-29	9,62457E-27
ENSMUSG00000035200	Chrn4	180,5673236	16,3898232	-3,131636907	8,46388E-29	2,10286E-26
ENSMUSG00000040084	Bub1b	232,6405287	1152,78962	2,20661763	2,11612E-28	5,13334E-26
ENSMUSG000000023940	Sgol1	48,49343425	250,868186	2,250964694	2,74008E-28	6,59504E-26
ENSMUSG00000015880	Ncapg	94,65742125	504,325902	2,295512685	3,07627E-28	7,34681E-26
ENSMUSG00000005470	Asf1b	100,5086269	433,742528	2,0229517	4,35768E-28	1,01706E-25
ENSMUSG00000033952	Aspm	192,3929439	853,723342	2,064768098	7,57792E-28	1,71662E-25

ENSMUSG00000041193	Pla2g5	2117,478179	292,136359	-2,665296912	1,69237E-27	3,72417E-25
ENSMUSG00000092203	1110038B12Rik	397,2760844	2153,26404	2,313832157	4,05381E-27	8,79504E-25
ENSMUSG00000001403	Ube2c	149,7728707	713,662298	2,150196081	4,23603E-27	9,06274E-25
ENSMUSG000000050107	Gsg2	36,57580921	186,370937	2,238705274	5,82081E-27	1,20354E-24
ENSMUSG00000006948	Klk4	422,3239227	78,1522485	-2,308909053	7,42728E-27	1,51536E-24
ENSMUSG00000026429	Ube2t	54,10863869	324,568444	2,425789591	4,30102E-26	8,66051E-24
ENSMUSG00000028873	Cdca8	135,9683267	624,652847	2,095526826	4,34829E-25	8,11891E-23
ENSMUSG00000005233	Spc25	87,57471381	378,669041	2,016727434	4,40571E-25	8,17658E-23
ENSMUSG00000062248	Cks2	133,0412666	571,070809	2,010472131	5,14269E-25	9,48719E-23
ENSMUSG00000002588	Pon1	497,8919029	76,776389	-2,519299026	6,13229E-25	1,12455E-22
ENSMUSG00000040564	Apoc1	792,241351	141,429795	-2,343085311	6,38889E-25	1,16467E-22
ENSMUSG00000066058	Cldn19	268,916142	1176,66355	2,036591001	6,85259E-25	1,24185E-22
ENSMUSG00000026622	Nek2	238,3960439	1045,59551	2,041520289	8,03328E-25	1,43889E-22
ENSMUSG00000073964	Olfir570	584,3924078	99,7385451	-2,394782874	1,29593E-24	2,29455E-22
ENSMUSG00000106718	Gm20052	102,090278	438,61976	2,01783362	1,42074E-24	2,50115E-22
ENSMUSG00000029414	Kntc1	133,4471879	749,097501	2,339983756	1,73909E-24	3,04419E-22
ENSMUSG00000038943	Prc1	406,1661719	1820,28616	2,06440628	4,09187E-24	7,00346E-22
ENSMUSG00000042489	Clspn	125,0872796	539,286787	2,009719804	3,2635E-23	5,05236E-21
ENSMUSG00000025507	Pidd1	637,010162	2773,55081	2,02554488	3,3502E-23	5,16065E-21
ENSMUSG00000027306	Nusap1	180,7292123	887,748475	2,170559677	3,66811E-23	5,62225E-21
ENSMUSG000000039639	Kcne1	12,74369676	93,7446489	2,66030024	4,12079E-23	6,28482E-21
ENSMUSG00000002055	Spag5	260,9717892	1126,30949	2,01109867	4,30438E-23	6,53248E-21
ENSMUSG00000009108	Gnat2	47,79534207	203,425138	2,004655186	1,55034E-22	2,24238E-20
ENSMUSG00000024791	Cdca5	55,48035903	339,795033	2,423003982	2,91842E-22	4,06836E-20
ENSMUSG000000037393	Nmur2	127,3053302	819,236658	2,488127958	3,1746E-22	4,38579E-20
ENSMUSG000000035486	Plk5	2285,997858	349,583227	-2,50448331	5,25492E-22	7,16343E-20
ENSMUSG000000046179	E2f8	88,78391455	540,304492	2,415387502	7,23795E-22	9,73742E-20
ENSMUSG00000017716	Birc5	168,3981954	730,369322	2,009313134	9,84018E-22	1,3011E-19
ENSMUSG00000029830	Svopl	399,4000818	1998,03159	2,19043511	1,18698E-21	1,55611E-19
ENSMUSG00000032815	Fanca	112,4457136	519,066044	2,085402675	1,30067E-21	1,69792E-19
ENSMUSG00000047534	Mis18bp1	57,79849592	279,680957	2,129924184	9,21423E-21	1,09603E-18
ENSMUSG000000035365	Parpbp	37,70507557	236,743626	2,009412415	1,0541E-20	1,24903E-18
ENSMUSG000000038379	Ttk	54,74305665	308,45627	2,311758799	1,33096E-20	1,56505E-18
ENSMUSG00000028587	Orc1	18,62119149	117,085154	2,454510424	1,50846E-20	1,76032E-18
ENSMUSG000000032988	Slc16a8	3489,152116	569,412589	-2,415962842	1,92393E-20	2,18718E-18
ENSMUSG00000049971	Glt1d1	60,53377077	301,344792	2,170667829	2,82918E-20	3,14662E-18
ENSMUSG000000035683	Melk	107,7356649	477,413095	2,027355926	5,4441E-20	5,92657E-18
ENSMUSG000000049916	2610318N02Rik	5,393346138	78,0545549	3,24818027	8,43611E-20	8,8703E-18
ENSMUSG000000039187	Fanci	79,11614602	439,783095	2,289044903	1,88804E-19	1,93245E-17
ENSMUSG000000076609	Igkc	147,7615879	24,3884527	-2,390858347	2,07492E-19	2,10971E-17
ENSMUSG000000070469	Adamts13	1436,168565	146,561063	-2,888330322	2,46652E-19	2,49142E-17
ENSMUSG000000027379	Bub1	103,7026213	495,507319	2,113789017	2,71049E-19	2,7159E-17
ENSMUSG00000034258	Mfsd7c	1021,777361	233,317181	-2,01288941	2,72401E-19	2,7159E-17
ENSMUSG000000028654	Mycl	198,4514332	868,473946	2,009610586	2,83481E-19	2,81725E-17
ENSMUSG000000051354	Samd3	54,39855118	253,189519	2,090151663	4,07364E-19	3,95901E-17
ENSMUSG00000020897	Aurkb	143,1934323	843,653695	2,349963728	8,51096E-19	7,89776E-17
ENSMUSG000000048988	Elfn1	404,8105517	65,8829765	-2,402785253	9,2221E-19	8,48103E-17
ENSMUSG000000072980	Oip5	30,36185492	198,487604	2,45457084	1,00276E-18	9,1671E-17
ENSMUSG000000020303	Stc2	35,03209227	236,962686	2,488988542	1,31757E-18	1,1869E-16
ENSMUSG00000017146	Brca1	141,3555828	620,17343	2,010453161	1,63186E-18	1,44883E-16
ENSMUSG000000078922	Tgtp1	110,3839671	13,2633639	-2,710266703	2,30509E-18	2,00608E-16
ENSMUSG000000019803	Nr2e1	258,9894393	25,3017201	-2,905902402	2,77597E-18	2,40907E-16
ENSMUSG00000028003	Lrat	65,53525029	1,67562484	-3,696546221	3,17194E-18	2,73729E-16
ENSMUSG000000038583	Pln	122,2535605	14,1984129	-2,735297142	3,28875E-18	2,82228E-16
ENSMUSG00000028012	Rrh	99,23435892	22,1407386	-2,029561182	4,73894E-18	3,98899E-16
ENSMUSG000000028068	Iqgap3	208,6117245	1010,11361	2,120269454	4,96687E-18	4,16946E-16
ENSMUSG000000087367	Gm15491	18,14544859	113,964029	2,418598546	5,33965E-18	4,4581E-16
ENSMUSG000000041064	Pif1	39,75141956	189,872382	2,094644331	1,32895E-17	1,07743E-15
ENSMUSG000000053886	Sh2d4a	26,50249365	130,072314	2,131044337	1,76547E-17	1,41643E-15
ENSMUSG000000029370	Rassf6	23,73419701	118,984868	2,143838965	2,96266E-17	2,32841E-15
ENSMUSG000000047415	Gpr68	20,96378643	198,748027	2,789555784	3,89804E-17	3,04027E-15
ENSMUSG000000035498	Cdcp1	10,32735788	90,8175436	2,761729257	4,33352E-17	3,34604E-15
ENSMUSG000000024177	Nme4	109,6884793	550,061377	2,149204921	4,55498E-17	3,4995E-15
ENSMUSG000000022034	Esco2	55,56482737	410,43791	2,562846485	4,67492E-17	3,57382E-15
ENSMUSG000000045625	Pigz	141,4375943	31,5400848	-2,025665085	4,7859E-17	3,6496E-15
ENSMUSG000000104939	Gm33651	4,044848839	62,3266784	3,163452688	5,25623E-17	3,99837E-15
ENSMUSG000000027793	Ccna1	69,51075004	357,511987	2,172834819	7,18747E-17	5,37455E-15
ENSMUSG000000022026	Olfm4	24,5864253	163,16539	2,458339945	7,80249E-17	5,82032E-15
ENSMUSG000000097180	2700038G22Rik	60,78864128	309,203164	2,161310912	9,54041E-17	6,99812E-15
ENSMUSG000000071470	Ccnb1ip1	15,54497705	103,019551	2,4589135	1,0774E-16	7,79166E-15
ENSMUSG000000027827	Kcnab1	340,0643537	70,671861	-2,102922917	2,36532E-16	1,6503E-14
ENSMUSG000000045273	Cenph	59,19751051	273,765186	2,042764835	4,40405E-16	3,02182E-14
ENSMUSG000000046295	Ankle1	60,12154436	426,860452	2,504879611	4,94089E-16	3,36768E-14
ENSMUSG000000087060	Eldr	34,08469942	181,12858	2,195871473	1,74982E-15	1,14455E-13
ENSMUSG000000038115	Ano2	52,28744237	4,86909803	-2,83835544	4,02498E-15	2,53582E-13
ENSMUSG000000095105	Edaradd	76,27888252	15,2657805	-2,128749333	4,15979E-15	2,61008E-13

ENSMUSG00000034452	Slc24a1	61,65300611	3,67187558	-3,127541644	5,87376E-15	3,62643E-13
ENSMUSG00000030994	D7Ert443e	12,3612065	93,5818553	2,56535316	6,32792E-15	3,86041E-13
ENSMUSG00000030867	Plk1	146,1171153	748,430044	2,148171022	6,54374E-15	3,98418E-13
ENSMUSG00000034883	Lrr1	4,947890247	54,5516569	2,824875527	1,1662E-14	6,92261E-13
ENSMUSG00000032500	Dclk3	17,75961863	98,992905	2,21934283	4,85178E-14	2,70296E-12
ENSMUSG00000108151	Gm44290	47,06980752	2,88875697	-3,02351355	1,22859E-13	6,64042E-12
ENSMUSG00000043155	Hpd1	4,809167818	50,5440968	2,720065784	3,29969E-13	1,70852E-11
ENSMUSG00000098318	Lockd	35,66830943	173,021558	2,054474757	3,60379E-13	1,85973E-11
ENSMUSG00000068227	Il2rb	9,85067612	54,5853531	2,214339551	4,10611E-13	2,10135E-11
ENSMUSG00000041774	Ydjc	47,20761568	254,179587	2,168532789	5,5632E-13	2,80051E-11
ENSMUSG00000058287	Gm12253	6,590722982	54,0556126	2,483427011	1,15665E-11	4,96989E-10
ENSMUSG00000030433	Sbk2	93,29259757	16,322028	-2,204409743	1,18014E-11	5,05673E-10
ENSMUSG00000107488	Gm44400	0,273887886	23,6257552	3,103840999	5,09278E-11	2,04561E-09
ENSMUSG00000047443	Fam132b	6,855839428	56,8036602	2,474417256	5,3801E-11	2,14702E-09
ENSMUSG00000032313	Tmem266	17,19156227	107,81313	2,249413349	6,17106E-11	2,44054E-09
ENSMUSG00000099703	Gm28285	1,164600882	32,035875	2,954662552	7,87048E-11	3,07318E-09
ENSMUSG00000050808	Muc15	563,1835917	103,514414	-2,12233989	1,3546E-10	5,13316E-09
ENSMUSG00000102004	4933402C06Rik	3,881519899	32,3716153	2,453844537	1,68708E-10	6,24707E-09
ENSMUSG00000025081	Tdrd1	10,20324478	64,3293466	2,238186227	3,19331E-10	1,14129E-08
ENSMUSG00000102353	Gm38345	39,16793495	215,69587	2,121218519	3,34753E-10	1,18951E-08
ENSMUSG00000025592	Dach2	606,9745414	118,378121	-2,055187937	3,49539E-10	1,23777E-08
ENSMUSG00000026100	Mstn	6,289166196	42,0902777	2,265059893	5,35989E-10	1,84913E-08
ENSMUSG00000101257	2310015K22Rik	3,744309767	42,2230736	2,59755698	1,15781E-09	3,79467E-08
ENSMUSG00000038932	Tcf5	82,68304674	14,8457447	-2,104697544	1,66349E-09	5,30527E-08
ENSMUSG00000009214	Tmem8c	0,472028217	19,1717273	2,828799364	1,69464E-09	5,39902E-08
ENSMUSG00000107125	Gm3822	3,669459999	39,5467339	2,504046384	2,01423E-09	6,32561E-08
ENSMUSG00000022542	Sept12	2,231544674	30,9303441	2,619247085	2,1217E-09	6,60923E-08
ENSMUSG00000003309	Ap1m2	0,758688786	17,5804139	2,668925707	7,88143E-09	2,25451E-07
ENSMUSG00000063260	Syt10	48,7734847	8,36749824	-2,088737653	2,10434E-08	5,65217E-07
ENSMUSG00000053168	9030619P08Rik	2,794660934	29,9578289	2,398244392	2,82356E-08	7,39067E-07
ENSMUSG00000033762	Recq14	27,92563832	157,312723	2,049408916	2,85382E-08	7,45721E-07
ENSMUSG00000044748	Defb1	5,507411742	45,1160241	2,290230656	5,6085E-08	1,3912E-06
ENSMUSG00000065282	Gm24455	8,805326765	48,4950342	2,021000875	7,20905E-08	1,76127E-06
ENSMUSG00000042474	Fcmr	28,40122712	3,53612327	-2,246241436	9,97301E-08	2,36163E-06
ENSMUSG00000083428	Gm14591	0	10,8530953	2,441836007	6,20029E-07	1,25258E-05
ENSMUSG00000043681	Fam25c	24,37899043	3,71825318	-2,054491549	7,41741E-07	1,4762E-05
ENSMUSG00000039200	Atf7ip2	1,910516985	18,2293372	2,173720961	1,10103E-06	2,12136E-05
ENSMUSG00000063011	Msln	97,79865623	5,8109133	-2,300162757	1,79646E-06	3,29437E-05
ENSMUSG00000027356	Fermt1	6,058328762	49,2557923	2,122474367	1,98898E-06	3,613E-05
ENSMUSG00000055312	Them7	2,270436165	18,424974	2,003787689	1,35597E-05	0,000205181
ENSMUSG00000062496	4930431F12Rik	1,284425852	14,7262449	2,044735885	1,70532E-05	0,000250895
ENSMUSG00000097254	C430042M11Rik	1,195905613	14,2578316	2,005489172	2,70776E-05	0,000378154
ENSMUSG00000048992	Prss32	17,18657152	0,72331998	-2,012676015	4,14262E-05	0,000551153

Sup. Table 2 El Nagar et al.

	-log(p-value)	Ratio	z-score	Molecules
Ingenuity Canonical Pathways	8,55E00	1,63E-01	-1,890	CDC25C,CKS2,CCNB2,PLK1,AURKA,BCRA1,CDK1,CCNB1
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	7,49E00	1,21E-01	1,890	CDC25C,CDC20,PLK5,PRC1,CCNB2,PLK1,CDK1,CCNB1
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	6,63E00	2,63E-01	#####	CCNE1,CCNB2,BCRA1,CDK1,CCNB1
DNA damage-induced 14-3-3 σ Signaling	4,97E00	2,11E-01	#####	CCNE1,BCRA1,CDK1,CCNB1
GADD45 Signaling	4,55E00	1,67E-01	2,000	CCNE1,CCNA1,ESR1,CDK1
Estrogen-mediated S-phase Entry	4,25E00	9,09E-02	-1,000	CDC25C,PLK1,CLSPN,BCRA1,CDK1
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	3,53E00	9,3E-02	#####	NME4,RECQL4,ENTPD3,RAD54L
Pyrimidine Ribonucleotides Interconversion	3,52E00	6,41E-02	2,236	CCNE1,CCNA1,CCNB2,CDK1,CCNB1
Cyclins and Cell Cycle Regulation	3,47E00	6,25E-02	-1,342	CDC25C,CCNB2,BCRA1,CDK1,CCNB1
ATM Signaling	3,45E00	8,89E-02	#####	NME4,RECQL4,ENTPD3,RAD54L
Pyrimidine Ribonucleotides De Novo Biosynthesis	3,13E00	5,26E-02	#####	NME4,PLK1,TTK,NEK2,CDK1
Salvage Pathways of Pyrimidine Ribonucleotides	2,84E00	6,15E-02	#####	PLK1,TTK,NEK2,CDK1
Pyridoxal 5'-phosphate Salvage Pathway	2,54E00	7,89E-02	#####	CDT1,POLE,ORC1
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	2,36E00	3,52E-02	#####	CDC25C,BCRA1,CDK1,FANCA,CCNB1
Hereditary Breast Cancer Signaling	2,13E00		1	#####
Asparagine Biosynthesis I	2,05E00	5,26E-02	#####	CCNE1,CCNA1,CDK1
Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease	1,9E00	8,7E-02	#####	NME4,RRM2
Pyrimidine Deoxyribonucleotides De Novo Biosynthesis I	1,83E00		0,5	#####
Glycine Biosynthesis I	1,79E00	7,69E-02	#####	CCNE1,CCNA1
Antiproliferative Role of TOB in T Cell Signaling	1,68E00	3,85E-02	#####	PLK1,BCRA1,FANCA
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	1,68E00	6,67E-02	#####	CDK1,CCNB1
Sonic Hedgehog Signaling	1,68E00	2,86E-02	#####	CCNE1,CCNA1,ESR1,GSTO1
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1,53E00	2,5E-01	#####	GSTO1
Arsenate Detoxification I (Glutaredoxin)	1,53E00	2,5E-01	#####	GSTO1
Ascorbate Recycling (Cytosol)	1,43E00		0,2	#####
dTMP De Novo Biosynthesis	1,43E00		0,2	#####
Folate Polyglutamylation	1,36E00	1,67E-01	#####	SPTLC3
Ceramide Biosynthesis	1,29E00	2,7E-02	#####	PIDD1,BCRA1,BIRC5
p53 Signaling	1,29E00	1,43E-01	#####	SHMT1
Superpathway of Serine and Glycine Biosynthesis I	1,23E00	1,25E-01	#####	TK1
Salvage Pathways of Pyrimidine Deoxyribonucleotides	1,22E00	3,77E-02	#####	PDE6C,GNAT2
Phototransduction Pathway	1,2E00	1,6E-02	#####	CDC25C,CCNE1,GNAT2,AURKA,BMP6,BCRA1
Molecular Mechanisms of Cancer	1,18E00	1,11E-01	#####	SHMT1
Folate Transformations I	1,14E00		0,1	#####
Glycine Betaine Degradation	1,06E00	8,33E-02	#####	POLE
BER pathway	9,73E-01	6,67E-02	#####	GSTO1
DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination	9,57E-01	1,94E-02	#####	CCNA1,CHRN4,ESR1
Vitamin-C Transport	9,46E-01	6,25E-02	#####	EXO1
eNOS Signaling	8,55E-01		0,05	#####
Mismatch Repair in Eukaryotes	8,21E-01	2,17E-02	#####	CCNE1,BMP6
The Visual Cycle	7,45E-01	1,94E-02	#####	PLA2G5,GSTO1
Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates	7,08E-01	3,45E-02	#####	GSTO1
Antioxidant Action of Vitamin C	6,58E-01	3,03E-02	#####	PLA2G5
Glutathione-mediated Detoxification	6,56E-01	1,69E-02	#####	CCNE1,BIRC5
MIF-mediated Glucocorticoid Regulation	6,36E-01	2,86E-02	#####	CCNE1
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	6,1E-01	1,57E-02	#####	PON1,PLA2G5
Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	5,95E-01	2,56E-02	#####	PDE6C
Atherosclerosis Signaling	5,86E-01	2,5E-02	#####	LRAT
tRNA Splicing	5,76E-01	2,44E-02	#####	PLA2G5
Retinol Biosynthesis	5,34E-01	2,17E-02	#####	BRCA1
MIF Regulation of Innate Immunity	5,26E-01	1,18E-02	#####	CDC20,BCRA1,UBE2C
Role of Oct4 in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	5,25E-01	1,37E-02	#####	PLA2G5,GNAT2
Protein Ubiquitination Pathway	5,02E-01	1,32E-02	#####	PDE6C,GNAT2
Synaptic Long Term Depression	4,58E-01	1,75E-02	#####	PDE6C
Relaxin Signaling	4,3E-01	1,16E-02	#####	GNAT2,ESR1
Wnt/Ca+ pathway	4,29E-01	1,61E-02	#####	PLA2G5
RhoGDI Signaling	4,18E-01	1,56E-02	#####	CCNE1
Phospholipases	4,18E-01	1,56E-02	#####	IL2RB
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	4,13E-01	1,54E-02	#####	UBE2C
IL-2 Signaling	4,03E-01	1,49E-02	#####	PLA2G5
Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System		1,09E-02	#####	COL4A3,COL4A4
Eicosanoid Signaling	3,88E-01	1,07E-02	#####	PLA2G5,GNAT2
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	3,88E-01	1,43E-02	#####	HMMR
Endothelin-1 Signaling	3,83E-01	1,41E-02	#####	IL2RB
Glioma Invasiveness Signaling	3,79E-01	1,39E-02	#####	BMP6
Role of JAK1 and JAK3 in γ c Cytokine Signaling	3,79E-01	1,39E-02	#####	PLA2G5
Basal Cell Carcinoma Signaling	3,74E-01	1,37E-02	#####	GNAT2
Role of MAPK Signaling in the Pathogenesis of Influenza	3,61E-01	1,32E-02	#####	IL2RB
Ephrin B Signaling	3,61E-01	1,32E-02	#####	BMP6
IL-15 Signaling	3,57E-01	1,3E-02	#####	BIRC5
BMP signaling pathway	3,57E-01	1,3E-02	#####	ESR1
Angiopoietin Signaling	3,57E-01	1,01E-02	#####	PLA2G5,ESR1
Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling	3,47E-01	9,85E-03	#####	CCNE1,CDK1
ERK/MAPK Signaling	3,29E-01	1,18E-02	#####	CCNE1
Breast Cancer Regulation by Stathmin1	3,22E-01	1,16E-02	#####	RASSF6
Small Cell Lung Cancer Signaling	3,15E-01	1,14E-02	#####	GNAT2
HIPPO signaling	3,15E-01	1,14E-02	#####	CCNE1
G Beta Gamma Signaling	3,15E-01	1,14E-02	#####	PLA2G5
HER-2 Signaling in Breast Cancer	3,12E-01	1,12E-02	#####	IL2RB
VEGF Family Ligand-Receptor Interactions	3,12E-01	1,12E-02	#####	CDK1
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	3,05E-01	1,1E-02	#####	CCNA1
Apoptosis Signaling	3,05E-01	1,1E-02	#####	GNAT2
Acute Myeloid Leukemia Signaling	3,02E-01	8,97E-03	#####	MC3R,PDE6C
IL-1 Signaling	2,95E-01	1,06E-02	#####	CCNE1
cAMP-mediated signaling	2,8E-01	1,01E-02	#####	AP1M2
Prostate Cancer Signaling	2,8E-01	1,01E-02	#####	HMMR
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	2,57E-01	8,1E-03	#####	GNAT2,SEPT12
FAK Signaling	2,52E-01	9,17E-03	#####	MC3R
Signaling by Rho Family GTPases	2,47E-01	9,01E-03	#####	GNAT2
Gas Signaling	2,47E-01	9,01E-03	#####	IL2RB
Androgen Signaling	2,32E-01	8,55E-03	#####	IQGAP3
Telomerase Signaling	2,32E-01	8,55E-03	#####	PLA2G5
Rac Signaling	2,28E-01	8,4E-03	#####	PLA2G5
p38 MAPK Signaling	2,26E-01	8,33E-03	#####	REN
Fc Epsilon RI Signaling	2,23E-01	8,26E-03	#####	PON1
Renin-Angiotensin Signaling	2,21E-01	8,2E-03	#####	IL2RB
LXR/RXR Activation	2,21E-01	8,2E-03	#####	BMP6
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	2,21E-01	8,2E-03	#####	SEPT12
Role of NANOG in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	2,17E-01	8,06E-03	#####	PDE6C
RhoA Signaling	2,15E-01	0,008	#####	PLA2G5
Gustation Pathway	2,13E-01	7,94E-03	#####	PON1
Sperm Motility	2,09E-01	7,81E-03	#####	ESR1
FXR/RXR Activation	2,05E-01	7,69E-03	#####	PLA2G5
Estrogen Receptor Signaling				
CCR3 Signaling in Eosinophils				

Sup. Table 3 El Nagar et al.

