

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 Nathalie Billon Olivier Chinot Béatrice Durand Michèle Studer

DR2, CNRS CR1, CNRS Professeur, Université Aix-Marseille CR1, CNRS Thomas Lamonerie Professeur, Université Côte d'Azur DR1, INSERM

Rapporteur Co-directeur de thèse Examinateur Rapporteur Directeur de thèse 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 master1 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 membre 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 sure, 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, contribuer 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 vielles 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.

SOMMAIRE

TAB	LE D	DES FIGURES	6	
TABI	LE D	DES ABRÉVIATIONS	7	
DÉCI	IN CT		0	
RESU	JME	/	8	
SUM	MAF	RY	9	
ілтр	וחסי	UCTION	10	
T		rhomhangánhala	10	
1.	Le	Organization minorine de certière nomeneur control	12	
	1.1.	Organisation primaire du système herveux central	12	
	1.2.	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			
		II.1.1. Morphologie	27	
		II.1.2. Histologie	29	
		II.1.2.a. La couche moléculaire		
		II.1.2.b. La monocouche des cellules de Purkinje		
		II.1.2.c. La couche granulaire interne		
		II.1.2.d. Les noyaux cérébelleux profonds		
		II.1.3. Connectivité		
	II.2. Le développement du cervelet			
		II.2.1. Mise en place du territoire présomptif du cervelet		
		II.2.1.a. Limite antérieure		
		II.2.1.b. Limite postérieure		
		II.2.2. Les zones germinatives	35	
		II.2.2.a. La zone ventriculaire	35	
		II.2.2.b. La lèvre rhombique		
	II.3	. Les précurseurs des cellules granulaires	38	
		II.3.1. La couche de cellules granulaires externes		
		II.3.2. La prolifération des GCP		
		II.3.2.a. Les facteurs extrinsèques contrôlant la prolifération des GCP		
		II.3.2.b. Facteurs intrinsèques contrôlant la prolifération des GCP		
		II.3.3. De l'EGL à l'IGL		
		II.3.3.a. La différenciation des GCP		
		II.3.3.b. La migration radiale		

III.	Les médulloblastomes	5	48			
	III.1. Classification des MB					
	III.1.1. Classificati	on histologique	48			
	III.1.2. Classificati	on moléculaire	50			
	III.1.2.a. Le gro	upe WNT	51			
	III.1.2.b. Le gro	upe SHH	53			
	III.1.2.c. Le gro	ире 3	54			
	III.1.2.d. Le gro	upe 4	55			
	III.2. Les modèles mur	ins pour comprendre les MB	56			
	III.2.1. Modèles de	e transplantation	56			
	III.2.2. Modèles de	souris génétiquement modifiées	57			
IV.	Le facteur de transcri	ption Otx2	62			
	IV.1. Biologie molécul	aire du gène Otx2	62			
	IV.1.1. La famille	Otx2	62			
	IV.1.2. Du gène à l	a protéine	63			
	IV.2. Otx2, un facteur o	clé dans le développement	65			
	IV.2.1. Mise en pla	ace 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 rhor	nbencéphale	67			
	IV.3.1. Otx2 dans	les plexus choroïdes	67			
	IV.3.2. Otx2 dans l	le développement normal et tumoral du cervelet	68			
	IV.4. Un modèle murin	pour étudier les fonctions d'Otx2	71			
OBJE	TIFS		72			
ODJE						
RESUI	LTATS ET DISCUSSI	ONS	74			
Pro	jet 1 : Étude de la fonc	tion d'Otx2 dans la prolifération normale et tumorale d	es			
prée	curseurs des cellules gr	anulaires du cervelet	75			
_	Diamaian		06			
			90			
	1) Les precurseurs d	les cellules granulaires presents dans le cervelet pendant la period	le			
	périnatale forment u	ne population heterogene	96			
	2) Otx2 contrôle la j	proliferation des GCP en favorisant la transition G1-S du cycle	07			
	cellulaire, et indéper	adamment de la voie de signalisation Shh				
	3) Otx2, dispensable	pour la formation mais indispensable pour le maintien des MB S	snh. 99			
	4) Otx2, une cible th	ierapeutique	102			
Pro	jet 2 : Etude de l'antag	gonisme Otx2-Hoxa2 dans la compétence de la lèvre				
rho	mbique à produire des	dérivés prolifératifs et sensibles à la tumorigenèse Shh-				
dén	endante	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	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'ho souris et leur ancêtre	mme, la 17
Figure 3: Expression des gènes <i>Hox</i> dans le rhombencéphale	19
Figure 4: Spécification moléculaire des neurones du rhombencéphale selo dorso-ventral	on l'axe 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 mitogène Shh	e au 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'Otx2 conduit à un phénotype "sans tête" dans les embryons de souris	à E8,5 63
Figure 18: Organisation et expression du locus Otx2 chez la souris	65
Figure 19: Otx2 dans le développement normal et tumoral du cervelet	70
Figure 20: L'expression de MycT58A dans les cellules Otx2 positives n'in la formation de médulloblastome	duit pas 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 organiseur 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 Shhdépendants 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 Hedgegog (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.

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'Oxt2 dans la spécification des dérivés de la lèvre 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.

11

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 <u>c</u>entral <u>n</u>ervous <u>system</u>) 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, myélencéphale (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 myélencéphale. Adapté de Honoré et Hemmati-Brivanlou (1997), de Gamill et Bronner-Fraser (2003) et d'après Purves, Neuroscience, 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 constrictions du neuroépithélium. 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 glossopharyngien (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, Neuroscience, 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 Hoxal, 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. Hoxal est donc à la fois important pour initier la régionalisation du rhombencéphale et pour définir l'identité des rhombomères. Dans les mutants Hoxal, 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 complétement 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 Waskiewisz et collègues a montré que l'inhibition de l'expression des gènes *Pbx2* et *lzr/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 dorsoventral

(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 <u>c</u>horoid <u>plexus</u>). Ces derniers sont des tissus spécialisés dans la production du fluide cérébro-spinal (CSF pour <u>c</u>erebro-<u>s</u>pinal <u>f</u>luid). 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 diencéphale 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 <u>upper rhombic lip</u>) 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 <u>c</u>ell <u>p</u>recursors), 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 rhombencéphale correspond à la lèvre rhombique (RL) est 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 précérébelleux 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 différentier 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 rhombencéphale 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 rhombencéphale 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 model 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 médiolatéral, il se subdivise en vermis, paravermis, hémisphères, paraflocculi flocculi. et **(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 flocculonodulaire 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 supplémentaire secondaire 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 <u>m</u>olecular <u>l</u>ayer), la monocouche des cellules de Purkinje (PL pour <u>P</u>urkinje <u>l</u>ayer) et la couche granulaire interne (IGL pour <u>i</u>nternal granular <u>l</u>ayer) (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 20µm, 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 5µm, 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 <u>u</u>nipolar <u>b</u>rush <u>c</u>ell) (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 innerver 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 précérébelleux 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 différentes 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 moussues 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 organiseur isthmique (IsO pour isthmus organizer) (Nakamura et al., 2008). Le principal médiateur de l'IsO est la molécule secrétée 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* entraine 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).

34



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 : organiseur 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 <u>v</u>entricular <u>z</u>one) 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

36

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 temporal 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).

37

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 variation, 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 Nusslein-Volhard et Wieshaus 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 Smoothened (Smo). En présence du ligand Shh, l'inhibition de Smo par Ptch1 dans le cil primaire, qui concentre les principaux composant 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 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

40

effet chez les mutants *lurcher* (gain de fonction de GluR $\Delta 2$), *staggerer* (perte de la fonction de RORalpha) et *reeler* (déficience 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 entraine 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).

41

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 cyclindependent 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; Obaya 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-dependent 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 gène 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

45

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, dominent 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 est 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 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 desmoplasiques/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.



classification Figure 13: La histologiques de médulloblastomes (A) et (B) Images par résonnance médicale montrant un médulloblastomes et des métastases (flèches blanches). (Cdifférents F) Les quatre types histologiques médulloblastomes de 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 (Massachussetts, 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 ß-caténine, est phosphorylée par la glycogène synthétase kinase 3β (GSK3β) et la caséine kinase 1α (CK1α) 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 ß-caténine du complexe, empêchant ainsi sa phosphorylation et sa dégradation. La ß-caténine peut alors être transloquée dans le noyau pour s'associer aux facteurs de transcription TCF/LEF (T-cell factor/lynphoid 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 ßcaténine, 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 $4^{\text{ème}}$ 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, Gilbson 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 ß-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 ß-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 recombinase 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., 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 monter 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 souriceaux (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 immunodéficiences. 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 dérivaient initiallement 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 <u>p</u>atient <u>d</u>erived <u>x</u>enograft), 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 ß-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 développement 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 ß-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 rétrotranscrits 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.



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 en 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 Finkelestein 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 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 et 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'activé 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 entraine un phénotype « sanstête » 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 nonneurales 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 différent 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 messager) 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 coté 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 feuillets 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 diencéphale 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 diencéphale 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 entraine 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 dont 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

68

la différenciation (Bunt et al., 2012; Kaur et al., 2015). De plus, une étude publiée par Adamson et collègues en 2010, montre que la xénogreffe de cellules surexprimant OTX2 dans des souris immunodéficiences 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 atrophié 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.

71
OBJECTIFS

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

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 <u>Salsabiel El Nagar</u>, 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 Biologia Molecular Severo Ochoa, Universidad Autonoma 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, Shhindependent 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 Smoothened (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 medulloblatomas, 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*.

<u>Results</u>

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 Smoothened (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 overproliferation 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 Smoothened 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 Shhdependent 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 loose their responsiveness to Shh when they differentiate (around the third postnatal week in mice). It is conceivable that this lost of Shh responsiveness also occurs in the tumour, abeit 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 overexpression 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 medulloblatoma 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 medulloblatoma, 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}^(CTsKO - CTcontrol) / 1+E_{gene}^(CTsKO - CTcontrol) / 1+E_{gene}^(CTsKO - CTcontrol) 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 μ m (± 300 μ m 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, Wl, 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.

Stastistical 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.natu	ure.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 cellcycle 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. Medulloblastomics: 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, Zadravec-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-contextdependent 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 nonproliferative 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 ± 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 µm. Data are represented as mean ± 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 ± 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 FxCycleTM 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 ± sem. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 5: Effect of Otx2 ablation on Shh medulloblastoma formation and their maintenance. $Otx2^{+/+}$ Otx2^{CreERT2/+};R26^{SmoM2/SmoM2} (WT), (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 µm (A) and 1000 µm (E). Data are displayed as mean ± 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.



RESULTATS ET DISCUSSIONS Projet 1

Α в P1 P3 P5 Otx2^{CreERT2/flox} Control sKO Control Otx2^{CreERT2/+} sKO Control sKO Otx2 GAPDH CreERT2 CreERT2 с Otx2 Otx2 Hoechs Control Tamoxifen injection at P1 t P3 Lobule X CreERT2 CreERT2 Otx2 sKO sKO Control D Е Control 30 P3 * ** EdU+ / Hoechst+ (%) Control 20 125, 1923 (B) P3 Lobule X -10 0 sko × _* Ш ш VIII IX I P5 30 * ** EdU+ / Hoechst+ (%) 20 10

0

I

II

ш

VIII

IX

х

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.



Genes	Primers	Sequences				
	Gen	otyping Primers				
	Foward	CCAAATCTACCCACCAAGGA				
Utx2-CreER12	Reverse	GACCGACGATGAAGCATGTT				
Otry? Flow	Foward	GAACAAACGTCCCTGTGGTG				
Otx2-Flox	Reverse	AGGAGCCACAATTCCCATC				
	Foward	GCTGGCTCAACTTCCTACT				
UIX2-GFP	Reverse	ACCCTCTCCACTGACAGAA				
Doca26 Stop flow	Foward	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT				
Rosazo-stop nox	Reverse	GCGAAGAGTTTGTCCTCAACC				
	Real t	time qPCR Primers				
01.2	Foward	CCAAATCTACCCACCAAGGA				
Utx2	Reverse	AGAGCTTCCAGAACGTCGAG				
(d)2d (10)	Foward	AATGTGACCCAAGGCCACT				
Cakn2a (p19)	Reverse	TTTCCTCTTTTGTTGACAAGTAACC				
C dlm 1h (m 27)	Foward	GAGCAGTGTCCAGGGATGAG				
	Reverse	TCTGTTCTGTTGGCCCTTTT				
Collim 1 a (m E 7)	Foward	CGCAAACGTCTGAGATGAGT				
Cuknic (p57)	Reverse	CCCAGAGTTCTTCCATCGTC				
Chh	Foward	CCAACGTAGCCGAGAAGACC				
5111	Reverse	CTTGTCTTTGCACCTCTGAGTC				
Datah 2	Foward	CCTAGAACAGCTCTGGGTAGAAGT				
Patchz	Reverse	CCCAGCTTCTCCTTGGTGTA				
<u></u>	Foward	CAGGGTCCCAGGGTTATGG				
GILL	Reverse	AGGTCGAGGCTGGCATCAG				
	Foward	TCCCCGACCCAGGGAAAAA				
GIIZ	Reverse	CCCTCCTGGTGTCTCATGTC				
Cli3	Foward	AGAGTGCCTCCAGGTGAAGA				
UIIJ	Reverse	GTTGCTGATGGGGGGACTGTT				
Boc	Foward	GCTACCAGTGCCATACCTCC				
DUC	Reverse	CGGGCCTCTCATATACACGG				
Mucn (Nmuc)	Foward	TGTGTCTGTTCCAGCTACTGC				
	Reverse	CTTCCTCCTCGTCATCCTCA				
Сарин	Foward	CATGGCCTTCCGTGTTCCTA				
	Reverse	TGCCTGCTTCACCACCTTCT				

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

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 Cdki impliqués dans la transition G1-S. Ces résultats sont extrêmement intéressants car ils étayent 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, Otx2dépendante, 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'invalidation 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'invalidation 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'invalidation d'Otx2 grâce à la souris *Otx2^{CreERT2/4}; 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 Shhindépendants 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 antéropostérieur : 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 précérébelleuse ne génère que des dérivés post-mitotiques, incompétents 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 <u>Salsabiel El Nagar</u>, 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 : le 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 (Tp53flox), 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 tumorigenèse.

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 $Otx2^{CreERT2/+}$; $Tp53^{FVF}$; $ROSA26^{MycT58A/MycT58A}$ 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 <u>Salsabiel El Nagar</u>, 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 theses 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 aged-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 tumourigenesis 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}; 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 diplayed 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 $Otx2^{CreER/+}$; $ROSA^{MYCT58A}$; $Tp53^{fl/fl}$ 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 immunecompromised 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 Smoothened (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 GSK3ß 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 phosphrylation 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 tumourigenesis 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 tumourigenesis, 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 tumourigenesis. 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 tumourigenesis (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-Imx1a (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-2phenylindole (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 pvalues 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 log2 FC>=2 and an adjusted pvalue<= 0,05s. 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).

Stastistical 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^{YEP} 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 μm.

Figure 2: Histopathological analysis of choroid plexus carcinomas in Otx2^{creER/+}; Rosa^{MYCT58A/MycT58A}; **Tp53**^{fl/fl} mice. (A) Kaplan-Meyer 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 ventricules. 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 ventricule 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 μm (C, 5X), 100 μm (C, 40X) and 25 μm (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 sagital 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 µ2. 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 (log2 FC >=2 or <=2; and p-adjusted value < 0.05). Expression values and log2 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 drown 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 log2 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







Α в EdU EdU-Hoechst Hoechst 10 No Tamoxifen No Tamoxifen Tamoxifen EdU+/Hoechst+ % Lat ventricle 5 Tamoxifen т 0 Lateral Ventricule III Ventricule IV Ventricule

Figure 3 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(Il	og2(FC) tumor vs C(P-)	/alue tumor vs (Ad	justed p-value tumor vs Cont	trol
ENSMUSG0000020534	Shmt1	193,1196197	1940,08513	3,261759089	1,3896E-123	4,281E-119	
ENSMUSG0000039977	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	
	Digap5	109,2380392	961,152474	3,044521141	4,01716E-80	3,09402E-76	
ENSMUSG0000019942	Sotle3	398 3133106	4455,02957	2,123443793	1,00229E-70	3 5657E-69	
ENSMUSG0000039092	Cdc20b	170 1020281	828 511206	2 246532069	1 93229F-72	8 50427E-69	
ENSMUSG00000020649	Rrm2	273.3130995	2123.87631	2,868398123	2.40516E-67	9.26227E-64	
ENSMUSG0000020080	Hkdc1	1051,459827	86,9909566	-3,437243326	6,87947E-65	2,35492E-61	
ENSMUSG0000028600	Podn	2038,975418	372,860041	-2,398599815	2,89686E-62	8,92464E-59	
ENSMUSG0000021175	Cdca7l	91,06414021	812,638437	3,035249207	6,09067E-62	1,70583E-58	
ENSMUSG0000028718	Stil	185,2609546	809,202205	2,086993106	8,18212E-61	2,10062E-57	
ENSMUSG0000079465	Col4a3	5751,530828	919,914849	-2,574707343	1,80002E-60	4,26577E-57	
ENSMUSG0000037572	Wdhd1	204,0071377	1079,12008	2,345768576	5,56688E-58	1,22503E-54	
ENSMUSG0000058523	Mup5	2,267373777	465,844848	5,9981106	8,34815E-58	1,55221E-54	
ENSIMUSG00000057541	Pus/	450,/32/8/9	1880,42401	2,023880925	1,2987E-57	2,22281E-54	
ENSIVIUSG00000041431	CCDD1	136,4202539	17 187722	2,470108621	4,70582E-56	7,03030E-53	
ENSMUSG0000072845	Col4a4	5621 296973	910 793167	-4,521201703	1 73278E-55	2 54206E-52	
ENSMUSG0000023505	Cdca3	273.1449097	1575.86888	2,458223732	3.8467E-55	5.38678F-52	
ENSMUSG0000030495	Slc7a10	8215.341805	1550,55477	-2.34780058	7.0722E-55	9.47306E-52	
ENSMUSG0000020185	E2f7	302,7098283	1372,33033	2,137538572	1,00762E-53	1,19395E-50	
ENSMUSG0000074578	Zfas1	951,5053272	6406,74409	2,661266473	9,41948E-53	1,03641E-49	
ENSMUSG0000016942	Tmprss6	133,8389387	1282,15885	3,113646707	1,58179E-52	1,68041E-49	
ENSMUSG0000026605	Cenpf	376,9288485	1952,20862	2,311605092	2,84896E-52	2,92569E-49	
ENSMUSG0000037474	Dtl	185,7437011	1350,25953	2,754875154	1,00516E-50	9,98931E-48	
ENSMUSG0000051728	4930563D23Rik	330,3241651	30,3638069	-3,262544885	8,77475E-50	8,44789E-47	
ENSMUSG0000002068	Ccne1	91,04063028	492,794535	2,35973687	3,34716E-48	3,03292E-45	
ENSMUSG0000031004	Mki67	998,8776702	5737,30683	2,442755898	8,96822E-47	7,46738E-44	
	Ccnb2	185,2849776	1155,60303	2,546388376	3,12559E-46	2,46905E-43	
	2410006U16Bik	139,5934135	2166 61744	2,08277109	3,50705E-40	2,74734E-43	
ENSMUSG0000080841	Lar5	76 00390133	414 259805	2,087944952	9 73665E-45	2,39790L-42 6 97597F-42	
ENSMUSG0000032400	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	
ENSMUSG0000027496	Aurka	118,5433089	740,615474	2,537801164	3,32183E-42	2,04678E-39	
ENSMUSG0000028678	Kif2c	112,6582681	603,572345	2,338473495	3,28093E-42	2,04678E-39	
ENSMUSG0000039748	Exo1	50,69191641	370,112059	2,733233414	7,82053E-42	4,54594E-39	
ENSMUSG0000020330	Hmmr	121,6219745	808,259644	2,618191728	1,06725E-41	5,97817E-39	
ENSMUSG0000039004	Bmp6	4927,089885	955,001208	-2,294306853	1,06494E-41	5,97817E-39	
ENSMUSG0000024552	Slc14a2	113,7510879	1990,05768	3,749810278	1,06134E-40	5,63757E-38	
ENSMUSG0000025068	Gsto1	472,9311916	2687,99823	2,418829998	3,67179E-40	1,88534E-37	
	Pthin Cm26517	144,6185979	810,191433	2,391284709	6,65222E-38	3,15295E-35 8,20601E,2E	
ENSIVE SG00000097159	Asps	9,100034743 146 8870493	142,074054 048 030508	2 565670778	1,79000E-57 1 22755E-36	5,59001E-55	
ENSMUSG0000025752	Cenne	181 075212	785 151577	2,505075778	2 97781F-36	1 29212F-33	
ENSMUSG0000091402	Rd3l	464.1879192	97.4083775	-2.175674614	1.11136E-35	4.62688E-33	
ENSMUSG0000070645	Ren1	86,10744469	471,578366	2,364095044	5,17168E-35	2,09644E-32	
ENSMUSG0000019768	Esr1	15,42861768	228,884046	3,491022711	7,90012E-35	3,16087E-32	
ENSMUSG0000027654	Fam83d	106,5385238	832,248757	2,790007494	8,12529E-35	3,20928E-32	
ENSMUSG0000028702	Rad54l	99,92121001	582,4677	2,429320467	2,17971E-34	8,39405E-32	
ENSMUSG0000040658	Dnph1	84,8204349	530,143848	2,512716559	2,04697E-33	7,24864E-31	
ENSMUSG0000092090	Gm3294	894,8763287	172,530934	-2,282736181	2,79691E-33	9,68172E-31	
ENSMUSG00000031562	Detd	127,6110012	820,290696	2,545220895	3,31307E-33	1,1341E-30	
	Kitzua Emol	247,6778371	1295,41856	2,289768403	5,48959E-33	1,8383E-30	
ENSIVE SG00000039033	Cdc25c	30,37704303	250,507451	2,519261519	0,12/1E-55 1 20128E-32	2,02972E-30	
ENSMUSG00000044201	Knstrn	166.7139951	1061.83685	2,534307304	1,20120E 32	4,3113F-30	
ENSMUSG0000097769	Snhg4	77.46720171	784.928937	3.082091358	3.0814E-32	9.68692E-30	
ENSMUSG0000007080	Pole	269,2256734	1323,94185	2,2082542	4,00553E-32	1,24649E-29	
ENSMUSG0000024992	Pde6c	190,4390905	11,0147925	-3,620005693	2,24388E-31	6,77739E-29	
ENSMUSG0000006398	Cdc20	240,955947	1091,06789	2,096992812	1,10531E-30	3,18247E-28	
ENSMUSG0000006585	Cdt1	215,9696095	953,77088	2,064485341	2,3539E-30	6,53323E-28	
ENSMUSG0000038537	Mc3r	248,0399256	19,9799336	-3,274021273	3,97276E-30	1,07362E-27	
ENSMUSG0000025574	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	
ENSIVIUSG00000035200	Chrnb4 Bub15	180,56/3236	1153 78003	-3,131636907	8,46388E-29	2,10286E-26	
	Sgoll	232,0403287 18 19313175	1132,78902 250 868186	2,20001/03	2,11012E-28 2 74008E-28	5,13334E-20 6 59504E-26	
ENSMUSG0000025540	Ncang	94,65742125	504.325902	2,295512685	3.07627F-28	7.34681F-26	
ENSMUSG0000005470	Asf1b	100,5086269	433,742528	2,0229517	4,35768E-28	1,01706E-25	
ENSMUSG0000033952	Aspm	192,3929439	853,723342	2,064768098	7,57792E-28	1,71662E-25	

