

S

jan 2000 1675

50376
1996
444

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE
LILLE**

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE



par

Nathalie TURQUE

**EFFET DE L'ONCOGENE V-MYC SUR LA
DIFFERENCIATION DE LA NEURORETINE D'OISEAU
*IN VITRO***

Soutenance le 19 décembre 1996 devant la commission d'examen

Président : Pr Jean-Pierre BOHIN
Rapporteurs : Dr Françoise DIETERLEN
: Dr Yves COURTOIS
Examineur : Pr Xavier DESBIENS
Directeur de thèse : Dr Simon SAULE

PUBLICATIONS

1- Desbiens, X., Turque, N. and Vandembunder, B. (1992). Hydrocortisone perturbs the cell proliferation pattern during feather morphogenesis : evidence for disturbance of cephalocaudal orientation.

Int. J. Dev. Biol. **36** : 373-380.

2 - Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carrière, C. and Saule, S. (1994). Pax-QNR/pax-6 a paired and homeobox containing gene expressed in neurons is also expressed in pancreatic endocrine cells.

Molecular Endocrinology **8** : 929-938.

3 - Plaza, S., Turque, N., Dozier, C., Bailly, M., and Saule S. (1995)

C-myb acts as transcriptional activator of the quail Pax6 (Pax-QNR) promoter through two different mechanisms.

Oncogene. **10** : 329-340.

4 - Plaza, S., Dozier, C., Turque, N., and Saule, S. (1995). The quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neural differentiation.

Mol. Cell. Biol. **15** : 3344-3353.

5 - Vincent, S., Turque, N., Plaza, S., Dhellemme, P., Hladky, J.P., Assaker, R., Ruchoux, M.M., and Saule, S. (1996). Differential expression between PAX-6 and EN proteins in medulloblastoma.

International Journal of Oncology. **8** : 901- 910.

6- Turque, N., Denhez, F., Martin, P., Planque, N., Bailly, M., Bègue, A., Stehelin, D. and Saule, S. (1996). Characterization of a new melanocyte-specific gene (QNR-71) expressed in the v-myc transformed quail neuroretina.

EMBO J., **15** : 3338-3350.

7 - Plaza, S., Langlois, M.-C., Turque, N., Lecornet, S., Bailly, M., Bègue, A., Quatannens, B., Dozier, C., and Saule, S. (1996). The expression of Pax-6 in the retina is down regulated by the homeo box-containing En products through a DNA-binding independent mechanism.

soumis

8- Turque, N., Buttice, G., Beuscart, A., Stehelin, D., Crépieux, P. and Desbiens, X. (1996). Hydrocortisone modulates the expression of c-ets-1 and 72kDa type IV collagenase in chicken dermis during early feather morphogenesis. *sous presse*

9- Turque, N., Plaza, S., Klempnauer, K.-H., and Saule, S. (1996). Overexpression of A-myb induces basic Fibroblast Growth Factor dependent proliferation of chicken neuroretina cells. *soumis*

SOMMAIRE

LISTE DES ILLUSTRATIONS	4
LISTE DES ABREVIATIONS	6
RESUME	7
PRESENTATION	8
I. LA DIVERSITE CELLULAIRE	9
I.1. CE QUI EST VISIBLE ET CE QUI NE L'EST PAS	9
I.2. LA DIFFERENCIATION ET LA DETERMINATION	10
I.3. TRANSDIFFERENCIATION	10
I.4. CE QUI ENGENDRE LA DIVERSITE CELLULAIRE	12
I.4.1. LA DIVISION ASYMETRIQUE	12
I.4.2. LES INTERACTIONS CELLULAIRES	14
II. DES ACTEURS DE LA DIFFERENCIATION : LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	14
II.1. CAR IL FAUT BIEN UN DEBUT : L'ŒUF	15
II.2. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	16
II.3. LE DOMAINE " FORK HEAD " / HELICE AILEE	21
II.4. LE DOMAINE DOIGT DE ZINC	21
II.5. LE DOMAINE HTH ET LES HOMEOPROTEINES	23
II.5.1. L'ARCHETYPE	23
II.5.2. LES PROTEINES HOMEOTIQUES	23
II.6. ASSOCIATION DU DOMAINE HOMEO ET DE MOTIFS CONSERVES	27
II.6.1. LE DOMAINE POU	27
1. présentation	27
2. implication des gènes POU dans le SNC	28
3. implication des gènes POU dans les premiers stades du développement	29
II.6.2. LA REPETITION LIM	29
II.6.3. LE DOMAINE PAIRED (PRD)	30
1. boîte PRD des gènes Pax	30
2. structure/fonction	31
3. territoires d'expression	34
<u>*pax-1 (classe I)</u>	34
<u>*pax-3 et pax-7 (classe II) / pax-6 (classe IV)</u>	35
<u>*pax-2, pax-8 et pax-5 (classe III)</u>	38
4. conclusions	40

II.6.4. LE DOMAINE CVC	41
II.7. LE DOMAINE bLZ ET LE DOMAINE bHLH	41
II.7.1. LE DOMAINE bLZ	41
II.7.2. LE DOMAINE bHLH	42
III. LA MYOGENESE	52
III.1. DES SOMITES MUSCLÉS	52
III.2. GENES <i>PAX</i> ET SOMITES	54
III.3. LA CASCADE DES GENES MYOGENIQUES bHLH	56
IV. LA MELANOGENESE	59
IV.1. DES MELANOCYTES ENVAHISSANTS	59
IV.2. MUTATIONS AFFECTANT LA MIGRATION DU MELANOBLASTE	62
IV.2.1. IMPLICATION DE PAX-3	62
IV.2.2. IMPLICATION D'UN FACTEUR DE TYPE BHLHLZ: MI	63
IV.2.3. IMPLICATION DE TYROSINES KINASES - LES MUTATIONS W/SL	65
IV.3. MUTATIONS AFFECTANT LES MELANOSOMES	66
IV.3.1. MUTATIONS AFFECTANT LA STRUCTURE MELANOSOMALE	66
IV.3.2. MUTATIONS AFFECTANT LES GENES CODANT LES ENZYMES	67
IV.3.3. MUTATIONS AFFECTANT LES GENES REGULATEURS DES ENZYMES	67
1. l' α -MSH	67
2. Agouti/ α -MSH /MC1r	68
3. les mutations <i>piebald spotting/lethal spotting</i>	68
V. MORPHOGENESE DE LA NEURORETINE ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION	70
V.1. LA NEURORETINE: UNE EXTENSION DU SNC	70
V.2. MORPHOGENESE RETINIENNE CHEZ LA DROSOPHILE	70
V.3. LA NEURORETINE (NR) DE VERTEBRES	76
V.3.1. PROTEINES PAX	85
V.3.2. PROTEINES CHX10	86
V.3.3. PROTEINES A HOMEODOMAINE DE TYPE POU	86
V.3.4. PROTEINES DE TYPE " BOUCLE AILEE "	87
V.3.5. PROTEINES DE TYPE ZINC FINGER	87
1. protéines Gli	87
2. récepteurs aux acides rétinoïques	87
V.3.6. PROTEINES DE TYPE BHLH	88
1. protéines de type bHLHLZ: facteur MITF/Mi	88
2. protéines de type bHLH	88
VI. PETIT RETOUR A LA TRANSDIFFERENCIATION	90
VI.1. LA RETINE PIGMENTAIRE	90
VI.2. TRANSDIFFERENCIATION DE LA RPE EN NR	91

VI.3. TRANSDIFFERENCIATION DE LA NR	92
VII. PRESENTATION DE NOTRE MODELE ET RESULTATS	92
VII.1. NOTRE MODELE	92
VII.2. LE GENE PAX-QNR	95
VII.3. LE GENE QNR-71	95
RESULTATS	97
PREMIERE PARTIE: « Pax-QNR/Pax-6, un gène contenant un domaine paired et un homéodomaine et exprimé dans les neurones, est également exprimé dans les cellules du pancréas endocrine. »	97
DEUXIEME PARTIE: «Les ARNm du gène PAX-QNR sont initiés à partir de deux promoteurs et sont différemment exprimés au cours du développement de la neurorétine et de la différenciation neuronale. »	114
TROISIEME PARTIE: « C-myb agit comme un activateur transcriptionnel du gène Pax-QNR par l'intermédiaire de deux mécanismes d'activation différents. » ET « La surexpression de A-myb induit la prolifération des cellules de neurorétine de Poulet, dépendante du bFGF. »	126
QUATRIEME PARTIE: « Caractérisation d'un nouveau gène spécifique des mélanocytes (QNR-71) exprimés dans les cellules de neurorétine de Caille transformées par <i>v-myc</i> . »	158
DISCUSSION	176
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	181

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Translocations nucléaires au cours des divisions des précurseurs neuronaux et modèles des divisions symétriques et asymétriques.	13
Figure 2: Neurulation chez les Vertébrés.	15
Figure 3: Morphogenèse du système nerveux des Vertébrés.	16
Figure 4: Modèle en deux étapes de l'activation de la transcription chez la Levure.	18
Figure 5: CBP, une molécule de pontage entre les facteurs de transcription et la machinerie de base de la transcription.	19
Figure 6: Rôle du nucléosome dans l'activation de la transcription.	20
Figure 7: Structure du domaine paired du gène <i>paired</i> de Drosophile et de l'homéodomaine du gène <i>engrailed</i> .	33
Figure 8: Les gènes <i>pax</i> dans le tube neural des Mammifères.	36
Figure 9: Les trois classes de protéines HLH.	43
Figure 10: Dimérisation entre protéines bHLH.	45
Figure 11: Importance des séquences adjacentes au site de fixation E-Box pour la régulation transcriptionnelle.	45
Figure 12: Cascades des facteurs HLH au cours de la neurogenèse de Drosophile et la myogenèse des Vertébrés.	46
Figure 13: Rôle de Myc dans la physiologie cellulaire.	49
Figure 14: Structure des partenaires de Max.	50
Figure 15: Mécanismes d'action de Myc.	51
Figure 16: Formation, maturation et régionalisation des somites aviaires.	53
Figure 17: Expression de marqueurs de la somitogenèse à 2 et 3 jours de développement (E2 et E3) chez le Poulet	55
Figure 18: Relations entre les facteurs de transcription myogéniques.	58
Figure 19: Cascade des facteurs de transcription conduisant à la différenciation myogénique	59
Figure 20: Voies de migration des cellules des crêtes neurales au niveau troncal d'un embryon de 3 jours	60
Figure 21: Voies de synthèse des mélanines.	62
Figure 22: Influence de l' α -MSH et d'Agouti dans la synthèse des mélanines.	69
Figure 23: Action de quelques gènes situés en amont de la mélanogenèse.	69
Figure 24: Eléments génétiques de la morphogenèse de l'oeil de Drosophile.	71
Figure 25: Conservation du récepteur Notch et de ses ligands à travers les espèces.	73
Figure 26: Mécanisme d'inhibition neurale par Notch.	75

Figure 27: Formation de l'oeil des Vertébrés.	77
Figure 28: Structure de la rétine de Vertébrés.	78
Figure 29: Ordre d'apparition des cellules de la rétine de Souris.	80
Figure 30: Potentialités de transdifférenciation de l'oeil de Vertébrés.	94
Figure A: Rôle de PDX1 durant le développement du pancréas	98
Figure B: Plasticité de l'épithélium pancréatique indifférencié	100
Tableau 1: Division en 4 classes de la famille des gènes Pax	32
Tableau 2: Syndromes malformatifs humains et défauts du développement murin associés à des mutations dans les gènes	32
Tableau 3: Gènes potentiellement régulés par les protéines Pax de Vertébrés.	40
Tableau 4: Classification de quelques facteurs de type HLH.	44
Tableau 5: Facteurs de transcription impliqués dans le développement de l'oeil.	83
Tableau 6: Défauts dans le développement des yeux causés par des mutations dans les gènes <i>pax</i> .	84
Tableau 7: Facteurs de transcription de Drosophile impliqués dans le développement de l'oeil et homologues chez les Vertébrés.	89

ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
CAT	Chloramphénicol Acétyl Transférase
CNR	Chicken NeuroRetina (Neurorétine de Poulet)
E-Box	Ephrussi box, de séquence consensus CANNTG
Ey	Eyeless
HD	Homéodomaine
Hes	Hairy- and Enhancer of split- related mammalian proteins
Hox	Homeobox
HLH	Helix-Loop-Helix (hélice-boucle-hélice)
HTH	Helix-Turn-Helix (hélice-coude-hélice)
Id	Inhibitor of differentiation protein (protéine inhibant la différenciation)
Inr	Initiateur
kD	kilodalton
HLH	Helix-Loop-Helix (hélice-boucle-hélice)
LZ	Leucine Zipper (Crémaillère à Leucines)
Mad	Max-associated dimer protein
Max	Myc-associated x protein
MRE	Myb Responsive Element (élément de réponse aux protéines Myb)
NR	Neurorétine
pb	Paire de bases
PRD	Domaine Paired
QEC	Quail Embryo Cells (cellules embryonnaires de caille)
QNR	Quail NeuroRetina (neurorétine de caille)
Rb	Protéine de Rétinoblastome
RNase	RiboNucléase
RPE	Retinal Pigment Epithelium (rétine pigmentaire)
Sey	Small eye
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
USF	Upstream Stimulatory Factor

RESUME

Par criblage différentiel d'une banque d'ADNc construite à partir d'ARNm provenant de cellules de neurorétine de Caille infectées par le rétrovirus MC29 porteur de l'oncogène *v-myc*, ont été isolés deux clones: l'un correspond au gène *Pax-QNR*, orthologue aviaire du gène *pax-6/PAX6* codant un facteur de transcription essentiel pour la formation des yeux, et le second, *QNR-71*, code une protéine du mélanosome apparentée au produit du gène *silver*.

A côté de son expression déjà documentée dans le système nerveux central, nous avons mis en évidence une expression de *Pax-QNR* dans le pancréas, et plus particulièrement le pancréas endocrine. L'expression de *pax-6* est sous le contrôle de deux promoteurs, P0 et P1. P1, promoteur interne, est constitutif dans les tissus qui expriment *Pax-QNR* alors que P0 s'induit au moment de la différenciation neuronale dans la rétine. Nous avons montré que l'oncogène *myc* était capable d'induire la différenciation de la rétine pigmentaire en neurones, ces cellules exprimant alors *Pax-QNR* à partir de P0. P0 et P1, qui sont activés par la protéine p46 codée par *Pax-QNR*, sont également stimulés par les produits de la famille Myb, A-Myb et c-Myb, ces deux facteurs étant exprimés dans la neurorétine. Par ailleurs, nous montrons que les cellules de neurorétine exprimant *A-myb* prolifèrent en réponse au bFGF, une propriété qui avait déjà été observée pour *c-myb*.

QNR-71 s'exprime dans les tissus mélanisés, rétine pigmentaire et mélanocytes de la peau. Le promoteur de ce gène, dont l'expression est spécifique des mélanocytes, répond directement à la fois à Myc et à Mi, deux facteurs de transcription de la famille bHLHLZ, par l'intermédiaire de deux sites de fixation CATGTG. D'autre part, l'expression sous promotion virale de Myc et de Mi conduit à une expression accrue du gène *QNR-71* endogène. Nos travaux montrent que le facteur de transcription v-Myc est capable de reprogrammer la différenciation de la neurorétine vers la voie pigmentaire, et celle de la rétine pigmentaire dans la voie neuronale, suggérant un rôle central pour les facteurs de cette famille dans les phénomènes de différenciation de la rétine.

PRESENTATION

Dans l'introduction de ce mémoire j'ai essayé de présenter succinctement le rôle de quelques grandes classes de facteurs de transcription en tant que marqueurs très précoces de la détermination cellulaire. Ceci pour montrer que très souvent les mêmes grandes classes de facteurs de transcription sont à l'oeuvre dans la détermination et la différenciation cellulaire. Il est admis que les cellules traversent différents stades de détermination avant de parvenir à leur état de différenciation finale. Cependant les cellules déterminées conservent la possibilité de choisir de s'engager sur une nouvelle voie de différenciation; ce phénomène concerne la transdétermination. Plus délicat est la conversion d'un type cellulaire acquis en un autre et qui concerne la transdifférenciation. Comme exemple je présenterai le système que nous travaillons dans le laboratoire depuis plusieurs années; la rétine. L'étude de la transdifférenciation pigmentaire de la neurorétine (NR) nous a permis d'isoler deux marqueurs: *Pax-QNR*, qui s'est avéré être le facteur de transcription *pax-6* et *QNR-71*, un gène marqueur des mélanocytes. Nous avons étudié la régulation de ces deux gènes et nous montrons dans ce travail leur intérêt pour l'étude du phénomène de transdifférenciation.

INTRODUCTION

I. LA DIVERSITE CELLULAIRE

I.1. CE QUI EST VISIBLE ET CE QUI NE L'EST PAS

Au sein de chaque espèce se réalise à partir de l'oeuf et de façon reproductible dans le temps et dans l'espace le développement de l'individu. A partir d'une cellule originelle se déroulent les phases successives de développement et la différenciation de milliers de types cellulaires qui, chez l'adulte, vont pour beaucoup d'entre eux continuer de se diviser. Pour respecter ce programme, de nombreux gènes sont requis avec une chronologie d'expression précise. Les facteurs de transcription sont codés par une catégorie de gènes dont le bon fonctionnement est impératif au développement embryonnaire. Ces gènes agissent souvent en cascades; les produits qu'ils codent ont la particularité de réguler l'expression d'autres gènes dont l'activité va résulter en la mise en place des axes de l'embryon (antéro-postérieur, dorso-ventral et gauche-droite) et ensuite en la différenciation des multiples tissus de l'organisme. Car la clé de tout développement est la génération de différences entre cellules pour les rendre non-équivalentes (Lewis et Wolpert, 1976).

Les premiers signes d'une différence de populations cellulaires apparaissent avec la mise en place des axes antéro-postérieur et dorso-ventral (le premier à se mettre en place chez les Oiseaux et les Mammifères) autour desquels l'embryon s'organise. Puis de l'axe gauche-droite. Déjà le premier axe est visible dans l'oeuf en train de se segmenter sauf chez les Mammifères où il n'apparaît qu'au stade 8 cellules. La présence de cet axe suppose une hétérogénéité de composition (protéines, ARNm maternels, ...) du cytoplasme de l'ovocyte. Le signal qui induit le premier axe est le plus souvent externe; la lumière polarise l'oeuf du Fucus, l'entrée du spermatozoïde détermine l'axe dorso-ventral chez les Amphibiens... Ce premier signal serait une réminiscence du point de contact de la primitive " Blastaea " posée sur le substrat, au fond des océans, de nos lointains ancêtres les premiers Métazoaires (Wolpert, 1994).

I.2. LA DIFFERENCIATION ET LA DETERMINATION

Le choix d'une voie de différenciation que la cellule emprunte est transmis aux cellules filles qui à leur tour ont à effectuer le même choix: poursuivre dans la voie maternelle ou changer de voie. Toutes ces étapes de choix qui précèdent les étapes finales de la différenciation constituent les étapes de détermination. Dès qu'une cellule est déterminée, elle s'est engagée sur une voie de différenciation mais elle reste pendant sa détermination sous l'influence de l'environnement (Slack, 1991). Cependant la détermination n'est pas un processus brutal et a lieu au cours d'étapes successives qui restreignent progressivement les potentialités de différenciation cellulaire. Occasionnellement ce déroulement est bouleversé et la cellule change de détermination; elle se transdétermine.

La plupart du temps les cellules différenciées sont caractérisables simplement par leur morphologie; comment confondre un neurone pourvu de ses dendrites avec un myotube multinucléé fusiforme ou avec un érythrocyte et sa forme biconcave de pneu ou encore avec les cellules mélanocytaires dendritiques pigmentant la peau? Quand ce seul critère morphologique est insuffisant il faut alors utiliser les caractéristiques biochimiques ou génétiques de la cellule.

L'examen des propriétés morphologiques ou biochimiques des cellules spécialisées renseignent sur leur état de différenciation. Par contre ces propriétés ne permettent pas toujours d'identifier des cellules déterminées, car elles sont souvent des conséquences de la différenciation. Si la différenciation peut donc être définie au niveau biochimique comme l'amplification de la diversité cellulaire par l'accumulation de protéines tissu-spécifiques (Grant, 1978), étudier ce qui régule la transcription des gènes codant ces protéines permet d'accéder à ce qui précède l'apparition des marqueurs phénotypiques et d'accéder ainsi aux gènes contrôlant la détermination.

I.3. TRANSDIFFERENCIATION

Chez les Vertébrés, toute cellule différenciée tend à maintenir stable son état au sein de l'organisme. Cependant l'on trouvera certaines conditions telles que la régénération ou la tumorigenèse au cours desquelles cet état sera modifié et pourra conduire à la "transdifférenciation". L'étude de la transcription a permis de mieux connaître les mécanismes

moléculaires impliqués dans la différenciation. Dans le cas de la transdifférenciation, les changements sont beaucoup plus dramatiques car ils résultent du remplacement de l'expression d'un groupe de gènes par un autre groupe. Pendant longtemps le terme traditionnellement utilisé, qui reposait sur des observations anatomiques et histologiques, était " métaplasie " pour dénoter un changement d'un phénotype différencié en un autre. Mais la métaplasie a un sens large qui désigne soit la croissance d'un petit groupe de cellules qui était resté minoritaire, soit la différenciation de cellules souches, soit la transformation d'un type différencié préexistant en un autre type;

La transdifférenciation s'observe essentiellement *in vitro*. La transdifférenciation est décrite dans le cas de transformation de cellules de la rétine pigmentaire (RPE) humaine ou de Poulet en cellules cristallines (Eguchi, 1986; 1988). Les cellules de la lignée myoblastique L6 de Rat se différencient en chondrocytes en présence de matière osseuse déminéralisée dans le milieu de culture (Bettex-Galland et Weismann, 1987). Un autre cas d'induction de La transdifférenciation induite par l'expression ectopique d'oncogènes procure de bons systèmes pour l'étude du rôle des facteurs de transcription requis dans ce processus. Un oncogène est un gène dont l'expression anormale peut transformer morphologiquement *in vitro* des cellules et provoquer *in vivo* des tumeurs. Les oncogènes viraux possèdent des progéniteurs cellulaires et sont responsables du pouvoir transformant des virus qui les expriment; c'est d'ailleurs cette caractéristique qui a permis leur découverte (revue Bishop, 1985). Les oncogènes vont coder nombre de molécules impliquées dans la cascade de la transmission au noyau de l'information perçue au niveau de la membrane; facteurs de croissance, récepteurs, protéines kinases, etc..., et bien sûr, facteurs de transcription. Parmi ces derniers, l'oncogène *v-myc* qui est porté par le rétrovirus de la myélocytomatose aviaire MC29. De très jeunes embryons injectés avec ce virus développent des anomalies cutanées, dans lesquelles l'épiderme prolifère exagérément, et cardiaques dans lesquelles le coeur est envahi par des rhabdomyomes (Saule *et al.*, 1987; Dieterlen-Lievre *et al.*, 1990). Par contre de très jeunes embryons injectés avec le virus MAHEVA qui porte les oncogènes *v-myc* et *v-erbA* (forme tronquée du récepteur à l'hormone thyroïdienne) présentent au sein des rhabdomyomes qu'ils ont développés des nodules cartilagineux formés par transdifférenciation des cellules musculaires (Bachnou *et al.*, 1991).

I.4. CE QUI ENGENDRE LA DIVERSITE CELLULAIRE

Le développement de l'embryon dépend pour beaucoup du dialogue permanent entre les types cellulaires. La plupart du temps ce dialogue se traduit en inductions qui déterminent les cellules de l'embryon. Les inductions embryonnaires consistent en des interactions entre des tissus inducteurs qui émettent des signaux et des tissus répondeurs capables de percevoir ces signaux. Le tissu répondeur est caractérisé comme tel car il est induit à conduire les modifications nécessaires à son développement (Gurdon, 1987). Cela se traduit par des changements coordonnés d'activités géniques aboutissant à des modifications de phénotypes. Deux mécanismes fondamentaux sont actuellement retenus pour expliquer comment s'engendre la diversité cellulaire: la *division asymétrique* et les *interactions cellulaires*.

I.4.1. LA DIVISION ASYMETRIQUE

Contrairement à la division symétrique qui multiplie simplement un lot de cellules identiques en préservant dans toute la descendance les caractéristiques parentales, la division asymétrique permet la création de deux cellules d'identités différentes qui auront des destins différents. L'asymétrie peut résulter d'une polarité propre à l'environnement ou bien intrinsèque à la cellule comme la distribution inégale dans le cytoplasme de déterminants (Rhyu et Knoblich, 1995). L'asymétrie intervient au cours de la différenciation de lignages cellulaires. La protéine Numb, associée à la membrane, est répartie asymétriquement dans les précurseurs des organes sensoriels de la Drosophile. Au cours des divisions de ces précurseurs, elle est distribuée asymétriquement à la descendance. Cela permet l'apparition des différents types cellulaires des organes sensoriels. Les mutants pour *numb* ne produisent pas de neurones (Rhyu *et al.*, 1994). La construction du SNC des Vertébrés s'appuie aussi sur ce processus de divisions asymétriques. La neurogenèse démarre avec un petit nombre de cellules qui prolifèrent (**Figure 1 A**), se déterminent et se différencient. Deux comportements cellulaires ont été observés à la sortie du cycle de divisions (Chenn et McConnell, 1995):

- des clivages verticaux qui produisent une division symétrique des cellules pour maintenir voire augmenter le nombre de précurseurs, chacun entrant à nouveau dans un cycle (**Figure 1B**)

- des clivages horizontaux qui produisent une division asymétrique et à l'issue desquels les cellules filles acquièrent des identités différentes. Les cellules filles dites « basales » vont devenir des neurones et donc entamer leur migration, et les cellules filles dites « apicales » vont demeurer dans la zone proliférative de l'épithélium pour participer à de nouveaux cycles de divisions (**Figure 1C**).

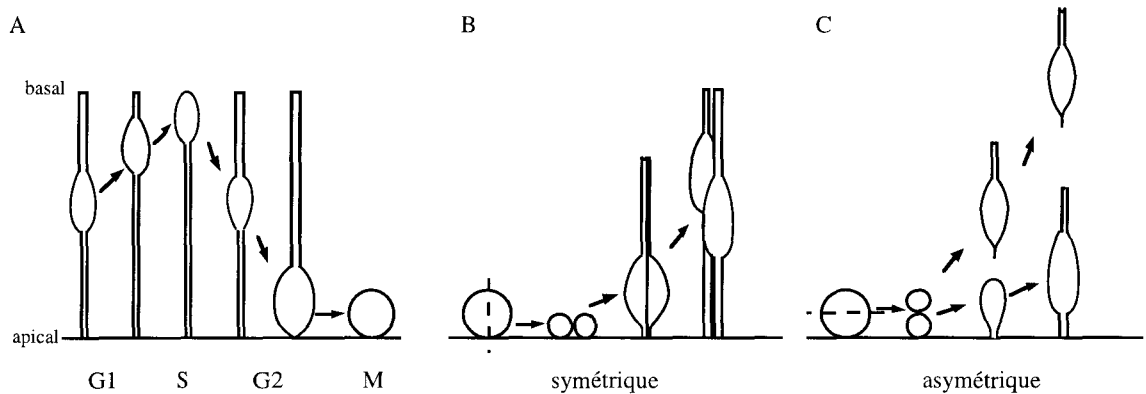


Figure 1: Translocations nucléaires au cours des divisions des précurseurs neuronaux et modèles des divisions symétrique et asymétrique. A. En G1 le noyau monte du côté basal où il se localise en phase S pour redescendre du côté apical en phase G2 et y subir la mitose. B. Clivages verticaux. C. Clivages horizontaux. (d'après Chenn et McConnell, 1995).

En schématisant, on peut dire que les divisions symétriques sont à but prolifératif, et, au cours de la neurogenèse tardive, assurent l'augmentation du nombre de précurseurs, tandis que les divisions asymétriques sont à but différenciateur, et ultérieurement servent à maintenir le nombre de précurseurs puisqu'elles génèrent un neurone et un précurseur, au lieu de deux précurseurs.

L'asymétrie intervient également durant la phase de segmentation des embryons, essentiellement d'invertébrés. Dès les premières divisions les cellules filles héritent de cytoplasmes différant en composition et souvent en taille. La diversité ainsi créée est alors amplifiée par les divisions successives. Les cellules peuvent ainsi être spécifiées très tôt au cours du développement. Les Invertébrés fournissent de nombreux cas d'études du phénomène de divisions asymétriques (Davidson, 1986). L'oeuf d'Amphibien présente une hétérogénéité du cytoplasme qui conduit à une première division asymétrique. L'accumulation différentielle des composants est en partie due à l'effet de la gravité. L'oeuf d'Amphibien présente une inégalité de la charge en vitellus ainsi que de la répartition de certains ARNm maternels (Weeks et Melton, 1987; Ku et Melton, 1993). Cependant le destin des blastomères n'est pas scellé, et comme chez les Oiseaux et les Vertébrés supérieurs la diversité cellulaire précoce est

essentiellement assurée par les interactions cellulaires (Gurdon, 1992), bien qu'aux stades ultérieurs les deux phénomènes puissent se compléter.

I.4.2. LES INTERACTIONS CELLULAIRES

Les interactions entre cellules sont le support de nombreuses inductions embryonnaires. C'est par le biais des contacts entre cellules ou entre cellules et molécules de la matrice extracellulaire que se créent les différences qui permettent l'organisation en tissus différenciés. Or les cellules du tout jeune embryon changent très souvent de voisines, donc d'environnements cellulaire et matriciel au cours des nombreux mouvements cellulaires ponctuant les étapes du développement. Le dialogue nécessite en plus des facteurs de croissance sécrétés par les cellules voisines et piégés ou non dans la matrice, des molécules associées à la matrice et les récepteurs. Et lorsque la distance entre cellules devient importante, le signal est véhiculé par le système circulatoire. Pour que les cellules répondent aux signaux qu'elles reçoivent, elles doivent être compétentes c'est-à-dire posséder les récepteurs pour les signaux externes. La présence de ces protéines membranaires résulte très souvent elle-même d'inductions. La compétence des cellules varie en fonction de leur localisation (nature et richesse de la matrice et cellules voisines) et du stade de développement.

Les types de signaux que deux cellules peuvent s'échanger engendrent trois possibilités :

- une des deux cellules induit la seconde à lui être identique
- une des deux cellules induit la seconde à lui être différente
- l'interaction de deux cellules différentes donne naissance à une troisième sorte

de cellule (Gurdon, 1992).

Aussi, comprendre le support génétique de ces mécanismes et donc de la différenciation cellulaire nécessite d'accéder aux gènes exprimés durant les phases de détermination. Ces gènes constituent en fait, une fois leur chronologie d'action connue, des marqueurs précoces de la différenciation.

II. DES INDUCTEURS DE LA DIFFERENCIATION : LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

II.1. CAR IL FAUT BIEN UN DEBUT : L'ŒUF

Le développement de l'œuf des Vertébrés est classiquement divisé en trois grandes étapes. La première étape, ou segmentation, consiste en une série de divisions successives des cellules dont le volume est diminué à chaque division afin de maintenir inchangé celui du tout jeune embryon ou blastula, stade à l'issue duquel les trois tissus ectoderme, mésoderme et endoderme sont déterminés. Lui succède, par divers mouvements cellulaires, la mise en place des feuillettes ou gastrulation qui constitue la seconde étape. Elle permet « l'épaississement » de l'embryon et lui assure la possession de plans d'organisation similaires chez tous les Vertébrés. Et bien que les gastrulas des Vertébrés soient morphologiquement très différentes, de nombreux gènes s'expriment de façons identiques. L'embryon, ou gastrula, est alors constitué de trois feuillettes cellulaires; il est dit triblastique. Ces trois feuillettes sont l'ectoblaste, le cordonoblaste et l'entoblaste. Les organes seront formés à partir de ces feuillettes à la suite de leurs interactions; il s'agit de la troisième étape de la formation de l'embryon ou organogenèse.

L'organogenèse est amorcée par l'interaction entre le mésoderme dorsal et l'ectoderme qui le recouvre (**Figure 2A**), le mésoderme étant lui-même issu d'interactions inductives (Nieuwkoop, 1969). C'est l'une des interactions les plus importantes de tout le développement puisque le développement du système nerveux (SN) débute avec cette interaction.

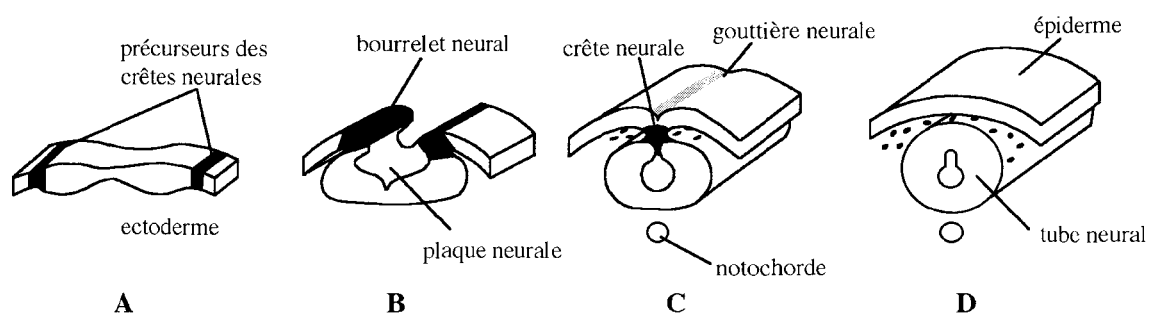


Figure 2: Neurulation chez les Vertébrés

De ces interactions émergent la plaque neurale, après enfoncement du neurectoderme, dont les bords, ou bourrelets, se soulèvent pour former le tube neural (**Figure 2B**). Très rapidement après la fermeture du tube (**Figures 2C et D**) celui-ci se différencie en une moëlle épinière et plus rostralement en trois vésicules; le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale (**Figure 3A**). Plus tard le prosencéphale se divise à son tour en deux autres vésicules: le diencéphale et le télencéphale, tandis que le rhombencéphale évolue pour donner le métencéphale et le

myélocéphale (**Figure 3B**). Les diverticules optiques émergent du diencéphale, et le bulbe olfactif du télencéphale (**Figure 3C**).

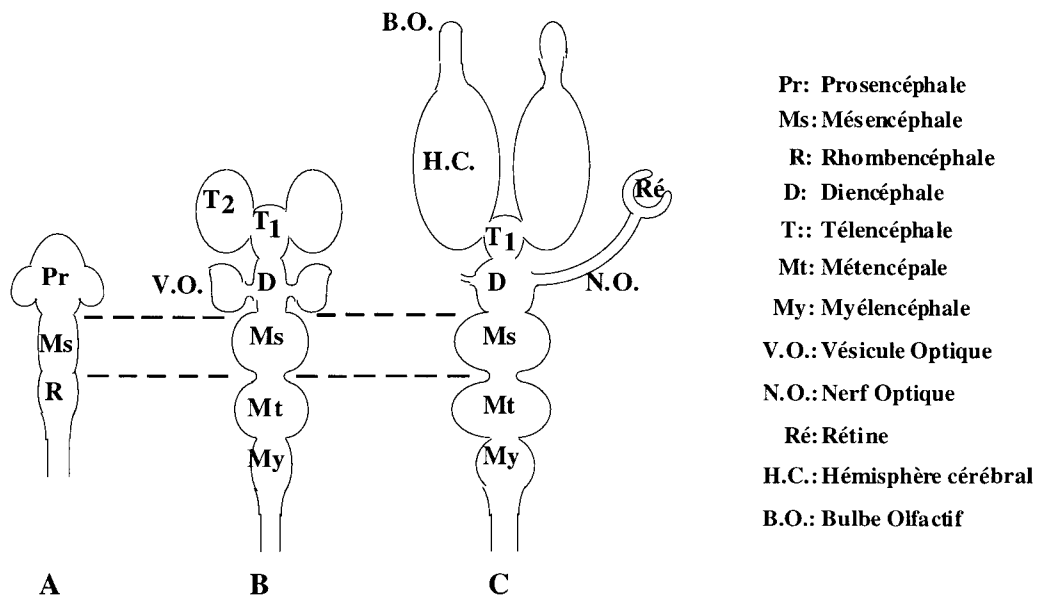


Figure 3: Morphogénèse du système nerveux des Vertébrés

Dans la partie la plus dorsale du tube neural, au sommet des bourrelets neuraxiaux, prennent naissance les cellules des crêtes neurales (**Figure 2C**) qui constituent une structure transitoire dont vont migrer (**Figure 2D**) nombre de cellules nécessaires à l'établissement du système nerveux périphérique (SNP). Les cellules qui migrent à partir de la région troncale des crêtes neurales traversent des structures mésodermiques, les sclérotomes. En effet le mésoderme se subdivise en plusieurs structures elles aussi transitoires: le mésoderme axial ou notochorde qui va former le *nucleus pulposus* de la colonne vertébrale, le mésoderme paraxial ou somites et le mésoderme latéral situé de part et d'autre des somites. Plus tard au cours du développement, le tube neural et la notochorde jouent à leur tour un rôle dans les inductions qui mènent à la formation d'organes. La notochorde est aussi responsable de la détermination de cellules du tube neural (Yamada *et al.*, 1993). Entre autres actions ces deux structures axiales sont impliquées dans l'induction de la myogénèse, en agissant au niveau des somites.

II.2 LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

De 75 à 90% des gènes exprimés dans un type cellulaire le sont dans la plupart des tissus. La spécificité d'un type cellulaire est due à l'expression tissu-spécifique de quelques gènes. La

transcription met en jeu des facteurs de transcription dits généraux qui s'assemblent en complexes sur l'ADN en un site proche du point d'initiation de la transcription, et des facteurs de transcription spécifiques car d'expression tissulaire restreinte. Différentes combinaisons de facteurs de transcription généraux s'assemblent autour des ARN polymérase pour assurer le démarrage de la transcription à partir du promoteur. Les promoteurs des gènes qui codent les protéines possèdent souvent une région appelée Inr importante pour déterminer le site d'initiation de la synthèse des ARN. Certains de ces promoteurs possèdent en plus une séquence TATAA (boîte TATA) et d'autres, classiquement associés aux gènes de ménage, sont dépourvus de boîte TATA mais possèdent une séquence riche en GC. Les facteurs de transcription généraux participant à la formation de complexes d'initiation de la transcription autour de l'ARN polymérase II, qui assure la transcription des gènes, ont été purifiés à partir d'extraits nucléaires de cellules Hela et ont été appelés TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH. Le démarrage de la transcription nécessite la reconnaissance du promoteur. Celle-ci est réalisée par TFIID. La boîte TATA est reconnue par la TBP (**TATA Binding Protein**), un des composants de la machinerie transcriptionnelle de base, et qui est une protéine de 38kD. La TBP fait partie du complexe multiprotéique TFIID qui contient également une dizaine de polypeptides appelés TAFs (**TBP Associated Factors**). Ce complexe de prédémarrage de la transcription très stable est ensuite reconnu par TFIIA. Ce second complexe, également très stable, est à son tour reconnu par la polymérase, associée à TFIIB et TFIIIF, qui peut alors se joindre à ce complexe. Puis enfin se rajoutent TFIIE et TFIIH (Roeder, 1996) (**Figure 4**). Ce complexe de prédémarrage constitué, la transcription s'amorce en faisant appel à l'hydrolyse d'ATP ou de dATP.

La transcription dépend de la région promotrice, mais « l'énergie » avec laquelle elle aura lieu dépend d'une ou plusieurs autres séquences réparties à distance variable du promoteur. Ces séquences régulatrices, ou amplificateurs, sont les cibles de protéines activatrices ou facteurs de transcription spécifiques. Les cellules recrutent donc pour réguler l'expression de leurs gènes des cofacteurs de la polymérase (ou facteurs de transcription généraux) et des facteurs de transcription spécifiques pour adapter l'expression de leur génome quantitativement et qualitativement. Les facteurs de transcription spécifiques possèdent souvent plus d'un site sur

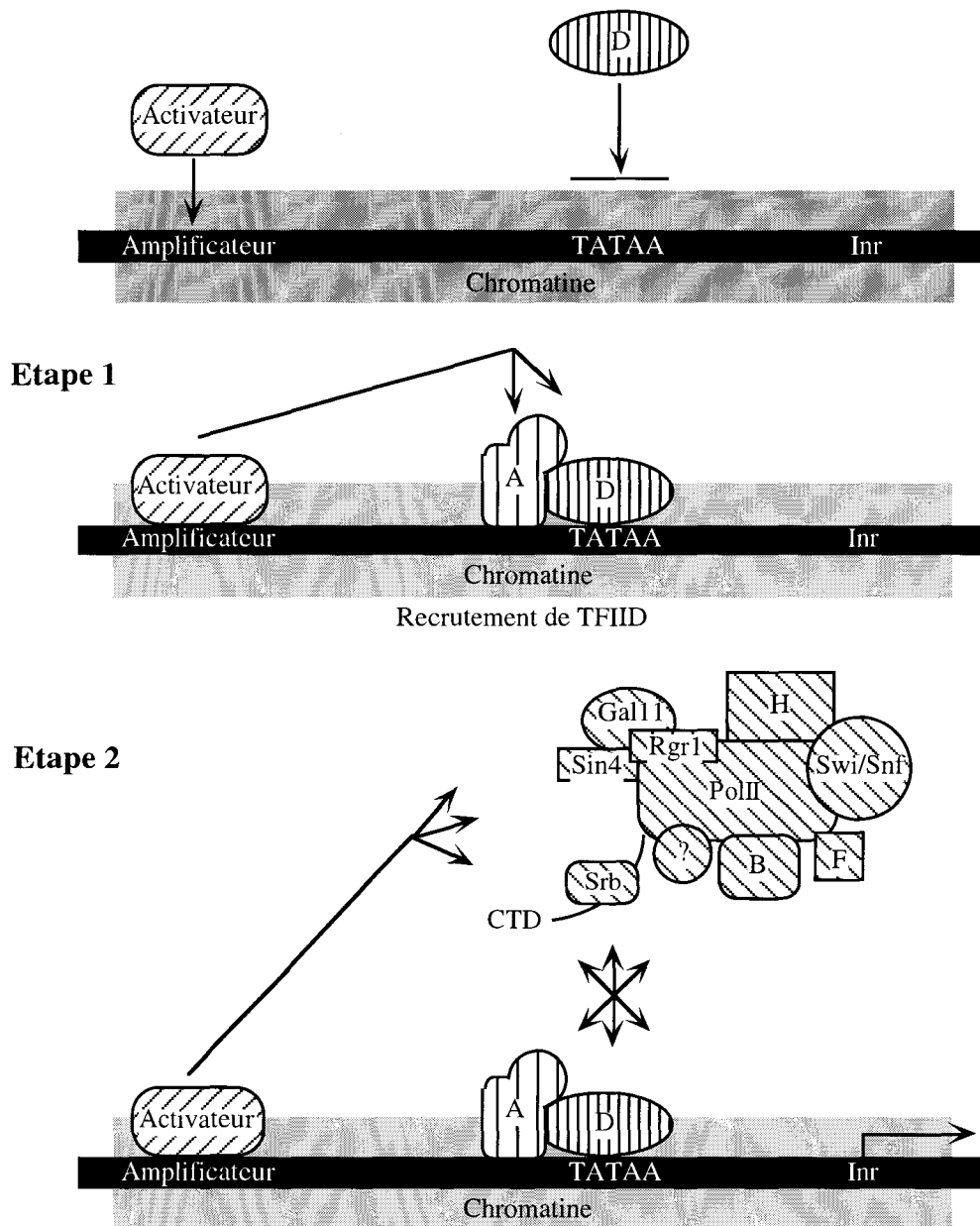


Figure 4 - Modèle en deux étapes de l'activation de la transcription chez la Levure.
(d'après Stargell et Struhl, 1996)

L'activateur peut accéder à l'amplificateur ("enhancer") quand la chromatine est complexée tandis que TFIID (D) ne peut se fixer à la boîte TATA. Ensuite :

Etape 1 : La fixation de l'activateur permet le débobinage de la chromatine, et le recrutement de TFIID (D), qui est stabilisé par TFIIA (A).

Etape 2 : Les interactions entre l'activateur et l'holoenzyme et entre TFIID et l'holoenzyme, permettent de recruter l'holoenzyme. Ceci a pour résultat d'initier à haut taux la transcription à la séquence Inr.

L'holoenzyme est composée de : l'ARN polymérase II (PolII), TFIIB (B), TFIIF (F), TFIIH (H), des protéines Srb qui interagissent avec le domaine C-terminal de Pol II, des protéines Gal11, Sin4, Rgr1, Swi/Snf et d'autres protéines qui restent à identifier.

lequel se fixer et une distribution restreinte à quelques types cellulaires. Leur importance dans la mise en place de la différenciation est attestée par l'existence de syndromes malformatifs qui sont souvent associés à leurs mutations. Et depuis maintenant quelques années a été développée la technique de recombinaison homologe qui repose sur la capacité d'échange réciproque entre deux ADN, dont l'un porte des altérations de séquences par rapport à l'autre. C'est-à-dire que l'on remplace un gène endogène par sa copie modifiée en l'injectant dans des cellules souches de Souris (cellules ES), que l'on réagrège à un embryon au stade blastocyste en espérant que les cellules mutantes colonisent la lignée germinale. Cette technique permet de suivre *in situ* les conséquences d'une mutation sur le développement ou le fonctionnement de l'organisme.

Pour agir les facteurs de transcription se fixent sur l'ADN au niveau de motifs nucléotidiques définis et entrent en contact avec la machinerie des facteurs généraux dont ils vont moduler l'activité. Des protéines adaptatrices peuvent effectuer des pontages entre les facteurs de transcription tissu-spécifiques et le complexe de base de la transcription. On peut ainsi citer le coactivateur CBP ainsi qu'une protéine qui lui est proche, la p300, toutes deux pouvant interagir avec différents facteurs de transcription comme les récepteurs nucléaires, CREB, c-Jun, c-Fos, Sap-1a, c-Myb, MyoD, YY1 et les polypeptides de la machinerie transcriptionnelle de base comme TBP ou TFIIB (Janknecht et Hunter, 1996)

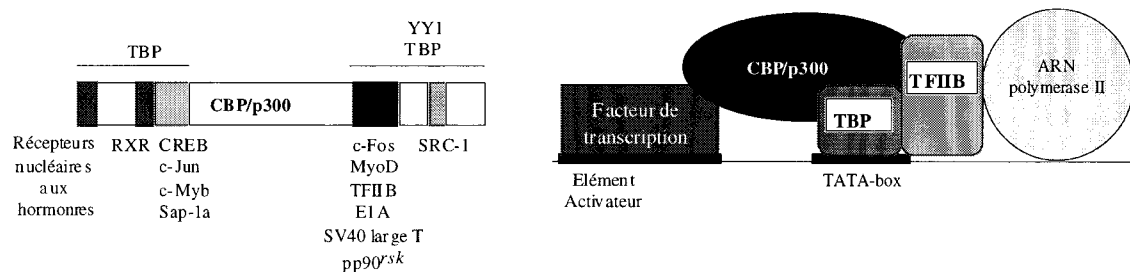


Figure 5: CBP, une molécule de pontage entre les facteurs de transcription et la machinerie de base de la transcription (d'après Janknecht et Hunter, 1996).

Ces molécules de pontages sont des facteurs limitants dans la cellule et leur épuisement peut conduire à l'arrêt de la transcription (**Figure 5**).

L'action de ces facteurs (assemblage du complexe et fixation sur l'ADN) dépend de leur accès à la chromatine, qui est la structure de l'ADN, condensée grâce aux nucléosomes (**Figure 6**). Le nucléosome peut être une structure de répression en empêchant l'accès des facteurs à l'ADN (Chen *et al.*, 1994). La régulation des promoteurs nécessite la fixation de facteurs

particuliers qui rompt la structure nucléosomale pour rendre accessible d'autres motifs de fixation et la boîte TATA (**Figure 4**). Inversement le nucléosome peut être une structure d'activation de la transcription dans le cas où les amplificateurs sont très éloignés du site d'initiation; les nucléosomes, en compactant la chromatine, assurent le rapprochement de ces sites (Cullen *et al.*, 1993; Schild *et al.*, 1993) (**Figure 6**).

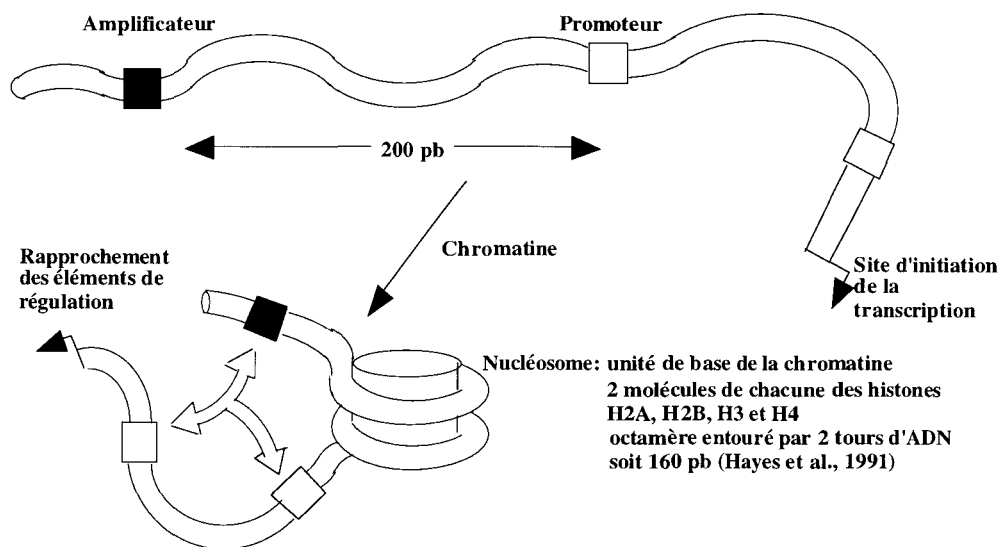


Figure 6: Rôle du nucléosome dans l'activation de la transcription (Wolffe, 1994).

Les histones sont particulièrement importantes dans la régulation de la phase de prolifération cellulaire du développement précoce des embryons précédant la mise en place des feuillettes. Au cours du développement s'effectue une transition progressive ou transition blastulienne (MBT pour **M**id **B**lastula **T**ransition), de l'utilisation du matériel d'origine maternel à la mise en route de l'expression des gènes de l'embryon. L'accumulation des produits maternels, protéines et ARNm, permet d'assurer les premières divisions de l'oeuf. Les études concernant la répression du génome zygotique ont été menées essentiellement chez les Amphibiens. Il apparaît que la répression de la transcription basale serait due, plutôt qu'à un manque de facteurs tels que TBP, à un excès d'histones: pendant l'oogenèse est synthétisée une quantité d'histones équivalente aux contenus de 13000 à 16000 noyaux (Adamson et Woodland, 1974; Woodland et Adamson, 1977). La transcription serait inhibée par la compaction importante de la chromatine (Prioleau *et al.*, 1994). Cependant les facteurs agissant en *trans* peuvent se fixer sur leur site. Mais ils sont dans l'impossibilité de recruter la machinerie transcriptionnelle de base du fait de la compaction de l'ADN (Prioleau *et al.*, 1995). Les

divisions ultérieures dilueraient la quantité d'histones, permettant la levée de la répression du génome zygotique. Toutes les détermination et différenciation du tout jeune embryon reposent sur cette notion de remodelage de la structure chromatinienne.

Le mode d'action des facteurs de transcription implique l'existence d'au moins deux types de domaines fonctionnels dans ces protéines. La structure générale des facteurs de transcription spécifiques comporte un ou plusieurs domaines assurant la liaison à l'ADN et un domaine ou plusieurs domaines se répartissant le pouvoir activateur. Ces deux types de domaines fonctionnels sont en général distincts. Parfois un domaine de dimérisation cotoie le domaine de liaison à l'ADN car certains facteurs agissent de façon homo ou hétérodimérique. Les facteurs ont été regroupés en familles sur la base d'homologies existant dans les motifs de liaison à l'ADN. Ces domaines de reconnaissance de l'ADN sont de plusieurs types et nous allons en détailler quelques uns plus particulièrement impliqués dans le développement.

II.3. LE DOMAINE « FORK HEAD »/HELICE AILEE

Le gène de *Drosophila* *fork head* a été ainsi nommé du fait des défauts, chez les animaux mutés dans ce gène, dans les structures terminales responsables de la formation de l'intestin antérieur et de l'intestin postérieur. La protéine codée par *fork head* possède un domaine de 100 acides aminés, que partage une large famille de gènes présents tant chez la *Drosophila* que chez les Vertébrés. Ce domaine, extrêmement conservé, est suffisant pour diriger la fixation à l'ADN (Clark *et al.*, 1993). La structure tridimensionnelle révèle 3 hélices α situées (H1, H2 et H3) constituant une structure globulaire hydrophobe dans la moitié N-terminale. La séquence qui sépare H1 de H2 interagit avec deux autres séquences situées en C-terminal du domaine pour former un feuillet β qui lie l'ADN. La surface principale de contact est assurée par H3 qui est flanquée de deux boucles; la fixation de l'ensemble confère à la protéine une structure en ailes de papillon, d'où le terme « winged helix » (Lai *et al.*, 1993).

II.4. LE DOMAINE DOIGT DE ZINC

Cette structure a d'abord été proposée pour le premier facteur général de transcription eucaryote caractérisé, le facteur TFIIIA qui stimule la transcription des gènes de l'ARN 5S par

l'ARN polymérase III. La séquence peptidique de ce facteur contient un motif de 30 acides aminés de type -C-X₂₋₅-C-X₁₂₋₁₃-H-X₃₋₄-H- répété 9 fois. Le repliement de chaque répétition permet la complexation d'un atome de zinc grâce à la présence d'acides aminés cystéines (C) et histidines (H) (Miller *et al.*, 1985). La structure ainsi formée autour de l'atome de zinc constitue un "doigt". Le contact du doigt de zinc avec 5 pb du grand sillon de l'ADN s'établit au niveau de l'hélice α qui comprend la boucle His-His et quelques résidus entre les doigts. Les nombreuses protéines possédant ce type de liaison à l'ADN ont été classées sur la base d'homologies dans ces structures en doigts de zinc. Trois grandes classes de motifs ont été distinguées. Les classes 2 et 3 se distinguent par la présence d'un nombre variable de cystéines et de l'absence d'histidines et par leur fixation à l'ADN sous forme dimérique sur des séquences palindromiques.