Categories	Functions	Diseases or Functions Annotation	p-Value	Predicted Activation Flags	Molecules	# Molecules
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization	segregation/organization	segregation of chromosomes	1.561		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	22
Cell Cycle	mitosis	mitosis	4.33E-24		AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	39
Cell Cycle	mitosis	mitosis of tumor cell lines	2.28E-20		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	21
Cell Cycle	cell cycle progression	cell cycle progression	1.54E-19		ASNS,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	46
Cell Cycle	mitosis	mitosis	4.63E-19		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	37
Cell Cycle	mitosis	mitosis of cervical cancer cell lines	1.02E-17	0.342	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	17
Cell Cycle	mitosis	delay in mitosis	6.42E-14		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	10
Cell Cycle	mitosis	arrest in mitosis of tumor cell lines	1.47E-13		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	12
Cell Cycle	mitosis	delay in mitosis of tumor cell lines	1.63E-13		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	9
Cellular Assembly and Organization, DNA Ralignment	alignment of chromosomes	alignment of chromosomes	3.56E-13	1.425	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	9
Cell Cycle	plody	plody of cells	5.97E-13	0.373	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	15
Cell Cycle	plody	plody	1.13E-12	-0.276	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	9
Cell Cycle, DNA Replication, Recombinatospindle checkpoint	spindle checkpoint	spindle checkpoint	2.63E-12	-0.762	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	10
Cell Cycle	mitosis	delay in mitosis of cervical cancer cell lines	3.65E-12		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	8
Cell Cycle, DNA Replication, Recombinatospindle checkpoint	M phase	M phase	3.54E-12	1.550	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	8
Cell Cycle, DNA Replication, Recombinatospindle checkpoint	spindle checkpoint of cells	spindle checkpoint of cells	3.30E-11	-0.762	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	10
Cell Cycle	metaphase	metaphase	3.33E-11	1.517	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	29
Cell Cycle, DNA Replication, Recombinatospindle checkpoint	checkpoint control	checkpoint control	3.76E-11	0.200	BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	12
Cellular Assembly and Organization	cohesion	cohesion of sister chromatids	7.61E-11	0.438	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	9
Cell Death and Survival	cell death	cell death of cervical cancer cell lines	3.99E-10	0.465	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	20
Cellular Assembly and Organization, Cellulorganization	organization of mitotic spindle	organization of mitotic spindle	5.32E-10		ASPM,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	9
Cell Cycle	mitosis	arrest in mitosis of cervical cancer cell lines	8.42E-10		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	9
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	non-diabetic obesity	non-diabetic obesity	1.76E-09		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	15
Nutritional Disease	non-diabetic obesity	non-diabetic obesity	2.70E-09		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	5
Cell Death and Survival	apoptosis	apoptosis of cervical cancer cell lines	2.77E-09	0.225	BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	17
Cell Death and Survival	cell death	cell death of tumor cell lines	3.70E-09	-0.520	ASNS,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	43
Cellular Assembly and Organization, DNA Ralignment	quantity of mitotic spindle	quantity of mitotic spindle	7.87E-09	-1.446	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	7
Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization	morphology of mitotic spindle	morphology of mitotic spindle	9.77E-09		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	6
Cell Cycle	polyploidization	polyploidization of cells	9.77E-09	-0.051	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	7
Cellular Assembly and Organization	cohesion	cohesion of mitotic sister chromatids	1.08E-08		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	6
Cell Cycle	G2M phase	G2M phase	1.13E-08		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	6
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	female genital tract serous carcinoma	female genital tract serous carcinoma	1.83E-08		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	19
Cell Cycle, Reproductive System Development	meiosis of germ cells	meiosis of germ cells	2.56E-08	-0.765	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	10
Cell Cycle	G2 phase	G2 phase	3.02E-08	0.546	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	11
Cell Cycle	mitotic exit	mitotic exit	5.23E-08	0.000	CDC20,CDC45,CDK1,NEK2,PLK1,UBE2C	6
Cellular Assembly and Organization, DNA Replication	amplification of centrosome	amplification of centrosome	1.56E-08	0.970	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	6
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic	hepatocellular carcinoma	hepatocellular carcinoma	8.26E-08		ASFB,ASPM,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,FAM83D,GSTO1,MK067,NCAPC	24
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	serous adenocarcinoma	serous adenocarcinoma	1.14E-07		ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	23
Cellular Assembly and Organization	cellular reorganization of chromosomes	cellular reorganization of chromosomes	1.23E-07	0.355	BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	11
Cellular Growth and Proliferation	proliferation	proliferation of cells	1.27E-07	Increased 5.899	ASNS,ASPM,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	71
Cell Cycle, Cellular Movement	cytokinesis	cytokinesis	1.40E-07	1.820	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	12
Cellular Development, Cellular Growth and Cell Proliferation	cell proliferation of tumor cell lines	cell proliferation of tumor cell lines	1.43E-07	3.324	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	12
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization	segregation of mitotic sister chromatids	segregation of mitotic sister chromatids	1.74E-07		KNSTN1,NEK2,NUSAP1,PLK1,SPAG5	5
Cell Cycle	cell cycle progression	cell cycle progression of tumor cell lines	1.77E-07	0.761	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	17
Cell Cycle	mitosis	entry into mitosis	3.65E-07	1.732	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	6
Cell Cycle	mitotic entry	entry into mitosis of cervical cell lines	4.11E-07		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	3
Cellular Movement, Reproductive System Development	ejection of first polar body	ejection of first polar body	4.11E-07		CCNB1,CCNE1,CDK1,PLK1	3
Cell Cycle, DNA Replication, Recombinatospindle checkpoint	spindle checkpoint of tumor cell lines	spindle checkpoint of tumor cell lines	5.22E-07		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	5
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	thoracic neoplasm	thoracic neoplasm	7.85E-07	0.326	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	32
Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization	morphology of cytoskeleton	morphology of cytoskeleton	1.03E-06	-1.400	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	5
Cell Cycle, Reproductive System Development	meiosis of oocytes	meiosis of oocytes	1.03E-06		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	5
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	carcinoma in lung	carcinoma in lung	1.07E-06		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	29
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	lung tumor	lung tumor	1.41E-06	0.326	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	31
Cancer	chromosomal congression	chromosomal congression of tumor cell lines	1.63E-06		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	3
Cellular Assembly and Organization	cell cycle progression	delay in cell cycle progression of cervical cell lines	1.63E-06		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	3
Cell Cycle, Reproductive System Development	metaphase	entry into metaphase of oocytes	1.63E-06		BUB1,CCNB1,CCNE1,CDK1,PLK1	3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	neoplasia	neoplasia	1.89E-06		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	30
Cellular Assembly and Organization	association	association of chromosome components	1.89E-06	Increased 2.200	BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	4
Cellular Assembly and Organization	attachment	attachment of spindle fibers	2.04E-06		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	5
Cellular Assembly and Organization, DNA Ralignment	chromosomal congression	chromosomal congression of chromosomes	2.04E-06	1.000	BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,CENPH,ESCO2,EXO1,HMMR,KIF2C,KNSTN1,PLK1	4
Cellular Assembly and Organization	chromosomal congression	chromosomal congression of metaphase	2.04E-06		ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	4
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal	neoplasia	gastrintestinal tract cancer	2.17E-06		ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	111
Cell Cycle	M phase	M phase	2.17E-06		CCNB1,CCNE1,CDK20,CDT1,PLK1,UBE2C	6
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal	neoplasia	Gastrointestinal Tract Cancer and Tumors	2.43E-06		ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	118
Cellular Assembly and Organization	aneuploidy	aneuploidy of nuclei	1.342E-06	1.707	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	7
Cell Cycle	aneuploidy	aneuploidy	2.51E-06		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	7
Cellular Assembly and Organization, DNA Ralignment	quantity of chromosomes	quantity of chromosomes	2.69E-06		ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	5
Cell Cycle	M phase	delay in initiation of M phase	2.81E-06		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	5
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	melanoma solid tumor	non-melanoma solid tumor	3.43E-06	-0.309	ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	140
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	melanoma solid tumor	lung cancer	3.58E-06		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	25
Cell Cycle, Cell Morphology	formation	formation of spindle apparatus	3.75E-06	-0.535	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	7
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	small cell lung cancer	non-small cell lung cancer	3.83E-06		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	7
Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization	morphology of mitotic spindle	morphology of mitotic spindle	3.86E-06		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	11
Cell Cycle	G1/S phase transition	G1/S phase transition	4.18E-06	1.446	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	11
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal	neoplasia	colorectal neoplasia	4.19E-06		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	84
Cell Cycle, Reproductive System Development	meiosis of female germ cells	meiosis of female germ cells	4.67E-06	-1.400	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	16
Cell Cycle	metaphase	arrest in metaphase	5.02E-06		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	16
Cell Cycle	metaphase	metaphase	5.11E-06		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	4
Cell Cycle, DNA Replication, Recombinatospindle checkpoint	metaphase	metaphase	5.11E-06		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	4
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal	digestive system cancer	digestive system cancer	5.37E-06	1.131	ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	130
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal	neoplasia	large intestine neoplasia	5.37E-06		ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	111
Cell Cycle, Reproductive System Development	meiosis of germ cells	meiosis of germ cells	5.95E-06	-0.882	BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	5
Cell Death and Survival	apoptosis	apoptosis of tumor cell lines	6.31E-06	-0.481	ASNS,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	31
Cell Cycle	epithelial cancer	arrest of centrosome	6.42E-06	0.421	ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	137
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	epithelial cancer	epithelial cancer	6.42E-06		ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	137
Cellular Assembly and Organization	attachment	attachment of kinetochores	6.65E-06		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	4
Cardiovascular Disease, Developmental	Fanconi anemia	Fanconi anemia	6.91E-06		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	4
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	abdominal cancer	abdominal cancer	7.72E-06	0.726	ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	136
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	abdominal cancer	adipose adenocarcinoma	7.85E-06		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	136
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization	separation	separation of centrosome	8.49E-06		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	4
Cell Cycle	cell cycle progression	cell cycle progression of cervical cancer cell lines	8.93E-06		AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	11
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal	neoplasia	large intestine neoplasia	9.26E-06		ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	111
Cell Cycle	aneuploidy	aneuploidy of cells	9.98E-06	-0.796	AURKB,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	6
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	connective tissue tumor	connective tissue tumor	1.00E-05	-1.000	ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	25
Cell Cycle	metaphase	metaphase	1.07E-05		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	6
Cell Cycle	mitosis	mitosis of breast cancer cell lines	1.07E-05		BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	6
Cell Cycle	plody	plody of epithelial cells	1.19E-05	1.000	BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	7
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	genital tract cancer	genital tract cancer	1.19E-05		ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,ATP7F2,AURKA,URKB,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CDC42,CENPE,CENPF,FAM83D	74

Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Steatosis	hepatic adenocarcinoma	1.04E-04		AURKB, BRCA1, POLE, RRM2	4
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	poorly differentiated malignant tumor	1.04E-04		MSL, N, POLE, RRM2, UBE2C	4
Cancer, DNA Replication, Recombination, and Repositioning	metabolism of DNA	1.11E-04	1,970	BIRC5, BRCA1, CCNE1, CDK1, CDT1, CKS2, ESCO2, EXO1, ORC1, PLK1, POLE, PTHLH, RECQL4	13
Cell Cycle	condensation of mitotic chromosomes	1.11E-04		CDCA8, NCAPG, NUSAP1	3
Cell Cycle, Connective Tissue Development	entry into mitosis of cervical cancer cell lines	1.11E-04		AURKB, CDC20, CKS2	3
Cell Signaling, Post-Translational Modification	plodly of fibroblast cell lines	1.11E-04		CDK1, CLSPN, CDK4, FBX, PLK1, TTK	6
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	senile phosphorylation of peptide	1.18E-04		ADAMTSL3, ANKLE1, AP1M2, ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNA1, CCNB1, CCNB1B, CCNB2, CKS2	74
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	myosarcoma	1.23E-04		ADAMTSL3, AURKB, CKS2, ESR1, FERMT1, MELK, PKB, POLE, PRK1, RRM2, SKA3, TK1, TTK, UBE2C	14
Reproductive System Development and Morphology	morphology of reproductive system	1.25E-04		ASPM, BRCA1, CCNA1, CCNE1, CKS2, E2F7, E2F8, ESR1, EXO1, IL2RB, KNSTRN, LRAT, MSTN, SEPT12, SLIC1442, STC2, TDRD1	18
Cellular Compromise, DNA Replication, and Repositioning	chromosomal instability	1.36E-04	Decreased -2,207	BRCA1, BUB1, EME1, EXO1, FANCA	5
Cellular Compromise	nucleation of cells	1.43E-04	0,000	AURKB, BRCA1, CCNE1, E2F8, NEK2	5
Cell Cycle	missis of sarcoma cell lines	1.41E-04		BUB1B, CDC20, CDK1	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal Injury and Abnormalities	large intestine carcinoma	1.51E-04		ADAMTSL3, ANKLE1, AP1M2, ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BRCA1, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNA1, CCNB1, CCNB1P1	102
Cancer, Hematological Diseases and Connective Tissue	aneuploidy of fibroblasts	1.61E-04	-0,322	ADAMTSL3, ANKLE1, AP1M2, ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNA1, CCNB1, CCNB1P1	93
Organ Morphology, Organismal Injury and Abnormalities	abnormal morphology of internal genitalia	1.63E-04		ASPM, BRCA1, CKS2, ESR1, EXO1, IL2RB, KNSTRN, LRAT, SEPT12, STC2, TDRD1, TK1	8
Cell Cycle, Connective Tissue Development	aneuploidy of fibroblasts	1.66E-04		BUB1, CENPE	2
Cell Cycle	arrest in mitosis of breast cancer cell lines	1.66E-04		CCNE1, CDK1	2
Cellular Assembly and Organization	association of kinetochores	1.66E-04		BIRC5, NEK2	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	chromosomal congression	1.66E-04		DLGAP5, SKA3	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	hypertrophy of mammary tubuloalveolar unit	1.74E-04		ESR1, PARP8	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	soft tissue sarcoma cancer	1.74E-04		ADAMTSL3, AURKB, BIRC5, BUB1B, CKS2, ESR1, FERMT1, MELK, PKB, POLE, PRK1, RRM2, SKA3, TK1, TTK, UBE2C	16
Cell Cycle	arrest in metaphase	1.75E-04		CCNB1, CDC20, PLK1	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	arrest in mitosis of soft tissue tumor	1.80E-04	-1,000	ADAMTSL3, AURKB, BIRC5, BRCA1, BUB1B, CCNE1, CKS2, COL4A3, COL4A4, E2F7, ESR1, EXO1, FERMT1, HMHR, MELK	26
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	arrest in metaphase	1.85E-04		ADAMTSL3, AURKB, BIRC5, BRCA1, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNA1, CCNB1, CCNB1P1, RRM2, SKA3, TK1, TTK, UBE2C	21
DNA Replication, Recombination, and Repositioning	chromosomal aberration	1.88E-04	Decreased -2,200	BRCA1, CCNE1, CDC20, CDK1, E2F8, MSLN	8
Organ Morphology, Reproductive System, Morphology	morphology of genital organ	1.91E-04		ASPM, BRCA1, CCNA1, CKS2, ESR1, EXO1, IL2RB, KNSTRN, LRAT, MSTN, SEPT12, SLIC1442, STC2, TDRD1, TK1	15
Nutritional Disease	obesity	1.94E-04	-0,323	AURKB, CCNA1, CCNB1, CDC4A, CDK1, CHRNB1, ESR1, KIF20A, MCSR, MKI67, MSTN, NEK2, NMR2, PLK1, REN	15
Cell Cycle	G2 phase of cervical cancer cell lines	2.02E-04		CCNB1, CDC20, EME1, PLK1	3
Cell Death and Survival	mitotic catastrophe	2.14E-04		AURKA, BUB1B, CDC20	3
Cell Death and Survival	apoptosis	2.14E-04	Decreased -2,170	AURKB, BIRC5, CDC2A, PLK1, RRM2	5
Cancer, Hematological Diseases and Connective Tissue	adenocarcinoma	2.19E-04		ADAMTSL3, ANKLE1, AP1M2, ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNA1, CDC20B, CDC25C, CDC4A, CDK1	12
Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System	abnormal morphology of reproductive system	2.23E-04		ASPM, BRCA1, CCNE1, CKS2, E2F7, E2F8, ESR1, EXO1, IL2RB, KNSTRN, LRAT, SEPT12, STC2, TDRD1, TK1	15
Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization	abnormal morphology of Nucleus	2.30E-04		AURKA, BRCA1, CCNE1, CDC20, CDK1, E2F8, MSLN	12
Cell Morphology	morphology of cells	2.34E-04		AP1M2, ASPM, AURKA, BIRC5, BRCA1, BUB1, CCNE1, CDCP1, CDK1, CLDN19, COL4A3, E2F7, E2F8, ESR1, EXO1, FERMT1, HMHR, MELK	49
Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System	abnormality of endometrium	2.45E-04		ANQ2, ASPM, AURKA, BMP6, BRCA1, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNA1, CCNB2, CCNE1, CDC20, CENPE, CENPF, DACH2, ES	48
Cell Death and Survival	apoptosis	2.47E-04	-1,381	AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, BUB1, CCNA1, CCNE1, CDC20, CDC25C, CDC4A, CDCP1, CDK1, CEB	3
Cellular Assembly and Organization	association of chromatin	2.57E-04		BRCA1, CDK1, WHD11	3
Connective Tissue Disorders, Developmental	autosomal recessive primary microcephaly	2.58E-04		ASPM, CENPE, STIL	3
Cancer, Endocrine System Disorders, Organismal Injury and Abnormalities	ovarian cancer	2.65E-04		BRCA1, POLE, RRM2	2
Cell Cycle	interphase	2.74E-04		BRCA1, CCNE1, CCNE1, CDC25C, CDC4A, CDK1, EME1, MELK, PLK1, RASSF8	10
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization	organization of chromosomes	2.87E-04		BRCA1, CDC4A, CENPF, RAD54, WHD11	5
Cell Cycle	entry into interphase	2.97E-04	1,912	BUB1, BUB1B, CCNE1, CDC20, CDK1, E2F8, MSLN	7
Cancer, Cell Cycle, Organismal Injury and Abnormalities	arrest in mitosis of tumor cells	3.30E-04		BIRC5, PLK1	2
Cell Cycle, Cellular Movement	cytokinesis of bone cancer cell lines	3.30E-04		BIRC5, NEK2	2
Cellular Assembly and Organization	dissociation of centrosome	3.30E-04		NEK2, PLK1	2
Cell Death and Survival	mitochondrial cell death of colorectal cancer	3.30E-04		CCNB1, CDK1	2
Cellular Compromise	nucleation of breast cancer cell lines	3.30E-04		BRCA1, CCNE1	2
Hereditary Disorder, Ophthalmic Disease, Rod monochromacy	rod monochromacy	3.30E-04		GNAT2, PDE6C	2
Endocrine System Development and Function	secretion of androstenedione	3.30E-04		BMP6, ESR1	2
Cell Cycle	tetraploidy	3.30E-04		AURKB, PLK1	2
DNA Replication, Recombination, and Repositioning	recombination	3.37E-04	0,725	ANKLE1, BRCA1, EME1, EXO1, JGKC, PARP8, RAD54, RECQL4	8
Cell Cycle	polyploidy of cells	3.65E-04		BIRC5, CKS2, PLK1	2
Cell Cycle	cell cycle progression	3.67E-04		AURKA, AURKB, BRCA1, CLSPN, ESR1, MELK, MYCL	7
Cell Death and Survival	cell death of colorectal cancer cell lines	3.67E-04	-0,876	BIRC5, CCNB1, CDC20, CDK1, LGRS, MELK, RASSF6, TK1, TTK, UBE2C	10
Cancer, Endocrine System Disorders, Organismal Injury and Abnormalities	ovarian cancer	3.67E-04		BRCA1, ESR1, POLE, RRM2	2
Cell Cycle	cell cycle progression	3.97E-04		AURKA, AURKB, BIRC5, BRCA1, CCNE1, CLSPN, ESR1, FANCA, MELK, MYCL, PLK1	11
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	endometrial cancer	4.23E-04		ANQ2, ASPM, AURKA, BMP6, BRCA1, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNA1, CCNB2, CCNE1, CDC20, CENPE, CENPF, DACH2, ES	47
Organ Morphology, Organismal Injury and Abnormalities	atrophy of renal tubule	4.26E-04		POLE, PTHLH, RRM2	3
Cancer, Endocrine System Disorders, Gastrointestinal Disease	pancreatic acinar cell carcinoma	4.26E-04		BRCA1, CCNE1, CDC20, CDK1, E2F8, MSLN	6
Cancer, Hematological Disease, Immunodeficiency	refractory peripheral T-cell lymphoma	4.95E-04		AURKA, POLE, RRM2	3
Cancer, Hematological Disease, Immunodeficiency	relapsed peripheral T-cell lymphoma	4.95E-04		ADAMTSL3, ANKLE1, AP1M2, ASPM, AURKA, BIRC5, BMP6, BRCA1, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNA1, CDC20B, CDC25C, CDC4A, CDCP1, CE1	88
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	cell death of melanoma cell lines	5.00E-04	0,600	ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, CCNA1, CDC20, CDK1, E2F7, ESR1, FERMT1, GPR88, IGF2, IGF2R, KIF20A, KLK4, KNTC1	26
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	cell death of prostate cancer and tumors	5.09E-04		CDK1, CDK1, CDT1, CLSPN, DTL, FBX, RRM2, SH2DA2, TK1	9
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	morphology of nucleus	5.28E-04		ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, CCNA1, CDC20, CDK1, E2F7, ESR1, FERMT1, GPR88, IGF2, IGF2R, KIF20A, KLK4, KNTC1	26
Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization	aneuploidy of epithelial cells	5.48E-04		AURKA, BRCA1, CDK1, NCAPG, PIF1, RAD54, SEPT12	7
Cell Cycle	arrest in mitosis of colorectal cancer cell lines	5.48E-04		AURKA, CENPE	2
Cellular Assembly and Organization	attachment of chromosomes	5.48E-04		BIRC5, PLK1	2
DNA Replication, Recombination, and Repositioning	storgation of mitotic spindle	5.48E-04		AURKB, BUB1B	2
Cellular Compromise	fragmentation of spindle pole	5.48E-04		PRK1, SPC25	2
Cell Cycle	origin firing	5.48E-04		AURKA, CENPE	2
Cell Cycle	replication of bone marrow cells	5.48E-04		CLSPN, RECQL4	2
Cell Cycle	replication of hematopoietic progenitor cells	5.48E-04		E2F7, E2F8	2
Cancer, Hematological System Development	refractory neutropenia	5.50E-04		AURKB, CCNE1	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	tumorigenesis of reproductive tract	5.64E-04	0,128	BIRC5, CCNE1, CDC20, CDK1, E2F8, MSLN	2
Cell Cycle	mitosis	5.65E-04		AURKB, CCNE1, NUSAP1	2
DNA Replication, Recombination, and Repositioning	double-stranded DNA break repair	6.07E-04	1,923	BRCA1, CDC4A, CDK1, ESCO2, EXO1, RAD54	6
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	synthesis of DNA	6.25E-04		BIRC5, BMP6, BRCA1, CCNE1, CDC25C, CDT1, ESR1, EXO1, LRAT, PLK1, POLE, RECQL4	12
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	stage 4 ER-negative breast cancer	6.51E-04		ESR1, PARP8, RRM2	2
Cancer, Endocrine System Disorders, Organismal Injury and Abnormalities	stage 3 ovarian cancer	6.63E-04		ESR1, MSLN, POLE, RRM2	4
Cellular Assembly and Organization, Cellular Formation	formation of microtubules	6.72E-04		BIRC5, CENPF, DLGAP5, KIF20A, NUSAP1	3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	melanoma	6.72E-04	0,725	ADAMTSL3, ANKLE1, AP1M2, ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNA1	100
Cell Cycle, DNA Replication, Recombination, and Repositioning	DNA recombination	6.76E-04		ANKLE1, BRCA1, EME1, EXO1, PARP8, RAD54, RECQL4	7
Organismal Development	development of germline/spermatogenic system	6.81E-04	1,154	ASPM, BRCA1, CCNA1, CCNE1, CKS2, E2F7, E2F8, ESR1, EXO1, FANCA, KNSTRN, MSTN, PTI	9
Cell Cycle	S phase of tumor cell lines	7.06E-04		CCNE1, CDC20, CDK1, E2F8, MSLN, PLK1	6
Molecular Transport	quantity of heavy metal	7.06E-04		BMP6, ERFE, GM12293, PON1, TMPRSS6	5
Connective Tissue Development and Morphology	morphology of short femur	7.12E-04		ESR1, MCSR, MSTN, PTHLH	3
Cellular Assembly and Organization	binding of chromatin	7.12E-04	0,208	CCNE1, CDK1, CDT1, PLK1	4
Cell Cycle	S phase	7.16E-04	1,210	BRCA1, CCNE1, CCNE1, CDC25C, CDK1, CKS2, E2F8, MSLN, PLK1	9
Cell Cycle	G2 phase	7.40E-04	1,210	BIRC5, BRCA1, CCNE1, CDC20, CDK1	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	HER2 negative hormone receptor negative	7.40E-04	-1,982	CCNB1, EME1, PLK1	7
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	HER2 negative hormone receptor negative	7.40E-04		BIRC5, BRCA1, CDK1, ESR1, POLE, PTHLH, RRM2	4
Cellular Compromise, DNA Replication, and Repositioning	breakage of chromosomes	7.64E-04		BRCA1, ESR1, FANCA, RECQL4	4
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	malignant neoplasm of connective and soft tissue	7.77E-04		BRCA1, BUB1B, ESR1, POLE, RRM2	5
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal Injury and Abnormalities	aneuploidization	8.02E-04		AURKB, BIRC5, C10orf90, CCNA1, CCNB1, CCNE1, CDC25C, CDC4A, CDC4A, CDCP1, CENPE, COL4A3, COL4A4, DLG4	49
Cellular Compromise	breakdown of nuclear envelope	8.18E-04		AURKA, BUB1B	2
Cell Cycle	mitotic exit	8.18E-04		AURKB, CCNB1P1	2
Cell Cycle	prometaphase	8.18E-04		CCDC20, CDK1	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	delay in initiation of prometaphase	8.18E-04		BIRC5, BUB1B	2
Cellular Compromise, DNA Replication, and Repositioning	delay in initiation of prometaphase	8.18E-04		BUB1B, ESR1	2
Cell Cycle, Connective Tissue Development	entry into mitosis of fibroblast cell lines	8.18E-04		CCNA1, CCNE1	2
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization	formation of chromosomes	8.18E-04		BRCA1, CDK1	2
Cellular Assembly and Organization, DNA Formation	formation of spindle pole	8.18E-04		DLGAP5, PLK1	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	growth of urinary tract tumor	8.18E-04		BMP6, PLK1	2
Cell Death and Survival	mitotic catastrophe of cervical cancer cell lines	8.18E-04		BUB1B, CDC20	2
Cell Cycle, Hepatic System Development	polyploidization of hepatocytes	8.18E-04		E2F7, E2F8	2
Cancer, Endocrine System Disorders, Gastrointestinal Disease	poorly differentiated pancreatic carcinoma	8.18E-04		POLE, RRM2	2
Cancer, Hematological Disease, Immunodeficiency	refractory angioimmunoblastic T-cell lymphoma	8.18E-04		POLE, RRM2	2
Cancer, Hematological Disease, Immunodeficiency	refractory enteropathy associated T-cell lymphoma	8.18E-04		POLE, RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hematohematopoietic T-cell lymphoma	refractory hepatosplenic T-cell lymphoma	8.18E-04		POLE, RRM2	2
Cancer, Hematological Disease, Immunodeficiency	relapsed angioimmunoblastic T-cell lymphoma	8.18E-04		POLE, RRM2	2
Cancer, Hematological Disease, Immunodeficiency	relapsed enteropathy associated T cell lymphoma	8.18E-04		POLE, RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hematohematopoietic T-cell lymphoma	relapsed hepatosplenic T-cell lymphoma	8.18E-04		POLE, RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Steatosis	resectable extrahepatic cholangiocarcinoma	8.18E-04		POLE, RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Steatosis	resectable gallbladder cancer	8.18E-04		POLE, RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Steatosis	resectable liver cholangiocarcinoma	8.18E-04		POLE, RRM2	2
Cancer, Endocrine System Disorders, Gastrointestinal Disease	unresectable locally advanced pancreatic cancer	8.18E-04		POLE, RRM2	2
Organismal Injury and Abnormalities, Renal/urinary fibrosis	interstitial fibrosis of kidney	8.18E-04	0,532	BUB1B, COL4A3, PTHLH, REN	4
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	urinary cancer	8.18E-04		AURKB, BUB1B, ESR1, POLE, RRM2	3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	inoperable breast cancer	8.37E-04		ESR1, POLE, RRM2	4
Cellular Assembly and Organization	modification of cytoskeleton	8.37E-04		AURKB, ESR1, HMHR	3
Cancer, Cardiovascular Disease, Hematohematopoietic anemia with excess blasts	refractory anemia with excess blasts	8.37E-04		IL2RB, PLK1, RRM2	3
Cell Development, Cellular Growth and cell proliferation	cell proliferation of breast cancer cell lines	8.51E-04	Increased 2,723	BIRC5, BRCA1, CCNE1, CDCP1, CDK1, DLGAP5, ESR1, JGKC, MELK, PKB, PLK1, PTHLH	13
Connective Tissue Disorders, Developmental	microcephaly	8.53E-04		AURKB, BIRC5, BRCA1, CDC25C, EME1	5
Cancer, Endocrine System Disorders, Gastrointestinal Disease	neuroendocrine tumor	9.34E-04		ASPM, CDT1, CENPE, ORC1, STI	16
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization	arrest in G2/M phase transition	9.34E-04		ASPM, CCNB2, CCNE1, CDC4A, COL4A3, ESR1, FERMT1, HKDC1, HMHR, KNSTRN, MKI67, MYCL, NUSAP1, POLE, RRM2, S	16
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	primary peritoneal cancer	9.34E-04		BRCA1, CCNE1, CDC20, CDK1	4
Cell Cycle	interphase	9.34E-04		BRCA1, NEK2, STIL, TTK	4
Cellular Development, Cellular Growth and proliferation	proliferation of fibroblast cell lines	9.81E-04	Increased 2,164	BRCA1, ESR1, POLE, RRM2	4
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal Injury and Abnormalities	large intestine adenocarcinoma	9.89E-04		BRCA1, CCNE1, CDC20, CDK1, ESR1	5
Cell Cycle	aneuploidy	1.05E-03		BRCA1, CCNA1, CCNB2, CCNE1, CDC4A, CKS2, E2F7, MSTN, PTHLH, RECQL4, SHMT1, UBE2C	12
DNA Replication, Recombination, and Repositioning	initiation of replication of DNA	1.05E-03		ADAMTSL3, ANKLE1, AP1M2, ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BRCA1, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNA1, CCNB1, CCNB1P1	98
Organismal Injury and Abnormalities	interstitial fibrosis	1.07E-03	0,353	CCNE1, CDT1, ORC1	3
Cellular Development, Cellular Growth and cell proliferation	cell proliferation of kidney cell lines	1.14E-03	1,446	BUB1B, COL4A3, IL2RB, PTHLH, REN	5
Cell Morphology, Cellular Compromise	multinucleation	1.13E-03		AURKB, CCNE1, E2F8, NEK2	4
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	urinary sarcoma	1.13E-03		BUB1B, ESR1, POLE, RRM2	4
Connective Tissue Disorders, Developmental	Meier-Gofin syndrome	1.14E-03		CDT1, ORC1	2

Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Siver cholangiocarcinoma	liver cholangiocarcinoma	1,17E-03			BRCA1,POLE,RRM2	3
Cellular Compromise	nucleation of tumor cell lines	1,17E-03			BRCA1,CCNE1,NEK2	3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalmorphology	growth of malignant tumor	1,20E-03	1,628		ASPM,BIRC5,BRCA1,CCNA1,ESR1,HMMR,MK167,NCAPG,PLK1,PTHLH,RRM2,UBE2C	12
Developmental Disorder, Embryonic Development, Abnormal morphology	abnormal morphology of trophoblast	1,20E-03			BRCA1,CCNE1,E2F7,E2F8	3
Organismal Injury and Abnormalities, Renal/renal lesion	renal lesion	1,24E-03	0,272		ASPM,AURKA,URKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1B,CCNA1,CDCC1,CENPE,CENPF,CENPH,COL4A3,DLGAP5,ESR1,II	24
Cancer, Hematological Disease, Organismal cancer neoplasm	metastatic HER2-positive breast cancer	1,30E-03			ADAMTSL3,AURKA,BRCA1,BUB1B,CCNB1,CCNB2,CDC42,DCLK3,FERMT1,IL2RB,MK167,POLE,RRM2,SHMT1,TDOR	16
Cancer, Hematological Disease, Organismal cancer neoplasm	B-cell neoplasm	1,31E-03			BRCA1,C10orf102,CDK1,DTL,PI3D1,PLK5,RAD54L,UBE2T	18
Cancer, Hematological Disease, Organismal cancer neoplasm	DNA damage response of cells	1,31E-03			BMP6,ERF,ESR1,Gm12253,IGKC,KCNE1B,NMUR2,PLA2G5,PLN,PON1,PTHLH,REN,TMPRSS6	13
Molecular Transport	quantity of metal	1,34E-03	1,588		ANKLE1,BRCA1,EXO1,PARPBP,RECQL4	5
Cell Cycle, DNA Replication, Recombination/recombination	recombination of cells	1,37E-03	0,600	bias	BRCA1,ESR1,POLE,RRM2	3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,uterine tube cancer	salivian tube cancer	1,43E-03			AURKB,NEK2,PLK1	3
Cell Cycle	ploidy	1,44E-03			BRCA1,FANCA	2
Cardiovascular Disease, Developmental Dif/anconia anemia, group A	Fanconi anemia, group A	1,51E-03			LRAT,SLC24A1	2
Cell Morphology, Embryonic Development, Abnormal morphology	abnormal morphology of cone outer segment	1,51E-03			ESR1,LRAT	2
Endocrine System Disorders, Organismal morphology	abnormal morphology of dilated seminiferous	1,51E-03			E2F7,E2F8	2
Cell Death and Survival	apoptosis	1,51E-03			BIRC5,IGKC	2
Cancer, Cell-To-Cell Signaling and Intercellular signaling reaction	cytotoxic reaction of breast cancer cell lines	1,51E-03			ESR1,PARPBP	2
Reproductive System Development and Fertilization	elongation of mammary duct	1,51E-03			ESR1,PTHLH	2
Connective Tissue Development and Functioning	height of growth plate	1,51E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,neuroblastoma	locally advanced urothelial cancer	1,51E-03			ESR1,MSTN	2
Connective Tissue Development and Functioning	mass of parametrial fat pad	1,51E-03			ANO2,ASPM,AURKA,URKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1B,BUB1B,C10orf90,CCNB1,CCNB2,CCNE1,CDCC20,CENPE,CEI	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,uterine tumor	uterine tumor	1,54E-03			ASPM,BIRC5,BMP6,BRCA1,CCNA1,CDCC25C,E2F7,ESR1,FERMT1,GPR68,IGKC,KIF20A,KLK4,KNTC1,MC3R,MK167,M	24
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,malignant neoplasm of male genital organ	malignant neoplasm of male genital organ	1,54E-03	Increased 2,979		BRCA1,CCNE1,CDK1,CDK2,CDK3,CDK4,CDK5,CDK6,CDK7,CDK8,CDK9,CDK10,CDK11,CDK12,CDK13,CDK14,CDK15,CDK16,CDK17,CDK18,CDK19,CDK20,CDK21,CDK22,CDK23,CDK24,CDK25,CDK26,CDK27,CDK28,CDK29,CDK30,CDK31,CDK32,CDK33,CDK34,CDK35,CDK36,CDK37,CDK38,CDK39,CDK40,CDK41,CDK42,CDK43,CDK44,CDK45,CDK46,CDK47,CDK48,CDK49,CDK50,CDK51,CDK52,CDK53,CDK54,CDK55,CDK56,CDK57,CDK58,CDK59,CDK60,CDK61,CDK62,CDK63,CDK64,CDK65,CDK66,CDK67,CDK68,CDK69,CDK70,CDK71,CDK72,CDK73,CDK74,CDK75,CDK76,CDK77,CDK78,CDK79,CDK80,CDK81,CDK82,CDK83,CDK84,CDK85,CDK86,CDK87,CDK88,CDK89,CDK90,CDK91,CDK92,CDK93,CDK94,CDK95,CDK96,CDK97,CDK98,CDK99,CDK100,CDK101,CDK102,CDK103,CDK104,CDK105,CDK106,CDK107,CDK108,CDK109,CDK110,CDK111,CDK112,CDK113,CDK114,CDK115,CDK116,CDK117,CDK118,CDK119,CDK120,CDK121,CDK122,CDK123,CDK124,CDK125,CDK126,CDK127,CDK128,CDK129,CDK130,CDK131,CDK132,CDK133,CDK134,CDK135,CDK136,CDK137,CDK138,CDK139,CDK140,CDK141,CDK142,CDK143,CDK144,CDK145,CDK146,CDK147,CDK148,CDK149,CDK150,CDK151,CDK152,CDK153,CDK154,CDK155,CDK156,CDK157,CDK158,CDK159,CDK160,CDK161,CDK162,CDK163,CDK164,CDK165,CDK166,CDK167,CDK168,CDK169,CDK170,CDK171,CDK172,CDK173,CDK174,CDK175,CDK176,CDK177,CDK178,CDK179,CDK180,CDK181,CDK182,CDK183,CDK184,CDK185,CDK186,CDK187,CDK188,CDK189,CDK190,CDK191,CDK192,CDK193,CDK194,CDK195,CDK196,CDK197,CDK198,CDK199,CDK200,CDK201,CDK202,CDK203,CDK204,CDK205,CDK206,CDK207,CDK208,CDK209,CDK210,CDK211,CDK212,CDK213,CDK214,CDK215,CDK216,CDK217,CDK218,CDK219,CDK220,CDK221,CDK222,CDK223,CDK224,CDK225,CDK226,CDK227,CDK228,CDK229,CDK230,CDK231,CDK232,CDK233,CDK234,CDK235,CDK236,CDK237,CDK238,CDK239,CDK240,CDK241,CDK242,CDK243,CDK244,CDK245,CDK246,CDK247,CDK248,CDK249,CDK250,CDK251,CDK252,CDK253,CDK254,CDK255,CDK256,CDK257,CDK258,CDK259,CDK260,CDK261,CDK262,CDK263,CDK264,CDK265,CDK266,CDK267,CDK268,CDK269,CDK270,CDK271,CDK272,CDK273,CDK274,CDK275,CDK276,CDK277,CDK278,CDK279,CDK280,CDK281,CDK282,CDK283,CDK284,CDK285,CDK286,CDK287,CDK288,CDK289,CDK290,CDK291,CDK292,CDK293,CDK294,CDK295,CDK296,CDK297,CDK298,CDK299,CDK300,CDK301,CDK302,CDK303,CDK304,CDK305,CDK306,CDK307,CDK308,CDK309,CDK310,CDK311,CDK312,CDK313,CDK314,CDK315,CDK316,CDK317,CDK318,CDK319,CDK320,CDK321,CDK322,CDK323,CDK324,CDK325,CDK326,CDK327,CDK328,CDK329,CDK330,CDK331,CDK332,CDK333,CDK334,CDK335,CDK336,CDK337,CDK338,CDK339,CDK340,CDK341,CDK342,CDK343,CDK344,CDK345,CDK346,CDK347,CDK348,CDK349,CDK350,CDK351,CDK352,CDK353,CDK354,CDK355,CDK356,CDK357,CDK358,CDK359,CDK360,CDK361,CDK362,CDK363,CDK364,CDK365,CDK366,CDK367,CDK368,CDK369,CDK370,CDK371,CDK372,CDK373,CDK374,CDK375,CDK376,CDK377,CDK378,CDK379,CDK380,CDK381,CDK382,CDK383,CDK384,CDK385,CDK386,CDK387,CDK388,CDK389,CDK390,CDK391,CDK392,CDK393,CDK394,CDK395,CDK396,CDK397,CDK398,CDK399,CDK400,CDK401,CDK402,CDK403,CDK404,CDK405,CDK406,CDK407,CDK408,CDK409,CDK410,CDK411,CDK412,CDK413,CDK414,CDK415,CDK416,CDK417,CDK418,CDK419,CDK420,CDK421,CDK422,CDK423,CDK424,CDK425,CDK426,CDK427,CDK428,CDK429,CDK430,CDK431,CDK432,CDK433,CDK434,CDK435,CDK436,CDK437,CDK438,CDK439,CDK440,CDK441,CDK442,CDK443,CDK444,CDK445,CDK446,CDK447,CDK448,CDK449,CDK450,CDK451,CDK452,CDK453,CDK454,CDK455,CDK456,CDK457,CDK458,CDK459,CDK460,CDK461,CDK462,CDK463,CDK464,CDK465,CDK466,CDK467,CDK468,CDK469,CDK470,CDK471,CDK472,CDK473,CDK474,CDK475,CDK476,CDK477,CDK478,CDK479,CDK480,CDK481,CDK482,CDK483,CDK484,CDK485,CDK486,CDK487,CDK488,CDK489,CDK490,CDK491,CDK492,CDK493,CDK494,CDK495,CDK496,CDK497,CDK498,CDK499,CDK500,CDK501,CDK502,CDK503,CDK504,CDK505,CDK506,CDK507,CDK508,CDK509,CDK510,CDK511,CDK512,CDK513,CDK514,CDK515,CDK516,CDK517,CDK518,CDK519,CDK520,CDK521,CDK522,CDK523,CDK524,CDK525,CDK526,CDK527,CDK528,CDK529,CDK530,CDK531,CDK532,CDK533,CDK534,CDK535,CDK536,CDK537,CDK538,CDK539,CDK540,CDK541,CDK542,CDK543,CDK544,CDK545,CDK546,CDK547,CDK548,CDK549,CDK550,CDK551,CDK552,CDK553,CDK554,CDK555,CDK556,CDK557,CDK558,CDK559,CDK560,CDK561,CDK562,CDK563,CDK564,CDK565,CDK566,CDK567,CDK568,CDK569,CDK570,CDK571,CDK572,CDK573,CDK574,CDK575,CDK576,CDK577,CDK578,CDK579,CDK580,CDK581,CDK582,CDK583,CDK584,CDK585,CDK586,CDK587,CDK588,CDK589,CDK590,CDK591,CDK592,CDK593,CDK594,CDK595,CDK596,CDK597,CDK598,CDK599,CDK600,CDK601,CDK602,CDK603,CDK604,CDK605,CDK606,CDK607,CDK608,CDK609,CDK610,CDK611,CDK612,CDK613,CDK614,CDK615,CDK616,CDK617,CDK618,CDK619,CDK620,CDK621,CDK622,CDK623,CDK624,CDK625,CDK626,CDK627,CDK628,CDK629,CDK630,CDK631,CDK632,CDK633,CDK634,CDK635,CDK636,CDK637,CDK638,CDK639,CDK640,CDK641,CDK642,CDK643,CDK644,CDK645,CDK646,CDK647,CDK648,CDK649,CDK650,CDK651,CDK652,CDK653,CDK654,CDK655,CDK656,CDK657,CDK658,CDK659,CDK660,CDK661,CDK662,CDK663,CDK664,CDK665,CDK666,CDK667,CDK668,CDK669,CDK670,CDK671,CDK672,CDK673,CDK674,CDK675,CDK676,CDK677,CDK678,CDK679,CDK680,CDK681,CDK682,CDK683,CDK684,CDK685,CDK686,CDK687,CDK688,CDK689,CDK690,CDK691,CDK692,CDK693,CDK694,CDK695,CDK696,CDK697,CDK698,CDK699,CDK700,CDK701,CDK702,CDK703,CDK704,CDK705,CDK706,CDK707,CDK708,CDK709,CDK710,CDK711,CDK712,CDK713,CDK714,CDK715,CDK716,CDK717,CDK718,CDK719,CDK720,CDK721,CDK722,CDK723,CDK724,CDK725,CDK726,CDK727,CDK728,CDK729,CDK730,CDK731,CDK732,CDK733,CDK734,CDK735,CDK736,CDK737,CDK738,CDK739,CDK740,CDK741,CDK742,CDK743,CDK744,CDK745,CDK746,CDK747,CDK748,CDK749,CDK750,CDK751,CDK752,CDK753,CDK754,CDK755,CDK756,CDK757,CDK758,CDK759,CDK760,CDK761,CDK762,CDK763,CDK764,CDK765,CDK766,CDK767,CDK768,CDK769,CDK770,CDK771,CDK772,CDK773,CDK774,CDK775,CDK776,CDK777,CDK778,CDK779,CDK780,CDK781,CDK782,CDK783,CDK784,CDK785,CDK786,CDK787,CDK788,CDK789,CDK790,CDK791,CDK792,CDK793,CDK794,CDK795,CDK796,CDK797,CDK798,CDK799,CDK800,CDK801,CDK802,CDK803,CDK804,CDK805,CDK806,CDK807,CDK808,CDK809,CDK810,CDK811,CDK812,CDK813,CDK814,CDK815,CDK816,CDK817,CDK818,CDK819,CDK820,CDK821,CDK822,CDK823,CDK824,CDK825,CDK826,CDK827,CDK828,CDK829,CDK830,CDK831,CDK832,CDK833,CDK834,CDK835,CDK836,CDK837,CDK838,CDK839,CDK840,CDK841,CDK842,CDK843,CDK844,CDK845,CDK846,CDK847,CDK848,CDK849,CDK850,CDK851,CDK852,CDK853,CDK854,CDK855,CDK856,CDK857,CDK858,CDK859,CDK860,CDK861,CDK862,CDK863,CDK864,CDK865,CDK866,CDK867,CDK868,CDK869,CDK870,CDK871,CDK872,CDK873,CDK874,CDK875,CDK876,CDK877,CDK878,CDK879,CDK880,CDK881,CDK882,CDK883,CDK884,CDK885,CDK886,CDK887,CDK888,CDK889,CDK890,CDK891,CDK892,CDK893,CDK894,CDK895,CDK896,CDK897,CDK898,CDK899,CDK900,CDK901,CDK902,CDK903,CDK904,CDK905,CDK906,CDK907,CDK908,CDK909,CDK910,CDK911,CDK912,CDK913,CDK914,CDK915,CDK916,CDK917,CDK918,CDK919,CDK920,CDK921,CDK922,CDK923,CDK924,CDK925,CDK926,CDK927,CDK928,CDK929,CDK930,CDK931,CDK932,CDK933,CDK934,CDK935,CDK936,CDK937,CDK938,CDK939,CDK940,CDK941,CDK942,CDK943,CDK944,CDK945,CDK946,CDK947,CDK948,CDK949,CDK950,CDK951,CDK952,CDK953,CDK954,CDK955,CDK956,CDK957,CDK958,CDK959,CDK960,CDK961,CDK962,CDK963,CDK964,CDK965,CDK966,CDK967,CDK968,CDK969,CDK970,CDK971,CDK972,CDK973,CDK974,CDK975,CDK976,CDK977,CDK978,CDK979,CDK980,CDK981,CDK982,CDK983,CDK984,CDK985,CDK986,CDK987,CDK988,CDK989,CDK990,CDK991,CDK992,CDK993,CDK994,CDK995,CDK996,CDK997,CDK998,CDK999,CDK1000	3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,malignant neoplasm of male genital organ	colony formation	1,54E-03			ASPM,BIRC5,BMP6,BRCA1,CCNA1,CDCC25C,E2F7,ESR1,FERMT1,GPR68,IGKC,KIF20A,KLK4,KNTC1,MC3R,MK167,M	24
Cell Cycle, Cellular Movement	cytokinesis	1,60E-03			AURKB,BIRC5,KIF20A,NEK2	4
Cellular Development, Cellular Growth and formation	formation of retinal cells	1,69E-03			GNAT2,LRAT,NR2E1,PDE6C	3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,bladder cancer	locally recurrent breast cancer	1,74E-03			ESR1,POLE,RRM2	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,metastatic breast cancer	relapsed metastatic breast cancer	1,74E-03			ESR1,POLE,RRM2	2
Cancer, Hematological Disease, Immunology/acute myeloid leukemia	type M7 acute myeloid leukemia	1,74E-03			BUB1B,IL2RB,RRM2	3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,prostate cancer	prostate cancer	1,88E-03			ASPM,BIRC5,BMP6,BRCA1,CCNA1,CDCC25C,E2F7,ESR1,FERMT1,GPR68,IGKC,KIF20A,KLK4,KNTC1,MC3R,MK167,P	3
Cancer, Hematological Disease, Immunology/acute myeloid leukemia with inv(16)(p13;p11.2) acute myeloid leukemia	inv(16)(p13;p11.2) acute myeloid leukemia	1,90E-03			IL2RB,POLE,RRM2	3
Cancer, Hematological Disease, Immunology/acute myeloid leukemia with inv(16)(p13;p11.2) acute myeloid leukemia	cell cycle progression	1,90E-03			BRCA1,CCNE1,CDK1	3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,HER2-negative breast carcinoma	metastatic HER2-negative breast carcinoma	1,90E-03			ESR1,POLE,RRM2	2
Cell Cycle, DNA Replication, Recombination/recombination	DNA replication checkpoint	1,90E-03			CDT1,CENPE	2
Cell Cycle, Connective Tissue Development/GOI1 phase transition	arrest in GO/G1 phase transition of fibroblast	1,93E-03			CCNE1,ESR1	2
Cell Cycle, Connective Tissue Development/G2M phase transition	arrest in G2M phase transition of fibroblast	1,93E-03			CCNE1,ESR1	2
Embryonic Development, Organ Development	development of glomerular basement membra	1,93E-03			COL4A3,COL4A4	2
Cellular Assembly and Organization, DNA Romation	formation of chiasmata	1,93E-03			BRCA1,EXO1	2
Cancer, Endocrine System Disorders, Galactogrowth	growth of islet cell tumor	1,93E-03			COL4A3,HMMR	2
Cancer, Endocrine System Disorders, Galactogrowth	metastatic BRCA1 mutation positive pancreatic adenocarcinoma	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Endocrine System Disorders, Galactogrowth	metastatic BRCA2 mutation positive pancreatic adenocarcinoma	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Endocrine System Disorders, Galactogrowth	metastatic BRCA1 mutation positive pancreatic adenocarcinoma	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Siver cholangiocarcinoma	metastatic extrahepatic cholangiocarcinoma	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Siver cholangiocarcinoma	metastatic gallbladder neoplasm	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Siver cholangiocarcinoma	metastatic liver cholangiocarcinoma	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cell Signaling, Vitamin and Mineral Metabolism	presence of Ca2+	1,93E-03			Pin,PTHLH	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Siver cholangiocarcinoma	resected extrahepatic cholangiocarcinoma	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Endocrine System Disorders, Galactogrowth	stage 2A pancreatic cancer	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal nasopharyngeal carcinoma	stage 4C nasopharyngeal carcinoma	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal nasopharyngeal carcinoma	unresectable extrahepatic cholangiocarcinoma	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Siver cholangiocarcinoma	unresectable gallbladder cancer	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Siver cholangiocarcinoma	unresectable liver cholangiocarcinoma	1,93E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,malignant solid tumor	recurrent malignant solid tumor	1,93E-03			AURKA,BRCA1,ESR1,IL2RB,POLE,RRM2	2
Cell Cycle	interphase	1,98E-03			BRCA1,CCNE1,CXK2,ESR1	4
Tissue Morphology	quantity of tumor cell lines	2,00E-03	0,087		BRCA1,CCNB1,ESR1,PRC1,PTHLH,HRAS,F6	6
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,cancer	stage 3c cancer	2,00E-03			BRCA1,IL2RB,MSI3,POLE,RRM2	3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,growth	growth of tumor	2,04E-03	Increased 2,892		AURKA,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1B,CCNA1,CCNE1,CO14A3,ESR1,GPR68,HMMR,MK167,MSTN,NCAPG,PLK1,PTHL	18
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,cancer	stage 3A cancer	2,04E-03			ESR1,IL2RB,POLE,RRM2	2
Hereditary Disorder, Organismal Injury and Autosomal recessive disease	autosomal recessive disease	2,11E-03			ASPM,BIRC5,BMP6,BRCA1,CCNA1,CDCC25C,E2F7,ESR1,FERMT1,GPR68,IGKC,KIF20A,KLK4,KNTC1,MC3R,MK167,M	24
Cancer, Hereditary Disorder, Organismal Inhereditary breast cancer	hereditary breast cancer	2,23E-03			BRCA1,ESR1,PRC1	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,cancer	adenoma	2,23E-03			AURKA,BRCA1,ESR1,IL2RB,POLE,RRM2	2
Cellular Development, Cellular Growth and cell proliferation	cell proliferation of hepatoma cell lines	2,40E-03	1,206		ASNS,AURKA,BIRC5,E2F8,NCAPG,PTHLH,RRM2	7
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Siver cholangiocarcinoma	Klatskin's tumor	2,40E-03			POLE,RRM2	2
Cell Cycle	G2 phase	2,40E-03			CCNE1,CDT1	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,small cell lung cancer	hyperplastic non-small cell lung cancer	2,40E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,EGFR expressing squamous cell lung cancer	locally advanced EGFR expressing squamous cell lung cancer	2,40E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,bladder carcinoma	recurrent bladder carcinoma	2,40E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities,bladder carcinoma	recurrent urethral carcinoma	2,40E-03			POLE,RRM2	2
Cancer, Endocrine System Disorders, Galactogrowth 4 pancreatic cancer						