ENSMUSG0000041193	Pla2g5	2117,478179	292,136359	-2,665296912	1,69237E-27	3,72417E-25
ENSMUSG0000092203	1110038B12Rik	397,2760844	2153,26404	2,313832157	4,05381E-27	8,79504E-25
ENSMUSG0000001403	Ube2c	149,7728707	713.662298	2.150196081	4.23603E-27	9.06274E-25
ENSMUSG00000050107	Gsg2	36 57580921	186 370937	2 238705274	5 82081E-27	1 20354E-24
	KIFV	122 2220221	79 15 22 495	2,230,032,4	7 427295-27	1 515265-24
	NIN4	422,3233227	78,1522485	2,3083030303	1,427201-27	1,515501-24
	Obezi	54,10863869	324,568444	2,425789591	4,30102E-26	8,00051E-24
ENSIMUSG0000028873	Cacas	135,9683267	624,652847	2,095526826	4,34829E-25	8,11891E-23
ENSMUSG0000005233	Spc25	87,57471381	378,669041	2,016727434	4,40571E-25	8,17658E-23
ENSMUSG0000062248	Cks2	133,0412666	571,070809	2,010472131	5,14269E-25	9,48719E-23
ENSMUSG0000002588	Pon1	497,8919029	76,776389	-2,519299026	6,13229E-25	1,12455E-22
ENSMUSG0000040564	Apoc1	792,241351	141,429795	-2,343085311	6,38889E-25	1,16467E-22
ENSMUSG0000066058	Cldn19	268,916142	1176,66355	2,036591001	6,85259E-25	1,24185E-22
ENSMUSG0000026622	Nek2	238,3960439	1045,59551	2.041520289	8.03328E-25	1.43889E-22
ENSMUSG0000073964	Olfr570	584 3924078	99 7385451	-2 394782874	1 29593F-24	2 29455E-22
ENSMUSC0000106718	Gm20052	102 000278	128 61076	2,004702074	1 420745-24	2,204002 22
	UIII20032	102,030278	438,01970	2,01783302	1,420741-24	2,501151-22
	KNTCL	133,44/18/9	749,097501	2,339983756	1,73909E-24	3,04419E-22
ENSMUSG0000038943	Prc1	406,1661719	1820,28616	2,06440628	4,09187E-24	7,00346E-22
ENSMUSG0000042489	Clspn	125,0872796	539,286787	2,009719804	3,2635E-23	5,05236E-21
ENSMUSG0000025507	Pidd1	637,010162	2773,55081	2,02554488	3,3502E-23	5,16065E-21
ENSMUSG0000027306	Nusap1	180,7292123	887,748475	2,170559677	3,66811E-23	5,62225E-21
ENSMUSG0000039639	Kcne1	12,74369676	93,7446489	2,66030024	4,12079E-23	6,28482E-21
ENSMUSG0000002055	Spag5	260,9717892	1126,30949	2,01109867	4,30438E-23	6,53248E-21
ENSMUSG0000009108	Gnat2	47,79534207	203.425138	2.004655186	1.55034E-22	2.24238E-20
ENSMUSG0000024791	Cdca5	55 48035903	339 795033	2 423003982	2 91842F-22	4 06836E-20
ENSMUSC0000027303	Nmur?	127 2052202	910 226659	2,425005502	2,510420 22	4 295705 20
		127,5055502	019,250050	2,400127930	5,1740E-22	4,56579E-20
	PIKS	2285,997858	349,583227	-2,50448331	5,25492E-22	7,10343E-20
ENSMUSG0000046179	E218	88,78391455	540,304492	2,415387502	7,23795E-22	9,73742E-20
ENSMUSG0000017716	Birc5	168,3981954	730,369322	2,009313134	9,84018E-22	1,3011E-19
ENSMUSG0000029830	Svopl	399,4000818	1998,03159	2,19043511	1,18698E-21	1,55611E-19
ENSMUSG0000032815	Fanca	112,4457136	519,066044	2,085402675	1,30067E-21	1,69792E-19
ENSMUSG0000047534	Mis18bp1	57,79849592	279,680957	2,129924184	9,21423E-21	1,09603E-18
ENSMUSG0000035365	Parobo	37,70507557	163,743626	2.009412415	1.0541E-20	1.24903E-18
ENSMUSG0000038379	Ttk	54 74305665	308 45627	2 311758799	1 33096F-20	1 56505E-18
ENSMUSC0000028587	Orc1	18 621101/0	117 095154	2,511750755	1,50846E-20	1 760225-19
	SIc16-2	2490 152116	EC0 412E90	2,434310424	1,000401-20	2 107105 10
	5101048	3489,152110	509,412589	-2,415962842	1,92393E-20	2,18/18E-18
ENSMUSG0000049971	GITIOI	60,53377077	301,344792	2,170667829	2,82918E-20	3,14662E-18
ENSMUSG0000035683	Melk	107,7356649	477,413095	2,027355926	5,4441E-20	5,92657E-18
ENSMUSG00000049916	2610318N02Rik	5,393346138	78,0545549	3,24818027	8,43611E-20	8,8703E-18
ENSMUSG0000039187	Fanci	79,11614602	439,783095	2,289044903	1,88804E-19	1,93245E-17
ENSMUSG0000076609	Igkc	147,7615879	24,3884527	-2,390858347	2,07492E-19	2,10971E-17
ENSMUSG0000070469	Adamtsl3	1436,168565	146,561063	-2,888330322	2,46652E-19	2,49142E-17
ENSMUSG0000027379	Bub1	103,7026213	495,507319	2,113789017	2,71049E-19	2,7159E-17
ENSMUSG0000034258	Mfsd7c	1021.777361	233,317181	-2.01288941	2.72401E-19	2.7159E-17
ENSMUSG0000028654	Mycl	108 /51/332	868 473946	2 009610586	2 83/81F-19	2 81725F-17
ENSMUSC0000051254	Samd?	5/ 20255112	252 180510	2,000010000	4.07264E-10	2,017232 17
	Aurich	142 1024222	233,183313	2,030131003	4,07304L-19	3,939011-17
ENSINUSG00000020897	AURKD	143,1934323	843,653695	2,349963728	8,51096E-19	7,89776E-17
ENSMUSG0000048988	Elfn1	404,8105517	65,8829765	-2,402785253	9,2221E-19	8,48103E-17
ENSMUSG0000072980	Oip5	30,36185492	198,487604	2,45457084	1,00276E-18	9,1671E-17
ENSMUSG0000020303	Stc2	35,03209227	236,962686	2,488988542	1,31757E-18	1,1869E-16
ENSMUSG0000017146	Brca1	141,3555828	620,17343	2,010453161	1,63186E-18	1,44883E-16
ENSMUSG0000078922	Tgtp1	110,3839671	13,2633639	-2,710266703	2,30509E-18	2,00608E-16
ENSMUSG0000019803	Nr2e1	258,9894393	25.3017201	-2.905902402	2.77597E-18	2.40907E-16
ENSMUSG0000028003	Irat	65 53525029	1 67562484	-3 696546221	3 17194F-18	2 73729F-16
ENSMUSC0000028582	Pin	122 2525605	14 1084120	2 725207142	2 200755-10	2,007202 10
	Prh	00 22425900	22 1407296	2,733237142	A 7200/E 10	2,022201 10
	KIII	99,23435892	22,1407386	-2,029561182	4,73894E-18	3,98899E-10
ENSMUSG0000028068	lqgap3	208,6117245	1010,11361	2,120269454	4,96687E-18	4,16946E-16
ENSMUSG0000087367	Gm15491	18,14544859	113,964029	2,418598546	5,33965E-18	4,4581E-16
ENSMUSG00000041064	Pif1	39,75141956	189,872382	2,094644331	1,32895E-17	1,07743E-15
ENSMUSG0000053886	Sh2d4a	26,50249365	130,072314	2,131044337	1,76547E-17	1,41643E-15
ENSMUSG0000029370	Rassf6	23,73419701	118,984868	2,143838965	2,96266E-17	2,32841E-15
ENSMUSG0000047415	Gpr68	20,96378643	198,748027	2,789555784	3,89804E-17	3,04027E-15
ENSMUSG0000035498	Cdcp1	10.32735788	90.8175436	2.761729257	4.33352E-17	3.34604E-15
ENSMUSG0000024177	Nme4	109 6884793	550 061377	2 149204921	4 55498F-17	3 4995F-15
	Ecco2	EE EC402727	410 42701	2,145204521	4,534502 17	2 572025 15
	LOCUZ	141 4275042	410,43/91	2,302040483	4,0/4326-1/	3,37302E-15
	rigz	141,43/5943	51,5400848	-2,025065085	4,/859E-1/	3,0496E-15
ENSMUSG0000104939	Gm33651	4,044848839	62,3266784	3,163452688	5,25623E-17	3,99837E-15
ENSMUSG0000027793	Ccna1	69,51075004	357,511987	2,172834819	7,18747E-17	5,37455E-15
ENSMUSG0000022026	Olfm4	24,58642533	163,16539	2,458339945	7,80249E-17	5,82032E-15
ENSMUSG00000097180	2700038G22Rik	60,78864128	309,203164	2,161310912	9,54041E-17	6,99812E-15
ENSMUSG0000071470	Ccnb1ip1	15,54497705	103,019551	2,4589135	1,0774E-16	7,79166E-15
ENSMUSG0000027827	Kcnab1	340.0643537	70,671861	-2,102922917	2,36532E-16	1,6503E-14
ENSMUSG0000045272	Cennh	59 19751051	273 765186	2 042764825	4 40405F-16	3 021825-14
ENSMUSGOOOOO	Ankle1	60 12154426	426 860452	2,542,54655	4 94080F-16	3 367695-14
	Eldr	24 08460042	101 1000402	2,004070011	1 7/0025 15	1 14/555 12
	Liui Ano 2	54,00409942	101,12838	2,1930/14/3	1,743026-13	1,14433E-13
	ANUZ	52,28/4423/	4,80909803	-2,83835544	4,02498E-15	2,53582E-13
ENSIVIUSG0000095105	Fastaaq	76,27888252	15,2657805	-2,128749333	4,159/9E-15	2,61008E-13

ENSMUSG0000034452	Slc24a1	61,65300611	3,67187558	-3,127541644	5,87376E-15	3,62643E-13
ENSMUSG0000030994	D7Ertd443e	12,3612065	93,5818553	2,56535316	6,32792E-15	3,86041E-13
ENSMUSG0000030867	Plk1	146,1171153	748,430044	2,148171022	6,54374E-15	3,98418E-13
ENSMUSG0000034883	Lrr1	4,947890247	54,5516569	2,824875527	1,1662E-14	6,92261E-13
ENSMUSG0000032500	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
ENSMUSG0000043155	Hpdl	4,809167818	50,5440968	2,720065784	3,29969E-13	1,70852E-11
ENSMUSG0000098318	Lockd	35,66830943	173,021558	2,054474757	3,60379E-13	1,85973E-11
ENSMUSG0000068227	Il2rb	9,85067612	54,5853531	2,214339551	4,10611E-13	2,10135E-11
ENSMUSG0000041774	Ydjc	47,20761568	254,179587	2,168532789	5,5632E-13	2,80051E-11
ENSMUSG0000058287	Gm12253	6,590722982	54,0556126	2,483427011	1,15665E-11	4,96989E-10
ENSMUSG0000030433	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
ENSMUSG0000047443	Fam132b	6,855839428	56,8036602	2,474417256	5,3801E-11	2,14702E-09
ENSMUSG0000032313	Tmem266	17,19156227	107,81313	2,249413349	6,17106E-11	2,44054E-09
ENSMUSG0000099703	Gm28285	1,164600882	32,035875	2,954662552	7,87048E-11	3,07318E-09
ENSMUSG0000050808	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
ENSMUSG0000025081	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
ENSMUSG0000025592	Dach2	606,9745414	118,378121	-2,055187937	3,49539E-10	1,23777E-08
ENSMUSG0000026100	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
ENSMUSG0000038932	Tcfl5	82,68304674	14,8457447	-2,104697544	1,66349E-09	5,30527E-08
ENSMUSG0000009214	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
ENSMUSG0000022542	Sept12	2,231544674	30,9303441	2,619247085	2,1217E-09	6,60923E-08
ENSMUSG0000003309	Ap1m2	0,758688786	17,5804139	2,668925707	7,88143E-09	2,25451E-07
ENSMUSG0000063260	Syt10	48,7734847	8,36749824	-2,088737653	2,10434E-08	5,65217E-07
ENSMUSG0000053168	9030619P08Rik	2,794660934	29,9578289	2,398244392	2,82356E-08	7,39067E-07
ENSMUSG0000033762	Recql4	27,92563832	157,312723	2,049408916	2,85382E-08	7,45721E-07
ENSMUSG0000044748	Defb1	5,507411742	45,1160241	2,290230656	5,6085E-08	1,3912E-06
ENSMUSG0000065282	Gm24455	8,805326765	48,4950342	2,021000875	7,20905E-08	1,76127E-06
ENSMUSG0000042474	Fcmr	28,40122712	3,53612327	-2,246241436	9,97301E-08	2,36163E-06
ENSMUSG0000083428	Gm14591	0	10,8530953	2,441836007	6,20029E-07	1,25258E-05
ENSMUSG0000043681	Fam25c	24,37899043	3,71825318	-2,054491549	7,41741E-07	1,4762E-05
ENSMUSG0000039200	Atf7ip2	1,910516985	18,2293372	2,173720961	1,10103E-06	2,12136E-05
ENSMUSG0000063011	MsIn	97,79865623	5,8109133	-2,300162757	1,79646E-06	3,29437E-05
ENSMUSG0000027356	Fermt1	6,058328762	49,2557923	2,122474367	1,98898E-06	3,613E-05
ENSMUSG0000055312	Them7	2,270436165	18,424974	2,003787689	1,35597E-05	0,000205181
ENSMUSG0000062496	4930431F12Rik	1,284425852	14,7262449	2,044735885	1,70532E-05	0,000250895
ENSMUSG0000097254	C430042M11Rik	1,195905613	14,2578316	2,005489172	2,70776E-05	0,000378154
ENSMUSG0000048992	Prss32	17,18657152	0,72331998	-2,012676015	4,14262E-05	0,000551153

Sup. Table 2 El Nagar et al.