1) les doigts de zinc "vrais" ou "**C2H2**" ou **classe 1**: dans cette famille de facteurs les atomes de zinc sont complexés par deux cystéines et deux histidines et se fixent à l'ADN en *monomères*. Les doigts à zinc sont très semblables à ceux de TFIIIA. Les facteurs de transcription de cette famille se distinguent par le nombre de doigts le plus souvent adjacents. Le nombre de doigts est en général compris entre deux et quatre. Cela concerne des facteurs comme Sp1, Krox, les produits des gènes *huckebein*, *hunchback*, *Krüppel*, *snail* et les produits des gènes *GLI* (clonés initialement dans des glioblastomes (Kinzler *et al.*, 1987). Les motifs doigts de zinc des protéines *GLI* contiennent 5 doigts dont 4 seulement contactent l'ADN (Pavletich *et al.*, 1993).

2) les doigts de zinc "**C4**" ou **classe 2**: dans cette famille les atomes de zinc sont complexés par quatre cystéines. On retrouve ce motif dans les récepteurs aux hormones stéroïdes, thyroïdiennes, et dans le facteur de transcription HNF4 (**H**epatocyte **N**uclear **F**actor 4). Ce motif est capable de se lier à la séquence HRE (**H**ormone **R**esponsive **E**lements). La spécificité de reconnaissance sur le HRE est le fait de trois acides aminés qui permettent la distinction entre les sites de reconnaissance des récepteurs des glucocorticoïdes, des oestrogènes ou des hormones thyroïdiennes. Ce motif est aussi présent dans les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR). Les RARs se divisent en deux familles: les RARs qui sont activés par tous les rétinoïdes tandis que les RXRs ne sont activés que par les 9-cis rétinoïdes (pour revue Giguère *et al.*, 1994). Plusieurs des membres de ces deux familles s'expriment au cours du développement de l'oeil, mais dans la

neurorétine seuls s'expriment $RXR\alpha$, dont les messagers sont présents dans tous les types cellulaires de l'oeil (Dolle *et al.*, 1990), et $RXR\gamma$ (Dolle *et al.*, 1994).

3) les doigts de zinc "C6" ou **classe 3**: dans cette famille deux atomes de zinc sont complexés par six cystéines. Cette structure caractérise de nombreux facteurs de transcription de la Levure (Gal4 etc...).

II.5. LE DOMAINE HTH ET LES HOMEOPROTEINES

II.5.1. L'ARCHETYPE

Il s'agit de deux hélices α de 8 à 10 acides aminés séparées par 3 acides aminés formant un coude β . C'est l'un des motifs de liaison à l'ADN le plus ancien phylogénétiquement. Cette sorte de structure a été pour la première fois observée chez les répresseurs du phage λ , λ Cro (Anderson *et al.*, 1981) et λ CI (McKay *et al.* 1981), et la protéine CAP d'E. Coli (Pabo et Lewis, 1982). L'hélice 2, en C-terminal, reconnaît la séquence d'ADN au niveau du grand sillon tandis que l'hélice 1, en N-terminal, sert à stabiliser l'ensemble. Les protéines à domaine HTH se fixent en dimères, sur une séquence palindromique, chacune liant la moitié du site, ou hémi-site. Le clonage et la caractérisation de nombreux gènes régulateurs homéotiques et de segmentation ont par la suite révélé la présence au sein du domaine de liaison à l'ADN de ces facteurs de transcription d'un motif HTH analogue au domaine de liaison à l'ADN des activateurs ou répresseurs procaryotes (Laughton, 1991). Les caractéristiques de cette structure HTH sont communes à plusieurs familles de domaines de liaison à l'ADN: domaine homéo, domaine "paired", domaine "POU". Dans chaque cas une hélice α est logée dans le grand sillon de l'ADN en contact direct avec les nucléotides. Ils peuvent agir soit de façon directe par fixation à l'ADN et interaction avec la machinerie transcriptionnelle, soit de façon indirecte sans fixer l'ADN, uniquement par des interactions protéine-protéine.

II.5.2. LES PROTEINES HOMEOTIQUES

C'est en étudiant des drosophiles mutantes que l'on a caractérisé les premiers gènes homéotiques et de segmentation. Le développement de la Drosophile se réalise selon un plan segmental établi le long de l'axe antéro-postérieur. L'établissement des axes et la détermination

des lignages cellulaires dépendent de 4 groupes de gènes à effet maternel. Ces groupes régulent en cascade des gènes zygotiques (« gap » → « pair rule » → « segment polarity ») qui subdivisent l'embryon en segments dont l'identité est définie en final par les gènes homéotiques. Chez ces insectes mutants, des organes sont remplacés par des organes portés par des segments placés ailleurs sur l'axe antéro-postérieur; soit le segment est transformé en un segment qui lui est antérieur (mutation perte de fonction) soit le segment lui est plus postérieur (mutation gain de fonction). Dans les deux cas l'insecte se retrouve avec deux segments identiques, d'où l'appellation de mutations homéotiques, le terme *homéo* signifiant semblable. Ainsi, par exemple, des pattes remplacent des antennes ou des éléments de la bouche comme dans le cas de la mutation *Antennapedia* (Gehring, 1966; Lewis, 1978; Garber *et al.*, 1983). L'engagement des cellules à l'origine des différentes parties de l'organisme puis leur différenciation finale sont sous le contrôle des produits des gènes homéotiques. Sans ces protéines homéotiques il n'y aurait pas de détermination en fonction de la position des cellules sur l'axe antéro-postérieur et chaque cellule se développerait sans doute de façon semblable. Ces gènes sont regroupés en deux complexes: d'une part les gènes du complexe *bithorax* (BX-C) qui spécifient la différenciation de la partie postérieure de l'embryon, et d'autre part les gènes du complexe *antennapedia* (ANT-C) qui spécifient la différenciation de la partie antérieure. Ces gènes constituent le complexe HOM-C (**HOM**eotic Complex) et sont disposés en groupes le long des chromosomes dans l'ordre de leur expression le long de l'axe antéro-postérieur. L'équivalent du complexe HOM-C est le complexe HOX chez les Vertébrés. Chez les Mammifères, comme d'ailleurs chez les Insectes primitifs, il n'existe qu'un seul ensemble regroupant les gènes des complexes *bithorax* et *antennapedia*.

Les gènes homéotiques sont caractérisés par la présence de l'homéoboîte, une séquence nucléotidique codant un domaine de 60 acides aminés, l'homéodomaine (HD). L'homéodomaine caractérise aussi de nombreuses protéines codées par d'autres gènes que les gènes homéotiques; actuellement plus de 300 gènes codant des protéines à homéodomaine ont été découverts. L'analyse par cristallographie des homéodomains d'*Antennapedia* (Quian *et al.*, 1989), d'*Engrailed* de *Drosophila* (Kissinger *et al.*, 1990) et de la protéine de Levure MAT α 2 (Wolberger *et al.*, 1991) a montré une structure commune de 3 hélices α et d'un bras amino-

terminal. L'homéodomaine reconnaît un motif dans le grand sillon de l'ADN grâce à son hélice 3 qui correspond dans le motif HTH à l'hélice 2 (Pabo et Lewis, 1982) et au bras amino-terminal au niveau du petit sillon. Le motif central de reconnaissance est TAAT (Laughton, 1991; Treisman *et al.*, 1992). Le reste du motif, à savoir 2 pb suivant le TAAT, est reconnu par l'acide aminé 50, qui est le 9^{ème} de l'hélice 3 (Treisman *et al.*, 1992). Cette courte séquence n'est pas à elle seule suffisante pour expliquer la grande diversité de cibles potentielles et la spécificité de reconnaissance des différentes protéines à homéodomaine. Le bras amino-terminal est nécessaire pour avoir une affinité de fixation optimale ainsi que pour le maintien de la structure tertiaire appropriée (Shang *et al.*, 1994). Dans certains cas le bras amino-terminal, bien que nécessaire à la spécificité de reconnaissance, n'est pas toujours suffisant (Chan et Mann, 1993). La conformation du bras amino-terminal pourrait être influencée par la séquence du site de fixation ou par les cofacteurs avec lesquels il peut s'associer. Bien que les 16 acides aminés conservés de l'homéodomaine à travers la famille des protéines à homéodomaine soient suffisants pour la reconnaissance de l'ADN, la nature de quelques acides aminés particuliers dans l'hélice qui contacte l'ADN est déterminante pour la spécificité de reconnaissance.

Si l'homéodomaine est capable de fixer l'ADN en tant que monomère et avec une bonne affinité (Gehring *et al.*, 1994), il existe aussi de nombreux exemples de dimérisation entre protéines à homéodomaine mais impliquant une autre région que l'HD (revue Wilson *et al.*, 1993). L'exposition d'acides aminés qui ne sont pas engagés dans la liaison avec l'ADN permet à l'homéodomaine de contacter d'autres protéines. La partie amino-terminale et la première hélice α de la protéine codée par HOXD8 sont suffisants *in vitro* pour interagir avec HOXD9 (Zappavigna *et al.*, 1994). Récemment il a été montré que les protéines à homéodomaine codées par le gène maternel *bicoid* de Drosophile peuvent interagir entre elles par l'intermédiaire d'une région différente de celle de l'HD (Yuan *et al.*, 1996).

Les premières données biochimiques et structurales d'une dimérisation entre homéodomaine proviennent d'études menées sur la fixation à l'ADN des protéines à homéodomaine de la classe PRD. Ces données révèlent que tous les membres homéodomaine de classe PRD peuvent se fixer de manière coopérative en homo- ou hétéro-dimères sur des séquences palindromiques contenant deux demi-sites TAAT et ATTA séparés par un nombre

variable de nucléotides (Wilson *et al.*, 1993). Le 9^{ième} résidu de l'hélice de reconnaissance intervient pour spécifier et interagir avec les 2 bases immédiatement en 3' du motif TAAT (Treisman *et al.*, 1992). Cette interaction est indirecte et fait intervenir plusieurs molécules d'eau (Wilson *et al.*, 1995). La nature du 9^{ième} résidu, qui détermine l'identité des nucléotides du centre du palindrome et l'espacement entre les séquences TAAT et ATTA, et par conséquent la structure adoptée par le complexe de fixation, varie selon les membres de la famille PRD. Pour une sérine, l'espacement pour une fixation optimale sera de 2 pb, pour une glutamine ou une lysine, l'espacement préférentiel sera de 3 pb mais avec des exigences quant à la nature de ces 3 pb différentes (Wilson *et al.*, 1993). Ce 9^{ième} résidu de la 3^{ième} hélice, qui est en fait l'AA 50 de l'homéodomaine, est donc important pour la spécificité de reconnaissance de la séquence nucléotidique, de telle sorte que sa nature a servi de critère de classification des divers types d'homéodomaines: Gln pour les homéodomaine de type Hox, Caudal, TCL, Msh, NK1 et 2, Engrailed et certains apparentés au type Paired (PRD); Ser pour les homéodomaines de type PRD; Lys pour les homéodomaines de type *Bicoïd* et certains apparentés au type PRD; et Cys pour les homéodomaines de type POU. Il est intéressant de noter que dans le cas des homéodomaines de type PRD avec une sérine, la fixation peut avoir lieu sur des séquences avec P2 de type **TAATYRATTA** ou bien avec P3 de type **TAATYNRATTA**, Y pour C ou T, R pour A ou G et N quelconque (Wilson *et al.*, 1995). Ainsi la dimérisation procède par la distorsion de l'ADN après la fixation de l'un des homéodomaine, ce qui permet l'accès du deuxième brin au second homéodomaine. La possibilité de dimérisation permet la reconnaissance de plus longues séquences que les 6 pb d'un monomère, ce qui apporte une plus grande spécificité dans la reconnaissance des séquences cibles.

Enfin, un nombre croissant d'exemples prouvent la capacité de l'homéodomaine à prendre part dans les interactions des protéines à homéodomaine avec des facteurs de la machinerie transcriptionnelle de base (Zhu et Kuziora, 1996).

La fonction des facteurs de transcription étant de réguler l'expression d'autres gènes, la moindre perturbation de l'expression de ces régulateurs perturbera en aval la cascade de tous les gènes que ces facteurs contrôlent. Ainsi on sait depuis déjà plusieurs années, qu'en-dehors de la présence de mutations, l'expression inappropriée d'un facteur de transcription peut également

être oncogénique. Le facteur de transcription C-MYC humain peut conduire à la transformation de fibroblastes aviaires sans nécessiter aucune mutation (Martin *et al.*, 1986). Les facteurs de transcription régulant le développement ont, entre autres missions, celle de réguler la vitesse de prolifération des cellules de l'embryon et de ce fait peuvent devenir des oncogènes (Duboule, 1994). Cela n'est en rien incohérent avec leur fonction d'inducteur de la différenciation car la mitose est associée à la différenciation dans la mesure où les cellules qui se différencient arrêtent très souvent de se diviser (Le Douarin, 1979). En réduisant son potentiel mitotique, la cellule se différencie en activant les gènes nécessaires à ses nouvelles fonctions. Certaines protéines à homéodomaine, par coexpression avec des facteurs de croissance, peuvent transformer des cellules *in vitro* et induire des leucémies *in vivo* (Perkins *et al.*, 1990).

Les nombreux gènes à boîte homéo isolés chez les Vertébrés ont été classés en grandes familles sur la base de la séquence en acides aminés. D'autres motifs, très conservés, sont parfois associés à l'HD qui peuvent participer aux interactions protéiques et à la liaison à l'ADN ou du moins dans la reconnaissance de séquences d'ADN voisines des séquences reconnues par le domaine homéo. Ainsi, en-dehors des facteurs de transcription à homéodomaine qui sont des facteurs se liant à l'ADN grâce au seul domaine homéo, ont été isolés des facteurs à domaine « CVC », « POU », à domaine « paired » (PRD) ou à domaine « LIM ».

II.6. ASSOCIATION DU DOMAINE HOMEIO ET DE MOTIFS CONSERVES

II.6.1. LE DOMAINE POU

1. présentation

La sous-famille des protéines à homéodomaine portant un domaine POU est apparue avec la découverte simultanée de quatre facteurs de transcription, Pit-1, Oct-2 (et Oct-1) et Unc-86. Il a été établi d'abord avec ces premiers membres découverts un rôle dans la détermination de phénotypes cellulaires spécifiques.

- Le facteur de transcription mammifère Pit-1 est spécifique de l'hypophyse (Bodner *et al.*, 1988; Ingraham *et al.*, 1988). Des mutations dans le gène *Pit-1* rendant son produit incapable de se fixer sur ses éléments de reconnaissance (Li *et al.*, 1990) provoquent une absence de production d'hormone de croissance, de prolactine, d'hormone thyrotrophe et de cellule de type

somatotrophe, lactotrophe et thyrotrophe dans l'hypophyse antérieure. Pit-1 régulerait la prolifération et/ou la survie de 3 types cellulaires de l'hypophyse et la transcription d'un récepteur nécessaire à la croissance des cellules somatotrophes (Godfrey *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1993). Les cellules thyrotrophes se différencieraient selon deux voies, l'une dépendante de Pit-1 et l'autre non (Lin *et al.*, 1994).

- Le facteur de transcription mammifère Oct-2 est spécifique des cellules B (Clerc *et al.*, 1988; Scheidereit *et al.*, 1988). La suppression de *Oct-2* par recombinaison homologue, révèle son rôle clé dans la différenciation terminale et la survie des cellules B (Corcoran *et al.*, 1993). Le facteur de transcription Oct-1 semble être ubiquiste et capable de fixer une séquence octamérique (Sturn *et al.*, 1988).

- Le produit du gène *unc-86* de *C.elegans* (Finney *et al.*, 1988) peut activer directement la transcription du gène *mec-3* (Way *et al.*, 1991) qui code une protéine à homéodomaine importante dans la différenciation neuronale chez *C.elegans* (Way *et al.*, 1988; 1989). Et une mutation dans le locus de *unc-86* a montré que ce facteur à domaine POU était nécessaire à l'engagement dans plusieurs voies neuroblastiques (Finney *et al.*, 1988; 1990). Elle affecte également la différenciation terminale des neurones mécanorécepteurs (Finney et Ruvkun, 1990).

Le domaine POU est bipartite et se divise en un domaine de 76 à 78 acides aminés ou Pou-spécifique (POU_S) et un domaine homéo divergent de type Antennapedia ou POU_{HD} dans la moitié C-terminale (pour revue voir Rosenfeld, 1991). L'acide aminé 50 de l'hélice de reconnaissance des domaines POU_{HD} est une cystéine. Aucun des deux domaines ne peut séparément lier l'ADN avec une grande affinité (Verrijzer *et al.*, 1992). Les domaines POU_{HD} de Pit-1 et de Oct-2 se lient à la séquence TAAT seulement si celle-ci est précédée d'une séquence ATGC qui est reconnue par le domaine POU_S. Le domaine POU peut également intervenir dans la formation d'homodimères ou d'hétérodimères entre les autres protéines de la famille, voire même avec des protéines comme VP-16 (Stern *et al.*, 1989), avec des protéines inhibitrices de la liaison à l'ADN telles que I-POU (Treacy *et al.*, 1991) ou encore avec des récepteurs nucléaires (Wegner *et al.*, 1993).

2. implication des gènes POU dans le SNC

La division de la famille des protéines à domaine POU en 6 groupes repose sur des homologies de séquences dans la région séparant les POU_S et POU_{HD} et d'un groupe de résidus basiques de la partie amino-terminale de l'homéodoamine (Wegner *et al.*, 1993). De nombreux membres de cette famille s'expriment dans le système nerveux central (SNC); dans le tube neural en développement, puis dans certaines zones du cerveau adulte, et dans la rétine, ou bien les crêtes neurales. Ce qui suggère que ces facteurs de transcription pourraient être impliqués dans la détermination et la différenciation de certaines populations neuronales.

3. implication des gènes POU dans les premiers stades du développement (Rosner *et al.*, 1990)

Un autre membre de la famille, Oct-3, semble quant à lui agir dans les tous premiers événements du développement de l'embryon. Oct-3 est exprimé dans les cellules souches embryonnaires de Souris (cellules ES) mais en disparaît dès que celles-ci sont amenées à se différencier. Il est aussi exprimé dans l'oocyte mature, dans le trophoctoderme, puis dans l'épiblaste et l'endoderme primitif. Après implantation, son expression se restreint à l'ectoderme primitif. La différenciation du mésoderme à partir de ce tissu s'accompagne alors d'une forte réduction de l'expression de Oct-3. L'expression de Oct-3 est présente dans les cellules de la lignée germinale; Oct-3 est retrouvé chez l'adulte dans les ovaires et les testicules.

II.6.2 LA REPETITION LIM

Le domaine homéo peut aussi être associé avec des domaines qui n'ont aucune similitude avec un domaine homéo quelconque dégénéré ou non. Ainsi, le domaine LIM qui contient un motif riche en cystéine/histidine capable de fixer le zinc. Son nom vient des trois premiers membres identifiés de la famille: Lin-11 de *C. elegans* impliqué dans le développement de la vulve (Freyd *et al.*, 1990), Isl1 activateur transcriptionnel du gène I de l'insuline chez le rat (Karlson *et al.*, 1990) jouant un rôle essentiel dans l'expression cellule-spécifique de l'insuline (Ericson *et al.*, 1992; German *et al.*, 1992), et Mec-3 de *C. elegans* (Way et Chalfie, 1988), lui même régulé par le produit du gène POU *unc-86* (Xue *et al.*, 1993) et étant impliqué dans la différenciation de certains neurones mécanosensoriels (Way et Chalfie, 1988).

Ce domaine est très conservé au cours de l'évolution. On distingue trois classes de protéines à domaine LIM.

- Les protéines de type LIM-homéodomaine contiennent deux domaines LIM en association avec un homéodomaine. Les exemples d'Is11 et de Mec-3, de type LIM-homéodomaine soulignent l'importance des protéines de ce type dans la spécification de type cellulaire. Plusieurs protéines de ce type interviendraient dans la diversification des motoneurones et dans leur aptitude à déterminer la voie d'acheminement de leurs axones (Tsuchida *et al.*, 1994).

- Les protéines de type LIM-seul ne contiennent pas d'homéodomaine mais seulement un à trois domaines LIM. Seulement deux protéines avec un domaine LIM unique sont actuellement connues: CRIP (Birkenmeier *et al.*, 1986) et rEPS1 (Nalik *et al.*, 1989) chez le Rat, et deux protéines à 3 domaines LIM, la zyxin de Poulet (Sadler *et al.*, 1992) et la testin de Rat (Sanchez-Garcia et Rabbitts, 1994). De nombreuses protéines possédant deux domaines LIM sont connues. L'une d'entre elles, MLP (Muscle LIM Protein) joue un rôle essentiel dans la différenciation myogénique (Arber *et al.*, 1994). Trois protéines à deux domaines LIM ont été isolées chez l'homme, RTBN1, RTBN2 et RTBN3. Les gènes des deux premières sont impliqués dans des translocations chromosomiques t(11;14) et t(7;11) qui génèrent des leucémies aiguës de cellule T (Sanchez-Garcia et Rabbitts, 1993).

- Les protéines de type LIM-PK, découvertes récemment, où 2 domaines LIM seraient associés à un domaine protéine kinase (Mizuno *et al.*, 1994).

Les protéines LIM sont capables d'interagir *in vivo* avec des protéines à domaine basique et hélice-boucle-hélice (Wadman *et al.*, 1994) et avec des protéines à domaine POU (Xue *et al.*, 1993). Ces interactions sont partiellement médiées par le domaine LIM (Schmeichel *et al.*, 1994) et, dans certains cas, ce domaine peut réprimer la fixation spécifique à l'ADN d'homéodomaine de type LIM (Xue *et al.*, 1993).

II.6.3 LE DOMAINE PAIRED (PRD)

1. boîte PRD des gènes *pax*

Les gènes possédant un domaine PRD ont été isolés pour l'essentiel par homologie avec le gène *paired* de Drosophile (Bopp *et al.*, 1986), premier gène pour lequel a été montrée

l'existence d'un domaine de 128 acides aminés, la boîte paired (PRD) capable de se fixer à l'ADN (Treisman *et al.*, 1989; 1991). Ce domaine, également présent dans d'autres protéines de *Drosophila* comme celles codées par les gènes de polarité segmentaire *gooseberry* (*Gsb*) et *gooseberry neuro* (*Gsb_n*), est très bien conservé à travers l'évolution (Bopp *et al.*, 1989a et b). Chez les Mammifères 9 gènes avec une boîte PRD ont été isolés et constituent la famille des gènes *pax* (**Paired Box**) (**Tableau 1**). Le domaine PRD est localisé dans la partie aminoterminal des protéines Pax. En-dehors des gènes *pax-4* et *pax-6*, le domaine PRD est accolé à une séquence octapeptide homologue à la séquence de *Drosophila* HSIDGILG impliquée dans la dimérisation. Cette séquence octapeptidique conférerait la même propriété aux gènes *pax* qui la possèdent (Chalepakakis *et al.*, 1994a et b). Les protéines Pax-3, Pax-7, Pax-4 et Pax-6 possèdent dans leur partie carboxy-terminale, en aval de la région charnière octapeptidique, un second domaine de liaison à l'ADN, l'homéodomaine de type PRD.

De par leurs homologies dans le domaine PRD, les gènes *pax* ont été classés en sous-groupes (**Tableau 1**) et il s'avère que les différents membres d'un sous-groupe donné possèdent des profils d'expression semblables au cours du développement (Stuart et Gruss, 1995). L'importance de ces gènes pour le développement et de leur rôle dans la régulation de la différenciation, est attestée par l'existence de nombreux défauts touchant le plus souvent le système nerveux, lorsque ces gènes sont mutés. Chez l'Homme trois gènes PAX sont actuellement reconnus comme étant à l'origine de syndromes malformatifs et quatre défauts du développement murin ont pu être associés à des mutations dans les gènes *pax* (**Tableau 2**). Les anomalies du développement observées sont dues à l'absence fonctionnelle d'un des deux allèles, ces mutations étant le plus souvent létales au stade homozygote. Et, comme de nombreux facteurs de transcription, les gènes *pax* sont potentiellement oncogéniques et impliqués dans la genèse de cancers. La surexpression de Pax-1, 2, 3, 6 et 8 dans des NIH3T3 transforment ces fibroblastes et l'injection de ces cellules dans des Souris nude peut provoquer l'apparition de tumeurs (Maulbecker et Gruss, 1993).

2. structure/fonction

On a vu que l'un des déterminants les plus importants dans la spécificité des homéodomaine est l'acide aminé en position 50 de l'hélice 3 (Treisman *et al.*, 1989). Or, il s'agit

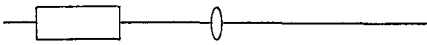
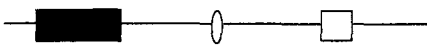
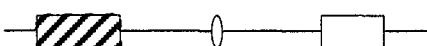
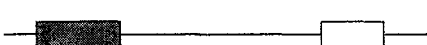

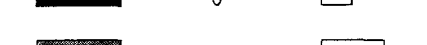

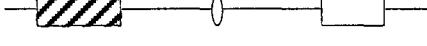
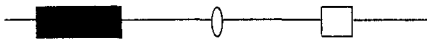
GENE	CHROMOSOME		STRUCTURE			CLASSE
	Souris	Humain	Prd	OCT	HD	
Pax-1	2	20p11				I
Pax-2	19	10q25				III
Pax-3	1	2q35				II
Pax-4	6	7q22-qter				IV
Pax-5	4	9p13				III
Pax-6	2	11p13				IV
Pax-7	4	11p36.2				II
Pax-8	2	2q12-q14				III
Pax-9	12	14q12-q13				I

Tableau 1: Division en 4 classes de la famille des gènes *pax*, en fonction de leur structure (boîtes PRD de même couleur par classe). PRD: domaine paired, OCT: octapeptide, HD: homéodomaine.

GENE	PHENOTYPE PERTE DE FONCTION	PHENOTYPE GAIN DE FONCTION
PAX1	Homme ? Souris : <i>undulated</i>	?
PAX9	?	?
PAX2	Homme : problèmes rétiens et rénaux Souris : Krd	Homme : implication dans la tumeur de Wilms ? Souris : anomalies du développement du rein
PAX5 (BSAP)	Souris : anomalies du cerveau et des cellules B	Homme : implication dans des glioblastomes et des médulloblastomes?
PAX8	?	Homme : implication dans la tumeur de Wilms ?
PAX3	Homme : WS1, WS3, syndrome craniofacial-surdité Souris : Splotch	Rhabdomyosarcome
PAX7	?	?
PAX4	?	?
PAX6	Homme : aniridie, anomalie de Peter, cataracte Souris : small-eye	?

Tableau 2 : Syndromes malformatifs humains et défauts du développement murin associés à des mutations dans les gènes *pax* (d'après Stuart et Gruss, 1995).

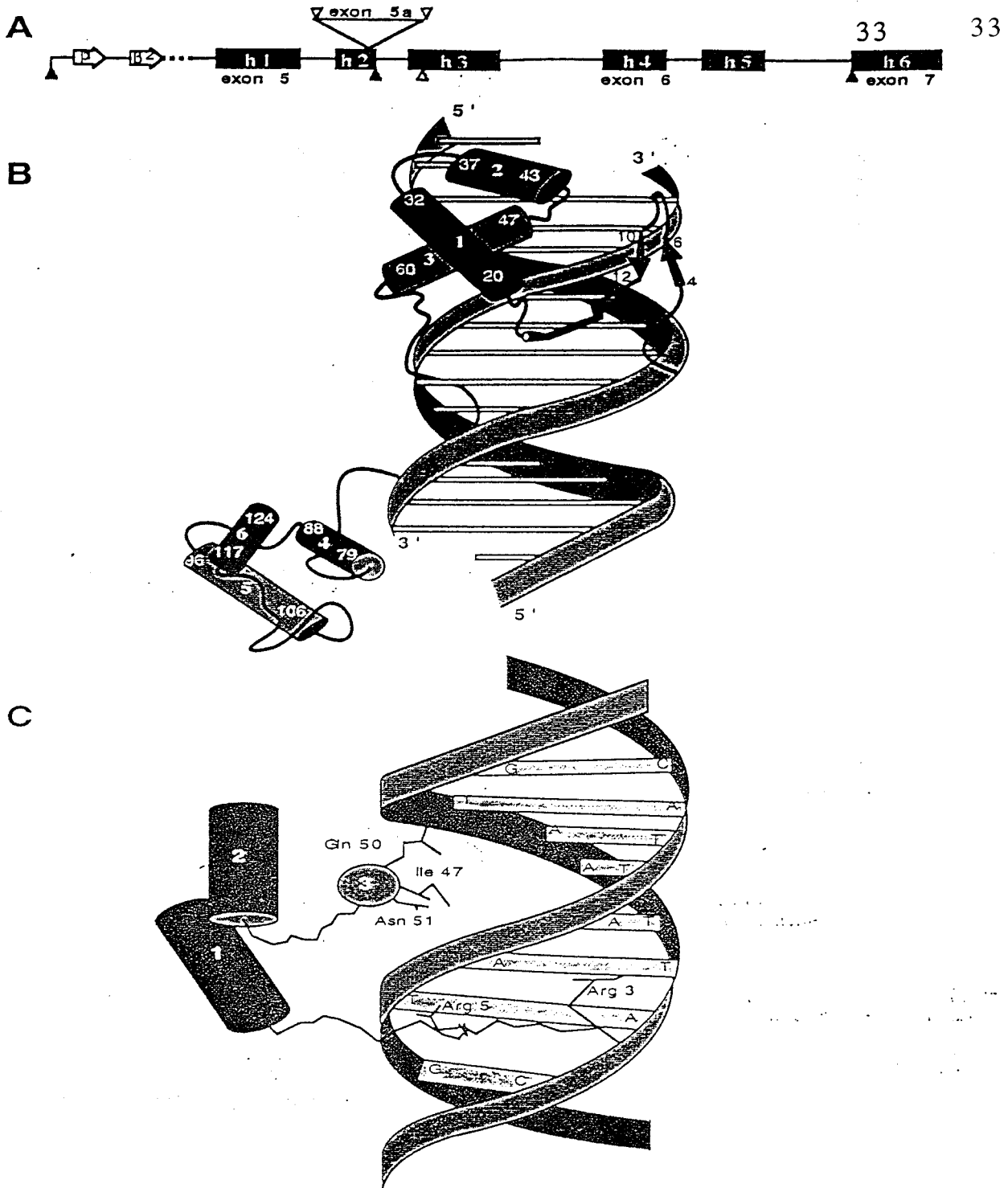


Figure 7: Structure du domaine *Paired* du gène *paired* de drosophile et de l'homéodomaine du gène *engrailed*. A, Les hélices α (h1-6), définies par l'analyse cristallographique sont replacées sur la séquence codante de *PAX-QNR*. Les limites des exons codant le domaine sont figurées par des triangles. La p43 perd ainsi les hélices 3, 4, et 5. B, Schématisation des domaines de liaison à l'ADN du domaine *Paired*. C, Schématisation de l'homéodomaine de la protéine *engrailed*. Deux différences essentielles entre cet homéodomaine et celui de Pax-6. (i) la glutamine 50 est une sérine dans Pax-6 et cet acide aminé est essentiel dans la sélection de la séquence cible liée par l'homéodomaine. (ii) l'homéo-domaine de Pax-6 est capable de former des homodimères sur son ADN cible.

toujours d'une sérine lorsque l'homéodomaine est associé à un domaine paired (Treisman *et al.*, 1992). Les protéines Pax-2, Pax-5 et Pax-8 ne possèdent que l'hélice 1 de l'homéodomaine, alors que la protéine Pax-1 en est entièrement dépourvue. L'analyse par cristallographie a montré que le domaine paired, comme l'homéodomaine, possède en fait une structure bipartite, deux sous-domaines dénotés PAI et RED (Jun et Desplan, 1996) de type HTH se fixant sur deux demi-sites proches dans le grand sillon. Des mutations affectant l'un ou l'autre des sous-domaines réduisent la spécificité du domaine PRD (Treisman *et al.*, 1989; Czerny *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1995). Le domaine PAI joue un plus grand rôle dans la reconnaissance de l'ADN que le domaine RED; il s'insinue dans le grand sillon par son hélice 3 et dans le petit sillon par un tour β et la séquence qui relie PAI et RED. Les deux domaines coopèrent en fait dans la liaison à l'ADN de la protéine totale (Jun et Desplan, 1996).

3. territoires d'expression

L'expression des gènes *pax* commence très tôt dans l'embryogenèse et plusieurs d'entre eux continuent de s'exprimer chez l'adulte. Comme en rappel de leur homologie avec les gènes de *Drosophile*, qui sont impliqués dans la segmentation, l'expression des gènes *pax* de Vertébrés finit souvent par se restreindre aux limites des territoires dans lesquels ils s'expriment initialement. A l'exception de *pax-1* et de *pax-9* qui sont exprimés dans des dérivés mésodermiques et jouent un rôle décisif dans les événements chondrogéniques (Deutsch *et al.*, 1988; Stapleton *et al.*, 1993; Timmons *et al.*, 1994; Wallin *et al.*, 1993; 1994), les autres gènes *pax* sont impliqués au moins dans le développement précoce du système nerveux central (SNC) et dans le maintien des différents types neuronaux puisque l'on retrouve l'expression des gènes *pax* dans les mêmes régions du cerveau adulte que celles où ils s'exprimaient chez l'embryon (Stoykova et Gruss, 1994). Les études concernant les territoires d'expression des gènes *pax* et les défauts présentés par les Souris dans lesquelles ces gènes ont été remplacés par des copies non fonctionnelles, montrent l'implication de ces gènes dans le développement d'organes autres que le SNC.

****pax 1* (classe I)**

L'expression de *pax-1* apparaît dans la partie ventrale des somites destinée à devenir le sclérotome dont il est un marqueur précoce. *pax-1* jouerait un rôle dans la spécification du

sclérotome, dans la migration des cellules sclérotomales et dans la différenciation de la partie ventrale des vertèbres en réponse à des signaux provenant de la notochorde (Koseki *et al.*, 1993; Wallin *et al.*, 1994). Les mutants *undulated*, mutés dans *pax-1*, ont effectivement la colonne vertébrale et la queue tordues suite à des malformations du squelette (Balling *et al.*, 1988).

Des mutants *undulated* présentant également des défauts au niveau du thymus (taille réduite et perturbation du développement des cellules T) qui seraient dus à des défauts liés aux cellules épithéliales dérivant de l'endoderme (Wallin *et al.*, 1996). Or *pax-1* s'exprime dans le thymus embryonnaire; d'abord dans la poche pharyngienne endodermique de la région de l'intestin antérieur, puis dans le primordium épithélial et enfin dans la zone corticale du thymus (Deutsch *et al.*, 1988).

***pax-3 et pax-7 (classe II) / pax-6 (classe IV)**

♦ Ce sont les premiers gènes *pax* à s'exprimer au cours du développement du système nerveux (SN). Plus précisément, *pax-3* et *pax-7*, qui sont très apparentés, s'expriment dans le tube neural dorsal (**Figure 8**) (Goulding *et al.*, 1991). Le territoire d'expression de *pax-3* présente des surfaces communes avec celui de *pax-7* avec lequel encore aucun mutant du développement n'est associé. *pax-7* est détecté après la fermeture de l'épithélium neural (Jostes *et al.*, 1991) alors que *pax-3*, plus précoce, apparaît dans la bordure de la plaque neurale, avant la fermeture du tube neural (Goulding *et al.*, 1991). Les Souris homozygotes mutées dans *pax-3* (Souris *Spotch*) présentent entre autres défauts une fermeture incomplète du tube neural (phénotype *spina bifida*) et une exencéphalie (Epstein *et al.*, 1991). *pax-6* s'exprime également juste avant la fermeture du tube neural mais un plus tardivement que *pax-3*. Après la fermeture du tube neural, les messagers de *pax-3* et de *pax-7* sont localisés dans la partie dorsale et même dans le plafond, tandis que les cellules exprimant *pax-6* constituent une large bande dans le tube neural, plus ventralement; ni le plancher ni le plafond n'expriment ce transcrit (**Figure 8**) (Goulding *et al.*, 1993). Ces trois gènes *pax* se partagent les régions de la zone ventriculaire: *pax-6* est présent dans les plaques basale et intermédiaire, alors que *pax-3* et *pax-7* sont exprimés dans les plaques alaires. Cette régionalisation dorso-ventrale de la moëlle épinière pourrait donc être en partie le fait des gènes *pax*.

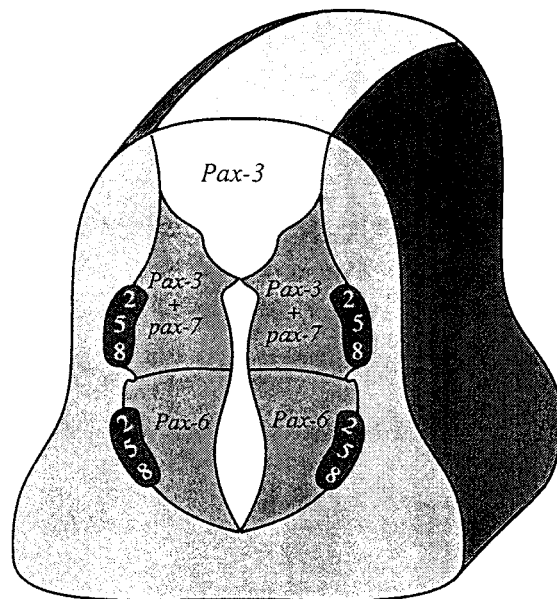


Figure 8: Les gènes *pax* dans le tube neural de Mammifères

Carte d'expression des gènes *pax* dans la moëlle épinière d'un embryon de Souris de 11 jours. *pax-3* est exprimé dans la région dorsale et *pax-6* dans la région ventrale.

◆ De façon générale, l'expression de *pax-3*, *pax-7* et *pax-6* caractérise des zones de prolifération des cellules neuroépithéliales, avant la différenciation neuronale. *pax-3* et *pax-7* sont exprimés dans des régions de division cellulaire intense du cerveau et du tube neural (Goulding *et al.*, 1991) et l'expression de *pax-3* et *pax-6*, qui paraît être régulée par des signaux en provenance de la notochorde, caractérise des zones de grande activité mitotique des précurseurs des neurones et des cellules gliales du système nerveux (Goulding *et al.*, 1993). La restriction dorso-ventrale de *pax-3* et de *pax-6* dans la moëlle épinière précède la différenciation des neurones moteurs, qui sont les premiers à se développer (Goulding *et al.*, 1993).

◆ *pax-3* et *pax-7* sont ensuite exprimés dans deux grandes structures de l'embryon précoce: les somites et les crêtes neurales. Les Souris *Splotch* présentent en effet des défauts dans les dérivés de ces deux structures: défauts dans les muscles des bourgeons de membres d'une part, et d'autre part, réduction de la taille des ganglions rachidiens, anomalies des nerfs périphériques, déficiences des cellules de Schwann, des défauts cardio-vasculaires et anomalies de la pigmentation (Bober *et al.*, 1994). Le phénotype des Souris homozygotes est beaucoup plus sévère puisque les embryons meurent avant la naissance. Ces anomalies sont comparables à celles observées chez les patients atteints des syndromes de Waardenburg de types I (SW1) (Tassabehji *et al.*, 1992) et III (SW3) (Baldwin *et al.*, 1992); ces deux syndromes découlent de mutations dans le domaine paired de PAX3 (Hoth *et al.*, 1993). Le SW1 se caractérise par une dystopie des canthi (déplacement latéral des angles internes des yeux), des anomalies de pigmentation et une surdité uni- ou bilatérale. Quant au SW3, il associe aux caractéristiques du SW1 des malformations des membres supérieurs (contractures et réduction de la taille des muscles). Il existe quelques variantes dans les phénotypes correspondant à différentes mutations de PAX3 et montrant de fortes homologues avec les mutations de type *Splotch*. Ces observations suggèrent donc un rôle de Pax-3 dans le contrôle très précoce du développement des cellules dérivées de la zone dorsale du tube neural.

◆ Dans le cerveau, l'expression de *pax-3* et de *pax-7* se restreint du télencéphale à la limite rostrale du diencephale alors que le territoire d'expression de *pax-6*, qui est le premier membre à s'y exprimer, s'élargit. L'expression de *pax-7* est retrouvée dans des régions du

rhombencéphale et dans les rhombomères 1, 3 et 5. *pax-6* est exprimé dans les futurs diencéphales et télencéphales mais non dans les futurs mésencéphale et métencéphale et son expression s'arrête au niveau de la limite diencéphale et mésencéphale, c'est-à-dire à la limite du cerveau moyen et du cerveau antérieur (Walther *et al.*, 1991; Krauss *et al.*, 1991). Puis l'expression de *pax-6* est ensuite détectée plus tardivement dans le mésencéphale caudal et le métencéphale, ainsi que dans le myélocéphale, et se maintient dans ces structures tout au long du développement. *pax-6* s'exprimant dans le diencéphale est également retrouvé dans l'évagination que le diencéphale ébauche pour la formation des cupules optiques.

L'importance de *pax-6* dans le développement de l'oeil est attestée par l'existence de mutants dans ce gène, les Souris *Small Eye*, qui à l'état d'hétérozygote ont des petits yeux et qui à l'état d'homozygote, sont anophtalmiques (Robers *et al.*, 1967; Hill *et al.*, 1991). Chez l'Homme, les mutations dans PAX6 sont à l'origine des cas d'Aniridie (malformations oculaires affectant plus ou moins gravement l'iris, le cristallin, le nerf optique, problèmes auxquels peuvent s'ajouter des glaucomes) (**Tableau 2**) et des anomalies de Peter (présence d'adhérences entre le cristallin et la cornée). Des mutations dans le gène *eyeless*, qui est l'orthologue de *pax-6* chez la Drosophile et qui est exprimé dans le disque imaginal oeil/antenne, empêchent la formation correcte des yeux (Quiring *et al.*, 1994).

****pax-2*, *pax-8* et *pax-5* (classe III)**

Un second groupe de gènes *pax* comprenant *pax-2*, *pax-5* et *pax-8* s'exprime plus tardivement, à la limite de la moëlle épinière et du cerveau postérieur, dans des groupes de neurones post-mitotiques et différenciés destinés à évoluer en interneurones du tube neural. Si les messagers de *pax-8* deviennent vite indétectables ceux de *pax-2* persistent durant tout le développement embryonnaire. L'importance de *pax-2* dans la régionalisation du cerveau moyen est indubitable: le mésencéphale est absent chez le Poisson zébra-fish dérivé d'ovocytes injectés avec des anticorps anti-*pax(zf-b)*, *pax(zf-b)* étant la protéine la plus apparentée à Pax-2 chez cette espèce animale. Ces trois gènes *pax-2*, 5 et 8 s'expriment également en-dehors du tube neural au cours du développement.

◆ Dès E9-E10 chez la Souris, *pax-2* et *pax-8* apparaissent dans le rein en développement c'est-à-dire dans les tubules épithéliaux, le canal de Wolff puis dans l'uretère et le mésenchyme

métanéphrique condensé. L'expression de *pax-2* est transitoire, le temps de la transition du mésenchyme en épithélium (Rothenpieler *et al.*, 1993), cette extinction étant requise pour la différenciation épithéliale rénale (Dressler *et al.*, 1993). Ceci peut expliquer la nature mésenchymateuse des tumeurs de Wilms, qui sont des cancers rénaux indifférenciés humains, restés embryonnaires, dont un grand pourcentage expriment de façon persistante PAX2 et PAX8 (Dressler et Douglass, 1992; Poleev *et al.*, 1992; Eccles *et al.*, 1995). *pax-2* réapparaît fortement dans le système uro-génital adulte (Fickenscher *et al.*, 1993). L'extinction de l'expression de *pax-2* pourrait être le fait du gène *wtl* qui joue probablement un rôle prépondérant dans la différenciation du système urogénital au moment de la transition mésenchyme-épithélium, et dont l'expression est elle-même activable par PAX2 et PAX8 (Kriedberg *et al.*, 1993; Dehbi *et al.*, 1996), et qui en retour est capable de réprimer *pax-2* (Ryan *et al.*, 1995). L'importance de *pax-2* dans le développement rénal, et surtout l'importance d'une expression *pax-2*^{-/-} affublées de sérieuses anomalies histologiques et fonctionnelles du rein, au niveau des épithéliums glomérulaire et tubulaire (Dressler *et al.*, 1993), et d'autre part avec les graves anomalies rénales des Souris dans lesquelles le chromosome 19 est délété d'une large portion, incluant le locus *pax-2* (Keller *et al.*, 1994). Les Souris porteuses de cette mutation *Krd* (*kidney and retinal effects*) présentent également des défauts de la rétine. Il faut noter que *pax-2* s'exprime dans la rétine ventrale (Walther *et al.*, 1991b). *pax-8* étant exprimé dans la thyroïde tout le long de son développement, il constitue un marqueur de choix pour le développement de cette glande car il s'avère être l'un des plus précoces (Zannini *et al.*, 1992).

◆ *pax-5* s'exprime transitoirement dans le SNC, dans les testicules adultes et dans le foie foetal dès E13 au moment où débute la lymphopoïèse B et se maintient chez l'adulte, dans tous les tissus lymphoïdes B (Adams *et al.*, 1992). Pax-5, ou BSAP (**B** Cell **S**pecific **A**ctivator **P**rotein) (Kozmik *et al.*, 1992) régule le promoteur du gène *CD19* codant une protéine de surface spécifique des cellules B (Gold et Defranco, 1994) et différents promoteurs et «enhancers» spécifiques des lymphocytes B (pour revue Baker et Reddy, 1995). *pax-5* constitue un marqueur précoce de la lymphopoïèse B. L'élimination de ce gène par la technique de la recombinaison homologe, tout en provoquant des altérations du SNC, bloque la différenciation des cellules B (Urbanek *et al.*, 1994). L'équivalent de Pax-5 chez l'Oursin, TSAP (**T**issue **S**pecific **A**ctivator

Protein), est un facteur capable de contrôler les gènes des histones H2A-2 et H2B-2 (Barberis *et al.*, 1989). Par ailleurs, Pax-5 réprimerait l'expression de p53 (Stuart *et al.*, 1995).

4. conclusions

De ces nombreuses études il ressort que les gènes *pax* ne portant aucun vestige d'homéodomaine (*pax1* et *pax9*) ne sont pas exprimés eux dans le SN. Par contre les gènes *pax* possédant un homéodomaine (*pax3*, *pax6*, et *pax7*) sont exprimés avant la différenciation neuronale, plus précocément que les gènes *Pax* ne possédant qu'un homéodomaine partiel (*pax2*, *pax5* et *pax8*) (**Tableau 1**). On peut supposer que le nombre de gènes cibles dont la régulation précise est requise au moment de la différenciation des différentes populations gliales et neuronales du SN sera supérieure dans le cas des gènes *pax* possédant les deux domaines paired et homéo, ce qui expliquerait que leurs expressions soient les plus précoces. La grande diversité de populations neuronales impose une grande spécificité de liaison sur les gènes nécessaires à la différenciation de chaque type neuronal. Par ailleurs cette plus grande spécificité pourrait expliquer l'apparente absence de redondance de ces gènes dans le SN étant donné les différences de phénotypes des différents mutants *pax*. Pourtant, malgré cette évidente implication des gènes *pax* des classes II, III et IV dans le SNC, jusqu'à présent les seuls gènes cibles identifiés appartiennent aux territoires autres que le SNC, dans lesquels ces gènes *pax* s'expriment (**Tableau 3**). Cela tient probablement au fait qu'il est plus difficile d'isoler un type neuronal du SNC et de l'établir en culture.

GENE	GENES CIBLES PUTATIFS	REFERENCES
pax-2	p53 wt1	Stuart <i>et al.</i> , 1995 Dehbi, <i>et al.</i> , 1996
pax-5	p53 régions de régulation du gène de la chaîne lourde des Ig CD19	Stuat <i>et al.</i> , 1995 Gold et DeFranco, 1994
pax-6	V ^{pre-B1} Molécule d'adhésion cellulaire L1 <i>Pax-6</i> Cristallines	Chalepakis <i>et al.</i> , 1994 Plaza <i>et al.</i> , 1993
pax-8	p53 Thyropéroxydase Thyroglobuline N-CAM wt1	Stuat <i>et al.</i> , 1995 Francis-Lang <i>et al.</i> , 1992 Zannini <i>et al.</i> , 1992 Holst <i>et al.</i> , 1994 Dehbi, <i>et al.</i> , 1996

Tableau 3 : Gènes potentiellement régulés par les protéines Pax de Vertébrés

II.6.4. LE DOMAINE CVC

Le domaine CVC est un motif protéique de 54/55 pb d'abord identifié dans les trois protéines CHX10, VSX1, une protéine de la rétine du poisson rouge et CEH-10, une protéine de nématode. Chx10 a été caractérisé comme étant le gène responsable du phénotype *ocular retardation* chez la Souris (Burmeister *et al.*, 1996). Ce domaine est placé immédiatement en amont de l'HD de type PRD de ces trois protéines. Bien que sa fonction soit encore inconnue, les 70% d'homologies que les CVC des 3 protéines partagent permettent de supposer qu'il est important, peut-être en intervenant dans des interactions protéiques ou dans la liaison à l'ADN. Chez la Souris, *Chx10* est clairement exprimé, dans le thalamus en développement, la partie ventrale de la moëlle et dans la rétine en développement où il se restreint à la couche nucléaire interne au cours de sa maturation (Liu *et al.*, 1994).

II.7. LE DOMAINE bLZ ET LE DOMAINE bHLH

Ces deux types de domaines permettent la dimérisation des facteurs dans lesquels ils sont présents et la présentation des deux monomères associés de façon appropriée pour leur interaction avec l'ADN. Dans les deux cas le principal intérêt de ces deux types de motifs réside dans la possibilité de former des hétérodimères entre protéines différentes mais comportant le même motif.

II.7. 1. LE DOMAINE bLZ

Dans la plupart des cas, ce motif, dit crémaillère à leucines, est constitué d'un domaine de dimérisation (LZ ou « leucine zipper »), à savoir une hélice α comportant 4 à 5 résidus leucines espacés tous les 7 acides aminés, associé à un domaine basique (b) permettant l'interaction avec l'ADN (Landschultz *et al.*, 1988). De nombreux facteurs de transcription possédant cette structure ont été isolés dont les membres Fos et Jun du complexe AP-1 et CREB, facteur dépendant de l'AMPc. Les gènes *c-fos* et *c-jun* appartiennent chacun à deux grandes familles dont les membres peuvent former des hétérodimères. D'autres facteurs à domaine bLZ peuvent également former des dimères avec des facteurs Jun ou Fos (revue Hurst, 1994). Enfin, les protéines du complexe AP-1 peuvent interagir directement avec les récepteurs aux

glucocorticoïdes (GR). Certains des membres du complexe AP-1 semblent impliqués dans le développement de la rétine. L'expression de *c-jun* dans la neurorétine décroît au cours du développement de cette dernière parallèlement au ralentissement de la prolifération cellulaire, et semble intervenir dans l'inhibition de l'activité des GR (Berko-Flint *et al.*, 1994). L'interaction entre ces deux types de facteurs pourrait être déterminante pour la coordination des programmes de prolifération et/ou de différenciation cellulaires au cours du développement de la neurorétine. *In vitro*, Jun et Fos peuvent s'hétérodimériser avec la protéine Nrl humaine (Swaroop *et al.*, 1992) spécifique de la rétine (Kerppola and Curran, 1994). Nrl peut former des dimères avec Fra-2 qui est aussi exprimé dans la rétine (résultats personnels). L'expression transitoire du seul gène *jun* de Drosophile D-jun (ou jra ou dm-jun) au moment de la détermination des cellules neuronales de photorécepteurs des ommatidies, est importante car l'utilisation d'un transdominant négatif bloquant son activité transcriptionnelle résulte en l'absence du photorécepteur R7 (Bohmann *et al.*, 1994). Pourtant l'inactivation de *c-jun* chez la Souris ne semble pas altérer de façon dramatique le développement de l'oeil (Hilberg *et al.*, 1993).

II.7. 2. LE DOMAINE bHLH

Les facteurs de transcription à domaine bHLH appartiennent à la famille plus large des protéines HLH. Les protéines membres de cette famille ont en commun une similitude de séquence protéique et structurale mais une diversité fonctionnelle. Le domaine HLH comporte deux hélices α de 8 et 24 résidus séparées par une boucle de 8 résidus (Murre *et al.*, 1989). Ce motif a d'abord été décrit dans les produits E12 et E47, transcrits à partir du gène E2A et différents au niveau du domaine HLH par épissage alternatif (Sun et Baltimore, 1991). Ces produits peuvent se fixer sous forme de dimères sur la séquence KE2, une "E-boîte" de motif CANNTG (Ephrussi *et al.*, 1985). Puis de nombreuses autres protéines contenant ce motif HLH ont ensuite été isolées; elles ont été classées en trois catégories structurales. On distingue les protéines bHLH dont le domaine HLH est associé à un domaine basique (b), les protéines bHLHLZ dont les domaines HLH et basique sont associés à un domaine LZ (les domaines b et le LZ sont localisés dans l'extrémité carboxy-terminale) et enfin un troisième groupe de protéines dnHLH caractérisées par l'absence d'un domaine de fixation à l'ADN (**Figure 9**) qui par, d'une

part, leur capacité à se dimériser, et d'autre part, leur impossibilité à se fixer sur l'ADN, se comportent comme des dominants négatifs (dn).

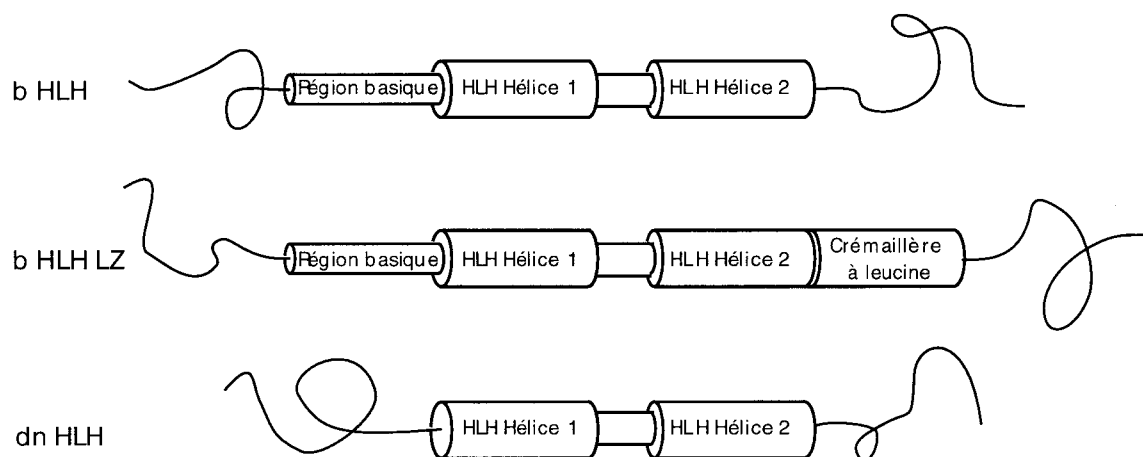


Figure 9: Les trois classes de protéines HLH (Kadesch, 1993).