Cellular Growth and Proliferation	colony formation	colony formation of breast cancer cell lines	5.25E-03			BRCA1,ESR1,PKB,PLK1	4
Cellular Growth and Proliferation	colony formation	colony formation of cells	5.29E-03	Increased	2,827	BIRC5,BRCA1,CCNE1,CDC47L,E2F8,ESR1,FANCA,PKB,PLK1,PTHLH,RRM2,UBE2C	12
Cancer, Endocrine System Disorders, Organismal Injury and Abnormalities	Organismal Injury and Abnormalities	small-cell carcinoma	5.30E-03			CDC45,MK167,MYCL,POLE,RRM2	5
Cell Cycle	G2M phase	G2M phase of cervical cancer cell lines	5.48E-03			CCDC25,EME1	2
Auditory Disease, Auditory and Vestibular System Morphology	Auditory and Vestibular System Morphology	abnormal morphology of stria vascularis of	5.48E-03			COL4A3,KCNE1B	2
Cancer, Hematological Disease, Immunology	Immunology	advanced chronic lymphocytic leukemia	5.48E-03			POLE,RRM2	2
Dermatological Diseases and Conditions, Catrphy	function	strphy of skin	5.48E-03			BRCA1,FERMT1	2
Organ Development	function	function of urinary bladder	5.48E-03			CHRN4,Dab1	2
Cellular Assembly and Organization	modification	modification of microtubules	5.48E-03			AURKA,HMMR	2
Cellular Assembly and Organization	quantity	quantity of chromosome components	5.48E-03			MELK,SGO1	2
Lipid Metabolism, Molecular Transport, Smeaction	secretion	secretion of arachidonic acid	5.48E-03			NMUR2,PLA2G5	2
Humoral Immune Response, Immunological	abnormal quantity	abnormal quantity of immunoglobulin	5.55E-03			ESR1,FOXR1,IKKc	3
Cellular Function and Maintenance, Molecuhomeostasis	homeostasis	homeostasis of iron ion	5.55E-03			BMP6,ERFE,TMPRSS6	3
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	sensitization	sensitization of cells	5.55E-03			BIRC5,CCNE1,CCNE2	3
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal Injury and Abnormalities	Organismal Injury and Abnormalities	nasopharyngeal carcinoma	5.66E-03			AURKA,ESR1,POLE,RRM2	4
Cell Cycle	G1 phase	G1 phase of breast cancer cell lines	5.66E-03			BRCA1,CCNE1,ESR1	3
Cancer, Hematological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	Organismal Injury and Abnormalities	lymphocytic neoplasm	6.12E-03			ADAMTSL3,AURKA,AURKB,BIRC5,BRCA1,BUB1B,CCNE1,CCNE2,CDC42,CDC47L,CDK1,COL4A4,DCLK3,E2F7,EXO	27
Cancer, Hematological Disease, Immunology	large-cell lymphoma	large-cell lymphoma	6.20E-03			ADAMTSL3,BIRC5,FERMT1,IL2RB,MK167,POLE,RRM2,ZWILCH	8
Hereditary Disorder, Ophthalmic Disease, Cretinal degeneration	retinal degeneration	autosomal recessive retinal degeneration	6.22E-03			LRAT,NEK2,PDE6C	3
Amino Acid Metabolism, Post-Translational phosphorylation	phosphorylation	phosphorylation of L-theonine	6.22E-03			CDK1,PKB,TTK	3
Cell Death and Survival	apoptosis	apoptosis of carcinoma cell lines	6.22E-03			CDCEP1,PLK1	2
Cell Cycle	G2M phase	arrest in G2M phase of breast cancer cell	6.23E-03			BRCA1,CCDC25C	2
Endocrine System Disorders, Organ Morphology	abnormal morphology	abnormal morphology of semiterous tubule	6.25E-03			ASPM,CX32,ESR1,KNSTRN,LRAT	5
Organismal Injury and Abnormalities, Reprendometosis	endometriosis	endometriosis	6.33E-03			BIRC5,BRCA1,BUB1B,CDK1,ESR1,IL2RB,KIF20A,PKB,PON1,TK1	10
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	cancer of secretory structure	cancer of secretory structure	6.46E-03			ADAMTSL3,ASPM,BIRC5,BMP6,BRCA1,C10orf90,CCNA1,CCNE1,IP1,CCDC25C,CDC47L,GENPE,GENPF,DCLK3,DCTD,	48
Cancer, Cellular Development, Cellular Growth	proliferation	proliferation of tumor cells	6.50E-03	Increased	2,078	BIRC5,BRCA1,CCNA1,CCNE1,COL4A3,ESR1,HMMR,MK167,PLK1,PTHLH,UBE2C	11
Organismal Injury and Abnormalities, Renafailure	failure of kidney	failure of kidney	6.51E-03		0,849 bias	BUB1B,CHRN4,CLDN19,COL4A3,IL2RB,PTHLH,REN	7
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic	gall bladder carcinoma	gall bladder carcinoma	6.54E-03			BRCA1,CCNE1,POLE,RRM2	4
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	metastatic solid tumor	metastatic solid tumor	6.57E-03			AURKB,BIRC5,CCNA1,DKAP5,ESR1,HMMR,IL2RB,KIF20A,NCAPG,PKB,PLK1,POLE,RRM2	13
Cellular Growth and Proliferation	accumulation	accumulation of tumor cell lines	6.57E-03			AURKA,BIRC5,PLK1	3
Organ Morphology, Reproductive System	branching of mammary duct	branching of mammary duct	6.57E-03			BRCA1,ESR1,PTHLH	3
Cancer, Endocrine System Disorders, Gastrimetastatic pancreatic adenocarcinoma	metastatic pancreatic adenocarcinoma	metastatic pancreatic adenocarcinoma	6.57E-03			PLK1,POLE,RRM2	3
Cell Death and Survival	apoptosis	apoptosis of colorectal cancer cell lines	6.63E-03		-0,501	BIRC5,CCNE1,CDK1,LGR5,MELK,RASSF6,TTK	7
Cell Death and Survival, Organismal Injury	apoptosis	apoptosis of kidney cell lines	6.75E-03		-0,805	BIRC5,BRCA1,CCNE1,CDK1,ESR1,MELK,PTHLH	7
Connective Tissue Development and Function	growth of connective tissue	growth of connective tissue	6.76E-03			CDCEP1,CDK1,IL2RB,PLK1,RRM2	5
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	growth of carcinoma	growth of carcinoma	6.76E-03	Increased	3,381	BMP6,BRCA1,BUB1,CCNE1,CCNE1,ESR1,FERMT1,HMMR,IL2RB,MK167,MSTN,MYCL,PTHLH,UBE2C	14
Cellular Growth and Proliferation	cell death	cell death of myeloma cell lines	7.02E-03		0,927	BMP6,NCAPG,PLK1,PTHLH,RRM2	5
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	tumorigenesis of epithelial neoplasm	tumorigenesis of epithelial neoplasm	7.02E-03		0,025	AURKA,BMP6,CDK1,HMMR	4
Cell Cycle	M phase	M phase of germ cells	7.02E-03		1,069	BIRC5,BRCA1,BUB1B,CCNE1,ESR1,GPR88	6
Cell Cycle	cell cycle progression	arrest in cell cycle progression of bone can	7.02E-03			CK2S2,UBE2C	2
Cellular Compromise, Ophthalmic Disease, degeneration	degeneration of retinal rods	degeneration of retinal rods	7.02E-03			AURKB,CLSPN	2
Cellular Development, Digestive System	differentiation	differentiation of hepatocytes	7.02E-03			LRAT,SLC24A1	2
						E2F7,E2F8	2

Discussion

Dans ce projet, nous avons tenté de générer un nouveau modèle murin de médulloblastomes du groupe 3 en orientant l'expression de l'allèle mutant *MycT58A* dans les cellules exprimant *Otx2* pendant la période postnatale. Contrairement à ce que nous attendions, les souris mutantes développent toujours des carcinomes des plexus choroïdes, et jamais de médulloblastomes.

1) Un modèle murin qui ne mime pas la formation de MB du groupe 3

L'analyse des cerveaux d'une trentaine de souris *Otx2^{CreERT2/+}; Trp53^{fl/fl}; ROSA26^{MycT58A/MycT58A}* injectées au tamoxifène durant la première semaine postnatale a révélé qu'aucun cas ne développe de médulloblastomes. Pourquoi l'expression de *MycT58A* dans les GCP *Otx2*-positifs n'induit-elle pas la formation de MB ? Dans la littérature, de nombreux indices nous laissaient supposer que ce modèle devrait développer des MB du groupe 3. Tout d'abord, les études menées par Kawauchi et collègues en 2012 : ces auteurs démontrent que la surexpression de *c-Myc* dans des GCP issues de souris *Cdkn2c^{-/-}; Trp53^{-/-}* et réimplantés dans des souris immuno-déficientes conduit à la formation de médulloblastomes extrêmement agressifs, similaires à ceux du groupe 3 dans 100% des cas (réimplantation de 2×10^6 GCP) (Kawauchi et al., 2012). Plus récemment, la même équipe montre que l'induction de la surexpression de *c-Myc* et d'un dominant négatif de *p53*, DNp53, qui mime l'inactivation fonctionnelle de *p53*, dans des GCP à P1, conduit à nouveau à la formation de MB (Kawauchi et al., 2017). En parallèle, Pei et collègues ont montré que la surexpression de *MycT58A* et de DNp53 dans des cellules souches isolées à partir de la matière blanche du cervelet postnatal, puis réimplantées dans des souris immuno-déficientes, conduisait également à la formation de médulloblastomes semblables à ceux du groupe 3 (Pei et al., 2012).

Comment expliquer alors l'absence totale de MB dans notre cas ? Pour répondre à cette question, deux paramètres sont à prendre en compte : la cellule d'origine, et l'altération qui va initier la tumeur. Nous induisons l'expression de *MycT58A* et l'ablation de *Trp53* dans les cellules exprimant *Otx2* durant la première semaine postnatale. A ce stade, quelques structures du cerveau expriment encore *Otx2*, telles que la rétine, ou encore les plexus choroïdes mais également, les GCP du cervelet postérieur. Dans notre première étude, nous avons démontré que ces GCP représentaient environ 40% de la totalité des GCP du cervelet. On peut alors imaginer que nous avons bien ciblé ici une cellule d'origine potentielle des MB, et que l'utilisation de lignée *Otx2^{CreERT2/+}* n'est pas à remettre en question. Le second paramètre est

l'altération qui initie la formation de tumeur à partir de la cellule d'origine. Nous avons utilisé ici une forme stabilisée de c-Myc, *MycT58A*, sous le contrôle du promoteur ROSA26. L'utilisation de ce promoteur, au même stade, pour induire l'expression de SmoM2 dans notre étude n°1 (cf chapitre 1 des résultats) nous amène à conclure que ce promoteur est actif. Cependant, si son activité est suffisante pour induire la formation de MB Shh avec SmoM2, elle ne l'est peut pas pour former des médulloblastomes du groupe 3 avec *MycT58A*. On peut alors supposer ici que l'accumulation de la protéine Myc, lorsqu'elle est exprimée sous le contrôle du promoteur ROSA26, dans les GCP n'est pas suffisante pour rendre ces derniers sensibles à la tumorigenèse. Dans les études citées plus haut, la surexpression de c-Myc se faisait grâce à des vecteurs viraux où les gènes c-Myc ou *MycT58A* sont placés en aval d'un promoteur synthétique fort : le promoteur CAG. Le niveau d'expression de l'allèle *MycT58A*, dans nos GCP, pourrait donc être trop faible pour parvenir au même résultat.