Indenuity Canonical Pathways	-log(n-vali	#Ratio	z-score	Molecules
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	8.55E00	1.63E-01	-1 890	CDC25C CKS2 CCNB2 PLK1 AURKA BRCA1 CDK1 CCNB1
Mitotic Poles of Pole-Like Kinase	7.49500	1,00E 01	1 800	CDC25C CDC20 PLK5 PPC1 CCNB2 PLK1 CDK1 CCNB1
DNA damage-induced 14-3-3g Signaling	6.63E00	2.63E-01	#######################################	CONE1 CONB2 BPCA1 CDK1 CONB1
CADD45 Signaling	4.07E00	2,032-01		
GADD45 Signaling	4,97E00	2,11E-01		
Estrogen-mediated S-phase Entry	4,55E00	1,67E-01	2,000	CONE1,CONA1,ESR1,CDK1
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	4,25E00	9,09E-02	-1,000	CDC25C,PLK1,CLSPN,BRCA1,CDK1
Pyrimidine Ribonucleotides Interconversion	3,53E00	9,3E-02	##########	NME4,RECQL4,ENTPD3,RAD54L
Cyclins and Cell Cycle Regulation	3,52E00	6,41E-02	2,236	CCNE1,CCNA1,CCNB2,CDK1,CCNB1
ATM Signaling	3,47E00	6,25E-02	-1,342	CDC25C,CCNB2,BRCA1,CDK1,CCNB1
Pyrimidine Ribonucleotides De Novo Biosynthesis	3.45E00	8.89E-02	##########	NME4.RECQL4.ENTPD3.RAD54L
Salvage Pathways of Pyrimidine Ribonucleotides	3 13E00	5 26E-02	<i></i>	NME4 PLK1 TTK NEK2 CDK1
Pyridoval 5'-phosphate Salvage Pathway	2.84E00	6 15E-02	############	
Coll Cycle Central of Chromosomal Banlinstion	2,0400	7 90E 02		
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	2,54E00	7,69E-02	****	
Hereditary Breast Cancer Signaling	2,36E00	3,52E-02	##########	CDC25C,BRCA1,CDK1,FANCA,CCNB1
Asparagine Biosynthesis I	2,13E00	1	##########	ASNS
Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease	2,05E00	5,26E-02	#########	CCNE1,CCNA1,CDK1
Pyrimidine Deoxyribonucleotides De Novo Biosynthesis I	1,9E00	8,7E-02	#########	NME4,RRM2
Glycine Biosynthesis I	1.83E00	0.5	##########	SHMT1
Antiproliferative Role of TOB in T Cell Signaling	1 79E00	7 69E-02	<i></i>	CONF1 CONA1
Pole of BBCA1 in DNA Damage Response	1,68E00	3.855-02	****	
Conia Ladanhan Cinceling	1,00000	5,05E-02		
Sonic Hedgenog Signaling	1,66E00	6,67E-02	****	
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1,68E00	2,86E-02	##########	CCNE1,CCNA1,ESR1,GST01
Arsenate Detoxification I (Glutaredoxin)	1,53E00	2,5E-01	##########	GST01
Ascorbate Recycling (Cytosolic)	1,53E00	2,5E-01	#########	GST01
dTMP De Novo Biosynthesis	1,43E00	0,2	##########	SHMT1
Folate Polyglutamylation	1.43E00	0.2	##########	SHMT1
Ceramide Biosynthesis	1.36E00	1 67E-01	<i></i>	SPTI C3
n53 Signaling	1 29E00	2 7E-02	<i></i>	PIDD1 BRCA1 BIRC5
Supernathway of Serine and Glycine Biosynthesis I	1 29E00	1.43E-01	###########	SHMT1
Superpartiway of Senine and Stycine Diosynthesis i	1,2300	1,450-01		
Salvage Pathways of Pyrimidine Deoxynbonucleolides	1,23E00	1,25E-01	****	
Phototransduction Pathway	1,22E00	3,77E-02	****	PDE6C,GNAT2
Molecular Mechanisms of Cancer	1,2E00	1,6E-02	##########	CDC25C,CCNE1,GNAT2,AURKA,BMP6,BRCA1
Folate Transformations I	1,18E00	1,11E-01	##########	SHMT1
Glycine Betaine Degradation	1,14E00	0,1	#########	SHMT1
BER pathway	1,06E00	8,33E-02	#########	POLE
DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination	1	7.14E-02	##########	BRCA1
Vitamin-C. Transport	9 73E-01	6.67E-02	#######################################	GST01
aNOC Circalian	0.575.04	1.045.02		
enco olynaing	9,37E-01	1,94E-02		EVOA
Mismatch Repair in Eukaryotes	9,46E-01	6,25E-02	****	EXUI
The Visual Cycle	8,55E-01	0,05	##########	LRAT
Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates	8,21E-01	2,17E-02	#########	CCNE1,BMP6
Antioxidant Action of Vitamin C	7,45E-01	1,94E-02	#########	PLA2G5,GSTO1
Glutathione-mediated Detoxification	7.08E-01	3.45E-02	##########	GST01
MIE-mediated Glucocorticoid Regulation	6 58E-01	3.03E-02	<i></i>	PLA2G5
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	6 56E-01	1.69E-02	###########	CCNE1 BIRC5
Cell Cuele Desulation by DTC Femily Destains	0,000-01	1,032-02		CONE 1, DIROS
Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	0,30E-01	2,00E-02	****	DONA PLACOF
Atherosclerosis Signaling	6,1E-01	1,57E-02	##########	PON1,PLA2G5
tRNA Splicing	5,95E-01	2,56E-02	##########	PDE6C
Retinol Biosynthesis	5,86E-01	2,5E-02	#########	LRAT
MIF Regulation of Innate Immunity	5,76E-01	2,44E-02	#########	PLA2G5
Role of Oct4 in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	5.34E-01	2.17E-02	##########	BRCA1
Protein Ubiquitination Pathway	5.26E-01	1.18E-02	##########	CDC20.BRCA1.UBE2C
Synantic Long Term Depression	5 25E-01	1 37E-02	###########	PLA2G5 GNAT2
Bolovin Signaling	5,20E 01	1 22E 02		DECC CNAT2
Mat/Cat asthurs	4.505.04	1,320-02		DECC, GIAIZ
wnt/Ca+ pathway	4,58E-01	1,75E-02	****	PDE6C
RhoGDI Signaling	4,3E-01	1,16E-02	##########	GNAT2,ESR1
Phospholipases	4,29E-01	1,61E-02	##########	PLA2G5
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	4,18E-01	1,56E-02	#########	CCNE1
IL-2 Signaling	4,18E-01	1,56E-02	#########	IL2RB
Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System	4,13E-01	1,54E-02	#########	UBE2C
Eicosanoid Signaling	4.03E-01	1.49E-02	##########	PLA2G5
Henatic Fibrosis / Henatic Stellate Cell Activation	.,	1 1 09E-02	############	COL 443 COL 444
Endetholin 1 Signaling	2 00E 01	1.07E 02		
Endotrein-T Signaling	3,00E-01	1,07E-02	****	PLAZGO,GINATZ
Giorna invasiveness Signaling	3,00E-01	1,43E-02	****	
Role of JAK1 and JAK3 in yc Cytokine Signaling	3,83E-01	1,41E-02	##########	IL2RB
Basal Cell Carcinoma Signaling	3,79E-01	1,39E-02	##########	BMP6
Role of MAPK Signaling in the Pathogenesis of Influenza	3,79E-01	1,39E-02	#########	PLA2G5
Ephrin B Signaling	3,74E-01	1,37E-02	#########	GNAT2
IL-15 Signaling	3.61E-01	1.32E-02	##########	IL2RB
RMP signaling nathway	3.61E-01	1 32E-02		BMP6
Angionojetin Signaling	3.57E-01	1 3E-02	###########	BIRC5
Fetrogen Dependent Project Concer Signaling	2 575 01	1.00 02		ESB1
EStrogen-Dependent breast Gancer Signaling	3,37 E-01	1,32-02	******	
ERNMAPK Signaling	3,57E-01	1,01E-02	****	PLAZGO,EGRI
Breast Cancer Regulation by Stathmin1	3,47E-01	9,85E-03	##########	CCNE1,CDK1
Small Cell Lung Cancer Signaling	3,29E-01	1,19E-02	#########	CCNE1
HIPPO signaling	3,22E-01	1,16E-02	#########	RASSF6
G Beta Gamma Signaling	3,15E-01	1,14E-02	#########	GNAT2
HER-2 Signaling in Breast Cancer	3,15E-01	1,14E-02	#########	CCNE1
VEGF Family Ligand-Receptor Interactions	3,15E-01	1,14E-02	##########	PLA2G5
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	3,12E-01	1.12E-02	##########	IL2RB
Apoptosis Signaling	3,12E-01	1.12E-02	###########	CDK1
Acute Myeloid Leukemia Signaling	3.055-01	1 1E-02		CCNA1
	3 OFE 04	1 1 5 02		CNAT2
n∟-r orginalling sAMD me distant size alia :	3,03E-01	1,12-02		
CAMP-mediated signaling	3,02E-01	8,97E-03	##########	MU3K,PDE6C
Prostate Cancer Signaling	2,95E-01	1,06E-02	#########	CCNE1
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	2,8E-01	1,01E-02	#########	AP1M2
FAK Signaling	2,8E-01	1,01E-02	#########	HMMR
Signaling by Rho Family GTPases	2,57E-01	8,1E-03	#########	GNAT2,SEPT12
Gas Signaling	2.52E-01	9.17E-03	###########	MC3R
Androgen Signaling	2,020-01	9.01E.02		GNAT2
Telomerase Signaling	2,412-01	0.01E-03	***********	II 2PB
reiomendse olghalling	2,47E-01	9,010-03	<i>"""""""""""""""""""""""""""""""""""""</i>	
Rac olgnaling	2,32E-01	8,55E-03	###########	IQGAF3
p38 MAPK Signaling	2,32E-01	8,55E-03	#########	PLA2G5
Fc Epsilon RI Signaling	2,28E-01	8,4E-03	#########	PLA2G5
Renin-Angiotensin Signaling	2,26E-01	8,33E-03	#########	REN
LXR/RXR Activation	2,23E-01	8,26E-03	#########	PON1
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	2.21E-01	8.2E-03	##########	IL2RB
Role of NANOG in Mammalian Embryonic Stem Cell Plurinotoney	2 21E-01	8 2E-03	<u>############</u>	BMP6
	2,210-01	0,22-00		SEDT12
Rhor Signaling	2,21E-01	o,∠E-U3	****	DEFI12
Gustation Pathway	2,17E-01	0,00E-03	"""""""""""""""""""""""""""""""""""""""	PUEDG
Sperm Motility	2,15E-01	0,008	#########	PLA2G5
FXR/RXR Activation	2,13E-01	7,94E-03	#########	PON1
Estrogen Receptor Signaling	2,09E-01	7,81E-03	##########	ESR1
CCR3 Signaling in Eosinophils	2,05E-01	7,69E-03	##########	PLA2G5

Sup. Table 3 El Nagar et al.

Categories
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organi
Cell Cycle
Cellular Assembly and Organization DNA
Cell Cuelo
Cell Cycle
Cell Cycle DNA Replication Recombination
Cell Cycle, Dive Replication, Recombinati
Cell Cycle
Cell Cycle DNA Replication Recombinati
Cell Cycle
Cell Cycle, DNA Replication, Recombinati
Cellular Assembly and Organization
Cell Death and Survival
Cellular Assembly and Organization, Cellu
Cell Cycle
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Nutritional Disease
Cell Death and Survival
Cell Death and Survival
Cellular Assembly and Organization, DNA
Cell Morphology, Cellular Assembly and C
Cell Cycle
Cellular Assembly and Organization
Cell Cycle
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cell Cycle, Reproductive System Develop
Cell Cycle
Cell Cycle
Cellular Assembly and Organization, DNA
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cellular Assembly and Organization
Cell Curle, Cellular Manament
Cellular Development, Cellular Crowth on
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organi
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organic
Cell Cycle
Cell Cycle
Cellular Movement Reproductive Sustan
Cell Cycle, DNA Replication Recombination
Cancer, Organismal Injury and Abnormalia
Cell Morphology, Cellular Assembly and C
Cell Cycle, Reproductive System Develor
Cancer, Organismal Iniury and Abnormali
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cancer
Cellular Assembly and Organization
Cell Cycle
Cell Cycle, Reproductive System Develop
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cellular Assembly and Organization
Cellular Assembly and Organization
Cellular Assembly and Organization, DNA
Cellular Assembly and Organization
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organis
Cell Cycle
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organis
Cellular Assembly and Organization
Cell Cycle
Cell Cuelo
Consor Organismal Injuny and Abnormalia
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cell Cycle, Cell Mombology
Cancer Organismal Injury and Abnormali
Cell Morphology Cellular Assembly and C
Cell Cycle
Concer Controletesting Disease Organic
Cell Cycle, Reproductive System Develor
Cell Cycle, Reproductive System Develop
Cell Cycle
Cell Cycle DNA Replication Recombinati
Cancer Gastrointestinal Disease Organis
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organis
Cell Cycle. Reproductive System Develop
Cell Death and Survival
Cell Cycle
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cellular Assembly and Organization
Cardiovascular Disease, Developmental I
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organi
Cell Cycle
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organis
Cell Cycle
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cell Cycle
Cell Cycle
Cell Cycle
Cancer, Organismai Injury and Abnormali
Organ Morphology, Reproductive System
Cell Cycle, Cell Morphology, Cellular Asse
Cancer, Organismal Johns and Aler
Cancer, Organismal Injury and Abraman
Cell Death and Survival
Cell Cycle
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
DNA Replication, Recombination, and Re
Cell Cycle
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organis
Cellular Assembly and Organization
Cell Signaling
Cell Cycle
Cell Cycle
Cell Cycle, Cell Morphology
Developmental Disorder, Embryonic Deve
Cell Cycle
DNA Replication, Recombination, and Re
Cell Cycle
Cell Death and Survival
Cell Cycle
Cancer, Hematological Disease, Immunol
Endocrine System Disorders, Organ Morp
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cancer, Organismai Injury and Abnormali
Concer Organismal Internet Alter
Concer, Organismai Injury and Abnormali
Connective rissue Disorders, Hereditary I
Cell Cude, Hemotor
Cell Cycle, Hematopolesis
UNA Replication, Recombination, and Re
Cen-ro-Cell Signaling and Interaction
Concer, Organismal Jointo and Alexandre
Cancer, Organismai Injury and Abnormali
Cell Cuelo, Concesti a Taxin Day
Ceni Cycle, Connective Tissue Developme
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organis
Cell Morphology
Organismal Injury and Abnormalities, Rep
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
UNA Replication, Recombination, and Re
Cancer, Organismal Injury and Abnormali
Cellular Assembly and Organization
Cell Cycle, Hepatic System Development
Coll Contra DNA Day
Cell Cycle, DNA Replication, Recombinati
Cell Cycle, DNA Replication, Recombinati Cancer, Organismal Injury and Abnormali DNA Replication, Recombination, controls