Les protéines bHLH ont été subdivisées en trois groupes: la classe A des facteurs fonctionnant comme des inducteurs de la détermination, la classe B regroupant les bHLH avec LZ et la classe C des facteurs, dits aussi à proline, fonctionnant plutôt comme des répresseurs de la détermination. Chacune des classes comprend des membres de distribution tissulaire restreinte impliqués dans des étapes clé du développement (différenciation du mésoderme, détermination du sexe, neurogenèse, myogenèse, hématopoïèse, et mélanogenèse) qui peuvent se dimériser avec les membres de distribution ubiquistes, amputés ou non du domaine de liaison à l'ADN. L'activité de liaison à l'ADN de la plupart des facteurs à bHLH (avec ou sans LZ) est régulée par au moins deux mécanismes essentiels: l'hétérodimérisation (Jones *et al.*, 1990) et la nature du domaine basique. Les homodimères sont souvent beaucoup moins stables que les hétérodimères (réalisés au sein d'une même classe structurale; les bHLHLZ ne se dimériseraient pas avec les bHLH) et possèdent une affinité plus faible pour l'ADN; la dimérisation augmente l'affinité pour l'ADN (Sun et Baltimore, 1991). La séquence du domaine basique va également diriger la qualité de la liaison à l'ADN (Dang *et al.*, 1992; Blackwell *et al.*, 1993). Parmi les bHLH, les différences d'AA de la région basique ont permis de repérer des sites préférentiels de fixation, et par conséquent de ranger la plupart des protéines bHLH et leur site de fixation sur l'ADN en 3 classes (Ohsako *et al.*, 1994)(**Tableau 4**)

Classe A: Parmi les membres de cette classe deux familles, celle des facteurs myogéniques MyoD et celle des facteurs proneuraux Achaete-scute (AS-C) (impliqués dans la

position:	Région Basique															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Classe A Activateurs	R	R	E	I	A	N	S	N	E	R	R	R	M	Q	S	AP-4
	R	R	K	A	A	T	M	R	E	R	R	R	L	S	K	MyoD
	R	R	V	A	N	N	A	R	E	R	L	R	V	R	D	E12
	R	R	M	A	N	N	A	R	E	R	V	R	V	R	D	E47
	R	R	Q	A	N	N	A	R	E	R	I	R	I	R	D	da
	R	R	.	.	.	N	E	R	E	R	N	R	V	K	L	Mash
	R	R	L	A	A	N	A	R	E	R	R	R	M	Q	N	Atonal
	S	V	A	R	R	N	A	R	E	R	N	R	V	K	Q	l'sc
	S	V	Q	R	R	N	A	R	E	R	N	R	Y	K	Q	sc
	S	V	I	R	R	N	A	R	E	R	N	R	V	K	Q	ac
A	V	A	R		N	A	R	E	R	N	R	V	K	Q	ase	
Classe B + LZ	K	R	R	T	H	N	V	L	E	R	Q	R	R	N	E	c-myc
	R	R	K	N	H	N	I	L	E	R	Q	R	R	N	D	N-myc
	K	R	K	N	H	N	F	L	E	R	K	R	R	N	D	L-myc
	S	R	A	H	H	N	A	L	E	R	K	R	R	D	H	Myn/Max
	R	R	S	T	H	N	E	M	E	K	N	R	R	A	H	mad ₁
	R	R	A	Q	H	N	E	V	E	R	R	R	R	D	K	USF
	K	K	D	N	H	N	L	I	E	R	R	R	R	F	N	TFE3
	K	K	D	N	H	N	L	I	E	R	R	R	R	F	N	TFEB
	K	K	D	N	H	N	L	I	E	R	R	R	R	F	N	Mi
Classe C proline Répresseurs	R	R	S	N	K	P	I	M	E	K	R	R	R	A	R	hairy
	Q	K	V	K	K	P	M	L	E	R	Q	R	R	A	R	E(spl) m8
	L	K	V	K	K	P	L	L	E	R	Q	R	R	A	R	E(spl) m5
	R	K	V	M	K	P	L	L	E	R	K	R	R	A	R	E(spl) m7
	R	K	V	M	K	P	L	L	E	R	K	R	R	A	R	E(spl) m3
	R	K	S	S	K	P	I	M	E	K	R	R	R	A	R	HES-1
	N	R	L	R	K	P	V	V	E	K	M	R	R	L	R	HES-5
Séquence canonique des HLH: C A N N T G																
Sites de Classe A :		C A C C T G ; C A G C T G														
Sites de Classe B :		C A C G T G ; C A T G T G														
Sites de Classe C :		C A C G C G ; C A C G A G														

Alignements des séquences des domaines basiques des protéines bHLH de classe A, B et C et de leurs sites de fixation.

La classe C est caractérisée par la présence d'une proline (P) en position 6
Les classes B et C sont caractérisées par la présence d'une arginine (R) en position 13 qui est directement en contact avec le nucléotide G en position 4 (cerclé) dans la séquence nucléotidique du site de fixation.

Les protéines de la classe C peuvent se fixer sur les sites de classe B grâce à la présence de l'arginine en 13

Les acides aminés basiques arginine (R) et lysine (K) sont sur fond gris.

Tableau 4: Classification de quelques facteurs de type HLH.

formation du SNC et des organes sensoriels du SNP de *Drosophile*), présentent de nombreuses analogies tant structurales que fonctionnelles. Ils peuvent se fixer en homodimères sur l'ADN avec une bonne affinité mais la stabilité des homodimères est faible.

◆ Dans les deux systèmes, les facteurs se dimérisent avec des facteurs bHLH de classe A *ubiquitaires*, qui peuvent se fixer en homodimères sur l'ADN mais avec une faible affinité, alors que les hétérodimères formés sont stables et se fixent avec une forte affinité sur l'ADN (**Figure 10**). Les membres MyoD s'hétérodimérisent avec les facteurs E12 ou E47 (Lassar *et al.*, 1991; Weintraub *et al.*, 1991) tandis que les membres du complexe AS-C s'hétérodimérisent avec *daughterless* (da) (Van Doren *et al.*, 1992). Les hétérodimères se fixent sur des « E-box » de même séquence (puisque les protéines du complexe AS-C peuvent se fixer sur les sites de MyoD) avec cependant une sélection dans leur capacité à activer la transcription des gènes par la nature des deux bases adjacentes à cette boîte (Weintraub *et al.*, 1994) (**Figure 11**).

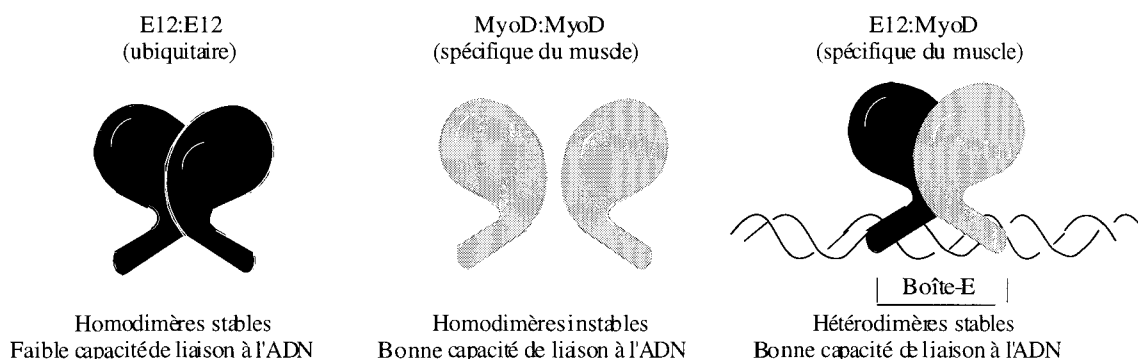


Figure 10: Dimérisation entre protéines bHLH (d'après Kadesch 1993)

	"E-Box"	MyoD	E12	
Igh	TCCC CT GCAGGT GT TTCCAGA AGGG GA CGTCCAC CA AGGTCT	-	++	Igh: immunoglobuline H gène régulé par E12/E12
MCK	TCCC AG GCAGGT GC CCAGA AGGG TC CGTCCAC CC GGGTCT	++	+	MCK: muscle créatine kinase gène régulé par MyoD/E12

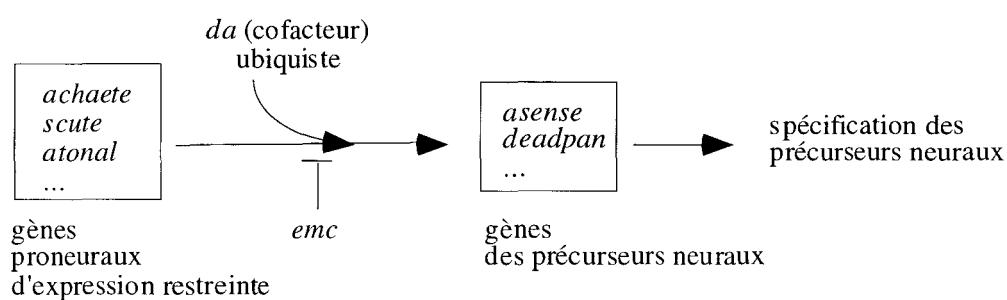
Figure 11 : Fixation de MyoD sur "E-Box" d'Igh et de MCK mais Importance des séquences adjacentes à la "E-box" pour l'activité transactivatrice (d'après Weintraub 1994).

-: absence de transactivation
+: transactivation

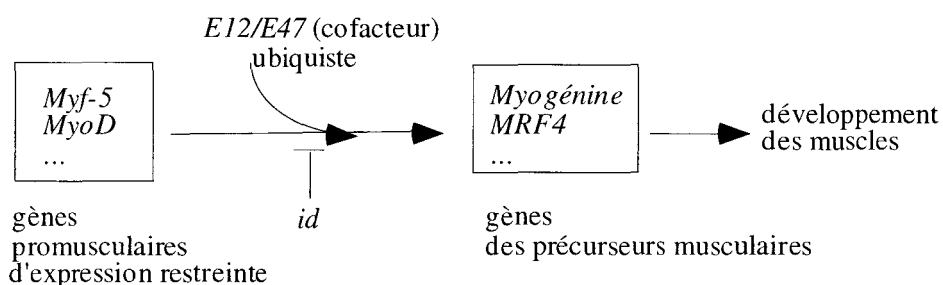
♦ L'activité des protéines bHLH de classe A est d'un autre côté régulée négativement par dimérisation avec des protéines de type dnHLH, dépourvus de domaine de fixation à l'ADN: Id et emc respectivement, qui séquestrent les facteurs auxquels ils se lient en les empêchant de se fixer à l'ADN (Benezra *et al.*, 1990), et donc qui limitent la formation des dimères actifs en se comportant comme des transdominants négatifs. On retrouve ce phénomène de répression par dimérisation avec une forme inactive dans d'autres groupes de facteurs de transcription. Ainsi la protéine Δ FosB (FosB2) produite par épissage alternatif est dépourvue de domaine de transactivation et réprime l'activité du complexe AP-1 qu'elle a formé avec une protéine Jun (Mumberg *et al.*, 1991; Nakabeppu *et al.*, 1991; Yen *et al.*, 1991). Ou bien l'isoforme I-POU incapable de se fixer à l'ADN, régule négativement l'activité du facteur de transcription Cf1-a en formant des hétérodimères inactifs en solution (Treacy *et al.* 1991).

Ces gènes peuvent se réguler mutuellement et sont suffisamment similaires pour se substituer les uns aux autres au sein d'un même groupe fonctionnel: tout membre de la famille MyoD peut induire la différenciation myogénique *in vitro* (Weintraub *et al.*, 1991) et l'expression ectopique des membres d'AS-C chez les Insectes provoque la formation de soies de petite et grande taille (Jan et Jan, 1993).

Neurogenèse de la Drosophile



Myogenèse des Vertébrés



da: daughterless
emc: extramacrochaetae
Id: Inhibitor of differentiation protein

Figure 12: Cascades des facteurs HLH au cours de la neurogenèse de *Drosophile* (SNP) et la myogenèse des Vertébrés (d'après Jan et Jan, 1993).

Classe B: La plus connue des protéines à bHLHLZ est la protéine c-Myc. Le premier gène *myc* identifié est celui correspondant au *v-myc* aviaire et dont un allèle cellulaire a été transduit dans le génome du virus aviaire de la myélocytomatose MC29 (Roussel *et al.*, 1979). Ce virus défectif pour la réplication provoque chez le Poulet des leucémies et des carcinomes (rein, foie, endothéliums) (Graf, 1978; Gazzolo, 1980; Enrietto, 1987) ainsi que des tumeurs myogéniques (muscles cardiaque et lisse) après infection de l'embryon (Saule *et al.*, 1987; Al Moustafa *et al.*, 1988) et, enfin, des tumeurs cutanées. Le proto-oncogène *c-myc* est phylogénétiquement bien conservé (Atchley *et al.*, 1995). Il appartient à une famille de 5 membres. Comme ses proches cousins, les gènes *L-myc* et *N-myc*, *c-myc* comporte 3 exons séparés par 2 introns (DePinho *et al.*, 1991). Chez tous ces gènes, l'exon 1 est non codant; seuls sont traduits les exons 2 et 3 (Marcu *et al.*, 1992). En fait grâce à un site d'initiation de la traduction situé plus en amont, qui n'est pas un AUG, deux protéines *myc* différentes dans leur domaine N-terminal sont synthétisées. Ce phénomène semble général pour les gènes apparentés à *myc* car deux isoformes sont également synthétisées par *N-myc* et *L-myc*. Le premier exon paraît être impliqué dans la régulation du potentiel oncogénique de *c-myc*; il suffit de tronquer le premier exon et le premier intron pour accroître fortement ce potentiel oncogénique (Xu *et al.*, 1993); le rétrovirus aviaire de la myélocytomatose MC29 n'a transduit que les exons 2 et 3. *C-myc* possède un potentiel oncogénique (Martin *et al.*, 1986) supérieur à celui de *N-* et *L-myc* (DePinho *et al.*, 1987; Barrett *et al.*, 1992; Mukherjee *et al.*, 1992).

L'expression de *c-myc* a été relativement bien documentée tout au long du développement de la Souris (Downs *et al.*, 1989) où son expression est généralement corrélée à une prolifération cellulaire rapide. Tandis que l'expression de *N-myc* et *L-myc*, détectée chez la Souris au niveau du SNC, des crêtes neurales et des somites (Orkin, 1975), paraît corrélée plutôt avec des processus de différenciation. La suppression de *c-myc* par recombinaison homologue est létale sous forme homozygote, après 9,5 jours de gestation, avec un retard de développement et un délai dans la fermeture du tube neural. Les cellules des Souris mutantes prolifèrent en culture. Ceci montre que *c-myc* n'est pas absolument requis pour la division cellulaire. Toutefois ces dernières n'auraient plus de possibilité de répondre aux facteurs de croissance (Davis *et al.*,

1993). *N-myc* et *c-myc* sont régulés de façon coordonnée dans le neuroépithélium, et l'absence de *N-myc*, létale, permet l'expression de *c-myc* (Stanton *et al.*, 1992). Chez l'embryon de Poulet l'expression de *c-myc* a été suivie par immunohistochimie (Jaffredo *et al.*, 1989). Une importante quantité de protéines est détectée dans les cellules du myotome pour ensuite décroître avec l'organisation du myotome en masses prémusculaires. La vésicule otique exprime *c-myc* de façon constante jusqu'à E14 et de façon homogène dans la RPE à E6. La protéine c-Myc est présente dans toutes les cellules du SN au début du développement. Puis son expression se restreint aux précurseurs neuronaux, et enfin aux neurones ne proliférant plus à E14. Ceci est clairement visible dans la neurorétine. *N-myc* a également été détecté au cours du développement de la NR et dans le cristallin (Hirning *et al.*, 1991). Cependant l'inactivation de *N-myc* par recombinaison homologue ne semble affecter que le délai d'invagination de la cupule optique et des vésicules cristallines des Souris (Charron *et al.*, 1992). *C-myc* est induit très rapidement en réponse à des stimuli mitotiques; les cellules passent d'un état quiescent à une phase de prolifération en transitant de l'état G0 à l'état G1 (pour revue Evan et Littlewood, 1993). En général l'arrêt des stimuli provoque l'effondrement de l'expression de *c-myc* et le blocage des cellules en phase G0/G1 (Evan *et al.*, 1992). Aussi la dérégulation de l'expression de *c-myc* conduit-elle souvent à la transformation cellulaire et à la tumorigenèse (Spencer et Groudine, 1991). L'expression dérégulée de *c-myc* peut aussi conduire à l'entrée en apoptose de certains types cellulaires, lorsque le milieu des cellules est appauvri en facteurs de croissance ou bien lorsque les cellules sont exposées à certaines drogues (Evan *et al.*, 1992) (**Figure 13**).

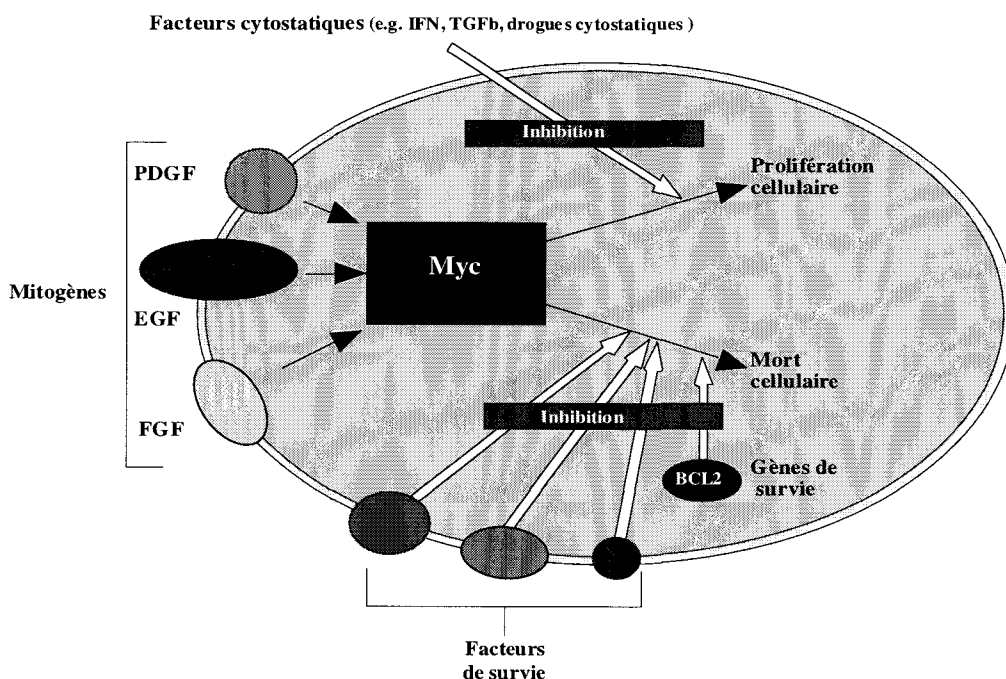


Figure 13: Rôle de Myc dans la physiologie cellulaire

Bien que la protéine c-Myc possède le motif basique, elle ne peut se fixer sur KE2. L'activité de c-Myc, protéine à localisation restreinte et incapable d'homodimérisation, est contrôlée par son co-facteur ubiquiste Max (*Myc associated X factor*) (Mukherjee *et al.*, 1992; Amati *et al.*, 1993a and b; Harrington *et al.*, 1994). Il s'agit d'une protéine de 151 acides aminés, isolée d'abord chez l'Homme (Blackwood and Eisenman, 1991) (**Tableau 4**), qui, contrairement à Myc, est stable (pour revue Littlewood et Evan, 1994) et ne porte pas de domaine transactivateur. Max, lui-même transcriptionnellement inactif (Kato *et al.*, 1992), forme avec Myc (c-, N- ou L-Myc) des hétérodimères stables reconnaissant l'ADN avec une haute affinité sur des « E-box » de type CACGTG ou CATGTG (pour revue Littlewood et Evan, 1994). Max a également la possibilité de se dimériser avec les protéines de la famille Mad (Mad, Mad3, Mad4 et Mxi1) (Gandarillas et Watt, 1995). Mad (*Max associated dimer protein*) ne porte pas de domaine transactivateur mais un domaine transrépresseur avec lequel interagit l'orthologue Vertébré mSin3 du gène *sin3* de Levure, qui est un répresseur de la transcription, ce qui serait l'un des mécanismes par lequel Mad agit comme un répresseur de la transcription (Ayer *et al.*, 1995; Schrieber-Agus *et al.*, 1995) (**Figure 14**).

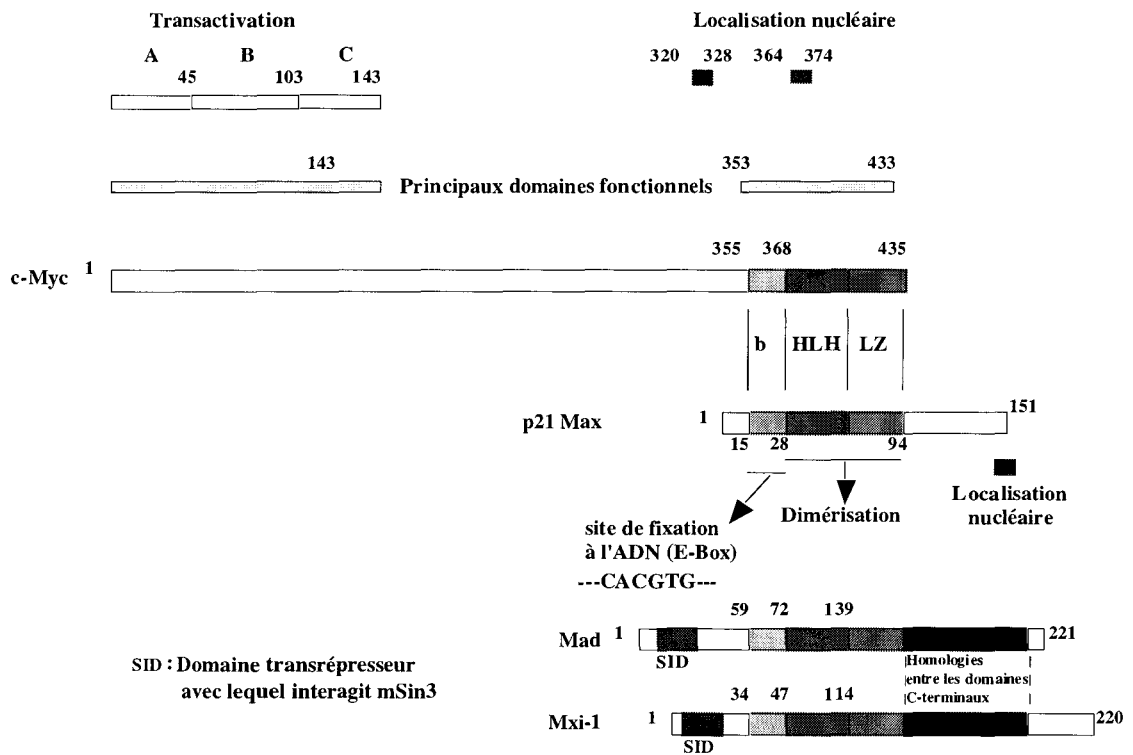


Figure 14: Structure des partenaires de Max.

Max peut également former des homodimères, incompetents pour l'activation transcriptionnelle, qui reconnaissent la même séquence que le complexe Myc/Max (Berberich *et al.*, 1992) et qui entrent ainsi en compétition et antagonisent l'action transcriptionnelle de Myc (Ayer *et al.*, 1993; Zervos *et al.*, 1993; Amati et Land, 1994). En présence de Myc, se forment préférentiellement les hétérodimères qui sont plus stables que les homodimères Max-Max (Amati *et al.*, 1992). De nombreux exemples illustrent cette modulation de l'activité de Myc. La différenciation terminale de kératinocytes humains est accompagnée d'une chute de l'expression de *c-myc*, alors que les expressions de Mad et de Mxi1 sont induites (Gandarillas et Watt, 1995).

Max serait ainsi le pivot d'une régulation fine dont le versant activateur serait fourni par les membres de la famille myc, et le versant répresseur par les membres de la famille Mad. Le passage d'un type à l'autre conditionnerait en grande partie le glissement d'un état de prolifération (avec Myc) vers un état de différenciation (avec Mad) (**Figure15**).

Classe C: Les domaines basiques des protéines de cette classe ont des propriétés de liaison à l'ADN différentes de ceux des protéines des classes A et B. Les protéines bHLH de la classe C possèdent une proline dans le domaine b, qui dirige la fixation à l'ADN sur des sites de classe C différents des consensus décrits pour les facteurs de type MyoD (sites de classe A) et

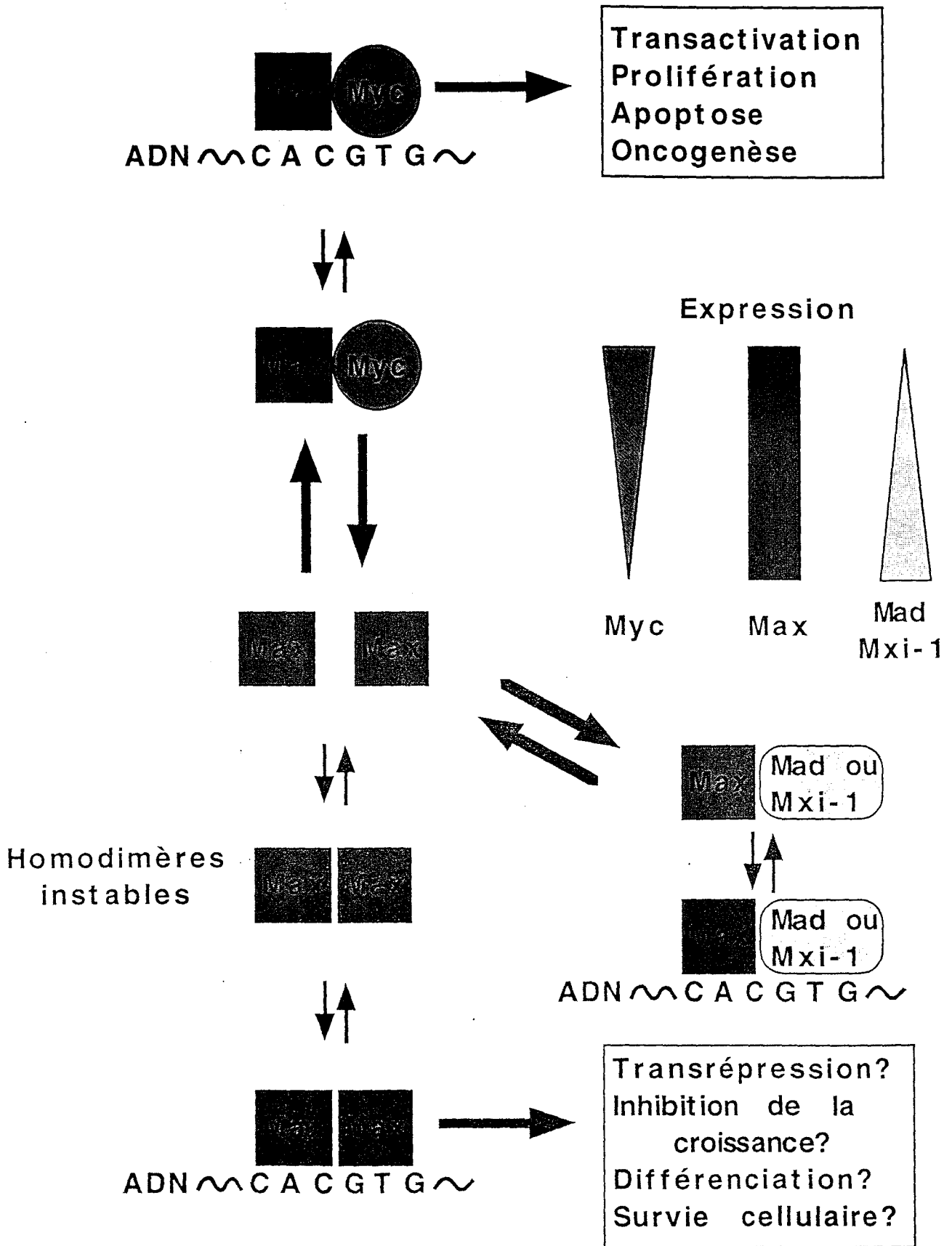


Figure 15: Mécanismes d'action de Myc

Myc (sites de classe B), ces caractéristiques différentes sont associées à une activité de répression de la transcription (Ohsako *et al.*, 1994). Les domaines basiques des facteurs de classe B et C ont une caractéristique commune, à savoir la présence d'une arginine en position 13 qui conduit à la sélection d'un G en position 4 dans la séquence du CANNTG. Aussi les protéines de classe C pourront-elles se fixer sur les sites de classe B (**Tableau 4**). Il est à noter que les hétérodimères Myc/Max pourraient se fixer, dans de rares cas, sur des sites de la classe C (Blackwell *et al.*, 1993).

L'étude des territoires d'expression et des anomalies du développement, associées à des défauts de la différenciation, obtenues par recombinaison homologe ou mutation, laissent apparaître un « partage » des étapes conduisant à la différenciation par les familles de facteurs de transcription. Les gènes *pax* seraient impliqués dans les phénomènes précoces de la détermination, tandis que plusieurs sous-groupes de la super-classe des facteurs de type HLH s'attribueraient la détermination plus tardive ainsi que la différenciation terminale. Il va sans dire que ce schéma est très grossier et qu'il n'y a guère de limite entre ces étapes. Les répartitions spatio-temporelles se recouvrent souvent et un même facteur de transcription peut intervenir dans plusieurs étapes et concourir également au maintien des structures et fonctions qu'il a contribué à élaborer. Les facteurs de transcription peuvent intervenir en rendant les précurseurs aptes à répondre aux stimuli environnementaux et en induisant l'émission de signaux par les cellules qui influenceront, par l'intermédiaire de modifications induites dans l'environnement, le développement des cellules voisines. Il semble cependant possible d'illustrer cette proposition d'une hiérarchie des facteurs de transcription Pax et bHLH à l'aide de quelques exemples puisés dans le développement.

III. LA MYOGENESE

III.1. DES SOMITES MUSCLÉS

Le muscle squelettique adulte est un tissu très spécialisé dont les fibres, ou myotubes, sont les résultats de fusions de plusieurs centaines de précurseurs mononucléés, les myoblastes.

Les myoblastes prennent naissance dans les somites. L'ensemble des somites est agencé en une structure segmentée et transitoire. Les somites sont des structures métamériques caractéristiques des Cordés qui donnent naissance à d'autres lignées cellulaires: du cartilage, de l'os et du tissu conjonctif de la colonne vertébrale, du tissu conjonctif de la peau du dos, des cellules endothéliales et du muscle lisse (pour revue Brand-Saberi *et al.*, 1996). Elles se forment à partir du mésoderme paraxial qui longe le tube neural, en progressant de l'avant vers l'arrière. Les somites sont d'abord des amas de cellules épithéliales sphériques, qui se polarisent par la suite en un compartiment mésenchymateux ventral, le sclérotome, et en un compartiment épithélial dorsal, le dermatomyotome qui est donc la source des cellules précurseurs des muscles squelettiques du tronc et des membres chez l'embryon de Vertébré (Chevallier *et al.*, 1977) (**Figure 16**).

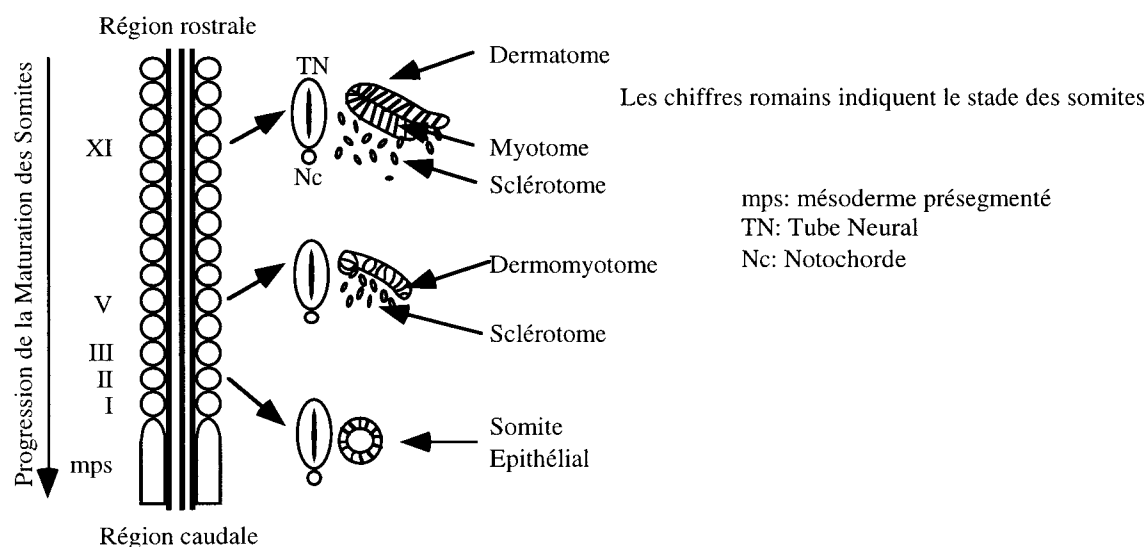


Figure 16: Formation, maturation et régionalisation des somites aviaires

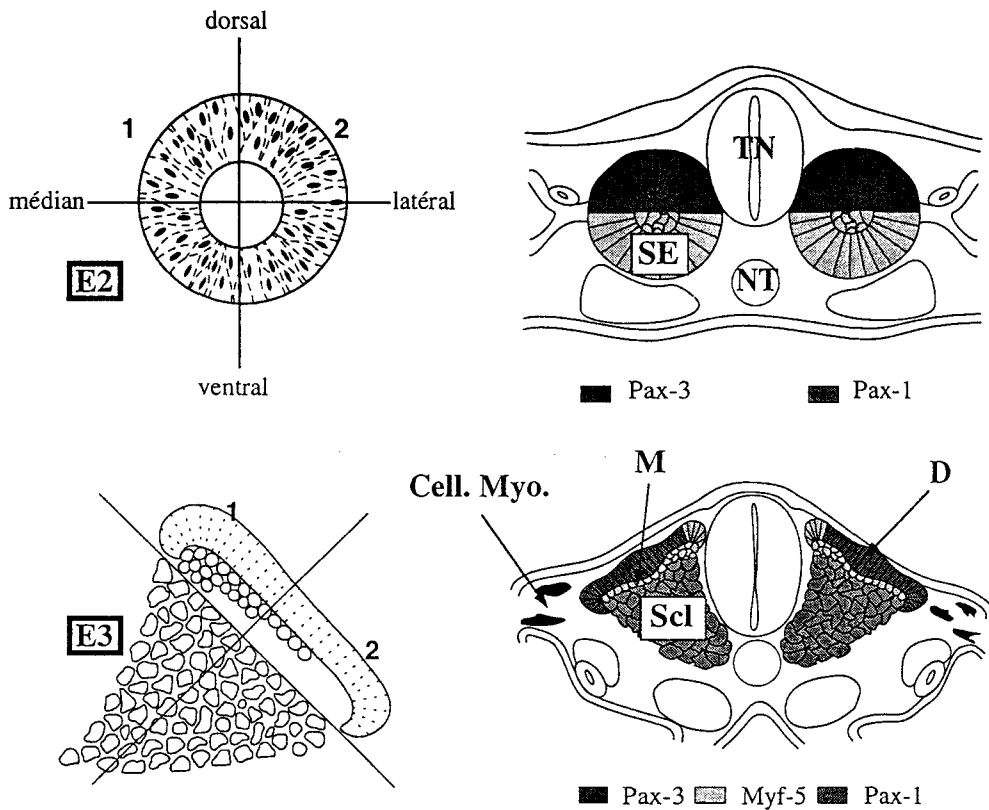
Le compartiment somitique épithélial se divise lui-même en deux compartiments latéral et médian. L'apparition du myotome sous le bord dorso-médian du dermatomyotome est le premier événement morphologique visible de la différenciation des muscles squelettiques. La formation du myotome à partir du dermatomyotome se réalise par prolifération et élongation des cellules à la bordure craniale du dermatomyotome. Le myotome consiste en une couche de cellules arrangées longitudinalement. Les cellules myotomales sont d'abord détectées dans le quart médian des somites à l'avant de l'embryon puis progressivement plus caudalement. Ce phénomène a lieu ventro-latéralement (Kaehn *et al.*, 1988). A ce moment du développement les cellules sont dans

une phase post-mitotique et commencent à exprimer des marqueurs myogéniques comme la desmine ou la myosine. Cependant la détermination des cellules souches dépend également de facteurs extrinsèques agissant dans les phase plus tardives de la somitogenèse.

III.2. GENES *PAX* ET SOMITES

L'intervention de plusieurs des gènes *pax* dans le contrôle des étapes précoces de la détermination des cellules somitiques sur la voie de la myogenèse est maintenant acquise. De nombreuses études tendent à montrer que *pax-3* et *pax-7* constituent des marqueurs précoces de la somitogenèse. Au moins trois grandes catégories de gènes de régulation sont impliqués dans la somitogenèse : les gènes *Hox*, les gènes *pax* et les gènes de la famille de *MyoD*. Les gènes *Hox* sont impliqués dans la spécification régionale des somites (Kessel *et al.*, 1991; Kessel et Gruss, 1991), les gènes *pax* jouent un rôle dans la détermination précoce de chaque somite tandis que les facteurs de la famille de *MyoD* interviennent dans la différenciation myogénique.

Le gène *pax-3* s'exprime dans la plaque segmentaire (chez l'Oiseau, équivalent du mésoderme insegmenté des Mammifères, stade précédent la segmentation en somites) puis voit son expression se restreindre au dermomyotome en réponse à des signaux de la notochorde et de la plaque neurale, qui exercent une influence certaine sur le choix des somites entre le lignage musculaire, cartilagineux ou dermique (Pourquié *et al.*, 1993; Bober *et al.*, 1994b; Goulding *et al.*, 1994a and b; Williams et Ordahl, 1994). *pax-7* n'apparaît qu'au stade VII des somites. Plus précisément, *pax-3* s'exprime d'abord dans la partie dorsale puis dorso-latérale des somites (**Figure 17**) avant d'être présent dans le dermomyotome. *pax-1*, comme *pax-3*, est un marqueur de différenciation somitique, qui s'exprime dans les somites épithéliales, à partir du 3^{ème} somite, en portion ventrale (**Figure 17**) avec l'initiation de la différenciation du sclérotome, puis son expression dans le somitocèle s'accompagne de celle de *pax-9* (Williams et Ordahl, 1994). L'expression de *pax-7* se restreint aux muscles intercostaux. Beaucoup plus tard au cours du développement ces deux gènes *pax* s'expriment dans les bourgeons de membres (Goulding *et al.*, 1994a). L'analyse des Souris mutées dans *pax-7* ne révèle aucune anomalie morphologique dans le dermomyotome (Mansouri *et al.*, 1996), contrairement au dermomyotome des Souris *splotch*, mutées dans *pax-3*, qui présente une désorganisation manifeste (Franz *et al.*, 1993; Bober *et al.*,



Sous l'effet des repliements latéraux, entre E2 et E3 le somite subit une rotation

1 le quartier dorso-médian se dispose plus dorsalement

2 le quartier dorso-latéral se dispose plus ventralement

Figure 17: Expression de marqueurs de la somitogenèse à 2 et 3 jours de développement (E2 et E3) chez le Poulet. TN: Notochorde; NT: Tube Neural; SE: Somite Epithélial; Scl: Sclérotome; M: Myotome; D: Dermotome; Cell. Myo.: Cellules Myogéniques en migration.

1994; Goulding *et al.*, 1994a). Il n'est donc pas à exclure une prise en charge de l'action de *pax-7* par *pax-3* dans les Souris *pax-7^{-/-}*.

Chez le Poulet il a été montré que les cellules myogéniques des bourgeons de membre migrent à partir du dermomyotome latéral et expriment *pax-3* (Williams et Ordahl, 1994). De la même manière que les défauts des dérivés des crêtes neurales sont dus à un défaut de migration des cellules des crêtes neurales dans les Souris *Spotch*, les problèmes myogéniques de ces Souris peuvent provenir d'un défaut de migration des précurseurs musculaires (Daston *et al.*, 1996). De tous ces travaux il ressort que *pax-3* est impliquée dans la spécification et/ou la migration des précurseurs myogéniques et constitue un marqueur de la détermination myogénique plus précoce que les membres de la famille MyoD (Bober *et al.*, 1994b; Goulding *et al.*, 1994a; Olson et Rosenthal, 1994).

III.3. LA CASCADE DES GENES MYOGENIQUES bHLH

L'étude des mécanismes génétiques régulant la myogenèse a grandement été favorisée par la relative facilité avec laquelle on peut reproduire la différenciation myogénique *in vitro*. La grande caractéristique des cellules myogéniques est de conserver, malgré les passages en culture, leur capacité à se différencier en myotubes multinucléés. Leur état de détermination est particulièrement stable. Grâce à ces systèmes de cultures cellulaires on a pu commencer à isoler les gènes opérationnels dans la différenciation myogénique. Ainsi le produit du gène *MyoD* (Davis *et al.*, 1987), présent uniquement dans le muscle squelettique et les myoblastes mais pas dans le muscle cardiaque ou les muscles lisses (Weintraub *et al.*, 1989). Il en est de même pour les trois autres membres qui lui sont apparentés, Myf-5 (Braun *et al.*, 1989), Myf-6 (Braun *et al.*, 1990) par ailleurs isolée sous le nom de MRF4 (Rhodes et Konieczny, 1989) ou d'herculine (Miner et Wold, 1990) et la Myogénine (Edmondson et Olson, 1989).

Les travaux menés *in vitro* avec des lignées de cellules musculaires montrent que le principal lien entre ces membres, outre la forte homologie de leurs motifs bHLH, est leur capacité à induire une différenciation myogénique lorsqu'ils sont introduits dans des cellules non musculaires (Weintraub *et al.*, 1991). *MyoD* et *Myf-5* s'expriment dans les myoblastes proliférant tandis que la Myogénine s'accumule au moment de la différenciation des myoblastes, et que

l'expression de *Myf-6* n'apparaît que très tardivement en culture (Arnold et Braun, 1996). *MyoD* et *Myf-5* auraient un rôle prépondérant dans les événements précoces de la myogenèse, alors que les autres membres interviendraient dans la différenciation terminale.

Les travaux menés *in vivo* en inactivant chez la Souris chacun de ces membres ont révélé des différences fonctionnelles entre eux (Weintraub *et al.*, 1993). La Myogénine est indispensable *in vivo* pour la différenciation terminale des myoblastes. Le phénotype le plus altéré est celui obtenu après l'inactivation du gène codant la Myogénine; les Souris meurent précocément. Les myoblastes, dont le nombre est équivalent à celui des animaux normaux, ne se différencient pas et les gènes codant les protéines contractiles ne sont pas activés (Hasty *et al.*, 1993; Nabeshima *et al.*, 1993). Aucun autre membre ne peut prendre le relais de Myogénine et l'inactivation de chacun des trois autres membres n'empêche pas la formation de muscles.

L'inactivation de *MyoD* (Rudnicki *et al.*, 1992) n'empêche pas l'initiation ou la progression du développement des muscles. Mais dans ces Souris l'expression de *Myf-5* est augmentée; *Myf-5* pourrait prendre le relais de *MyoD* et être un gène réprimé par *MyoD* en situation normale. De même les muscles squelettiques des Souris dont *Myf-5* est inactivé (Braun *et al.*, 1992) sont normaux, alors que *Myf-5* est le messager détectable le plus précocément (chez la Souris). Son expression apparaît dans la quart dorso-médian des somites (**Figure 17**) dont il constitue un marqueur précoce et l'on aurait pu s'attendre à ce qu'il représente un déterminant des précurseurs myogéniques. Néanmoins il faut souligner que la somitogenèse précoce chez les homozygotes est perturbée, malgré la présence de *MyoD*, puisque leurs côtes sont tronquées, voire absentes. *MyoD* assurerait avec un léger retard, la naissance de cellules myotomales indépendamment de *Myf-5*. Ce retard perturberait les interactions entre le myotome et la partie latérale du sclérotome, qui contient les précurseurs des côtes. Le phénotype des Souris *Myf6*^{-/-} (Olson *et al.*, 1996), *Myf-6* étant détecté transitoirement mais devenant la protéine bHLH dominante des muscles squelettiques adultes (Bober *et al.*, 1991), rappelle celui des Souris *Myf5*^{-/-} (Braun *et al.*, 1995). L'expression de *Myf-5* est diminuée et l'expression des protéines musculaires est altérée.

Enfin l'inactivation de *MyoD* et de *Myf-5* (Rudnicki *et al.*, 1993) tue aussi les souriceaux qui sont dépourvus de myofibres. Il est donc clair que *MyoD* et *Myf-5* sont nécessaires à la

détermination et au nombre des myoblastes, à leur propagation et à leur position, et qu'ils agissent en amont de Myf-6 et de Myogénine, indispensable à la différenciation terminale du muscle squelettique. Des études menées *in vivo* et *in vitro*, il ressort que les membres de la famille MyoD peuvent donc se réguler mutuellement (**Figure 18**).

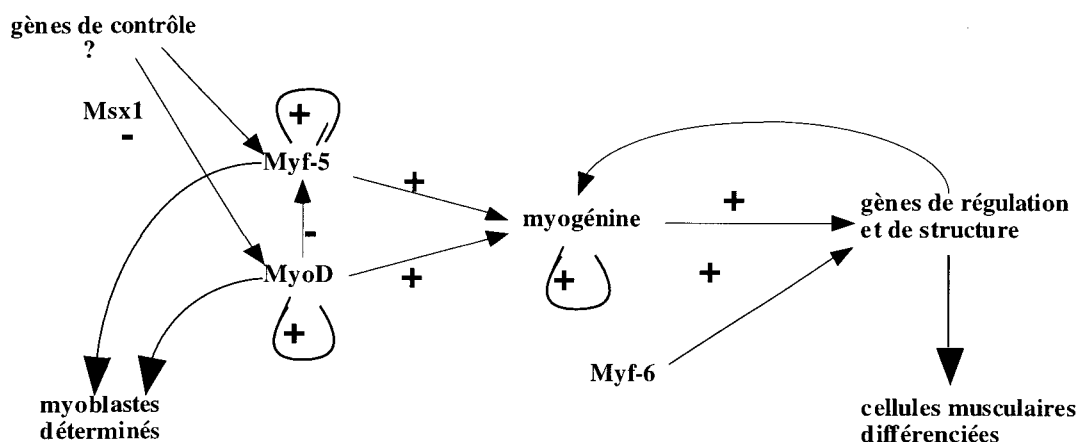


Figure 18: Relations entre les facteurs de transcription myogéniques (d'après Arnold et Braun, 1996). Msx1 est une homéoprotéine qui inhiberait la transcription de *MyoD*.

Les protéines bHLH myogéniques se dimérisent pour agir, avec d'autres protéines bHLH ubiquistes de classe A comme E12, E47 et HEB (Murre *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1992) mais aussi avec de nombreux autres facteurs non bHLH qui modulent ainsi leur activité durant la myogenèse. Ainsi, les protéines MEF2 (Myocyte Enhancer Factor-2) agissent comme co-activateurs des protéines myogéniques bHLH (Molkentin et Olson, 1996) ou c-Jun, capable de substituer aux partenaires de MyoD comme E12 *in vitro*, et de réprimer ses capacités d'activation transcriptionnelle (Bengal *et al.*, 1992), ou encore Rb, voire la protéine p107 (Schneider *et al.*, 1994), les complexes MyoD/Rb, en s'accumulant dans les noyaux des myoblastes (Gu *et al.*, 1994) permettraient l'arrêt de la prolifération des myoblastes, préalable à leur différenciation.

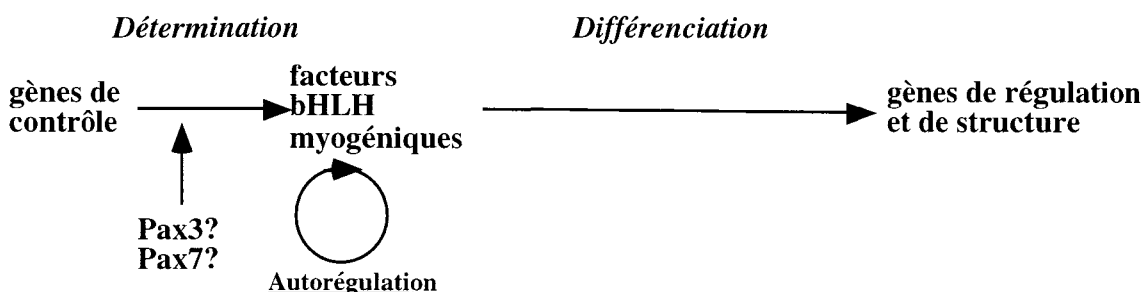


Figure 19: Cascade des facteurs de transcription conduisant à la différenciation myogénique.

Les protéines myogéniques se situent donc au sein de toute une combinaison d'interactions protéiques avec différentes familles de facteurs de transcription. On serait également tenté de supposer une éventuelle régulation des gènes myogéniques par les gènes *pax-3* ou *pax-7* (**Figure 19**). Ceci dit l'expression dans le dermatome et dans le myotome des gènes myogéniques est normale dans les Souris *pax7*^{-/-} (Mansouri *et al.*, 1996). D'autre part, Daston *et al.*, ont montré que les cellules somitiques de Souris *Spotch* greffées dans des bourgeons de membres de Poulet peuvent se différencier et exprimer les gènes myogéniques (Daston *et al.*, 1996). Ceci suggère dans ce cas qu'un seul des gènes *pax* (*pax-3* ou *pax-7*) serait un régulateur des protéines bHLH de la différenciation musculaire.

IV. LA MELANOGENESE

Dans ce modèle de différenciation, la détermination précoce serait prise en charge par *pax-6* pour les mélanocytes du SNC et *pax-3* pour les mélanocytes du Snp, un facteur de type bHLHLZ, MI, officiant ensuite pour mettre en place la différenciation finale de ces cellules. *pax-6* est requis pour la formation de la rétine pigmentaire (RPE) (Quinn *et al.*, 1996).

IV.1. DES MELANOCYTES ENVAHISSANTS

La mélanogenèse constitue depuis longtemps un modèle favorable aux études de différenciation, grâce à un type cellulaire, le mélanocyte, rendu bien visible par la présence d'un pigment, la mélanine. Chez les Vertébrés supérieurs la distribution mélanocytaire est essentiellement restreinte à la peau et à ses phanères et à la rétine pigmentaire. Chez les Oiseaux l'on trouve quelques excentricités; présence dans le mésentère chez la Caille Japonaise, dans les gonades de quelques autres. Des mélanocytes sont aussi présents dans la choroïde, dans la glande lacrymale de Harderian, et peut-être plus surprenante est la contribution des mélanocytes au fonctionnement de l'oreille interne dans laquelle on en détecte; des Souris dépourvues de mélanocytes dérivés des crêtes neurales sont sourdes (Steel et Barkway, 1989). Toutefois, ces mélanocytes sont dépourvus de pigments.

Les mélanocytes ont deux origines: l'épithélium de la cupule optique (dérivé du SNC) pour ceux de la RPE et des crêtes neurales pour les autres. Les premiers ne migrent pas et sont dépourvus de dendrites. Tandis que les seconds suivent tout un trajet migratoire des crêtes à l'état de mélanoblastes pour coloniser peau et phanères, oreille interne, méninges, choroïde, iris et muqueuses. Aussi des mutations affectant des mélanocytes dérivés des crêtes neurales n'affectent pas toujours ceux de la RPE. Les cellules des crêtes neurales migrent en deux vagues principales. Les mélanoblastes, issus de la deuxième vague, proviennent de la région céphalique des crêtes neurales. Ceux-ci migrent ensuite (entre E3 et E4) entre le dermomyotome et l'ectoderme de façon dorso-latérale avant de coloniser leurs sites d'arrêt (Teillet et Le Douarin, 1970; Teillet, 1971) alors que les cellules de la première vague suivent un trajet dorso-ventral (Figure 20).

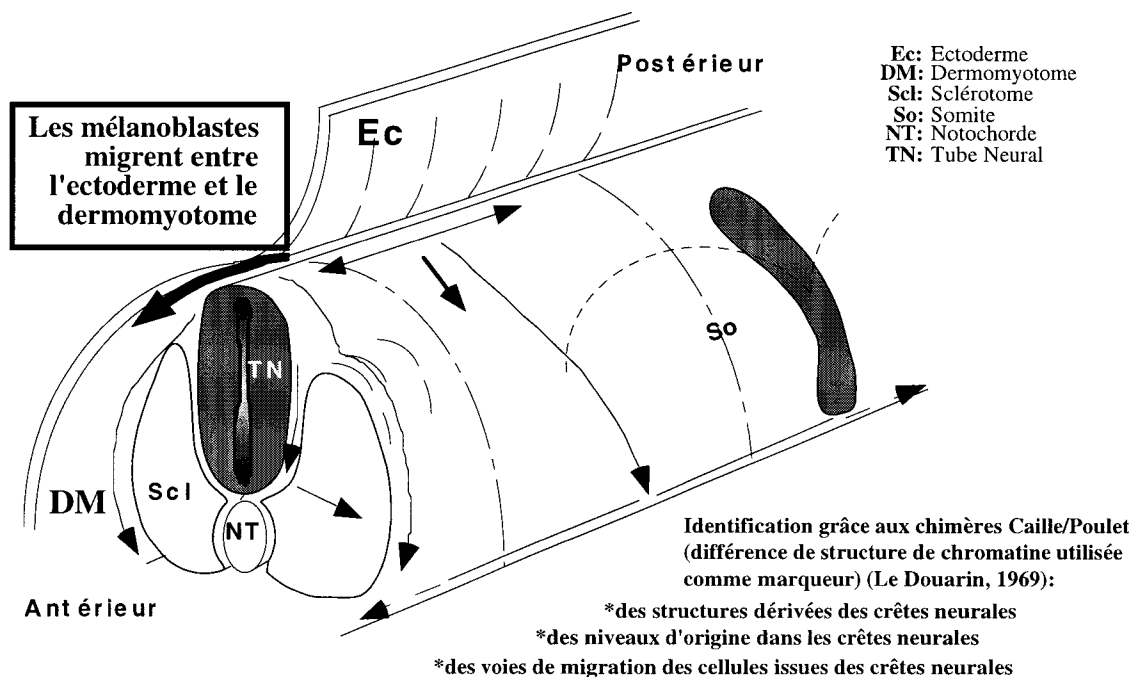


Figure 20: Voies de migration des cellules des crêtes neurales au niveau tronc d'un embryon de 3 jours (d'après Dulac, 1993).