2) Un nouveau modèle de carcinomes des plexus choroïdes

Dans le modèle présenté ici, alors que l'expression de *MycT58A* dans les GCP ne produit jamais de médulloblastomes, elle conduit dans 100% des cas à des tumeurs situées au niveau des plexus choroïdes. L'analyse histo-pathologique de ces tumeurs a révélé qu'il s'agissait bien de carcinomes des plexus choroïdes. Pourquoi ce modèle donne-t-il des carcinomes des plexus choroïdes ? Dans ce modèle, l'expression de *MycT58A* et l'ablation de *Tp53* sont induites simultanément, par injection de tamoxifène, dans les cellules *Otx2* positives. Or, les plexus choroïdes des quatre ventricules (deux latéraux au niveau du télencéphale, le 3^{ème} au niveau du diencéphale et le 4^{ème} au niveau du rhombencéphale) expriment fortement le facteur de transcription *Otx2* et ce jusqu'à l'âge adulte. Ainsi, les altérations génétiques induites dans les GCP le sont également dans les plexus choroïdes. Cependant, dans ce cas, ces altérations semblent suffisantes pour induire efficacement la tumorigenèse. En supposant que l'activité du promoteur ubiquitaire ROSA26 soit la même dans les GCP et dans les plexus choroïdes, cela voudrait dire que ces derniers sont beaucoup plus sensibles à une augmentation modérée de la protéine c-Myc que les GCP. Cette hypothèse concorde avec les récents travaux de Kawauchi et collègues. Ces derniers montrent que la surexpression de c-Myc, induite par *Atoh1-Cre* ou *Blbp-Cre*, induit aussi souvent des carcinomes des plexus choroïdes que des MB du groupe 3. Or, le lignage de ces deux lignées montre que très peu de leurs dérivés se retrouvent dans les plexus choroïdes : moins de 0,5% dans le cas du lignage *Atoh1* (Kawauchi et al., 2017; Luca et al., 2016). Ces résultats suggèrent que les cellules des plexus choroïdes sont extrêmement sensibles à la tumorigenèse induite par c-Myc. De plus, de manière très intéressante, dans

l'étude de Kawauchi et al., l'utilisation de différentes lignées pilotes pour induire la surexpression de c-Myc dans différentes populations et à différentes périodes, génère soit des médulloblastomes, soit des carcinomes des plexus choroïdes, mais jamais les deux (Kawauchi et al., 2017).

Le nouveau modèle que nous avons généré s'avère être un excellent modèle murin de carcinomes des plexus choroïdes. En effet, il reproduit de nombreuses caractéristiques retrouvées dans les tumeurs humaines. C'est le cas par exemple de l'altération c-Myc. Une analyse récente d'une large cohorte de tumeurs des plexus choroïdes humain a révélé que c-Myc est surexprimé dans 43% des cas (Merve et al., 2017). De plus, chez l'homme, cette pathologie est souvent associée à la mutation du gène *Tp53* (Tabori et al., 2010). Enfin, une autre caractéristique que partage notre modèle avec la pathologie humaine est la prépondérance des tumeurs dans les ventricules latéraux et le quatrième ventricule (Gopal et al., 2008).

3) Mécanisme par lequel c-Myc induit la formation de carcinomes des plexus choroïdes

Afin de comprendre comment l'expression de MycT58A induit la formation de tumeurs dans les plexus choroïdes, nous avons réalisé une analyse à grande échelle du transcriptome des plexus choroïdes normaux ou tumoraux de souris âgées de 9 jours. Cette analyse a permis d'identifier une dérégulation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, ainsi que dans différentes voies nécessaires au maintien de la stabilité du génome, comme celles impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN. Ceci a mis en évidence des événements critiques qui permettent de basculer dans la tumorigenèse. Nos résultats suggèrent que, comme dans d'autres types de cancers, c-Myc pourrait accélérer la progression des carcinomes en favorisant l'instabilité génétique et l'accumulation d'altérations génomiques dans les cellules des plexus choroïdes (Vafa et al., 2002; Tong et al., 2015). On peut se demander ici, si la fonction oncogénique de c-Myc nécessite la coopération d'autres facteurs oncogènes. Une étude a suggéré que dans les médulloblastomes de groupe 3, *Otx2* et c-Myc agissent en synergie pour favoriser la tumorigenèse (Bunt et al., 2012). Etant donné la forte expression d'*Otx2* dans les plexus choroïdes, ainsi que l'importance de cette expression pour le développement de ces structures, il est envisageable qu'*Otx2* soit également fonctionnellement impliqué dans la formation des CPC, et qu'il interagissent avec c-Myc (Makiyama et al., 1997; Fossat et al., 2007; Johansson et al., 2013). Le croisement avec la lignée *Otx2^{fl/fl}* nous permettrait d'inhiber l'expression d'*Otx2* dans ce nouveau modèle, en parallèle à l'induction de MycT58A, et ainsi d'analyser le rôle d'*Otx2* dans le processus tumoral. Enfin, fait intéressant, l'inhibition

pharmacologique des protéines AurA et PLK1, deux kinases dont l'expression est fortement stimulée dans notre modèle, a récemment suscité un grand intérêt en tant que thérapie potentielle pour le traitement des cancers pédiatriques (Pezuk et al., 2016). Il est donc attendu que le nouveau modèle animal que nous avons créé ici puisse être utilisé non seulement pour élucider la biologie fondamentale des CPC, mais aussi servir de plate-forme pour découvrir les vulnérabilités tumorales et valider des cibles thérapeutiques potentielles.

CONCLUSION

Les médulloblastomes sont des tumeurs cérébrales fréquentes et agressives chez l'enfant. Dans 75% des cas, ces tumeurs présentent une surexpression du facteur de transcription Otx2. Ce dernier est exprimé en temps normal dans une sous-population de précurseurs de cellules granulaires du cervelet, depuis leur genèse, au niveau de la lèvre rhombique, jusqu'à leur différenciation et leur migration dans la couche granulaire interne. Pour mieux comprendre son rôle pro-oncogénique, le travail présenté ici a comparé la fonction d'Otx2 dans le développement normal et tumoral du cervelet et des structures adjacentes, les noyaux cochléaires (Figure 24).

L'étude du rôle d'Otx2 durant le développement précoce du cervelet a révélé qu'Otx2 est induit dans l'une des zones germinatives du cervelet, la lèvre rhombique, et va permettre aux progéniteurs de la lèvre rhombique de générer des GCP en nombre suffisant, en favorisant sans doute leur prolifération. Plus tard, dans le développement périnatal du cervelet, Otx2 agit sur la prolifération intense des GCP de manière Shh-indépendante, en inhibant les CDKi impliqués dans la transition G1-S. L'étude du rôle d'Otx2 dans la tumorigenèse Shh-dépendante des précurseurs des cellules granulaires a révélé qu'Otx2 était dispensable pour la formation de la tumeur, mais indispensable au maintien à long terme de son état prolifératif. Cette découverte révolutionne notre compréhension du rôle d'Otx2 dans ce sous-groupe de MB, jusqu'alors insoupçonné, mais permet également d'émettre une hypothèse sur la cause de la surexpression d'Otx2 dans les autres sous-groupes : dans les médulloblastomes des groupes WNT, 3 et 4, la surexpression d'Otx2 compenserait l'absence d'altération de la voie Shh, et permettrait ainsi pour soutenir la prolifération tumorale.

Toutes ces nouvelles données, obtenues dans un contexte entièrement *in vivo*, positionnent Otx2 comme un acteur clé de la prolifération des GCP et font de lui une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapies pour les MB en général et pour ceux ayant pour origine les GCP en particulier.

En parallèle à ces travaux, la tentative de génération d'un nouveau modèle mimant la formation de MB du groupe 3 a échoué. Cependant, elle conduit à la génération du tout premier modèle murin de carcinome des plexus choroïdes. La caractérisation histologique et moléculaire de ce modèle suggère fortement qu'il mime la formation de ces tumeurs chez l'homme. L'utilisation de ce modèle pourrait s'avérer un atout dans le développement de thérapies pour lutter contre les carcinomes de plexus choroïdes, un cancer pédiatrique agressif et encore très peu compris.

BIBLIOGRAPHIE

- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., and Brûlet, P. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 3279–3290.
- Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., and Simeone, A. (1997). Genetic control of brain morphogenesis through *Otx* gene dosage requirement. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 3639–3650.
- Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Barone, P., Reichert, H., Finkelstein, R., and Simeone, A. (1998). Murine *Otx1* and *Drosophila otd* genes share conserved genetic functions required in invertebrate and vertebrate brain development. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 1691–1702.
- Adams, N.C., Tomoda, T., Cooper, M., Dietz, G., and Hatten, M.E. (2002). Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 965–972.
- Adamson, D.C., Shi, Q., Wortham, M., Northcott, P.A., Di, C., Duncan, C.G., Li, J., McLendon, R.E., Bigner, D.D., Taylor, M.D., et al. (2010). *OTX2* is critical for the maintenance and progression of classic medulloblastoma. *Cancer Res.* *70*, 181–191.
- Aldinger, K.A., Elsen, G.E., Prince, V.E., and Millen, K.J. (2009). Model organisms inform the search for the genes and developmental pathology underlying malformations of the human hindbrain. *Semin. Pediatr. Neurol.* *16*, 155–163.
- Aldosari, N., Bigner, S.H., Burger, P.C., Becker, L., Kepner, J.L., Friedman, H.S., and McLendon, R.E. (2002). *MYCC* and *MYCN* oncogene amplification in medulloblastoma. A fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections from the Children's Oncology Group. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *126*, 540–544.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1978). Prenatal development of the cerebellar system in the rat. I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J. Comp. Neurol.* *179*, 23–48.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1987a). Development of the precerebellar nuclei in the rat: I. The precerebellar neuroepithelium of the rhombencephalon. *J. Comp. Neurol.* *257*, 477–489.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1987b). Development of the precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J. Comp. Neurol.* *257*, 490–512.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1987c). Development of the precerebellar nuclei in the rat: III. The posterior precerebellar extramural migratory stream and the lateral reticular and external cuneate nuclei. *J. Comp. Neurol.* *257*, 513–528.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1987d). Development of the precerebellar nuclei in the rat: IV. The anterior precerebellar extramural migratory stream and the nucleus reticularis tegmenti pontis and the basal pontine gray. *J. Comp. Neurol.* *257*, 529–552.
- Alvarez Otero, R., Sotelo, C., and Alvarado-Mallart, R.M. (1993). Chick/quail chimeras with partial cerebellar grafts: an analysis of the origin and migration of cerebellar cells. *J. Comp. Neurol.* *333*, 597–615.

- Amakye, D., Jagani, Z., and Dorsch, M. (2013). Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat. Med.* *19*, 1410–1422.
- Ang, S.L., Conlon, R.A., Jin, O., and Rossant, J. (1994). Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse *Otx2* in ectoderm explants. *Dev. Camb. Engl.* *120*, 2979–2989.
- Ang, S.L., Jin, O., Rhinn, M., Daigle, N., Stevenson, L., and Rossant, J. (1996). A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* *122*, 243–252.
- Anne, S.L., Govek, E.-E., Ayrault, O., Kim, J.H., Zhu, X., Murphy, D.A., Van Aelst, L., Roussel, M.F., and Hatten, M.E. (2013). WNT3 inhibits cerebellar granule neuron progenitor proliferation and medulloblastoma formation via MAPK activation. *PLoS One* *8*, e81769.
- Arellano, M., and Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *29*, 559–573.
- Awatramani, R., Soriano, P., Rodriguez, C., Mai, J.J., and Dymecki, S.M. (2003). Cryptic boundaries in roof plate and choroid plexus identified by intersectional gene activation. *Nat. Genet.* *35*, 70–75.
- Ayrault, O., Zhao, H., Zindy, F., Qu, C., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (2010). *Atoh1* inhibits neuronal differentiation and collaborates with *Gli1* to generate medulloblastoma-initiating cells. *Cancer Res.* *70*, 5618–5627.
- Barrow, J.R., and Capecchi, M.R. (1996). Targeted disruption of the *Hoxb-2* locus in mice interferes with expression of *Hoxb-1* and *Hoxb-4*. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 3817–3828.
- Barrow, J.R., Stadler, H.S., and Capecchi, M.R. (2000). Roles of *Hoxa1* and *Hoxa2* in patterning the early hindbrain of the mouse. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 933–944.
- Bell, E., Wingate, R.J., and Lumsden, A. (1999). Homeotic transformation of rhombomere identity after localized *Hoxb1* misexpression. *Science* *284*, 2168–2171.
- Bel-Vialar, S., Itasaki, N., and Krumlauf, R. (2002). Initiating Hox gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 5103–5115.
- Ben-Arie, N., Bellen, H.J., Armstrong, D.L., McCall, A.E., Gordadze, P.R., Guo, Q., Matzuk, M.M., and Zoghbi, H.Y. (1997). *Math1* is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* *390*, 169–172.
- Berenguer, J., Herrera, A., Vuolo, L., Torroba, B., Llorens, F., Sumoy, L., and Pons, S. (2013). MicroRNA 22 regulates cell cycle length in cerebellar granular neuron precursors. *Mol. Cell Biol.* *33*, 2706–2717.
- Bihannic, L., and Ayrault, O. (2016). Insights into cerebellar development and medulloblastoma. *Bull. Cancer (Paris)* *103*, 30–40.
- Birgbauer, E., and Fraser, S.E. (1994). Violation of cell lineage restriction compartments in the chick hindbrain. *Dev. Camb. Engl.* *120*, 1347–1356.

- Boncinelli, E., Gulisano, M., and Broccoli, V. (1993). *Emx* and *Otx* homeobox genes in the developing mouse brain. *J. Neurobiol.* *24*, 1356–1366.
- Boon, K., Eberhart, C.G., and Riggins, G.J. (2005). Genomic amplification of orthodenticle homologue 2 in medulloblastomas. *Cancer Res.* *65*, 703–707.
- Boyden, E.S., Katoh, A., and Raymond, J.L. (2004). Cerebellum-dependent learning: the role of multiple plasticity mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* *27*, 581–609.
- Broccoli, V., Boncinelli, E., and Wurst, W. (1999). The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmic organizer. *Nature* *401*, 164–168.
- Bunt, J., de Haas, T.G., Hasselt, N.E., Zwijnenburg, D.A., Koster, J., Versteeg, R., and Kool, M. (2010). Regulation of cell cycle genes and induction of senescence by overexpression of *OTX2* in medulloblastoma cell lines. *Mol. Cancer Res. MCR* *8*, 1344–1357.
- Bunt, J., Hasselt, N.E., Zwijnenburg, D.A., Hamdi, M., Koster, J., Versteeg, R., and Kool, M. (2012). *OTX2* directly activates cell cycle genes and inhibits differentiation in medulloblastoma cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *131*, E21–32.
- Butts, D.T., Wilson, D.L., and Wingate, D.R.J.T. (2013). Specification of Granule Cells and Purkinje Cells. 89–106.
- Butts, T., Chaplin, N., and Wingate, R.J.T. (2011). Can Clues from Evolution Unlock the Molecular Development of the Cerebellum? *Mol. Neurobiol.* *43*, 67–76.
- Butts, T., Green, M.J., and Wingate, R.J.T. (2014). Development of the cerebellum: simple steps to make a ‘little brain.’ *Development* *141*, 4031–4041.
- Cerminara, N.L., Lang, E.J., Sillitoe, R.V., and Apps, R. (2015). Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nat. Rev. Neurosci.* *16*, 79–93.
- Chaplin, N., Tendeng, C., and Wingate, R.J.T. (2010). Absence of an external germinal layer in zebrafish and shark reveals a distinct, amniote groundplan of cerebellum development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 3048–3057.
- Chatelain, G., Fossat, N., Brun, G., and Lamonerie, T. (2006). Molecular dissection reveals decreased activity and not dominant negative effect in human *OTX2* mutants. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *84*, 604–615.
- Chau, K.Y., Chen, S., Zack, D.J., and Ono, S.J. (2000). Functional domains of the cone-rod homeobox (*CRX*) transcription factor. *J. Biol. Chem.* *275*, 37264–37270.
- Chen, S., Wang, Q.L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Zack, D.J. (1997). *Crx*, a novel *Otx*-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* *19*, 1017–1030.
- Cheng, S.Y., and Bishop, J.M. (2002). Suppressor of Fused represses *Gli*-mediated transcription by recruiting the *SAP18-mSin3* corepressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 5442–5447.

- Chi, C.L., Martinez, S., Wurst, W., and Martin, G.R. (2003). The isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 2633–2644.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* *383*, 407–413.
- Chizhikov, V., and Millen, K.J. (2003). Development and malformations of the cerebellum in mice. *Mol. Genet. Metab.* *80*, 54–65.
- Chlapek, P., Zitterbart, K., Kren, L., Filipova, L., Sterba, J., and Veselska, R. (2017). Uniformity under in vitro conditions: Changes in the phenotype of cancer cell lines derived from different medulloblastoma subgroups. *PloS One* *12*, e0172552.
- Cho, Y.-J., Tsherniak, A., Tamayo, P., Santagata, S., Ligon, A., Greulich, H., Berhoukim, R., Amani, V., Goumnerova, L., Eberhart, C.G., et al. (2011). Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 1424–1430.
- Ciemerych, M.A., Kenney, A.M., Sicinska, E., Kalaszczynska, I., Bronson, R.T., Rowitch, D.H., Gardner, H., and Sicinski, P. (2002). Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev.* *16*, 3277–3289.
- Cobrinik, D., Lee, M.H., Hannon, G., Mulligan, G., Bronson, R.T., Dyson, N., Harlow, E., Beach, D., Weinberg, R.A., and Jacks, T. (1996). Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev.* *10*, 1633–1644.
- Conlon, R.A., and Rossant, J. (1992). Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. *Dev. Camb. Engl.* *116*, 357–368.
- Corrales, J.D., Rocco, G.L., Blaess, S., Guo, Q., and Joyner, A.L. (2004). Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 5581–5590.
- Corrales, J.D., Blaess, S., Mahoney, E.M., and Joyner, A.L. (2006). The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 1811–1821.
- Courtois, V., Chatelain, G., Han, Z.-Y., Le Novère, N., Brun, G., and Lamonerie, T. (2003). New Otx2 mRNA isoforms expressed in the mouse brain. *J. Neurochem.* *84*, 840–853.
- Crossley, P.H., Minowada, G., MacArthur, C.A., and Martin, G.R. (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* *84*, 127–136.
- Dakubo, G.D., Mazerolle, C.J., and Wallace, V.A. (2006). Expression of Notch and Wnt pathway components and activation of Notch signaling in medulloblastomas from heterozygous patched mice. *J. Neurooncol.* *79*, 221–227.
- Davenne, M., Maconochie, M.K., Neun, R., Pattyn, A., Chambon, P., Krumlauf, R., and Rijli, F.M. (1999). Hoxa2 and Hoxb2 control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron* *22*, 677–691.

- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675–684.
- Di, C., Liao, S., Adamson, D.C., Parrett, T.J., Broderick, D.K., Shi, Q., Lengauer, C., Cummins, J.M., Velculescu, V.E., Fults, D.W., et al. (2005). Identification of OTX2 as a Medulloblastoma Oncogene Whose Product can be Targeted by All-Trans Retinoic Acid. *Cancer Res.* 65, 919–924.
- Di Bonito, M., and Studer, M. (2017). Cellular and Molecular Underpinnings of Neuronal Assembly in the Central Auditory System during Mouse Development. *Front. Neural Circuits* 11, 18.
- Duboule, D. (2007). The rise and fall of Hox gene clusters. *Dev. Camb. Engl.* 134, 2549–2560.
- Duboule, D., and Dollé, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO J.* 8, 1497–1505.
- Dupé, V., and Lumsden, A. (2001). Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling. *Dev. Camb. Engl.* 128, 2199–2208.
- Dziegielewska, K.M., Ek, J., Habgood, M.D., and Saunders, N.R. (2001). Development of the choroid plexus. *Microsc. Res. Tech.* 52, 5–20.
- Eddison, M., Toole, L., Bell, E., and Wingate, R.J. (2004). Segmental identity and cerebellar granule cell induction in rhombomere 1. *BMC Biol.* 2, 14.
- Edmondson, J.C., and Hatten, M.E. (1987). Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 7, 1928–1934.
- Espinosa, J.S., and Luo, L. (2008). Timing neurogenesis and differentiation: insights from quantitative clonal analyses of cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 2301–2312.
- Farago, A.F., Awatramani, R.B., and Dymecki, S.M. (2006). Assembly of the brainstem cochlear nuclear complex is revealed by intersectional and subtractive genetic fate maps. *Neuron* 50, 205–218.
- Favier, B., and Dollé, P. (1997). Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 115–131.
- Fink, A.J., Englund, C., Daza, R.A.M., Pham, D., Lau, C., Nivison, M., Kowalczyk, T., and Hevner, R.F. (2006). Development of the Deep Cerebellar Nuclei: Transcription Factors and Cell Migration from the Rhombic Lip. *J. Neurosci.* 26, 3066–3076.
- Finkelstein, R., Smouse, D., Capaci, T.M., Spradling, A.C., and Perrimon, N. (1990). The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the Drosophila nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* 4, 1516–1527.

- Flora, A., Klisch, T.J., Schuster, G., and Zoghbi, H.Y. (2009). Deletion of *Atoh1* disrupts Sonic Hedgehog signaling in the developing cerebellum and prevents medulloblastoma. *Science* 326, 1424–1427.
- Fossat, N., Courtois, V., Chatelain, G., Brun, G., and Lamonerie, T. (2005). Alternative usage of *Otx2* promoters during mouse development. *Dev. Dyn.* 233, 154–160.
- Fossat, N., Chatelain, G., Brun, G., and Lamonerie, T. (2006). Temporal and spatial delineation of mouse *Otx2* functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep.* 7, 824–830.
- Fossat, N., Le Greneur, C., Béby, F., Vincent, S., Godement, P., Chatelain, G., and Lamonerie, T. (2007). A new GFP-tagged line reveals unexpected *Otx2* protein localization in retinal photoreceptors. *BMC Dev. Biol.* 7, 122.
- Foucher, I., Mione, M., Simeone, A., Acampora, D., Bally-Cuif, L., and Houart, C. (2006). Differentiation of cerebellar cell identities in absence of *Fgf* signalling in zebrafish *Otx* morphants. *Dev. Camb. Engl.* 133, 1891–1900.
- Friedman, H.S., Colvin, O.M., Skapek, S.X., Ludeman, S.M., Elion, G.B., Schold, S.C., Jacobsen, P.F., Muhlbaier, L.H., and Bigner, D.D. (1988). Experimental chemotherapy of human medulloblastoma cell lines and transplantable xenografts with bifunctional alkylating agents. *Cancer Res.* 48, 4189–4195.
- Fujita, S., Shimada, M., and Nakamura, T. (1966). H3-thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 128, 191–208.
- Fujiyama, T., Yamada, M., Terao, M., Terashima, T., Hioki, H., Inoue, Y.U., Inoue, T., Masuyama, N., Obata, K., Yanagawa, Y., et al. (2009). Inhibitory and excitatory subtypes of cochlear nucleus neurons are defined by distinct bHLH transcription factors, *Ptf1a* and *Atoh1*. *Dev. Camb. Engl.* 136, 2049–2058.
- Fuller, G.N., and Scheithauer, B.W. (2007). The 2007 Revised World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System: newly codified entities. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 17, 304–307.
- Fults, D.W. (2005). Modeling medulloblastoma with genetically engineered mice. *Neurosurg. Focus* 19, E7.
- Furukawa, T., Morrow, E.M., Li, T., Davis, F.C., and Cepko, C.L. (1999). Retinopathy and attenuated circadian entrainment in *Crx*-deficient mice. *Nat. Genet.* 23, 466–470.
- Gajjar, A., Chintagumpala, M., Ashley, D., Kellie, S., Kun, L.E., Merchant, T.E., Woo, S., Wheeler, G., Ahern, V., Krasin, M.J., et al. (2006). Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. *Lancet Oncol.* 7, 813–820.
- Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P., and Rijli, F.M. (1997). Role of *Hoxa-2* in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* 124, 3693–3702.