2 5 3

0 0	ft	han all a share see a second	4.045.04				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	iemalignant tumor	poorly differentiated malignant tumor	1,04E-04				MSLN,POLE,RRM2,UBE2C
DNA Replication, Recombination, and Rep DNA Replication, Recombination, and Rep	contensation	metabolism of DNA condensation of mitotic chromosomes	1,11E-04 1,11E-04		1,970		BIRC5,BRCA1,CCNE1,CDK1,CDT1,CKS2,ESCO2,EXO1,ORC1,PLK1,POLE,PTHLH,RECQL4 CDCA5,NCAPG,NUSAP1
Cell Cycle	mitosis	entry into mitosis of cervical cancer cell line	1,11E-04				AURKA,CDC25C,PLK1
Cell Signaling, Post-Translational Modifica	ripiolay Itiserine phosphorylation	serine phosphorylation of peptide	1,12E-04				CDK1,CLSPN,DCLK3,PBK,PLK1,TTK
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	iepelvic cancer iemyosarcoma	pelvic cancer myosarcoma	1,18E-04 1,23E-04				ADAMTSL3,ANO2,ASPM,ATF7IP2,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1,BUB1B,C10orf90,CCNA1,CCNB1,CCNE ADAMTSL3,AURKB,CKS2,ESR1,FERMT1,MELK,PBK,POLE,PRC1,RRM2,SKA3,TK1,TTK,UBE2C
Reproductive System Development and F Cellular Compromise DNA Replication R	umorphology exchromosomal instability	morphology of reproductive system chromosomal instability	1,29E-04 1.36E-04	Decreased	1 -2 207	hias	ASPM, BRCA1, CCNA1, CCNE1, CKS2, E2F7, E2F8, ESR1, EXO1, IL2RB, KNSTRN, LRAT, MSTN, SEPT12, SLC14A2, STC2, TD BRCA1, BUB1, FMF1, FXO1, FANCA
Cellular Compromise	nucleation	nucleation of cells	1,36E-04		0,000		AURKB,BRCA1,CCNE1,E2F8,NEK2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organis	marge intestine carcinoma	large intestine carcinoma	1,51E-04				ADAMTSL3,ANKLE1,AP1M2,ASPM,AURKA,AURKB,BIRC5,BRCA1,BUB1,BUB1B,C10orf90,CCNA1,CCNB1,CCNB1IP1,
Cancer, Dermatological Diseases and Cor Organ Morphology, Organismal Injury and	rcskin tumor /abnormal morphology	skin tumor abnormal morphology of internal genitalia	1,61E-04 1.63E-04		-0,322		ADAMTSL3,ANO2,ASPM,ATF7IP2,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BUB1,BUB1B,C10or/90,CCNA1,CDC20B,CDC25C,CD ASPM.BRCA1,CKS2,ESR1,EXO1,IL2RB,KNSTRN,LRAT,SEPT12,STC2,TDRD1,TK1
Cell Cycle, Connective Tissue Developme	maneuploidy	aneuploidy of fibroblasts	1,66E-04				BUB1,CENPE
Cellular Assembly and Organization	association	association of kinetochores	1,66E-04				BIRC5,NEK2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	chromosomal congression iehyperplasia	chromosomal congression of cervical cance hyperplasia of mammary lobuloalveolar uni	e1,66E-04				ESR1,PARPBP
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit Cell Cycle	iesoft tissue sarcoma cancer metanhase	soft tissue sarcoma cancer arrest in metaphase	1,74E-04 1,75E-04				ADAMTSL3,AURKB,BIRC5,BUB1B,CKS2,ESR1,FERMT1,MELK,PBK,POLE,PRC1,RRM2,SKA3,TK1,TTK,UBE2C CCNR1 CDC20 PLK1
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	econnective or soft tissue tumor	connective or soft tissue tumor	1,80E-04		-1,000		ADAMTSL3,AURKB,BIRC5,BRCA1,BUB1B,CCNE1,CKS2,COL4A3,COL4A4,E2F7,ESR1,EXO1,FERMT1,HMMR,MELKJ
DNA Replication, Recombination, and Rep	schromosomal aberration	chromosomal aberration	1,85E-04	Decreased	1 -2,200	bias	ADAMISLS,AURAD,BIRCS,BRCAT,BUB1B,CKS2,E2F7,ESKT,EXOT,FERMITT,MEEK,MIN07,FBK,POLE,PRCT,RECUL4, BIRCS,BRCA1,BUB1,BUB1B,EME1,EXO1,FANCA,RRM2
Organ Morphology, Reproductive System Nutritional Disease	Dmorphology	morphology of genital organ obesity	1,91E-04 1 94E-04		-0.323		ASPM, BRCA1, CCNA1, CKS2, ESR1, EXO1, IL2RB, KNSTRN, LRAT, MSTN, SEPT12, SLC14A2, STC2, TDRD1, TK1 AURKB CCNA1, CCNB1, CDCA8, CDK1, CHRNB4, ESR1, KIE20A, MC3R, MKI67, MSTN, NEK2, NMI IR2, PLK1, REN
Cell Cycle	G2 phase	G2 phase of cervical cancer cell lines	2,02E-04				CCNB1,CDC25C,EME1,PLK1
Cell Death and Survival	apoptosis	apoptosis of squamous cell carcinoma cell	2,14E-04 12,19E-04	Decreased	1 -2,170		AURA, BUB 18, CDC20 AURKA, BIRC5, CDCA2, PLK1, RRM2
Cancer, Dermatological Diseases and Cor Organismal Injury and Abnormalities, Rep	icskin cancer rcabnormal morphology	skin cancer abnormal morphology of reproductive syste	2,24E-04 2,30E-04				ADAMTSL3,ANO2,ASPM,ATF7IP2,AURKA,BIRC5,BMP6,BUB1,BUB1B,C10orf90,CCNA1,CDC20B,CDC25C,CDCA5,CD ASPM,BRCA1,CCNE1,CKS2,E2F7,E2F8,ESR1,EXO1,IL2RB,KNSTRN,LRAT,SEPT12,STC2,TDRD1,TK1
Cell Morphology, Cellular Assembly and C	reabnormal morphology	abnormal morphology of Nucleus	2,33E-04				AURKA, BRCA1, CDK1, RAD54L, SEPT12 APIM2 ASPM AURKA BIRCS BRCA1 BUB1 CONE1 CDCP1 CDK1 CLDN19 COL4A3 E2E7 E2E8 ELEN1 ESP1 EXO1 EL
Organismal Injury and Abnormalities, Rep	rcabnormality of endometrium	abnormality of endometrium	2,45E-04		4 004		ANO2, ASPM, AURKA, BMP6, BRCA1, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CDC20, CENPE, CENPF, DACH2, ES
Cellular Assembly and Organization	association	apoptosis association of chromatin	2,47E-04 2,58E-04		-1,381		ASNS,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1,CCNA1,CCNB1,CCNE1,CDC20,CDC25C,CDCA2,CDCP1,CDK1,CEI BRCA1,CDT1,WDHD1
Connective Tissue Disorders, Developmen	ntautosomal recessive primary microcephaly	y autosomal recessive primary microcephaly	2,58E-04				ASPM,CENPE,STIL BRC44 POLE RPM2
Cell Cycle	interphase	arrest in interphase of tumor cell lines	2,74E-04				BRCA1, CCNB1, CCNE1, CDC25C, CDCA2, CDK1, EME1, MELK, PLK1, RASSF6
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organia Cell Cycle	interphase	entry into interphase	2,81E-04 2,97E-04		1,912		BUB1,BUB1B,CCNE1,CDC20,CDK1,E2F8,MSLN
Cancer, Cell Cycle, Organismal Injury and Cell Cycle, Cellular Movement	/mitosis cvtokinesis	arrest in mitosis of tumor cells cytokinesis of bone cancer cell lines	3,30E-04 3.30E-04				BIRC5,PLK1 BIRC5.NEK2
Cellular Assembly and Organization	dissociation mitochondrial coll dooth	dissociation of centrosome	3,30E-04				NEK2,PLK1
Cellular Compromise	nucleation	nucleation of breast cancer cell lines	3,30E-04				BRCA1,CCNE1
Hereditary Disorder, Ophthalmic Disease, Endocrine System Development and Euror	Crod monochromacy tisecretion	rod monochromacy secretion of androstenedione	3,30E-04 3,30E-04				GNAT2,PDE6C BMP6 FSR1
Cell Cycle	tetraploidy	tetraploidy	3,30E-04		0 705		AURKB,PLK1
Cell Cycle	polyploidy	polyploidy of cells	3,37E-04 3,64E-04		0,725		BIRC5,CKS2,PLK1
Cell Cycle Cell Death and Survival	cell cycle progression cell death	arrest in cell cycle progression of tumor cel cell death of colorectal cancer cell lines	13,67E-04 3.67E-04		-0.876		AURKA,AURKB,BRCA1,CLSPN,ESR1,MELK,MYCL BIRC5.CCNB1.CDC20.CDK1.LGR5.MELK.RASSF6.TK1.TTK.UBE2C
Cancer, Endocrine System Disorders, Org	arecurrent ovarian cancer	recurrent ovarian cancer	3,85E-04				BRCA1,ESR1,POLE,RRM2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	ieendometrial cancer	endometrial cancer	4,23E-04				ANO2,ASPM,AURKA,BMP6,BRCA1,BUB1,BUB1B,C10or/90,CCNB1,CCNB2,CCNE1,CDC20,CENPE,CENPF,DACH2,ES
Organ Morphology, Organismal Injury and Cancer, Endocrine System Disorders, Gas	Atrophy stpancreatic acinar cell carcinoma	atrophy of renal tubule pancreatic acinar cell carcinoma	4,26E-04 4,26E-04				BUB1B,COL4A3,REN POLE,PTHLH,RRM2
Cell Cycle	G2 phase	arrest in G2 phase of tumor cell lines	4,61E-04				BRCA1,CCNB1,CDC25C,CDK1,EME1,PLK1
Cancer, Hematological Disease, Immunoli Cancer, Hematological Disease, Immunoli	ogrelapsed peripheral T-cell lymphoma	relapsed peripheral T-cell lymphoma	4,95E-04 4,95E-04				AURKA, POLE, RKM2 AURKA, POLE, RRM2
Cancer, Dermatological Diseases and Cor Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	normalignant cutaneous melanoma cancer iemale genital neoplasm	malignant cutaneous melanoma cancer male genital neoplasm	4,97E-04 5.00E-04				ADAMTSL3, ANO2, ASPM, ATF7IP2, BIRC5, BMP6, BUB1, BUB1B, C10orf90, CCNA1, CDC20B, CDC25C, CDCA5, CDCP1, CEI ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, CCNA1, CDC25C, E2F7, ESR1, FERMT1, GPR68, IGKC, KIF20A, KLK4, KNTC1
Cell Death and Survival	cell death	cell death of melanoma cell lines	5,09E-04		0,600		BIRC5,CDK1,CDT1,CLSPN,DTL,PBK,RRM2,SH2D4A,TK1
Cell Morphology, Cellular Assembly and C	rimorphology	morphology of nucleus	5,28E-04				AURKA, BRCA1, CDK1, NCAPG, PIF1, RAD54L, SEPT12
Cell Cyde Cell Cyde	mitosis	arrest in mitosis of colorectal cancer cell lin	5,48E-04 x5,48E-04				AUKKA, CENPE BIRC5, PLK1
Cellular Assembly and Organization	attachment	attachment of chromosomes	5,48E-04				AURKB,BUB1B PRC1 SPC25
Cellular Compromise	fragmentation	fragmentation of spindle pole	5,48E-04				AURKA,CENPE
Cell Cyde Cell Cyde	origin linng ploidy	origin tinng ploidy of trophoblast giant cells	5,48E-04 5,48E-04				E2F7,E2F8
Cell Cycle Cell Cycle Hematological System Develo	replication	replication of bone marrow cells replication of bematopoietic progenitor cells	5,48E-04				AURKB,CCNE1
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	iebenign neoplasia	benign neoplasia	5,50E-04		0,128		AURKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1B,CCNB1,CCNB2,CCNE1,CDK1,COL4A3,COL4A4,ESR1,EXO1,GSTO1,HMMR,KLK
Cell Cycle	mitotic index	mitotic index	5,69E-04				ADAM SES, ANOZ, ASEM, AT FTEZ, AURAX, AURAB, BIRCS, BMP6, BRCAT, BUBT, BUBTB, CT00190, CONAT, CONBT, CONB AURKA, CONE1, NUSAP1
DNA Replication, Recombination, and Rep DNA Replication, Recombination, and Rep	xedouble-stranded DNA break repair xesynthesis	double-stranded DNA break repair synthesis of DNA	6,07E-04 6,26E-04		1,923		BRCA1,CDCA5,CDK1,ESCO2,EXO1,RAD54L BIRC5,BMP6,BRCA1,CCNE1,CDC25C,CDT1,ESR1,EXO1,LRAT,PLK1,POLE,RECQL4
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	ieHER2-negative breast cancer	stage 4 HER2-negative breast cancer	6,51E-04				ESR1,POLE,RRM2
Cellular Assembly and Organization, Cellu	advarian cancer	formation of microtubules	6,72E-04				ESR1,MSLN,POLE,RKMZ BIRC5,CENPF,DLGAP5,KIF2C,NUSAP1
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit Cell Cycle, DNA Replication, Recombinati	iemelanoma orrecombination	melanoma DNA recombination	6,76E-04 6,76E-04		0.725		ADAMTSL3,ANKLE1,ANO2,ASNS,ASPM,ATF7IP2,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1,BUB1B,C10or/90,CCNA ANKLE1,BRCA1,EME1,EXO1,PARPBP,RAD54L,RECQL4
Organismal Development	development S phase	development of genitourinary system	6,81E-04		1,579	bias	ASPM,BMP6,BRCA1,CCNA1,CCNB1IP1,CENPF,COL4A3,COL4A4,E2F7,E2F8,ESR1,EXO1,FANCA,KNSTRN,MSTN,PT CCNE1,CDC25C,CDK1,E2E8,MSI,N,PI,K1
Molecular Transport	quantity	quantity of heavy metal	7,06E-04		1,104		BMP6,ERFE,Gm12253,PON1,TMPRSS6
Connective Tissue Development and Funi Cellular Assembly and Organization	binding	abnormal morphology of short femur binding of chromatin	7,12E-04 7,12E-04		0,208		ESR1,MC3R,MSTN,PTHEH CCNE1,CDK1,CDT1,PLK1
Cell Cycle	S phase G2 phase	S phase arrest in G2 phase of breast cancer cell line	7,16E-04		1,210		BIRC5,BRCA1,CCNE1,CDC25C,CDK1,CKS2,E2F8,MSLN,PLK1 BRCA1,CDC25C,CDK1
Cell Cycle	G2 phase	arrest in G2 phase of cervical cancer cell lin	n7,40E-04				CCNB1,EME1,PLK1
Cellular Compromise, DNA Replication, R	ebreakage	HER2 negative normone receptor negative breakage of chromosomes	7,62E-04 7,64E-04		-1,982	bias	BIRC5,BRC41,CDR1,ESR1,POLE,PTHLH,RRM2 BRC41,ESR1,FANC4,RECQL4
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit Cancer, Gastrointestinal Disease, Organis	iemalignant neoplasm of connective and sof	t malignant neoplasm of connective and soft colon cancer	7,77E-04 8.06E-04				BRCA1,BUB1B,ESR1,POLE,RRM2 AURKA BIRC5 C100/99 CCNA1 CCNR1IP1 CCNR2 CDC25C CDCA5 CDCA8 CDCP1 CENPE COL4A3 COL4A4 DLGA
Cell Cycle	aneuploidization	aneuploidization of fibroblast cell lines	8,18E-04				AURKA,BUB1B
Cell Cycle	mitotic exit	delay in initiation of mitotic exit of cervical c	8,18E-04				CDC20,CDK1
Cell Cycle Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	prometaphase ieendometrial stromal sarcoma	delay in initiation of prometaphase endometrial stromal sarcoma	8,18E-04 8,18E-04				BIRC5,BUB1B BUB1B,ESR1
Cell Cycle, Connective Tissue Developme	rimitosis	entry into mitosis of fibroblast cell lines	8,18E-04				CCNA1,CCNE1
Cellular Assembly and Organization, DNA	Fformation	formation of spindle pole	8,18E-04				DLGAP5,PLK1
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit Cell Death and Survival	mitotic catastrophe	growth of urinary tract tumor mitotic catastrophe of cervical cancer cell li	8,18E-04 r8,18E-04				BMP6,PLR1 BUB1B,CDC20
Cell Cycle, Hepatic System Development Cancer Endocrine System Disorders Gar	applyploidization	polyploidization of hepatocytes	8,18E-04 8 18E-04				E2F7,E2F8 POLF RRM2
Cancer, Hematological Disease, Immunol	stpancreatic carcinoma	poorly differentiated pancreatic carcinoma					POLE RRM2
Cancel, riematological Disease, immunoi	stpancreatic carcinoma orangioimmunoblastic T-cell lymphoma	poorly differentiated pancreatic carcinoma refractory angioimmunoblastic T-cell lymph refractory angioimmunoblastic T-cell lymph	(8,18E-04				DOLE DRM2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hemato	stpancreatic carcinoma ogangioimmunoblastic T-cell lymphoma ogenteropathy associated T cell lymphoma ikhepatosplenic T-cell lymphoma	poorly differentiated pancreatic carcinoma refractory angioimmunoblastic T-cell lymph refractory enteropathy associated T cell lym refractory hepatosplenic T-cell lymphoma	c8,18E-04 n8,18E-04 8,18E-04				POLE,RRM2 POLE,RRM2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hemato Cancer, Hematological Disease, Immunoli Cancer, Hematological Disease, Immunoli	tipancreatic carcinoma gangioimmunoblastic T-cell lymphoma generopathy associated T cell lymphoma khepatosplenic T-cell lymphoma gangioimmunoblastic T-cell lymphoma reneromathy associated T cell lymphoma	poorly differentiated pancreatic carcinoma refractory angioimmunoblastic T-cell lymph refractory enteropathy associated T cell lym refractory hepatosplenic T-cell lymphoma relapsed angioimmunoblastic T-cell lympho relansed reteromathy associated T cell lympho	(8,18E-04 18,18E-04 8,18E-04 18,18E-04 18,18E-04 18,18E-04				POLE RRM2 POLE R
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hemato Cancer, Hematological Disease, Immunoli Cancer, Hematological Disease, Immunoli Cancer, Gastrointestinal Disease, Hemato	atpancreatic carcinoma gangioimmunoblastic T-cell lymphoma generopathy associated T cell lymphoma gangioimmunoblastic T-cell lymphoma generopathy associated T cell lymphoma khepatosplenic T-cell lymphoma	pootly differentiated pancreatic carcinoma refractory angioimmunoblastic T-cell lymph refractory enteropathy associated T cell lym refractory hepatosplenic T-cell lymphoma relapsed angioimmunoblastic T-cell lymphom relapsed enteropathy associated T cell lym relapsed hepatosplenic T-cell lymphoma	c8,18E-04 n8,18E-04 x8,18E-04 x8,18E-04 p8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04				POLE FRANZ POLE PRANZ POLE PRANZ POLE RRANZ POLE RRANZ
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hematic Cancer, Hematological Disease, Immunol Cancer, Hematological Disease, Immunol Cancer, Gastrointestinal Disease, Hematic Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic	stpanicreatic carcinoma grangioimnumobalisti T-cell lymphoma openteropathy associated T cell lymphoma khtepatospienic T-cell lymphoma apagioimnumobalisis T-cell lymphoma openteropathy associated T cell lymphoma Kepatospienic T-cell lymphoma Sextrahepatic cholangiocarcinoma Sjalibladder cancer	pootly differentiated pancreatic carrinoma refractory angioimmunoblastic T-cell lymph refractory enteropathy associated T cell lym refractory hepatosplenic T-cell lymphon relapsed angioimmunoblastic T-cell lymphon relapsed enteropathy associated T cell lymphon respect the patosplenic T-cell lymphoma resectable extrahepatic cholangiocarcinom resectable galibalder cancer	c8,18E-04 n8,18E-04 n8,18E-04 p8,18E-04 p8,18E-04 a,18E-04 a,18E-04 a,18E-04 a,18E-04 a,18E-04 a,18E-04				POLE RRND POLE RRND POLE RRND POLE RRND POLE RRND POLE RRND POLE RRND
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hernato Cancer, Hematological Disease, Immunoi Cancer, Hematological Disease, Immunoi Cancer, Gastrointestinal Disease, Hernato Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic	stpanicreatic carcinoma segnalismumobilastis T-cell lymphoma genetropathy associated T cell lymphoma opagangiummunoblastic T-cell ymphoma opagangiummunoblastic T-cell symphoma khepatosplenic T-cell symphoma Sextalbeputic Cholorgiocarcinoma Silver cholangiocarcinoma Silver cholangiocarcinoma	poorly differentiated pancreatic carinoma refractory anjoinmunobiasic T-cell ymph refractory enteropathy associated T cell ymphoma relapsed angoimmunobiastic T-cell ymphoma relapsed hepatophina sicolated T cell ymphoma relapsed hepatophina (T-cell ymphoma relapsed hepatophina) cell ymphoma resectable galladider cancer resectable alladider cancer resectable pancal y dancer de pancreatic c	c8,18E-04 h8,18E-04 k8,18E-04 k8,18E-04 k8,18E-04 k8,18E-04 k8,18E-04 k8,18E-04 k8,18E-04 k8,18E-04 k3,18E-04 k3,18E-04				POLE FRANZ POLE RANZ POLE
Cancer, Gastrointesinal Disease, Hemato Cancer, Hematological Disease, Immunoli Cancer, Hematological Disease, Immunoli Cancer, Gastrointesinal Disease, Hemato Cancer, Gastrointesinal Disease, Hepatic Cancer, Gastrointesinal Disease, Hepatic Cancer, Gastrointesinal Disease, Hepatic Cancer, Gastrointesinal Disease, Hepatic Cancer, Castrointesinal Disease, Hepatic Cancer, Fadocrine System Disorders, Gar Organismal Injury and Ahnormalities, Ren Disease Armaneal Injury and Ahnormalities, Ren	siparicrisatic cardroma apragiorimmobiastis T-cell ymphoma prenteropathy associated T cell ymphoma agangiorimmuobiastic T-cell ymphoma schargenteropathy associated T cell ymphoma scharthepatic chalongiocarritoma Spatibilatior cancer Sharthepatic chalongiocarritoma Storet Ablangiocarritoma stlocathy advanced pancreatic cancer altrestista Phories	poorly differentiate pancreatic carionme refractory angiomunolbastic T-cell ymphoma refractory networkspleric T-cell ymphoma relapsed angioimmunoblastic T-cell ymphoma relapsed angioappleric T-cell ymphoma resectable angioappleric T-cell ymphoma resectable galibalder cancer resectable galibalder cancer resectable icaliagiocarritoma unresectable icali yadnanced pancreatic c interstata licoxia o lidengy	c8,18E-04 n8,18E-04 s8,18E-04 s8,18E-04 s8,18E-04 s8,18E-04 s8,18E-04 s8,18E-04 s8,18E-04 s8,18E-04 s8,18E-04 s8,18E-04 s8,18E-04		0,532	bias	POLERAND POLERAND POLERAND POLERAND POLERAND POLERAND BUB COLLARD POLERAND BUB COLLARD POLERAND
Cancer, Gastrointesinal Disease, Hemato Cancer, Hematological Disease, Immunoli Cancer, Hematological Disease, Immunoli Cancer, Gastrointesinal Disease, Hemato Cancer, Gastrointesinal Disease, Hemato Cancer, Gastrointesinal Disease, Hemato Cancer, Gastrointesinal Disease, Hemato Cancer, Castrointesinal Disease, Hemato Cancer, Coganismal Injury and Abnormalities, Ren Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Ren Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Ren Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	Injpancreatic carcinoma spranterostatik Carell ymphoma spranterostatik Carell ymphoma spranterostatik Carell ymphoma thepatiospicint - Carell ymphoma spranterostatik angele spranter Sextrahepatic chicangiccarcinoma Spatibilided care of man Satistikagen og pinnesitic cancer sinterstitia (Norsek) subrestitic ancer Bielenatic cancer bielenatic cancer	poorly differentiated pancreatic carcinome relatociary angioantic C-ell lymph relatociary enteropathy associated T cell lymph relapsed enteropathy associated T cell lymph relapsed enteropathy associated T cell lymphona resectable estimatesine T-cell lymphona resectable estimatesine T-cell lymphona resectable cell lympho	c8,18E-04 n8,18E-04 8,18		0,532	bias	POLE RNIL POLE RNIL POLE RNIL POLE RNIL POLE RNIL POLE RNIL POLE RNIL BUERS COLLAR APTHLI REN SIBIIS COLLAR APTHLI REN ANDCA SPRUALIRA BIRG, BURGA 1, BUB 1, BUB 1B, C10x199, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CDC20, CENPE, CENPF, DAL SPRIJ POLE RNIL
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hermato Cancer, Hermatological Disease, Immunoli Cancer, Hermatological Disease, Immunoli Cancer, Gastrointestinal Disease, Herpato Cancer, Gastrointestinal Disease, Herpato Cancer, Gastrointestinal Disease, Herpato Cancer, Endocrino System Disorders, Ga Organismal Injury and Abnormalite, Ren Cancer, Organismal Injury and Abnormalite Childra Assembly and Organizzation Concer, Cancibrocular Disease, Hermatol	tippincreatic curcinoma aprediorimunoblastis T-cell hymphoma dynagolomimunoblastis T-cell hymphoma dynagolomimunoblastis T-cell hymphoma dynagolomimunoblastis T-cell hymphoma dynagolomimunoblastis T-cell hymphoma dynagolomimunoblastis to cella dynagologi dynagologi dynagologi dynagologi Sentarlegatis chalangocarcinoma diametristia thosia alametristia thosia dihemast cancer madification	poorly differentiated parcreates carcinome relations angiomunoblastic Trail ymph- refractory neptotoprinci Trail ymph- refractory neptotoprinci Trail ymphoma relapeed angiomunoblastic Trail ymphoma relapeed angiomunoblastic Trail ymphoma resectable galfbladder cancer resectable galfbladder resectable galf	c8,18E-04 n8,18E-04 8,18E-04 g8,18E-04 g8,18E-04 g8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,37E-04 8,37E-04 8,37E-04		0,532	bias	POLE RRND POLE RRND RRND RRND RRND RRND RRND RRND RRND
Cancer, Gastrointesinal Disease, Hematio Cancer, Hematological Disease, Iematudo Cancer, Gastrointesina Disease, Hepatic Cancer, Organismal Injury and Abnormali Cancer, Organismal Injury and Abnormali Cancer, Organismal Injury and Abnormali Cancer, Cradiovascular Disease, Hemato Cancer, Cradiovascular Disease, Hemato Cancer, Cradiovascular Disease, Hemato Cancer, Cradiovascular Disease, Hemato Cancer, Cradiovascular Disease, Hemato	Tapioneste curritorian apredenzipati suscitade T cell Imphoma sperekergahy associated T cell Imphoma sperekergahy associated T cell Imphoma serekergahy associated T cell Imphoma Sental-guide chalangocastroma Sental-guide chalangocastroma Silver chalangocaricoma silver chalangocaricoma silverabili aprocessi cancer andifactan endifactan amenia modifactan oreflactory amenia with excess blasts oreflactory amenia with excess blasts	poorty differentiated panceatic carationan micratory angiormadiate. Teal Inputs Intentiona y angiormadiate. Teal Inputs Intentiona y hepatospheric Toal Inputsonan relapada angiormadostis. Teal Inputson researable galibladder cancer mescitable locally advanced panceatic unresectable locally advanced panceatic insegnated locally advanced panceatic insegnated besits cancer motification of cytosel cancer methaction y amenia with encess blasts and panotematic cancer methaction y amenia with encess blasts and panotematic cancer motification of cytosel cancer cancer methaction y amenia with encess blasts and panotematic or these cancer cell methaction methaction y amenia with encess blasts	(8,18E-04 8,37E-04 8,37E-04 8,57E-04 8,57E-04 8,57E-04 8,57E-04 8,57E-04	Increased	0,532	bias	POLE RMID POLE RMID POLE RMID POLE RMID POLE RMID POLE RMID POLE RMID POLE RMID BURL COLLAR APPTH-L REN BURL COLLAR APPTH-L REN AVC2 ASPT ALIRNA BIRCA BIRCA I JUB I BUB I B. C104/90, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CDC20, CENPE, CENPF, DATA AVC2 ASPT ALIRNA BIRCA BIRCA BUB I BUB I B. C104/90, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CDC20, CENPE, CENPF, DATA AVC2 ASPT ALIRNA BIRCA BIRCA BUB I BUB I B. C104/90, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CDC20, CENPE, CENPF, DATA AVC2 ASPT ALIRNA BIRCA BIRCA BUB I BUB I B. C104/90, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CDC20, CENPE, CENPF, DATA AVC3, ASPT ALIRNA BIRCA BUC I DCP I, CDK1, DLCAPE, ESR 1, GRC, MELK, PBK, PLK1, PTHLH BURC3, BIRCA I BURCA I CTOCYCE (PML)
Cancer, Gastrointestina Disease, Hennato Cancer, Hennatological Disease, Immunol Cancer, Hennatological Disease, Immunol Cancer, Castrointestina Disease, Hegato Cancer, Gastrointestinal Disease, Hegato Cancer, Castrointestinal Disease, Hegato Cancer, Castrointestinal Disease, Hegato Cancer, Castrointestinal Disease, Hegato Cancer, Castrointestina Disease, Hegato Cancer, Castrointestina Disease, Hegato Cancer, Castrointestina, Celutar Growthen Calcular Aseemby and Coglanization Cancer, Castrointestina, Celutar Growthen Celutar Development. Celutar Growthen Celutar Development. Celutar Growthen Sci Connection Taisue Disordere, Development	spectrastic curritorian appricrimum/ballisti T-cell kmphoma bijerkengangkimi T-cell kmphoma bijerkengangkimi T-cell kmphoma bijerkengangkimi T-cell kmphoma bijerkengangkimi T-cell kmphoma Sentarbegand Umphoma Sentarbegand Umphoma Sentarbega	poorty differentiated parovasile carationan entendos angiornadiase. Ted Tryphon entendos y angiornadiase. Ted Tryphon refractory hepatospiene". Ted Tryphona misjaed angiornadiase. Ted Tryphon relapida di postaspiene". Ted Tryphona rescatable antibaposite. Ted Tryphonan rescatable antibaposi	68,18E-04 89,18E-04 89,18E-04 89,18E-04 89,18E-04 89,18E-04 89,18E-04 89,18E-04 89,18E-04 89,18E-04 89,18E-04 89,37E-04	Increased	0,532	bias	POLE RMID POLE RMID POLE RMID POLE RMID POLE RMID POLE RMID POLE RMID POLE RMID POLE RMID BUILS COLLAAPTHLIKEN ANDCA ASPHAURKABIRCS BMID; BILBUB1B, C10M90, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CDC20, CENPE, CENPF, DAI BUIRTS, COLLAAPTHLIKEN ANDCA ASPHAURKABIRCS, BMID; BICA1, BUB1, BUB1B, C10M90, CCNB1, CCNB2, CCNE1, CDC20, CENPE, CENPF, DAI BURTS, BICA1, BUB1, CCNE1, CDCP1, CDK1, DLCAPS, ESR 11, GKC, MELK, PBK, PLK1, PTHLH AURKABIRCS, BICA1, BUB1, CCNE1, CDCP1, CDK1, DLCAPS, ESR 11, GKC, MELK, PBK, PLK1, PTHLH AURKABIRCS, BICA1, BUB1, CCNE1, CDCP1, CDK1, DLCAPS, ESR 11, GKC, MELK, PBK, PLK1, PTHLH AURKABIRCS, BICA1, DCC25, CLME1
Cancer, Gastonietaria Disease, Irenauto Cancer, Hanatologica Disease, Irenauto Cancer, Hanatologica Disease, Irenauto Cancer, Gastronietaria Disease, Hegato Cancer, Gastronietaria Disease, Hegato Cancer, Gastronietaria Disease, Hegato Cancer, Edacorter System Disorders, Cancer, Cancer, Castronietaria Disease, Hegato Cancer, Castronietaria Disease, Hegato Cancer, Castronietaria Disease, Hegato Cancer, Castronietaria Disease, Hegato Calutari Asembi yand Charomato Calutari Calcutari Calutari Calcutari Calutari Calcutari Calutari Calcutari Calutari Calcutari Calutari Calcutari Calutari Calcutari Calutari Calcutari Calutari Calutari Calutari Calutari Calcutari Calutari	Taparicestic curritoria apparicentical curritoria perieterspating tablecities T cell tyrehoma specieterspating tablecities T cell tyrehoma tyrehoma tablecities the tyrehoma tyre	podry differentiated pancestic caracinoma micratory angiormadiate. Teal Inputs Intentionaly angiormadiate. Teal Inputs Intentionaly hepatoplanetic Teal Inputs Interpade angiormanobalisti. Teal Input Inputs Inputs Inputs International Inputs Inputs International Inputs Inputs International Inputs Inputs International Inputs Inputs International Inputs International Inputs Inputs International Inputs International Inputs International Inputs Inputs Inputs International International International Inputs International International	68,18E-04 89,18E-04 88,18E-04 88,18E-04 88,18E-04 88,18E-04 88,18E-04 88,18E-04 88,18E-04 88,18E-04 88,18E-04 88,18E-04 88,18E-04 88,18E-04 88,37E-04 89,38E-04 9,34E-04 9	Increased	0,532	bias	POLE RRND POLE RRND RND ASPM JURCA BIRCS BMP6 BRCA1, BUB1 BUB1B,C10wf90,CCNB1,CCNB2,CCNE1,CDC20,CENPE,CENPF,DA1 BURC3,DSFM JURCA,BIRCS BMP6,BRCA1,BUB1,BUB1B,C10wf90,CCNB1,CCNB2,CCNE1,CDC20,CENPE,CENPF,DA1 BURC3,BRCA1,BUB2,COLES,LDC21,CDC21,CDC30,CCNB1,CCNB2,CCNE1,CDC20,CENPE,CENPF,DA1 BURC3,BRCA1,BUB2,COLES,LDC21,CDC31,CDC31,CDC32,CCNB1,CCNB2,CCNB1,CCNB2,CCNB1,CDC30,CCNB1,CCNB2,CCNB1,CDC30,CCNB1,CCNB2,CCNB1,CDC30,CCNB1
Cancer, Gastrointestina Disease, Hennato Cancer, Hennatologica Disease, Immuno Cancer, Hennatologica Disease, Immuno Cancer, Gastrointestina Disease, Hennato Cancer, Gastrointestina Disease, Hegata Cancer, Gastrointestina Disease, Hegata Calcular Asemby and Craganization Calcular Destrointestina Calcular Cancer, Brancine System Disorders, Developme Calcular, Endocrine System Disorders, Developme Calculor, Endocrines System Disorders, Developme Calculor, Endocrines Development Cancer, Endocrines Development Cancer, Endocrines Hegata Disorders, Development Cancer, Endocrines Development Cancer, Endocrines Hegata Disorders, Development Cancer, Endocrines Dev	hiperiorestic curritorian appriorestic particular Tool Impriorian aprenteroparty associated Tool Impriorian aprenteroparty associated Tool Impriorian aprenteroparty associated Tool Impriorian Sentaneguic charangocastroma Sentaneguic charangocastroma Sentaneguic charangocastroma Siter charangocarcitorian allocativ advanced pancreatic cancer andification amenia with excess blasts cell pollesation oreflactory amenia with excess blasts of pollesation ansurestications function tratroco-pathyl ameurestications and CSUM partamatilian CSUM partamatilian	poorty differentiated pancestic cararioma micratory angiormadiate. Teal Inputs Intentional y angiormadiate. Teal Inputs Intentional Phatatappineni Toal Inputs Insignad angiormadostis. Teal Inputs Insignad angiorducida Teal Input Insignad Inguitadostis Teal Inputs Insignad Inguitadostis Teal Inputs Insignad Inguitadostis Teal Inputs Insignada Inguitadostis Teal Inputs Insignada Inguitadosti Teal Inputs Insignada Inguitadosti Teal Inputs Insignada Inguitadosti Teal Inputs Inguitada Ibesist cancer microcoptavia Insignada Ibesist cancer Indication of Coldwellon Intercoro Isano Cancer Indicatoria Informatic Inputs Indicatoria Informatic Inputs Intercoro Isano Indicatoria Informatic Inputs Indicatoria Informatic Informatic Inputs Informatic Informatic	c8,18E-04 n8,18E-04 n8,18E-04 n8,18E-04 n8,18E-04 n8,18E-04 n8,18E-04 s8,18E-04 s8,37E-04 s8,37E-04 s8,37E-04 s8,37E-04 s9,34E-04 9,34E-04 9,34E-04	Increased	0,532	bias	POLE RMIQ POLE RMIQ POLE RMIQ POLE RMIQ POLE RMIQ POLE RMIQ POLE RMIQ POLE RMIQ BUBIS COLLAGASTHLIKEN BUBIS COLLAGASTHLIKEN AND ASPH AURYCABHCS BMIG BICA1 BUB1 BUB1B C10xH00 CCNB1 CCNB2 CCNE1 CDC20 CENPE CENPF. AND ASPH AURYCABHCS BMIG BICA1 BUB1 BUB1B C10xH00 CCNB1 CCNB2 CCNE1 CDC20 CENPE CENPF. AND ASPH AURYCABHCS BMIG BICA1 BUB1 BUB1B C10xH00 CCNB1 CCNB2 CCNE1 CDC20 CENPE CENPF. AND ASPH AURYCABHCS BMIG BICA1 BUB1 BUB1B C10xH00 CCNB1 CCNB2 CCNE1 CDC20 CENPE CENPF. AND ASPH AURYCABHCS BMIG BICA1 BUB1 BUB1B C10xH00 CCNB1 CCNB2 CCNE1 CDC20 CENPE CENPF. AND ASPH AURYCABHCS COLOR COLOR SCIENCE ASPM CONSCI CCNE1 COCH COCH AS SR1 / FEMIT 1 / MCC1 / HMMR / NSTRN, MM67 MYCL, NUSAP1 / POLE RM2 S BECA1 CCDB1 CDC22C COCH