Parmi les mélanoblastes qui parviennent dans la peau (entre E5 et E6), certains franchissent la membrane basale et pénètrent dans l'ectoderme; les autres restent dans le derme. Vers E9 pour le Poulet et E8 pour la Caille, les mélanoblastes prolifèrent alors activement et enfin se différencient en mélanocytes dendritiques.

Un nombre limité de précurseurs déterminés précocément engendrent les mélanocytes de la peau. De l'agrégation de deux morula de Souris de pelages différents naissent des Souriceaux avec 17 paires de zébrures dans le pelage; la pigmentation est due à 17 paires de précurseurs évoluant en 17 paires de clones disposés parallèlement à la ligne médiodorsale et qui combrent les espaces par prolifération (Mintz, 1967).

Avec le développement des techniques de cultures de cellules des crêtes neurales et des mélanocytes, de nombreux auteurs ont utilisé une approche clonale pour essayer de définir les potentialités de différenciation des cellules des crêtes neurales de Caille ou bien de Souris (Cohen et Konigsberg, 1975; Sieber-Blum et Cohen, 1980; Baroffio *et al.*, 1988; 1991; Dupin *et al.*, 1990; Ito and Sieber-Blum, 1991; Ito *et al.*, 1993). En obtenant des clones entièrement pigmentés, non pigmentés ou bien mixtes dans lesquels les cellules pigmentées sont associées à différents autres types cellulaires issus des crêtes neurales, ces auteurs ont ainsi démontré l'hétérogénéité des cellules de crêtes neurales. A un temps donné, certaines cellules sont déjà engagées sur la voie de différenciation mélanocytaire, et d'autres conservent une certaine pluripotence qui se restreint au cours du développement embryonnaire (Anderson, 1989). Néanmoins dans l'embryon, seules les cellules des crêtes neurales déjà déterminées à devenir des mélanoblastes s'engageraient dans la voie dorso-latérale (Erickson et Goins, 1995). Au fur et à mesure que les heures passent le rapport entre les deux populations cellulaires s'inverse avec une diminution des précurseurs pluripotents et un enrichissement de la peau en cellules déterminées dans la voie mélanogénique (Richardson *et al.*, 1993).

Le mélanocyte dérivé des crêtes neurales et pleinement différencié est donc caractérisé, comme on l'a dit, par son contenu en mélanosomes, ses dendrites mais aussi ses activités enzymatiques.

Les pigments de mélanine sont synthétisés et déposés dans des organites subcellulaires appelés mélanosomes (Seiji *et al.*, 1963). De nombreuses études cytochimiques, génétiques, biochimiques et de microscopie électronique tendent à montrer que les mélanosomes sont en fait des organites de la grande famille des lysosomes (Orlow, 1995). Les pigments de mélanine sont de deux sortes : eumélanine noire à brune et phaeomélanine rouge à jaune, synthétisées soit dans le même mélanosome soit dans des mélanosomes différents (eumélanosomes et

phaeomélanosomes) (Hach *et al.*, 1993). La mélanine est issue d'une chaîne enzymatique dont l'enzyme principale est la tyrosinase qui catalyse trois réactions dans la voie de synthèse des mélanines (**Figure 21**). Deux autres enzymes qui lui sont très proches en séquences (35 à 45% d'identités en acides aminés) participent à la synthèse des mélanines; TRP-1 (tyrosinase-related protein-1) (Jackson *et al.*, 1988) et TRP-2 (tyrosinase-related protein-2) (Jackson *et al.*, 1988), qui est en fait la DOPACHrome tautomérase (Tsukamoto *et al.*, 1992).

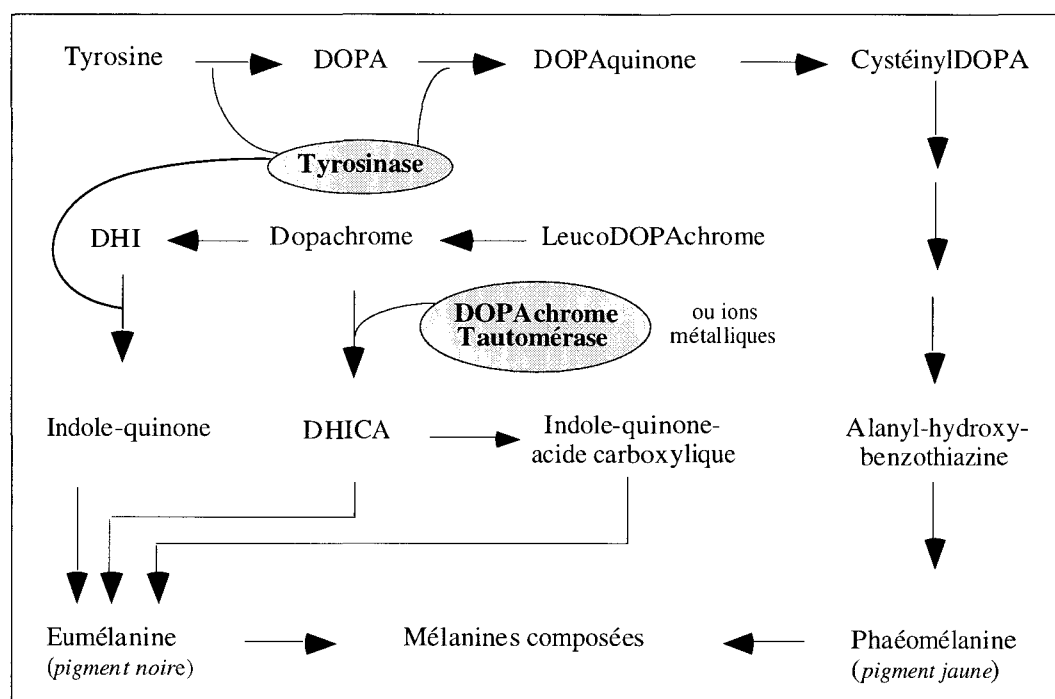


Figure 21: Voies de synthèse des mélanines (d'après Bouchard, 1993)

DHI: dihydroxyindole; DHICA: dihydroxyindole acide carboxylique.

La mélanogénèse implique les processus de prolifération, de migration et de différenciation; différentes mutations perturbant ces étapes ont été caractérisées. Parmi les loci impliqués, deux codent des facteurs de transcription, *pax-3* et *Mi*. Plusieurs molécules impliquées dans la mélanogénèse ont été caractérisées grâce à l'analyse de souches de Souris porteuses de mutations dans les loci affectant la couleur du pelage. Chez la Souris on connaît au moins 150 allèles représentant 60 loci.

IV.2. MUTATIONS AFFECTANT LA MIGRATION DU MELANOBLASTE

IV.2.1. IMPLICATION DE *PAX-3*

Comme nous l'avons vu, *pax-3* est exprimé dans la zone dorsale du tube neural, incluant la région de l'épithélium neural qui donne naissance aux crêtes neurales (Goulding *et al.*, 1991). Puis *pax-3* est exprimé dans les cellules des crêtes neurales céphaliques et troncales *avant* leur migration dans des structures qui en dérivent comme les ganglions crâniens, les ganglions des racines dorsales et le més ectoderme facial (Goulding *et al.*, 1991). L'étude de Souris *splotch* suggère une implication de ce gène dans la mélanogénèse. Les Souris hétérozygotes présentent des anomalies de pigmentation, à savoir des taches blanches sur le ventre, parfois la queue et les membres, en plus des anomalies auditives. Ces anomalies sont comparables à celles observées chez les patients atteints des syndromes de Waardenburg de types I (SW1) (Tassabehji *et al.*, 1992) et III (SW3) (Baldwin *et al.*, 1992), qui présentent entre autres défauts des anomalies de pigmentation (hétérochromie iridienne, mèche de cheveux blancs, taches achromiques). Il a été montré *in vitro* que les cellules des crêtes neurales des Souris *Splotch* avaient une migration retardée (Moase and Trasler, 1990); elles ne coloniseraient pas complètement le derme. *pax-3* pourrait donc être impliqué dans la migration des précurseurs mélanoblastiques mais aussi dans la détermination au sein des crêtes neurales des futures mélanoblastes, puisque *pax-3* est exprimé dans la zone de l'épithélium dont sont issues les crêtes neurales.

IV.2.2. IMPLICATION D'UN FACTEUR DE TYPE bHLHLZ - MUTATION *MICROPHTALMIA* (MI)

Le facteur de transcription Mi de type bHLHLZ de classe B (**Tableau 4**) est directement impliqué dans la mélanogénèse. Il a été découvert dans les lignées de Souris transgéniques porteuses d'une insertion dans le locus *microphthalmia* (Hodgkinson *et al.*, 1993). Il existe de nombreux allèles *mi* et les phénotypes sont plus ou moins sévères. Les hétérozygotes présentent souvent des taches blanches sur le pelage (tête, corps et queue) ainsi qu'une coloration incomplète de l'iris. Les défauts de développement des homozygotes sont plus nombreux: dépigmentation, parfois totale, petits yeux dépigmentés avec réduction de taille voire absence des bâtonnets, surdité, anomalies des mastocytes et des déficiences en ostéoclastes avec pour conséquences des problèmes de résorption des os et de pousse des dents (Steingrimsson *et al.*, 1994). Chez la Souris, *mi* est exprimé dans les zones affectées chez les nombreux mutants:

derme, rétine pigmentaire, vésicule otique, et dans des mastocytes en culture. Mais aussi dans le coeur et le muscle squelettique, qui eux ne sont pas affectés. L'équivalent *mi* humain (MITF) a été isolé sur le chromosome 3q12.3-p14.1 et le syndrome de Waardenburg de type 2 (SW2) a été associé à des mutations de MITF (Hughes *et al.*, 1994; Tachibana *et al.*, 1994; Tassabehji *et al.*, 1994b). Le SW2 se distingue du SW1 par une absence de dystopie des canthi et les individus touchés par cette maladie présentent un défaut de coloration de l'iris et des mèches de cheveux blanches ou grises. De plus, ils sont atteints d'une surdité uni ou bilatérale (Hughes *et al.*, 1994). Contrairement à l'albinisme, les zones dépigmentées sont dépourvues de mélanocytes. Mi paraît donc être un facteur important de régulation des gènes indispensables à l'intégrité des mélanocytes. Cette absence mélanocytaire chez les Mutants ainsi que la capacité de Mi à réguler l'expression de *c-kit* dans les cellules mastocytaires (Tsujimura *et al.*, 1996) suggèrent que Mi pourrait agir sur la migration et/ou la différenciation des mélanocytes, qui expriment *c-kit*.

Les études fonctionnelles réalisées *in vitro* ont montré que Mi est capable de former des homodimères, ainsi que des hétérodimères avec 3 autres facteurs à bHLHLZ dont il est le plus proche, TFE3, TFEB qui sont d'expression ubiquiste, ou encore TFEC qui peut se lier à TFE3 pour en inhiber l'activité (Zhao *et al.*, 1993). Par contre, Mi n'a pas été montrée capable de s'hétérodimériser avec Myc, Max, E47 ou USF (Hemesath *et al.*, 1994). Mi constitue avec TFE3, TFEB et TFEC une sous-famille de facteurs se fixant à l'ADN sur des « E-box » communes de séquences CATGTG et CACGTG. Cette « E-box » est le centre d'un motif de 11 pb, la boîte M (pour Mélanocyte), décrit initialement dans les promoteurs de la tyrosinase et de la TRP-1 (Hemesath *et al.*, 1994; Yasumoto *et al.*, 1994), élément minimal pour conférer la spécificité d'expression mélanocytaire de ces gènes, et très conservé chez les Vertébrés (Bentley *et al.*, 1994). L'action de Mi se situerait à deux niveaux: la migration des mélanocytes en provenance des crêtes neurales, et la différenciation finale des mélanoblastes en mélanocytes, que ceux-ci proviennent du SNC ou du SNP, puisque parmi les gènes cibles de Mi figurent les gènes codant les enzymes impliqués dans la synthèse de la mélanine.

Il faut également noter la présence de c-Myc, autre facteur de type bHLHLZ dans la RPE, le derme et les bourgeons plumaires (Desbiens *et al.*, 1991). La RPE exprime *c-myc* de façon homogène à E6 puis son expression diminue fortement dans la zone centrale, qui synthétise de

fortes quantités de pigments tandis que la zone périphérique qui synthétise de faibles quantités de pigments continue d'exprimer *c-myc* (Jaffredo *et al.*, 1989).

IV.2.3. IMPLICATION DE TYROSINES KINASE - LES MUTATIONS W/ LES MUTATIONS SI

Les loci W (*White Spotting*) et SI (*Steel*) sont connus pour affecter la couleur du pelage des Souris (Marusich et Weston, 1991). Les allèles sont semi-dominants et les mutations dans ces loci, le plus souvent létales pour les homozygotes, perturbent le développement de 3 types de cellules souches: mélanocytaires, hématopoïétiques et germinales, et engendrent des phénotypes plus ou moins sévères. Les animaux souffrent d'anémie macrocytaire, ainsi que d'une stérilité complète, et surtout de l'absence de pigmentation de la peau, ce qui indique que les mélanocytes issus des crêtes neurales sont perturbés.

Le locus W est le proto-oncogène *c-kit*, qui code un récepteur transmembranaire doué d'une activité tyrosine kinase (Chabot *et al.*, 1988; Geissler *et al.*, 1988). *C-kit* est le progéniteur de l'oncogène *v-kit* d'un rétrovirus félin qui est amputé de sa portion extra-cellulaire ce qui rend constitutive son activité tyrosine kinase (Besmer *et al.*, 1986). Ce récepteur fonctionne sous forme de dimères voire de multimères. Chez l'Homme, les patients atteints de piébaldisme (pie) présentent une dépigmentation des zones ventrales et des extrémités des membres. Et dans quelques cas, l'analyse de l'ADN a révélé une implication possible de *c-kit* (Fleischman *et al.*, 1991; Giebel *et al.*, 1991) dans ce phénotype.

Le locus *Sl* code le facteur de croissance *steel* appelé aussi SCF pour *stem cell growth factor*, MGF pour *mast cell growth factor* ou encore KL pour *kit-ligand*. Car en fait ce facteur est le ligand du récepteur codé par *c-kit*. Il agirait comme mitogène pour des mélanoblastes, voire comme un facteur de survie de ces cellules plutôt que comme un facteur induisant leur différenciation; il n'est pas nécessaire pour la production de mélanine (Murphy *et al.*, 1992; Morrison-Graham *et al.*, 1993). Les interactions *c-kit/steel* sont en fait requises durant le développement mélanocytaire. Chez le Poulet, les cellules exprimant *c-kit* sont localisées dans des zones où le facteur Steel est détecté, au moment de la prolifération des mélanoblastes et de leur différenciation (Lecoin *et al.*, 1995). Les cellules des crêtes neurales qui se détachent de

l'épithélium neural, stationnent dans une zone délimitée par le tube neural, les somites et l'épiderme, puis entament leur migration. Les précurseurs mélanocytaires, avant même de s'engager dorso-latéralement, expriment déjà les messagers de *c-kit* (Steel *et al.*, 1992). Le choix du trajet dorso-latéral (**Figure 20**) par les précurseurs mélanocytaires exprimant *c-kit* serait dû à la production transitoire de Steel par les cellules épithéliales du dermatome dorsal; les mélanoblastes exprimant *c-kit* seraient attirés par ces cellules; ceci conditionnerait leurs voies de migration (Flanagan *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1992; Wehrle-Haller and Weston, 1995). L'absence de migration des précurseurs dans les mutants de *Steel* est probablement due à la mort de ceux-ci, *Steel* ayant déjà été décrit comme un facteur de survie des précurseurs mélanocytaires (Morrison-Graham et Weston, 1995). Ceci expliquerait le phénotype similaire des mutants de *c-kit* dont les précurseurs mélanocytaires ne pourraient percevoir les stimuli de Steel et qui ne survivraient pas.

IV.3. MUTATIONS AFFECTANT LES MELANOSOMES

IV.3.1. MUTATIONS AFFECTANT LA STRUCTURE MELANOSOMALE

La morphologie du mélanocyte semble dépendre de plusieurs loci dont les mutations «diluent» la couleur du pelage et privent les mélanocytes de leurs dendrites, dont les mutations *dilute*, *leaden* et *ashen* et *dilute suppressor (dsu)* (Jackson, 1994). Le locus *dilute* code la protéine myosine, conservée à travers les espèces (Jackson, 1994)

Le mélanosome étant apparenté aux lysosomes, de nombreuses mutations affectant les lysosomes vont également affecter les mélanosomes. Une douzaine de loci ont été décrits, dont le locus *silver*.

Les Souris homozygotes porteuses de mutations dans ce locus présentent une perte progressive des pigments bruns et noirs du pelage et une disparition des mélanocytes à la base du poil. La séquence de la protéine codée par *silver* révèle une séquence signal et un domaine transmembranaire qui suggèrent que le produit de *silver* est ancré dans la membrane mélanosomale (Kwon *et al.*, 1991). En outre les mélanosomes extraits des rares mélanocytes des Souris *silver* sont dépourvus de cette protéine. Un homologue a été décrit chez le Poulet, MMP115 dont le produit se localise dans la matrice mélanosomale et qui participe à la formation

des mélanosomes (Mochii *et al.*, 1991). Récemment il a été assigné à la protéine Silver une activité enzymatique *in vitro* à partir d'extraits de cellules de mélanomes humains et murins, qui catalyse la polymérisation du DHICA (**Figure 20**) en mélanines (Chakraborty *et al.*, 1996).

IV.3.2. MUTATIONS AFFECTANT LES GENES CODANT LES ENZYMES

La tyrosinase est produite par le locus *albino* (*c*). Les mutations dans ce locus provoquent l'albinisme en affectant la pigmentation des mélanocytes des crêtes neurales et de la RPE. Les mutants possèdent des mélanocytes mais ceux-ci sont incapables de produire de la mélanine.

La TRP-1 est produite par le locus *brown*. (Jackson, 1988). Là aussi les homozygotes produisent une eumélanine plutôt brune que noire (Bouchard, 1993).

La TRP-2 est produite par le locus *slaty*. Les homozygotes produisent une eumélanine plutôt gris-brun que noire (Jackson *et al.*, 1992). Des trois enzymes, TRP-2 apparaît la première; elle est exprimée dans le neurectoderme destiné à évoluer en RPE de l'oeil, et dans les mélanoblastes en cours de migration (Steel *et al.*, 1992).

IV.3.3. MUTATIONS AFFECTANT LES GENES REGULATEURS DES ENZYMES

1. L' α -MSH.

La différenciation mélanocytaire est contrôlée entre autres par des hormones synthétisées par l'hypophyse, les mélanotrophines. Il s'agit de trois molécules dérivées d'un précurseur commun, la pro-opiomélanocortine (POMC): l'ACTH (adrénocorticotropie hormone) et pour les deux autres l' α -et γ -MSH (α -et γ -Melanocyte-Stimulating Hormone), bien que l' α -MSH puisse aussi être synthétisée par les kératinocytes (Slominski *et al.*, 1995). L' α -MSH, qui serait la plus puissante, régule la synthèse des pigments jaunes (phaéomélanine) et des pigments noirs (eumélanine). L'application d' α -MSH sur des clones de cellules de crêtes neurales de Caille augmente le nombre de clones contenant des mélanocytes (Sato et Ide, 1987). Elle augmenterait le taux d'AMPc intracellulaire ce qui augmente l'activité de la tyrosinase (Hirobé, 1992), le premier enzyme de la biosynthèse de la mélanine à partir de la tyrosine. L' α -MSH n'a par contre

aucune action sur la prolifération des mélanoblastes ou des mélanocytes, même en présence de kératinocytes (Hirobé, 1992). Cependant les mélanoblastes prolifèrent mieux en présence des kératinocytes. Un agent mitogène tel que le bFGF ne peut pas se substituer aux kératinocytes pour induire la prolifération mélanoblastique, non plus d'ailleurs qu'un milieu conditionné par les kératinocytes (Hirobé, 1992). L'action mitogène des kératinocytes est probablement liée à une molécule associée à leur membrane.

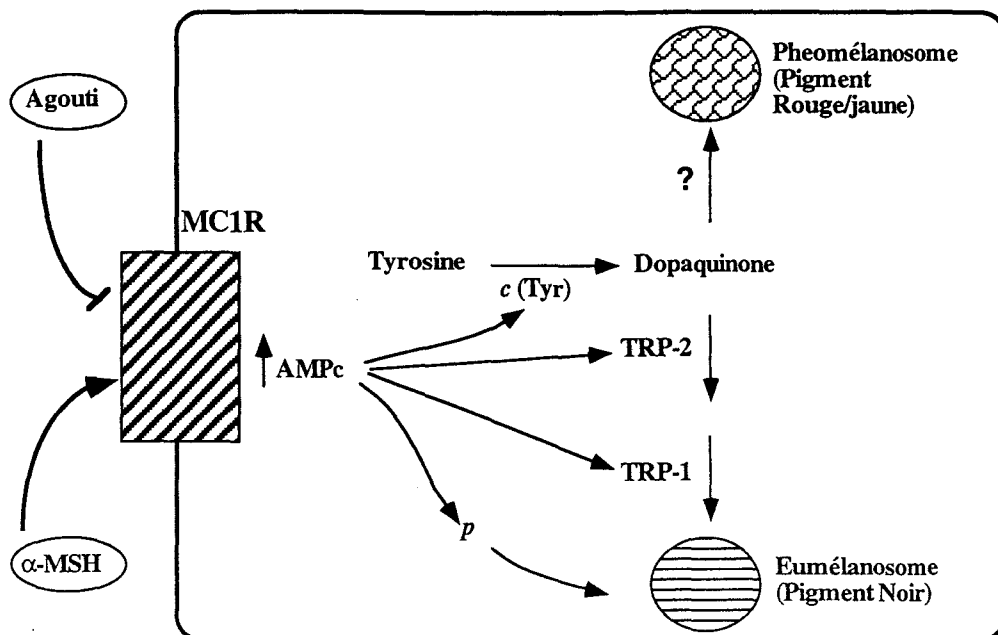
2. Agouti/ α -MSH /MC1r

L'analyse des mutants *Agouti*, a conduit à l'isolement d'une protéine qui est sécrétée, Agouti. Contrairement aux hormones mélanocortiques véhiculées par le sang, elle possède une action paracrine (Millar *et al.*, 1995). Sur les lieux d'action de ces hormones, Agouti empêcherait la fixation des hormones sur MC1R (**M**elanocortin **1 R**eceptor), qui est un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G exprimé en grande quantité par les mélanocytes, et dont l'activation par les mélanocortines telles que l' α -MSH induit une augmentation du taux d'AMPC (Mountjoy *et al.*, 1992). Agouti se comporterait comme un antagoniste naturel qui modulerait localement le taux d'activité des MSH (**Figure 22**). Comme les MSH (Robbins *et al.*, 1993), elle est sans effet sur les mélanocytes de la RPE.

3. les mutations *piebald spotting/lethal spotting*

Des mutations dans le récepteur de type B et dans son ligand, l'endothéline3 sont responsables des phénotypes semblables des mutants *piebald spotting* (*Ednrb*) et *lethal spotting* (*Edn3^{ls}*), respectivement (Pavan et Tilghman, 1994). *Ednrb* est un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G. Les anomalies affectent un plus grand nombre de dérivés de crêtes neurales que celles présentées par les mutants W/SI. Le couple *Ednrb/ Edn3^{ls}* intervient en amont du couple W/SI, qui lui-même intervient en amont de l'action de MC1R (**Figure 23**).

A l'heure actuelle, aucune hiérarchie n'a été établie *entre pax-3 et Mi* ou *pax-6 et Mi*, bien que ces deux types de gènes soient exprimés dans les mêmes précurseurs, avec toutefois un avantage chronologique pour les gènes *pax* qui s'expriment, pour *pax-3* dans les bords de la plaque neurale avant que ne naissent les crêtes neurales, et pour *pax-6* dans les vésicules optiques avant l'apparition de la RPE.



Agouti et α -MSH régulent l'activité de MC1R négativement et positivement pour, respectivement, diminuer et augmenter le taux d'AMPc
p est le produit du gène pink-eyed dilution; protéine membranaire spécifique des eumélanosomes
c est le locus codant la tyrosinase
 L'augmentation d'AMPc par α -MSH stimule l'activité de Tyr, TRP-1 et TRP-2, et est modulée par Agouti, ce qui détermine la nature des pigments produits à partir de la Dopaquinone

Figure 22: Influences de l' α -MSH et d'Agouti dans la synthèse des mélanines.

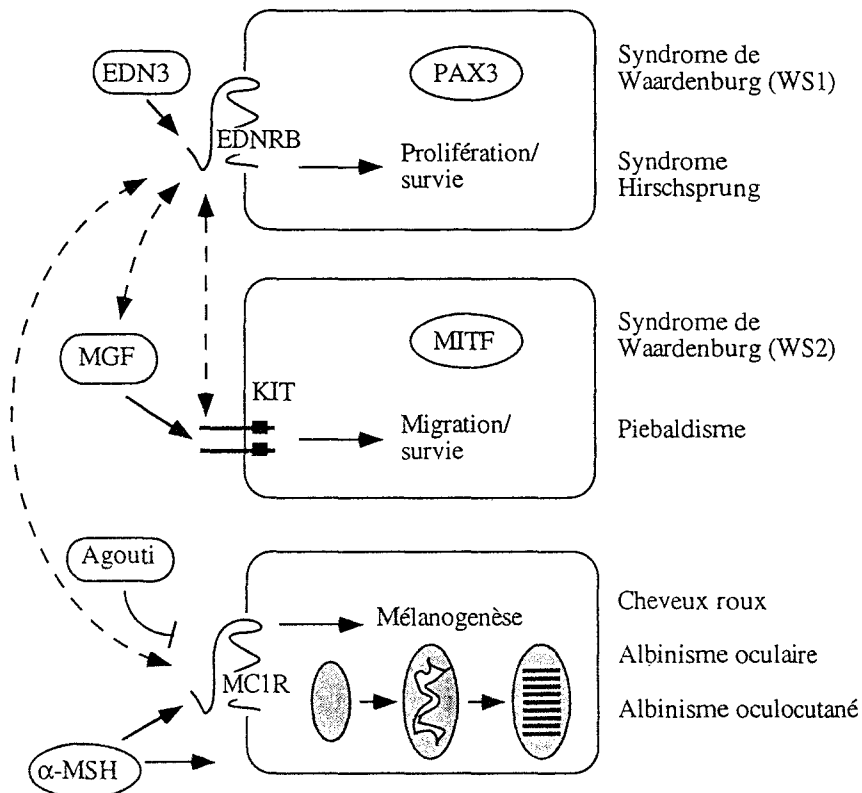


Figure 23: Action de quelques gènes situés en amont de la mélanogenèse (d'après Barsh, 1996).

V. MORPHOGENES DE LA NEURORETINE ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION

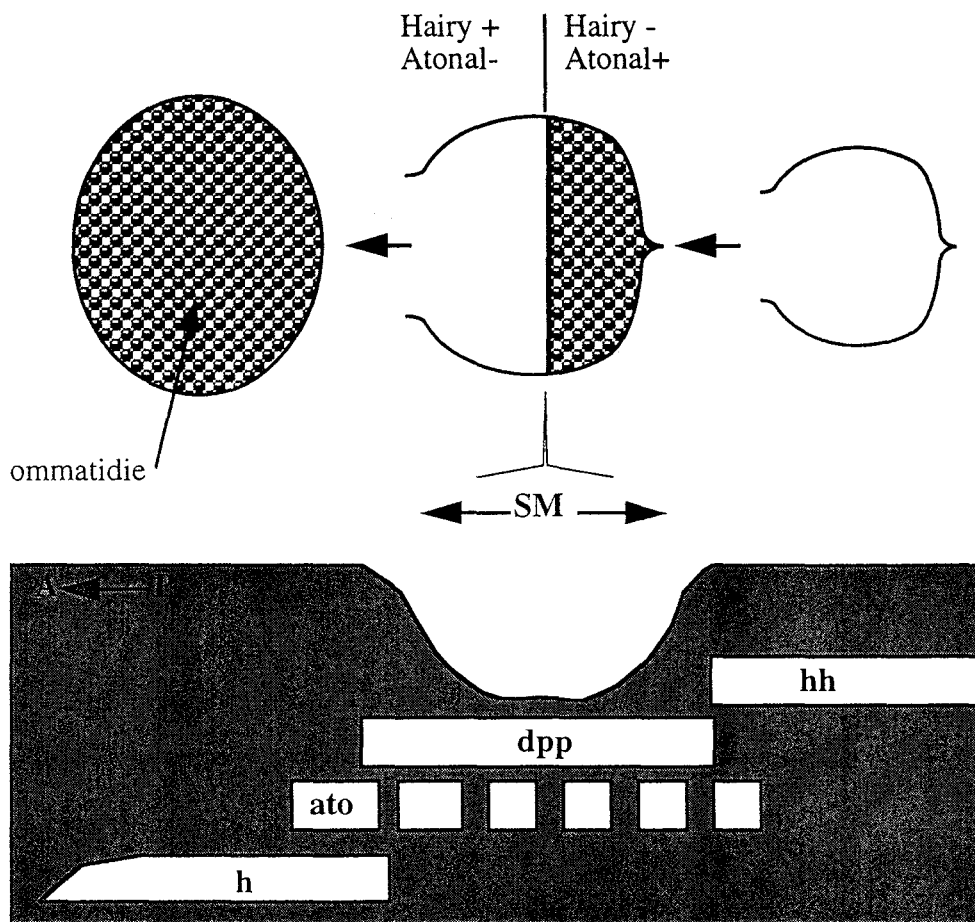
V.1. LA NEURORETINE: UNE EXTENSION DU SNC

Chez les Vertébrés, le SN est un des tissus les plus complexes par la diversité des phénotypes neuronaux. La NR, qui est une extension du SNC, en est la structure la mieux caractérisée (Dowling, 1987). Le nombre de types neuronaux est bien moindre et il sera plus facile de suivre leur différenciation. La morphologie et le développement de la NR sont très similaires chez tous les vertébrés. Ce tissu est très accessible et d'une structure relativement simple. Elle n'est reliée au reste du SNC que par le nerf optique. Elle peut ainsi facilement être prélevée et mise en culture soit sous forme d'explants soit après dissociation. On peut cultiver les cellules rétinienne en mono-couches ou en trois dimensions dans des gels de collagène. La rétine représente donc un système d'étude du SNC particulièrement attractif et très utilisé.

Le développement de la neurorétine (NR) nous intéresse particulièrement car ce tissu constitue la base du modèle cellulaire étudié dans le laboratoire. Là encore, un gène *pax* (*pax-6*) détermine le devenir d'un large territoire cellulaire dans lequel les gènes bHLH neurogéniques et proneuraux contrôleront la différenciation neuronale. La compréhension du développement de la rétine de vertébrés a été grandement facilitée par l'étude du développement de l'oeil de la Drosophile. La Drosophile représente un outil génétique puissant dont l'essentiel des mécanismes de base est retrouvé chez les Vertébrés. Pour s'en convaincre, il suffit de se rappeler l'essor que la génétique du développement a connu grâce à la découverte des gènes Hox.

V.2. MORPHOGENESE RETINIENNE CHEZ LA DROSOPHILE

Chez la Drosophile, l'oeil adulte est composé de 800 ommatidies identiques formées à partir de l'épithélium du disque imaginal « oeil/antenne » (Heberlein *et al.*, 1995a et b). Chaque ommatidie contient 8 cellules pigmentaires, 8 photorécepteurs neuronaux (R1 à R8), 4 cônes qui sont des cellules non neuronales et qui fabriquent le cristallin, et 1 soie mécanosensorielle. L'oeil de Drosophile, facile d'accès et non vital, est donc un agencement de sous-unités représentant un nombre limité de cellules. L'expression de *Eyeless* (*Ey*), l'homologue de *pax-6*, est essentielle à la survie des cellules épithéliales du disque imaginal. L'expression ectopique de *Ey* ou de *pax-6*



- La morphogenèse de la rétine démarre au troisième stade larvaire par le creusement d'un Sillon Morphogénétique (SM) qui progresse de l'extrémité postérieure vers l'extrémité antérieure.
- L'expression d'*atonal* (*ato*) s'étend sur une colonne continue de cellules proneurales en avant du SM.
L'expression d'*ato* se restreint à des groupes intermédiaires régulièrement espacés puis à une seule cellule au sein de chaque groupe.
- La morphogenèse requiert le gène *decapentaplegic* (*dpp*), qui code une molécule apparentée au TGF β , dont l'expression dépend de la protéine codée par le gène *hedgehog* (*hh*).

Figure 24: Eléments génétiques de la morphogenèse de l'oeil de *Drosophila*

(d'après Heberlein et Moses, 1995)

dans les cellules des disques imaginaux autres que « oeil/antenne » de *Drosophila* conduit à la formation d'yeux dans ces structures (Halder *et al.*, 1995; Deutsch *et al.*, 1995).

La mise en place de la neurogenèse rétinienne implique une expression séquentielle de facteurs de transcription de type bHLH (**Figure 24**). Les mêmes processus se déroulent au cours de la différenciation des neuroblastes à partir de l'ectoderme neurogénique procéphalique de la tête, puisque chez les Insectes, ne présentant pas de structures telles que le tube neural, le SN se forme ventralement par délamination du neurectoderme au cours de la gastrulation. La détermination des précurseurs dans ces deux cas repose d'une part sur une régionalisation de l'expression de gènes proneuraux et d'autre part sur des échanges de signaux d'inhibition de la différenciation.

Au cours de la formation des ommatidies, le récepteur R8 est le premier à se différencier. La restriction du potentiel des cellules à devenir R8 permet le futur arrangement des ommatidies, les R8 devant être en nombre correct et suffisamment espacés. Cette restriction est due à un signal inhibiteur produit par les cellules déterminées à devenir R8, impliquant les gènes *Notch* et *Delta*. *Notch* et *Delta* codent des protéines transmembranaires qui appartiennent à deux grandes familles de protéines conservées à travers le règne animal (**Figure 25**) (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995). *Notch* contient 36 répétitions du motif EGF. Le domaine cytoplasmique contient 6 répétitions ankyrine permettant des interactions protéiques.

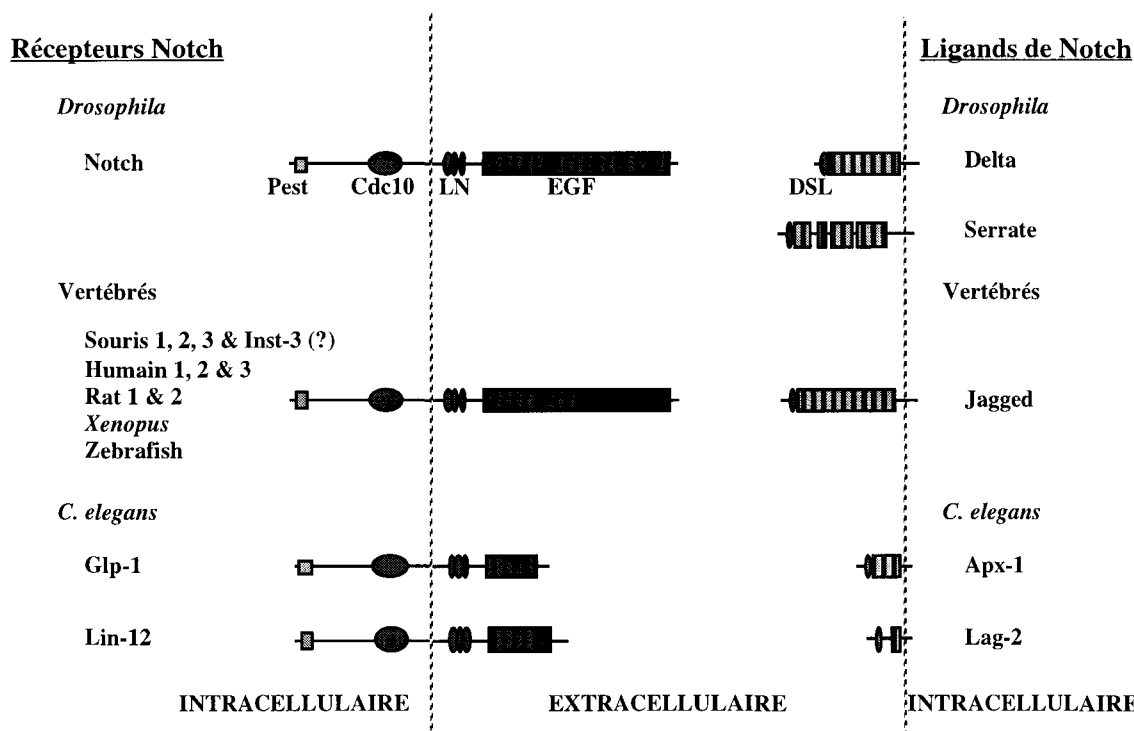


Figure 25: Conservation du récepteur Notch et de ses ligands à travers les espèces (d'après Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995).

Il est maintenant acquis que l'activité de Notch est impliquée dans deux types d'interactions cellulaires: la spécification latérale qui permet à une cellule de s'individualiser au sein d'un groupe par un processus d'inhibition latérale qui bloque les autres cellules et la signalisation inductive qui concerne des cellules non-équivalentes (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995). L'activité de Notch s'inscrit dans un schéma d'action de plusieurs facteurs de transcription de type bHLH.

En effet, différents gènes ont été montrés agir successivement au cours de la différenciation des précurseurs du SN et des organes des sens de la *Drosophila*. Ils ont été classés en 6 groupes (Jan et Jan, 1994).

- les gènes proneuraux, qui regroupent les gènes de la famille d'*Achaete-scute*, et *atonal*, et qui déterminent les cellules ectodermiques à devenir neuronales.
- les gènes neurogéniques, qui comprennent *Notch*, *Delta*, *Enhancer of split*, etc..., et qui isolent les précurseurs neuraux de leur environnement.
- les gènes des précurseurs neuraux qui comprennent *Prospero*, *deadpan*, *asense*, etc..., et qui contrôlent la différenciation neurale.
- les gènes sélectionnant le type neuronal qui comprennent *pox neuro*, *cut*, etc...

- les gènes du cycle cellulaire qui comprennent *string*, *cyclins*, etc... et qui définissent le patron de divisions à accomplir.
- les gènes qui contrôlent le destin de chaque cellule au sein d'un organe des sens, par exemple.

L'activation de *Notch* par interaction directe avec la protéine transmembranaire Delta qui lui sert de ligand et qui est présentée par la cellule qui va devenir R8, va permettre, par un mécanisme d'inhibition latérale, d'inhiber le devenir R8 des cellules adjacentes. La détermination de R8 est engagée grâce à l'activité d'un seul gène bHLH proneural de classe A, *atonal* (*ato*). L'expression d'*ato*, d'abord présente chez toute une population de cellules « proneurales » se restreint à des groupes de cellules puis au sein de chaque groupe à une seule cellule, le futur R8 (Lee *et al.*, 1996). Des mutations dans l'un ou l'autre des deux gènes *Notch* et *Delta* maintiennent l'expression d'*ato* dans toutes les cellules des groupes qui auraient dû évoluer en ommatidie et font apparaître des R8 supplémentaires (Baker et Zitron, 1995; Cagan et Ready, 1989; Lee *et al.*, 1996).

L'analyse fonctionnelle des différents domaines de Notch a suggéré que des molécules doivent interagir avec le domaine intracellulaire. Deux protéines ont été caractérisées comme pouvant se lier au motif ankyrine. Il s'agit d'une protéine cytoplasmique, Deltex (Matsuno *et al.*, 1995), et de Suppressor of *Hairless* (Su(H)) (Fortini *et al.*, 1994) qui est un facteur ubiquitaire présent à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme et qui agit comme médiateur transcriptionnel de l'activité de Notch en bloquant la neuralisation. Des mutations dans ce facteur provoquent un phénotype semblable à celui obtenu lorsque Notch est constitutivement activé (**ref**). Su(H) est un facteur de transcription capable de réguler plusieurs gènes du complexe *Enhancer of split* (E(spl)) lors de la neurogenèse. Ce complexe comprend 8 membres dont 7 sont des facteurs de transcription de type HLH de classe C (**Tableau 4**). L'activation des gènes du complexe E(spl), ainsi que l'action de Hairy, autre facteur de type bHLH de classe C, aboutit à la répression transcriptionnelle du gène proneural *ato*. D'une part en se liant directement aux facteurs codés par les gènes proneuraux pour les empêcher de se fixer à l'ADN, et d'autre part en interagissant avec le répresseur transcriptionnel *Groucho* (*gro*), de distribution ubiquitaire et dont les répétitions du motif WD40 autorisent les interactions protéiques (Tata et Hartley, 1993). Gro peut contacter les protéines Hairy (Paroush *et al.*, 1994) et agirait comme co-répresseur. Enfin

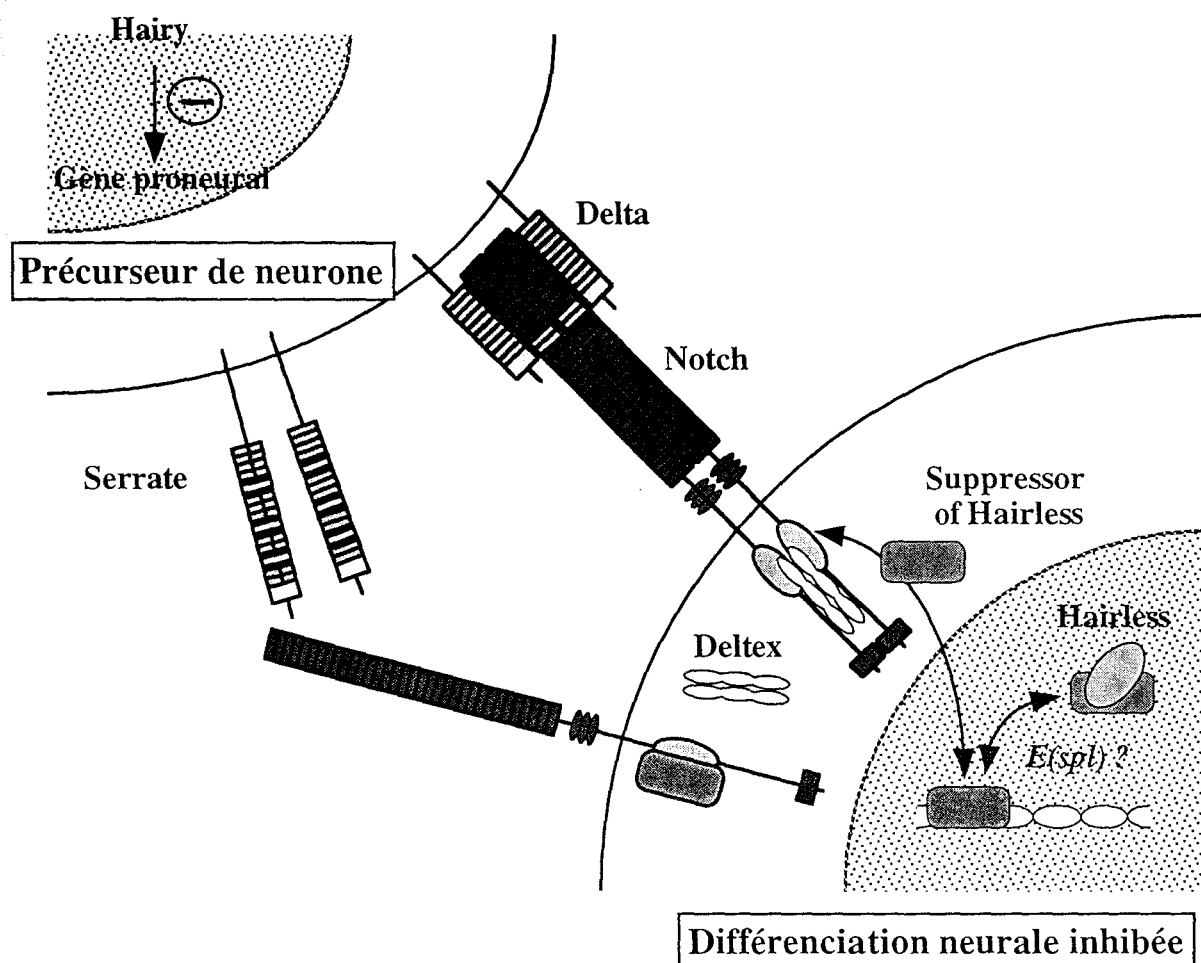


Figure 26: Mécanisme d'inhibition neurale par Notch
(d'après Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995)

Le mécanisme par lequel Notch activerait Su(H) est encore mal défini. Soit Su(H) serait retenu dans le cytoplasme par Notch et serait libéré pour transloquer dans le noyau par Notch après fixation sur celui-ci par Delta. Soit un fragment du domaine intracellulaire de Notch serait clivé et irait dans le noyau pour se fixer à Su(H) lui-même fixé à l'ADN, et pour agir comme co-activateur de la transcription.

Su(H) peut réguler la transcription des gènes de E(spl)-C (Tun *et al.*, 1994). Su(H) est lui-même la cible de la protéine Hairless qui interagit directement avec Su(H) pour inhiber sa capacité à se lier à l'ADN. *Hairless* se comporte donc comme un inhibiteur de la transduction du signal transmis par Notch (**Figure 26**). Cependant le mécanisme par lequel Notch activerait Su(H) est encore mal défini.

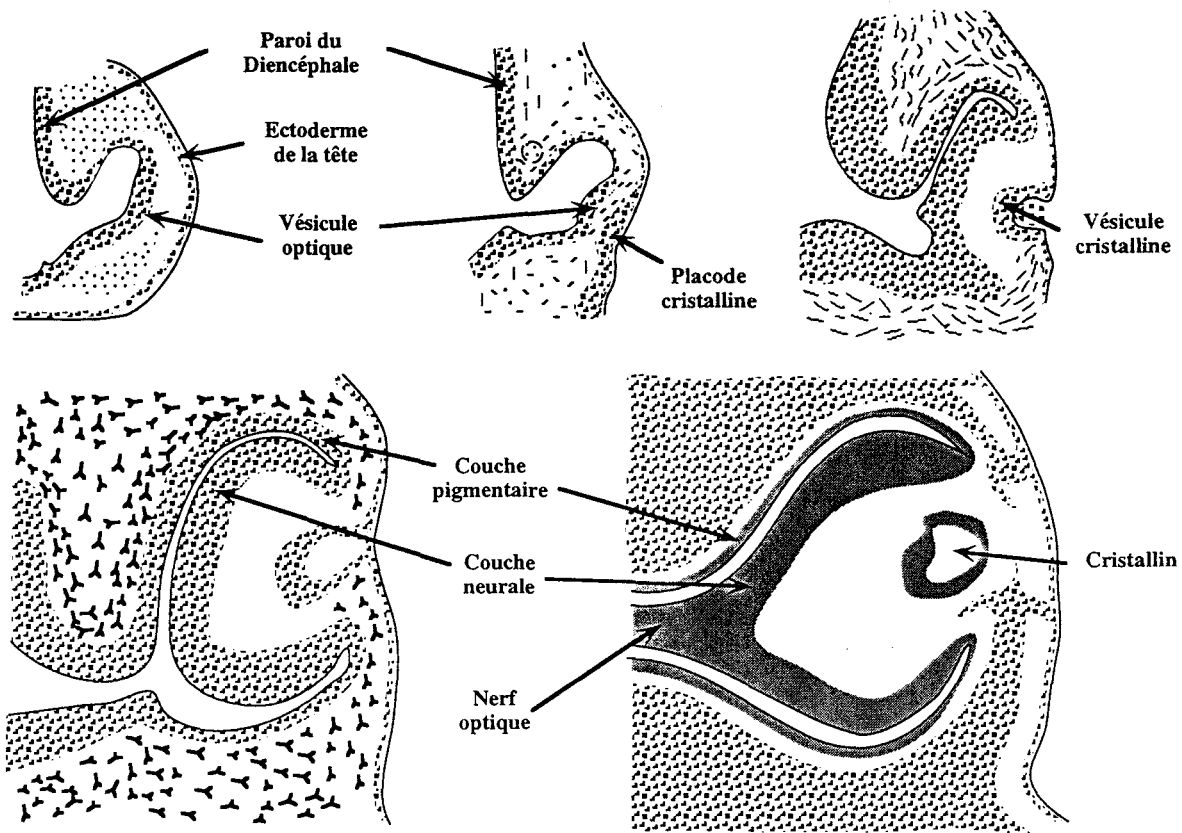
Les membres du complexe *Enhancer of Split* sont donc au centre de régulations positives et négatives, qui selon leur importance détermineront l'induction du phénotype neuronal ou non. Notch se situerait en amont de la cascade négative pour assurer par l'intermédiaire de l'activation de facteurs de type bHLH la restriction du champ de cellules compétentes et les compétences mêmes des cellules à répondre aux signaux inducteurs de la différenciation neurogénique.

Il est évidemment impossible de calquer la génétique de la genèse de l'oeil composé de la *Drosophile* sur celle de l'oeil des Vertébrés. Cependant, il semble que les mécanismes génétiques de base et leur régulation soient conservés ainsi que nous allons le voir.

V.3. LA NEURORETINE (NR) DE VERTEBRES

L'évolution de la neurorétine (NR) n'est généralement pas symétrique puisque la zone centrale évolue plus rapidement que la périphérie (Romanoff, 1960). La NR et la rétine pigmentaire (RPE) se développent à partir du diencephale qui a été déterminé à donner du tissu oculaire au moment de la gastrulation (**Figure 27**).

La neurorétine différenciée est organisée en couches cellulaires: des neurones et interneurones (photorécepteurs, cellules horizontales, bipolaires, amacrines et ganglionnaires), ainsi que des cellules gliales, les cellules de Müller, qui traversent toutes les couches. La couche la plus externe de la neurorétine, celle qui perçoit les stimuli lumineux, est composée de photorécepteurs: les cônes que l'on peut distinguer des bâtonnets par l'expression de la visinine, une molécule impliquée dans la transduction (Yamagata *et al.* 1990). La lumière est absorbée par les pigments présents dans les segments externes des photorécepteurs. Le récepteur (l'opsine) transduit le signal induit par la lumière grâce à la transducine qui est une protéine G. L'hydrolyse du GMPc qui en résulte provoque une hyperpolarisation membranaire; les stimuli lumineux sont transformés en stimuli électriques et transmis par voie nerveuse (pour revue Baylor, 1996). Les



L'oeil se développe à travers des dialogues entre tissus: neuroectoderme, ectoderme et mésenchyme (dérivé des CN) qui s'est interposé entre les deux précédents. Les cellules dérivées du neuroectoderme vont former la rétine, le nerf optique et la partie épithéliale de l'iris. L'ectoderme de surface donnera le cristallin et l'épithélium de la cornée et les cellules dérivées des CN, la sclérotique, le stroma de la cornée, la chambre antérieure et l'humeur vitrée.

Les deux évaginations latérales du diencéphale évoluent en deux cupules optiques diblastiques qui mettent en contact l'ectoderme de surface et le neuroépithélium diencéphalique. Des interactions entre ces deux tissus naît la placode cristalline qui s'invagine en vésicule cristalline. Tandis que la couche externe évolue en rétine pigmentaire, la couche neurale multicellulaire interne va fournir les différentes couches constitutives de la neurorétine.

Figure 27: Formation de l'oeil des Vertébrés

prolongements des photorécepteurs constituent la couche plexiforme externe et sont en contact synaptique avec deux types d'interneurones, les cellules bipolaires et les cellules horizontales. Les photorecepteurs transmettent à ces cellules l'influx nerveux. L'influx parvient ensuite aux cellules horizontales et amacrines qui sont dépourvues d'axones mais transmettent l'influx horizontalement par le biais de dendrites, et aux cellules bipolaires puis ganglionnaires. Les axones des cellules ganglionnaires, d'au moins 10 sortes chez les Mammifères (Wassle and Boycot, 1991), en se rassemblant forment le nerf optique qui achemine le signal hors de l'oeil vers le toit optique pour finir dans le cortex. Les cellules ganglionnaires sont séparées du reste de la rétine par la couche plexiforme interne qui est une zone de contact entre les prolongements des cellules ganglionnaires d'une part et de ceux des cellules amacrines et bipolaires d'autre part (Figure 28).

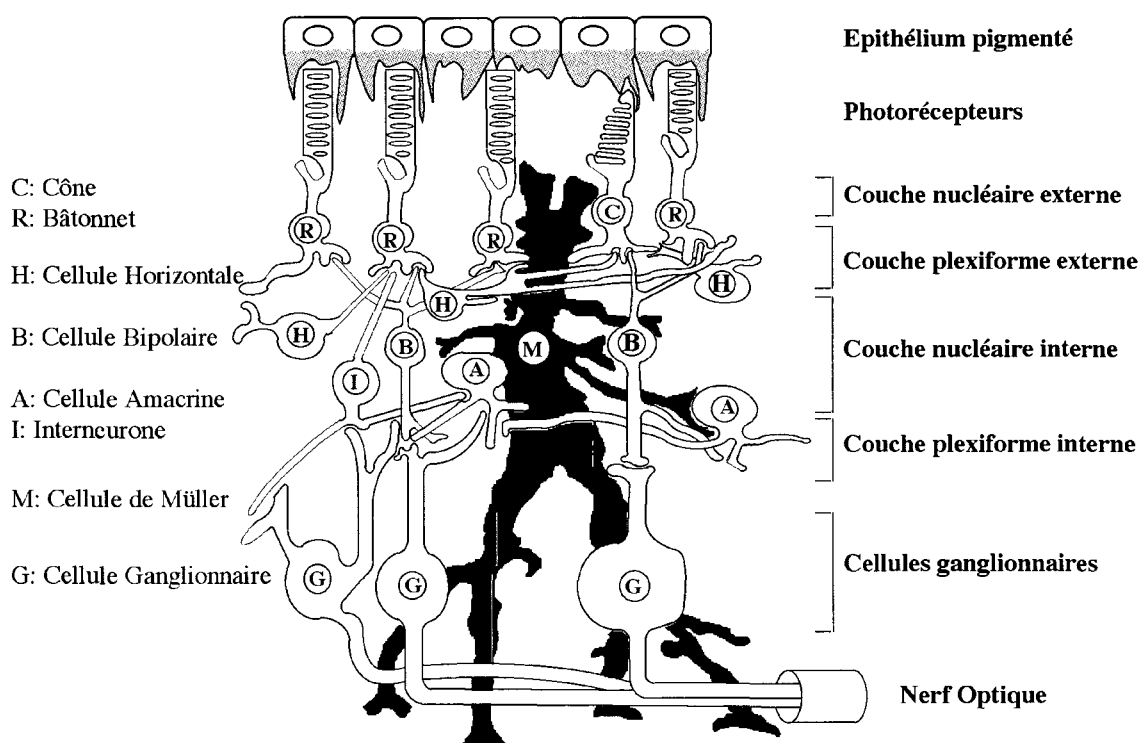


Figure 28: Structure de la rétine de Vertébrés

La NR n'est pas vascularisée chez l'Oiseau mais elle est pénétrée par le pecten richement vascularisé et projeté dans l'humeur vitrée (Romanoff, 1960; Meyer, 1977). Dès E7, la rétine de Caille est infiltrée par des macrophages qui empruntent la voie du pecten. Très vite leur nombre croît et ils migrent vers la périphérie de la rétine tangentiellement à la membrane limitante interne en utilisant les prolongements cytoplasmiques des cellules de Müller. Ils se répandent sur toute la surface. Dès E9 les macrophages changent de direction et colonisent la couche plexiforme interne puis la couche externe, couches dans lesquelles ils se différencient en cellules microgliales ramifiées (E12 pour la première et E14 pour la seconde). Cette stratégie d'utilisation des axones comme guides de migration macrocytaire est un phénomène présent dans d'autres parties du SNC comme le corps calleux, le cervelet (pour revue Navascues *et al.*, 1995).