- Gavalas, A., Ruhrberg, C., Livet, J., Henderson, C.E., and Krumlauf, R. (2003). Neuronal defects in the hindbrain of *Hoxa1*, *Hoxb1* and *Hoxb2* mutants reflect regulatory interactions among these Hox genes. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 5663–5679.
- Gehring, W.J. (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science* *236*, 1245–1252.
- Gibson, P., Tong, Y., Robinson, G., Thompson, M.C., Curre, D.S., Eden, C., Kranenburg, T.A., Hogg, T., Poppleton, H., Martin, J., et al. (2010). Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature* *468*, 1095–1099.
- Gilbertson, R.J., and Ellison, D.W. (2008). The Origins of Medulloblastoma Subtypes. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *3*, 341–365.
- Gilthorpe, J.D., Papantoniou, E.-K., Chédotal, A., Lumsden, A., and Wingate, R.J.T. (2002). The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 4719–4728.
- Glover, J.C. (2003). The development of vestibulo-ocular circuitry in the chicken embryo. *J. Physiol. Paris* *97*, 17–25.
- Goddard, J.M., Rossel, M., Manley, N.R., and Capecchi, M.R. (1996). Mice with targeted disruption of *Hoxb-1* fail to form the motor nucleus of the VIIth nerve. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 3217–3228.
- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M.L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U.B., Nowak, N.J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M.E., et al. (2003). A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* *425*, 917–925.
- Gonzalez, A.M., Berry, M., Maher, P.A., Logan, A., and Baird, A. (1995). A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. *Brain Res.* *701*, 201–226.
- Goodrich, L.V., Milenković, L., Higgins, K.M., and Scott, M.P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* *277*, 1109–1113.
- Gopal, P., Parker, J.R., Debski, R., and Parker, J., Joseph C. (2008). Choroid Plexus Carcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *132*, 1350–1354.
- Grammel, D., Warmuth-Metz, M., von Bueren, A.O., Kool, M., Pietsch, T., Kretschmar, H.A., Rowitch, D.H., Rutkowski, S., Pfister, S.M., and Schüller, U. (2012). Sonic hedgehog-associated medulloblastoma arising from the cochlear nuclei of the brainstem. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *123*, 601–614.
- Gräper, L. (1913). Die Rhombomeren und ihre Nervenbeziehungen. *Arch. Mikrosk. Anat.* *83*, 371–426.
- Grapin-Botton, A., Bonnin, M.A., and Le Douarin, N.M. (1997). Hox gene induction in the neural tube depends on three parameters: competence, signal supply and paralogue group. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 849–859.
- Guthrie, S., and Lumsden, A. (1991). Formation and regeneration of rhombomere boundaries in the developing chick hindbrain. *Dev. Camb. Engl.* *112*, 221–229.

- de Haas, T., Oussoren, E., Grajkowska, W., Perek-Polnik, M., Popovic, M., Zadavec-Zaletel, L., Perera, M., Corte, G., Wirths, O., van Sluis, P., et al. (2006). OTX1 and OTX2 expression correlates with the clinicopathologic classification of medulloblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *65*, 176–186.
- Habas, C. (2010). Functional imaging of the deep cerebellar nuclei: a review. *Cerebellum Lond. Engl.* *9*, 22–28.
- Hahn, H., Christiansen, J., Wicking, C., Zaphiropoulos, P.G., Chidambaram, A., Gerrard, B., Vorechovsky, I., Bale, A.E., Toftgard, R., Dean, M., et al. (1996). A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J. Biol. Chem.* *271*, 12125–12128.
- Hallonet, M.E.R., and Le Douarin, N.M. (1993). Tracing Neuroepithelial Cells of the Mesencephalic and Metencephalic Alar Plates During Cerebellar Ontogeny in Quail – chick Chimaeras. *Eur. J. Neurosci.* *5*, 1145–1155.
- Hamburger, V. (1969). Hans Spemann and the organizer concept. *Experientia* *25*, 1121–1125.
- Han, Y.-G., Kim, H.J., Dlugosz, A.A., Ellison, D.W., Gilbertson, R.J., and Alvarez-Buylla, A. (2009). Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nat. Med.* *15*, 1062–1065.
- Harkmark, W. (1954). Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons; a morphological and experimental investigation on chick embryos. *J. Comp. Neurol.* *100*, 115–209.
- Hashimoto, M., and Hibi, M. (2012). Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev. Growth Differ.* *54*, 373–389.
- Hatten, M.E., and Roussel, M.F. (2011). Development and cancer of the cerebellum. *Trends Neurosci.* *34*, 134–142.
- Hatton, B.A., Knoepfler, P.S., Kenney, A.M., Rowitch, D.H., de Alborán, I.M., Olson, J.M., and Eisenman, R.N. (2006). N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer Res.* *66*, 8655–8661.
- Hatton, B.A., Villavicencio, E.H., Tsuchiya, K.D., Pritchard, J.I., Ditzler, S., Pullar, B., Hansen, S., Knoblaugh, S.E., Lee, D., Eberhart, C.G., et al. (2008). The Smo/Smo model: hedgehog-induced medulloblastoma with 90% incidence and leptomeningeal spread. *Cancer Res.* *68*, 1768–1776.
- Helmbacher, F., Pujades, C., Desmarquet, C., Frain, M., Rijli, F.M., Chambon, P., and Charnay, P. (1998). Hoxa1 and Krox-20 synergize to control the development of rhombomere 3. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 4739–4748.
- Helms, A.W., and Johnson, J.E. (1998). Progenitors of dorsal commissural interneurons are defined by MATH1 expression. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 919–928.
- Hibi, M., Matsuda, K., Takeuchi, M., Shimizu, T., and Murakami, Y. (2017). Evolutionary mechanisms that generate morphology and neural-circuit diversity of the cerebellum. *Dev. Growth Differ.* *59*, 228–243.

- His W. (1891). Die Entwicklung des Menschlichen Rautenhirns vom ende des ersten bis zum Beginn des dritten Monats. Der mathematisch-physischen Classe der Koeniglich Saechsichen Gesellschaft der Wissenschaften. 1;17:1–74.
- Hoch, R.V., Rubenstein, J.L.R., and Pleasure, S. (2009). Genes and signaling events that establish regional patterning of the mammalian forebrain. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 378–386.
- Hoshino, M., Nakamura, S., Mori, K., Kawauchi, T., Terao, M., Nishimura, Y.V., Fukuda, A., Fuse, T., Matsuo, N., Sone, M., et al. (2005). *Ptf1a*, a bHLH Transcriptional Gene, Defines GABAergic Neuronal Fates in Cerebellum. *Neuron* 47, 201–213.
- Huang, X., Ketova, T., Fleming, J.T., Wang, H., Dey, S.K., Litingtung, Y., and Chiang, C. (2009). Sonic hedgehog signaling regulates a novel epithelial progenitor domain of the hindbrain choroid plexus. *Dev. Camb. Engl.* 136, 2535–2543.
- Huard, J.M., Forster, C.C., Carter, M.L., Sicinski, P., and Ross, M.E. (1999). Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Dev. Camb. Engl.* 126, 1927–1935.
- Ingham, P.W., and McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15, 3059–3087.
- Inouye, M., and Oda, S.I. (1980). Strain-specific variations in the folial pattern of the mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 190, 357–362.
- Jenkins, N.C., Rao, G., Eberhart, C.G., Pedone, C.A., Dubuc, A.M., and Fults, D.W. (2016). Somatic Cell Transfer of c-Myc and Bcl-2 Induces Large-Cell Anaplastic Medulloblastomas in Mice. *J. Neurooncol.* 126, 415–424.
- Jessell, T.M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.* 1, 20–29.
- Jiang, Y., Kumada, T., Cameron, D.B., and Komuro, H. (2008). Cerebellar granule cell migration and the effects of alcohol. *Dev. Neurosci.* 30, 7–23.
- Johansson, P.A., Irmeler, M., Acampora, D., Beckers, J., Simeone, A., and Götz, M. (2013). The transcription factor *Otx2* regulates choroid plexus development and function. *Development* 140, 1055–1066.
- Jungbluth, S., Bell, E., and Lumsden, A. (1999). Specification of distinct motor neuron identities by the singular activities of individual Hox genes. *Dev. Camb. Engl.* 126, 2751–2758.
- Kaur, C., Rathnasamy, G., and Ling, E.-A. (2016). The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 75, 198–213.
- Kaur, R., Aiken, C., Morrison, L.C., Rao, R., Bigio, M.R.D., Rampalli, S., and Werbowetski-Ogilvie, T. (2015). OTX2 exhibits cell-context-dependent effects on cellular and molecular properties of human embryonic neural precursors and medulloblastoma cells. *Dis. Model. Mech.* 8, 1295–1309.
- Kawahira, H., Ma, N.H., Tzanakakis, E.S., McMahon, A.P., Chuang, P.-T., and Hebrok, M. (2003). Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development. *Dev. Camb. Engl.* 130, 4871–4879.

- Kawauchi, D., Robinson, G., Uziel, T., Gibson, P., Rehg, J., Gao, C., Finkelstein, D., Qu, C., Pounds, S., Ellison, D.W., et al. (2012). A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. *Cancer Cell* 21, 168–180.
- Kawauchi, D., Ogg, R.J., Liu, L., Shih, D.J.H., Finkelstein, D., Murphy, B.L., Rehg, J.E., Korshunov, A., Calabrese, C., Zindy, F., et al. (2017). Novel MYC-driven medulloblastoma models from multiple embryonic cerebellar cells. *Oncogene* 36, 5231–5242.
- Kenney, A.M., Cole, M.D., and Rowitch, D.H. (2003). Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Dev. Camb. Engl.* 130, 15–28.
- Kimura, C., Yoshinaga, K., Tian, E., Suzuki, M., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2000). Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. *Dev. Biol.* 225, 304–321.
- Kimura, C., Shen, M.M., Takeda, N., Aizawa, S., and Matsuo, I. (2001). Complementary Functions of Otx2 and Cripto in Initial Patterning of Mouse Epiblast. *Dev. Biol.* 235, 12–32.
- Klisch, T.J., Xi, Y., Flora, A., Wang, L., Li, W., and Zoghbi, H.Y. (2011). In vivo Atoh1 targetome reveals how a proneural transcription factor regulates cerebellar development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3288.
- Knoepfler, P.S., Cheng, P.F., and Eisenman, R.N. (2002). N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev.* 16, 2699–2712.
- Kool, M., Koster, J., Bunt, J., Hasselt, N.E., Lakeman, A., van Sluis, P., Troost, D., Meeteren, N.S., Caron, H.N., Cloos, J., et al. (2008). Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PloS One* 3, e3088.
- Kool, M., Korshunov, A., Remke, M., Jones, D.T.W., Schlanstein, M., Northcott, P.A., Cho, Y.-J., Koster, J., Schouten-van Meeteren, A., van Vuurden, D., et al. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 473–484.
- Kool, M., Jones, D.T.W., Jäger, N., Northcott, P.A., Pugh, T.J., Hovestadt, V., Piro, R.M., Esparza, L.A., Markant, S.L., Remke, M., et al. (2014). Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothed inhibition. *Cancer Cell* 25, 393–405.
- du Lac, S., Raymond, J.L., Sejnowski, T.J., and Lisberger, S.G. (1995). Learning and memory in the vestibulo-ocular reflex. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 409–441.
- Lainé, J., and Axelrad, H. (1994). The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* 339, 159–173.
- Lainé, J., and Axelrad, H. (1998). Lugaro cells target basket and stellate cells in the cerebellar cortex. *Neuroreport* 9, 2399–2403.

- Lainé, J., and Axelrad, H. (2002). Extending the cerebellar Lugaro cell class. *Neuroscience* 115, 363–374.
- Lam, C.W., Xie, J., To, K.F., Ng, H.K., Lee, K.C., Yuen, N.W., Lim, P.L., Chan, L.Y., Tong, S.F., and McCormick, F. (1999). A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas. *Oncogene* 18, 833–836.
- Landsberg, R.L., Awatramani, R.B., Hunter, N.L., Farago, A.F., DiPietrantonio, H.J., Rodriguez, C.I., and Dymecki, S.M. (2005). Hindbrain rhombic lip is comprised of discrete progenitor cell populations allocated by Pax6. *Neuron* 48, 933–947.
- Larsell, O. (1947). The cerebellum of myxinooids and petromyzonts including developmental stages in the lampreys. *J. Comp. Neurol.* 86, 395–445.
- Larsell, O. (1952). The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J. Comp. Neurol.* 97, 281–356.
- Lee, M.H., Williams, B.O., Mulligan, G., Mukai, S., Bronson, R.T., Dyson, N., Harlow, E., and Jacks, T. (1996). Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes Dev.* 10, 1621–1632.
- Leung, C., Lingbeek, M., Shakhova, O., Liu, J., Tanger, E., Saremaslani, P., Van Lohuizen, M., and Marino, S. (2004). Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* 428, 337–341.
- Leuzinger, S., Hirth, F., Gerlich, D., Acampora, D., Simeone, A., Gehring, W.J., Finkelstein, R., Furukubo-Tokunaga, K., and Reichert, H. (1998). Equivalence of the fly orthodenticle gene and the human OTX genes in embryonic brain development of *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* 125, 1703–1710.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–570.
- Lewis, P.M., Gritli-Linde, A., Smeyne, R., Kottmann, A., and McMahon, A.P. (2004). Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev. Biol.* 270, 393–410.
- Li, P., Du, F., Yuelling, L.W., Lin, T., Muradimova, R.E., Tricarico, R., Wang, J., Enikolopov, G., Bellacosa, A., Wechsler-Reya, R.J., et al. (2013). A population of Nestin expressing progenitors in the cerebellum exhibits increased tumorigenicity. *Nat. Neurosci.* 16.
- Liu, A., and Joyner, A.L. (2001). Early anterior/posterior patterning of the midbrain and cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 869–896.
- Luca, A.D., Cerrato, V., Fucà, E., Parmigiani, E., Buffo, A., and Leto, K. (2016). Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 291–303.
- Lumsden, A., and Keynes, R. (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337, 424–428.
- Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1996). Patterning the Vertebrate Neuraxis. *Science* 274, 1109–1115.

- Lun, M.P., Monuki, E.S., and Lehtinen, M.K. (2015). Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat. Rev. Neurosci.* *16*, 445–457.
- Ma, M., Wu, W., Li, Q., Li, J., Sheng, Z., Shi, J., Zhang, M., Yang, H., Wang, Z., Sun, R., et al. (2015). N-myc is a key switch regulating the proliferation cycle of postnatal cerebellar granule cell progenitors. *Sci. Rep.* *5*.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* *17*, 9–26.
- Machold, R., and Fishell, G. (2005). Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron* *48*, 17–24.
- Machold, R.P., and Fishell, G. (2009). Math1: Waiting to Inhale. *Neuron* *64*, 293–295.
- Machold, R.P., Kittell, D.J., and Fishell, G.J. (2007). Antagonism between Notch and bone morphogenetic protein receptor signaling regulates neurogenesis in the cerebellar rhombic lip. *Neural Develop.* *2*, 5.
- Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., and Zile, M. (1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr. Biol. CB* *6*, 417–426.
- Makiyama, Y., Shoji, S., and Mizusawa, H. (1997). Hydrocephalus in the Otx2^{+/-}-Mutant Mouse. *Exp. Neurol.* *148*, 215–221.
- Mallamaci, A., Di Blas, E., Briata, P., Boncinelli, E., and Corte, G. (1996). OTX2 homeoprotein in the developing central nervous system and migratory cells of the olfactory area. *Mech. Dev.* *58*, 165–178.
- Marín, F., and Charnay, P. (2000). Hindbrain patterning: FGFs regulate Krox20 and mafB/kr expression in the otic/preotic region. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 4925–4935.
- Marino, S., Hoogervorst, D., Brandner, S., and Berns, A. (2003). Rb and p107 are required for normal cerebellar development and granule cell survival but not for Purkinje cell persistence. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 3359–3368.
- Martinez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubenstein, J.L., and Martin, G.R. (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 1189–1200.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N., and Aizawa, S. (1995). Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev.* *9*, 2646–2658.
- Maves, L., and Kimmel, C.B. (2005). Dynamic and sequential patterning of the zebrafish posterior hindbrain by retinoic acid. *Dev. Biol.* *285*, 593–605.
- McGinnis, W., and Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* *68*, 283–302.
- Merve, A., Acquati, S., Hoeck, J., Jeyapalan, J., Behrens, A., Marino, S. (2017). TMOD-01. CMyc overexpression induces choroid plexus tumours through modulation of inflammatory pathways. *Neuro-oncology.* *19*, iv48-iv48.

- Meyers, E.N., Lewandoski, M., and Martin, G.R. (1998). An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* *18*, 136–141.
- Middleton, F.A., and Strick, P.L. (1998). The cerebellum: an overview. *Trends Neurosci.* *21*, 367–369.
- Mitsumura, K., Hosoi, N., Furuya, N., and Hirai, H. (2011). Disruption of metabotropic glutamate receptor signalling is a major defect at cerebellar parallel fibre-Purkinje cell synapses in staggerer mutant mice. *J. Physiol.* *589*, 3191–3209.
- Miyazawa, K., Himi, T., Garcia, V., Yamagishi, H., Sato, S., and Ishizaki, Y. (2000). A role for p27/Kip1 in the control of cerebellar granule cell precursor proliferation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 5756–5763.
- Montgomery, J.C., Bodznick, D., and Yopak, K.E. (2012). The cerebellum and cerebellum-like structures of cartilaginous fishes. *Brain. Behav. Evol.* *80*, 152–165.
- Mugnaini, E., Diño, M.R., and Jaarsma, D. (1997). The unipolar brush cells of the mammalian cerebellum and cochlear nucleus: cytology and microcircuitry. *Prog. Brain Res.* *114*, 131–150.
- Mugnaini, E., Sekerková, G., and Martina, M. (2011). The unipolar brush cell: A remarkable neuron finally receiving deserved attention. *Brain Res. Rev.* *66*, 220–245.
- Nakamura, H., Sato, T., and Suzuki-Hirano, A. (2008). Isthmus organizer for mesencephalon and metencephalon. *Dev. Growth Differ.* *50 Suppl 1*, S113-118.
- Neumann, J.E., Swartling, F.J., and Schüller, U. (2017). Medulloblastoma: experimental models and reality. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1–11.
- Nichols, D.H., and Bruce, L.L. (2006). Migratory routes and fates of cells transcribing the *Wnt-1* gene in the murine hindbrain. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *235*, 285–300.
- Northcott, P.A., Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Eberhart, C.G., Mack, S., Bouffet, E., Clifford, S.C., Hawkins, C.E., French, P., et al. (2011). Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 1408–1414.
- Northcott, P.A., Dubuc, A.M., Pfister, S., and Taylor, M.D. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma. *Expert Rev. Neurother.* *12*, 871–884.
- Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* *100*, 71–78.
- Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* *287*, 795–801.
- Obaya, A.J., and Sedivy, J.M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *59*, 126–142.
- Oliver, T.G., Grasfeder, L.L., Carroll, A.L., Kaiser, C., Gillingham, C.L., Lin, S.M., Wickramasinghe, R., Scott, M.P., and Wechsler-Reya, R.J. (2003). Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7331–7336.

- Othman, R.T., Kimishi, I., Bradshaw, T.D., Storer, L.C.D., Korshunov, A., Pfister, S.M., Grundy, R.G., Kerr, I.D., and Coyle, B. (2014). Overcoming multiple drug resistance mechanisms in medulloblastoma. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 57.
- Palay, S.L., and Chan-Palay, V. (1976). A guide to the synaptic analysis of the neuropil. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 40, 1–16.
- Pascual, M., Abasolo, I., Meur, A.M.-L., Martínez, A., Rio, J.A.D., Wright, C.V.E., Real, F.X., and Soriano, E. (2007). Cerebellar GABAergic progenitors adopt an external granule cell-like phenotype in the absence of Ptf1a transcription factor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5193.
- Pasqualetti, M., Díaz, C., Renaud, J.-S., Rijli, F.M., and Glover, J.C. (2007). Fate-mapping the mammalian hindbrain: segmental origins of vestibular projection neurons assessed using rhombomere-specific Hoxa2 enhancer elements in the mouse embryo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 9670–9681.
- Pateras, I.S., Apostolopoulou, K., Niforou, K., Kotsinas, A., and Gorgoulis, V.G. (2009). p57KIP2: “Kip”ing the cell under control. *Mol. Cancer Res. MCR* 7, 1902–1919.
- Pei, Y., Moore, C.E., Wang, J., Tewari, A.K., Eroshkin, A., Cho, Y.-J., Witt, H., Korshunov, A., Read, T.-A., Sun, J.L., et al. (2012). An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer Cell* 21, 155–167.
- Pezuk, J.A., Valera, E.T., and Brassesco, M.S. (2016). PLK1 Inhibition: Prospective Role for the Treatment of Pediatric Tumors. *Curr. Drug Targets* 17, 1661–1672.
- Phoenix, T.N., Patmore, D.M., Boop, S., Boulos, N., Jacus, M.O., Patel, Y.T., Roussel, M.F., Finkelstein, D., Goumnerova, L., Perreault, S., et al. (2016). Medulloblastoma Genotype Dictates Blood Brain Barrier Phenotype. *Cancer Cell* 29, 508–522.
- Pogoriler, J., Millen, K., Utset, M., and Du, W. (2006). Loss of cyclin D1 impairs cerebellar development and suppresses medulloblastoma formation. *Dev. Camb. Engl.* 133, 3929–3937.
- Pons, S., Trejo, J.L., Martínez-Morales, J.R., and Martí, E. (2001). Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Dev. Camb. Engl.* 128, 1481–1492.
- Puelles, L., and Rubenstein, J.L.R. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 26, 469–476.
- Rakic, P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J. Comp. Neurol.* 141, 283–312.
- Ramon y Cajal, S. (1911). *Histologie du système nerveux de l’homme et des vertébrés*, vol. 2. Maloine Paris.
- Ramón y Cajal, S., and Azoulay, L. (1894). *Les nouvelles idées sur la structure du système nerveux : chez l’homme et chez les vertébrés* (Paris : C. Reinwald & Cie.).