Cancer, Gastrointestina Disease, Hernats Cancer, Heathorghol Disease, Hernats Cancer, Heathorghol Disease, Ihrenato Cancer, Gastrointestinal Disease, Hernato Cancer, Gastrointestinal Disease, Hernato Cancer, Gastrointestinal Disease, Hegati Cancer, Endoorline System Disordens, Ga Cancer, Endoorline System Disordens, Ga Cancer, Castrointestinal Disease, Hegati Cancer, Castrointestinal Disease, Henato Cancer, Castrointestina, Dis Cancer, Castrointestina, Dis Cancer, Castrointestina, Branchisto, Dis Cancer, Castrointestina, Branchisto, Dis Cancer, Castrointestina, Branchisto, Dis Cancer, Castrointestina, Parkar Cancer, Castrointestina, Castrointestina, Dis Cancer, Castrointestina, Castrointestina, Dis Cancer, Castrointestina, Branchisto, Dis Cancer, Castrointestina, Branchisto, Dis Castrointestina, Branchisto, Castrointestina, Dis Castrointestina, Branchisto, Castrointestina, Dis Castrointestina,	hiperioresic curritoma operations and the set of the set of the operation of the set of the set of the operation of the set of the set of the operation of the set of	porty differentiated parovalia: carationan entanologi anglomanolatar. Tedi Iryingi refractory hapatoparena Cost Iryingi refractory hapatoparolatas. Tedi Iryingi milagead anglomatokas. Tedi Iryingi mescatable cathagead contanol umescatable cathagead contanol umescatable cathagead contanol umescatable cathagead solution meditation of cytosteelion meditation of cytosteelion meditation of cytosteelion metacopathe uncertain neurocophaty neuromolocines tano primacopathead cancer interastial concer interastian for the solution primacopathead cancer interastian for the solution primary pertoneal cancer interprimary Detroseal cancer interprimary Detroseal cancer interprimary Detroseal cancer interprimary Detroseal cancer interprimary Detroseal cancer inter-	c8,18E-04 n8,18E-04 n8,18E-04 n8,18E-04 n8,18E-04 n8,18E-04 n8,18E-04 s8,18E-04 s8,37E-04 s8,37E-04 s8,37E-04 s8,37E-04 s8,37E-04 s9,31E-04 9,34E-04	Increased	0,532 2,723 2,164	bias	POLE RMILE POLE RMILE BUBIE BOLGALAAPTHLIK REN ANCRA SPHILAR REN BUBIE BOLGALAAPTHLIK REN BUBIE BOLGALAPTHLIK REN BUBIE BOLGALAP
Cancer, Gastrointestina Disease, Irenauto Cancer, Henatologica Disease, Irenauto Cancer, Henatologica Disease, Irenauto Cancer, Gastrointestinal Disease, Hegatic Cancer, Gastrointestinal Disease, Hegatic Cancer, Gastrointestinal Disease, Hegatic Cancer, Castrointestinal Disease, Hegatic Calcular Assembly and Organization Cancer, Castrointestina Disease, Henato Calcular Assembly and Organization Cancer, Castrointestina Disease, Henato Cancer, Castrointestina Disease, Denato Cancer, Castrointestina Disease, Organiz Calc Cycle, Calcular Assembly and Organiz Cell Cycle Calc Cycle Calc Cycle Calcular, Castrointestinal Disease, Organiz	Taparicreatic curritorian apparicemento Marcia To et Improhema appariemento Marcia To et Improhema appariemento Marcia To et Improhema appariemento Marcia To et Improhema functional paragrammento appariemento appariemento Marcia apparicetatic cancer alticular y annocal paracetatic cancer attenter cancer eternastican appariemento appariemento eternastican appariemento appariemento appariemento eternastican appariemento appariemento eternastican appariemento appariemento eternastican appariemento appariemento eternastican appariemento eternastican appariemento	porty direntiated pancestic carationa micrology angiomadulatic. Teal Input reflactory heptotopicne'i Cost Inputona reflactory heptotopicne'i Cost Inputona reflactory heptotopicne'i Cost Inputona rescatable autoritatic chalangocaritorna rescatable schedingocaritorna rescatable schedingocaritorna rescatable basis classific chalangocaritorna rescatable	c8,18E-04 8,18E-04 8,37E-04 9,34E-04 9,34E-04 9,34E-04 9,34E-04 9,34E-04 9,81E-04 4,062	Increased	0,532 2,723 2,164	bias	POLE RING POLE RING RING ALBRIT AND REAL POLE RING POLE RING RING ALBRIT AND REAL RING ALBRIT AND REAL RING ALBRIT AND REAL RING ALBRIT AND REAL RING ALBRIT AND REAL RING ALBRIT AND REAL RING ALBRIT AND REAL REAL REAL REAL REAL REAL REAL REAL
Cancer, Gastrointestina Disease, Hemato Cancer, Henatological Disease, Immuno Cancer, Henatological Disease, Immuno Cancer, Gastrointestinal Disease, Hegato Cancer, Graginatinal Huyay and Abromatil Cancer, Organisma Inivy and Abromatiles, Ren Calcular Assembly and Cognization Calcular Development, Celdual Growth an Celluar Development, Celdual Growth an Celluar Development, Celdual Growth an Celluar Development, Cellual Growth an Celluar Development, Celluar Stroit Development Celluar Development, Celluar Development Celluar D	Tapofordesic curritorian approximum Carely may be a prevence party associated T cell tymphoma sequences parts and the sequences of the sequences of the sequences of the sequenc	poorty differentiated pancesatic cararioma micratory angiormadiate. Teal Inputs Intentional angiormadiate. Teal Inputs Intentional pagatagenetic Teal Inputsonal Insighaed angiormadostasi. Teal Inputsonal Insighaed Angioratory and Intentional Insighaed Angioratory and Intentional Insighaed Insighaed Intention Insighaed Incubic Inputsonal Insighaed Insighaed Intention Insighaed Insighaed Intention Insighaed Insighaed Intention International Intentional Intention International Intention International Intention International Intention International Intention International Intention International Interna	c8,18E-04 8,18E-04 8,37E-04 8,37E-04 8,37E-04 8,37E-04 8,37E-04 8,37E-04 9,34E-04 <	Increased	0,532 2,723 2,164	bias	POLE RING POLE RING BUILS COLLAGATION REAL POLE RING BUILS COLLAGATION REAL BUILS COLLAGATION REAL BUILS COLLAGATION REAL RING BERCH AND REAL BUILS COLLAGATION REAL RING BERCH RING BUILS COLLAGATION REAL RING BERCH RING BUILS COLLAGATION REAL RING BERCH RING BUILS COLLAGATION REAL RING BERCH RING BUILS COLLAGATION REAL RING REAL RING BUILS COLLAGATION REAL RING REAL RING BUILS COLLAGATION REAL RING REAL RING BUILS COLLAGATION REAL RING REAL RING BUILS REAL RING REAL RING BUILS REAL RING REAL RING BUILS REAL RING REAL RIN
Cancer, Castoroinetaria Disease, Hennato Cancer, Heastoroinetaria Disease, Internato Cancer, Castoroinetaria Disease, Internato Cancer, Castoroinetaria Disease, Henato Cancer, Castoroinetaria Disease, Henato Cancer, Castoroinetaria Disease, Hegati Cancer, Endocrine System Disorders, Cancer, Handberg Cancer, Endocrine System Disorders, Cancer, Castoroinetaria Cancer, Castoroinetaria Disease, Henato Cancer, Castoroinetaria Disease, Menato Cancer, Castoroinetaria, Destanto Cancer, Castoroinetaria Disease, Menato Cancer, Castoroinetaria Disease, Organiza Cancer, Castoroinetaria Disease, Organiz Cancer, Castoroinetaria Disease, Organiz Cancer, Castoroinetaria Disease, Organiz Cancer, Castoroinetaria Disease, Organiz	Taparicestic curritorias apparicenter curritorias apparicentimuto bateria (Toel Ingelman apparicentimuto bateria) per dencipative Toel Toel Toel Toel apparicentimuto bateria per dencipative Toel Ingelman apparicentimuto bateria Startibustica Coel Ingelman Subrategiato characteria Subrategiato characteria Subrategiato characteria Subrategiato characteria dencipative cancer alisteratifiat forosis unitarios and coel and coel and coel and coel and coel and coel and coel	porty differentiated pancestic carations intentionly angiomanolatic. Tedi Irying Intentionly angiomatolitic. Tedi Irying reflectory hepatospiceni. Tedi Irying reflectory hepatospiceni. Tedi Iryin residue da angiomatolisis. Tedi Irying rescalable asthapolisis. Tedi Irying rescalable asthapolisis. Challinguesti construction and angio angio angio rescalable asthapolisis. Challinguesti construction and angio angio rescalable asthapolisis. Challinguesti construction and angio rescalable asthapolisis. Challinguesti construction and angio rescalable asthapolisis. Challinguesti construction of protoseletion modification of protoseletion relations and the access basis contrological patientian interview of basis transition primary performed cancer on lines papersineand absociasi continen- amenta in (D2) and patient transition papersineand astrony continensis papersineand astrony continensis papersinean data concer interviews papersineand cancer of the constant contentinensis papersinean data concer of the contentinensis papersis papersinean data concer of the conten	c8,18E-04 s8,18E-04 s8,37E-04 s8,51E-04 s8,93E-04 9,34E-04 1,05E-03 1,07E-03	Increased	0,532 2,723 2,164 0,353	bias	POLE RMILE POLE RMILE BIRL SOLLAWAS PHILE RMILE BIRL SOLLAWAS PHILE RMILE BIRL SOLLAWAS PHILE RMILE BIRL SOLLAWAS APPLICATE OF THE SOLUTION OF THE SO
Cancer, Castoroinetand Disease, Iremato Cancer, Henatological Disease, Iremato Cancer, Henatological Disease, Iremato Cancer, Castoroinetania Disease, Henato Cancer, Castoroinetania Disease, Hegato Cancer, Castoroinetania Disease, Hegato Caluar Assembly and Organization Caluar Assembly and Organization Caluar Development, Celduar Growth an Callor Castoroinet, Calduar Growth an Callor Callor, Callador Boese, Henato Cancer, Castoroinetania Disease, Organiz Cancer, Castoroinetania Disease, Organiz Callor, Chalar Assembly and Organiz Callor, Callor Development, Celduar Growth an Callaria, Castoroineta Disease, Organiz Callor, Callador Assembly and Organiz Callor, Castoroineta Disease, Organiz Callor, Callador Abenomatise Calluar Development, Celduar Growth an Callador Development, Celduar Growth an Callador Development, Calladar Growth an Callador Development, Calladar Growth an Callador Development, Calladar Growth an	Tapancesic curricina apparesente curricina presentergality associated T cell tymphoma suppresentergality associated T cell tymphoma suppresentergality associated T cell tymphoma supertengality associated T cell tymphoma subcelly advanced paroceatic cancer associated associated T cell tymphoma subcelly advanced paroceatic cancer advanced paroceatic cancer advanced associated associated technesis cancer modification and associated associated associated technesis and associated technesis and the access blass of cell positionaria advanced paroceatic cancer advanced associated technesis and the access blass of cell positionaria advanced associated associated technesis and the access blass of cell positionaria advanced associated technesis and the advanced associated technesis associated associated technesis associated technesis associated	porty direntiated pancestic carations entendor supportunities (and instru- tendors) and pancestical in the instru- retractory hepatospicenic T-cell symptoma- retractory hepatospicenic T-cell symp- retractory and and and and and and and and executable is entendorship characteristical executable is entendorship characteristical instructional floors of bidowy unitaries cancer instructional floors of bidowy instructional floors of bidowy instructional floors instructional floors of bidowy instructional floors formation of centroscare particle cancer instruction of bidows cell lines ingel netices advectorial floors of bidowy of the participation of bidows cell lines instruction of bidows cell lines instruction of bidows cell lines instruction of bidows cell lines instruction of bidows cell lines instructional cells	c8,18E-04 s8,18E-04 s8,37E-04 s8,51E-04 s8,93E-04 9,34E-04 1,05E-03 1,07E-03 1,17E-03 1,13E-03	Increased	0,532 2,723 2,164 0,353 1,446	bias	POLE RING POLE RING POLE RING POLE RING POLE RING POLE RING POLE RING POLE RING POLE RING POLE RING BUB COLLARS AND POLE RING BUB COLLARS AND POLE RING BUB COLLARS AND POLE RING BUB COLLARS AND POLE RING AND POLE RING BUB COLLARS AND POLE RING STATUS AND POLE R
Cancer, Gastrointestina Disease, Hernats Cancer, Hastrointestina Disease, Hernats Cancer, Heantologica Disease, Immuno Cancer, Gastrointestina Disease, Hernat Cancer, Gastrointestina Disease, Hegat Cancer, Gastrointestina Disease, Hegat Cancer, Castrointestina Castrointestina Calcure, Castrointestina Castrointestina Cancer, Castrointestina Disease, Castrointestina Castrointestina Disease, Castrointestina Castroint	Tapofordesic curricroma operations and a second of the second operation of the second of the second second operation of the second of the second second operation of the second operation of the second operation operation operation of the second operation operation operation operation of policitic operation operation operation operation interesting through the second operation operation operation operation interesting through the second operation operation operation operation interesting through the second operation operat	porty differentiated parovasile carationan entendos argumentadas r. Edi riporta intendos y angiornano alta argumenta refractory hepatospiene". Toda Impedia integlada angiornano alta argumenta integlada angiornano alta argumenta relapada angiornano alta argumenta relapada angiornano alta argumenta relapada angiornano alta argumenta relapada angiornano alta argumenta relacada de angiorna angiorna relacada de angiorna angiorna relacada de angiorna angiorna maditadan di colas de la dela media angiorna angiorna angiorna maditadan di colas de la dela metalo de angiorna angiorna relación alta angiorna angiorna primar partenesa da colas en primar partenesa da colas en primar partenesa da colas en primar partenesa da colas partenes in la delas da colas en partenes in la delas da colas en la poleración di fondas col lines ingelinetas adenocacionna antes in la delas da colas insestita facosa o la poleración di colas col lines ingelinetas adenocacionna antes in la delas da colas insestitas adenocacionna antes in la delas da colas insestitas adenocacionna antes in la delas da colas col insestitas adenocacionna antes in la delas da colas insestitas adenocacionna antes in la delas da colas colas insestitas adenocacionna antes in la delas da colas insestitas adenocacionna antes in la delas da colas colas insestitas adenocacionna antes in la delas da colas colas inses polemento di fondas colas inses	cd.18E-04 sk.18E-04 sk.37E-04 sk.37E-04 <td< td=""><td>Increased</td><td>0,532 2,723 2,164 0,353 1,446</td><td>bias</td><td>POLE RIND POLE RIND BUB SCOLAUASTHULKEN AND ARPHAURYABICS BIRCH SCOLAUST BUB SCOLAUSTHULKEN AND ARPHAURYABICS BIRCH SCOLAUSTBUB SCOLAUST BUB SCOLAUSTHULKEN AND ARPHAURYABICS BIRCH SCOLAUSTBUB SCOLAUST BUB SCOLAUST SCOLAUSTBUB BUB SCOLAUST SCOLAUSTBUB BUB SCOLAUST SCOLAUSTBUB BUB SCOLAUS</td></td<>	Increased	0,532 2,723 2,164 0,353 1,446	bias	POLE RIND POLE RIND BUB SCOLAUASTHULKEN AND ARPHAURYABICS BIRCH SCOLAUST BUB SCOLAUSTHULKEN AND ARPHAURYABICS BIRCH SCOLAUSTBUB SCOLAUST BUB SCOLAUSTHULKEN AND ARPHAURYABICS BIRCH SCOLAUSTBUB SCOLAUST BUB SCOLAUST SCOLAUSTBUB BUB SCOLAUST SCOLAUSTBUB BUB SCOLAUST SCOLAUSTBUB BUB SCOLAUS
Cancer, Castorointesina Disease, Hennato Cancer, Hennatogola Disease, Immuno Cancer, Hennatogola Disease, Immuno Cancer, Castorointesina Disease, Hennato Cancer, Gastrointesina Disease, Hegadi Cancer, Gastrointesina Disease, Hegadi Cancer, Endocrine System Disorders, Garon Cancer, Castorointesina Disease, Hegadi Cancer, Castorointesina Disease, Hennato Caluar Dasonetti, Besad, Hennato Caluar Dasonetti, Besad, Hennato Cancer, Castorointesina Disease, Hennato Cancer, Castorointesina Disease, Hennato Cancer, Castorointesina Disease, Hennato Cancer, Castorointesina Disease, Menato Cancer, Castorointesina Disease, Organica Cancer, Castorointesina Disease, Organica Califord, Disease Disease, Organica Califord, Denatorointesina Cancer, Castorointesina Disease, Organica Califord, Disease, Disease, Organica Califord, Denatorointesina Cancer, Castorointesina Disease, Organica Califord, Disease, Disease, Organica Califord, Disease, Disease, Disease, Organica Califord, Disease, Disease, Disease, Organica Califord, Disease, Disease, Disease, Disease, Disease Califord, Disease, Disease, Disease, Organica Califord, Disease, Disease, Disease, Disease, Disease, Disease, Disease Califord, Disease, Disea	Taparicestic curritoma apparicentic curritoma apparicenticapitatic T cell tyrahoma apparicenticapitatic tell apparicenticapitatic tell apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitatic apparicenticapitati	porty differentiated pancestic carations microlicy angiomachiais. Teal inputs intentions angiomachiais. Teal inputs reflactory hepatopicent. Teal inputs reflactory hepatopicent. Teal inputs respect angiomachiais. Teal input escalable and angiomachiais. Teal input escalable and angiotacionan mescalable patholicy chalangiocacionan mescalable patholicy chalangiocacionan mescalable patholicy chalangiocacionan mescalable patholicy chalangiocacionan mescalable patholicy chalangiocacionan medication of protections medication of protections medication of protections medication of protections and in the caraction medication of protections medication of protections medication of brobast caractions primary perturbant cancer al lines poolesation of blobast caractions poolesation of blobast caractions primary perturbant cancer al lines poolesation of blobast caractions institution deplocation of DNA internstant fibrobast of DNA internstant of caraction of protections multinuclation of editions blobast caractions and blobast caracti	cd.18E-04 sk.18E-04 sk.37E-04 sk.37E-04 <td< td=""><td>Increased</td><td>0,532 2,723 2,164 0,353 1,446</td><td>bias</td><td>POLE RMILE POLE RMILE BIOL RALE AND POLE RMILE BIOL RALE AND POLE RMILE BIOL RALE AND POLE RMILE BIOL RALE AND POLE RMILE BIOL RALE RMILE BIOL RALE RMILE BIOL RALE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE CONFL CONTI GOOD RALE RMILE RMILE CONFL CONTI GOOD RALE RMILE CONFL CONTI GOOD RALE RMILE RMILE RMILE RMILE RMILE RMILE RALE RMILE RMILE RMILE CONFL CONTI GOOD RALE RMILE RMIL</td></td<>	Increased	0,532 2,723 2,164 0,353 1,446	bias	POLE RMILE POLE RMILE BIOL RALE AND POLE RMILE BIOL RALE AND POLE RMILE BIOL RALE AND POLE RMILE BIOL RALE AND POLE RMILE BIOL RALE RMILE BIOL RALE RMILE BIOL RALE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE BIOL RALE RMILE RMILE CONFL CONTI GOOD RALE RMILE RMILE CONFL CONTI GOOD RALE RMILE CONFL CONTI GOOD RALE RMILE RMILE RMILE RMILE RMILE RMILE RALE RMILE RMILE RMILE CONFL CONTI GOOD RALE RMILE RMIL
Cancer, Gastrointestina Disease, Irenauto Cancer, Henatologica Disease, Irenauto Cancer, Henatologica Disease, Irenauto Cancer, Gastrointestinal Disease, Hegatic Cancer, Gastrointestinal Disease, Hegatic Cancer, Gastrointestinal Disease, Hegatic Cancer, Castrointestinal Disease, Dension Cancer, Castrointestinal Disease, Organic Cancer, Castrointestinal Disease, Organic Cancer, Castrointestinal Disease, Organic Cancer, Castrointestinal Disease, Organic Cancer, Castrointestinal Disease, Organic Calcular Concer, Disease Annual Disease, Organic Calcular Cancer, Castrointestinal Disease, Organic Calcular Cancer, Castrointestinal Disease, Organic Calcular Cancer, Castrointest Disease, Disease Calvalar Development, Calduar Componities Calvalar Development, Calduar Componities Connector, Tissae Disocides, Development Connector, Tissae Disocides, Development Connector, Tassae Disocides, Development Connector, Tassae Disocides, Development Connector, Bascrointestinal Connectoristic Calvalar Development, Calvalar Componities Connector Issae Disocides, Development Connector Issae Disocides, Development Connector Issae Disocides, Development Cancer, Development, Calvalar Componities Connector Issae Disocides, Development Cancer, Development, Calvalar Componities Connector Development, Calvalar Componities Connector Development, Calvalar Componities Connector Development, Calvalar Componities Calvalar Development, Calvalar Componities Connector Development, Calvalar Componities Connector Development, Calvalar Componities Connector Development, Calvalar Componities Connector Development, Calvalar Componities Conne	Taploricestic curricina apprinterspatial constraints of the prohoma speciencipality associated T cell tyrphoma speciencipality associated T cell tyrphoma speciencipality associated T cell tyrphoma speciencipality associated T cell tyrphoma shoready associated T cell tyrphoma shoready advanced parocestic cancer astociaty advanced parocestic cancer associated association and stociaty advanced parocestic cancer association and the cancer modification association and the cancer modification association and the cancer modification and cancer modification and cancer modification association and the cancer modification and cancer and	porty direntiated pancestic carations ententions angiomenalisatic. Feel Inputs reflactory heptotopicnetic Tool Symphone reflactory heptotopicnetic Tool Symphone reflactory heptotopicnetic Tool Sym related angiomatomic challing back rescalable entention of the second statistical rescalable entention of the second statistical interface cancer interface and the second statistical rescalable back challing back rescalable statistical challing back rescalable statistical challing back rescalable statistical rescalable rescalable back challing back rescalable statistical rescalable rescalable back challing back rescalable statistical rescalable rescalable back challing back rescalable rescal		Increased	0,532 2,723 2,164 0,353 1,446	bias	POLE RING POLE RING RING POLE RING
Cancer, Gastrointestina Disease, Hennisto Cancer, Hastrointestina Disease, Hennisto Cancer, Hastrointestina Disease, Hennisto Cancer, Gastrointestina Disease, Hennisto Cancer, Gastrointestina Disease, Hegatio Cancer, Castrointestina Disease, Cheman Cancer, Castrointestina Disease, Organia Cancer, Castrointestina Disease, Organia Castrointestina Disea	Tapoforestic curricroma approximum Data Cost (Teol Impricona speretersparity associated Teol Impricona speretersparity associated Teol Impricona speretersparity associated Teol Impricona Sentimegranic Teol Impricona Interesting Teologia Sentimegranic Teol Impricona Interesting Teologia Sentimegranic Teol Impricona Interesting Teologia Sentimegranic Teol Sentimegranic Teol Sentimegranic Teol Impricona Interesting Teologia Impricona Interesting Teologia Impricona Impricona Interesting Teologia Impricona Interesting Teologia Impricona	porty differentiated parovalia: carationan entiatoby angiomachiais. Tedi Typica Interboy angiomachiais. Tedi Typica Interboy hapatopiano Salari. Tedi Typica Interboy hapatopiano Salari. Tedi Typica Interboy angiomachiais. Tedi Typica Interboy angiomachiais. Tedi Typica Interboy angiomachiais. Tedi Typica Interboy angio Salari. Changlocatarono mescatabe antapanya bandon gancenati o intersitali Rossi of Vadey umescatabe canada wanno gancenati o intersitali Rossi of Vadey Interboy anena wan wanno gancenation meditation of fotosletion meditation of fotosletion meditation of totosletion meditation of totosletion meditation of totosletion meditation of totosletion metacophay neuroncolorus tanto primary pattonel cancer primary pattonel cancer primary pattonel cancer primary pattonel cancer multinuctation of delis abornation of kidey of sporotophobati anominal morphology of sporotophobati abornati morphology of sporotophobati abornation of calis.	8,185-04 9,185-04 1,185-04 1,1	Increased	0,532 2,723 2,164 0,353 1,446	bias	POLE RING POLE RING BUBIS COLLAGASTHLIKEN AND ARTHUR BUBIS COLLAGASTHLIKEN BUBIS COLLAGASTH BUBIS CO
Cancer, Castoroinetaria Disease, Hernato Cancer, Hennatogola Disease, Inmunol Cancer, Hanatogola Disease, Inmunol Cancer, Castoroinetaria Disease, Hernato Cancer, Gastronitestinal Disease, Hegato Cancer, Gastronitestinal Disease, Hegato Cancer, Castoroinetaria Disease, Hegato Calutar Asembly and Cognization Calutar Davison Marchanol Calutar Davison Disease, Henato Cancer, Castoroinetaria Disease, Henato Cancer, Castoroinetaria Disease, Henato Cancer, Castoroineta Disease, Nenato Cancer, Castoroinetaria Disease, Nenato Cancer, Castoroinetaria Disease, Nenato Cancer, Castoroinetaria Cancer, Castoroinetaria Concercitor Tissue Disorden, Developmente Cancer, Castoroinetaria Concercitor Tissue Disorden, Developmente Cancer, Castoroinetaria Concercitor Tissue Disorden, Sevelopmente Cancer, Castoroinetaria Concercitor Tissue Disorden, Developmente Cancer, Castoroinetaria Concercitor Tissue Disorden, Developmente Cancer, Castoroinetaria	Tapérdésite curritoria appeidensity attackané T cell tyrohoma specielosapital pasochané T cell tyrohoma specielosapital tyrohoma specielosapita pasochano specielosapita pasochano specielosapita pasochano specielosapitano spe	porty direntiated pancestic carations microlina significant carations interaction and approximation of the con- relation participation of the con- relation of the control of the con- rescatable inter control of the con- trol of the control of the control of the control of the control of the con- trol of the control of the control of the control of the control of the con- trol of the control of the control of the con- trol of the control of the control of the con- trol of the control of the control of the polletion of the control of the con- trol of the control of the con- center in the control of the con- center in the control of the con- trol of	8,185-04 8,1	Increased	0,532 2,723 2,164 0,353 1,446	bias	POLE RING POLE RING BIT SOLUTION DET SOLUTI
Cancer, Castoroinetand Disease, Iremato Cancer, Henotologica Disease, Iremato Cancer, Henotologica Disease, Iremato Cancer, Castoroinetand Disease, Henote Cancer, Castoroineta Disease, Henote Cancer, Castoroineta Disease, Henote Cancer, Castoroineta Disease, Henote Cancer, Castoroineta Disease, Organic Cancer, Castoroineta Disease, Organic Castor, Castoroineta Disease, Organic Calcular Cancer, Castoroineta Disease, Organic Calcular Cancer, Castoroineta Disease, Organic Cancer, Castoroineta Disease, Organic Calcular Cancer, Castoroineta, Castoroineta, Castoroineta, Cancer, Castoroineta, Castoroineta, Castoroineta, Calcular Mantenator, Reschibarator, and Re Calcular Disease, Dispane, Disorders, Ga Cal Cycle, Internative System Disorders, Ga Cal Cycle	Taporicestic curricina approximatic curricina prevenzyatic cost previous prevenzyatic cost previous prevenzyatic cost previous prevenzyatic cost previous prevenzyatic cost previous prevenzyatic cost previous spatibility of cost spatibility of cos	porty direntiated pancestic carationa entendor supportendiate. Leal inputs refractory heptotopicanic Carationalise Leal inputs refractory heptotopicanic Casa Inputson entendor heptotopicanic Casa Inputson entended and inputso characterization executable settle obligation characterization researcharacterization characterization researcharacterization	8, 18E-04 8, 18E-04 8, 18E-04 9, 18E-04 9, 18E-04 9, 18E-04 9, 18E-04 8, 18E-04 9, 38E-04 9, 38E	Increased	0,532 2,723 2,164 0,353 1,446	bias	POLE RING POLE RING BIT COLLASS AND A RING RING POLE RING BIT COLLASS AND A RING RING RING RING RING POLE RING BIT COLLASS AND A RING RING RING RING RING RING RING BIT COLLASS AND A RING RING RING RING RING RING RING BIT COLLASS AND A RING RING RING RING RING RING RING RING BIT COLLASS AND A RING RING RING RING RING RING RING RING RING BIT COLLASS AND A RING RING RING RING RING RING RING RING RING BIT COLLASS AND A RING RING RING RING RING RING RING RING
Cancer, Gastrointestina Disease, Hernats Cancer, Hastrointogia Disease, Hernats Cancer, Hastrointogia Disease, Termano Cancer, Gastrointestinal Disease, Hernats Cancer, Gastrointestinal Disease, Hernats Cancer, Gastrointestinal Disease, Hegati Cancer, Castrointestinal Disease, Hendi Cancer, Castrointestina Disease, Hendi Cancer, Castrointestina, Disease, Hendi Cancer, Castrointestina, Disease, Hendi Cancer, Castrointestinal Disease, Chendi Cancer, Castrointestinal Disease, Organi Cancer, Castrointestinal Disease, Organi Castrointestina Disease, Organi Castrointestina Disease, Organi Castrointestina Disease, Organi Castrointestina Disease, Organi Castrointestina Disease, Pacido Castrointestina Disease, Pacido Disease, Pacido Disease, Distrointestina Disease, Pacido Disease, Distrointestina Disease, Pacido Disease, Distrointestina Disease, Pacido Distrointestina Disease, Pacido Distrointestina Distrointestina Distrointestina Distrointestina Distrointestina Distrointestina Distrointestina Distrointestina Distrointestina Distr	hiperiorises curational appaionismutobalisti Coel Imploma appaionismutobalisti Coel Imploma presentative and the appaionism presentative and the appaionism model calori model ca	porty differentiated parovasile carationan enterinativa argoinanciatasi. Teal injunci tertistos hapatospienen Toal hymphoma enteristos hapatospienen Toal hymphoma enteristos hapatospienen Toal hymphoma enteristos hapatospienen Toal hymphoma enteristas palibilidear cancer unescitable cathagolicacitosis chalangolicacitomo resectable galibilidear cancer unescitable cathagolicacitomo enteristas de la catalogue anteristas enteristas estas	8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,18E-04 8,38E-04 8,38E-04 8,38F-04 8,38F-04 8,38F-04 8,38F-04 8,38F-04 8,38F-04 8,38F-04 8,38F-04 8,38F-04 8,38F-04 9,34E-04 9,3	Increased	0.532 2.723 2.164 0.353 1.446	bias	POLE RMILE POLE POLE POLE POLE POLE POLE POLE POLE

Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Silver cholangiocarcinoma Cellular Compromise nucleation	liver cholangiocarcinoma nucleation of tumor cell lines	1,17E-03				BRCA1,POLE,RRM2 BRCA1 CCNF1 NEK2	3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiegrowth Developmental Disorder, Embryonic Develoabnormal morphology	growth of malignant tumor abnormal morphology of trophoblast	1,20E-03 1,20E-03		1,628		BIRC5, BMP6, BRCA1, CCNA1, ESR1, HMMR, MKI67, NCAPG, PLK1, PTHLH, RRM2, UBE2C BRCA1, CCNE1, E2F7, E2F8	12 4
Organismal Injury and Abnormalities, Renalrenal lesion Cancer, Organismal Injury and AbnormalitieHER2-positive breast cancer	renal lesion metastatic HER2-positive breast cancer	1,24E-03 1,30E-03		0,272		ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, BUB1B, CCNA1, CDCP1, CENPE, CENPF, CENPH, COL4A3, DLGAP5, ESR1, II ESR1, POLE, RRM2	24 3
Cancer, Hematological Disease, OrganismaB-cell neoplasm DNA Replication, Recombination, and RepsDNA damage response	B-cell neoplasm DNA damage response of cells	1,30E-03 1,31E-03				ADAMTSL3,AURKA,BRCA1,BUB1B,CCNB1,CCNB2,CDCA2,DCLK3,FERMT1,IL2RB,MKI67,POLE,RRM2,SHMT1,TDRD BRCA1,C10or/90,CDK1,DTL,PIDD1,PLK5,RAD54L,UBE2T	16 8
Molecular Transport quantity Cell Cycle, DNA Replication, Recombination	quantity of metal recombination of cells	1,34E-03 1,37E-03		1,588 0,600	bias	BMP6,ERFE,ESR1,Gm12253,IGKC,KCNE1B,NMUR2,PLA2G5,PIn,PON1,PTHLH,REN,TMPRSS6 ANKLE1,BRCA1,EXC1,PARPBP,RECQL4 DBCAL_ESCA1,EXC1,PARPBP,RECQL4	13
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitietallopian tube cancer Cell Cycle ploidy	fallopian tube cancer ploidy of epithelial cell lines	1,43E-03 1,44E-03				BRCARLESK1,POLE,RKM2 AURKB,NEK2,PLK1	3
Cardiovascular Disease, Developmenta Derandoni anemia, group A Cell Morphology, Embryonic Development, labnormal morphology	abnormal morphology of cone outer segment abnormal morphology of dilated seminiferout	1,51E-03 1,51E-03				LRAT,SLC24A1	2
Cell Death and Survival apoptosis	apoptosis of placenta cutotoxic reaction of breast cancer cell lines	1,51E-03				E2F7,E2F8 BIROS ICKC	2
Reproductive System Development and Fuelongation Connective Tissue Development and Fuelongation	elongation of mammary duct height of growth plate	1,51E-03 1,51E-03				ESR1,PARPBP ESR1,PTHLH	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitieurothelial cancer Connective Tissue Development and Functimass	locally advanced urothelial cancer mass of parametrial fat pad	1,51E-03 1,51E-03				POLE,RRM2 ESR1.MSTN	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitieuterine tumor Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiemalignant neoplasm of male genital organ	uterine tumor malignant neoplasm of male genital organ	1,54E-03 1,54E-03				ANO2,ASPM,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1,BUB1B,C100/90,CCNB1,CCNB2,CCNE1,CDC20,CENPE,CEI ASPM,BIRC5,BMP6,BRCA1,CCNA1,CDC25C,E2F7,ESR1,FERMT1,GPR68,IGKC,KIF20A,KLK4,KNTC1,MC3R,MKI67,M	50 24
Cellular Growth and Proliferation colony formation Cell Cycle, Cellular Movement cytokinesis	colony formation cytokinesis of tumor cell lines	1,58E-03 1,60E-03	Increased	2,979		BIRC5,BRCA1,CCNB1,CCNE1,CDCA7L,E2F8,ESR1,FANCA,OLFM4,PBK,PLK1,PTHLH,RRM2,UBE2C AURKB,BIRC5,KIF20A,NEK2	14 4
Cellular Development, Cellular Growth and formation Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiebreast cancer	formation of retinal cells locally recurrent breast cancer	1,69E-03 1,74E-03				GNAT2,LRAT,NR2E1,PDE6C ESR1,POLE,RRM2	4 3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiemetastatic breast cancer Cancer, Hematological Disease, Immunologtype M7 acute myeloid leukemia	relapsed metastatic breast cancer type M7 acute myeloid leukemia	1,74E-03 1,74E-03				ESR1,POLE,RRM2 BUB1B,IL2RB,RRM2	3 3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitieprostate cancer Cancer, Hematological Disease, Immunologadult acute myeloid leukemia with inv(16)(prostate cancer padult acute myeloid leukemia with inv(16)(p	1,88E-03 1,90E-03				ASPM,BIRC5,BMP6,BRCA1,CCNA1,CDC25C,E2F7,ESR1,FERMT1,GPR68,IGKC,KIF20A,KLK4,KNTC1,MC3R,MKI67,PI IL2RB,POLE,RRM2	23 3
Cancer, Hematological Disease, Immunologadult t(16;16)(p13;q22) acute myeloid leuk Cell Cycle cell cycle progression	eadult t(16;16)(p13;q22) acute myeloid leuke cell cycle progression of bone cancer cell lin	1,90E-03 1,90E-03				IL2RB,POLE,RRM2 AURKB,CLSPN,PLK1	3
Cancer, Organismal Injury and AbnormalitienER2-negative breast carcinoma Cell Cycle, DNA Replication, RecombinatiorDNA replication checkpoint	DNA replication checkpoint	1,90E-03 1,93E-03				ESK1,POLE,RKM2 CDT1,CENPE	2
Cell Cycle, Connective Tissue DevelopmentGUGT phase transition Cell Cycle, Connective Tissue DevelopmentG2/M phase transition	arrest in GurG i phase transition of fibroblast arrest in G2/M phase transition of fibroblast development of alemonilar becoment mem	1,93E-03				CCNB1,CDC25C	2
Cellular Assembly and Organization, DNA Romation	formation of chiasmata growth of jelet cell tumor	1,93E-03				BRCA1,EX01	2
Cancer, Endocrine System Disorders, GastiBRCA1 mutation positive pancreatic adent Cancer, Endocrine System Disorders, GastiBRCA2 mutation positive pancreatic adent	provention and the contraction positive pancre proventiation positive pancre	1,93E-03				POLE,RRM2 POL E,REM2	2
Cancer, Endocrine System Disorders, GastiPALB2 mutation positive pancreatic adeno Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Sextrahepatic cholandiocarcinoma	cmetastatic PALB2 mutation positive pancrea metastatic extrahepatic cholangiocarcinoma	1,93E-03				POLE,RRM2 POLE,RRM2	2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Smetastatic gallbladder neoplasm Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Siver cholangiocarcinoma	metastatic gallbladder neoplasm metastatic liver cholangiocarcinoma	1,93E-03 1,93E-03				POLE,RRM2 POLE,RRM2	2
Cell Signaling, Vitamin and Mineral Metabolpresence Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Sextrahepatic cholangiocarcinoma	presence of Ca2+ resected extrahepatic cholanoiocarcinoma	1,93E-03 1,93E-03				Pin,PTHLH POLE.RRM2	2
Cancer, Endocrine System Disorders, Gastipancreatic cancer Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismasopharyngeal carcinoma	stage 2A pancreatic cancer stage 4C nasopharyngeal carcinoma	1,93E-03 1,93E-03				POLE,RRM2 POLE,RRM2	2 2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Sextrahepatic cholangiocarcinoma Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Sgallbladder cancer	unresectable extrahepatic cholangiocarcino unresectable gallbladder cancer	1,93E-03 1,93E-03				POLE,RRM2 POLE,RRM2	2 2
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Sliver cholangiocarcinoma Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiemalignant solid tumor	unresectable liver cholangiocarcinoma recurrent malignant solid tumor	1,93E-03 1,95E-03				POLE,RRM2 AURKA,BRCA1,ESR1,IL2RB,POLE,RRM2	2 6
Cell Cycle interphase Tissue Morphology quantity	arrest in interphase of fibroblast cell lines quantity of tumor cell lines	1,98E-03 2,00E-03		0,087		BRCA1,CCNE1,CKS2,ESR1 BRCA1,CCNB1,ESR1,PRC1,PTHLH,RASSF6	4 6
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiecancer Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiegrowth	stage 3c cancer growth of tumor	2,02E-03 2,04E-03	Increased	2,892		ESR1,IL2RB,MSLN,POLE,RRM2 AURKA,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1B,CCNA1,CCNE1,COL4A3,ESR1,GPR68,HMMR,MKI67,MSTN,NCAPG,PLK1,PTHLI	5 18
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiecancer Hereditary Disorder, Organismal Injury and autosomal recessive disease	stage 3A cancer autosomal recessive disease	2,09E-03 2,11E-03				ESR1,IL2RB,POLE,RRM2 ASNS,ASPM,CCNB1,CENPE,CENPF,CLDN19,COL4A3,COL4A4,EDARADD,GNAT2,IGKC,KLK4,LRAT,MSTN,NEK2,PDE	4 22
Cancer, Hereditary Disorder, Organismal Injiereditary breast cancer Cancer, Organismal Injury and Abnormalitieadenoma	adenoma	2,25E-03 2,35E-03		4 000		BRCA1,ESR1,PRC1 BRCA1,BUB1B,CCNB1,CCNB1,CCNE1,CDK1,ESR1,EXO1,KLK4,MSLN,NUSAP1,POLE,RRM2,SKA3	14
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic SKlatskin's tumor	Klatskin's tumor	2,40E-03 2,40E-03		1,200		ASNS,AUKAA,BIROS,EZPO,NCAPG,PTITLIT,KKMZ POLE,RRM2 CONET_0D1	2
Cell Cycle G2 phase Cancer, Ornanismal Injuny and Abnormalitienon-small cell king cancer	entry into G2 phase inconerable non-small cell lung cancer	2,40E-03 2,40E-03				CCNE1,CDK1	2
Cancer, Organismal Injury and AbnormalitieEGFR expressing squamous cell lung can Cancer, Organismal Injury and AbnormalitieEGFR expressing squamous cell lung can	plocally advanced EGFR expressing squame	2,40E-03				POLE,REM2	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormaliteurethral carcinoma Cancer, Endocrine System Disorders, Gastistage 4 pancreatic cancer	recurrent urethral carcinoma stage 4 pancreatic cancer	2,40E-03 2,40E-03				POLE,RM2 POLE,RM2	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitieurethral cancer Hematological Disease, Organismal Injury suremia	stage 4 urethral cancer uremia	2,40E-03 2,40E-03				POLE, RRM2 COLAA3, SLC14A2	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiefibromatosis Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismeoplasia	fibromatosis Pharyngeal Cancer and Tumors	2,42E-03 2,44E-03				CCNE1,COL4A3,COL4A4,ESR1,HMMR AURKA,BIRC5,ESR1,MKI67,POLE,RRM2	5 6
Cell Morphology, Connective Tissue Develoabnormal morphology Cancer, Hematological Disease, Organismachronic myeloproliferative neoplasm	abnormal morphology of Sertoli cells chronic myeloproliferative neoplasm	2,45E-03 2,45E-03				ASPM,ESR1,KNSTRN BMP6,CDCP1,CDK1,IL2RB,PLK1,POLE,RRM2	3 7
Organismal Survival morbidity or mortality Cell Cycle S phase	morbidity or mortality arrest in S phase	2,53E-03 2,54E-03	Decreased	-4,161	bias	AP1M2,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1,BUB1B,CCNB2,CCNE1,CDC20,CDCP1,CDK1,CENPE,CHRNB4,C# BRCA1,CDC25C,CDK1,PLK1	41 4
Cellular Assembly and Organization, Cellulorganization Organ Morphology, Organismal Developmemass	organization of cytoskeleton mass of testis	2,57E-03 2,63E-03		0,438	bias	ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, CCNB1, CDC20, CDK1, CENPE, CENPF, DLGAP5, ELFN1, ESR1, HMMR, KIF21 CCNA1, ESR1, EX01, KNSTRN, MSTN, SEPT12, SLC14A2	26 7
Cell Death and Survival apoptosis Cellular Development, Cellular Growth and cell proliferation	apoptosis of male germ cells cell proliferation of carcinoma cell lines	2,68E-03 2,71E-03	Increased	2,512		BRCA1,CCNA1,EX01,SEPT12,TDRD1 ASNS,BIRC5,CDCA2,CDCA5,CDCP1,E2F8,FANCA,HMMR,NEK2,PLK1,UBE2C	11
Organismal Injury and Abnormalities, Tissusabnormal morphology Cell Cycle, Skeletal and Muscular System Ecell cycle progression	cell cycle progression of muscle cells	2,83E-03 2,86E-03				AP1M2,ASPM,BRCA1,CHRNB4,COL4A3,ESR1,RCNE1B,KNS1RN,P1HLH,SEP112,TMPRSS8 BIRC5,CCNB1,PTHLH DIPOC MC3 DDNA	3
Hereditary Disorder, Neurological Disease, spinocerebellar ataxia type 7 Cancer, Gastrointedinal Disease, Hanatic Sluar carcinoma	spinocerebellar ataxia type 7	2,86E-03 2,86E-03				GNAT2,PDE6C,SLC24A1 aDAMT313 ANO2 AD1M2 ASE18 ASDM ALIRKA ALIRKR RMDR RPCA1 BLIB1 BLIB1B CONA1 CONB1 CONB101 CON	3
Cancer, Hematological Disease, Immunologystemic mastocytosis	advanced systemic mastocytosis arrest in cell curle progression of embruonic	2,92E-03				POLE,RRM2 BPC41 DI K1	2
Organismal Injury and Abnormalities, Skeleatrophy Organismal Injury and Abnormalities, Skeleatrophy	atrophy of gastrocnemius fibrosis of renal glomerulus	2,92E-03 2,92E-03				BUB18, MSTN COL4A3, REN	2
Cancer, Hematological Disease, Immunologhairy-cell leukemia Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Bisynthesis	relapsed hairy-cell leukemia synthesis of deoxyribonucleotide	2,92E-03 2,92E-03				POLE, RRM2 RRM2, SHMT1	2 2
Cancer, Endocrine System Disorders, Orgaovarian cancer Developmental Disorder, Embryonic Develodegeneration	ovarian cancer degeneration of embryonic tissue	2,95E-03 3,08E-03				ADAMTSL3,ASPM,ATF7IP2,AURKB,BIRC5,BRCA1,CCNA1,CCNB1,CCNB2,CDK1,CENPE,COL4A4,E2F8,ESR1,FANCA AURKA,PTHLH,STIL	28 3
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiegenitourinary carcinoma Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiealveolar rhabdomyosarcoma	genitourinary carcinoma alveolar rhabdomyosarcoma	3,14E-03 3,17E-03		0,762		ADAMTSL3,ANO2,ASPM,ATF7IP2,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1,BUB1B,C10orl90,CCNA1,CENPE,CENP AURKB,MELK,PBK,TK1,TTK	66 5
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Silver tumor Cancer, Endocrine System Disorders, Orgaepithelial ovarian cancer	liver tumor recurrent epithelial ovarian cancer	3,24E-03 3,31E-03		1,131		ADAMTSL3,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1,BUB1B,CCNA1,CCNB1,CCNB1P ESR1,POLE,RRM2	66 3
Skeletal and Muscular Disorders abnormality Cell Cycle, Reproductive System Developmmeiosis	abnormality of upper limb meiosis of male germ cells	3,35E-03 3,35E-03				ESR1,MSTN,PTHLH,RECQL4 BRCA1,CCNA1,EX01,FANCA	4
Cancer, organisma injury and Adnormaniterindeence Cellular Growth and Proliferation, Hematolocolony formation Cancer, Hematolocical Discourse, Immunolociu(2) positive acute musicial laukamia	colony formation of colony-forming granuloo	3,39E-03 3,49E-03		-1,961	Dias	ESR1,FANCA	2
Cancer, nematological Disease, immunologini(3) positive acute myeroid leukemia Cell Cycle mitosis	mitosis of bone cancer cell lines	3,49E-03 3,49E-03				CDC25C,CDK1	2
Cancer, Hematological Disease, Immunologon-Sezary/visceral disease Cancer, Hematological Disease, Immunologoriant hair-cell leukemia	stage 4 non-Sezary/visceral disease symptomatic stage variant hairy-cell leukerr	3,49E-03 3 49E-03				POLE,RRM2 POLE REM2	2
Cancer, Endocrine System Disorders, Gastipancreatic adenocarcinoma Developmental Disorder, Neurological Diseconcenital encephalopathy	unresectable pancreatic adenocarcinoma congenital encephalopathy	3,49E-03 3,50E-03				POLE, RRM2 ASNS.ASPM.BRCA1.CCNA1.CDT1.CENPE.FLVCR2.ORC1.STIL	2
Organismal Survival organismal death Cancer. Organismal Injury and AbnormalitieHER2-negative breast cancer	organismal death advanced stage HER2-negative breast can	3,53E-03 3.55E-03	Decreased	-4,105	bias	AP1M2, AURKA, AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, BUB1, BUB1B, CCNB2, CCNE1, CDC20, CDCP1, CDK1, CENPE, CHRNB4, CHESR1, POLE, RRM2	40 3
Cell Death and Survival cell viability Gastrointestinal Disease, Hepatic System Diver lesion	cell viability of cervical cancer cell lines liver lesion	3,87E-03 3,89E-03		1,969 -0,531	bias	AURKA,AURKB,BIRC5,BRC41,BUB1B,FANCA,SKA3 ADAMTSL3,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BRC41,BUB1,BUB1B,CCN41,CCNB1,CCNB1IP	7 68
Cell Death and Survival Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiemetastatic adenocarcinoma	cell survival metastatic adenocarcinoma	3,95E-03 3,95E-03	Increased	4,075	bias	ASNS,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1B,CCNA1,CCNB1,CDCA7L,CDK1,COL4A3,EME1,ESR1,EXO1,FANC ESR1,IL2RB,PLK1,POLE,RRM2	26 5
Cancer, Immunological Disease, Organismsneoplasia Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiemalignant solid tumor	neoplasia of lymphoid organ advanced malignant solid tumor	3,99E-03 4,01E-03				BIRC5,ESR1,HMMR,MKI67,POLE,RRM2 AURKB,BIRC5,BRC41,CCNA1,DLGAP5,ESR1,HMMR,IL2RB,KIF20A,MSLN,NCAPG,PBK,PLK1,POLE,RRM2	6 15
Cell Death and Survival, Cellular Compromifragmentation Cancer, Endocrine System Disorders, Orgaovarian cancer	fragmentation of nucleus stage 4 ovarian cancer	4,07E-03 4,07E-03				CDK1,PLK1,PTHLH ESR1,POLE,RRM2	3
Cancer, Dermatological Diseases and Conclumongenesis Cell Cycle, Hair and Skin Development andcell cycle progression	arrest in cell cycle progression of epithelial	4,07E-03 4,11E-03				BIRCS, BMP6, CDCP1 CCNE1, PLK1	2
Cancer, Dermatological Diseases and Condarge cell transformed mycosis fungoides Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiebladder cancer	large cell transformed mycosis fungoides locally advanced bladder cancer	4,11E-03				POLE, RKM2	2
Embryonic Development, Organismal Devepremplantation embryo development DNA Beningtion, Benerghingtion, and Benergementering	preimplantation embryo development	4,11E-03				AURKA,ESCO2	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitieprostatic carcinoma Cancer, Endocrine System Disorders, Orragonardal tumor	recurrent prostatic carcinoma	4,11E-03 4 15E-03				POLE,RRM2 ADAMTSI 3 ASPM ATF7IP2 ALIRKE BIRG5 BRCA1 CONA1 CONB1 CONB2 CDK1 CENPE COL4A4 E2ER ESR1 FANCA	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitieurinary tract cancer Cell Simaling Generation Simaling Cell Simaling Centrelin S	urinary tract cancer G-protein signaling, coupled to IP3 second.	4,17E-03				ASPM, AURKA, AURKB, BIRCS, BMP6, BRCA1, BUB1B, CCNA1, CDCP1, CENPE, CENPF, CENPF, CENPF, DLGAP5, ESR1, GPR68, IL: FSR1 MC3R, MMI IR2	25
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Scancer Tissue Morphology guantity	liver cancer quantity of cells	4,46E-03 4,49E-03		1,131 1,467		ADAMTSL3,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1,BUB1B,CCNA1,CCNB1,CCNB1P BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNB2,CCNE1,CDC20,COL4A3,ENTPD3,ESR1,EXO1,FANCA,FCMR,GPR68,IGKC	64 31
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiemetastatic solid tumor Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic Shepatobiliary system cancer	stage 4 metastatic solid tumor hepatobiliary system cancer	4,49E-03 4,52E-03		1,131		ESR1,IL2RB,POLE,RRM2 ADAMTSL3,ANO2,AP1M2,ASF1B,ASPM,AURKA,AURKB,BIRC5,BMP6,BRCA1,BUB1,BUB1B,CCNA1,CCNB1LCCNB1IP	4 65
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiehyperplasia Lipid Metabolism, Molecular Transport, Smcconcentration	hyperplasia of breast concentration of lipid	4,63E-03 4,65E-03		-0,559		BRCA1,ESR1,PARPBP AP1M2,Apoc1,BRCA1,COL4A3,ERFE,ESR1,Gm12253,KCNE1B,LGR5,LRAT,MSTN,NME4,PARPBP,PLA2G5,PON1,PTH	3 17
Organ Morphology, Organismal Developmeabnormal morphology Cellular Assembly and Organization, Celluladensity	abnormal morphology of endometrium density of microtubules	4,77E-03 4,77E-03				ESR1,IL2RB BIRC5,KIF2C	2 2
Cellular Development, Cellular Growth and development Cell Morphology, Cellular Compromise multinucleation	development of retinal cone cells multinucleation of cervical cancer cell lines	4,77E-03 4,77E-03				GNA12,PDE8C CCNE1,NER2	2
Cell Cycle ploidy Cell Cycle interphase	proray of megakaryocytes re-entry into interphase of tumor cell lines	4,77E-03				CONEL, PANUA CONEL, CDC25C	2
Cancer, Organismal Injury and Abnormalitietumorigenesis Cancer, Hematological Disease, ImmunologHodgkin disease	tumongenesis of breast adenocarcinoma Hodgkin disease	4,77E-03 4,86E-03				DRUAT,ESRT AURIA,MKI67,POLE,RRM2 ESRT MEN DOLE BEN/2	2
Cancer, organismal injury and Abnormalitiedenocarcinoma Cancer, Organismal Injury and Abnormalitiecervical adenocarcinoma Cancer Organismal Injury and Abnormalitication access	primary adenocarcinoma cervical adenocarcinoma metastatic uterine cancer	4,92E-03				ESRI, INDURY CHE, RKM2 ESRI, POLE, RRM2 ESRI POLE DPM2	4 3
Cellular Assembly and Organization, Cellularganization Cell Cycle G1 nhase	organization of cytoplasm G1 phase of tumor cell lines	5,00E-03		0,438	bias	ASPM, AURKA, AURKB, BIRC5, BMP6, BRCA1, CCNB1, CDC20, CDK1, CENPE, CENPF, DLGAP5, ELFN1, ESR1, HMMR, KIF21 BRCA1, CCNE1, CDC25C, CDCA2, ESR1, MELK, RASSF6	27 7
Cancer, Hematological Disease, Immunologymphocytic cancer Cancer, Organismal Injury and Abnormalitielocally advanced breast cancer	lymphocytic cancer locally advanced breast cancer	5,21E-03 5,23E-03				ADAMTSL3, AURKA, AURKB, BIRCS, BRCA1, BUB1B, CDCA2, CDCA7L, DCLK3, EXO1, FERMT1, IGKC, IL2RB, MKI67, POLE, ESR1, POLE, RRM2	21 3
Cellular Assembly and Organization, DNA Rquantity	quantity of centrosome	5,23E-03				AURKA,AURKB,PLK1	3