Les variétés de neurones sont générées par migrations ordonnées de cellules post-mitotiques à partir d'une couche de neuroblastes en prolifération; ce phénomène est similaire avec celui qui assure les premières étapes de la formation du cortex cérébral. L'ordre d'apparition des types cellulaires de la rétine, déterminé par l'ordre de sortie des cellules du cycle cellulaire, est assez semblable chez les vertébrés mais présente des différences temporelles. Les cellules ganglionnaires sont presque toujours les premières à sortir du cycle et les précurseurs des cellules de Müller et des cellules gliales sont souvent les derniers à entrer en quiescence (Altshuler *et al.*, 1991).

La mise en place de l'architecture de la rétine implique essentiellement trois phases dont les transitions ne sont pas nettes:

- prolifération des précurseurs neuroectodermiques en bordure de la cupule optique de E2 à E8. A ce stade, les cellules ne sont pas réparties en couche. La première à s'individualiser est la couche des cellules ganglionnaires, qui vont cesser les premières de se diviser entre E3 et E5, suivies des cellules précurseurs des cônes et des bâtonnets, apparaît à E6 et est complètement séparée du reste de la rétine par la couche plexiforme interne à E9 (revue Adler 1993).

- migration où les différentes couches cellulaires apparaissent de E8 à E10 et parallèlement, les cellules horizontales et amacrines, suivies des cellules précurseurs des cellules de Müller, vont cesser chronologiquement de se diviser. A E10, la majorité des cellules de NR sont en phase post-mitotique.

- différenciation terminale des cellules postmitotiques de E10 à l'éclosion (à E21) avec formation des synapses et des segments internes puis externes des photorécepteurs qui présentent une morphologie totalement différenciée à E15. Les dernières cellules à se diviser sont les cellules de Müller et les photorécepteurs (**Figure 29**).

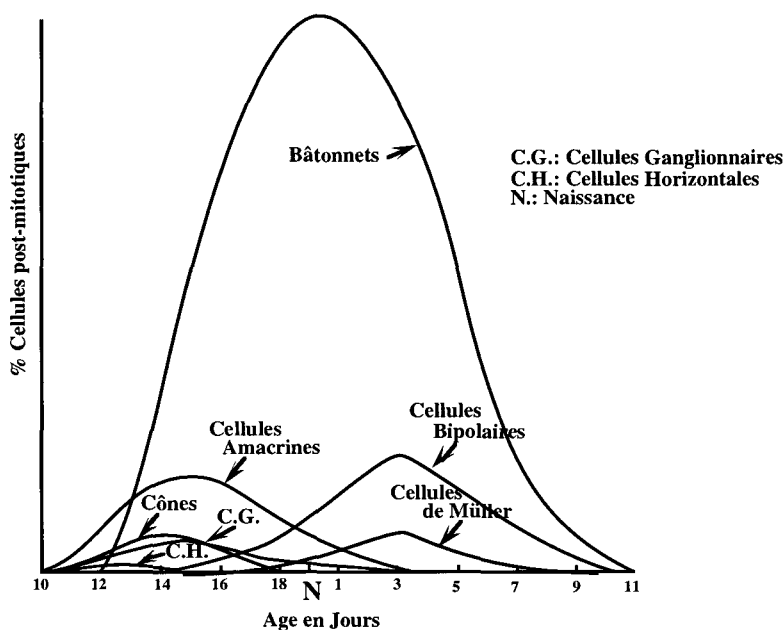


Figure 29: Ordre d'apparition des cellules de la rétine de Souris (d'après Cepko *et al.*, 1996)

Pour assurer son développement la rétine doit donc produire en proportions correctes les différents types cellulaires qui doivent migrer vers la couche cellulaire appropriée pour s'y différencier et établir des connexions synaptiques, tâche assurée par les cellules neuroépithéliales qui forment la couche de la zone ventriculaire de la rétine. Le contrôle de la prolifération cellulaire met en jeu des familles de protéines nucléaires, dont les cyclines associées à des kinases qui leur sont spécifiques. Chez les Mammifères, ce contrôle a essentiellement lieu durant la phase G1 du cycle. Actuellement 4 cyclines de la phase G1 sont connues: D1, D2, D3 et E avec induction précoce des cyclines de type D sous l'effet de mitogènes (voir revue Sherr, 1994). La cycline D1, qui a été clonée en tant qu'oncogène, fut soupçonnée d'avoir un rôle prépondérant dans la progression des cellules à partir de la phase G1. Pourtant dans l'embryon de

Souris, seuls deux tissus parmi tous ceux en pleine phase proliférative, expriment un taux d'ARNm très élevé: le cerveau et la rétine, dont le développement est affecté après inactivation du gène codant D1 grâce à la recombinaison homologue (Fantl *et al.*, 1995; Sicinski *et al.*, 1995). Le nombre de cellules de chaque couche est excessivement diminué. Les électrorétinographies montrent que les rétines des animaux mutants sont fonctionnelles. La suppression de l'expression de la cycline D1 diminue de façon drastique les capacités prolifératives des précurseurs de la rétine sans attenter à leur totipotence. En effet tant que les précurseurs prolifèrent ils conservent leurs capacités à fournir les types cellulaires de la rétine. Ce sont des cellules post-mitotiques, ou dans leur dernier cycle qui s'engagent sur la voie de différenciation d'un type neuronal (Cepko *et al.*, 1996).

Il semble intéressant de rappeler que la vésicule optique exprime *c-myc*. Dans la zone centrale de la rétine, qui évolue plus rapidement que la périphérie, l'expression de *c-myc* se restreint et devient beaucoup plus intense au niveau de la couche ganglionnaire alors que la zone périphérique continue d'exprimer *c-myc* de manière homogène. A partir de E11 la future couche nucléaire interne commence à exprimer *c-myc* (Jaffredo *et al.*, 1989). La protéine c-Myc est généralement un partenaire essentiel dans les processus de contrôle de la prolifération cellulaire et c-Myc serait capable de réprimer l'expression de la cycline D1, sans nécessiter une dimérisation avec Max (Philipp *et al.*, 1994).

Ce qui détermine les types cellulaires de la rétine reste encore largement inconnu, bien que l'on sache que le microenvironnement et les interactions cellulaires jouent un rôle dans la détermination des précurseurs. Plusieurs facteurs, dont l'expression est régulée au cours du temps, semblent plus liés aux phases tardives de développement de la rétine. Le facteur de croissance aFGF est important pour la détermination du destin des cellules et la détermination/différenciation des cellules ganglionnaires (Guillemot 1992). Un facteur de la famille des TGF β , le BMP7 (**B**one **M**orphogenetic **P**rotein 7) apparenté au produit decapentaplegic (*dpp*) de *Drosophila* est également essentiel pour la différenciation de la rétine, dans la mesure où l'annulation de ce gène par la technique de recombinaison homologue conduit à la naissance de Souris anophtalmiques (Dadley *et al.*, 1995).

A l'heure actuelle, chez les Mammifères, on a identifié une quarantaine de gènes codant des facteurs de transcription s'exprimant dans l'oeil. Cependant parmi ces facteurs seuls 14 gènes répartis sur 6 classes ont été décrits comme nécessaires au développement de l'oeil. (**Tableau 5**). Mais il ne faut pas oublier que la rétine est une évagination du cerveau antérieur, ce qui suppose que les gènes s'exprimant dans le cerveau antérieur sont également impliqués dans la formation de l'oeil. Ainsi, de nombreux gènes codant des protéines à homéodomaine de *Drosophile*, exprimés dans la partie rostrale, possèdent leurs homologues chez les Vertébrés, ces derniers s'exprimant également dans le cerveau antérieur: *Dlx* (homologue de *distal-less*), *Emx* (homologue de *empty-spiracle*) et *Otx* (homologue *ortho-denticle*). On retrouve également l'expression de plusieurs gènes de la classe POU, tels que *Pit-1*, *Oct-1*, *Oct-2* et les gènes de type *Brn*. Plusieurs de ces gènes seront par la suite exprimés dans l'oeil (**Tableau 5**).

Tout en amont de la chaîne d'expression des facteurs nécessaires au développement de l'oeil de Vertébrés, on retrouve l'expression des gènes *pax*, avec, cette fois deux membres impliqués et nécessaires au développement, *pax-2* et *pax-6*, ainsi que l'attestent les nombreuses anomalies liées à des mutations affectant ces gènes (**Tableau 6**).

<i>Pax6</i>	<p><u>Homme</u> : phénotype variable, incluant l'aniridie et d'autres défauts de la partie antérieure de l'oeil, dont des cataractes et des anomalies de la cornée. Hypoplasie du corps ciliaire et de la fovée.</p> <p><u>Rat, souris</u> : animaux « Small Eye » (Sey). Mutation semidominante présentant plusieurs allèles. Les hétérozygotes ont de petits yeux, les homozygotes sont dépourvus d'yeux et de structures nasales.</p>
<i>Pax2</i>	<p><u>Homme</u> : colobome et anomalies rénales.</p> <p><u>Souris</u> : animaux « Kidney, Retinal Defects » (Krd). Rétine mince, nombre réduit de cellules rétiniennes, dysfonction des photorécepteurs et des cellules bipolaires.</p>
<i>Chx10</i>	<p><u>Souris</u> : animaux « Ocular Retardation » (or). L'allèle or' cause microphthalmie, aplasie du nerf optique, rétine mince avec peu de cellules, et manque de cellules bipolaires différenciées.</p>
<i>Pou4f2</i>	<p><u>Souris</u> : réduction de 70% du nombre de cellules ganglionnaires, petit nerf optique, couches nucléaires interne et externe amincies.</p>
<i>Hes1</i>	<p><u>Souris</u> : taille de la rétine diminuée, accroissement de la mort des cellules bipolaires, augmentation du nombre de bâtonnets et de cellules amacrines et différenciation prémature de la rétine, défauts du cristallin et de la cornée.</p>
<i>mi</i>	<p><u>Souris</u> : microphthalmie, dégénérescence rétinienne, colobome et sous-pigmentation de la couche pigmentaire.</p>
<i>Rxr</i> α, β, γ <i>Rar</i> α, β, γ	<p><u>Souris</u> : Rar α : anomalies de la partie ventrale de l'oeil (petite rétine, chambre antérieure réduite ou absente, colobome du nerf optique). Combinaison Rar α, β, γ et Rxr β : défauts des paupières, de la cornée, de la conjonctive ou de la chambre antérieure; défauts du cristallin : fibres cristallines anormales, membrane rétrolenticulaire, rotation ventrale; défauts de la rétine : réduction de la partie ventrale, dysplasie rétinienne, colobome; colobome du nerf optique.</p>
<i>Gli3</i>	<p><u>Souris</u> : animaux « Extra Toes » (Xi). Défauts légers de l'oeil.</p>
<i>Hfhbf1</i>	<p><u>Souris</u> : oeil ellipsoïde orienté ventralement, défauts de la rétine nasale qui présente une surface neuroépithéliale irrégulière.</p>

Tableau 5: Facteurs de transcription impliqués dans le développement de l'oeil

Gene	Espèces	Mutation	Phénotype	Références
<i>pax-6</i>	<i>Drosophile</i>	eyeless (<i>ey</i> ² , <i>ey</i> ^R)	Yeux réduits ou absents	Quiring <i>et al.</i> , 1994
	Souris	Small eye (<i>Sey</i>)	Hétérozygotes : yeux réduits, hypoplasie de l'iris, formation d'une cataracte, vacuolarisation du cristallin et dislocation	Fujiwara <i>et al.</i> , 1994 Hogan <i>et al.</i> , 1988 Glaser <i>et al.</i> , 1990 Hill <i>et al.</i> , 1991
	Rat	Rat small eye (<i>rSey</i>)	Homozygotes : aux premiers stades formation de la vésicule optique mais pas du cristallin ; aux stades tardifs pas de développement de l'oeil ou du nez ; migration altérée des cellules de crête neurale vers les régions faciales (Rat).	Grindley <i>et al.</i> , 1995 Matsuo <i>et al.</i> , 1993
	Homme	Aniridia	Hétérozygotes : hypoplasie de l'iris, formation d'une cataracte, vascularisation de la cornée, glaucome. Homozygotes/ hétérozygotes : pas d'yeux, léthal.	Glaser <i>et al.</i> , 1995 Fantes <i>et al.</i> , 1995 Jordan <i>et al.</i> , 1992 Ton <i>et al.</i> , 1991 Glaser <i>et al.</i> , 1992 Glaser <i>et al.</i> , 1994
		Anomalie de Peter	Défauts de la cornée et de la chambre intérieure.	Hanson <i>et al.</i> , 1994
		Mutation d'épissage alternatif	Défauts de la cornée, cataractes, glaucome, vision réduite, mais iris intacts et <i>fovea</i> normale.	Epstein <i>et al.</i> , 1994
	Keratitis autosomale dominante	Opacification de la cornée, et défauts de vascularisation du stomate de l'iris, hypoplasie de la <i>fovea</i> .	Mirzayans <i>et al.</i> , 1994	
<i>pax-2</i>	Souris	Défauts rénaux et rétiniens (<i>Krd</i>) ^b	Colobome du nerf optique, défauts rétiniens.	Keller <i>et al.</i> , 1994
		Mutant Null	Homozygotes : colobome du nerf optique.	Torres <i>et al.</i> , 1995
	Homme		Hétérozygotes : colobome du nerf optique.	Sanyanusin <i>et al.</i> , 1995

Tableau 6 : Défauts dans le développement des yeux causés par des mutations dans les gènes *Pax* (d'après Macdonald and Wilson, 1996).

V.3.1. PROTEINES PAX

pax-6 s'exprime dans une large portion de la plaque neurale antérieure dont toutes les cellules vont contribuer à la formation des vésicules optiques (Walther et Gruss, 1991), ce qui laisse présager pour *pax-6* un rôle dans la détermination d'un champ de cellules rendues compétentes pour la formation des yeux. Si *pax-6* n'est pas requis pour la phase d'évagination des vésicules optiques, puisque cette phase se déroule chez les Souris *Sey*, ce gène l'est pour la suite du développement de l'oeil. Les vésicules optiques des Souris *Sey* n'évoluent pas et dégénèrent. *pax-6* assurerait le maintien des cellules en phase proliférative, ce qui est cohérent avec le fait que dans le SNC son expression est détectée dans des neurones mitotiques (Walther et Gruss, 1991) et que les yeux des Souris hétérozygotes *Sey* sont de petite taille (Hogan *et al.*, 1988). L'obtention d'yeux avec l'expression ectopique de *pax-6* et de *Eye* dans les disques imaginaux de *Drosophila* programmés initialement à former des membres, des ailes ou des antennes suggère plus que fortement que *pax-6* est capable de déterminer l'identité des cellules rétiniennes. La découverte de *pax-6* a donc montré que les bases génétiques de la formation de l'oeil sont conservées dans le règne animal mais que chez les Vertébrés *pax-6*, seul, n'est pas suffisant pour programmer toute la cascade d'événements qui conduit à la formation d'un oeil complet. *pax-6* s'exprime dans d'autres territoires du SNC qui n'évoluent pas en oeil!

pax-2 s'exprime de façon plus restreinte que *pax-6*, dans les cellules des vésicules optiques qui formeront le pédoncule optique et les bordures de la vésicule ventrale de part et d'autre de la fissure choroïdienne (Nornes *et al.*, 1990). Les phénotypes des mutants dans *pax-2* présentant des défauts de fermeture de cette fissure montrent bien que *pax-2* est requis pour la fermeture mais pas pour la formation du pédoncule optique.

Enfin, la répartition des territoires d'expression de *pax-6* et *pax-2* est au moins régulée par des molécules sécrétées appartenant à la famille de Hedgehog (HH), Sonic Hedgehog (SHH) et Tigglywinkle hedgehog (TWHH). SHH et TWHH induisent l'expression de *pax-2* et répriment celle de *pax-6* (Ekker *et al.*, 1995).

V.3.2. PROTEINES CHX10

Chx10 s'exprime dans la vésicule optique dans les cellules qui formeront la NR, puis dans les précurseurs rétiniens de la couche interne. Avec la différenciation de la NR, son expression ne se restreint que dans cette couche, essentiellement dans les cellules bipolaires. L'extinction de l'expression de *Chx10* semble concomitante à la formation des couches des photorecepteurs et des cellules ganglionnaires. Ce gène interviendrait donc à 3 niveaux: dans les précurseurs indifférenciés, durant la différenciation et, dans la rétine mature, au niveau des cellules bipolaires. Les animaux mutés dans ce gène présentent une réduction du nombre de précurseurs proliférants et une absence des cellules bipolaires, probablement imputable à une mauvaise détermination de ces cellules plutôt qu'à une différenciation défectueuse puisque les cellules de Müller, qui apparaissent en même temps sont présentes chez les animaux mutés (Burmeister *et al.*, 1996).

V.3.3. PROTEINES A HOMEODOMAINE DE TYPE POU

En particulier, les trois membres *Brn-3a*, *Brn-3b* et *Brn-3c* (nommés aussi *Brn-3.1*, *Brn-3.2* et *Brn-3.3*, ou encore *Pou4f1*, *Pou4f2* et *Pou4f3*) de la classe IV (Wegner *et al.*, 1993), ont des domaines d'expression dans le SN (rétine comprise) qui se recouvrent mais qui concernent aussi des populations neuronales distinctes, pour la différenciation desquelles ils jouent un rôle primordial. Cette classe se distingue par ailleurs par l'existence d'un petit domaine de 25 acides aminés de fonction inconnue. *Brn-3a* et *Brn-3b* sont exprimés dans les cellules ganglionnaires de la rétine au moment où ces neurones commencent à se différencier, avant l'établissement des connections rétino-tectales, *Brn-3a* apparaissant après *Brn-3b*. *Brn-3a* est fortement exprimé dans la couche ganglionnaire de la rétine mature (Gerrero *et al.*, 1993; Xiang *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 1994). Les Souris homozygotes mutées dans *Brn-3b*, présentent une réduction importante du nombre de cellules de la couche ganglionnaire, ce qui entraîne une réduction, plus faible, du nombre des cellules de la couche nucléaire et du nombre d'axones dans le nerf optique (Gan *et al.*, 1996). *Brn-3b* semble donc nécessaire à la différenciation d'une sous-population de cellules de la couche ganglionnaire de la rétine. L'expression de *Brn-3a* est détectable dans quelques cellules ganglionnaires de ces Souris et reste inchangée ailleurs, ce qui suggère que *Brn-3b* ne

régule probablement pas *Brn-3.a* directement dans les cellules ganglionnaires et ce qui confirme que comme pour le SNC, *Brn-3a* et *Brn-3b* s'expriment aussi dans des cellules distinctes (Erkman *et al.*, 1996). Quant au 3^{ième} membre, *Brn-3c*, il a un territoire d'expression supplémentaire, dans l'oreille interne. Les Souris homozygotes mutées dans *Brn-3c* sont sourdes. Leur surdité provient de défauts dans les « hair cells », ce qui affecte le développement de l'organe de Corti en contact étroit avec ces cellules (Erkman *et al.*, 1996). Ce qui distingue les membres de la sous-famille *Brn-3*, ce sont les orientations opposées des deux consensus de fixation à l'ADN POU_S et POU_{HD}, strictement espacés de 3 pb, par rapport aux sites de reconnaissance de Pit-1 et Oct-1 (Li *et al.*, 1993).

V.3.4. PROTEINES DE TYPE « BOUCLE AILEE »

Deux membres de cette famille sont exprimés dans la rétine. *Hfhubf1* s'exprime spécifiquement dans la portion nasale du pédoncule optique et de la NR tandis que *Hfhubf2* s'exprime dans la portion temporale. Le premier est clairement important pour le développement de l'oeil car les Souris porteuses de mutations dans ce gène présentent des yeux ellipsoïdes orientés ventralement et une surface neuro pith liale de la rétine ventrale irrégulière (Xuan *et al.*, 1995).

V.3.5. PROTEINES DE TYPE ZINC FINGER

1. protéines Gli

Les 3 gènes *Gli1*, *Gli2* et *Gli3* identifiés chez la Souris s'expriment dans la vésicule optique. Puis *Gli1* se restreint au pédoncule optique et la NR, *Gli2* et *Gli3* se restreignent au pédoncule optique et au cristallin (Hui *et al.*, 1994).

2. récepteurs aux acides r tino iques

Les recombinaisons homologues ont été réalisées avec 5 membres de la famille des récepteurs nucléaires: *RAR α* , *β* et *γ* et *RXR α* et *β* , mais pas avec *RXR γ* , qu'il serait intéressant d'étudier au niveau du développement de l'oeil puisqu'il s'exprime dans la NR. *RXR α*  tant le seul membre à s'exprimer dans tous les types cellulaires de l'oeil (revue dans Means et Gudas, 1995), seules les Souris mutées dans *RXR α* présentent des défauts du développement de l'oeil, à

savoir, une réduction de taille de la portion ventrale de la rétine (Kastner *et al.*, 1994). Le même type de défaut a été décrit dans le cas des Drosophiles mutées au niveau de *ultraspiracle (usp)*, l'équivalent des *RXR* Mammifères (Oro *et al.*, 1992). Ces défauts rétiens, dus à une diminution de prolifération des cellules durant le développement de la NR et à une augmentation du taux d'apoptose, ces défauts sont aggravés dans les Souris recombinaisons doublement pour *RARβ2γ2* (Grondona *et al.*, 1996).

V.3.6. PROTEINES DE TYPE BHLH

1. protéines de type bHLHLZ: facteur MTF/Mi

Mi s'exprime dans la RPE mais pas dans la NR. Cependant les Souris *microphthalmia* mutées dans *mi* présentent une dégénérescence rétinienne (Moore, 1995), probablement par rupture de l'influence trophique que la RPE exerce sur la NR.

2. protéines de type bHLH

Nous avons déjà évoqué l'importance des facteurs de transcription de type bHLH au cours de la morphogénèse rétinienne chez la Drosophile. Ces différentes protéines bHLH de Drosophile, ainsi que d'autres types de facteurs de transcription nécessaires au développement de l'oeil, possèdent des homologues chez les Vertébrés (**Tableau 7**).

Les gènes de la famille *Hes* ont été clonés chez les Mammifères sur la base d'homologies avec les gènes de Drosophile *hairy (h)* et *E(spl)* (114). Comme ses homologues drosophiliens, le gène *Hes1* agit comme inhibiteur de la neurogenèse dans la NR (Tomita *et al.*, 1996). Les Souris mutées dans *Hes1* meurent, certainement à cause de défauts dans le tube neural. Leurs yeux sont anormaux. Les précurseurs se différencient prématurément en cellules ganglionnaires (les premières à apparaître en temps normal) et expriment des marqueurs neuronaux plus précocément que ceux des rétines normales. Les cultures réalisées à partir des rétines des Souris

Gènes de Drosophile	Homologues Mammifères	Autres espèces
eyeless (ey)	Humain: PAX6 Souris Pax-6	Poulet: Pax-6 Caille: Pax-QNR Zebrafish: zf6
cubitus interruptus (ci)	Humain: GLI,2, 3 Souris: Gli,2, 3	
enhancer of split (E(spl)), hairy (h)	Humain HRY Souris et Rat: Hes1, 5	Xenope ESR1, 3
sine oculis (so)	Souris: Six3	
achaete scute complex (AS-C)	Souris et Rat: Mash1	Chicken: CASH-1
atonal (ato)	Souris: Math1	Xenope: ASH3a, b
seven-up (svp)	Humain: TFCOUP1, 2 Souris: Aporp1, Earb2, 3	Poulet: COUP-TF Zebrafish: svp
orthodenticle (otd)	Souris: Otx1, 2	
ultraspiracle (usp)	Humain Rar Souris: Rxr	Poulet: Rxr
prospero (pro)	Souris: Prox1	

Tableau 7: Facteurs de transcription de Drosophile impliqués dans le développement de l'oeil et homologues chez les Vertébrés.

mutantes montrent aussi le rôle de *Hes* dans la différenciation et la survie d'autres types neuronaux de la rétine. Ces résultats suggèrent donc que les mécanismes d'inhibition neuronale sont conservés entre la Drosophile et les Vertébrés. D'autant plus que chez le Poulet, *Notch* est exprimé dans les cellules ganglionnaires et est capable d'inhiber la différenciation de ces cellules en culture lorsqu'il est activé. Chez les Mammifères ont été clonés trois gènes apparentés à *Notch*. Les territoires d'expression chez la Souris suggèrent une implication de *Notch* dans la formation du SN, du mésoderme et des somites dont il coordonnerait la segmentation (Conlon *et al.*, 1995).

On peut également noter que les facteurs de type bHLH impliqués dans la myogenèse et dans la neurogenèse peuvent avoir des cofacteurs communs. *MEF2*, qui s'exprime dans le cerveau (Lyons, G.E., 1995) peut interagir avec la région basique de MASH1 (gène proneural de classe A équivalent Vertébré des gènes AS-C de Drosophile) (**Tableau 4**), comme avec MyoD lors de la différenciation myogénique (Molkentin et Olson, 1996).

VI. PETIT RETOUR A LA TRANSDIFFERENCIATION

VI.1. LA RETINE PIGMENTAIRE

De même origine embryologique que la NR (Jacobson et Sater, 1988), la structure de la RPE apparaît plus simple que celle de la NR. Il s'agit en effet d'une monocouche de cellules très jointives de type épithélial. Le développement de la plupart des types cellulaires dépend pour une grande part de l'environnement. La RPE, qui jouxte la NR, exerce un contrôle sur la différenciation des photorécepteurs (Hollyfied et Witkowsky, 1974), sur la stratification de la NR (Vollmer et Layers, 1986) et sur le maintien de l'intégrité de la NR (Raymond et Jackson, 1995). Cette action constante sur la vie de la NR s'exerce par le biais de la sécrétion de facteurs paracrines (Steele *et al.*, 1992). Des facteurs comme l'insuline-like growth factor-I (IGF-1) dont les messagers sont présents dans la RPE et les produits détectés dans la NR (Lee *et al.*, 1992; De la Rosa *et al.*, 1994b) ainsi que leurs récepteurs (Waldbillig *et al.*, 1991) peuvent agir sur la différenciation neuronale de la NR. IGF-1 favorise la réponse de la NR à l'induction neuronale par la laminine-1 (De la Rosa *et al.*, 1994a) en augmentant le nombre de récepteurs (sous-unité

α -6 de l'intégrine) à cette molécule de la matrice extracellulaire (Frade *et al.*, 1996). Ce rôle trophique de la RPE vis-à-vis de la neurorétine pourrait expliquer les défauts affectant cette dernière en cas de dysfonctionnement de la RPE.

Ce tissu est également capable de participer à la régénération de la NR et du cristallin. La différenciation de la RPE, qui marque la disparition des cellules prolifératives, est accomplie au bout de 14 jours de développement. La RPE présente une remarquable plasticité dans les stades initiaux du développement avec possibilité de se transdifférencier en NR. Avec la maturation, cette plasticité est perdue chez les Oiseaux et chez les Mammifères. Toutefois elle persiste chez l'adulte de certaines espèces d'Urodèles (Yasuda *et al.*, 1991).

VI.2. TRANSDIFFERENCIATION DE LA RPE EN NR

La régénération de la NR à partir de la RPE a l'avantage d'ouvrir des perspectives d'études de différenciation neuronale. La capacité de la RPE à former de la NR, associée ou non à une régénération neurorétinienne semble exister chez tous les Vertébrés, surtout lors des premiers stades du développement. La formation de l'iris ou de la NR à partir de la RPE implique une phase de dédifférenciation de cette dernière. Elle est marquée par l'extinction de l'expression des gènes *MMP115* et *pP344* codant des protéines de la matrice mélanosomale, et par leur réapparition avec la repigmentation de ces cellules (Mochii *et al.*, 1988a,b). L'expression du proto-oncogène *c-myc* décline également au moment de la dédifférenciation des cellules de la RPE (Eguchi, 1993). Puis les cellules dépigmentées entrent en phase proliférative afin de constituer une couche de cellules neuroépithéliales qui pourront se différencier en une structure neurorétinienne stratifiée et des photorécepteurs. La régénération de NR par transdifférenciation de la RPE, capacité décroissant avec l'âge de l'embryon, a été montrée *in vivo* chez le Poulet (Coulombre et Coulombre, 1965; Coulombre 1970), et *in vitro* chez les têtards de Grenouille (Reh *et al.*, 1987) et chez le Poulet en cultivant des morceaux de RPE où apparaissent des caractéristiques de NR (arrangement cellulaire mais inversé, présences de cellules de Müller et de photorécepteurs,...) (Tsunematu et Coulombre, 1981). Les cultures sont capables de s'enrichir en corps lenticulaires. Cependant il semble que le choix entre transdifférenciation en NR ou en corps lenticulaires dépende de la composition des milieux de culture.

VI.3. TRANSDIFFERENCIATION DE LA NR

La transdifférenciation de la NR ne semble pas être un événement utile à la régénération de tissus oculaires *in vivo*. Pourtant les cellules de NR de nombreuses espèces de Vertébrés dissociées en culture peuvent se différencier en cellules lenticulaires et en cellules de RPE. Lorsque l'on dissocie des cellules de NR d'embryons de Poulet à E8-E9, on observe un tapis de cellules épithéliales recouvertes d'agrégats de cellules rondes connectées entre elles par ce qui ressemble à des axones, ces cellules correspondant certainement aux cellules neuronales de la NR (Combes *et al.*, 1977). Au cours des passages, ces cellules neuronales disparaissent, et parallèlement décroît l'expression de plusieurs marqueurs neuronaux tels que les enzymes sécrétant des neurotransmetteurs (choline acétyltransférase, acide glutamique décarboxylase, ...) et les récepteurs correspondants. Puis de petites cellules épithéliales apparaissent secondairement. C'est au sein de cette population que l'on peut observer le processus de pigmentation et la formation de corps lenticulaires. La formation des corps lenticulaires est accompagnée d'une accumulation de cristallines de type δ , qui est la forme lenticulaire préférentielle chez le Poulet, mais aussi de type α et β . Cependant, les expériences de cultures clonales des cellules du neuroépithélium de l'embryon de Poulet à E3,5 ont montré la présence de cellules multipotentes. Trois types de colonies sont obtenues: des colonies avec des corps lenticulaires, des colonies avec des cellules pigmentées et des colonies avec les deux types cellulaires (Okada *et al.*, 1979).

VII. PRESENTATION DE NOTRE MODELE ET RESULTATS

VII.1. NOTRE MODELE

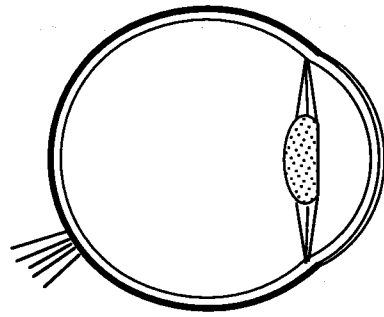
La thématique de notre groupe est centrée sur la compréhension des mécanismes contrôlant la différenciation cellulaire. Le modèle que nous avons choisi concerne les termes de passage entre la RPE et la NR. La NR aviaire offre des avantages nombreux pour l'étude moléculaire des processus de différenciation/prolifération. Tout d'abord le système aviaire est accessible expérimentalement à tous les stades de développement contrairement au système murin. Ensuite, la NR en culture donne naissance par différenciation à plusieurs types cellulaires

(neurones et cellules gliales). Les cellules de NR sont capables de poursuivre leur différenciation *in vitro* suivant une cinétique proche de celle observée *in vivo* (Crisanti-combes *et al.* 1977 ; revue d'Adler 1993). Les cellules de NR peuvent aussi *in vitro* se transdifférencier en cellules pigmentées et en corps lenticulaires riches en cristallines (Okada, 1976).

Les cellules de NR d'embryon d'oiseau prélevées à E8 prolifèrent très peu *in vitro* et meurent au bout de quelques passages, ce qui en fait un outil de choix pour étudier les événements régulant la prolifération. Le système de NR permet donc d'étudier l'effet qu'induisent les oncogènes sur la prolifération et la différenciation cellulaire en distinguant l'effet sur la prolifération de l'effet sur la transformation. Les premières évidences de l'intérêt de ce système ont été fournies avec l'observation de l'induction de la prolifération de cellules de NR après introduction de l'oncogène *src* (Pessac et Calothy 1974). Les études de coopération entre oncogènes pour la transformation ont permis de montrer que certains oncogènes étaient associés à la prolifération, d'autres à la transformation cellulaire (Amouyel *et al.* 1989). Ce système a également permis de révéler pour la première fois une activité mitogène de l'oncogène *v-mil* sur ces cellules (Bechade *et al.* 1985) ce qui a conduit à montrer que le virus MH2 était porteur de deux oncogènes *mil* et *myc* contrairement à une idée répandue à l'époque, qui faisait de MH2 une doublure de MC29 (Coll *et al.*, 1983). Les CNR (chicken neuroretina) infectées par un rétrovirus portant un oncogène sont capables de proliférer. Lorsque cet oncogène code un facteur de transcription, les CNR répondent (positivement ou négativement) au bFGF (Garrido *et al.*, 1992; 1993) ce qui en fait un modèle biologique intéressant pour étudier l'influence de mutations sur l'activité de ces gènes (**Figure 30**).

La RPE, de son côté, peut, *in vivo et in vitro* être conduite à se différencier en neurones en présence de bFGF si elle est prélevée sur de jeunes embryons (revue de Eguchi et Kodama 1993).

Nous avons infecté des cellules de NR de Caille en culture avec le rétrovirus aviaire MC29, porteur de l'oncogène *v-myc*. Ces cellules se mettent à proliférer activement et sont transformées. Après plusieurs passages, la culture se pigmente massivement. Afin d'isoler les gènes neurorétiniens potentiellement régulés par *myc* et responsables de ce phénotype pigmenté,



Cellules souches multipotentes

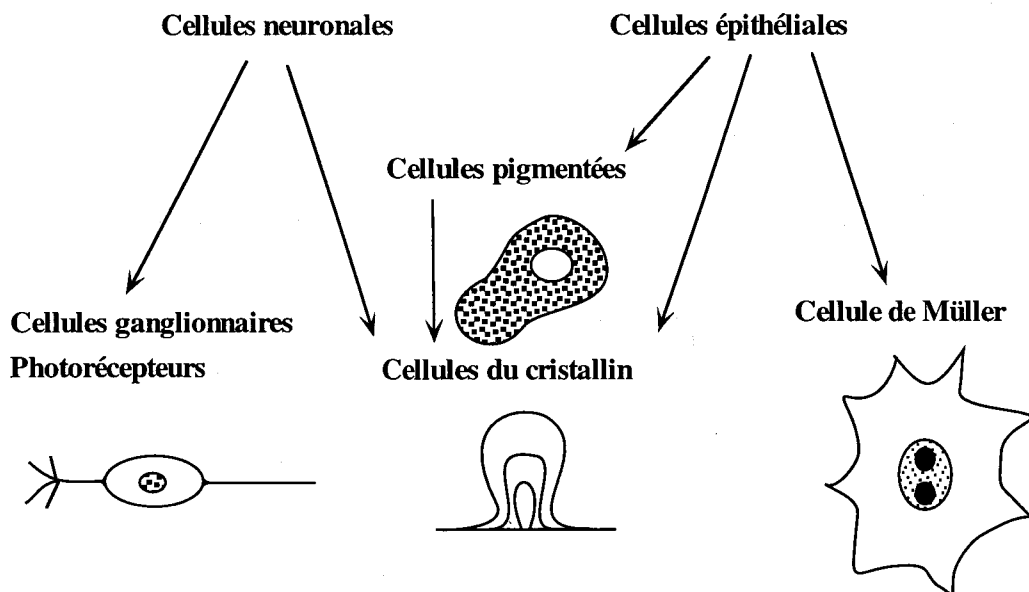


Figure 30: Potentialités de transdifférenciation de l'oeil de Vertébrés.

un criblage différentiel d'une banque d'ADNc construite à partir de l'ARN poly-adenylé de ces cellules a été réalisé dans le laboratoire. Deux clones ont retenu l'attention, baptisés *MC29-QNR2* et *QNR-71*. *MC29-QNR2* a conduit à l'isolement du gène *Pax-6* de Caille (ou *Pax-QNR*) et *QNR-71* à un gène impliqué dans la pigmentation.

VII.2. LE GENE *PAX-QNR*

Ce gène est l'équivalent aviaire du gène murin *Pax-6* (Martin *et al.* 1992 ; Walther et Gruss 1991).

Pax-QNR est le siège d'épissages alternatifs multiples (Dozier *et al.*, 1993) et code au moins 5 protéines distinctes dans la NR *in vivo* à partir des différents ARNm produits (Carrière *et al.* 1993) (schéma).

- une protéine de 48 kD contenant un exon supplémentaire (dénommé 4a) au niveau de la première hélice de reconnaissance du domaine PRD ;
- une protéine de 46 kD
- une protéine de 43 kD dont une partie du domaine Prdd est absente, résultat d'un épissage de l'exon 5 ;
- deux protéines de 32 et 33 kD, produites vraisemblablement par initiation interne. Ces protéines sont dépourvues de domaine paired.

La p46 possède les deux domaines de liaison à l'ADN (PRD et homéodomaine), chacun étant capable de fixer l'ADN (Dozier *et al.* 1993). Les différences structurales des protéines *Pax-QNR* leur confèrent des propriétés distinctes: localisation nucléaire et fixation à l'ADN (Carrière *et al.* 1995). Cela suggère que les différentes protéines *Pax-QNR*, possédant des séquences de reconnaissance à l'ADN distinctes, ne réguleront donc pas les mêmes gènes.

VII.3. LE GENE *QNR-71*

Nous savons que le gène *QNR-71* est essentiellement exprimé dans les tissus mélanisés ou en cours de mélanisation. Nous avons découvert une homologie limitée (27%) avec le gène *Pmel17*, lequel est associé à la mutation "silver coat color" chez la Souris (Kwon *et al.*, 1991). *QNR-71* ne code donc pas un facteur de transcription mais un gène directement impliqué dans

l'organisation voire le fonctionnement des mélanocytes. Nous avons caractérisé ce gène, ses différents produits, sa région de promotion et étudié sa régulation. Nous avons montré que l'expression de *QNR-71* est directement régulée par Myc et par Mi. *QNR-71* constitue donc un nouveau gène cible pour ces deux facteurs de transcription de type bHLHLZ.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE

**« Pax-QNR/Pax-6, a paired Box- and Homeobox-Containing Gene Expressed in
Neurons, is Also Expressed in Pancreatic Endocrine Cells »**

Nathalie Turque, Serge Plaza, François Radvanyi, Catherine Carrière and Simon Saule

Molecular Endocrinology, 8, 929-938, 1994

***Pax-QNR/Pax-6*, un gène contenant un domaine paired et un homéodomaine et exprimé dans les neurones, est également exprimé dans les cellules du pancréas endocrine.**

A. Territoires d'expression de *Pax-QNR/Pax-6*

L'analyse du clone *Pax-QNR* isolé dans le laboratoire par criblage différentiel d'une banque réalisée à partir d'ARNm de cellules de neurorétines de Caille transformées par l'oncogène *v-myc*, nous a révélé que ce clone était l'orthologue aviaire du gène murin *pax-6* (Martin *et al.*, 1992). Grâce à des expériences d'hybridation *in situ* et de « northern blot », nous avons étudié ses territoires d'expression et confirmé que le gène *Pax-QNR* est exprimé dans la neurorétine, la rétine pigmentaire et dans le tube neural (Martin *et al.*, 1992; Goulding *et al.*, 1993) (Figures 1A, 1B et 1E). En outre nous avons observé l'expression de *Pax-QNR* dans le bourgeon pancréatique à E3,5. L'expression de *Pax-QNR* dans le pancréas se maintient au cours du développement (Figures 1C, 1E, 1F, 1G et 1I) et persiste au-delà de l'éclosion (Figure 1J).

Le pancréas est un organe présentant une fonction exocrine et une fonction endocrine. La fonction exocrine est assurée par un tissu organisé en acini qui sécrètent des enzymes tels que l'élastase. La fonction endocrine est assurée par au moins 4 types d'îlots cellulaires sécrétant des hormones peptidiques. Les principaux sont les îlots α essentiellement responsables de la sécrétion du glucagon et les îlots β de l'insuline. La restriction de l'expression de *Pax-QNR* dans certaines zones du pancréas au cours de son développement nous a suggéré que cette expression était peut-être le fait du pancréas endocrine. Ce que nous avons confirmé par des expériences de PCR réalisées sur des ARNm provenant de cellules d'îlots purifiés à partir de pancréas de Souris adultes (Figure 2). *Pax-QNR* s'exprime donc dans le pancréas endocrine.

B. Morphogenèse du pancréas

La morphogenèse du pancréas se déroule en 3 grandes étapes:

- un stade indifférencié où l'endoderme s'invagine pour initier la morphogenèse et au cours duquel les gènes du glucagon et de l'insuline sont déjà exprimés.

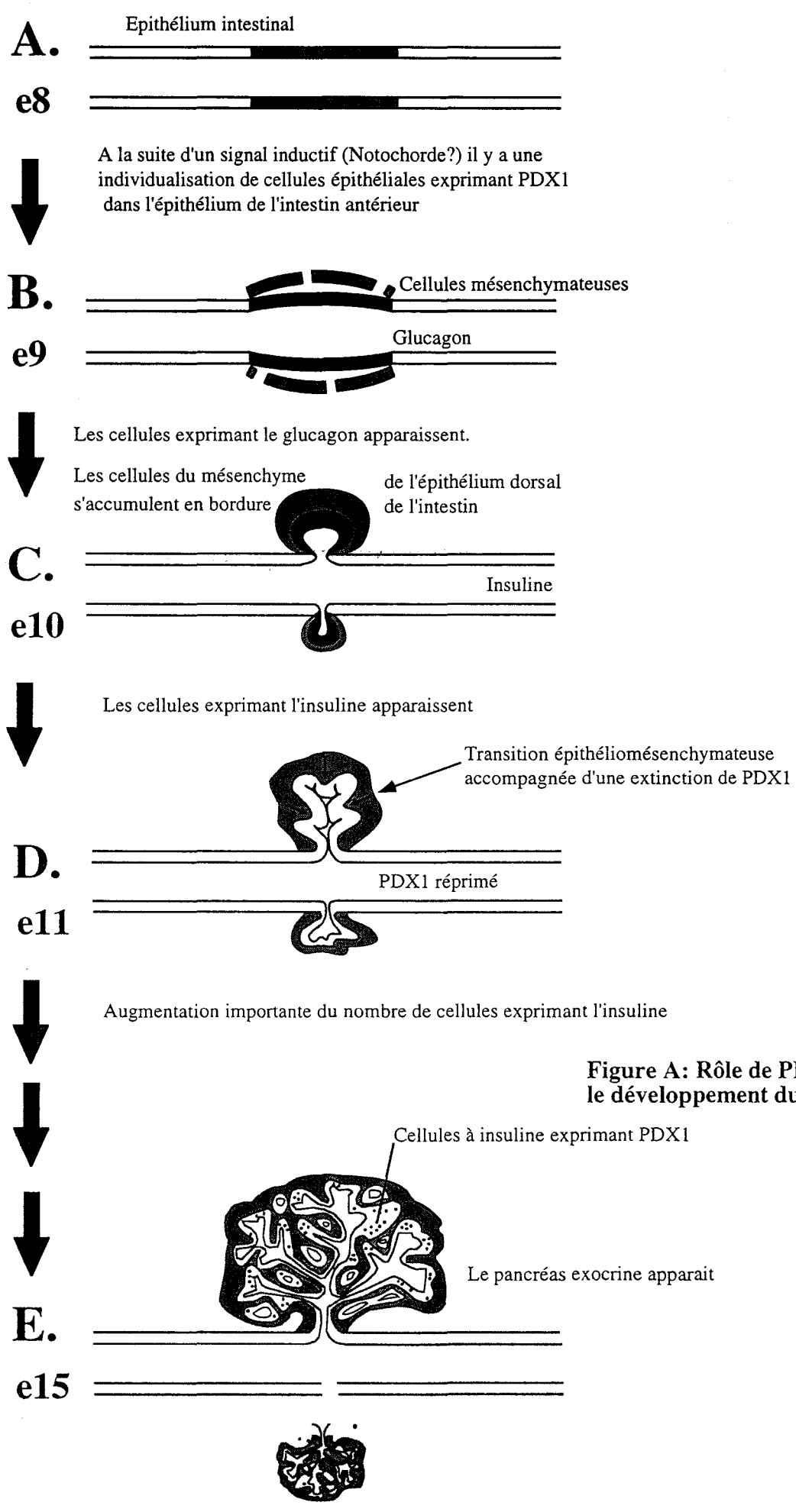


Figure A: Rôle de PDX1 durant le développement du pancréas

(D'après Ahlgren *et al.*, 1996).

- une étape de formation des anses et des canaux primitifs, au cours de laquelle les îlots commencent à se différencier. Ils se détachent de la membrane basale et quittent l'épithélium.

- une 3^{ème} étape de formation des acini au niveau des structures tubulaires. Les acini commencent à sécréter leurs enzymes après la naissance (**Figure A**).

Grâce à des systèmes d'organoculture, il a été récemment montré que les interactions épithéliomésenchymateuses sont nécessaires pour la formation des acini mais pas pour la formation du pancréas endocrine. Les îlots peuvent se former à partir de l'épithélium de l'intestin antérieur en absence de mésenchyme. Les précurseurs des îlots proviendraient de l'épithélium. Quant aux structures tubulaires, elles se formeraient en réponse à des signaux en provenance des membranes basales **Figure B**) (Gittes *et al.*, 1996).

Plus précisément, le facteur de transcription *PDX1*, codant une protéine à homéodomaine capable de réguler l'expression de l'insuline (Ohlsson *et al.*, 1993), est exprimé dans les cellules épithéliales du bourgeon pancréatique (Ahlgren *et al.*, 1996) et serait impliqué dans la formation du pancréas (**Figure A**).

Sachant que *Pax-QNR* code 5 isoformes protéiques (Carrière *et al.*, 1993), il nous a paru important d'examiner si les mêmes isoformes étaient produites chez la Souris et dans le pancréas endocrine.

Afin de caractériser les protéines du gène *Pax-QNR*, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre les différents domaines de la p46: contre le domaine paired (sérum 11), contre la jonction entre le domaine paired et l'homéodomaine (sérum 12), contre l'homéodomaine (sérum 13) et contre la partie carboxy-terminale (sérum 14) (Figure 3A). Ces anticorps reconnaissent cinq protéines produites *in vivo* dans la neurorétine de Caille. Trois protéines de 48, 46 et 43 kD sont reconnues par les sera 11, 12, 13 et 14 et au moins deux protéines de 33 et 32 kD ne sont reconnues que par les sera 12, 13 et 14 (Figure 3B). Ces dernières protéines sont dépourvues de domaine paired et sont générées par des initiations internes en aval du domaine paired. En effet, la mutagenèse dirigée transformant les ATG situés en aval du domaine paired en ATC, supprime la production du doublet de protéines, ce qui confirme l'hypothèse que ces p33-32 sont produites par initiation interne

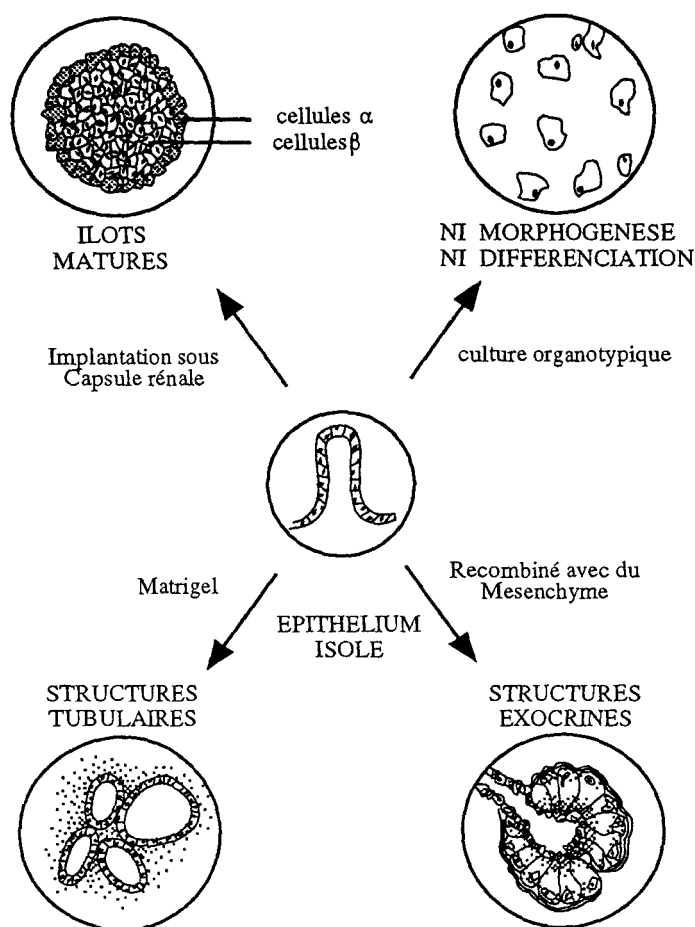


Figure B: Plasticité de l'épithélium pancréatique indifférencié

(D'après Gittes *et al.*, 1996)

- Cultivé en présence d'un gel de collagène de type I ou en trois dimensions
ni différenciation, ni morphogénèse
- Cultivé sous la capsule rénale d'une souris adulte syngénique
différenciation en îlots
- Cultivé en matrigel
différenciation de cellules de canaux
- Cultivé en présence de mésenchyme
différenciation en cellules exocrines

(Carrière *et al.*, 1993). A l'aide des anticorps, nous avons pu analyser l'expression de Pax-6 dans des lignées cellulaires murines dérivées de pancréas endocrine (d'îlots α et β) et de pancréas exocrine, et transformées par l'antigène T de SV40. Les anticorps reconnaissent, uniquement dans les cellules endocrines, 5 isoformes de même poids moléculaire que ceux reconnus dans la rétine de Caille (Figure 3B et 3C), encore que chez la Souris, les protéines de petits poids semblent exprimées à un taux plus faible; il faut cependant garder à l'esprit que les immunoprécipitations ont été réalisées sur des lignées transformées. Par « Western blot » réalisé avec des extraits protéiques de pancréas d'embryons de Poulet prélevés à E9, les 5 isoformes sont également détectées avec des rapports similaires à ceux de la rétine (Figure 3D). Ces résultats montrent que le pancréas exocrine n'exprime pas Pax-6, ce qui était suggéré par nos expériences d'hybridation *in situ*.

Afin de contrôler que les cinq protéines caractérisées *in vivo* étaient bien codées par le gène Pax-QNR, une cartographie à la protéase V8 de ces cinq protéines a été faite en parallèle avec celle des protéines p46 et p33-32 produites *in vitro* à partir de l'ADNc MC29QNR2 en lysat de réticulocytes. Les cartes de digestion des différentes protéines sont superposables (Figure 4). Les doubles immunoprécipitations obtenues en utilisant successivement les anticorps 11 puis 14 montrent qu'il ne s'agit pas de protéines reconnues par réaction croisée avec les anticorps ou suite à une association avec les produits de Pax-QNR (Figure 3C). Les cinq protéines sont produites de façon indépendantes et ne proviennent pas d'événement de dégradation ou de maturation post-traductionnelle. Elles ont toutes la même durée de demi vie, de l'ordre de 6 heures, que celle des isoformes produites dans la rétine (Carrière *et al.*, 1993) ce qui est particulièrement élevé pour un facteur de transcription (Figure 5). Les protéines p48, 46 et 43 ne sont pas des formes différenciellement phosphorylées de la même protéine ainsi que le suggère un traitement à la phosphatase qui ne modifie pas la taille des protéines (résultats non présentés).

C. Capacité de liaison à l'ADN des protéines Pax-6 du pancréas endocrine

Des expériences de fixation à l'ADN montrent qu'au moins une des isoformes présentes dans les extraits cellulaires de la lignée endocrine β , produite *in vivo* donc, est

capable de reconnaître la séquence e5 portant les sites de fixation pour le domaine paired et l'homéodomaine (Dozier *et al.*, 1993); après migration, le complexe ADN-protéine se trouve au même niveau que celui formé par la p46 produite en lysat de réticulocyte fixée à e5 (Figure 6A). Ce complexe migre également au même niveau que celui formé par e5 et une des isoformes produites par les cellules de rétine prélevée à E6 ou à E15 (Figure 6A et 6B). L'isoforme se fixant à e5 dans ces extraits protéiques de cellules endocrines est bien un produit de *Pax-QNR*, comme le montrent des expériences d'«UV cross-linking» (Figure 6C) qui consistent à réaliser une immunoprécipitation à la suite d'un pontage covalent entre la sonde ADN radiomarquée et les protéines du complexe.