- Ray, R.S., and Dymecki, S.M. (2009). Rautenlippe Redux – toward a unified view of the precerebellar rhombic lip. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 741–747.
- Redzic, Z.B., and Segal, M.B. (2004). The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *56*, 1695–1716.
- Redzic, Z.B., Preston, J.E., Duncan, J.A., Chodobski, A., and Szmydynger-Chodobska, J. (2005). The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging. *Curr. Top. Dev. Biol.* *71*, 1–52.
- Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R.R., Meur, M.L., and Ang, S.L. (1998). Sequential roles for *Otx2* in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* *125*, 845–856.
- Rijli, F.M., Gavalas, A., and Chambon, P. (1998). Segmentation and specification in the branchial region of the head: the role of the Hox selector genes. *Int. J. Dev. Biol.* *42*, 393–401.
- Robinson, G., Parker, M., Kranenburg, T.A., Lu, C., Chen, X., Ding, L., Phoenix, T.N., Hedlund, E., Wei, L., Zhu, X., et al. (2012). Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature* *488*, 43–48.
- Robinson, G.W., Orr, B.A., Wu, G., Gururangan, S., Lin, T., Qaddoumi, I., Packer, R.J., Goldman, S., Prados, M.D., Desjardins, A., et al. (2015). Vismodegib Exerts Targeted Efficacy Against Recurrent Sonic Hedgehog-Subgroup Medulloblastoma: Results From Phase II Pediatric Brain Tumor Consortium Studies PBTC-025B and PBTC-032. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 2646–2654.
- Rodriguez, C.I., and Dymecki, S.M. (2000). Origin of the Precerebellar System. *Neuron* *27*, 475–486.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., and Jessell, T.M. (1994). Floor plate and motor neuron induction by *vhh-1*, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* *76*, 761–775.
- Roussel, M.F., and Hatten, M.E. (2011). Cerebellum: Development and Medulloblastoma. *Curr. Top. Dev. Biol.* *94*, 235–282.
- Rubenstein, J.L., Martinez, S., Shimamura, K., and Puelles, L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* *266*, 578–580.
- Rudin, C.M., Hann, C.L., Laterra, J., Yauch, R.L., Callahan, C.A., Fu, L., Holcomb, T., Stinson, J., Gould, S.E., Coleman, B., et al. (2009). Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N. Engl. J. Med.* *361*, 1173–1178.
- Sandén, E., Dyberg, C., Krona, C., Gallo-Oller, G., Olsen, T.K., Enríquez Pérez, J., Wickström, M., Estekizadeh, A., Kool, M., Visse, E., et al. (2017). Establishment and characterization of an orthotopic patient-derived Group 3 medulloblastoma model for preclinical drug evaluation. *Sci. Rep.* *7*, 46366.
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., and Kondoh, H. (1999). Regulation of *Gli2* and *Gli3* activities by an amino-terminal repression domain: implication of *Gli2* and *Gli3* as primary mediators of *Shh* signaling. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 3915–3924.

- Sato, T., and Joyner, A.L. (2009). The duration of Fgf8 isthmic organizer expression is key to patterning different tectal-isthmo-cerebellum structures. *Dev. Camb. Engl.* 136, 3617–3626.
- Schmahmann, J.D., and Caplan, D. (2006). Cognition, emotion and the cerebellum. *Brain J. Neurol.* 129, 290–292.
- Schüller, U., Heine, V.M., Mao, J., Kho, A.T., Dillon, A.K., Han, Y.-G., Huillard, E., Sun, T., Ligon, A.H., Qian, Y., et al. (2008). Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Hedgehog-induced medulloblastoma. *Cancer Cell* 14, 123–134.
- Sgaier, S.K., Millet, S., Villanueva, M.P., Berenshteyn, F., Song, C., and Joyner, A.L. (2005). Morphogenetic and cellular movements that shape the mouse cerebellum; insights from genetic fate mapping. *Neuron* 45, 27–40.
- Shakhova, O., Leung, C., van Montfort, E., Berns, A., and Marino, S. (2006). Lack of Rb and p53 delays cerebellar development and predisposes to large cell anaplastic medulloblastoma through amplification of N-Myc and Ptch2. *Cancer Res.* 66, 5190–5200.
- Shih, J., and Fraser, S.E. (1996). Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage. *Dev. Camb. Engl.* 122, 1313–1322.
- Shimamura, K., Hartigan, D.J., Martinez, S., Puelles, L., and Rubenstein, J.L. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121, 3923–3933.
- Shimamura, K., Martinez, S., Puelles, L., and Rubenstein, J.L. (1997). Patterns of gene expression in the neural plate and neural tube subdivide the embryonic forebrain into transverse and longitudinal domains. *Dev. Neurosci.* 19, 88–96.
- Sieber, M.A., Storm, R., Martinez-de-la-Torre, M., Müller, T., Wende, H., Reuter, K., Vasyutina, E., and Birchmeier, C. (2007). Lbx1 acts as a selector gene in the fate determination of somatosensory and viscerosensory relay neurons in the hindbrain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 4902–4909.
- Sillitoe, R.V., and Joyner, A.L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 549–577.
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., and Boncinelli, E. (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358, 687–690.
- Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D’Apice, M.R., Nigro, V., and Boncinelli, E. (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* 12, 2735–2747.
- Simeone, A., Puelles, E., and Acampora, D. (2002). The Otx family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 409–415.
- Sirbu, I.O., Gresh, L., Barra, J., and Duester, G. (2005). Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2611–2622.

- Sotelo, C. (2004). Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog. Neurobiol.* 72, 295–339.
- Spassky, N., Han, Y.-G., Aguilar, A., Strehl, L., Besse, L., Laclef, C., Romaguera Ros, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Dev. Biol.* 317, 246–259.
- Spemann, H. (1938). *Embryonic development and induction*, (New Haven: Yale University press; London, H. Milford, Oxford University Press).
- Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A., and Krumlauf, R. (1996). Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature* 384, 630–634.
- Sturrock, R.R. (1979). A morphological study of the development of the mouse choroid plexus. *J. Anat.* 129, 777–793.
- Sultan, F., and Bower, J.M. (1998). Quantitative Golgi study of the rat cerebellar molecular layer interneurons using principal component analysis. *J. Comp. Neurol.* 393, 353–373.
- Swanson, L.W. (2000). What is the brain? *Trends Neurosci.* 23, 519–527.
- Swartling, F.J., Grimmer, M.R., Hackett, C.S., Northcott, P.A., Fan, Q.-W., Goldenberg, D.D., Lau, J., Masic, S., Nguyen, K., Yakovenko, S., et al. (2010). Pleiotropic role for MYCN in medulloblastoma. *Genes Dev.* 24, 1059–1072.
- Tabori, U., Shlien, A., Baskin, B., Levitt, S., Ray, P., Alon, N., Hawkins, C., Bouffet, E., Pienkowska, M., Lafay-Cousin, L., et al. (2010). TP53 alterations determine clinical subgroups and survival of patients with choroid plexus tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 1995–2001.
- Tanaka, S., Shaikh, I.M., Chiocca, E.A., and Saeki, Y. (2009). The Gs-linked receptor GPR3 inhibits the proliferation of cerebellar granule cells during postnatal development. *PLoS One* 4, e5922.
- Taylor, M.D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C., Mainprize, T.G., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., et al. (2002). Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat. Genet.* 31, 306–310.
- Taylor, M.D., Northcott, P.A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y.-J., Clifford, S.C., Eberhart, C.G., Parsons, D.W., Rutkowski, S., Gajjar, A., et al. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 465–472.
- Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1990). Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* 346, 847–850.
- Thompson, M.C., Fuller, C., Hogg, T.L., Dalton, J., Finkelstein, D., Lau, C.C., Chintagumpala, M., Adesina, A., Ashley, D.M., Kellie, S.J., et al. (2006). Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 1924–1931.

- Tong, Y., Merino, D., Nimmervoll, B., Gupta, K., Wang, Y.-D., Finkelstein, D., Dalton, J., Ellison, D.W., Ma, X., Zhang, J., et al. (2015). Cross-Species Genomics Identifies TAF12, NFYC, and RAD54L as Choroid Plexus Carcinoma Oncogenes. *Cancer Cell* 27, 712–727.
- Ulloa, F., and Martí, E. (2010). Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 239, 69–76.
- Vaage, S. (1969). The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). A morphological, histochemical and autoradiographical investigation. *Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch.* 41, 3–87.
- Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T.K., Hampton, G.M., and Wahl, G.M. (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell* 9, 1031–1044.
- Varjosalo, M., and Taipale, J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 22, 2454–2472.
- Vogel, M.W., Caston, J., Yuzaki, M., and Mariani, J. (2007). The Lurcher mouse: fresh insights from an old mutant. *Brain Res.* 1140, 4–18.
- Voogd, J., and Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci.* 21, 370–375.
- Wallace, V.A. (1999). Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr. Biol.* 9, 445–448.
- Wang, V.Y., and Zoghbi, H.Y. (2001). Genetic regulation of cerebellar development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 484–491.
- Wang, V.Y., Rose, M.F., and Zoghbi, H.Y. (2005). Math1 Expression Redefines the Rhombic Lip Derivatives and Reveals Novel Lineages within the Brainstem and Cerebellum. *Neuron* 48, 31–43.
- Waskiewicz, A.J., Rikhof, H.A., and Moens, C.B. (2002). Eliminating zebrafish pbx proteins reveals a hindbrain ground state. *Dev. Cell* 3, 723–733.
- Wechsler-Reya, R.J., and Scott, M.P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 103–114.
- White, J.J., and Sillitoe, R.V. (2013). Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2, 149–164.
- White, J.C., Shankar, V.N., Highland, M., Epstein, M.L., DeLuca, H.F., and Clagett-Dame, M. (1998). Defects in embryonic hindbrain development and fetal resorption resulting from vitamin A deficiency in the rat are prevented by feeding pharmacological levels of all-trans-retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13459–13464.
- Wingate, R.J. (2001). The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 82–88.

- Wingate, R.J., and Hatten, M.E. (1999). The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Development* 126, 4395–4404.
- Wingate, R.J., and Lumsden, A. (1996). Persistence of rhombomeric organisation in the postsegmental hindbrain. *Dev. Camb. Engl.* 122, 2143–2152.
- Wortham, M., Jin, G., Sun, J.L., Bigner, D.D., He, Y., and Yan, H. (2012). Aberrant Otx2 Expression Enhances Migration and Induces Ectopic Proliferation of Hindbrain Neuronal Progenitor Cells. *PLoS ONE* 7.
- Wurst, W., and Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 99–108.
- Xu, H., Yang, Y., Tang, X., Zhao, M., Liang, F., Xu, P., Hou, B., Xing, Y., Bao, X., and Fan, X. (2013). Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. *Mol. Neurobiol.* 47, 833–844.
- Yamada, M., Seto, Y., Taya, S., Owa, T., Inoue, Y.U., Inoue, T., Kawaguchi, Y., Nabeshima, Y.-I., and Hoshino, M. (2014). Specification of spatial identities of cerebellar neuron progenitors by *ptf1a* and *atoh1* for proper production of GABAergic and glutamatergic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 4786–4800.
- Yamamoto, M., McCaffery, P., and Dräger, U.C. (1996). Influence of the choroid plexus on cerebellar development: analysis of retinoic acid synthesis. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 93, 182–190.
- Yan, G.Z., and Ziff, E.B. (1997). Nerve growth factor induces transcription of the *p21* *WAF1/CIP1* and *cyclin D1* genes in PC12 cells by activating the *Sp1* transcription factor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 6122–6132.
- Yazigi-Rivard, L., Masserot, C., Lachenaud, J., Diebold-Pressac, I., Aprahamian, A., Avran, D., and Doz, F. (2008). Le médulloblastome de l'enfant. *Arch. Pédiatrie* 15, 1794–1804.
- Yun, J.-S., Rust, J.M., Ishimaru, T., and Díaz, E. (2007). A Novel Role of the Mad Family Member *Mad3* in Cerebellar Granule Neuron Precursor Proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8178–8189.
- Zeltser, L., Desplan, C., and Heintz, N. (1996). *Hoxb-13*: a new *Hox* gene in a distant region of the *HOXB* cluster maintains colinearity. *Dev. Camb. Engl.* 122, 2475–2484.
- Zervas, M., Millet, S., Ahn, S., and Joyner, A.L. (2004). Cell behaviors and genetic lineages of the mesencephalon and rhombomere 1. *Neuron* 43, 345–357.
- Zhang, P., Liégeois, N.J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J.C., Silverman, A., Harper, J.W., DePinho, R.A., and Elledge, S.J. (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking *p57KIP2* indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387, 151–158.
- Zhao, H., Ayrault, O., Zindy, F., Kim, J.-H., and Roussel, M.F. (2008). Post-transcriptional down-regulation of *Atoh1/Math1* by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development. *Genes Dev.* 22, 722–727.

Zhu, Y., Yu, T., and Rao, Y. (2004). Temporal regulation of cerebellar EGL migration through a switch in cellular responsiveness to the meninges. *Dev. Biol.* 267, 153–164.

Zindy, F., Soares, H., Herzog, K.H., Morgan, J., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (1997). Expression of INK4 inhibitors of cyclin D-dependent kinases during mouse brain development. *Cell Growth Differ.* 8, 1139.

Zindy, F., Knoepfler, P.S., Xie, S., Sherr, C.J., Eisenman, R.N., and Roussel, M.F. (2006). N-Myc and the cyclin-dependent kinase inhibitors p18Ink4c and p27Kip1 coordinately regulate cerebellar development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11579–11583.

ANNEXE

RESEARCH ARTICLE

Comprehensive Interactome of *Otx2* in the Adult Mouse Neural RetinaBruno Fant,¹ Alexander Samuel,¹ Stéphane Audebert,² Agnès Couzon,³ Salsabiel El Nagar,¹ Nathalie Billon,¹ and Thomas Lamonerie^{1*}¹Institut De Biologie Valrose, University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences, CNRS, UMR7277, Inserm, U1091, Nice F-06108, France²Centre De Recherche En Cancérologie De Marseille, INSERM U1068/Institut Paoli-Calmettes, 13273 Marseille CEDEX 9, France³AniRA-PBES, SFR BioSciences Gerland, UMS3444/US8, ENS De Lyon, Lyon 69007, France

Received 15 April 2015; Revised 28 September 2015; Accepted 29 September 2015

Summary: The *Otx2* homeodomain transcription factor exerts multiple functions in specific developmental contexts, probably through the regulation of different sets of genes. Protein partners of *Otx2* have been shown to modulate its activity. Therefore, the *Otx2* interactome may play a key role in selecting a precise target-gene repertoire, hence determining its function in a specific tissue. To address the nature of *Otx2* interactome, we generated a new recombinant *Otx2*^{CTAP-tag} mouse line, designed for protein complexes purification. We validated this mouse line by establishing the *Otx2* interactome in the adult neural retina. In this tissue, *Otx2* is thought to have overlapping function with its paralog *Crx*. Our analysis revealed that, in contrary to *Crx*, *Otx2* did not develop interactions with proteins that are known to regulate phototransduction genes but showed specific partnership with factors associated with retinal development. The relationship between *Otx2* and *Crx* in the neural retina should therefore be considered as complementarity rather than redundancy. Furthermore, study of the *Otx2* interactome revealed strong associations with RNA processing and translation machineries, suggesting unexpected roles for *Otx2* in the regulation of selected target genes all along the transcription/translation pathway. The *Otx2*^{CTAP-tag} line, therefore, appears suitable for a systematic approach to *Otx2* protein–protein interactions. *genesis* 53:685–694, 2015. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: *Otx2*; interactome; retina; TAP-tag

RESULTS AND DISCUSSION

The homeodomain transcription factor *Otx2* participates in various developmental processes such as visceral endoderm anteriorization during gastrulation, midbrain specification and differentiation and development of sensory organs (Beby and Lamonerie, 2013). In the adult eye, it is needed for photoreceptor maintenance (Beby *et al.*, 2010; Housset *et al.*, 2013). To mediate these functions, *Otx2* regulates different sets of genes, at different stages and in various tissues (Housset *et al.*, 2013; Zakin *et al.*, 2000), through distinct sets of active binding sites (Samuel *et al.*, 2014; Yasuoka *et al.*, 2014). However, little is known about how spatial- and temporal-specific sets of target genes are selected. Different *Otx2* protein partners have been found among various tissues (Masuda and Esumi, 2010; Nakano *et al.*, 2000), some of which are able to modify its binding and transactivating properties (Agoston and Schulte, 2009; Heimbucher *et al.*, 2007; Yasuoka *et al.*, 2014). For

B. Fant and A. Samuel have contributed equally to this work.

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

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

Contract grant sponsor: CNRS; Contract grant sponsor: RETINA France, Contract grant number: AAP2014TL

Published online 23 October 2015 in

Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/dvg.22903

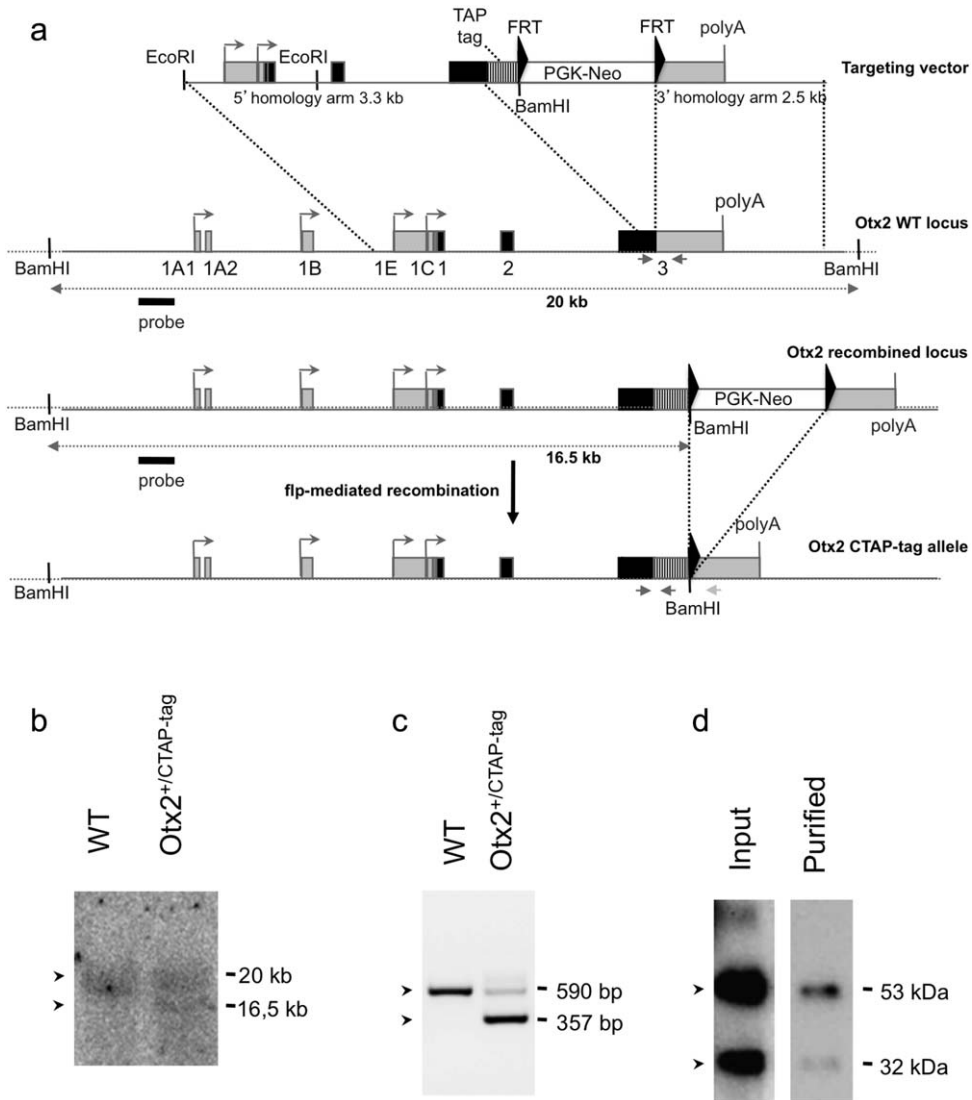


FIG. 1. The *Otx2*^{CTAP-tag} mouse line allows for efficient purification of Otx protein complexes. **(a)** Structure of targeting vector (first line), wild-type *Otx2* locus (second line), recombined locus (third line), and *Otx2*^{CTAP-tag} allele (bottom line). Boxes are *Otx2* exons with coding regions in black, and 5'- and 3'-UTR regions in grey. White box is *PGK-Neo* selection cassette, box with stripes is the TAP-tag coding sequence. 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 and size of BamH I fragments is indicated. Primers used for PCR in **(c)** are shown as arrows. Black arrows primer couples lead to amplification. Grey arrow antisense primer is too far to result in amplification. **(b)** Southern blot analysis of WT and recombinant ES cells with the probe indicated in **(a)**. **(c)** PCR amplification on WT (left) and *Otx2*^{CTAP-tag/+} (right) clones using the primers shown in **(a)**. A 590 bp amplicon is detected in WT clones, and *Otx2*^{CTAP-tag/+} clone displays the WT amplicon and a 357 bp *Otx2*^{CTAP-tag/+} amplicon. **(d)** Anti-*Otx2* Western Blot on adult retina protein input extract or on purified fraction after streptavidin-coated beads pull down. Tagged *Otx2* protein is detected at 53 kDa and wild-type *Otx2* at 32 kDa.

instance, *Otx2* interacts with the coactivator *Meis2* to specify the mesencephalon (Agoston and Schulte, 2009), whereas it binds to the corepressor *TLE4* to repress mesencephalic factors and position the isthmus 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 facilitate the identification of *Otx2* protein partners, we developed the recombinant knock-in mouse line *Otx2*^{CTAP-tag}. This line bears a sequence designed

for tandem-affinity protein purification (TAP-tag) (Burckstummer *et al.*, 2006) fused to the endogenous *Otx2* coding sequence (Fig. 1a). The TAP-tag consists in two Protein-G domains and a streptavidin-binding protein (SBP), separated by a TEV protease cleavage site; as such, it allows for one- or two-step purification process. *Otx2*^{CTAP-tag} mice thus express a tagged *Otx2* under the control of its full regulatory sequences, at its physiological level. A selectable targeting molecule (Fig. 1a) was built and introduced into ES cells. Homologous

recombination was analyzed by Southern blot (Fig. 1b) and the modified allele was confirmed by PCR (Fig. 1c) and sequencing after flip recombinase-mediated removal of the selection cassette. Mouse chimeras were generated by injection of recombinant ES cells into recipient blastocysts and used to transmit the *Otx2*^{CTAP-tag} allele. The breeding of *Otx2*^{CTAP-tag/+} mice yielded 8% *Otx2*^{CTAP-tag/CTAP-tag} homozygous offspring (8/97 animals scored), a proportion intermediate to the expected Mendelian ratio and to that observed for the *Otx2*^{Otx2-GFP} mouse line (Fossat *et al.*, 2007). Heterozygous *Otx2*^{CTAP-tag/+} animals were, however, healthy and fertile, and were further used in this study.

To validate the *Otx2*^{CTAP-tag} line, we investigated the Otx2 interactome in the adult neural retina, where its function remains to be elucidated. *Otx2* expression is maintained in all the cells of the retinal pigmented epithelium (RPE) as well as in all photoreceptors and bipolar cells of the adult neural retina (Fossat *et al.*, 2007). We first verified that expression of the tagged Otx2 protein matched the expression of endogenous Otx2 in this organ. Thanks to the two Protein G motifs present in the TAP-tag, an Alexa-488-conjugated Ig-G antibody could detect the tagged Otx2 protein only in heterozygous *Otx2*^{CTAP-tag/+} retina, where it labelled RPE, photoreceptor, and bipolar cells as expected (Fig. 2a) but not in wild-type retina (Fig. 2b). This pattern perfectly recapitulated that of the endogenous Otx2 protein (Fig. 2c,d).