Cellular Growth and Proliferation	colony formation	colony formation of breast cancer c
Cellular Growth and Proliferation	colony formation	colony formation of cells
Cancer, Endocrine System Disorders, Org	asmall-cell carcinoma	small-cell carcinoma
Cell Cycle	G2/M phase	G2/M phase of cervical cancer cell
Auditory Disease, Auditory and Vestibular	Sabnormal morphology	abnormal morphology of stria vascu
Cancer, Hematological Disease, Immunol	odymphocytic leukemia	advanced chronic lymphocytic leuk
Dermatological Diseases and Conditions,	Catrophy	atrophy of skin
Organ Development	function	function of urinary bladder
Cellular Assembly and Organization	modification	modification of microtubules
Cellular Assembly and Organization	quantity	quantity of chromosome componen
ipid Metabolism, Molecular Transport, Sr	nisecretion	secretion of arachidonic acid
lumoral Immune Response, Immunologic	aabnormal quantity	abnormal quantity of Immunoglobul
Cellular Function and Maintenance, Molec	cuhomeostasis	homeostasis of iron ion
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	sensitization	sensitization of cells
Cancer, Gastrointestinal Disease, Organis	rrnasopharyngeal carcinoma	nasopharyngeal carcinoma
Cell Cycle	G1 phase	G1 phase of breast cancer cell lines
Cancer, Hematological Disease, Organish	alymphocytic neoplasm	lymphocytic neoplasm
Cancer, Hematological Disease, Immunoli	oslarge-cell lymphoma	large-cell lymphoma
lereditary Disorder, Ophthalmic Disease,	Cretinal degeneration	autosomal recessive retinal degene
Amino Acid Metabolism, Post-Translationa	al phosphorylation	phosphorylation of L-threonine
Cell Death and Survival	anoikis	anoikis of carcinoma cell lines
Cell Cycle	G2/M phase	arrest in G2/M phase of breast can
Endocrine System Disorders, Organ Morp	habnormal morphology	abnormal morphology of seminifero
Organismal Injury and Abnormalities, Rep	rcendometriosis	endometriosis
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	iecancer	cancer of secretory structure
Cancer, Cellular Development, Cellular Gr	oproliferation	proliferation of turnor cells
Organismal Injury and Abnormalities, Ren	alfailure	failure of kidney
Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic	\$gall bladder carcinoma	gall bladder carcinoma
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	iemetastatic solid tumor	metastatic solid tumor
Cellular Growth and Proliferation	accumulation	accumulation of tumor cell lines
Organ Morphology, Reproductive System	Dbranching	branching of mammary duct
Cancer, Endocrine System Disorders, Gas	stmetastatic pancreatic adenocarcinoma	metastatic pancreatic adenocarcing
Cell Death and Survival	apoptosis	apoptosis of colorectal cancer cell li
Cell Death and Survival, Organismal Injur	/ apoptosis	apoptosis of kidney cell lines
Cancer, Hematological Disease, Immunoli	oçchronic myeloid leukemia	chronic myeloid leukemia
Connective Tissue Development and Fund	tigrowth	growth of connective tissue
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	iegrowth	growth of carcinoma
Cell Death and Survival	cell death	cell death of myeloma cell lines
Cancer, Organismal Injury and Abnormalit	ietumorigenesis	tumorigenesis of epithelial neoplasr
Cell Cycle	M phase	M phase of germ cells
Cell Cycle	cell cycle progression	arrest in cell cycle progression of be
Cellular Compromise, Ophthalmic Disease	e, degeneration	degeneration of retinal rods
Cellular Development, Digestive System E	Dedifferentiation	differentiation of hepatocytes

ony formation of breast cancer cell lines	5,25E-03			
ony formation of cells	5,29E-03	Increased	2,827	
all-cell carcinoma	5,30E-03			
M phase of cervical cancer cell lines	5,48E-03			
formal morphology of stria vascularis of	65,48E-03			
anced chronic lymphocytic leukemia	5,48E-03			
ophy of skin	5,48E-03			
ction of urinary bladder	5,48E-03			
dification of microtubules	5,48E-03			
antity of chromosome components	5,48E-03			
retion of arachidonic acid	5,48E-03			
ormal quantity of Immunoglobulin	5,55E-03			
neostasis of iron ion	5,55E-03			
sitization of cells	5,55E-03			
opharyngeal carcinoma	5,66E-03			
phase of breast cancer cell lines	5,88E-03			
phocytic neoplasm	6.12E-03			
e-cell lymphoma	6.20E-03			
osomal recessive retinal degeneration	6.22E-03			
sphorylation of L-threonine	6,22E-03			
ikis of carcinoma cell lines	6,23E-03			
est in G2/M phase of breast cancer cell	li6,23E-03			
ormal morphology of seminiferous tubu	16,25E-03			
Iometriosis	6,33E-03			
cer of secretory structure	6,46E-03			
liferation of tumor cells	6,50E-03	Increased	2,078	
ure of kidney	6,51E-03		0,849	
bladder carcinoma	6.54E-03			
tastatic solid tumor	6,57E-03			
umulation of tumor cell lines	6,57E-03			
nching of mammary duct	6,57E-03			
tastatic pancreatic adenocarcinoma	6,57E-03			
ptosis of colorectal cancer cell lines	6,63E-03		-0,501	
ptosis of kidney cell lines	6,75E-03		-0,805	
onic myeloid leukemia	6,76E-03			
wth of connective tissue	6,78E-03	Increased	3,381	
wth of carcinoma	6,94E-03		0,927	
death of myeloma cell lines	7,02E-03		0,025	
origenesis of epithelial neoplasm	7,02E-03		1,069	
hase of germ cells	7,02E-03			
est in cell cycle progression of bone can	(7,02E-03			
eneration of retinal rods	7,02E-03			
erentiation of hepatocytes	7,02E-03			