Pax-QNR/Pax-6 est donc bien exprimé dans le pancréas endocrine, dès la formation du bourgeon pancréatique. *Pax-QNR/Pax-6* n'est pas le seul gène contenant un homéodomaine à être présent dans cet organe (Karlson *et al.*, 1990; German *et al.*, 1992; Ohlsson *et al.*, 1993; Leonard *et al.*, 1993). Certains sont impliqués dans la régulation du gène de l'insuline dont le promoteur contient des sites de fixation pour l'homéodomaine (German *et al.*, 1992; Ohlsson *et al.*, 1993). Néanmoins *Pax-QNR/Pax-6* ne semble pas capable d'activer *in vitro* le promoteur de l'insuline (résultats non montrés), ce qui n'exclue pas une participation *in vivo* de *Pax-QNR/Pax-6* dans la régulation de l'expression d'hormones peptidiques. Les 3 isoformes P48, 46, 43 de *Pax-QNR/Pax-6* contiennent en effet un second domaine de liaison à l'ADN, le domaine paired, qui serait capable d'entrer dans des interactions protéiques; ces isoformes pourraient moduler l'action d'autres protéines plus vitales pour la différenciation du pancréas endocrine et son maintien. Nous ne savons pas encore si l'expression de *Pax-QNR/Pax-6* apparaît avec la première étape de la morphogenèse du pancréas, au stade où l'épithélium est encore indifférencié. Cependant l'examen des pancréas des Souris *Sey*, mutées dans *pax-6* ne présentent pas d'anomalie majeure (résultats non montrés). La participation éventuelle de *pax-6* dans le fonctionnement du pancréas endocrine, voire dans la différenciation des îlots, ne semble pas déterminante. L'absence *pax-6*

dans les Souris *Sey* pourrait être compensée par la présence des autres protéines à homéodomains. La protéine PDX1, exprimée dans les îlots β , a été montrée nécessaire à l'élaboration du pancréas puisque les Souris mutées dans le gène codant PDX1 n'ébauchent que les bourgeons pancréatiques, ce gène étant requis pour la détermination de l'épithélium (Ahlgren *et al.*, 1996).

***Pax-QNR/Pax-6*, a Paired Box- and Homeobox-Containing Gene Expressed in Neurons, Is Also Expressed in Pancreatic Endocrine Cells**

Nathalie Turque, Serge Plaza, François Radvanyi*, Catherine Carriere, and Simon Saule

Centre National de la Recherche Scientifique CNRS EP 56
Institut Pasteur de Lille
59019 Lille Cedex, France

After differential screening of a cDNA library constructed from quail neuroretina cells infected with the *v-myc* containing avian retrovirus MC29, we have isolated a cDNA clone *Pax-QNR*, homologous to the murine *Pax6* which is mutated in the autosomal dominant mutation *small eye* (*Sey*) of the mouse and *aniridia* in man. Here we report the characterization of *Pax-QNR/Pax-6* expression in the chicken, quail, and mouse pancreas. *In situ* hybridization performed with E3 chick embryos demonstrated that, in addition to the documented expression of *Pax-QNR/Pax-6* in the neural tube, this gene is also expressed in the pancreatic bud. This expression is later restricted to discrete parts of the organ. From bacterially expressed *Pax-QNR* peptides we obtained rabbit antisera (paired domain, serum 11; domain between paired and homeo, serum 12; homeodomain, serum 13; and carboxyl-terminal part, serum 14) capable of specifically recognizing *Pax-QNR/Pax-6* proteins (48, 46 kilodaltons) in cell lines derived from α - and β -pancreatic cells, but not from exocrine derived cell lines. We conclude that *Pax-QNR/Pax-6* represents another gene expressed both in the endocrine pancreas and neuro-ectodermic tissues. (*Molecular Endocrinology* 8: 929-938, 1994)

INTRODUCTION

Pancreatic endocrine cells bud from the pancreatic duct during development and give rise to four endocrine cell types assembled in the islet. These cells probably develop from the same precursor (1) with glucagon-producing cells appearing at embryonic day 10 in the mouse and the other three cell types later (2). Islet cells express several neuronal markers including the cate-

cholamine biosynthetic enzymes tyrosine hydroxylase (2), neuron-specific enolase (3), glutamic acid decarboxylase (4), and dopa decarboxylase (5). In addition, pancreatic β -cells have synaptic-like microvesicles that store γ -aminobutyric acid (6), neural cell adhesion molecules (7); dispersed islets cells can form neurites in culture and express neurofilaments (8). Experiments performed in quail/chicken (9) and mouse embryos (8) indicate that although islets cells express neuronal markers, they originate from endodermal precursors.

Cell differentiation is the product of differential gene expression, and transcription factors are expected to regulate such events. Homeobox-containing genes encode developmentally regulated transcription factors. The homeobox encodes the homeodomain, a conserved DNA-binding domain with a helix-turn-helix motif (10), and several vertebrate homeoproteins have been identified as transcription factors required for expression of lineage-specific genes (11-14). The paired motif found in *Drosophila* developmental genes such as *paired* and *gooseberry*, has also been shown to be conserved in vertebrates and found to encode another DNA-binding motif (15, 16). In contrast to homeobox-containing genes whose expression is region-specific, the paired-containing (*Pax*) genes are expressed along the entire anteroposterior axis in the neural tube (17).

We have previously isolated from MC29 (an avian retrovirus bearing the *v-myc* oncogene) infected quail neuroretina cells (MC29QNR) a cDNA clone named *Pax-QNR* which is the quail homolog of *Pax-6* (18-20). During the study of *Pax-QNR* expression by *in situ* hybridization we found significant labeling of the pancreas. To examine the potential biological role of *Pax-QNR* in the pancreas, we characterized *Pax-QNR* expression during pancreatic development. *In situ* hybridization experiments performed on chick embryos showed that the developing organ expresses *Pax-QNR* transcripts, restricted to areas presumed to be the endocrine pancreas. Therefore, we characterized *Pax-QNR* in several cell lines established from the endocrine

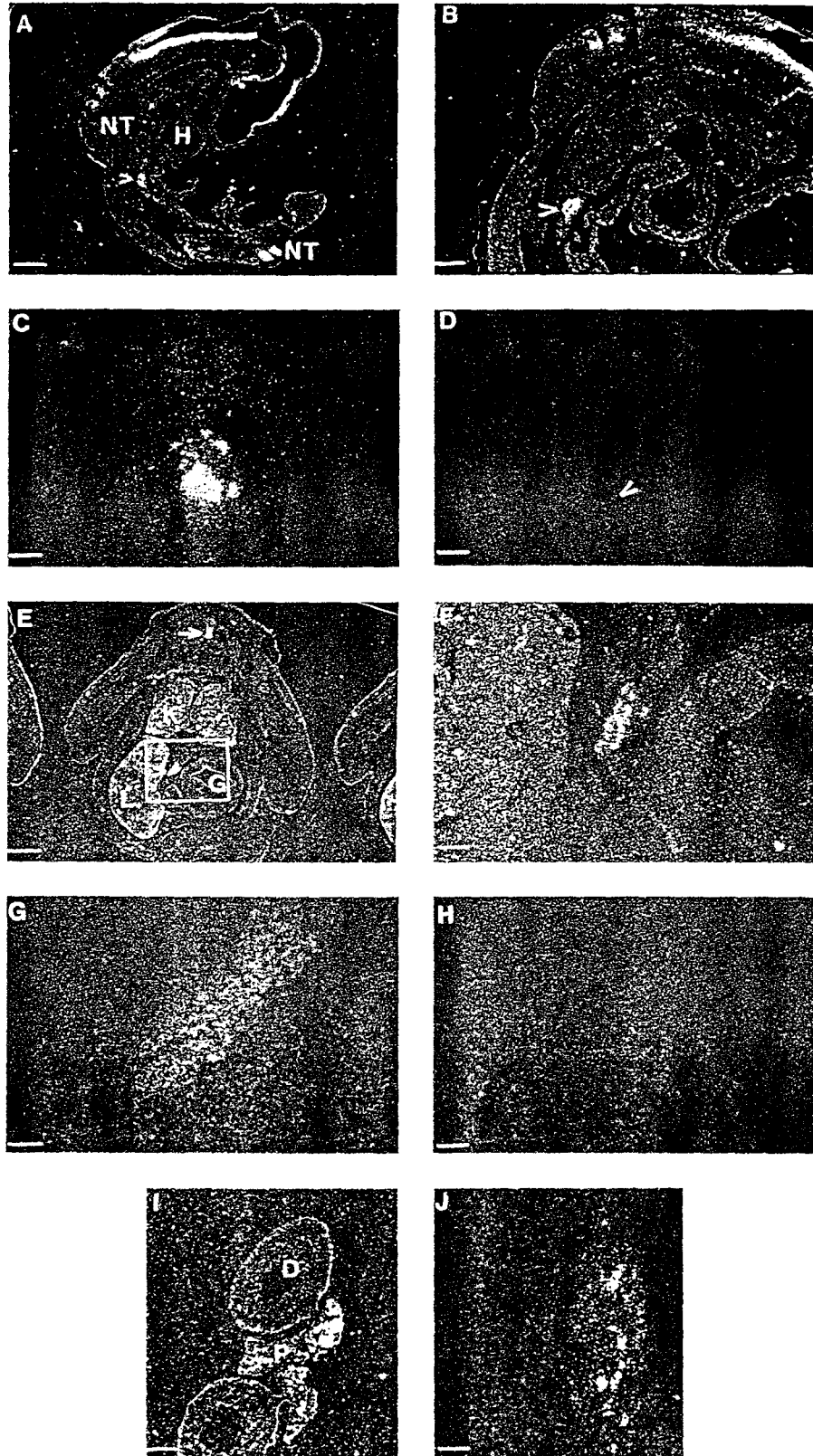


Fig. 1. Detection of *Pax-QNR* RNA by *in Situ* Hybridization in Chicken

A, Hybridization of longitudinal section of E3.5 chicken embryo with a [³⁵S]-labeled antisense probe. Arrowhead indicates the labeled pancreas. NT, Neural tube; H, heart (bars, 470 μm). B, Enlarged view from panel A (bars, 200 μm). C, Transverse section from E3 embryos showing hybridization of the pancreatic bud with ³⁵S-labeled antisense probe (bars, 12 μm). D, Same section

pancreas (α and β cells) of transgenic mouse bearing the Rip-Tag transgene (21). Transformed cell lines from exocrine pancreas were also studied (22). We demonstrate that pancreatic endocrine, but not exocrine cells, express the Pax-6 transcription factor as two major proteins recognized by rabbit antiserum made against bacterially expressed Pax-QNR peptides.

RESULTS

Expression of Pax-QNR/Pax-6 RNA in the Normal Pancreas

Sections of chicken embryos were analyzed by *in situ* hybridization with a Pax-QNR probe. In addition to the well described neuroretina and neural tube expression (Refs. 19 and 23 and Fig. 1A and B) signal was also detected in the pancreatic area from E3 chick embryos before hatching (Fig. 1, A, B, C, E, G, I). Figure 1H shows the Hoechst 3358 labeling of the nuclei from E9 embryonic pancreatic section. The positive cells appeared to be organized in clusters (islets). No signal was detected in the pancreas with the sense probe used as control (data not shown). Figure 1I shows the signal in chicken E12 pancreas (P) dissected with the duodenum (D). The signal is clearly restricted in small areas. Pax-QNR transcripts can be detected in the pancreas of newly hatched chicken (Fig. 1J). Similar results were also obtained with quail. Restriction of the signal suggested that Pax-QNR expression was rather localized in the endocrine part of the pancreas. In the avian species, insulin islets are dispersed throughout the pancreas, but the dorsal part of the pancreas gives rise to large glucagon-secreting and small insulin-secreting islets (24). Exocrine pancreas grows and differentiates after E13 (24).

In the mouse, the islet cell mass makes up only a small fraction (1%) of the total pancreas. To demonstrate that normal mouse pancreas islets express Pax-6, we performed a quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis with RNA prepared from normal pancreas and purified islets. A mix of oligonucleotides able to co-amplify Pax-6 as well as the TFIID factor (expected to be similarly expressed in all cells and used as an internal control), were mixed with reverse-transcribed RNA. The result shown in Fig. 2A confirms that Pax-6 is mainly expressed by islet cells. Figure 2A also shows that Pax-6 RNA is expressed in a β -cell-derived cell line β TC3. We next prepared with the same RNA

another quantitative PCR analysis in order to compare the level of Pax-6 and insulin in the same tissue. Figure 2B shows that the ratio between insulin and Pax-6 is the same in the purified islets and the total pancreas. This result suggests that Pax-6 is not expressed in the pancreas outside the islets.

Pax-QNR/Pax-6 Proteins Are only Expressed in Cell Lines from Endocrine Origin

In order to define the type of cell expressing Pax-QNR/Pax-6 in the islets, we analyzed Pax-QNR/Pax-6 expression in cell lines of defined origin isolated from pancreatic tumors obtained from transgenic animals. We used cell lines derived from endocrine or exocrine tissues depending on the type of promoter used to target large T oncogene expression (21, 22) and rabbit antisera capable of specifically recognizing Pax-QNR/Pax-6 proteins. These antisera were obtained with gel-purified peptides prepared from distinct parts of Pax-QNR expressed in bacteria. We used antisera produced against the paired domain (121 residues; serum 11), the junction between paired and homeodomain (53 residues; serum 12), the homeodomain (81 residues; serum 13), and the carboxyl-terminal domain (146 residues; serum 14) as fusion proteins with part of MS2 phage polymerase (99 residues). The different anti-Pax-QNR sera were tested in immunoprecipitations using whole [³⁵S]methionine-labeled reticulocyte lysates programmed with MC29-QNR2 RNA (20). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of anti-Pax-QNR immunoprecipitates revealed a predominant protein with relative molecular mass of 46 kDa (20), which was not recognized by the cognate preimmune serum or with serum blocked with an excess of immunizing peptide (lane b). The four immune sera tested (lanes i) immunoprecipitated the Pax-QNR protein with equal efficiency (Fig. 3A).

To detect the Pax-QNR products *in vivo*, cells were [³⁵S]methionine-labeled for 45 min. SDS-PAGE analysis of cell lysate immunoprecipitated with serum 11 (made against the paired domain) revealed a predominant doublet with relative molecular masses of 48 and 46 kDa in β TC3 cells and in the quail neuroretina used as positive control, but not in the fibroblastic NIH 3T3 cells (Fig. 3B). Pax-6 expression was not restricted to this particular clone of an endocrine pancreas cell line since another clone (β TC12) as well as α -type cells (cell lines α TC1-2 and α TC1-6) expressed this protein doublet. No expression was found in cell lines derived from

from E3 embryos showing the Hoescht labeling of the nuclei. Arrowhead indicates the positive area. E, Hybridization of transverse sections from E7.5 embryos. Arrowhead indicates the labeled pancreas. Most probably due to erythrocytes light scattering, a nonspecific signal (also detected with the sense probe) is observed in liver and kidney. Arrow indicates the residual signal in the neural tube. K, Kidney; L, liver; G, gizzard (bars, 300 μ m). F, Enlarged view from the boxed area in panel E (bars, 160 μ m). G, Hybridization of transverse sections from E9 pancreas (bars, 160 μ m). H, Same section as in panel G showing the Hoescht labeling of the nuclei. I, Transverse section of E12 pancreas dissected out with the duodenum. D, Duodenum; P, pancreas (bars, 230 μ m). J, Section from 1-week-old chicken pancreas hybridized with Pax-QNR antisense probe (bars, 120 μ m). We used a Leica Wild M10 zoom stereomicroscope to produce pictures from panels A, B, E, F, and I.

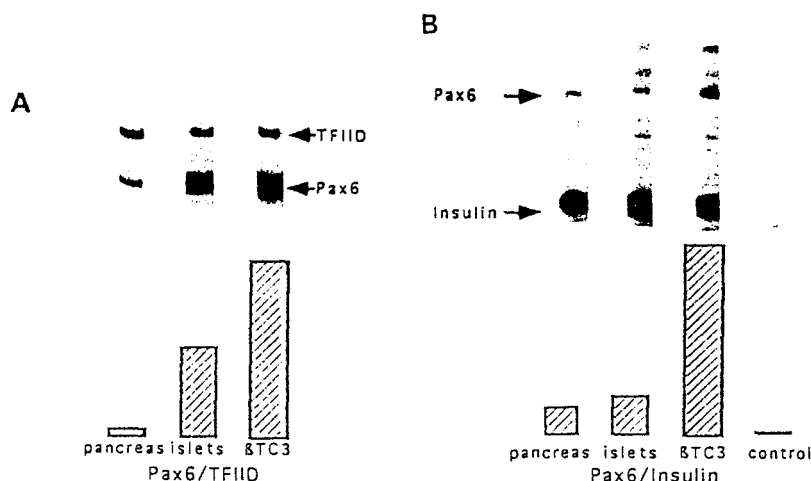


Fig. 2. Pax-6 RNA Is Expressed in Normal Mouse Pancreatic Islets

Quantitative PCR analysis performed with total pancreas, purified islets, or β TC3 retrotranscribed RNA. A, TFIID factor was used as internal control. Densitometric scanning of the bands allows definition of a ratio of Pax-6/TFIID as indicated on the bottom of the figure. Twenty four cycles of PCR were used. Pancreas, 0.6; islets, 10; β TC3, 22.5. B, Insulin and pax-6 expression were compared. Densitometric scanning of the bands allows definition of a ratio of Pax-6/Insulin as indicated on the bottom of the figure; pancreas, 0.7; islets, 1; β TC3, 5. A kinetic was used in order to obtain the same insulin signal: pancreas, 28 cycles, islets and β TC3, 21 cycles. Control, PCR experiment performed without reverse transcriptase.

exocrine pancreas [cell line 266-6 (22) and rat cell line AR4-2J (25), Fig. 3C].

The same doublet proteins were recognized in β -cells with immune (i) sera 12, 13, and 14 but not with cognate preimmune (p) or blocked (b) sera (Fig. 3B). Sera 12, 13, and 14, but not serum 11, also recognized a very faint doublet of proteins of 32 and 33 kDa (see latter). To determine whether the proteins immunoprecipitated were Pax-6/Pax-QNR-associated proteins, we performed an immunoprecipitation with serum 11 after which the proteins recovered from the immunocomplexes bound to protein-A sepharose were denatured and immunoprecipitated again with serum 14. Denatured proteins were not expected to be associated with Pax-6. Figure 3C demonstrates that p46 and p48 kDa proteins can be recovered from the second immunoprecipitation suggesting that these proteins are not Pax-associated products. This was further demonstrated by Western blot experiments performed with β TC12 total cell extracts. As shown in Fig. 3D, paired-containing and paired-less proteins were found with serum 13 specific for the homeodomain in an experimental condition where protein associations are destroyed. In addition, we demonstrate that normal pancreas expressed the Pax-QNR proteins. This was shown in a Western blot experiment performed with extracts of E9 chicken pancreas (Fig. 3D). Paired-containing p48 and p46 kDa proteins as well as the p32/33 kDa paired-less products [also found in the neuroretina (26)] were present in the normal pancreas.

To confirm that the proteins detected *in vivo* were structurally related to Pax-QNR/Pax-6, we compared V8-protease fragments obtained from [35 S] methionine-labeled proteins generated from *in vitro* transcription-translation of MC29-QNR2 cDNA (20) and from β TC12

pancreas endocrine Pax-6 proteins. MC29-QNR2 RNA translated in rabbit reticulocyte lysates in the presence of [35 S]methionine produced a doublet band of 46/47 kDa, but also in some experiments, a 32/33 kDa doublet of proteins presumably initiated from an internal AUG initiation codon (see Fig. 3A, lanes 12, 13, and 14). Indeed, MC29-QNR2 cDNA deleted from the first AUG yielded only the paired-less protein doublet from reticulocyte lysates (26). Figure 4 shows that the labeled peptide patterns of the *in vivo* and *in vitro*-generated proteins are superimposable, demonstrating that the proteins recognized by anti-Pax-QNR sera are produced from the same gene, even for the paired-less p32/33 kDa doublet proteins. The avian and murine Pax-QNR/Pax-6 products differ by only three amino acids out of 416, located in the junction between the paired domain and homeodomain (18, 19). This strong conservation explains the identical pattern found between the reticulocyte lysate Pax-QNR V8-protease fragments and the fragments obtained from the murine Pax-6 products.

Pax-QNR/Pax-6 Encodes Stable Proteins

Since two major proteins (48 and 46 kDa) can be detected in the endocrine pancreas cell lines, it was important to determine the relationship between these proteins. They did not appear to be differentially phosphorylated forms of the same protein since phosphatase treatment did not resolve the protein doublet to a single species (data not shown). In addition we found no evidence for a precursor-product relationship between these proteins (see Fig. 5). To examine the stability of the different Pax-QNR/Pax-6 proteins we performed a pulse-chase analysis in β TC12 cells after

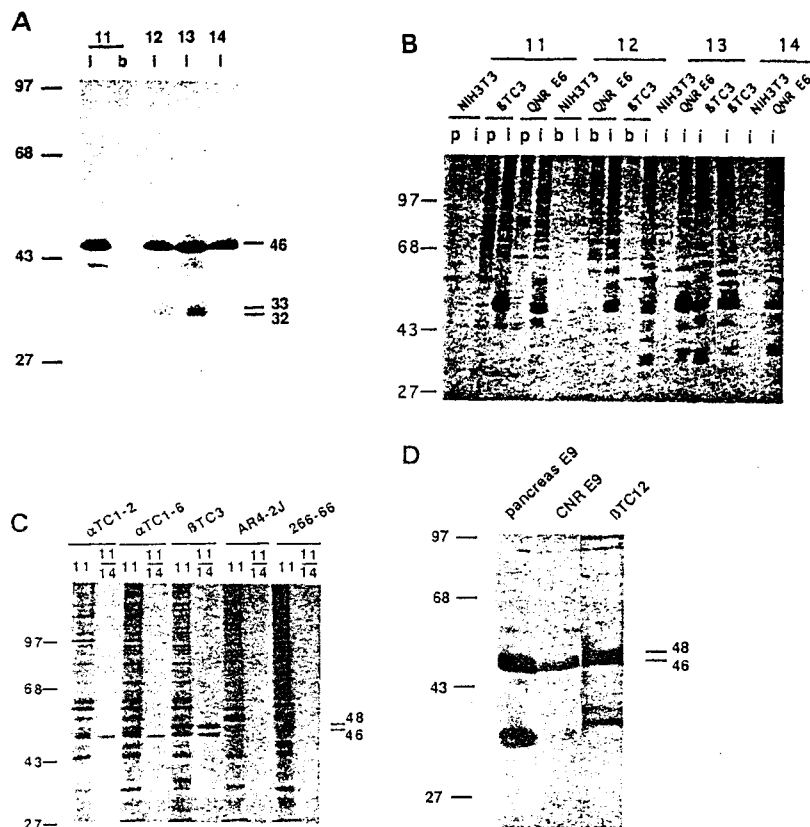


Fig. 3. Characterization of Pax-QNR/Pax-6 Proteins

A, Characterization of the antisera used. The MC29-QNR2 cDNA was transcribed *in vitro* in a sense orientation and translated in a rabbit reticulocyte lysate. Translated proteins were immunoprecipitated with rabbit antisera prepared against bacterially expressed peptides. The peptides encoded by the paired domain (serum 11), the junction between paired and homeodomain (serum 12), homeodomain (serum 13), and the carboxyl-terminal part (serum 14) of the Pax-QNR protein were eluted after 15% SDS-PAGE of the bacterial proteins, and injected into rabbits (see *Materials and Methods*). i, Immune serum; b, serum blocked with an excess of immunogen. B, Expression and characterization of Pax-QNR/Pax-6 proteins *in vivo*. Cells were [³⁵S]methionine-labeled for 45 min. Cell lysate was immunoprecipitated in RIPA buffer with immune serum 11, 12, 13, and 14 (lanes i) and with cognate preimmune sera (lanes p). Specific proteins were indicated by *arrows*. C, Immunoprecipitations were performed in a sequential order with serum 11 and then the proteins recovered after boiling from the immunocomplexes bound to protein-A sepharose were immunoprecipitated with serum 14 as indicated in the *top* of the figure. D, Western blot was performed on total E9 chicken pancreas, neuroretina, and βTC12 cell extracts with serum 13. Bound antibodies were detected with an ECL detection kit.

45 min of labeling with [³⁵S] methionine. We found that the two paired-containing proteins exhibited similar half-lives of 6 h (Fig. 5). In addition, the relative levels of these proteins were unaltered during the chase period consistent with the idea that these proteins are independent translation products. We have previously reported that Pax-QNR/Pax-6 can generate distinct mRNA by alternative splicing (20). The paired-containing 48 and 46 kDa proteins might be produced from two already identified transcripts: the 48 kDa product may be encoded by the mRNA containing the additional paired exon 4a (18, 20) and the 46 kDa by an MC29-QNR2-type mRNA described in mouse (18).

Pax-QNR/Pax-6 Encodes Proteins Capable of Binding the e5 Oligonucleotide Sequence

To determine whether paired-containing Pax-QNR/Pax-6 isoforms were able to specifically recognize the e5

sequence [as previously demonstrated for the quail p46 kDa translated in reticulocyte lysates (20)] electrophoretic migration shift assays (EMSA) were performed using βTC3 nuclear extracts and ³²P-labeled e5 DNA (Fig. 6, A and B). The e5 DNA-binding complex found in reticulocyte lysates is shown by an *arrow*. A similar complex (labeled III in Fig. 6A) was also detected using βTC3 and E6 or E15 quail neuroretina, but not with nuclear extracts from NIH 3T3 in which Pax-6 is not expressed (see Fig. 3B). This complex is specific for the e5 sequence since it disappeared in the presence of a 100-fold excess of unlabeled e5 oligonucleotide (lane e5) but not in the presence of 100-fold excess of unrelated AP3 or AP1 binding site oligonucleotide [lane AP3 (Fig. 6A) and AP1 (Fig. 6B)]. In addition to this complex, two complexes (complexes II and I, Fig. 6A) migrating with a slower electrophoretic mobility were

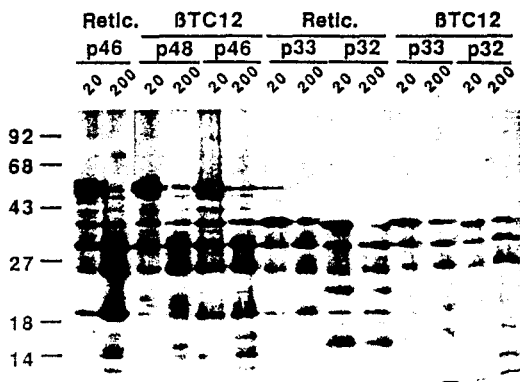


Fig. 4. One-Dimensional V8 Protease Mapping of Reticulocyte MC29-QNR2 cDNA-Encoded and β TC12-Expressed Pax-6 Proteins

β TC12 cells were labeled with 2 mCi L-[35 S]methionine/ml, lysed in RIPA buffer, and immunoprecipitated with serum 14. Labeled proteins were excised from the gel and run on a 15% polyacrylamide gel after partial digestion for 1 h with either 20 or 200 ng *Staphylococcus aureus* V8 protease. The mol wt of the purified Pax-6 proteins is indicated at the top of the figure. The positions of prestained mol wt standards are shown on the left (in kilodaltons).

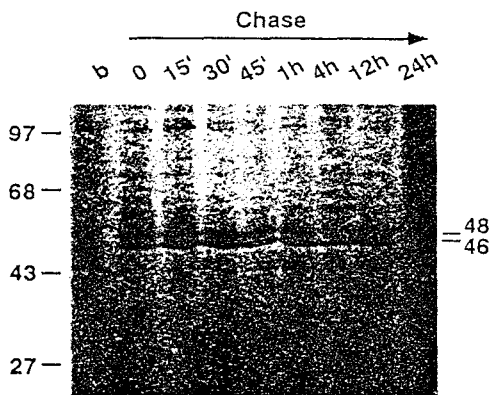


Fig. 5. Stability of Pax-6 Products Analyzed by Pulse-Chase Labeling

β TC12 cells were L-[35 S]methionine labeled for 45 min and chased for the indicated period of time in complete medium. Cell lysates were immunoprecipitated with serum 14. Lane b, Serum blocked with an excess of the bacterial immunogen.

also resolved. It is unlikely that these complexes involve Pax-6 proteins since they can be formed using the nuclear extracts from NIH 3T3 which is devoid of the Pax-6 protein.

To confirm that Pax-QNR/Pax-6 proteins are in the DNA-protein complex described above, we performed UV cross-linking assays with the e5 probe simultaneously labeled with 32 P and 5-BrdUTP and MC29-QNR2 programmed reticulocyte lysates, β TC3 and E6 quail neuroretina nuclear extracts. The DNA-protein complexes formed in solution were resolved under denaturing conditions. After SDS-PAGE analysis of the cross-linked DNA-protein complexes, a protein of identical

molecular weight was detected using MC29-QNR2 reticulocyte lysates, β TC3 or E6 quail neuroretina nuclear extracts complex III only (Fig. 6B).

DISCUSSION

We have previously described the isolation of Pax-QNR (19), the quail homolog of the Pax-6 gene. Performing *in situ* hybridization to describe the expression pattern of this gene we found strong labeling in a small subset of cells in the developing pancreas. We found expression of this gene as early as E3 in chick embryos. The restricted hybridization pattern, and the expression in purified islets, was suggestive of expression in the endocrine pancreas. β -cells in the islets are probably not the only pancreatic cells expressing Pax-QNR/Pax-6, since expression of Pax-6 is also observed in α -cell-derived cell lines. This raises the possibility that cells from the amine precursor uptake and decarboxylation (APUD) system also expressed Pax-QNR/Pax-6. Two arguments do not favor this hypothesis. First, no expression of Pax-QNR/Pax-6 could be observed outside the developing nervous system and pancreas (see Fig. 1). Second, COLO 320 cell line isolated from a human colon carcinoma and expressing neuroendocrine markers (27) does not express Pax-6 (data not shown). To characterize the Pax-6 protein expressed in endocrine cells we performed immunoprecipitation experiments with [35 S]methionine-labeled cellular extracts from cell lines derived from exocrine mouse transgenic pancreas. We used rabbit antisera prepared from bacterially produced recombinant peptides corresponding to defined parts of Pax-QNR/Pax-6 (26). The previously isolated quail cDNA, MC29-QNR2, as well as the murine cDNA have one in-frame AUG translation start site that places the paired domain very close to the amino terminus of the protein. This AUG is expected to initiate a protein product of 46 kDa. This corresponds to the major product found *in vivo* in all the endocrine pancreas cell lines used, as well as in the neuroretina and the normal pancreas. In addition to this expected product, we detected another protein product of 48 kDa. The murine Pax-6 cDNA previously described (18) shows an insertion of 14 amino acids between the first and the second exon of the paired-box domain with respect to the Pax-QNR/Pax-6 sequence. We found the corresponding sequence in the first paired-box intron of the Pax-QNR locus. We therefore called this sequence exon 4a (20). A mRNA containing this additional exon could explain the 48 kDa protein immunoprecipitated with all the antisera used, since we found no evidence for posttranslational maturation of p46 to explain the existence of this protein product.

Paired-less p32 and p33 proteins, faintly detected in mouse endocrine pancreas cell lines, and obvious in normal chicken pancreas, are not processing products of the full size protein since paired-less and paired-containing proteins exhibit similar half-lives (as found

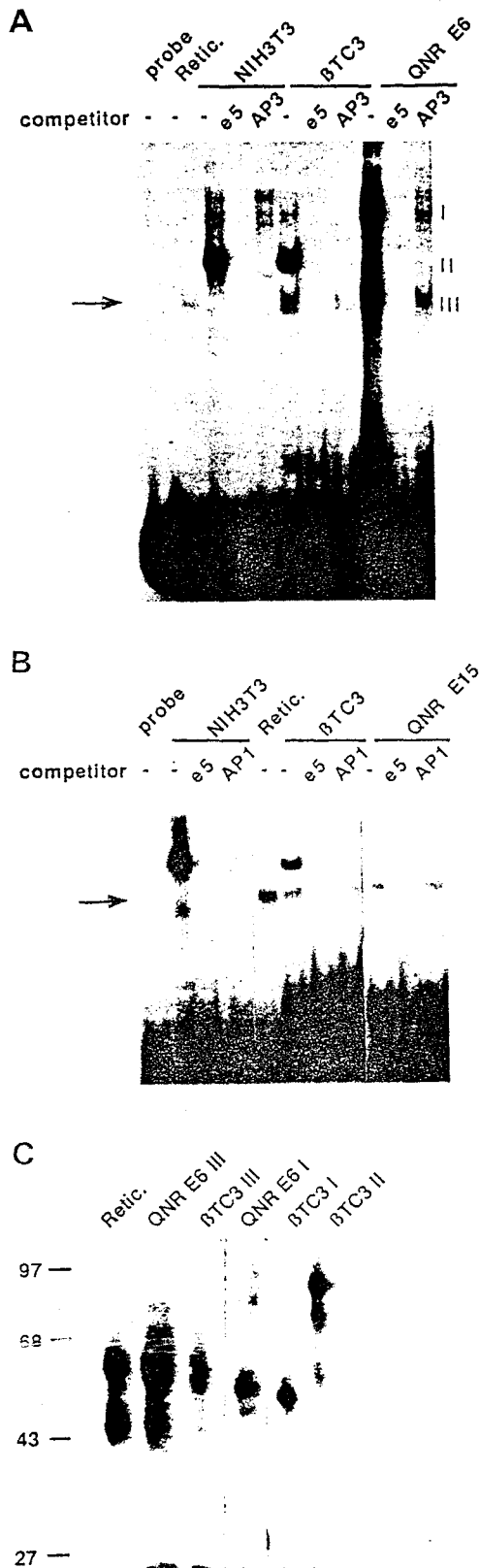


Fig. 6. Tissue-Specific Distribution of a Factor That Interacts with the e5 DNA Probe Detected by EMSA

A, The arrow shows a specific DNA-protein complex found in reticulocyte lysates expressing the p46 kDa Pax-QNR/Pax-6 protein. e5 probe was incubated without (lane probe) or with

on long autoradiographic exposure presented in Fig. 5, data not shown). These small paired-less forms may be generated by alternative translational initiation sites at internal AUGs in the full-length Pax-QNR/Pax-6 mRNA, a process already suggested for the production of truncated forms of the thyroid hormone receptor (28) and short cAMP responsive element modulator proteins (29). Both of these proteins, generated by the use of an internal AUG codon, act as repressors of the activity of the full-size protein (28, 29). The function of these Pax-QNR/Pax-6 isoforms remains to be defined. These paired-less proteins might also be produced from an mRNA derived after alternative splicing involving the removal of the first in frame AUG. In the quail, we isolated a particular messenger [cDNA B1 (20)] differing in the 5'-untranslated region due to such an alternative splicing event. This messenger is devoid of an AUG to initiate the paired-box open reading frame and could therefore be a good candidate to drive the synthesis of the p32/33 paired-less proteins. From *in situ* hybridization experiments performed with B1-specific probe, we found this messenger in the pancreas (data not shown). The quail p46 Pax-QNR is capable of binding to the *Drosophila* e5 sequence, and this binding is mediated by the paired domain and the homeodomain (20), as for the Pax-3 protein (30); both homeo and paired domains are required for high-affinity binding. That both domains are involved in DNA binding is indicated by the fact that paired and homeodomains individually expressed in bacteria are able to bind to e5 (20). We have been unable to demonstrate a DNA binding activity for the p32/33 paired-less proteins expressed in reticulocyte lysates (26) and have been unable to demonstrate any effect of p32/33 proteins on p46 DNA binding (data not shown).

What is the function of the Pax-QNR/Pax-6 transcription factor in the endocrine pancreas? Since Pax-QNR/Pax-6 is expressed in developing as well as in mature pancreas, it could play a role both in the differentiation and the maintenance of endocrine pancreas functions. Numerous transcription factors containing a homeodomain DNA binding have already been found in endocrine pancreas (13, 14, 31, 32), and some experiments sug-

an equal amount of nuclear extracts from cells indicated on the top. Competitions were carried out in the absence (-) or presence of 100-fold m excess of unlabeled competitor DNA e5 or AP3 binding site. Protein-DNA complexes were resolved on a 6% acrylamide gel. I, II and III refer to the distinct protein-DNA complexes found in nuclear extracts from β TTC3 cells. B, Same experiment as in A, except that a 100-fold m excess of unlabeled DNA AP1 binding site is used in the competition experiments. Nuclear extracts from neuroretinas were from E15 embryos, instead from E6 as in panel A. C, Determination of mol wt of proteins involved in DNA-protein complexes formation by UV-cross-linking assay. The covalent DNA-protein complexes formed after UV irradiation between labeled e5 and p46 kDa Pax-QNR (MC29-QNR2, lane retic), E6 quail neuroretina nuclear extracts (QNR, complexes I and III, see panel A), or β TTC12 nuclear extracts (complexes I, II, and III; see panel A) were recovered from the gel and subjected to SDS-PAGE analysis.

gest that these factors are implicated in insulin gene transcriptional regulation (14, 31). Among the different homeodomain-containing proteins expressed in the pancreas, Pax-6 expresses a paired-type homeodomain expected to have distinct DNA recognition sequences (33). Paired-containing transcription factor devoid of homeodomain (Pax-8) and homeodomain-containing protein (TTF-1) have been shown to bind the promoter region and regulate the expression of tissue-specific gene from the thyroid (34) suggesting a cooperation between these different types of transcription factors. Preliminary experiments performed with the Pax-QNR/Pax-6 expression vector and insulin promoter-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene have not suggested a direct effect of the Pax-QNR/Pax-6 protein on this promoter in a transient transfection assay. However, it remains possible that this protein plays a role *in vivo* in insulin gene regulation. Since Pax-QNR/Pax-6 is expected to control gene expression, it may be possible that this gene is involved in the regulation of adhesion molecule expression and that this control may be involved in the formation of islets (7) via regulation of neural-cellular adhesion molecule, for example, in the pancreas. Regulation of this class of adhesive molecules might also be essential for structured formation of the neuroretina and neural tube as well. As homozygous mice for Pax-6 mutation (Sey) are available (35) we will soon be able to know whether Pax-6 has a function in the formation of the endocrine pancreas. To date, no results are available on the structure of the pancreas of mutant Sey. Human heterozygous for the Pax-6 mutation (Aniridia, AN) have been described (36) but no defects in the biological function of the pancreas in these patients have been reported, suggesting that in contrast to the eye, in the heterozygous situation Pax-6 product can fulfill its function in the pancreas.

MATERIALS AND METHODS

Cells and Plasmids Used

Islets of Langerhans were isolated from neonatal 4- to 5-week-old mice by collagenase digestion and Percoll gradient purification followed by selection of individual islet under a stereo microscope to yield pure preparations. Cell cultures derived from endocrine pancreas (β TC3, β TC12, α TC1-2, and α TC1-6) were maintained and passaged in Dulbecco's modified Eagles medium H21 (DME H21) supplemented with 5% horse and 5% fetal calf serum on gelatinized plates. Cell cultures derived from exocrine pancreas 256-6 were maintained and passaged in DME H21 supplemented with 10% horse serum, and the rat exocrine cell line AR4-2J was cultured in DME H21 supplemented with 10% fetal calf serum.

In Situ Hybridization

An EcoRI-HinDII fragment from MC29-QNR-2 containing the 5'-untranslated region sequence and the beginning of the paired domain (20) was subcloned into pSP64 and pSP65 plasmid vectors (Promega Biotec, Madison, WI) and used to prepare high specific activity 35 S-labeled RNA sense and anti-

sense probes. These probes were processed and used as previously described (37).

Expression of Pax-QNR Domains in Bacteria and Production of Rabbit Antisera

The appropriate fragments were obtained using the MC29-QNR2 plasmid as a template for PCR (the sequence of the oligonucleotides used are available upon request). The fragments correspond to sequences present in paired, fragments between paired and homeodomain, the homeo and the carboxyl domains of Pax-QNR containing 5' the BamHI restriction site and 3' the HindIII site. Amplified fragments were digested with BamHI and HindIII and ligated between the BamHI-HindIII sites of a pLC24-derived vector. This subcloning resulted in the in-frame fusion of the desired sequence to the first 99 amino acids of the polymerase of phage MS2. For expression, plasmids grown in LE392 (λ) were transferred into an *Escherichia coli* host (SG4044) containing a temperature-sensitive repressor of the PL promoter. Cultures of exponentially growing bacteria carrying the desired vector were induced at 42 C for 3 h. Bacterial pellets were washed twice, boiled in sample buffer, and electrophoresed in 15% SDS-PAGE. Proteins were visualized by staining with Coomassie brilliant blue and cut from the gel.

In Vitro Transcription

Plasmids pGEM4-MC29-QNR2 were used with a Promega transcription/translation kit. All reactions were performed according to the manufacturer's specifications.

Cell Labeling, Immunoprecipitation, Western Blotting, and V8 Analysis

CNR cells were incubated for 45 min in the presence of 100 μ Ci ml $^{-1}$ [35 S]methionine (Amersham, Arlington Heights, IL; specific activity, 1000 Ci mmol $^{-1}$), lysed in Radio Immuno Protection Assay-buffer, (RIPA) and immunoprecipitated as previously described (26) with rabbit anti-Pax-QNR sera (serum 11 against the paired domain, from amino acids 6 to 130; serum 12 against the amino acids located between paired and homeo from amino acids 133 to 190, serum 13 against homeo from amino acids 191 to 270, and serum 14 against the carboxyl-terminal part of the protein from amino acids 271 to 416). Immunoprecipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by fluorography.

Neuroretina, β TC12 cells, or pancreas from ten E9 chick embryos (5×10^5) were boiled in loading buffer, subjected to SDS-PAGE, and electrophoretically transferred to Immobilon membranes (Millipore Corp, Bedford, MA). Filters were treated for 60 min in blocking buffer (5% nonfat dry milk in PBS). Filters were then treated overnight in blocking buffer containing rabbit serum 13 diluted 1:200, followed by a 30-min wash in blocking buffer, 0.1% Tween 20. Bound antibodies were detected with an ECL detection kit (Amersham).

Partial digestion by *Staphylococcus aureus* V8 protease in gel slices containing [35 S]methionine-labeled proteins was essentially done as described in Ref. 38.

PCR Experiment

Total RNA (1 μ g) was converted to cDNA as described in Ref. 39. After heat inactivation at 95 C for 5 min, 2 μ l of the reaction mixture were prepared for PCR (Pharmacia apparatus with Taq polymerase, Taq buffer, Bioprobe) with 0.25 μ g of the appropriate oligonucleotide primers. The sequences of the primers were 5'-AGTGAAGAAGACAGTC12AGACTG, and CCAGGAAATAACTCTGGCTCAT for TFIID [194 base pairs (bp) expected to be amplified]. For Pax-6 the following oligonucleotides were used: 5'CGCACATGCAACACACATG and GTACTGAGACATGTCAGGTTTC (expected fragment, 128 bp).

Amplifications were carried out in a Pharmacia apparatus: 1.0-min denaturation at 94 C, 1.0-min annealing at 57 C, 1.0-min elongation at 72 C. For insulin the following oligonucleotides were used 5'-GCCGTGAAGTGGAGGACC, and TTCC(A/T)CCCAGCTCCAGTTG recognizing mouse insulin 1 and 2. Reaction products (expected fragment, 48 bp) were analyzed by electrophoresis through a 8% polyacrylamide gel.

Nuclear Extract Preparation and Gel Mobility-Shift Assays

Nuclei were prepared from cells and tissues as described previously (40). Crude nuclear extracts were prepared essentially as described in Ref. 41. All buffers contained a cocktail of proteinase and phosphatase inhibitors (0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ μ l each leupeptin, antipain, pepstatin, 2 mM benzamidine, 10 mM β -glycerophosphate, 2 mM levamisole, 10 μ M ortho-vanadate). Binding reactions were performed for 10 min on ice, using 1 ng radiolabeled DNA probe and 4 μ g nuclear extracts in 14 μ l 10% glycerol, 10 mM HEPES (pH 7.9), 30 mM KCl, 4 mM spermidine, 0.1 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol, 1 mM Na_2HPO_4 (pH 7.2), 1 μ g single stranded salmon sperm DNA, 1.5 μ g poly dI-dC. For competition experiments, a 100-fold m excess of unlabeled competitor oligonucleotides was added simultaneously with the probe. Samples were loaded on a 6% native polyacrylamide gel, run for 2 h at 180 V, and examined by autoradiography after exposure of the dried gel to a Kodak X-AR film at -70 C with an intensifying screen.

To prepare the DNA probes for gel shift analysis, an oligonucleotide containing the e5 binding site CTCAGCACCGCACGATTAGCACCGTTCCGCTTC and its complementary strand were synthesized, annealed, and used as a DNA probe after 5'-end labeling. The recognition sequence bound by the homeodomain is *underlined* and the paired domain recognition sequence is shown in *boldface*.

UV Cross-Linking Assays

DNA probes were prepared by 3'-end annealing of complementary 10 mer primers that were then extended with Klenow fragment of DNA polymerase I and 50 μ Ci (3000 Ci/mmol; Amersham) of each α [³²P]-labeled dATP, dCTP, dGTP, and 5 mM 5-BrdUTP, and purified on native 20% polyacrylamide gels. Cross-linking assays were performed using 5 ng probe DNA and 30 μ g nuclear extracts (30 μ l final volume). After the binding reaction a scaled-up band-shift assay was performed, and the gel was exposed to UV irradiation for 10 min on a UV-transilluminator (302 nm) and autoradiographed. Retarded complexes were cut out from the gel and the acrylamide piece was loaded on a 10% SDS-PAGE. Molecular size of the DNA-protein complexes was calculated after autoradiography.

Acknowledgments

We thank Christine Dozier and Bob Lafyatis for critical reading of the manuscript. We thank D. Hanahan for the gift of BTC and α TC cell lines.

Received July 14, 1993. Re-revision received March 31, 1994. Accepted March 31, 1994.

Address requests for reprints to: Simon Saule, Differentiation Cellulaire et Moléculaire, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue Calmette-BP.245, 59019 Lille/Cedex-France.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, the Association Française Retinitis Pigmentosa, and the Association pour la Recherche sur le Cancer.

* Present address: Ecole Normale Supérieure ULM, Laboratoire de Physiopathologie du Développement, 75230 Paris Cedex 05 France.

REFERENCES

- Alpert S, Hanahan D, Teitelman G 1988 Hybrid insulin genes reveal a developmental lineage for pancreatic endocrine cells and imply relationship with neurons. *Cell* 53:295-308
- Teitelman G, Lee GK 1987 Cell lineage analysis of pancreatic islet cell development: glucagon and insulin cells arise from catecholaminergic precursors present in the pancreatic duct. *Dev Biol* 121:454-466
- Polack JM, Bloom SR, Maramba PJH 1984 Neuron-specific enolase; a marker for neuroendocrine cells. In: Steiner DF, Frenkel M (eds) *Evolution and Tumor Pathology of the Neuroendocrine System*. American Physiology Society, Washington, DC, vol 1:25-66
- Okada Y, Taniguchi Shimada C 1976 High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science* 194:620-622
- Teitelman G, Lee GK, Alpert S 1987 Cell lineage analysis of pancreatic exocrine and endocrine cells. *Cell Tissue Res* 250:435-439
- Reetz A, Solimena M, Matteoli M, Folli F, Takei K, De Camilli P 1991 GABA and pancreatic b-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO J* 10:1275-1284
- Möller CJ, Christgau S, Willamson MR, Madsen OD, Zhao N, Bock E, Baekkeskov S 1992 Differential expression of neural cell adhesion molecule and cadherins in pancreatic islets, glucagonomas and insulinomas. *Mol Endocrinol* 6:1332-1342
- Teitelman G 1990 Insulin cells of pancreas extend neurites but do not arise from the neuroectoderm. *Dev Biol* 142:368-379
- Le Douarin N 1988 On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell* 53:169-171
- Kissinger C, Liu B, Martin-Blanco E, Kornberg T, Pabo C 1990 Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63:579-590
- Ingraham HA, Chen R, Manganiam H, Elsholtz S, Flynn CR, Lin DM, Simmons L, Swanson L, Rosenfeld MG 1988 A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55:519-529
- Frain M, Swart G, Monaci P, Nicosia A, Stämpfli S, Frank R, Cortese R 1989 The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* 59:145-157
- Karlson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T 1990 Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344:879-882
- German MS, Wang J, Chadwick RB 1992 Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev* 6:2165-2176
- Walther C, Guenet J-L, Simon D, Deutch U, Jostes B, Goulding MD, Plachov D, Balling R, Gruss P 1991 Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* 11:424-434
- Treisman J, Harris E, Desplan C 1991 The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev* 5:594-604
- Kessel M, Gruss P 1990 Murine developmental control genes. *Science* 249:374-379
- Walther C, Gruss P 1991 Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113:1435-1449
- Martin P, Carriere C, Dozier C, Quatannens B, Mirabel M-A, Vandenbunder B, Stehelin D, Saule S 1992 Characterization of a paired box- and homeobox-containing quail

- gene (Pax-QNR) expressed in the neuroretina. *Oncogene* 7:1721-17285
20. Dozier C, Carrière C, Grévin D, Martin P, Quatannens B, Stehelin D, Saule S 1992 Structure and DNA-binding properties of Pax-QNR a paired box- and homeobox-containing gene. *Cell Growth Differentiation* 4:281-289
 21. Efrat S, Linde S, Kofod H, Spector D, Delannoy M, Grant S, Hanahan D, Baekkeskov S 1988 Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-*oncogene*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9037-9041
 22. Ornitz DM, Hammer RE, Messing A, Palmiter RD, Brinster RL 1987 Pancreatic neoplasia induced by SV40 T-antigen expression in acinar cells of transgenic mice. *Science* 238:188-193
 23. Goulding MN, Lumsden A, Gruss P 1993 Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development* 117:1001-1016
 24. Beaupin D, Dieterlen-Lievre F 1974 Etude immunocyto-*logique* de la différentiation du pancreas endocrine chez l'embryon de poulet. I. Ilots à insuline. *Gen Comp Endocrinol* 22:62-69
 25. Sratowa C, Rutter WJ 1986 Selective regulation of trypsin gene expression by calcium and by glucose starvation in rat exocrine pancreas cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4292-4296
 26. Carriere C, Plaza S, Martin P, Quatannens B, Bailly M, Stehelin D, Saule S 1993 Characterization of quail Pax-6 (Pax-QNR) proteins expressed in the neuroretina. *Mol Cell Biol* 13:7257-7266
 27. Quinn LA, Moore G, Morgan R, Woods L 1979 Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes and homogeneously staining regions. *Cancer Res* 39:4914-4924
 28. Bigler J, Hokanson W, Eisenman RN 1992 Thyroid hormone receptor transcriptional activity is potentially auto-regulated by truncated forms of the receptor. *Mol Cell Biol* 12:2406-2417
 29. Delmas V, Laoide B, Masquillier D, de Groot R, Foulkes N, Sassone-Corsi P 1992 Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4226-4230
 30. Goulding MD, Chalepakis G, Deutch U, Erselius JR, Gruss P 1991 Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J* 5:1135-1147
 31. Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T 1993 IPF1, a homeo-
domain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J* 12:4251-4259
 32. Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S, Montminy M 1993 Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol* 7:1275-1283
 33. Treisman J, Gónczy M, Vashishtha H, Desplan C 1989 A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* 59:553-562
 34. Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D, Di Lauro R 1992 Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol Cell Biol* 12:4230-4241
 35. Hill RE, Favor J, Hogan B, Ton CC, Saunders G, Hanson I, Prosser J, Jordan T, Hastie N, Heyning VV 1991 Mouse *small eye* results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354:522-525
 36. Ton CH, Hirvonen H, Miwa H, Weil M, Monaghan P, Jordan T, Van Heyningen V, Hastie N, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, Royer-Pokora B, Collins F, Swaroop A, Strong LC, Saunders GH 1991 Positional cloning and characterization of a paired box-and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67:1059-1074
 37. Queva C, Ness SA, Grasser FA, Graf T, Vandenbunder B, Stehelin D 1992 Expression patterns of *c-myb* and of *v-myb* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo. *Development* 114:125-133
 38. Cleveland DW, Fisher SG, Kirschner MW, Laemmli UK 1977 Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analyses by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 252:1102-1106
 39. Radvanyi F, Christgau S, Baekkeskov S, Jolicoeur C, Hanahan D 1993 Pancreatic b cells cultured from individual preneoplastic foci in a multistage tumorigenesis pathway: a potentially general technique for isolating physiologically representative cell lines. *Mol Cell Biol* 13:4223-4232
 40. Spegelaere P, van Hille B, Spruyt N, Faisst S, Cornelis J, Rommelaere J 1991 Initiation of transcription for the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a *c-Ha-ras* oncogene. *J Virol* 65:4919-4928
 41. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG 1983 Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11:1475-1489

DEUXIEME PARTIE

«The quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNA are expressed from two promoters used differentially during retina development and neural differentiation.»

Serge Plaza, Christine Dozier, Nathalie Turque and Simon Saule

Molecular and Cellular Biology, 15, 3344-3353, 1995

Les ARNm du gène Pax-QNR sont initiés à partir de deux promoteurs et sont différemment exprimés au cours du développement de la neurorétine et de la différenciation neuronale.

A. Isolement de deux promoteurs P0 et P1

Etudier la régulation transcriptionnelle de *Pax-QNR* nécessitait de caractériser ses régions de promotion. Dans un premier temps fut caractérisée la région de promotion à partir de laquelle est synthétisé l'ARNm correspondant à l'ADNc isolé de la banque de cellules de neurorétine de Caille transformées par *v-myc*. Cette région, appelée P0, peut fonctionner dans des cellules n'exprimant pas *Pax-QNR* comme les QEC, ce qui suggère que cette région ne possède pas les éléments de régulation restrictifs n'autorisant son activité que dans les cellules de neurorétine. En outre, l'activité transcriptionnelle de P0 est régulable par la protéine p46 codée par *Pax-QNR* et la présence du domaine paired est essentielle pour la transactivation de P0 par p46 (Plaza *et al.*, 1993).

L'isolement de plusieurs ARNm différant dans leur extrémité 5' suggérait l'existence d'au moins un promoteur supplémentaire. Effectivement, un second promoteur, appelé P1, a été caractérisé (Figure 2). P1 gouverne la synthèse des ARNm A1 (Figure 1A). Il s'agit d'un promoteur interne situé 3 kpb en aval de P0, pouvant aussi fonctionner dans des cellules non neuronales de type QEC et que la p46 peut également transactiver (Figure 4), entretenant ainsi une boucle d'autorégulation.

B. Expressions différentielles des ARNm initiés à partir de P0 et P1.

Des expériences d'hybridation *in situ* nous ont permis d'observer que les messagers initiés à partir de ces deux promoteurs étaient exprimés dans les mêmes territoires, à savoir le tube neural, la cornée et la neurorétine, plus précisément dans les mêmes couches cellulaires de la neurorétine (Figure 5). Un seul territoire d'expression échappe à cette règle: les messagers initiés à partir de P0 ne sont pas détectés dans le pancréas endocrine au contraire des messagers A1.

Par contre, des expériences de protection à la RNase nous ont révélé que les deux types de messagers présentaient des cinétiques d'expression différentes. L'expression des ARNm initiés à partir de P0, détectée à partir de E6, augmente jusqu'à E8 puis se stabilise jusqu'à l'éclosion, tandis que celle des ARNm initiés à partir de P1 est maximale à E6 et reste constante tout au long du développement jusqu'à l'éclosion (Figure 6). Ces deux promoteurs sont donc probablement régulés par des facteurs différents.