Otx2 importance wildly varies in both pigmented and neural tissues; while Otx2 expression in the RPE is absolutely essential for photoreceptor survival, tissue-specific knockout of *Otx2* in the adult neural retina does not affect photoreceptor maintenance (Housset *et al.*, 2013). Analysis of Otx2 genome occupancy by ChIP-seq has revealed that, in the neural retina, Otx2 shares most of its binding repertoire with its paralog, Crx (Samuel *et al.*, 2014), suggesting functional redundancy between these two proteins. Such a redundancy is expected to translate into shared protein partners. As many Crx protein partners are described, our mouse model offered the opportunity to confirm a common activity of Crx and Otx2, as well as to address potential new function of Otx2 in the adult neural retina.

We performed protein complex purification from protein extracts of dissected *Otx2*^{CTAP-tag/+} and control wild-type adult retina. Pull-down by streptavidin-coated beads resulted in efficient purification of the tagged Otx2 protein together with endogenous Otx2 (Fig. 1d), evoking homo-dimerization abilities of the protein (Nakano *et al.*, 2000). MS/MS analyses of the purified *Otx2*^{CTAP-tag/+} and wild-type fractions were performed and we compared them for enrichment. A total of 421 proteins were identified in at least one condition. Of these, a high-confidence list was extracted by applying the following criteria. First, proteins below the false

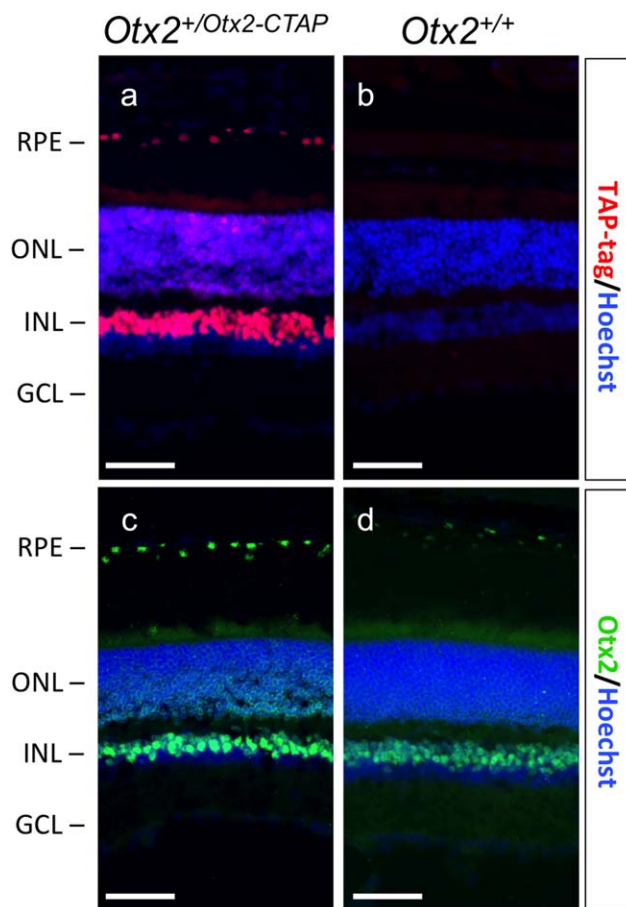


FIG. 2. Expression of Otx2-TAP-tag in the adult retina. Protein expression was determined by immunostaining P35 retinal sections of littermate (a,c) *Otx2*^{CTAP-tag/+} and (b,d) *Otx2*^{+/+} mice with Alexa-conjugated-IgG to detect the Protein G domains of the (a,b) TAP-tag or (c,d) anti-Otx2 antibody. Scale bars, 50 μ m. RPE: retinal pigment epithelium; ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer.

discovery rate threshold—less than 4 peptide-spectrum matches (PSM)—were eliminated. Second, only proteins that were enriched more than two times in the *Otx2*^{CTAP-tag/+} extracts were considered. Third, proteins not expressed in the same cell types as Otx2 (photoreceptor and bipolar cells), according to molecular signatures of mouse neural retina cell types (Siegert *et al.*, 2012), were ignored. This yielded a list of 128 high-confidence partners of Otx2 in the neural retina (Table 1). With the exception of Otx2 homo-dimerization, none of these interactions had been described up to now.

To gain insight into the biological processes associated with Otx2 interactome, we performed Gene Ontology analyses on the partner list using DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) and g:profiler (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/index.cgi>) software. In the adult retina, 34% of Otx2 partners had gene ontologies related to developmental processes (Table 2). While Otx2 is well known for its role in specification and for correct

Table 1
List of High-Confidence *Otx2* Protein Partners in the Adult Neural Retina

UNIPROT accession code	Description	#PSM TAP-tag	#PSM WT	CTAP/WT ratio	
Q8BG81	<i>Poldip3</i>	Polymerase delta-interacting protein 3	26	3	8.67
P28740	<i>Kif2a</i>	Kinesin-like protein	11	2	5.5
Q6PGN3	<i>Dclk2</i>	Serine/threonine-protein kinase	14	3	4.67
P80206	<i>Otx2</i>	Homeobox protein <i>Otx2</i>	19	4	4.75
Q5SSK3	<i>Tefm</i>	Transcription elongation factor: mitochondrial	9	2	4.5
Q8VCC9	<i>Spon1</i>	Spondin-1	20	6	3.33
P10126	<i>Eef1a1</i>	Elongation factor 1-alpha 1	38	12	3.17
Q9JLM8	<i>Dclk1</i>	Serine/threonine-protein kinase	15	4	3.75
Q5RJ54	<i>Zscan26</i>	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 26	7	2	3.5
O54751	<i>Crx</i>	Cone-rod homeobox protein	13	4	3.25
Q61656	<i>Ddx5</i>	Probable ATP-dependent RNA helicase	93	30	3.1
O70318	<i>Epb41l2</i>	Band 4.1-like protein 2	17	6	2.83
Q9Z1L4	<i>Rs1</i>	Retinoschisin	17	6	2.83
Q64523	<i>Hist2h2ac</i>	Histone H2A type 2-C	16	6	2.67
P26369	<i>U2af2</i>	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	21	8	2.63
Q99JF8	<i>Psp1</i>	PC4 and SFRS1-interacting protein	21	8	2.63
P20357	<i>Map2</i>	Microtubule-associated protein 2	45	18	2.5
Q8K2J0	<i>Plcd3</i>	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta-3	10	4	2.5
Q9Z2K1	<i>Krt16</i>	Keratin: type-I cytoskeletal 16	34	14	2.43
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
Q9JJ18	<i>Rpl38</i>	60S ribosomal protein L38	31	13	2.38
Q9D0M5	<i>Dynll2</i>	Dynein light chain 2, cytoplasmic	7	3	2.33
Q8CGP6	<i>Hist1h2ah</i>	Histone H2A type 1-H	16	7	2.29
G5E870	<i>Trip12</i>	E3 ubiquitin-protein ligase	57	25	2.28
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
P35700	<i>Prdx1</i>	Peroxiredoxin-1	11	5	2.2
Q5SUF2	<i>Luc7l3</i>	Luc7-like protein 3	11	5	2.2
Q60930	<i>Vdac2</i>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	17	8	2.13
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
Q69Z99	<i>Znf512</i>	Zinc finger protein 512	12	4	3
Q61464	<i>Znf638</i>	Zinc finger protein 638	12	4	3
Q61FX2	<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
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
Q61ME9	<i>Krt72</i>	Keratin: type-II cytoskeletal 72	13	0	N/A
Q9JJU9	<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

UNIPROT accession code	Description	#PSM TAP-tag	#PSM WT	CTAP/WT ratio	
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>Fbl1</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 1	7	0	N/A
P03930	<i>Mtstp8</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>Myl12b</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>Cas21</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>Tmpt</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>Hnrmpk</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

For each protein are shown the number of detected PSM in *Otx2*^{CTAP-tag} purified protein extracts, the number of PSM in WT extracts, and the enrichment ratio of the *Otx2*^{CTAP-tag} to WT condition when applicable. N/A— not applicable.

Table 2
List of Gene Ontologies Associated with *Otx2* Protein Partners

Gene ontology	Number of proteins 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

Number of proteins and *P*-values attributed to each category by both Gene Ontology software are indicated.

differentiation of photoreceptors (Nishida *et al.*, 2003), it is possible that *Otx2* expression and interactome in these mature and differentiated cells represent specific developmental modules that are maintained for adult functions, yet to be uncovered. In accordance with its role as a transcription factor, a large proportion of *Otx2* partners were involved in regulation of transcription (21/24%, Tables 2 and 3). However, almost no interaction could be found between *Otx2* and other transcription factors of the neural retina genetic network. For instance, *Nr2e3*, *Nrl*, or *Sp1/3/4*—which are the major regulators of photoreceptor-specific genes—were not detected here (Table 3). Yet, they all interact physically and display functional synergy with *Crx* (Haider *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2012; Lerner *et al.*, 2005). Thus, despite *Otx2* and *Crx* are evolutionary related, interact with each other (Tables 1 and 3), and share a large part of their genomic binding sites (Samuel *et al.*, 2014), they do not share the same interactome. Regulators of phototransduction genes seem to preferentially interact with *Crx*, while *Otx2* develops interactions with proteins involved in the regulation of other gene networks, or in totally different functions. Rather than the functional redundancy we expected, there seems to be a functional difference and specificity of the two homeoproteins.

Importantly, further ontological analysis of the 128 partners points to molecular mechanisms so far never documented to involve *Otx2*. First, as many as 33% of *Otx2*-interacting proteins appeared to play a role in cellular component organization and cell architecture (Table 2), which suggests highly controlled subcellular localization of this protein. *Otx2* notably develops strong interactions with intermediate filaments proteins (*Krt16*, *Krt42*, and *Krt72*) and microtubule-associated kinesin *Kif2a*, indicating the possibility of its intracellular transport. 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 proposed that *Otx2* can travel along neural pathways of the visual system (Sugiyama *et al.*, 2008) upon reception of a stim-

ulus; our study indicates that it may do so by interacting with the neurotransmitter release system.

Another exciting aspect of the *Otx2* interactome is that it also comprises proteins involved in RNA splicing and export, as well as in translation processes (Table 3). *Otx2* interacts with three splicing factors (*U2AF1*, *U2AF2*, and *SFPQ*), and its most-enriched partner, *PDIP3*, functions in mRNA export and is a potent regulator of translation efficiency through recruitment of the *S6K1* kinase (Folco *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2008). *Otx2* also interacts with several other actors of the RNA export machinery, such as *NXF1* and *TREX* complex member *SARNP/CIP29*. Finally, *Otx2* binding to *PABPC1* and *EEF1A1*, as well as to several ribosomal proteins (Table 3), suggests that it may be involved in the early steps of translation regulation. It had already been proposed that *Otx2* could play a role in regulating translation in the axons of the olfactory systems (Nedelec *et al.*, 2004). We propose here a larger model in which *Otx2* might accompany the expression of certain target genes all along the processes of transcription, translation, and subcellular localization, and have a regulatory effect at every step of the way (Fig. 3). More than a transcription factor, *Otx2* might therefore act as a tight regulator of the protein output resulting from transcriptional modulation of specific genes. Further studies will aim at identifying which target mRNAs are 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 homeoprotein. 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-specific genes in this cell type may be mainly attributed to *Crx*. The neuroretinal interactome of *Otx2* also allowed us to highlight new potential functions of the protein, which may regulate the gene-to-protein yield at several points of the transcriptional and translational process. The *Otx2*^{CTAP-tag/+} mouse line will therefore be an invaluable tool to further decipher *Otx2* function in mouse development and in all different tissues where it is expressed, as it will help us understand how the cellular context can modulate its activity.

Table 3
List of *Otx2* Protein Partners Associated with Gene Expression-Related Ontologies

Accession		Description
<i>Regulation of transcription</i>		
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>Hnrnpk</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
Q9JJK2	<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>Tmpo</i>	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/delta/epsilon/gamma
G5E870	<i>Trip12</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
<i>RNA processing and export</i>		
Q6A068	<i>Cdc5l</i>	Cell division cycle 5-like protein
Q69ZA1	<i>Cdk13</i>	Cyclin-dependent kinase 13
P61979	<i>Hnrnpk</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>Sarnp</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
<i>Translation regulation</i>		
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
Q9JJJ8	<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

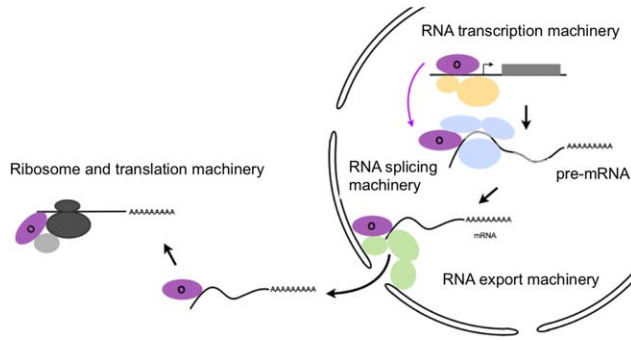


FIG. 3. A model for Otx2 activity based on its protein partners. Given that Otx2 interacts with proteins implicated in transcription regulation, mRNA splicing and export, as well as in translation processes, the Otx2 protein might accompany selected target genes from transcription to translation and tightly regulate each step.

MATERIALS AND METHODS

Mouse Breeding and Phenotyping

Mice were handled according to the European Communities Council Directive, as well as the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. TL received the authorization to experiment #A 06-261 from the Direction Départementale de la protection des Populations des Alpes-Maritimes, France. Animals were housed with a 12-h light/dark cycle (7 A.M.–7 P.M.) and allowed access to food and water *ad libitum*. The mouse line was maintained in an 129/sv background. Genotypes were determined by PCR analysis of digit DNA using the following primers (30 cycles, annealing temperature: 60°C):

Otx2 forward primer: 5'-GCTGGCTCAACTTCCTACT-3'

Otx2 reverse primer: 5'-TTGGTTGCATGTCGCTA-GAA-3'

CTAP-tag reverse primer: 5'-CTTCTCGTCCATGA-GATCCT-3'

Wild-type and CTAP-tag alleles yield 590 bp and 357 bp PCR products, respectively.

Generation of *Otx2*^{CTAP-Tag} Line

To generate the targeting vector, a five-step cloning strategy was adopted. First, a fragment containing the coding sequence of the TAP-tag was generated by PCR using plasmid pCeMM-CTAP(SG) (Burckstummer *et al.*, 2006) as a template and the forward 5'-ACGTGCTAGCGGTGGCGAGCAGAAGCTTATC-3' and the reverse 5'-ACGTGGATCCCTATTCAGTGACAGT-3' primers. This PCR product was digested with *NheI*/*BamHI* and inserted downstream of a mutated-stop codon *Otx2* cDNA coding sequence in the pOtx2-GFP

plasmid digested with *SpeI*/*BamHI* (Chatelain *et al.*, 2006), substituting the GFP fragment. This sequence was then digested with *BamHI*/*EcoRI* to subclone the 2.5 kb 3'-recombination arm, previously used to generate the *Otx2*^{Otx2-GFP} line (Fossat *et al.*, 2007). The *BglII*/*BamHI* PGK-neo selection cassette flanked by *FRT* sites was inserted at the *BamHI* restriction site immediately downstream from the TAP-tag. Finally, the 3.3 kb 5'-recombination arm was inserted as two consecutive genomic fragments (3 kb *EcoRI*/*AatII* and 2.5 kb *EcoRI*/*EcoRI*, respectively). The targeting vector was electroporated into ES cells, and homologous recombinant clones were selected for 8 days in 300 µg/mL G418. Gene targeting was confirmed by PCR using 5'-GGTACCGAGCTCGAATTGA-3' and 5'-ACTAGGAGTGGCCATCAGA-3' as forward and reverse primers, respectively, and Southern blot (probe: 0.573 kb *XbaI*/*NheI* genomic fragment located 5' of exon 1A1). The PGK-neo selection cassette was removed in one positive clone by transfection of a plasmid expressing the flip recombinase, and removal was assessed by PCR using the genotyping primers and sequencing. Mice were produced by standard blastocyst injection procedure. The line will be available to the research community upon acceptance of the manuscript.

Immunocytochemistry

Wild-type and *Otx2*^{CTAP-tag/+} littermate mice aged of 35 days were perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) under deep anesthesia. Eyes were fixed for 30 min in 4% PFA and cornea and lens were removed. Eyecups were rinsed twice (30 min) in PBS, protected in PBS-sucrose (10–30%), and frozen in Tissue-Tek OCT at –80°C. Sections (10 µm) were mounted onto SuperFrost+ slides (Fisher Scientific, Atlanta, GA). For TAP-tag detection, sections were permeabilized in PBS with 0.1% Triton-X100, 2% gelatin, 2% DMSO, and 0.5 M NaCl. For Otx2 detection, sections were permeabilized 1 h in PBST (PBS with 0.2% Gelatin and 0.1% Triton X-100) containing 5% donkey serum and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies diluted in PBST with 2% donkey serum. After rinsing, slides were incubated for 1 h at 20°C with the secondary antibodies. Specimens were washed twice for 15 min in PBS, cover-slipped with Vectashield, observed under fluorescent LSM 510 meta microscope (Carl Zeiss, Germany), and images were analyzed using LSM Image browser software version 4.2 (Carl Zeiss, GmbH). Primary antibodies were used at the following concentration: Goat anti-Otx2 (1/1,000) (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Secondary antibodies (1/1,000): Donkey anti-Rabbit Alexa Fluor 488 and Donkey anti-Rabbit Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Carlsbad CA, USA).

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 (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

As tandem mass-spectrometry (MS/MS) sensitivity improves, we could use a single purification step. Protein purification was carried out following Bailey *et al.*'s (2012) protocol adapted for one-step purification. Protein extracts were incubated overnight at 4°C with 20 µL washed Ultralink Immobilized Streptavidin Beads (Pierce). Beads were pelleted at 1,200g 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 1 mM D-biotin and incubation for overnight at 4°C. Beads were pelleted again and the supernatant was collected. The purification quality was assessed by Western blot analysis (anti-Otx2, 1/500, R&D Systems) and by silver nitrate staining.

MS/MS Analysis

Reduced and alkylated purified protein complexes were trypsinated in 12.5 ng/mL trypsin for overnight at 37°C and dried with SpeedVac. Dried pellets were suspended in 1/6 saturated HCCA in 50% CH₃CN, 50% H₂O, and 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).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the PBES facility in Lyon for generation of chimeric mice and for expert handling of the mouse line. We are indebted to Pierre Godement for preparation and fixation of eyes. 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.

LITERATURE CITED

Agoston Z, Schulte D. 2009. Meis2 competes with the Groucho co-repressor Tle4 for binding to Otx2 and specifies tectal fate without induction of a secondary midbrain-hindbrain boundary organizer. *Development* 136:3311-3322.

Bailey D, Urena L, Thorne L, Goodfellow I. 2012. Identification of protein interacting partners using tandem affinity purification. *J Vis Exp* 2012; doi: 10.3791/3643.

Beby F, Housset M, Fossat N, Le Greneur C, Flamant F, Godement P, Lamonerie T. 2010. Otx2 gene deletion in adult mouse retina induces rapid RPE dystrophy and slow photoreceptor degeneration. *PLoS ONE* 5: e11673.

Beby F, Lamonerie T. 2013. The homeobox gene Otx2 in development and disease. *Exp Eye Res* 111:9-16.

Burckstummer T, Bennett KL, Preradovic A, Schutze G, Hantschel O, Superti-Furga G, Bauch A. 2006. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Met* 3:1013-1019.

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

Folco EG, Lee CS, Dufu K, Yamazaki T, Reed R. 2012. The proteins PDIP3 and ZC11A associate with the human TREX complex in an ATP-dependent manner and function in mRNA export. *PLoS One* 7:e43804.

Fossat N, Le Greneur C, Beby F, Vincent S, Godement P, Chatelain G, Lamonerie T. 2007. A new GFP-tagged line reveals unexpected Otx2 protein localization in retinal photoreceptors. *BMC Dev Biol* 7:122. doi: 10.1186/1471-213X-7-122.

Haider NB, Mollema N, Gaule M, Yuan Y, Sachs AJ, Nystuen AM, Naggert JK, Nishina PM. 2009. Nr2e3-directed transcriptional regulation of genes involved in photoreceptor development and cell-type specific phototransduction. *Exp Eye Res* 89:365-372.

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

Heimbucher T, Murko C, Bajoghli B, Aghaallaei N, Huber A, Stebeegg R, Eberhard D, Fink M, Simeone A, Czerny T. 2007. Gbx2 and Otx2 interact with the WD40 domain of Groucho/Tle corepressors. *Mol Cell Biol* 27:340-351.

Housset M, Samuel A, Ettaiche M, Bemelmans AP, Beby F, Billon N, Lamonerie T. 2013. Loss of Otx2 in the adult retina disrupts retinal pigment epithelium function, causing photoreceptor degeneration. *J Neurosci* 33:9890-9904.

Lerner LE, Peng GH, Gribanova YE, Chen S, Farber DB. 2005. Sp4 is expressed in retinal neurons, activates transcription of photoreceptor-specific genes, and synergizes with Crx. *J Biol Chem* 280:20642-20650.

Ma XM, Yoon SO, Richardson CJ, Julich K, Blenis J. 2008. SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/

- S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell* 133:303–313.
- Masuda T, Esumi N. 2010. SOX9, through interaction with microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and OTX2, regulates BEST1 expression in the retinal pigment epithelium. *J Biol Chem* 285: 26933–26944.
- Nakano T, Murata T, Matsuo I, Aizawa S. 2000. OTX2 directly interacts with LIM1 and HNF-3beta. *Biochem Biophys Res Commun* 267:64–70.
- Nedelec S, Foucher I, Brunet I, Bouillot C, Prochiantz A, Trembleau A. 2004. Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10815–10820.
- Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, Furukawa T. 2003. Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 6:1255–1263.
- Reim K, Wegmeyer H, Brandstatter JH, Xue M, Rosenmund C, Dresbach T, Hofmann K, Brose N. 2005. Structurally and functionally unique complexes at retinal ribbon synapses. *J Cell Biol* 169: 669–680.
- Samuel A, Housset M, Fant B, Lamonerie T. 2014. Otx2 ChIP-seq reveals unique and redundant functions in the mature mouse retina. *PLoS ONE*, in press.
- Siegert S, Cabuy E, Scherf BG, Kohler H, Panda S, Le YZ, Fehling HJ, Gaidatzis D, Stadler MB, Roska B. 2012. Transcriptional code and disease map for adult retinal cell types. *Nat Neurosci* 15:487–495; S481–S482.
- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK. 2008. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* 134:508–520.
- Yasuoka Y, Suzuki Y, Takahashi S, Someya H, Sudou N, Haramoto Y, Cho KW, Asashima M, Sugano S, Taira M. 2014. Occupancy of tissue-specific cis-regulatory modules by Otx2 and TLE/Groucho for embryonic head specification. *Nat Commun* 5:4322. doi: 10.1038/ncomms5322.
- Zakin L, Reversade B, Virlon B, Rusniok C, Glaser P, Elalouf JM, Brulet P. 2000. Gene expression profiles in normal and Otx2^{-/-} early gastrulating mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14388–14393.