BRCA1,ESR1,PBK,PLK1	4
BIRC5,BRCA1,CCNE1,CDCA7L,E2F8,ESR1,FANCA,PBK,PLK1,PTHLH,RRM2,UBE2C	12
CDCA5,MKI67,MYCL,POLE,RRM2	5
CDC25C,EME1	2
COL4A3,KCNE1B	2
POLE,RRM2	2
BRCA1,FERMT1	2
CHRNB4,Defb1	2
AURKA,HMMR	2
MELK,SGO1	2
NMUR2,PLA2G5	2
ESR1,FCMR,IGKC	3
BMP6,ERFE,TMPRSS6	3
BIRC5,CCNB1,CCNB2	3
AURKA,ESR1,POLE,RRM2	4
BRCA1,CCNE1,ESR1	3
ADAMTSL3.AURKA.AURKB.BIRC5.BRCA1.BUB1B.CCNB1.CCNB2.CDCA2.CDCA7L.CDK1.COL4A4.DCLK3.E2F7.EXO	27
ADAMTSL3,BIRC5,FERMT1,IL2RB,MKI67,POLE,RRM2,ZWILCH	8
LRAT,NEK2,PDE6C	3
CDK1,PBK,TTK	3
CDCP1,PLK1	2
BRCA1,CDC25C	2
ASPM,CKS2,ESR1,KNSTRN,LRAT	5
BIRC5,BRCA1,BUB1B,CDK1,ESR1,IL2RB,KIF20A,PBK,PON1,TK1	10
ADAMTSL3,ASPM,BIRC5,BMP6,BRCA1,C10orf90,CCNA1,CCNB1IP1,CDC25C,CDCA7L,CENPE,CENPF,DCLK3,DCTD,	48
BIRC5, BRCA1, CCNA1, CCNE1, COL4A3, ESR1, HMMR, MKI67, PLK1, PTHLH, UBE2C	11
BUB1B,CHRNB4,CLDN19,COL4A3,IL2RB,PTHLH,REN	7
BRCA1,CCNE1,POLE,RRM2	4
AURKB,BIRC5,CCNA1,DLGAP5,ESR1,HMMR,IL2RB,KIF20A,NCAPG,PBK,PLK1,POLE,RRM2	13
AURKA,BIRC5,PLK1	3
BRCA1,ESR1,PTHLH	3
PLK1,POLE,RRM2	3
BIRC5,CCNB1,CDK1,LGR5,MELK,RASSF6,TTK	7
BIRC5,BRCA1,CCNB1,CDK1,ESR1,MELK,PTHLH	7
CDCP1,CDK1,IL2RB,PLK1,RRM2	5
BMP6,BRCA1,BUB1,CCNB1,CCNE1,ESR1,FERMT1,HMMR,IL2RB,MKI67,MSTN,MYCL,PTHLH,UBE2C	14
BMP6,NCAPG,PLK1,PTHLH,RRM2	5
AURKA,BMP6,CDK1,HMMR	4
BIRC5,BRCA1,BUB1B,CCNE1,ESR1,GPR68	6
CKS2,UBE2C	2
AURKB,CLSPN	2
LRAT,SLC24A1	2
F2F7 F2F8	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

des cerveaux d'une trentaine de souris $Otx2^{CreERT2/+}$; $Trp53^{fl/fl}$; L'analyse 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 2x10⁶ 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 Tp53 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 avions démontré que ces GCP représentaient environs 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 souriceaux âgés 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 prooncogénique 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 croissement 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 différentiation 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, anamniote 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., Currle, 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., Kretzschmar, 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., Zadravec-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: hedgehoginduced 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 Entwickelung des Menschlischen Rautenhirns vom ende des ersten bis zum Beginn des dritten Monats. Der mathematish-physischen Classe der Koeniglich Saechsischen Gesellshaft 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., Irmler, 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 smoothened 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 smoothened 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 myxinoids 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., Hoogervoorst, 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 systeme nerveux de l'homme et des vertebrds, 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. 0ff. 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 protooncogene 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-transretinoic 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 isthmic 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

ANNEXE

RESEARCH ARTICLE

Comprehensive Interactome of *Otx2* in the Adult Mouse Neural Retina

Bruno Fant,¹ Alexander Samuel,¹ Stéphane Audebert,² Agnès Couzon,³ Salsabiel El Nagar,¹ Nathalie Billon,¹ and Thomas Lamonerie¹*

¹Institut De Biologie Valrose, University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences, CNRS, UMR7277, Inserm, U1091, Nice F-06108, France

²Centre De Recherche En Cancérologie De Marseille, INSERM U1068/Institut Paoli-Calmettes, 13273 Marseille CEDEX 9, France

³AniRA-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 intergenesis 53:685-694, 2015. © 2015 Wiley Periodicals, actions. 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

Published online 23 October 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/dvg.22903

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



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 isthmic organizer (Heimbucher *et al.*, 2007). The interactome of Otx2 in a given tissue may, therefore, be a key part of the explanation of its role.

To 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 flp 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, tissuespecific 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 highconfidence 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

FANT ET AL.

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

UNIPROT					
accession			#PSM	#PSM	CTAP/WT
code		Description	TAP-tag	WT	ratio
Q8BG81	Poldip3	Polymerase delta-interacting protein 3	26	3	8.67
P28740	Kif2a	Kinesin-like protein	11	2	5.5
Q6PGN3	DCIK2	Serine/threonine-protein kinase	14	3	4.67
P80206	UtX2 Tofm	Homeobox protein Utx2	19	4	4.75
	Spon1	Spondin-1	20	6	4.5
P10126	Sport Fef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	38	12	3.17
Q9JLM8	Dclk1	Serine/threonine-protein kinase	15	4	3.75
Q5RJ54	Zscan26	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 26	7	2	3.5
O54751	Crx	Cone-rod homeobox protein	13	4	3.25
Q61656	Ddx5	Probable ATP-dependent RNA helicase	93	30	3.1
O70318	Epb41l2	Band 4.1-like protein 2	17	6	2.83
Q9Z1L4	Rs1	Retinoschisin	17	6	2.83
Q64523	Hist2h2ac	Histone H2A type 2-C	16	6	2.67
P26369	U2af2	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	21	8	2.63
Q99JF8	PSIP I	PC4 and SFRS1-Interacting protein	21	8 10	2.63
P20357	Nap2	Microtubule-associated protein 2	45	18	2.5
	FICUS Krt16	Keratin: type-Loytoskeletal 16	34	4 1/	2.5
060932	Vdac1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	48	20	2.40
Q501J6	Ddx17	Probable ATP-dependent BNA helicase	36	15	2.4
Q9JJI8	Rol38	60S ribosomal protein L38	31	13	2.38
Q9D0M5	Dynll2	Dynein light chain 2. cytoplasmic	7	3	2.33
Q8CGP6	Hist1h2ah	Histone H2A type 1-H	16	7	2.29
G5E870	Trip12	E3 ubiquitin-protein ligase	57	25	2.28
P62806	Hist1h4a	Histone H4	18	8	2.25
P35564	Canx	Calnexin	9	4	2.25
Q80ST9	Lca5	Lebercilin	9	4	2.25
P35700	Prdx1	Peroxiredoxin-1	11	5	2.2
Q550F2	LUC/13	Luci-like protein 3	17	о 0	2.2
097273	Vuacz Tuln1	Tubby-related protein 1	24	0 6	2.13
P16381	D1Pas1	Putative ATP-dependent RNA helicase	16	4	4
Q8C9B9	Dido1	Death-inducer obliterator 1	8	2	4
Q69Z99	Znf512	Zinc finger protein 512	12	4	3
Q61464	Znf638	Zinc finger protein 638	12	4	3
Q6IFX2	Krt42	Keratin: type-I cytoskeletal 42	40	20	2
Q91XV3	Basp1	Brain acid-soluble protein 1	18	9	2
Q60972	Rbbp4	Histone-binding protein	10	5	2
Q91YQ5	Rpn1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1	8	4	2
Q9WV55	Vapa	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	8	4	2
Q8K2B3	Sana	Succinate denydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit: mitochondrial	4	2	2
000200	Lyai Siv6	Homeobox protain SIX6	4	2	2
P62696	Cryhh2	Reta-crystallin B2	42	0	Z N/A
Q9WVJ5	Crvbb1	Beta-crystallin B1	24	Õ	N/A
P24622	Cryaa	Alpha-crystallin A chain	16	Ō	N/A
Q9QWH1	Phc2	Polyhomeotic-like protein 2	15	0	N/A
Q9DC28	Csnk1d	Casein kinase I isoform delta	14	0	N/A
P62821	Rab1A	Ras-related protein Rab-1A	13	0	N/A
P01868	lghg1	Ig gamma-1 chain C region secreted form	13	0	N/A
Q6IME9	Krt72	Keratin: type-II cytoskeletal 72	13	0	N/A
Q9JJU9	Crybb3	Beta-crystallin B3	13	0	N/A
	NIYET2	Nyelin expression factor 2	12	0	N/A
Q9J1100	Jako	Ja kanna chain C region	12	0	N/A
009167	Rnl21	60S ribosomal protein L 21	10	0	N/A
08VD12	Znf385a	Zinc finger protein 385A	10	0	N/A
Q91V41	Rab14	Ras-related protein Rab-14	9	Õ	N/A
P19253	Rpl13a	60S ribosomal protein L13a	9	Ō	N/A
Q9CQE8	Cn166	UPF0568 protein C14orf166 homolog	9	0	N/A
P15655	Fgf2	Fibroblast growth factor 2	9	0	N/A
O08582	Gtpbp1	GTP-binding protein 1	9	0	N/A
P62918	Rpl8	60S ribosomal protein L8	8	0	N/A

688

INTERACTOME OF OTX2 IN THE MOUSE NEURAL RETINA

UNIPROT accession code		Description	#PSM TAP-tag	#PSM WT	CTAP/WT ratio
Q9D8E6	Rpl4	60S ribosomal protein L4	8	0	N/A
Q8BHG9	Cggbp1	CGG triplet repeat-binding protein 1	8	0	N/A
Q9JJV1	Cryba2	Beta-crystallin A2	8	0	N/A
P23927	Cryab	Alpha-crystallin B chain	8	0	N/A
Q80WS3	Fbll1	rRNA/tRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin-like protein 1	8	0	N/A
Q99JX7	Nxf1	Nuclear RNA export factor 1	8	0	N/A
Q9ERU3	Znf22	Zinc finger protein 22	8	0	N/A
P46660	Ina	Alpha-internexin	8	0	N/A
P62274	Rps29	40S ribosomal protein S29	7	0	N/A
Q60749	Khdrbs1	KH domain-containing RNA-binding signal transduction-associated protein 1	(0	N/A
P03930	Mtatp8	AIP synthase protein 8	1	0	N/A
P04344	Crygb	Gamma-crystallin B	7	0	N/A
P01831	Inyi	I ny-1 membrane glycoprotein	7	0	N/A
Q9RTR2	Irim3 Zafzoz	Tripartite motif-containing protein 3	7	0	N/A
Q8BIF9	ZNT/8/	Zinc finger protein 787	1	0	N/A
P02000	Rpszo	405 ribosornal protein 520	6	0	IN/A
PU0131	Cotfo	L-lactate denydrogenase A chain	6	0	IN/A
	Sko1	S phase kinese associated protein 1	6	0	N/A
	Skp i Codm2	Coll adhesion molecule 2	6	0	N/A
060701	Cdk13	Cyclin_dependent kingse 13	6	0	N/A
D56561	SIc123	Excitatory amino acid transporter 1	6	0	N/A
P17005	Umaa1	High mobility group protein HMG-1/HMG-V	6	0	N/A
P01654	Tilligat	In kappa chain V-III region PC 2880/PC 1229	6	0	N/A
P63321	Rala	Bas-related protein Bal-A	6	0	N/A
08B1B8	Rorb	Nuclear recentor BOB-beta	6	0	N/A
008547	Sec22h	Vesicle-trafficking protein SEC22b	6	0	N/A
03U0A7	Selh	Selenoprotein H Selh	6	Ő	N/A
O3THE2	Mvl12h	Myosin regulatory light chain 12B	5	Õ	N/A
P62915	Gtf2b	Transcription initiation factor IIB	5	Õ	N/A
P29341	Pabpc1	Polvadenvlate-binding protein 1	5	Õ	N/A
Q9CWL2	Casz1	Zinc finger protein castor homolog 1	5	Ō	N/A
P12382	Pfkl	6-phosphofructokinase, liver type	5	0	N/A
P47911	Rpl6	60S ribosomal protein L6	5	0	N/A
P27659	Rpl3	60S ribosomal protein L3	5	0	N/A
Q61029	Ттро	Lamina-associated polypeptide 2: isoforms beta/delta/epsilon/gamma	5	0	N/A
Q6NVD9	Bfsp2	Phakinin	5	0	N/A
Q6A068	Cdc5l	Cell division cycle 5-like protein	5	0	N/A
Q61597	Crygc	Gamma-crystallin C	5	0	N/A
P06330		Ig heavy chain V region AC38 205.12	5	0	N/A
Q9D1P2	Kat8	Histone acetyltransferase KAT8	5	0	N/A
Q6PDM1	Msl1	Male-specific lethal 1 homolog	5	0	N/A
Q6DID5	Mum1	PWWP domain-containing protein MUM1	5	0	N/A
P70257	Nfix	Nuclear factor 1 X-type	5	0	N/A
Q9D1J3	Sarnp	SAP domain-containing ribonucleoprotein	5	0	N/A
P60335	Pcbp1	Poly(rC)-binding protein 1	4	0	N/A
P61979	Hnrnpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	4	0	N/A
P32233	Drg1	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	4	0	N/A
P42932	CCt8	I-complex protein 1 subunit theta	4	0	N/A
Q61545	EWSTI	RINA-binding protein EWS	4	0	N/A
Q9JJK2	Lanci2	Land-like protein 2	4	0	N/A
P20443	Sag	S-arrestin	4	0	N/A
Q0K1D0	Cpixa	Complexin-3 Staroid harmona recenter EBP2	4	0	IN/A
Q01009	ESIID	la gemme 24 chain C region appreted form	4	0	IN/A
P01644		lg ganna-zA chain C region Secreted form	4	0	N/A
02 1790	Lin7a	Protoin lin 7 homolog A	4	0	
088952	Lin7c	Protein lin-7 homolog A	4 1	0	N/A N/Δ
0031/1	Mark?	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	4	0	N/A
081/116	Sfna	Splicing factor: proline- and dutamine-rich	4	0	N/A
0972R6	Unc110	Protein unc-119 homolog A	4	0	N/A
090883	112af1	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	ч 4	0	N/A
Q8K3G5	Vrk3	Inactive serine/threonine-protein kinase VRK3	4	0	N/A
Q3US17	Znf48	Zinc finger protein 48	4	Õ	N/A

Table 1. Continued

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-0.3
Regulation of transcription	28–31 (21–24%)	2.0e-02	2.45e-0.2
Translation and regulation of translation	13 (10%)	1.1e-05	1.40e-03
RNA processing and export	10 (8%)	9.5e-0.3	2.55e-02

FANT ET AL.

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 stimulus; 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 geneto-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.

INTERACTOME OF OTX2 IN THE MOUSE NEURAL RETINA

Table 3

L'UNCOLODULI DUL	A	
List of Otx2 Protein Partners	Associated with Gene	e Expression-Related Untologies

Accession		Description
		Regulation of transcription
Q91XV3	Basp1	Brain acid-soluble protein 1
Q9CWL2	Casz1	Zinc finger protein castor homolog 1
Q6A068	Cdc5l	Cell division cycle 5-like protein
Q69ZA1	Cdk13	Cyclin-dependent kinase 13
Q8BHG9	Cggbp1	CGG triplet repeat-binding protein 1
Q9CQE8	Cn166	UPF0568 protein C14orf166 homolog
054751	Crx	Cone-rod homeobox protein
Q501J6	Ddx17	Probable ATP-dependent RNA helicase
Q61656	Ddx5	Probable AIP-dependent RNA helicase
Q8C9B9	Dido1	Death-inducer obliterator 1
Q61539	Essrb	Steroid hormone receptor ERR2
Q61545	EWSTI	RINA-binding protein EWS
P15055	Fg12	FIDRODIAST GROWTH factor 2
P62915	GIT2D	Iranscription initiation factor IIB
000102	HIITIPK Kat9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
Q9D1F2	Kalo Khdrhal	MISIONE accelyIII ansiendse NATO
	Lanal2	LonC like protein 2
Q9JJKZ	LdHCIZ Nfix	Lang-like protein 2 Nuclear factor 1 X type
P202/1	INIIX Pabaa1	Nuclear factor i X-type Rolyadonylata hinding protoin 1
C0DC01	Fabperi Doldin?	Polyauenylate-billuling protein 1
	Phan Phan	Histopo hinding protoin PRPD4
Q00972	RDDP4 Porb	Historie-binding protein RBBP4
	ROID	Nuclear receptor ROR-bela
	Sipq	Splicing factor, proline- and glutamine-rich
Q9QZ28	Sixo	Homeobox protein Sixo
Q61029	Impo Tria 10	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/deita/epsilon/gamma
G5E8/0	Trip12	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
Q9ERU3	Znf22	Zinc finger protein 22
Q8VD12	Znf385a	Zinc finger protein 385A
Q3US17	Znf48	Zinc finger protein 48
Q69Z99	Znf512	Zinc finger protein 512
Q61464	Znf638	Zinc finger protein 638
Q8BIF9 Q5RJ54	Znf/87 Zscan26	Zinc finger protein 787 Zinc finger and SCAN domain-containing protein 26
		RNA processing and export
Q6A068	Cdc5l	Cell division cycle 5-like protein
Q69ZA1	Cdk13	Cyclin-dependent kinase 13
P61979	Hnrnpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
Q60749	Khdrbs1	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1
Q5SUF2	Lc713	Luc7-like protein 3
Q99JX7	Nxf1	Nuclear RNA export factor 1
P29341	Pabpc1	Polyadenylate-binding protein 1
P60335	Pcbp1	Poly(rC)-binding protein 1
Q8BG81	Poldip3	Polymerase delta-interacting protein 3
Q99JF8	Psip1	PC4 and SFRS1-interacting protein
Q9D1J3	Sarnp	SAP domain-containing ribonucleoprotein
Q8VIJ6	Sfpq	Splicing factor, proline- and glutamine-rich
Q9D883	U2af1	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit
P26369	U2af2	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit
		Translation regulation
P10126	Fof1a1	Elongation factor 1-alpha 1
P203/1	Pahno1	Polyadenylate-binding protein 1
D10253	Paupul Roll2a	60S ribosomal protein L13a
C00167	nµ13a Dn121	60S ribosomal protein L 13a
003107	ripiz i Polo	600 ribosomal protein L2
F21009	KPI3	ous ribosomal protein L3
	Rpi38	605 ribosomai protein L38
	Rpi4	605 ribosomai protein L4
P4/911	Rplb	605 ribosomai protein L6
P62918	HP18	605 ribosomal protein L8
P62855	Hps26	405 ribosomal protein S26
P62274	Rps29	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 Départemental 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 BamH1/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'-ACTAGGAGTGG CCATCAGA-3' as forward and reverse primers, respectively, and Southern blot (probe: 0.573 kb XbaI/NheI genomic fragment located 5' of exon 1A1). The PGKneo selection cassette was removed in one positive clone by transfection of a plasmid expressing the flp recombinase, and removal was assessed by PCR using the genotyping primers and sequencing. Mice were produced by standard blastocyst injection procedure. 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 μ L 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 μ L cold PBS 1 mM p-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 chimera 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. Nr2e3directed 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, Stebegg 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 complex-

ins 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.