C. P0 s'active avec l'apparition du phénotype neuronal

La cinétique d'expression des ARNm initiés à partir de P0 semble indiquer que l'activation de P0 démarre avec la neurogenèse de la neurorétine (E6 Figure 6). Cette hypothèse s'est trouvée confortée avec la mise en évidence de l'activation de P0 lors du processus de transdifférenciation des cellules de la rétine pigmentaire cultivées ou bien dans les cellules de rétine pigmentaires transformées par MC29 mais maintenues avec le phénotype épithélial, où seuls les messagers initiés à partir de P1 sont détectés par protection à la RNase (Figure 9).

On peut supposer qu'avec la mise en route de P0 dans les stades plus tardifs du développement, la quantité des cinq isoformes codées par les messagers initiés à partir de P1 sera augmentée de celle apportée par la traduction des messagers initiés à partir de P0. Les gènes requis pour la mise en place du phénotype neuronal seront probablement sensibles à des quantités de protéines Pax différentes de ceux requis pour le maintien du phénotype épithélial, l'oncogène *v-myc* étant peut-être responsable de l'apparition d'un contexte favorable à cette sensibilité ou bien favorable à l'activation de P0.

Quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) mRNAs Are Expressed from Two Promoters Used Differentially during Retina Development and Neuronal Differentiation

SERGE PLAZA, CHRISTINE DOZIER, NATHALIE TURQUE, AND SIMON SAULE*

Laboratoire de Différenciation Cellulaire et Moléculaire, CNRS EP56, Institut Pasteur, 59019 Lille Cedex, France

Received 6 January 1995; Returned for modification 3 February 1995; Accepted 6 March 1995

During investigations on the regulation of the *Pax-6* gene, we characterized a cDNA from quail neuroretina showing a 5' untranslated region distinct from that previously described and initiated from an internal promoter. Using RNase protection and primer extension mapping, we localized this second quail *Pax-6* promoter, termed P1. As reported for the already described P0 promoter, P1 was also transactivated in vitro by the p46^{*Pax-QNR*} protein. RNase protection assays performed with quail neuroretina RNA showed that P1-initiated mRNAs were detected before the P0-initiated mRNAs, remained constant up to embryonic day 8, and decreased slowly thereafter whereas, P0-initiated mRNAs accumulated up to embryonic day 8. In contrast, quail retinal pigmented epithelium expressed only the P1-initiated mRNAs. Transformation of these cells by the *v-myc* oncogene induced neuronal traits in the culture, which thereafter, in addition to the P1-initiated mRNAs, expressed *Pax-QNR* from the P0 promoter. These results suggest that expression of the quail *Pax-6* gene is under the control of different regulators through alternate promoters, P0 being activated at the onset of neuronal differentiation.

Transcriptional regulation by the homeobox proteins is thought to coordinate the precise spatial and temporal sequence of growth and differentiation (13). Through homology to the paired box, nine paired-box-containing genes, the *Pax* gene family, have been isolated in vertebrates (40). Mutations in the *Pax-6* gene have been associated with the mouse mutant small eye (19), the corresponding human gene (4N) has been found deleted or mutated in aniridia (17, 18), and the *Drosophila eyeless* gene is *Pax-6* (28). The *Pax-6* gene is expressed in the developing central nervous system, in the optic cup, lens, and overlying epithelium, in the neuronal layers of the retina, and in the endocrine pancreas (22, 38, 39). The restricted expression of this gene suggests transcriptional regulation of expression by tissue-specific factors. Among several mechanisms used to restrain gene expression (1), alternate promoter usage is frequently operative (34, 35, 41). However, to date little is known about the regulation of *Pax-6*.

We have recently characterized the quail *Pax-6* gene, named *Pax-QNR* (22), defined its complete exon-intron organization (22) and characterized a promoter region termed P0 (26). In this report, we describe the isolation of another cDNA (A1) linear to the previously characterized MC29-QNR2 cDNA except in its most 5' untranslated region (5' UTR) sequence. The A1 mRNA was initiated from an internal promoter termed P1, located 3 kb downstream from the previously described P0 promoter (26). The P1 promoter was able to drive chloramphenicol acetyltransferase (CAT) expression both in quail neuroretina (QNR) cells and in quail embryo cells (EC) and, like P0, responded positively to the p46^{*Pax-QNR*} protein. As shown by RNase protection assays, *Pax-QNR* mRNAs initiated from the P1 promoter were detected before the mRNAs initiated from the P0 promoter during neuroretina development. Moreover, P0- and P1-initiated mRNAs were

differentially accumulated during neuroretina development: while P0-initiated transcripts increased from embryonic day 5 (E5) to E8, the P1-initiated transcripts decreased. Only the mRNAs initiated from the P1 promoter could be detected in the quail pigmented retinal epithelium (RPE) and were not modulated during embryo development. However, transformation of these cells by the MC29 virus encoding the *v-Myc* transcription factor can induce neuronal traits in the culture, and these transdifferentiated neuronal cultures show expression of P0-initiated mRNAs. These mRNAs were not expressed in MC29 RPE cultures without neuronal morphology. These results suggest that a shift in transcriptional regulation occurs in quail *Pax-QNR* gene expression during neuronal differentiation and that P0 initiation is induced in these cells.

MATERIALS AND METHODS

Cloning and DNA sequencing. The cDNA A1 was isolated from a cDNA library constructed in the pCDM8 vector from 15-day-old quail spinal cords (kindly supplied by C. Ducloux), using MC29-QNR2 cDNA as a probe. The 5' UTR of the cDNA A1 as well as the homologous genomic DNA were ligated into M13 vectors mp18 and mp19. The nucleotide sequence was determined in both orientations by the dideoxy sequencing method, using an Applied Biosystem 370A automatic sequencer.

Mapping of transcription initiation sites. Total RNA from QNR or heart was isolated by the guanidinium isothiocyanate method. For the RNase protection assays, a 325-bp *SsrII-NcoI* (from -153 to +168) genomic fragment was blunt ended and subcloned into the blunt-ended *PstI-HincII* sites of the pGEM3 vector and used as described Dozier et al. (12) except that the hybridizations were performed at 50°C. The protected fragments were separated on a 5% sequencing gel. For the primer extension analysis, a 20-base synthetic oligonucleotide (5'-AAATGAGGCCCGCCCGGCTCCCTTTTCA-3') complementary to bases -24 to +2 of the *Pax-QNR* P1 promoter sequence shown in Fig. 1B was end labeled with T₄ polynucleotide kinase. The reaction was performed with 1 µg of poly(A)⁺ RNA prepared by using an mRNA purification kit (Pharmacia) and 10⁶ cpm of labeled primer as described previously (20) except that the annealing was performed overnight at 45°C in 400 mM NaCl-1 mM EDTA-40 mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES; pH 6.4)-80% formamide. For the external primer extension analysis, 100 µg of total RNA or 1 ng of in vitro-synthesized A1 sense RNA (used as a positive control) was mixed with 1 ng of single-stranded DNA of the 416-bp *SsrII* genomic fragment (from -153 to +263) cloned into mp18 vector in 26 µl of 400 mM NaCl-1 mM EDTA-40 mM PIPES (pH 6.4)-80% formamide, heated at 80°C for 10 min, and incubated overnight at

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Différenciation Cellulaire et Moléculaire, CNRS EP56, Institut Pasteur, 1 Rue Pasteur, 59019 Lille Cedex, France. Phone: (33) 20 87 77 86. Fax: (33) 20 87 79 08.

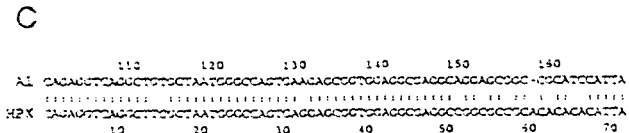
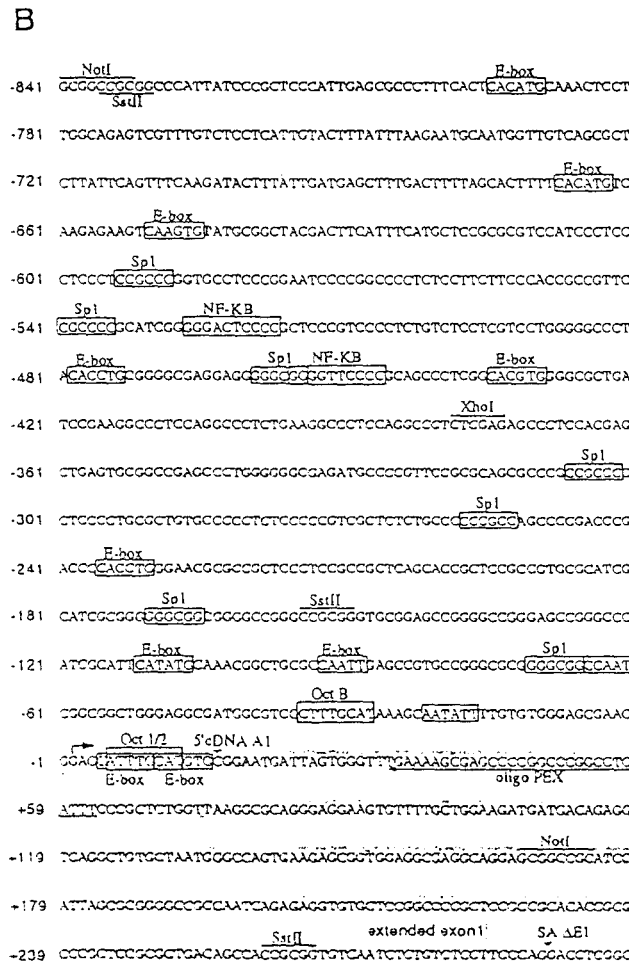
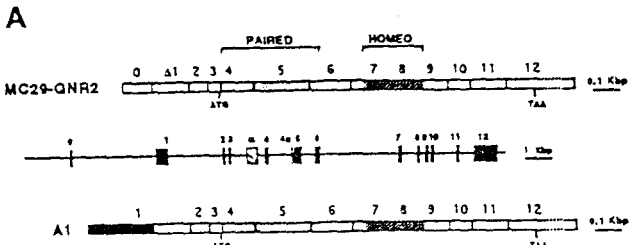


FIG. 1. (A) Exon structure of the quail *Pax-QNR* gene and comparison between the MC29-QNR2 and A1 cDNAs. The boxes indicate exons. (B) Sequence of the *Pax-QNR* P1 promoter. The sequence corresponds to a 1,140-bp genomic fragment of the *Pax-QNR* gene. The arrow represents the transcriptional start site. The sequence is numbered from the start site. The sequence of the ATG-LTR is shaded. SA, splice acceptor; the exon 11 LTR junction. (C) Comparison of the 3' UTR sequences of the A1 cDNA and the human HBPX-2 cDNA (HPX-2) described in reference 15). Double dots indicate identity of bases at those positions.

45°C. After ethanol precipitation, the pellet was resuspended in a final volume of 10 μ l of *Taq* DNA polymerase buffer containing 20 U of RNasin (Promega) and 0.5 ng of 5' end-labeled universal sequencing primer, and the solution was incubated first at 60°C for 10 min and then at room temperature for 10 min. The elongation reaction was carried out in 15 μ l of *Taq* buffer at 60°C for 1 h in the presence of 330 μ M deoxynucleoside triphosphates and 5 U of sequencing-grade *Taq* DNA polymerase (Promega). After RNase treatment, the elongated fragments were analyzed on a 6% sequencing gel.

Construction of CAT reporter plasmids. The 1.011-kb *NotI* genomic fragment (from -839 to +168 of the P1 promoter sequence) was blunt ended and cloned in both orientations into the blunt-ended *Bam*HI site of the promoterless vector pBLCAT6. The P1 promoter sequences in the sense and antisense orientations with respect to the CAT gene were named pPIN^S and pPIN^{AS}, respectively. To obtain the 5'-deleted CAT construct pP1 Δ 5, the blunt-ended *NotI* promoter fragment was subcloned into the blunt-ended *Bam*III site of the promoterless pBLCAT5. The pPICAT5 construct obtained was digested with *Sph*I and *Sal*I, treated with exonuclease III, and subsequently treated with mung bean nuclease. The endpoint of the deletion was determined by Jidcoxy sequencing using an oligonucleotide corresponding to the vector sequence 5'-CAAGCGGATTAAGTTGGG-3' as the primer. To obtain the 5'-deleted CAT construct pPINXN, which contains the 352-bp *Xho*I-*NotI* P1 promoter fragment (from -379 to +172), pPIN^S was digested with *Sul*I and *Xho*I, blunt ended, and religated. The enhancer constructs pP0CAT EP and pPIN^SCAT EP were obtained by cloning a 460-bp *Eco*RV-blunt-ended *Pst*I fragment (containing a neuroretina-specific enhancer element described in reference 25), downstream of the CAT gene, into the *Sma*I site of pP0CAT and pPIN^SCAT, respectively. The pRSVCAT plasmid contains the CAT gene under the control of the Rous sarcoma virus (RSV) long terminal repeat.

Cell culture and virus. Dissociated QNR or RPE cells dissected from 7-day-old quail embryos were plated in Dulbecco modified Eagle medium-F12 (equal amounts by volume) medium containing 10% fetal calf serum, 1% vitamin MEM 100 \times , and 10 μ g of conalbumin per ml (complete medium). Dishes (60-mm diameter) containing 5 \times 10⁶ dissociated QNR cells in complete medium were infected with RSV (rNY68 virus (a gift of G. Calothy)) at 37°C. The infected cells were passaged four times on gelatin-coated dishes to allow the virus to spread, and the morphologically transformed cells were then cultured for an additional 2 days at either 37 or 41°C. RPE cells were infected with MC29 (RAV-1) virus as described previously (16) at low density and cultured on gelatin-coated dishes. The neuronal phenotype appeared after three passages, and areas of cells with this phenotype were isolated under a microscope and grown as a homogeneous population. For the mRNA stability studies, QNR cells extracted from 8-day-old embryos were plated on 100-mm-diameter dishes and treated 36 h later with 5 μ g of actinomycin D per ml for various times or 10 μ g of cycloheximide per ml for 3 h.

RNA extraction and RNase protection analysis. Total RNA was extracted from QNR dissected from E5 to E18 embryos and from hatched chickens or from actinomycin D- and cycloheximide-treated E8 QNR cells by the RNazol method (6). A 424-bp *Eco*RI-*Hin*II fragment corresponding to the 5' part of the MC29-QNR2 cDNA and cloned into the pGEM4 vector described by Dozier et al. (12) was used to synthesize the antisense RNA probe used as described previously (12). When the *GAPDH* RNA probe was used, RNase protections were performed with 2 μ g of RNA supplemented with 20 μ g of yeast tRNA.

Immunofluorescence analysis. Normal or MC29-infected RPE cells cultured on collagen-coated 12-mm-diameter microscope coverlips were fixed for 20 min with 3.7% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline and then treated with rabbit anti-90 \times 10³-M₁ bovine brain neuron-specific enolase (ICN) serum. Bound antibodies were revealed by using a swine anti-rabbit fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody (Dako).

Transfection and CAT assays. QNR cells and OEC were seeded at 5 \times 10⁶ cells per 90-mm-diameter dish in Dulbecco modified Eagle medium-10% fetal calf serum 24 h prior to transfection, performed by the calcium phosphate method. Cells were cotransfected with 1 or 10 μ g of CAT constructs and 0.5 μ g of plasmid pRSV β -gal, used as an internal control of transfection efficiency. For the experiments with the vector expressing the p46^{hPax-QNR} protein, cells were cotransfected with 1 μ g of the CAT construct and 5 μ g of pJ3 Ω 103 as described previously (2a).

In vitro transcription. To prepare the control A1 used in the external prime extension procedure, a 5' fragment of cDNA A1 (0.5-kbp *Hin*II) was cloned into the *Hin*II site of the pGEM4 vector. The sense RNA probe was transcribed in vitro from the *Eco*RI-linearized plasmid, using T7 polymerase as specified by the manufacturer (Promega).

Electrophoretic mobility shift assay and orthophenanthroline footprinting. The DNA probe used was the 222-bp Δ 5-*Xho*I fragment (from -611 to -380) [α -³²P]dCTP labeled with the Klenow fragment of DNA polymerase I (Boehringer). Gel retardation assays were performed with 1 μ l of reticulocyte lysates as described previously (12). For band shift assays with antibodies, reticulocyte lysates were incubated for 2 h at 37°C in binding buffer supplemented with 1 μ l of antiserum directed against the carboxy-terminal part of the Pax-QNR protein products (4) or 1 μ l of preimmune serum prior to introduction of the probe. Gel retardation assays were performed with 1 μ g of reticulocyte lysates or bacterial expressed paired domain, homeodomain, and carboxy-terminal domain as described previously (12). Orthophenanthroline-copper (Cu²⁺) footprinting was

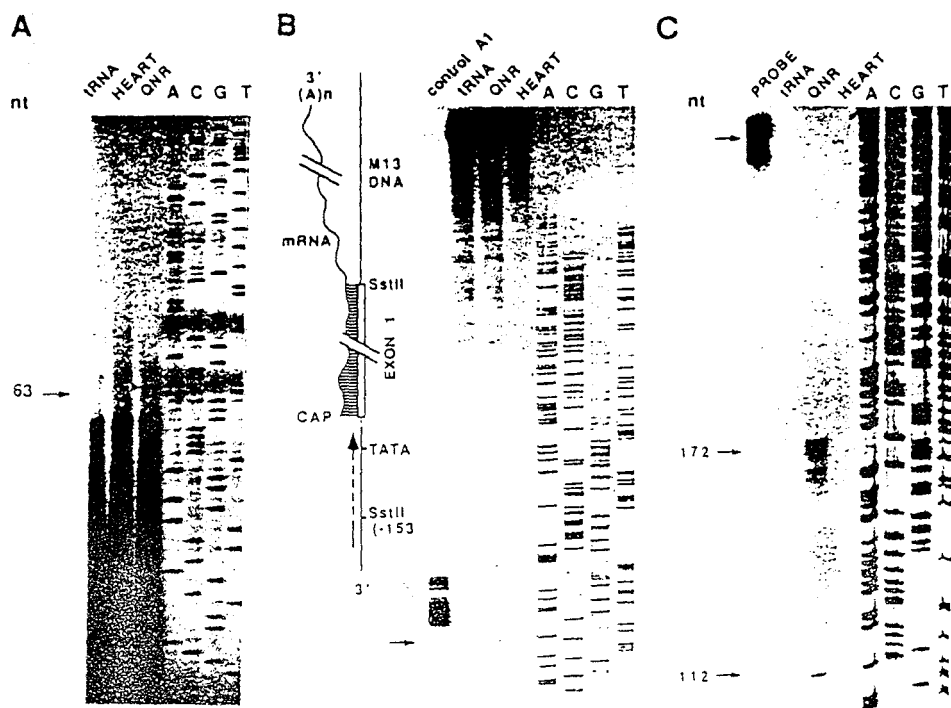


Fig. 2. Mapping of the transcription start sites of the P1 *Pax-QNR* promoter. (A) Primer extension analysis. One microgram of poly(A)⁺ quail RNA from QNR heart was hybridized to a 5'-end-labeled 30-mer oligonucleotide primer. After reaction with reverse transcriptase, the products were analyzed on a 6% sequencing gel along with a sequencing ladder (M13 mp18 template, using the 17-mer universal primer). The positions of the transcriptional start sites are indicated by arrows. (B) Mapping of transcription start sites by external primer extension analysis. An M13 mp18 DNA carrying the RNA-complementary strand of exon 1 and the promoter region (*Sst*II genomic fragment, from -153 to +263) was used as the template and hybridized to 100 μ g of total RNA from QNR or heart or 1 ng of in vitro-synthesized sense RNA (lane control A1). ³²P-end-labeled M13mp18 17-mer universal primer was hybridized, extended with *Taq* DNA polymerase, and analyzed on a 6% sequencing gel. (C) RNase protection analysis. Total RNA (20 μ g) from QNR or heart was hybridized with an antisense RNA probe prepared from the 325-bp *Sst*II-*Not*I genomic fragment. Following RNase digestion, the samples were analyzed on a 5% sequencing gel. The sequencing ladder (M13 mp18 template, using the 17-mer universal primer) was used to determine the number of nucleotides in the fragments protected by the RNAs, which are indicated by arrows.

performed essentially as described previously (26), using the 252-bp Δ 5-*Xho*I fragment and bacterially expressed paired-domain and homeodomain peptides and a fusion peptide MS2.

In situ hybridization. A 653-bp *Xho*I-*Asp* 718 genomic fragment encompassing exons 0 and 1 was cloned into the pGEM3 vector described previously (26) and used to synthesize the RNA probe specific for the P0-initiated mRNAs. To synthesize an RNA probe specific for the P1-initiated mRNAs, a 416-bp *Sst*II genomic fragment (from -153 to +263) was blunt-ended and cloned into the *Hinc*II site of the pGEM3 vector. Sense and antisense RNA probes were prepared with ³⁵S-UTP and used as described previously (38). The EMBL nucleotide sequence database accession number for the reported sequence is X62151.

RESULTS

Cloning and sequencing of the *Pax-QNR* promoter P1. The reported A1 cDNA is colinear to the MC29-QNR2 cDNA except in its most 5'UTR (Fig. 1A). This 5'UTR is encoded by genomic sequences immediately upstream from exon 1 (Fig. 1B). This cDNA was able to direct the synthesis of 4.6×10^3 - and $32/33 \times 10^3$ -*M_r* Pax-QNR proteins both in vitro and in vivo (37). A cDNA containing part of this 5'UTR was also found in humans (18), showing that the A1-specific 5'UTR sequences are phylogenetically conserved (Fig. 1C). Nothing is known regarding human Pax-6 promotion. Since alternative splicing within the 5'UTR is often combined with alternative promoter usage (21, 35), the presence of this different 5'UTR suggests that the A1 cDNA corresponds to an mRNA initiated from a promoter different from that already described (P0).

Determination of the transcriptional start site and functional analysis of the *Pax-QNR* P1 promoter. To determine whether the A1 mRNA is initiated from a distinct promoter, three different techniques were used to define the A1 transcriptional start site. For the primer extension experiments, a 5'-labeled 30-base primer complementary to cDNA sequences encoded by the *Pax-QNR* exon 1 (oligonucleotide PEX, positions +34 to +62 in Fig. 1B) was hybridized to 1 μ g of poly(A)⁺ RNA and was extended by reverse transcription. A faint primer extension product of 63 nucleotides (nt) appeared when QNR RNA, but not heart RNA, was used, suggesting that this product arises from specifically primed *Pax-QNR* mRNAs (Fig. 2A). This result was confirmed by an external primer extension analysis (11). In this experiment, total RNA from QNR or heart, or in vitro-synthesized A1 sense RNA (used as a positive control), was hybridized with antisense single-stranded DNA corresponding to the 416-bp *Sst*II genomic fragment (from -153 to +263 in Fig. 1B). The universal sequencing primer was annealed to the hybrid and *Taq* DNA polymerase was added to extend the primer up to the RNA cap site (diagram in Fig. 2B). One band was detected when QNR RNA, but not heart RNA, was used (Fig. 2B). The size of this elongated fragment localizes the transcriptional start site upstream from the beginning of the A1 cDNA, in agreement with the primer extension analysis. Next, we performed RNase protection assays with a 325-bp *Sst*II-*Not*I genomic fragment (from -153 to +163 in Fig. 1B) containing the extended exon 1 (E1). This fragment was subcloned into

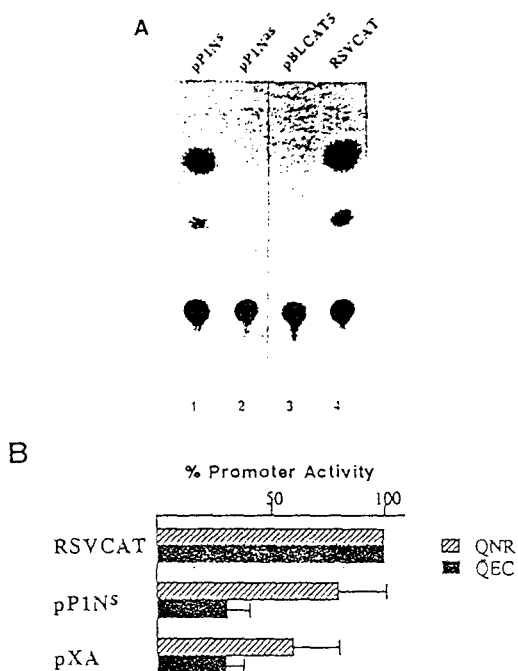


FIG. 3. CAT activities of the promoter region. (A) Plasmids pPIN^S and pPIN^{AS} contain the 1.01-kbp *NotI* fragment cloned in the pBLCAT6 reporter plasmid, upstream from the CAT gene in the sense and antisense orientations, respectively. QNR cells were transfected with 10 μ g of pPIN^S (lane 1), pPIN^{AS} (lane 2), and the promoterless vector pBLCAT5 (lane 3). One microgram of pRSVCAT was used as a positive control (lane 4). One-half microgram of pRSV β -gal was cotransfected with the CAT constructs as an internal control of transfection efficiency. (B) Expression of *Pax-QNR* promoters in QNR cells and QEC. pPIN^S or the P0 promoter pXA (10 μ g) or pRSVCAT (1 μ g) construct was cotransfected with 0.5 μ g of pRSV β -gal into either QNR cells or QEC. The results shown are the averages of three separate experiments, with the standard deviations indicated by error bars.

the pGEM3 vector, and a ³²P-labeled antisense RNA probe was hybridized to either QNR or heart RNA. A major fragment of approximately 170 nt in length was protected with QNR RNA but not with heart RNA (Fig. 2C). The RNA initiation site determined by this method was consistent with that defined by the primer extension experiments. Therefore, the nucleotide located 15 bases 5' to the beginning of the A1 cDNA was designated +1, the start of transcription initiation. These results indicate that the A1 mRNA is initiated at a new transcriptional start site involving a 5'-extended version of exon 1.

To determine whether this region exhibits promoter activity, a 1.010-bp *NotI* genomic fragment (from -839 to +168 in Fig. 1B) was inserted in both orientations upstream from the bacterial CAT gene of the promoterless pBLCAT6 vector. The resulting plasmids (pPIN^S and pPIN^{AS}) were transiently transfected into QNR cells in parallel with pRSVCAT as a positive control and the promoterless pBLCAT5 vector as a negative control and assayed for CAT activity. The results showed that the 1.010-bp *NotI* fragment in the correct orientation (pPIN^S; Fig. 3A, lane 1) but not the antisense orientation (pPIN^{AS}; Fig. 3A, lane 2) was able to drive the expression of the CAT gene in the transfected QNR cells. This promoter was also able to drive the expression of the CAT gene in the transiently transfected QEC, albeit with a lower efficiency but with an efficiency comparable to that of the previously characterized P0 promoter (Fig. 3B). This result shows the presence of a second *Pax-QNR* promoter (designated P1), located about 3 kbp

downstream from the *Pax-QNR* P0 promoter. Hereafter, we will refer to P0-initiated messengers for exon 0 containing mRNAs and P1-initiated messengers for mRNA containing the A1-specific part of exon 1, but it should be noted that *Pax-QNR* produced additional mRNAs not evidenced in the RNase protection assay (12).

***Pax-QNR* P1 promoter elements.** The sequence of the 5' flanking region of this downstream promoter (Fig. 1B) revealed the presence of a TATA box-like sequence (AATATT) and a canonical CAAT box, located respectively -23 and -66 nt upstream from the transcriptional initiation site, at positions consistent with those usually found in eukaryotic genes. A computer-assisted search revealed a number of potential regulatory elements: seven putative Sp1 binding sites matching 7 to 10 bp of the consensus Sp1 binding sequence (G/T) GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T) (14); 10 potential E binding sites for the basic region-helix-turn-helix-leucine zipper nuclear factors, such as Myc and USF (for a review, see reference 27); two NF- κ B-like sequences (consensus sequence GGGR[A/C/T]TYGCC [20]), and finally, close to the TATA box, two octamer binding sites at -36 and +5 (30, 33).

Autoregulation of the *Pax-QNR* P1 promoter by the Pax-QNR protein. To determine whether the Pax-QNR protein is able to regulate the *Pax-QNR* P1 promoter, equal amounts of the pPIN^S construct were cotransfected with increasing amounts of the pJ3 Ω 103 vector, which expresses the p46^{Pax-QNR} protein (described in reference 26), into QEC. Cell lysates were collected 2 days after transfection, and the levels of CAT activity present in the lysates were determined. Cotransfection of pPIN^S with the vector expressing the Pax-QNR protein resulted in a fivefold increase of CAT activity relative to the vector control (Fig. 4A; compare columns 1 and 2). Thus, the transcriptional activator p46^{Pax-QNR} acts similarly on the P0 (26) and P1 promoters in vitro.

To map the p46^{Pax-QNR}-responsive element(s) in the *Pax-QNR* P1 promoter, 5' deletion constructs of the promoter were tested for Pax-QNR responsiveness following transient cotransfection into QEC. Removal of the 5' sequences of the P1 promoter from the *NotI* site (position -839) to position -611 (construct p11 Δ 5) had no effect on the Pax-QNR responsiveness (Fig. 4A; compare columns 2 and 4). By contrast, further deletion to the *XhoI* site (position -379; construct p11 Δ N) abolished the Pax-QNR responsiveness (Fig. 4A; compare columns 5 and 6). This finding suggests that the 232-bp promoter fragment, between position -611 and the *XhoI* site (position -379), contains a p46^{Pax-QNR}-responsive element. We tested this fragment for direct p46^{Pax-QNR} protein-DNA binding by the electrophoretic mobility shift assay. The purified fragment was labeled and incubated with in vitro-synthesized p46^{Pax-QNR} protein. One DNA-protein complex was detected (Fig. 4B, lane 2, arrow). The formation of this complex was completely blocked after the addition of a specific Pax-QNR antiserum described by Carrière et al. (4) (Fig. 4B, lane 3) but not after the addition of preimmune serum (Fig. 4B, lane 4). These results demonstrate binding of the p46^{Pax-QNR} protein to the *Pax-QNR* P1 promoter sequences shown to mediate the Pax-QNR activation. The precise sequence recognized was further determined. A scaled-up band shift experiment was performed with bacterially expressed paired-domain and homeodomain peptides (26). The entire gel was treated with phenanthroline, and the free DNA and the DNA bound by the peptides were eluted and analyzed on a sequencing gel. Only a paired-domain-binding region was identified within the 232-bp Δ 5-*XhoI* fragment. Comparison of the P1 promoter Pax-QNR-binding site with the P0 (26), chicken α A-crystallin (10), mouse α A-crystallin (9), and mouse N-CAM L1 (5) Pax-6 binding sites is

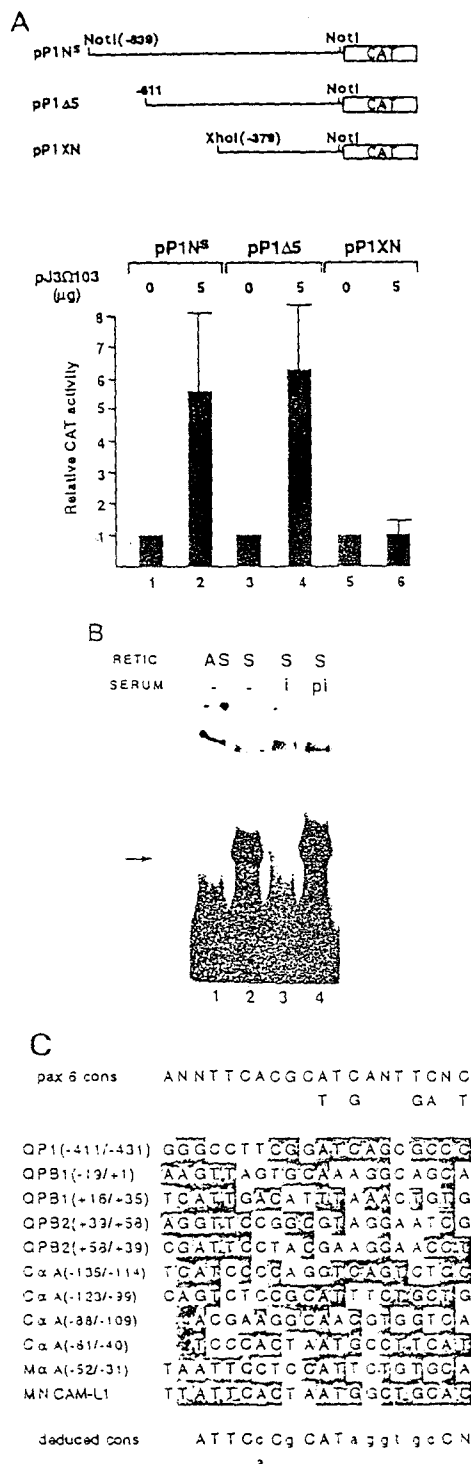


FIG. 4. Activation of the P1 *Pax-QNR* promoter by the Pax-QNR protein. (A) Structures of the deleted CAT constructs and analysis of their activation by Pax-QNR. QEC were transfected with 1 μ g of CAT constructs and 5 μ g of plasmid pJ3Q103 containing the MC29-QNR2 cDNA insert. The total amount of DNA in the transfection was kept constant by addition of the vector control, pJ3Q. CAT activities were determined with equal amounts of proteins. (B) Gel retardation analysis of DNA fragments spanning the *Pax-QNR* promoter region required for Pax-QNR-dependent activation. The end-labeled 232-bp *XhoI* fragment (from -411 to -380) was incubated in the presence of in vitro-translated Pax-QNR protein in the sense (+), lanes 2 to 4) or antisense (AS; lane 1) orientation, supplemented or not (-) with antiserum directed against the carboxy-terminal part of the *Pax-QNR* gene products (+; lane 3) or preimmune serum (pi; lane 4). (C) Alignment of the Pax-QNR (Pax-6) recognition sequences

shown in Fig. 4C. The alignment of the different sequences yielded a common pattern related to the Pax-6 binding site derived by PCR-based selection (15).

P0- and P1-initiated mRNAs are expressed in vivo in the ocular tissues. To study the expression patterns of the P0- and P1-initiated mRNAs in vivo, we performed in situ hybridization with riboprobes specific for each of these mRNAs (see Materials and Methods). We performed serial sections of quail or chicken embryos and hybridized them with the two specific riboprobes. The results (Fig. 5) show that the neuroretina at both E9 (quail; Fig. 5C and D) and E20 (chicken; Fig. 5E and F), the corneal epithelium (Fig. 5G and I), and the lens (not shown) expressed mRNAs initiated from P0 and P1. In the neuroretina, no difference in hybridization in the cellular layers could be distinguished with the two probes (Fig. 5C to F). In addition, the developing neural tube also expressed both mRNA species (Fig. 5A and B). In contrast, in the pancreas, the P1-initiated mRNAs were abundant whereas the P0-initiated mRNAs were not detected (37). Thus, these results indicate that both P0- and P1-initiated mRNAs are expressed in the same cell layers in the neuroretina.

P0- and P1-initiated mRNAs are expressed differentially during neuroretina development. To quantify the mRNAs initiated from P0 and P1, we performed RNase protection assays during neuroretina development. We used a riboprobe corresponding to the 5' *EcoRI-HincII* fragment of MC29-QNR2 cDNA which detects both the MC29-QNR2 mRNA initiated from the P0 promoter and the P1-initiated messengers (Fig. 6A and reference 12). The antisense labeled RNA probe was hybridized to total RNA extracted from QNR dissected from E5 to E18 embryos and from chicks after hatching. P0-initiated mRNAs could be detected as a full-length protected fragment of 424 nt, whereas the P1-initiated mRNAs (devoid of exon 0) could be detected as a smaller protected fragment of 323 nt (Fig. 6A). The results (Fig. 6B) show that in contrast to the P0-initiated mRNAs, the P1-initiated mRNAs were clearly detected in the neuroretina from E5 embryos: a P1/P0 ratio of 61 was determined by densitometric scanning of the 323- and 424-nt radiolabeled bands, and this ratio varied from 61 to 0.4 between E5 and E18. The analysis of three independent experiments shows that the amount of the P1-initiated mRNAs remained relatively constant from E5 to E8 and declined after this stage (Fig. 6C). In contrast, the P0-initiated mRNAs increased regularly from E5 to E8 (eightfold) and reached a plateau value at this stage (Fig. 6B). These results indicate that the two mRNA species are differentially expressed during neuroretina development.

P0- and P1-initiated mRNAs exhibit similar relative stabilities in E8 neuroretina. To explore the possibility that the two mRNA species undergo differential posttranscriptional processing, we studied the accumulation of these two messengers in the E8 neuroretina in the presence of cycloheximide (known as a protein synthesis inhibitor which stabilizes the messengers that are rapidly degraded under normal conditions) or actinomycin D (an inhibitor of RNA polymerases). As shown in Fig. 7A, the ratios between P0- and P1-initiated mRNAs are similar with or without cycloheximide or actinomycin D treatment, indicating no major differences in relative stability between

in the P1 promoter (QP1), the P0 promoter (QPB1 and QPB2 [26]), the chicken α -crystallin promoter (C α A [10]), the mouse α -crystallin promoter (M α A [9]), and the mouse N-CAM L1 promoter (5). Uppercase letters indicate at least 84% conservation of each nucleotide; lowercase letters indicate at least 56% conservation of each nucleotide. Pax-6 cons refers to the paired-domain consensus binding site derived by the PCR-based selection (15).

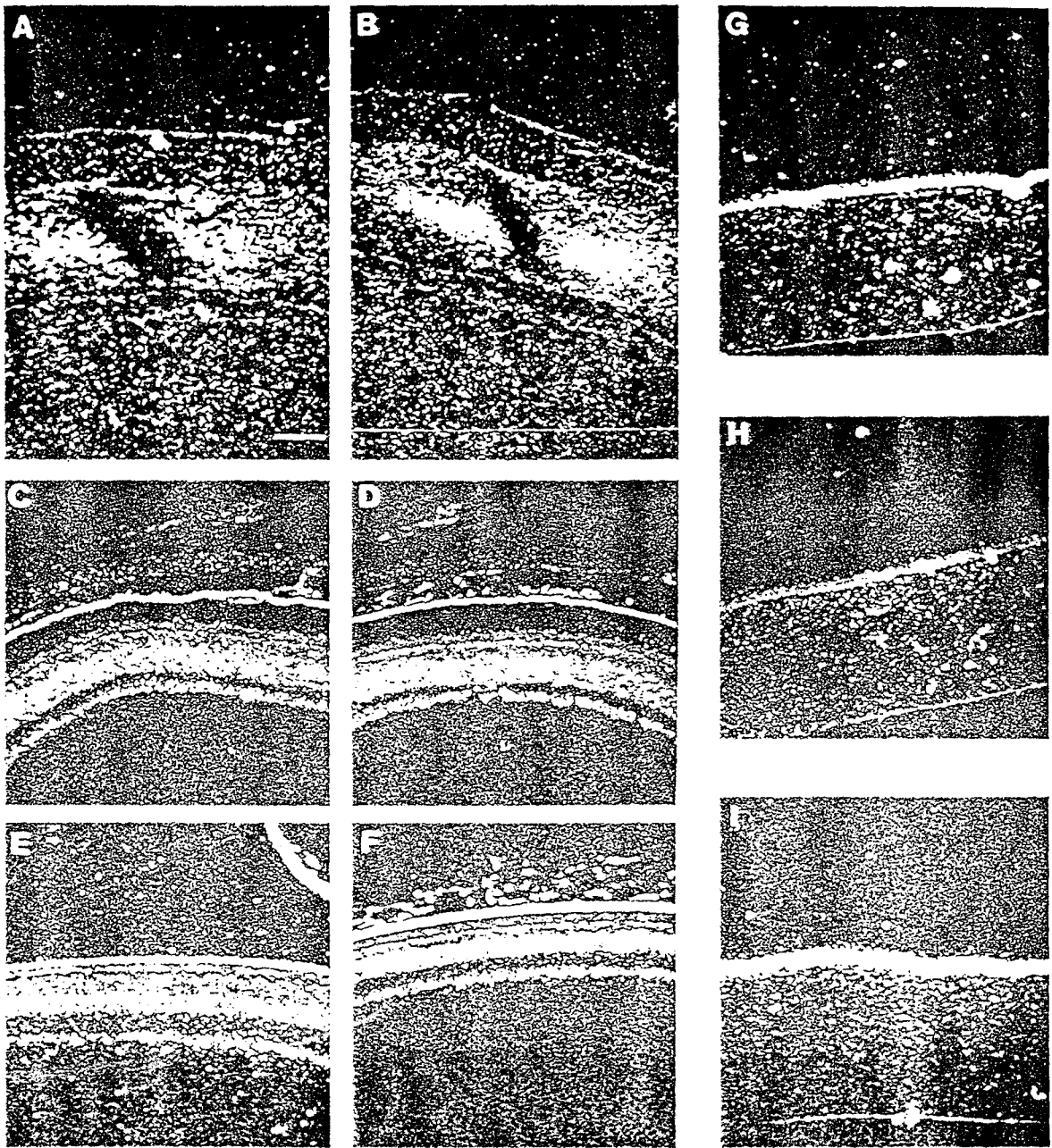


FIG. 5. Detection of P0- and P1-initiated *Pax-QNR* mRNAs by in situ hybridization in chick and mouse retina. (A) Hybridization of E3 chick transverse section with a ³⁵S-labeled P0 antisense probe (encompassing exon 3). (B) Adjacent section hybridized with a ³⁵S-labeled P1 antisense probe (encompassing the extended exon 3). (C) Hybridization of E20 chick eye section with a P0 antisense probe. (D) Adjacent section hybridized with a P1 antisense probe. (E) Hybridization of E20 mouse eye section with a P0 antisense probe. (F) Adjacent section hybridized with a P1 antisense probe. (G) Hybridization of E20 mouse ocular section with a P0 antisense probe. (H) Adjacent section hybridized with a P0 sense probe as a control. (I) Adjacent section hybridized with a P1 antisense probe.

these two mRNA species. This ratio, close to 2, is found for E11 instead of E5 QNR (ratio close to 1; Fig. 6B). This may be explained by the 36 h of *in vitro* culture separating the plating time from extraction.

Differential *Pax-QNR* promoter usage is not linked to cellular proliferation events, since we have shown that the amount of the P0-initiated mRNAs is maximal after E5, during the period when the cellular proliferation declines. To determine whether this mRNA could be modulated by proliferation events, to test the possibility that an arrest in cellular growth could induce P0 initiation, we infected QNR cells with

an RSV mutant expressing a temperature-sensitive *src* gene (RSV-*src*NY68) known to maintain neuroretina proliferation at the permissive temperature (37°C) at a nonpermissive temperature (41°C); the cells stop growing [3]. We examined the expression of the *Pax-QNR* mRNAs by RNase protection assays performed with these cells cultured at 37°C or shifted to 41°C. The results (Fig. 7C) show that the P1/P0 ratios are similar at 37 and 41°C, indicating that stopping cell growth is not sufficient to modulate *Pax-QNR* initiation in QNR cells.

When E7 neuroretina is cultured *in vitro*, the P0-initiated mRNAs are rapidly lost (Fig. 7B; compare lane ES with lanes

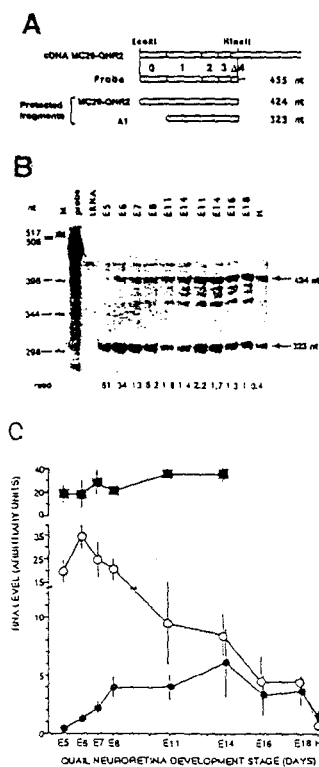


FIG. 6. Variations in the accumulation of P0- and P1-initiated *Pax-QNR* mRNAs during neuroretina development. (A) Structure of the 32 P-labeled RNA probe and predicted fragments (open box) derived from MC29-QNR2 DNA subcloned in a pGEM4 plasmid. Bold line, linker sequence. The 424-nt fragment should detect the P0-initiated mRNAs, whereas the 323-nt fragment will detect the P1-initiated messengers. (B) RNase protection experiments. Twenty micrograms of total RNA was used for each point. RNAs were extracted from embryonic QNR dissected on the indicated days and after hatching (lane H). Lane M, end-labeled *Hinf*I-digested pBR322. The intensity of the 323- and 424-nt fragments was measured by densitometry, and the 323-nt/424-nt fragment intensity ratio is shown below each lane. (C) The intensity of each protected fragment shown in panel B, measured by densitometry, was expressed in arbitrary units as the RNA level. As a control, the intensity of a *GAPDH* protected fragment was similarly measured. The results are the averages of three separate experiments until E14 and only two for late stages and after hatching. \blacksquare , *GAPDH*; \circ , P0-initiated messengers; \square , P1-initiated messengers.

ES P1 and P3), while the level of P1-initiated mRNAs remains constant. Since cultured QNR cells cease to proliferate (8), this is a further indication that P0 initiation is not linked to cell growth arrest. Disappearance of P0-initiated mRNAs could be explained if it is assumed that these messengers are expressed in postmitotic neurons which are lost in the culture. The fact that P0-initiated mRNAs were clearly detected in the RSV *rsNY68*-infected QNR cells (Fig. 7C, lane 37°C) but not in uninfected cultures could be explained by the *Src* protein activity. In fact, RSV *rsNY68* has been described as being able to induce the proliferation of infected neurons (7) and therefore to maintain them in the culture. Thus, P0-initiated mRNA expression in the neuroretina after E5 may be concomitant with the onset of neuronal differentiation rather than with the decrease in cellular proliferation.

P0-initiated mRNAs are expressed during neuronal differentiation. During the study of the effect of *v-src* on the differentiation process, we observed that the RPE cells (Fig. 8A) infected with the MC29 virus became transformed (Fig. 8B) and acquired neuronal traits. These included neuronal morphology with long cellular processes (Fig. 8C) and the expres-

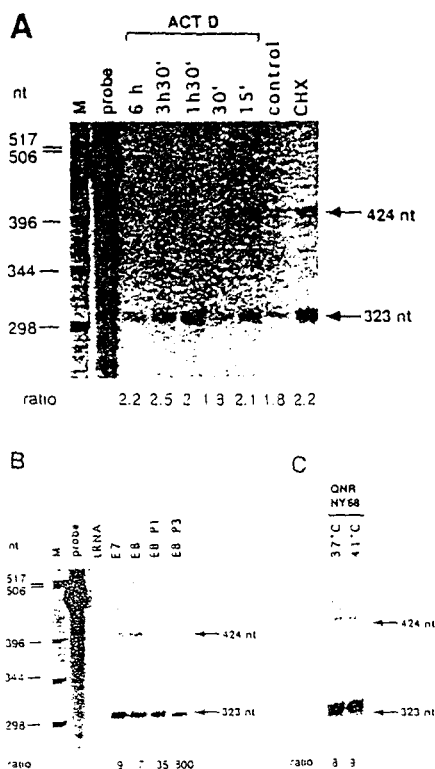


FIG. 7. Study the stability of P0- and P1-initiated *Pax-QNR* mRNAs in E8 neuroretina. (A) RNase protection experiment performed with 20 μ g of total RNA isolated from neuroretina treated 36 h after plating as indicated at the top. ACT D, actinomycin D; CHX, cycloheximide. (B) RNase protection experiment performed with RNA from neuroretina dissected from E7 or E8 quail embryos or extracted after in vitro propagation. P1 and P3 refer to neuroretina after one and three passages, respectively. (C) RNase protection experiment performed with RNA from neuroretina dissected from E7 quail embryos infected in vitro with RSV *rsNY68* passaged four times at 37°C. The transformed cells were then transferred at 41°C for 2 days and extracted. The intensity of each protected fragment was measured by densitometry, and the ratio of the 323-nt/424-nt fragment intensity is indicated below each lane. Lanes M are as in Fig. 6.

sion of several neuronal markers (such as neuron-specific enolase [Fig. 8D]) (a detailed characterization of these cells will be presented elsewhere). RNase protection assays performed on normal RPE show a low level of expression of P1-initiated mRNAs. In contrast to the neuroretina, no variation in the *Pax-QNR* expression can be observed during RPE development (Fig. 9A). In addition, RPE does not show expression of the P0-initiated mRNA (Fig. 9A). In cultured RPE, or in MC29-transformed RPE without neuronal traits, only the P1-initiated mRNAs are detected, albeit at a higher level than in RPE tissue (compare lane ES in Fig. 9A with lane RPE P3 or RPE MC29 in Fig. 9B). In contrast, MC29-transformed RPE exhibiting neuronal traits showed, in addition to the P1-initiated mRNAs, the P0-initiated mRNAs (424-nt protected fragment; Fig. 9B, lane RPE MC29 neurons). These results indicate that neurons efficiently accumulate *Pax-QNR* P0-initiated mRNAs.

A *Pax-QNR* neuroretina-specific enhancer element functions in a promoter-specific manner. All of the results described above suggest that the two *Pax-QNR* promoters P0 and P1 are under the control of different regulators. We have recently characterized within the *Pax-QNR* gene a neuroretina-specific enhancer element (located in exon α ; Fig. 1A) active on a CAT construct driven by the *Pax-QNR* P0 promoter (25). The activity of this enhancer prompted us to determine whether this

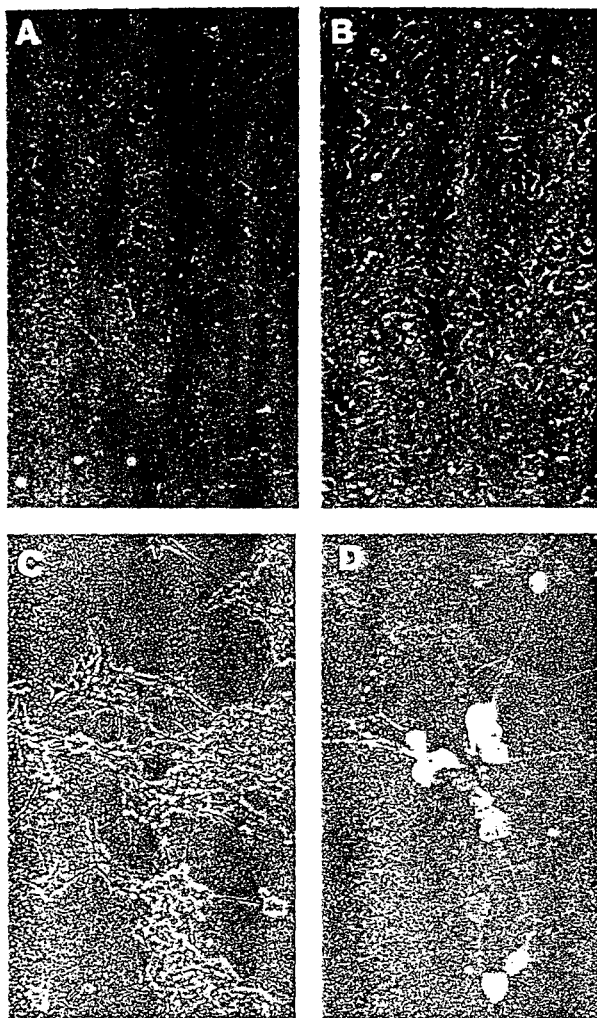


FIG. 8. Morphology of cultured RPE (A), MC29(RAV-1)-transformed RPE (B), and MC29(RAV-1)-transformed RPE cells exhibiting a neuronal phenotype (C). Antineuron-specific enolase immunoreactive proteins were detected on fixed MC29(RAV-1)-transformed RPE cells with fluorescein isothiocyanate-labeled swine anti-rabbit immunoglobulin as a secondary reagent (D).

element was able to enhance CAT activity driven by the *Pax-QNR* P1 promoter. For this purpose, a 460-bp *EcoRV-PstI* *Pax-QNR* genomic fragment, containing the enhancer element, was cloned 3' to the CAT gene in the pP0CAT or pP1^NCAT vector (Fig. 10). The resulting constructs (pP0CAT EP and pP1^NCAT EP; Fig. 10) and their parental plasmids pP0CAT and pP1^NCAT were transiently transfected into E7 QNR cells and QEC and assayed for CAT activity, expressed relative to the values for the parental plasmids. The results (Fig. 10) show that in E7 QNR cells, the enhancer element increased the CAT activity of the P0 promoter by about sixfold, whereas it failed to increase the CAT activity of the P1 promoter above the basal level. In QEC, which does not express the P0-initiated mRNAs, the enhancer element did not increase the CAT activity of either the P0 or P1 promoter above the basal levels (Fig. 10). Thus, the activity of this *Pax-QNR* neuroretina-specific enhancer is restricted to the P0 promoter, and this may explain the differential activity of P0 and P1 during neuroretina development.

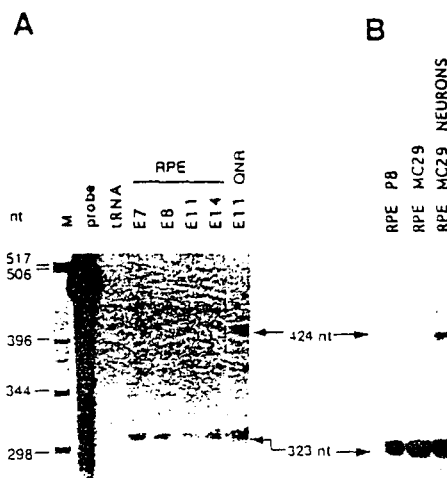


FIG. 9. Variations in accumulation of P0- and P1-initiated *Pax-QNR* mRNAs during RPE development. (A) RNAs were extracted from embryonic quail RPE dissected at indicated developmental stages and, as a control, from E11 neuroretina. (B) RNase protection experiment performed with RNA isolated from cultured cells as described in the legend to Fig. 8. Lane M is as in Fig. 6.

DISCUSSION

Pax-QNR (*Pax-6*) is expressed through two promoters. In this report, we present evidence that the quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) mRNAs are transcribed from two distinct promoters. We have isolated a cDNA clone, A1, showing a new 5'UTR sequence, which corresponds to a 5'-extended exon 1. By primer extension and RNase protection experiments, we have shown that the A1 initiation site is distinct from that described for the MC29-QNR2 mRNA (26) and maps 15 nt upstream from the 5' end of the corresponding cDNA clone. Moreover, this region is able to drive the expression of the CAT gene in transfected cells. Taken together, these results lead to the conclusion that the quail *Pax-6* gene contains a second promoter located 3 kbp downstream from the previously characterized P0 promoter (26).

The sequence of this promoter, P1, includes a TATA box-like sequence (position -23) and a canonical CAAT box (po-

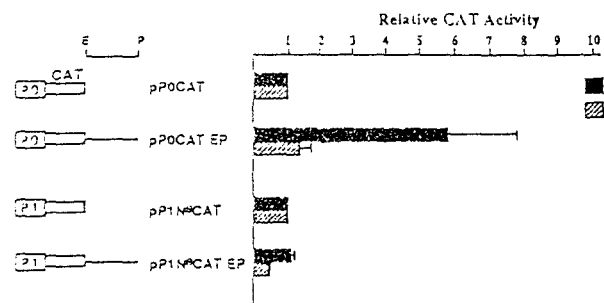


FIG. 10. Activity of a *Pax-QNR* neuroretina-specific enhancer element (25) in the two *Pax-QNR* promoters. pP0CAT EP and pP1^NCAT EP contain the 460-bp *EcoRV-PstI* fragment inserted in the natural orientation, 3' to the CAT gene in plasmids pP0CAT (26) and pP1^NCAT, respectively. These plasmids were transiently transfected into E7 QNR cells and QEC, and CAT activities were measured with an Instant Imager (Packard). CAT activities of the enhancer constructs are expressed relative to that for the parental plasmids. The *PstI* (P) and *EcoRV* (E) restriction enzyme sites used to generate the enhancer CAT constructs are marked. The results are the averages of three independent experiments performed in duplicate using two different DNA preparations, with the standard deviations indicated by error bars.

n -66) as well as putative binding sites for regulatory proteins. Of particular interest are the octamer motifs located at positions -36 and +5, which are not found in P0. Octamer motifs (ATGCAAAT) are found upstream from a number of tissue-specific and ubiquitously expressed genes. The octamer motif is bound by transcriptional regulators containing a DNA-binding motif referred to as the POU domain, and these proteins are developmental regulators (31, 32). Some of these genes are expressed in the developing eye (2), and the *Pit-1* gene, one of the POU family members (31), is expressed in the anterior pituitary gland, like the *Pax-6* gene (39).

Pax-QNR (*Pax-6*) mRNAs initiated from P0 or P1 are not modulated similarly during neuroretina development. Base protection assays show that P0- and P1-initiated mRNA species are not expressed similarly during neuroretina development. At E5, the P1-initiated mRNAs are detected first. The amounts of these mRNAs remained constant up to E8 and increased thereafter. P0-initiated transcripts were barely detected at E5. The amounts of these mRNAs increased regularly up to E8, remained constant up to E18, and declined after hatching. Therefore, the accumulation of the P0-initiated mRNAs is maximal during the period when cellular proliferation declines. Using the RSV mutant *tsNY68*, we showed that both P0- and P1-initiated mRNAs are expressed in proliferating cells and that their amounts are not modulated after the onset of cellular growth.

P0-initiated mRNAs follow neuronal differentiation. We found that in contrast to the P1-initiated mRNAs, the P0-initiated mRNAs disappear when E7 QNR cells are cultured in vitro. Indeed, the first cells lost from in vitro-cultured neuroretina are the small rounded neuronal cells. In RPE, only P1-initiated mRNAs are detected. RPE represents a useful model, since neuronal differentiation from RPE cells after basic fibroblast growth factor treatment of chicken RPE in vitro (24) or in vivo (23) has already been documented. Oncogenes usually block this differentiation process, but induction of differentiation has been documented for the *myc* oncogene in neural crest cells (16). MC29 carrying the *v-myc* oncogene transforms RPE cells and is able to induce neuronal differentiation, as judged by morphological criteria and neuron-specific enolase expression. Using MC29-infected RPE, we demonstrated that P0-initiated mRNAs are detected only after the expression of neuronal markers. This finding suggests that the expression of these mRNAs is associated with neuronal differentiation events and that factors present in the differentiating neurons are able to promote P0 initiation.

What distinguishes P0 from P1? We have recently characterized within the *Pax-QNR* gene a cis-acting DNA element enhancing the expression of the *Pax-QNR* P0 promoter in QNR cells but not in QEC or in RPE cells (25). The activity of this neuroretina-specific enhancer is restricted to the P0 promoter, since the P1 promoter remains unresponsive to it. Moreover, in QNR cells, the activity of this enhancer is weak at E5 and high at E7. E5 and parallels the level of expression of P0-initiated mRNAs (25). These results suggest that this enhancer participates, in a developmentally regulated way, in P0 initiation and that the two *Pax-QNR* promoters (P0) and P1 undergo differential regulation.

P0 initiation is induced upon neuronal differentiation. Why would P0 initiation be necessary in these cells since P1 initiation is also occurring? This may be because some critical event taking place during the neuronal differentiation is dependent on the amount of Pax-QNR proteins. Indeed, the dominant phenotype obtained with heterozygous animals in which only one copy of *Pax-6* is present demonstrates the importance of the protein dosage for Pax-6 function (17, 36). A distinct ini-

tiation site used by neurons may be the way to increase the amount of *Pax-QNR* mRNAs and proteins in these cells without affecting the amount of *Pax-QNR* mRNAs and proteins in the neighboring cells. This may suggest that Pax-QNR target promoters could be regulated differentially depending on the amount of Pax-QNR transcription factor present in the cell. Since the nucleotide sequence of the Pax-6 binding sites already identified is heterogeneous, it is conceivable that the Pax-6 binding affinity and transcriptional response differ from one site to another. Therefore, the amount of Pax-6 required to transactivate a particular gene may be dependent on the binding site(s) present in the promoter, and a gradient in the protein amount may be a way to activate distinct target genes during retinal differentiation. In addition, these observations suggest that mutations located outside the *Pax-6* locus and affecting the promoter usage, but not the protein structure, may be involved in some aniridia phenotypes when the Pax-6 coding sequence is found to be unaltered (36).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Martin, G. Buttice, and R. Pierce for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, Association pour la Recherche contre le Cancer, and Association Française Retinitis Pigmentosa.

REFERENCES

1. Bahiss, L. E., and J. M. Friedman. 1990. Regulation of *N-myc* gene expression: use of an adenovirus vector to demonstrate posttranscriptional control. *Mol. Cell. Biol.* 10:6700-6708.
2. Beebe, D. 1994. Homeobox genes and vertebrate eye development. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 35:2897-2900.
3. Calothy, G., F. Poirier, G. Dambrine, P. Mignatti, P. Combes, and B. Pessac. 1980. Expression of viral oncogenes in differentiating chick embryo neuroretinal cells infected with avian tumor viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44:83-90.
4. Carrière, C., S. Plaza, P. Martin, B. Quatannens, M. Bailly, D. Stehelin, and S. Saule. 1993. Characterization of quail Pax-6 (*Pax-QNR*) proteins expressed in the neuroretina. *Mol. Cell. Biol.* 13:7257-7266.
5. Chalepakis, G., J. Wijnholds, P. Giese, M. Schachner, and P. Gruss. 1994. Characterization of Pax-6 and Hoxa-1 binding to the promoter region of the neural cell adhesion molecule L1. *Dev. Cell Biol.* 13:891-900.
6. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
7. Crisanti Combes, P., A.-M. Lorinet, A. Girard, B. Pessac, M. Wassef, and G. Calothy. 1982. Expression of neuronal markers in chick and quail embryo neuroretina cultures infected with Rous sarcoma virus. *Cell Differ.* 11:45-54.
8. Crisanti Combes, P., A. Privat, B. Pessac, and G. Calothy. 1977. Differentiation of chick embryo neuroretina cells in monolayer cultures. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* 185:159-173.
9. Cvekl, A., F. Kashanchi, C. Sax, J. Brady, and J. Piatigorsky. 1995. Transcriptional regulation of the mouse α A-crystallin gene: activation dependent on a cyclic AMP-responsive element (CRE) and a Pax-6-binding site. *Mol. Cell. Biol.* 15:553-560.
10. Cvekl, A., C. Sax, E. Bresnick, and J. Piatigorsky. 1994. A complex array of positive and negative elements regulates the chicken α A-crystallin gene: involvement of Pax-6, USF, CREB and/or CREM, and AP-1 proteins. *Mol. Cell. Biol.* 14:7263-7276.
11. Deak, F., E. Barta, S. Mestric, M. Biesold, and I. Kiss. 1991. Complex pattern of alternative splicing generates unusual diversity in the leader sequence of the chicken link protein mRNA. *Nucleic Acids Res.* 19:4983-4990.
12. Dozier, C., C. Carrière, D. Grevin, P. Martin, B. Quatannens, D. Stehelin, and S. Saule. 1993. Structure and DNA-binding properties of *Pax-QNR*, a paired-box- and homeobox-containing gene. *Cell Growth Differ.* 4:281-289.
13. Duboule, D. 1994. *Guidebook to the homeobox genes*. Oxford University Press, Oxford.
14. Dynan, W. S., S. Sazer, R. Tjian, and R. T. Schinke. 1986. Transcription factor Sp1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter. *Nature (London)* 319:246-248.
15. Epstein, J., J. Cai, T. Glaser, L. Jepsen, and R. Maas. 1994. Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational change. *J. Biol. Chem.* 269:8355-8361.
16. Fauquet, M., D. Stehelin, and S. Saule. 1990. Myc products induce the

- expression of catecholaminergic traits in quail neural crest-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1546-1550.
17. Glaser, T., D. Walton, J. Cai, J. Epstein, L. Jepeal, and R. L. Maas. 1995. *PAX-6* gene mutations in Aniridia, p. 51-82. *In* J. R. Wiggs (ed.), *Molecular genetics of ocular disease*. Wiley-Liss, Inc., New York.
 18. Glaser, T., D. Waldon, and R. L. Maas. 1992. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human *pax-6* gene. *Nat. Genet.* 2:231-239.
 19. Hill, R. E., J. Favor, B. Hogan, C. C. Ton, G. Saunders, I. Hanson, J. Prosser, T. Jordan, N. Hastie, and V. V. Heyningen. 1991. Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature (London)* 354:522-525.
 20. Lenardo, M., and D. Baltimore. 1989. NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 83:6682-6686.
 21. Luo, X., K. Park, F. Lopez-Casillas, and K. Kim. 1989. Structural features of the acetyl-CoA carboxylase gene: mechanisms for the generation of mRNAs with 5' end heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4042-4046.
 22. Martin, P., C. Carrière, C. Dozier, B. Quatannens, M. Mirabel, B. Vandenbunder, D. Stehelin, and S. Saule. 1992. Characterization of a pairedbox- and homeobox-containing quail gene (*pax-QNR*) expressed in the neuroretina. *Oncogene* 7:1721-1728.
 23. Park, C., and M. Hollenberg. 1989. Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. *Dev. Biol.* 134:201-205.
 24. Pittack, C., M. Jones, and T. Reh. 1991. Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina *in vitro*. *Development* 113:577-588.
 25. Plaza, S., C. Dozier, M.-C. Langlois, and S. Saule. 1995. Identification and characterization of a neuroretina-specific enhancer element in the quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) gene. *Mol. Cell. Biol.* 15:892-903.
 26. Plaza, S., C. Dozier, and S. Saule. 1993. Quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) encodes a transcription factor able to bind and transactivate its own promoter. *Cell Growth Differ.* 4:1041-1050.
 27. Prendergast, G. C., and E. B. Ziff. 1992. A new bind for *myc*. *Trends Genet.* 8:91-96.
 28. Quiring, R., U. Walldorf, U. Kloter, and W. Gehering. 1994. Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the small eye gene in mice and aniridia in humans. *Science* 265:785-789.
 29. Romanoff, A. F. 1960. *The avian embryo*. MacMillan Co., New York.
 30. Rosales, R., M. Vigneron, M. Macchi, I. Davidson, F. H. Xiao, and P. Chambon. 1987. *In vitro* binding of cell-specific and ubiquitous nuclear proteins to the octamer motif of the SV40 enhancer and related motifs present in other promoters and enhancers. *EMBO J.* 6:3015-3025.
 31. Rosenfeld, M. 1991. POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes Dev.* 5:897-907.
 32. Ruvkun, G., and M. Finney. 1991. Regulation of transcription and cell identity by POU domain proteins. *Cell* 64:475-478.
 33. Singh, H., R. Sen, D. Baltimore, and P. A. Sharp. 1986. A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature (London)* 319:154-157.
 34. Strähle, U., A. Schmidt, G. Kelsey, F. Stewart, T. Cole, W. Schmid, and G. Schütz. 1992. At least three promoters direct expression of the mouse glucocorticoid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6731-6735.
 35. Timmusk, T., K. Palm, M. Metsis, T. Reintam, V. Paalme, M. Saarma, and H. Persson. 1993. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10:475-489.
 36. Tremblay, P., and P. Gruss. 1994. *Pax*: genes for mice and men. *Pharmacol. Ther.* 61:205-226.
 37. Turque, N. Unpublished data.
 38. Turque, N., S. Plaza, F. Radvanyi, C. Carrière, and S. Saule. 1994. *Pax-QNR Pax-6*, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol. Endocrinol.* 8:929-938.
 39. Walther, C., and P. Gruss. 1991. *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113:1435-1449.
 40. Walther, C., J.-L. Guenet, D. Simon, Ü. Deutch, B. Jostes, M. Goulding, D. D. Plachov, R. Balling, and P. Gruss. 1991. *Pax*: a murine gene family of paired box containing genes. *Genomics* 11:424-434.
 41. Yamasaki, T., H. Nakajima, N. Kono, K. Hotta, K. Yamada, E. Imai, M. Kuwajima, T. Noguchi, T. Tanaka, and S. Tarui. 1991. Structure of the entire human muscle phosphofructokinase-encoding gene: a two promoter system. *Gene* 104:277-282.

TROISIEME PARTIE

**« C-Myb acts as transcriptional activator of the quail PAX6 (PAX-QNR)
promoter through two different mechanisms. »**

Serge Plaza, Nathalie Turque, Christine Dozier, Manuella Bailly et Simon Saule

Oncogene, 10, 329-340, 1995

**« Overexpression of A-myb induces basic Fibroblast Growth Factor dependent
proliferation of chicken neuroretina cells. »**

Nathalie Turque, Serge Plaza, Karl-Heinz Klempnauer, and Simon Saule

Soumis à Oncogene

C-Myb agit comme un activateur transcriptionnel du gène *Pax-QNR* par l'intermédiaire de deux mécanismes d'activation différents.

ET

La surexpression de *A-myb* induit la prolifération des cellules de neurorétine de Poulet, dépendante du bFGF.

Après avoir caractérisé 2 régions de promotion de *Pax-QNR/Pax-6*, P0 et P1, nous avons entrepris d'étudier la régulation transcriptionnelle de *Pax-QNR*. Nous savons déjà que l'isoforme p46 est capable d'activer la transcription à partir de P0 et P1 (Plaza *et al.*, 1993; 1995).

A. Présence de sites de fixation à l'ADN pour c-Myb dans la séquence de P0

La recherche de sites de fixation pour des facteurs de transcription connus dans la séquence nucléotidique de P0 a révélé la présence de sites de fixation pour c-Myb, appelés MRE (Myb Responsive Elements). *C-myb* est un proto-oncogène recombiné dans les rétrovirus aviaires E26 et AMV qui provoquent des leucémies myéloïdes, et code un facteur de transcription capable d'induire la prolifération des cellules de neurorétine de Poulet (Garrido *et al.*, 1992a, b). Deux autres gènes codant aussi des facteurs de transcription lui sont proches, *A-myb* et *B-myb* (Nomura *et al.*, 1988; Bouwmeester *et al.*, 1992; Foos *et al.*, 1992; Lam *et al.*, 1992). En-dehors de leur similitude de séquences au niveau du domaine de liaison à l'ADN, A-Myb et c-Myb possèdent également des propriétés de transactivation très semblables (Foos *et al.*, 1994; Golay *et al.*, 1994; Trauth *et al.*, 1994). La présence de MRE dans le promoteur de *Pax-QNR* suggère que les membres de la famille Myb puisse être des régulateurs de ce gène.

B. Coexpression dans la neurorétine de Pax-QNR et des facteurs de transcription c- et A-myb.

Par hybridation *in situ* nous avons pu montrer que *c-myb* était exprimé dans la neurorétine au cours du développement embryonnaire. En fait jusqu'au 5^{ème} jour de

développement, c'est-à-dire tant que la neurorétine est en phase proliférative, les messagers de *Pax-QNR* et ceux de *c-myb* coexistent dans la neurorétine (Figures 9A-E, Plaza *et al.*, 1995). Puis les territoires d'expression des deux types de messagers se restreignent avec la différenciation de ce tissu et divergent, mais conservent une bande commune d'expression dans la couche nucléaire interne (Figures 9F et G, Plaza *et al.*, 1995). Dès E13, quand la neurorétine est différenciée, le taux d'expression de *c-myb* diminue fortement (Figures 9H, Plaza *et al.*, 1995). Donc au regard de la présence des MRE et de la coexpression des deux facteurs dans les jeunes stades, il était donc tentant de vérifier si c-Myb pouvait réguler l'expression de *Pax-QNR*. A-*myb* est également présent dans la neurorétine lorsque celle-ci est en pleine phase proliférative, ainsi que dans le système nerveux central (Trauth *et al.*, 1994; et résultats non montrés). Nous avons également inclus A-Myb dans les expériences de transactivation des promoteurs P0 et P1.

C. Régulation transcriptionnelle de *Pax-QNR* à partir de P0 et P1 par c-Myb et A-Myb.

Dans un premier temps nous avons vérifié que c-Myb était capable de réguler l'activité de P0 de manière directe, c'est-à-dire en se fixant sur des sites présents dans P0. Nous avons ensuite précisé que cette possibilité de régulation était aussi le fait du promoteur P1.

Nous avons étendu cette étude à la protéine A-Myb, qui est capable d'activer la transcription à partir de P0 et de P1, de façon similaire à c-Myb (Figure 4, Turque *et al.*).

Ces deux facteurs très proches partagent donc des propriétés de transactivation communes sur le promoteur du gène *Pax-QNR* dans la neurorétine. Leur expression constitutive dans les cellules de neurorétine de Poulet induit d'ailleurs l'expression de *mim-1*, ce gène ayant été montré être régulé par c-Myb et A-Myb (Ness *et al.*, 1989) (Figure 3, Turque *et al.*).

Enfin, lorsque l'on fait s'exprimer constitutivement c-Myb ou A-Myb dans des cellules de neurorétine en culture, l'expression de *Pax-QNR* est maintenue dans ces cellules alors que les cellules de neurorétine normales tendent à exprimer de moins en moins de protéines Pax-QNR au cours des passages (Figure 8, Plaza *et al.*, 1995; Figure 1C, Turque *et al.*). Ceci suggère que l'expression du gène *Pax-QNR* endogène est maintenue en présence des transactivateurs A-Myb ou c-Myb.

D. Réponses physiologiques des cellules de neurorétines sous l'influence de c-myb et A-myb

Les virus E26 et AMV qui sont transformants pour les cellules hématopoïétiques se sont révélés capables d'induire la prolifération des cellules de la neurorétine (Garrido *et al.*, 1992a, 1992b). Par ailleurs des cellules de neurorétine de Poulet transfectées par un virus exprimant soit la protéine c-Myb soit la protéine A-myb, deviennent sensibles à l'effet mitogène du bFGF (Figure 2, Turque *et al.*). Par contre ces deux facteurs de transcription ne semblent pas transformer de manière équivalente les cellules de neurorétine. Les cellules exprimant *c-myb* peuvent croître en agar semi-mou mais uniquement en présence de bFGF, tandis que les cellules exprimant *A-myb* ne le peuvent pas, malgré l'ajout de bFGF (Figure 1B, Turque *et al.*). *A-myb* n'est donc pas capable d'induire la transformation des cellules de neurorétine, en présence de bFGF, contrairement à *c-myb*. Ceci suggère que ces deux facteurs de transcription ne sont pas interchangeables.

Ces résultats nous font conclure, que les facteurs de transcription c-Myb et A-Myb sont des régulateurs potentiels de l'expression de Pax-QNR au cours du développement précoce de la neurorétine. L'originalité de ces observations réside dans le fait que jusqu'à présent l'activité de ces facteurs semblait restreinte au système hématopoïétique.



c-Myb acts as transcriptional activator of the quail PAX6 (PAX-QNR) promoter through two different mechanisms

Plaza, Nathalie Turque, Christine Dozier, Manuella Bailly and Simon Saule

Laboratoire de Différenciation Cellulaire et Moléculaire, CNRS EP56 Institut Pasteur - 1 Rue Calmette 59019 LILLE Cedex France

To understand the regulation of the *Pax-6* gene, which plays an important role in eye development, we have characterized the promoter region of the quail *Pax-QNR* gene. In addition to TATA and CAAT boxes, sequence analysis revealed several putative cis-regulatory elements among which three myb-responsive elements (MRE). C-myb encodes a nuclear, DNA-binding phosphoprotein that functions as transcriptional regulator. Co-transfection in quail embryo cells of the *Pax-QNR/pax-6* promoter with a vector expressing the 5 kDa c-myb protein resulted in an increase in *Pax-QNR* promoter activity. By footprinting experiments we identified multiple binding sites for the myb protein within the promoter region. Protein containing the myb DNA-binding domain fused to the VP16-transactivation domain was fully efficient in *Pax-QNR* promoter transactivation, demonstrating that myb can transactivate through a direct binding on DNA. However, a myb truncated protein devoid of DNA-binding domain was also able to transactivate the *Pax-QNR* promoter. These results show that this promoter can be transactivated by the myb protein directly as well as indirectly. Finally we show by *in situ* hybridization that c-myb is strongly expressed in the developing neuroretina, simultaneously with *Pax-QNR*. These observations suggest that the c-myb protein may be a regulator of *Pax-QNR/pax-6*.

Keywords: c-myb; Pax-6-regulation; neuroretina

Introduction

Transcriptional regulation by the homeobox proteins is thought to coordinate the precise spatial and temporal sequence of growth and differentiation, and previous studies of *Drosophila* homeobox-containing genes have shown that these genes are involved in the process of pattern formation (see Akam, 1987; Ingham, 1988; for reviews). A large number of vertebrate developmental control genes have been identified by their homology to *Drosophila* sequences. Through homology to the paired-box (specifying a DNA-binding sequence, Treisman *et al.*, 1991) nine paired-box containing genes, the *Pax* gene family, have been isolated in vertebrates (Walther *et al.*, 1991; Stapleton *et al.*, 1993). Each member shows spatially and temporally restricted expression patterns during embryonic development (Kessel and Gruss, 1990). The importance of the *Pax* genes in development is demonstrated by the

developmental alterations in the mouse associated with mutations in these genes. Mutations in the *Pax-6* gene have been associated with the mouse mutant *small eye* (Hill *et al.*, 1991). Moreover, the corresponding human gene (AN) has been found deleted or mutated in some cases of the human congenital disorder aniridia (Ton *et al.*, 1991). The *Pax-6* gene is expressed in the developing central nervous system, the optic cup, lens and overlying epithelium prior to morphological differentiation, and later in the neuronal layers of the retina (Walther and Gruss, 1991; Martin *et al.*, 1992). All of this strongly suggests that *Pax-6* is involved in the regulation of some of the inductive events that occur during the formation of the eye. Moreover, the restricted expression of this gene suggests transcriptional regulation of expression by tissue-specific factors. However, to date nothing is known about the regulation of *Pax-6*.

We have recently characterized the quail *Pax-6* gene, named *Pax-QNR* (Martin *et al.*, 1992), and defined its complete exon-intron organization (Dozier *et al.*, 1993). As a step toward elucidating the mechanisms involved in the control of *Pax-QNR/pax-6* expression, we isolated the promoter region of this gene (Plaza *et al.*, 1993). To identify the factors possibly involved in *Pax-QNR/pax-6* regulation, we examined the promoter region for the presence of already identified DNA-binding sequences for known transactivators. We located three myb responsive elements (PyAAC⁹/TG as defined by Biedenkapp *et al.*, 1988) in the *Pax-QNR* promoter region. The chicken c-myb is the progenitor of the v-myb oncogene, which is a truncated and mutated form of the 75kDa c-myb protein product (Klempnauer *et al.*, 1984; Gerondakis and Bishop, 1986). The myb product is present within the cell nucleus, has short half-life, and possesses an intrinsic sequence-specific DNA-binding activity (Boyle *et al.*, 1984; Biedenkapp, *et al.*, 1988; Klempnauer *et al.*, 1984; Moëlling *et al.*, 1984; Howe *et al.*, 1990). Several lines of evidence suggested that myb or myb-related genes may control cellular differentiation through a direct regulation of gene expression. The level of c-myb decreases dramatically upon differentiation of immature myeloblasts, erythroleukemic cells and neuroblastoma cells (Coll *et al.*, 1983; Ramsay *et al.*, 1986; Thiele *et al.*, 1988). In addition, constitutive expression of c-myb prevented the differentiation of erythroleukemic cells (Clarke *et al.*, 1988) and induced cell growth and bFGF responsiveness of chicken neuroretina cells (Garrido *et al.*, 1992b). In transient transfection assays p48^{c-myb} can function as a transactivator of gene expression (Ibanez and Lipsick, 1990; Ness *et al.*, 1989; Weston and Bishop, 1989). To date, three functional domains have been identified in the c-myb product: an amino terminal DNA-binding

domain, a central transcriptional activation domain and a carboxy-terminal negative regulatory region (Sakura *et al.*, 1989; Dubendorff *et al.*, 1992). In addition to the DNA-binding site dependent transactivation, exemplified by the *mim-1* gene whose promoter contains three myb binding sites (Ness *et al.*, 1989; Burk and Klempnauer, 1991), v-myb can transactivate the HSP70 promoter by a DNA-binding independent mechanism (Klempnauer *et al.*, 1989). This mechanism is likely to involve the TATA-box sequence of the promoter (Foos *et al.*, 1993). In addition to *c-myb*, two myb-related genes encoding DNA-binding proteins termed A-myb and B-myb have been identified (Nomura *et al.*, 1988; Bouwmeester *et al.*, 1992; Foos *et al.*, 1992; Lam *et al.*, 1992). B-myb has been shown to be unable to transactivate a myb binding-site containing promoter (Foos *et al.*, 1992) but exhibits the capacity to transactivate the HSP70 promoter (Foos *et al.*, 1993).

Here we show that *Pax-QNR/pax-6* promoter expression is inducible by *c-myb*. By footprinting analysis, we demonstrated multiple myb binding sites scattered in the promoter sequence. Using a fusion protein containing the myb DNA-binding and the VP16 transactivation domain, we demonstrate that *Pax-QNR/pax-6* promoter expression is inducible by *c-myb* by a direct mechanism. Using a myb mutant deleted in the DNA-binding domain, we found that myb can also activate this promoter by an indirect mechanism. Since, as demonstrated by *in situ* hybridization, myb and Pax-QNR are simultaneously expressed in the neuroretina, these results suggest that the *c-myb* protein may be involved in *Pax-QNR/pax-6* transcriptional regulation.

Results

The *Pax-QNR/pax-6* promoter is transactivated by *c-myb*

We have previously characterized the promoter region of the quail *pax-6* (Plaza *et al.*, 1993), initiating the synthesis of the MC29-QNR2 mRNA. A computer-assisted search revealed the presence in the 1.5 Kbp XbaI-Asp718 genomic promoter fragment of a number of potential regulatory elements among which three putative myb binding sites (MRE) matching the consensus myb binding sequence PyAAC²/T²G (Biedenkapp *et al.*, 1988) (MRE1, CAACGG, nucleotides -1105 to -1100; MRE2, CCGTTA, nucleotides -472 to -467; MRE3, TAACGG, nucleotides +110 to +115, see Figure 3 for schematic representation).

In order to determine if the *c-myb* protein is able to regulate the *Pax-QNR* promoter, we co-transfected into quail embryo cells (QEC) equal amounts of plasmid pXA (the 1.5 Kbp XbaI-Asp718 genomic promoter fragment linked to the gene encoding the Chloramphenicol Acetyl Transferase, Plaza *et al.*, 1993) together with increasing amounts of a *c-myb* expression vector. We used a vector encoding the chicken *p75^{c-myb}*, CCC (Grasser *et al.*, 1991), directing the synthesis of the protein under the control of the retroviral long terminal repeat. Another expression vector, pSG5c-myb was also used. This vector allows *p75^{c-myb}* expression under the early SV40 promoter. Cell

lysates were collected two days after transfection, and the levels of CAT activity present in the lysates were determined. Co-transfection of the pXA with 1 μ g of the vector expressing the myb protein resulted in a 16 fold increase of CAT activity relative to the vector control (Figure 1A, compare lanes 1 and 2), but when 5 μ g of expression vector was used the level of *Pax-QNR* promoter transactivation was reduced (compare lanes 2 and 3). Figure 1B shows the results obtained when increasing amounts of pSG5c-myb DNA were

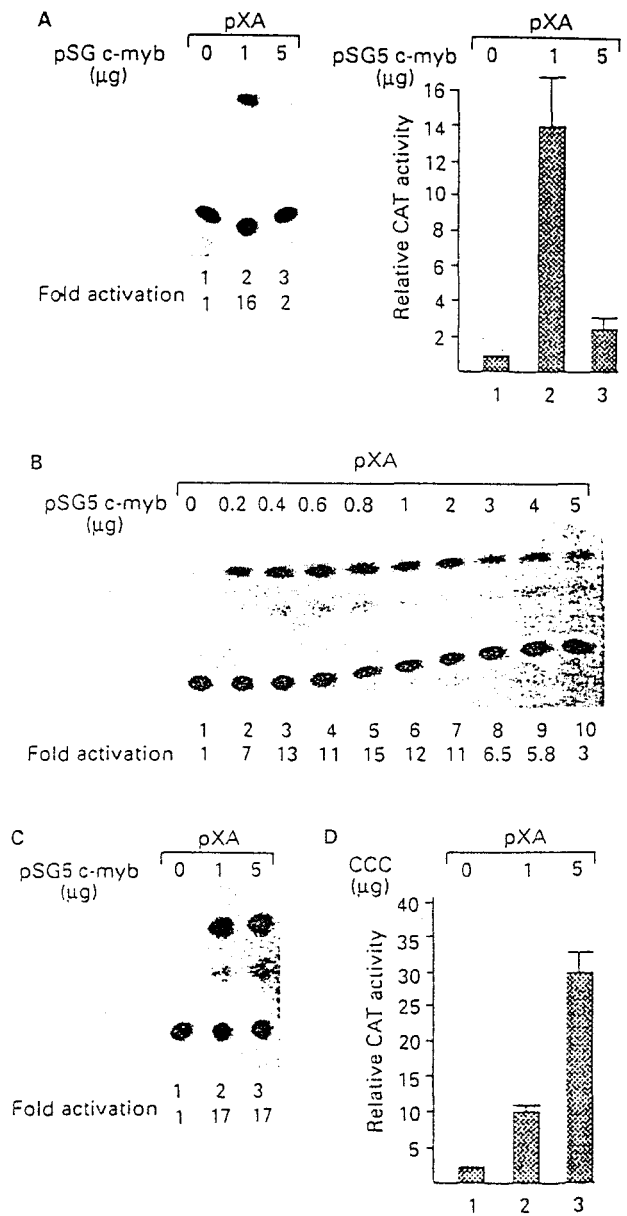


Figure 1 Activation of the *Pax-QNR* promoter by the *p75^{c-myb}* protein. (A) and (B) QEC were transfected with 1 μ g of CAT construct (pXA) and increasing amounts of the pSG5c-myb encoding the chicken *p75^{c-myb}*, as indicated on the top of the Figure. The total amount of DNA in the transfection was kept constant by the addition of the vector control, pSG5. (C) QNR cells expressing endogenous *Pax-QNR/pax6* were transfected as in A. Fold activation is indicated on the bottom of the Figure. (D) QNR cells expressing endogenous *Pax-QNR/pax6* were transfected as in A, but the vector encoding the *p75^{c-myb}* protein is the retroviral vector CCC. The CAT activity of the pXA construct in the absence of exogenous transactivator was arbitrarily designated as 1. Thin lines indicate standard deviations calculated from two transfections performed with two distinct DNA preparations

d. Clearly, the level of Pax-QNR promoter transactivation decreased after a plateau value. The reduced transactivation observed when higher amount expression vector was used is not a simple diluting effect induced by the vector sequences since the amount of vector is kept constant in each assay by the addition of the empty pSG5 DNA. However, similar experiments performed in quail neuroretina (QNR) or chicken neuroretina (CNR) cells expressing Pax-QNR (Carrière *et al.*, 1993) showed transcriptional activation of the Pax-QNR promoter with a c-myb encoding vector without the reduction of transactivation observed at 5 µg of expression vector (Figure 1C, compare lanes 2 and 3, and Figure 1D). Thus, the 75 kDa c-myb protein is a transcriptional activator of Pax-QNR/pax-6 promoter.

Domain analysis of c-myb using the Pax-QNR/pax-6 promoter

Transcriptional activation studies using murine and human c-myb have shown that deletions in the carboxy-terminal region can greatly increase their transcriptional stimulation capacity (Sakura *et al.*, 1989; Dubendorff *et al.*, 1992). We tested the transactivating properties of deleted c-myb constructs in the Pax-QNR promoter by transient transfection assays in QEC. We tested deletions of c-myb removing either carboxy-terminal sequences (CCd), both amino and carboxy-terminal sequences corresponding approximately to the truncations present in v-myb (dCd), and the DNA-binding domain (CCC(dDBD), Dubendorff *et al.*, 1992, and Figure 2). As shown in Figure 2, the clones encoding the deleted proteins (0.5 µg of transfected DNA) transactivate the pXA reporter with similar efficiency (these clones produced comparable amount of proteins in the transfected cells, data not shown, and Dubendorff *et al.*, 1992). When 5 µg of DNA were used, a reduction in Pax-QNR promoter transactivation was found with all the clones, excepted with the dCd mutant. Therefore, deletions in the carboxyl-terminus do not increase the transcriptional capacities of the deleted myb-protein on the Pax-QNR promoter region.

To map the MRE in the Pax-QNR promoter responsible for myb-induced transactivation, 5' and 3' deletion mutants of the promoter were tested for myb

response by transient transfection assays in QEC. As shown in Figure 3A, all the deleted promoter constructs tested were responsive to c-myb, even when the promoter fragment tested was devoid of classical MRE (compare the response of pXA and pHd reporter constructs). However, when the XbaI-SauI fragment containing the MRE1 was inserted upstream the c-myb unresponsive c-mil minimal promoter (pXSa-mil, Figure 3B), this construct become CCC (lane 8), but not CCC(dDBD) lane 9, inducible. In contrast, a clone containing the HincII-ScaI fragment upstream the c-mil minimal promoter (pHcSca-mil) was found mostly unresponsive to either the CCC or the CCC(dDBD) expression vectors (lanes 11 and 12). Therefore, at least the Pax-QNR genomic fragment containing the MRE1, was found able to confer the c-myb responsiveness to an unresponsive promoter.

Transactivation of the Pax-QNR/pax-6 promoter sequences by the DNA-binding deleted c-myb mutant (CCC (dDBD), Figure 2) and the observation that a Pax-QNR promoter fragment devoid of classical MRE was myb-transactivated, prompted us to determine whether myb product was able to transactivate through a direct binding to the DNA. We therefore tested by transient transfection assays in QEC the transactivating properties of a chimeric protein (VVP protein) containing the DNA-binding domain of v-myb fused to the VP16 carboxy-terminal transactivation domain. This protein is fully active on the neuroretina cells

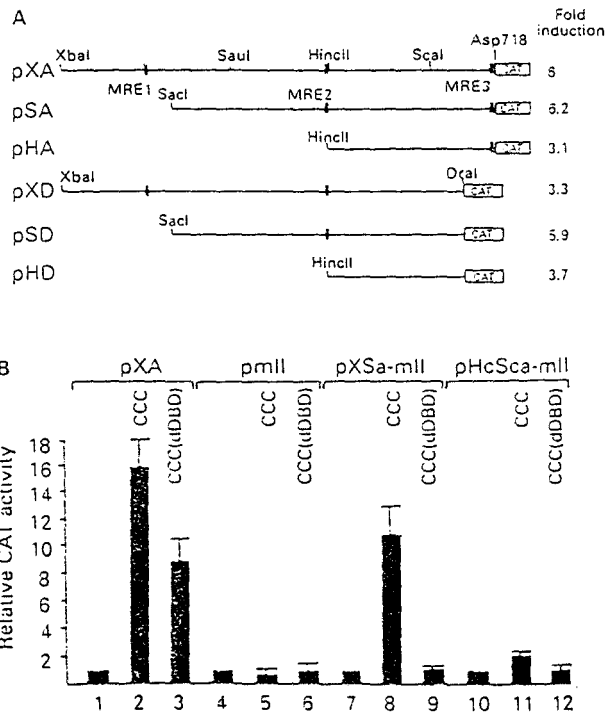


Figure 3 Analysis of Pax-QNR promoter deletion constructs for activation by c-myb. (A) QEC were transfected with 1 µg of CAT constructs and 1 µg of pSG5c-myb DNA expression vector. On the left part of the Figure, a schematic diagram of the different deleted promoter constructs is presented. (B) Activation of a myb-unresponsive c-mil promoter after fusion with parts of the Pax-QNR promoter sequences. The expression vectors used (CCC and CCC(dDBD)) are described in Figure 2. The CAT activity of the different constructs in the absence of exogenous transactivator was arbitrarily designated as 1. Thin lines indicate standard deviations calculated from at least two transfections performed with two distinct DNA preparations

Region	Fold activation	
	0.5µg	5µg
CCC	17.5	3.4
CCC(dDBD)	11	3.5
CCd	15.5	4.3
dCd	13.2	10
LX2	1	1

Figure 2 Activation of the Pax-QNR promoter by c-myb and truncated c-myb proteins. QEC were transfected with 1 µg of pXA construct and 0.5 or 5 µg of retroviral constructions expressing myb proteins. The pmil plasmid containing the CAT gene under the control of the minimal chicken c-mil promoter from nucleotides +1 to -298 (Ansieau *et al.*, 1993) was used as a control and was not expressed over the background level. On the left part of the Figure a schematic diagram of the proteins is presented. Three independent transfections performed with two distinct DNA preparations gave similar results

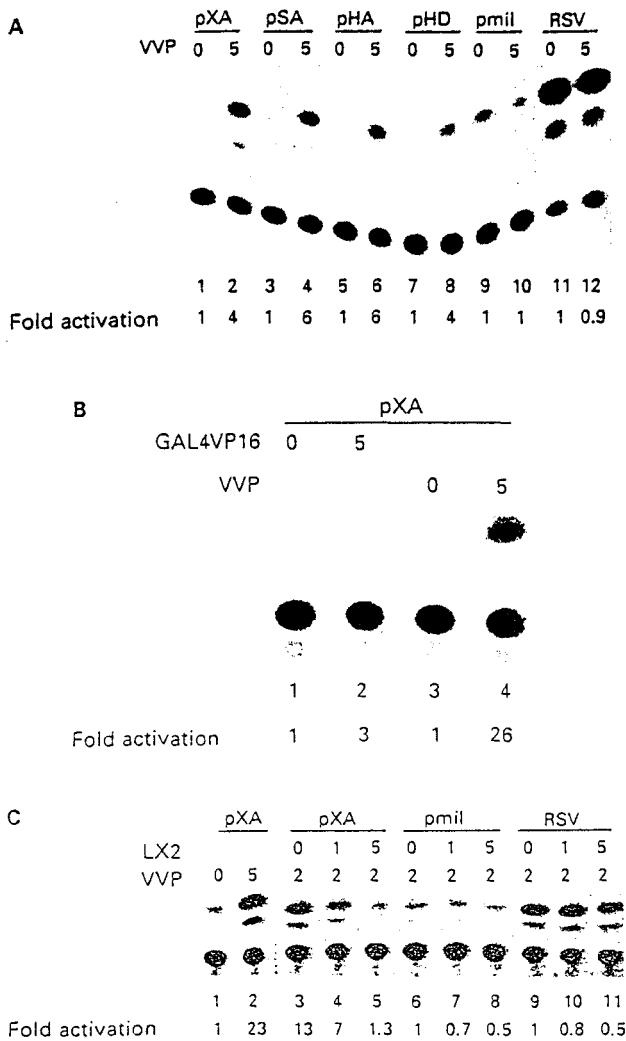


Figure 4 Activation of the Pax-QNR promoter by the VVP protein. (A) QEC were co-transfected with 1 μ g of Pax-QNR promoter CAT constructs following the nomenclature presented in the diagram of Figure 3 and 5 μ g of vector control pneoMAV or, when indicated on the top of the Figure, retroviral constructions expressing the VVP protein. Pmil and RSV CAT constructs were included as negative controls. (B) QEC were co-transfected with 1 μ g of pXA construct and as indicated on the top of the Figure, 5 μ g of retroviral constructions expressing GAL4VP16 or VVP proteins. DNA was kept constant at 5 μ g by the addition of pneoMAV vector. (C) Competition of VVP induced activation by LX2 protein. 1 μ g of pXA construct, 2 μ g of retroviral construction expressing VVP protein, and when indicated, 1 or 5 μ g of LX2 encoding retroviral vector were co-transfected in QEC. Pmil and RSV CAT constructs were included as negative controls

(Garrido *et al.*, 1992a) and when expressed from a proviral vector, VVP stimulated high levels of transcription from a reporter plasmid containing MRE but not from a reporter plasmid without myb-binding sites (Grasser *et al.*, 1992; Ibanez and Lipsick, 1990). Figure 4A shows that transcriptional activation by VVP was found with all Pax-QNR deletion constructs tested, even when no classical MRE were detected (see clone pHD) but no transactivation was obtained with the pmil or RSV CAT constructs, containing two heterologous myb-unresponsive promoters (compare lanes 1 and 2 with lanes 9 and 10 or 11 and 12). Transfection of an expression vector encoding a fusion protein containing the GAL4 DNA binding

domain and the VP16 carboxyl-terminus transactivation domain (GAL4VP16) was unable to transactivate the pXA reporter efficiently (Figure 4B, compare lanes 2 and 4), while this vector is a strong transactivator of a reporter construct containing four GAL4 binding sites (data not shown). This indicates that the transcriptional activation of Pax-QNR promoter obtained with VVP is dependent on the presence of the myb-DNA binding domain. This conclusion is emphasized by the fact that co-transfection of the VVP vector with an expression vector (LX2) encoding the DNA-binding domain and devoid of transactivating activity, (Chen and Lipsick, 1993 and Figure 2) strongly reduced the VVP induced transactivation of pXA (Figure 4C, compare lanes 3 and 5). These results suggest that c-myb can transactivate the Pax-QNR promoter through direct binding on the DNA and that non consensus myb-binding sites must be present in the Pax-QNR/pax-6 promoter.

Analysis of the DNA sequences in the Pax-QNR promoter interacting with the c-myb protein

To map the sequences recognized by c-myb within the 1.5 Kbp XbaI-Asp718 promoter fragment, DNase I footprinting experiments were performed on DNA fragments responsive to myb-induced transactivation (Figure 5) using the R2R3 myb-DNA binding polypeptide (Gabrielsen *et al.*, 1991). Examination of the sequences protected (Table 1) reveals a total of 22 binding sites, 8 almost completely protected by 200 ng of peptide (high-affinity sites including all three MRE consensus sequences) and 14 protected by 1000 ng of peptide (low affinity sites). As already found for other myb-responsive promoter regions (Sureau *et al.*, 1992), the binding affinity of the MREs was not correlated with the length of the protected regions. Only 13 out of 22 protected sites contain the AAC core motif sequence. However, all the high-affinity sites contained this sequence (Table 1), and the low-affinity sites were, as expected, more divergent from the consensus (Weston, 1992) than the high-affinity sites. These results show that multiple binding sites for the c-myb protein are present within the XbaI-Asp718 fragment. The total number of myb-binding sites within this fragment is expected to be over 22, since the sequence between SauI (nucleotide -891) and XhoI (nucleotide -522) was not investigated in footprint. Ten protected sites were found in the HincII-DraI promoter fragment devoid of consensus MRE but still responsive to c-myb (construct pHD, Figure 3A and Figure 4A lanes 7 and 8).

As demonstrated for the human HSP70 promoter (Klempnauer *et al.*, 1989), the Pax-QNR promoter can be transactivated by a myb protein devoid of DNA-binding domain (Figure 2, clone CCC (dDBD)). In the HSP70 promoter, this effect is mediated, in part, by the TATA-box, since the replacement of its TATA-box by the SV40 early promoter TATA-box abolished this myb-induction (Foos *et al.*, 1993). As shown in Figure 3B, the Pax-QNR promoter fragment upstream the ScaI site, is unable to confer a myb DNA-binding independent transactivation response to an heterologous promoter. Therefore, in order to define the role of the Pax-QNR/pax-6 TATA-box in the response to the myb protein devoid of DNA-binding domain, we

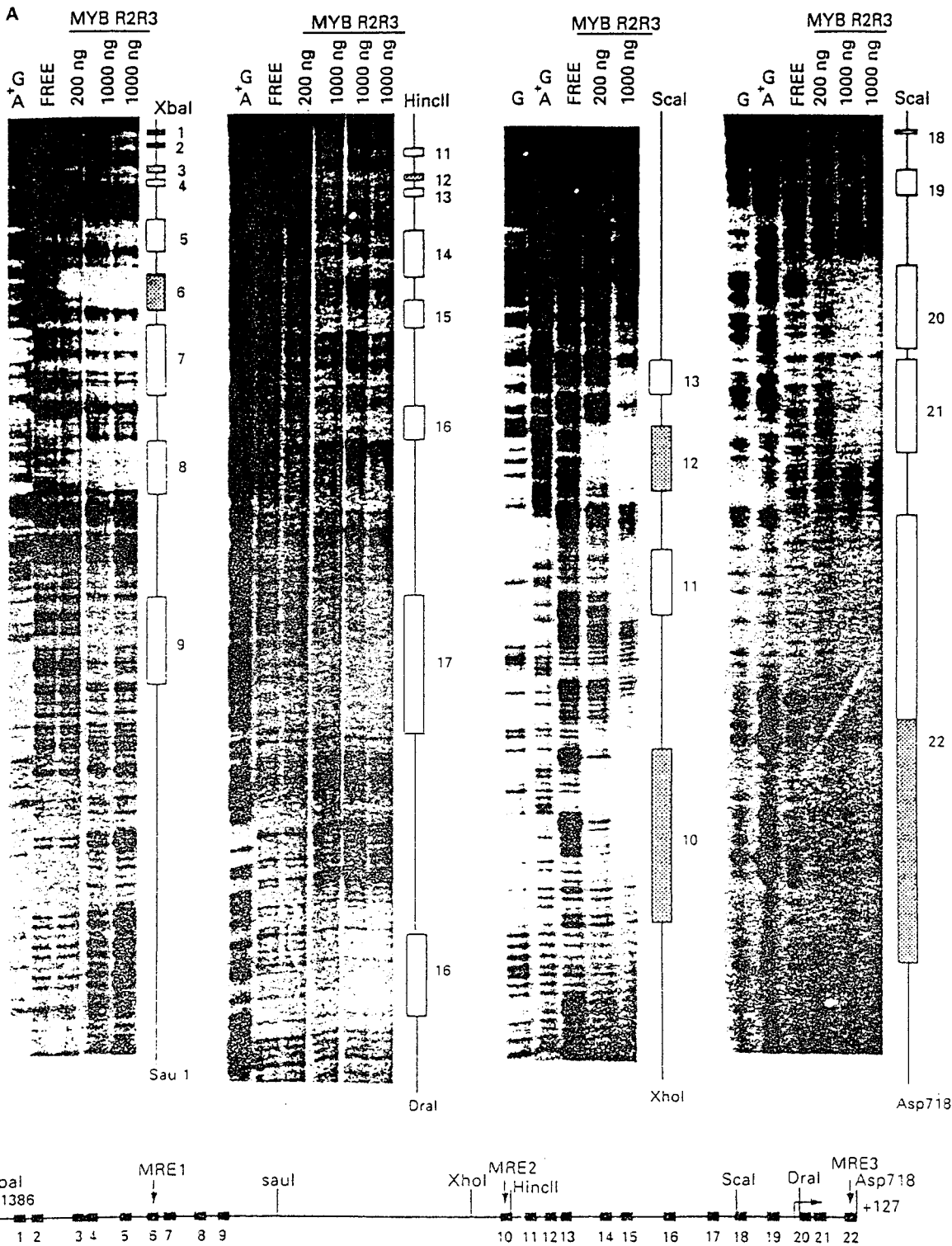


Figure 5 Footprinting analysis of the Pax-QNR promoter region. (A) Asymmetrically labelled probes were incubated without (lanes FREE) or with 200 ng or 1 μ g of R2R3 myb DNA-binding polypeptide and then subjected to DNaseI degradation. Sequence ladders (G,A - G) were obtained by the Maxam & Gilbert chemical cleavage of the same end-labelled DNA. Position and length of the protected regions are indicated by vertical boxes on the right of each autoradiogram. Hatched boxes represent high affinity protected sites. Restriction enzymes used to prepare the probes are indicated on the Figure. (B) Schematic drawing of the Pax-QNR promoter and summary of footprinting analysis. Note that DNA located between endonuclease restriction sites *SauI* and *XhoI* (384bp) was not investigated in footprinting experiments

aced by site directed mutagenesis the PaxQNR/6 TATA-box (GATATTAAG) by the SV40 early promoter TATA-box (CTTATTTAT) (Figure 6A). Co-transfection experiments in QEC of myb expression vectors (CCC or CCC(dDBD)) and wild type or mutant Pax-QNR promoter followed by the analysis of the

transfected QEC RNA by RNAase protection assays show that the specific RNA initiation (127 nt protected fragment, see Figure 6A) is increased by the CCC but not by the CCC (dDBD) expressing vector (compare Figure 6B, lanes 12 and 13). We tested the Pax-QNR/pax-6 promoter activity by RNAase protection assays

Table 1 Comparison of c-Myb binding sites with the *pax6* (*Pax-QNR*) promoter

protected sites	5'	3'	consensus	consensus	position
1	TACACCGTTTCCCGCAGCGGTCCCGGCCCGCAGC		AAACCGTG	CAACGCC	(-1363,-1356)
2	ATCGCCGAGTAAACAAGCGTTCT		CAGCGTC	TAA	(-1351,-1344)
3	TAGAGAATTAACGCTCATTATTA		GAACCGCT		(-1208,-1201)
4	GCGTGCCGCGGATCG		TAACGCTC		(-1255,-1248)
5	GAAAGAGCAACTCCCTCGTCGC		CAACCGAG		(-1105,-1098)
6	GTGCAACGCTCAACGGAGCAACACC		TAACGGAG		(-474,-467)
7	TTCTCGCGCCCATCGCCCAAACACGGG		TAACGAAAC		(-401,-394)
8	CAATGGGGCCGACAG		AAACTGTG		(+28,+35)
9	ATCGCTTTCGAG		TAACGGCC		(+110,+117)
10	GGCTCATCGGCAGCTCCGTTAACACCGAGT		CCCGGCA		(-1243,-1236)
11	CAGCAGGCCCGGTGAGGGGG		CAACTCT		(-1162,-1155)
12	TCTGTGGCCGTACGTTTCGTTACCC		CATCGCC		(-1063,-1056)
13	GAGGCCCGGTCTAG		CAATGGG		(-1021,-1014)
14	CGGGCACGGCTGCCACAGCCCTAAACGTGGGCCCGGA		CAAAGCG		(-977,-970)
15	GGGGTAGAGCCGTCGGGGA		CAACGGCC		(-437,-430)
16	AGCCCGTCCGGGG		CAACGGG		(-377,-370)
17	GCCGTCAGTGCCGTCGGGGCGGGCGGGCGGGCGCT		AAACGTGG		(-310,-303)
18	TACTGTCCGCCGTA		CGACGGCT		(-271,-264)
19	AAGGGAAAGTTAGTGCA		CAACGGGT		(-217,-210)
20	ATTTAAACTGTGTGGCAGGTTCCGGCGTAGG		CGACGGCA		(-146,-139)
21	GCCGAGCGGAGCCGCCAGGTC		TCACGGGG		(-81,-74)
22	CCGGACAGGTAACGGCCCTCG		TAACCTTC		(-21,-14)
			CACCTGGC		(+72,+79)

The nucleotide sequence of the consensus site is from Weston (1992). Numbers, base pairs defined from the *Pax-QNR* promoter sequence (Plaza et al., 1993)

to avoid possible CAT activity background due to non specific RNA initiations. Indeed, all mutated constructs showed a protected fragment of 149 nt, in addition to the expected 127 nt protected fragment. The former protected fragment is most probably due to an additional RNA initiation site located 3 nucleotides downstream of the mutated TATA-box (this fragment is not observed with the wild type promoter, see lanes 3,4 and 8 to 10). Lane 13 shows that the amount of the 127 nt fragment is not increased in the CCC(dDBD) transfected cells when compared with the vector control cells RNA (lane 11). This suggests that, as for HSP70 TATA-box, the transactivation of *Pax-QNR/pax-6* promoter by myb in an indirect way may also requires a peculiar TATA-box, even if the HSP70 and *Pax-QNR/pax-6* TATA-boxes are not identical (TTATAAAA and ATATTAAG respectively).

The p46^{Pax-QNR} and p75^{c-myb} do not cooperate in Pax-QNR promoter transactivation

We were interested to know whether *Pax-QNR/pax-6* autoregulation (Plaza et al., 1993) can be modulated by c-myb, because of the close proximity of the different binding sites. To address this question we compared the promoter activity of the pXA construct co-transfected into QEC with pJ3Q103 vector encoding the p46^{Pax-QNR} alone or together with the CCC vector. The result of the CAT assay (Figure 7) showed that the

CAT activity was only additive, showing no synergist effect between p46^{Pax-QNR} and p75^{c-myb} in the *Pax-QN* promoter transcriptional activation (Figure 7, compa lanes 2 and 4).

p75^{c-myb} maintains Pax-QNR expression in CNR cells vitro and c-myb is expressed in the developing neuroretina in vivo

From previous experiments, it was not possible to demonstrate an increase in *Pax-QNR* mRNA after p75^{c-myb} expression, and G418 selection, when compared to the unselected neuroretina expression level (Garrido et al., 1992b). Therefore, by indirect immunofluorescence we studied *Pax-QNR* expression in primary CNR cells, as well as in CNR cells expressing the neo^R gene alone, or in addition to the p75^{c-myb}. To detect the *Pax-QNR* products, we used two distinct rabbits serums prepared against the pair (serum 11) and carboxyl-terminus domains (serum 1) of the p46^{Pax-QNR} (Carrière et al., 1993). Figure demonstrates that *Pax-QNR* found in the normal unselected, neuroretina (A and B) is only barely detected in control cells expressing the neo^R gene (C and D). In contrast, CCC expressing cells selected after G418 treatment shows labelled nuclei with the two serums (E and F). That the p75^{c-myb} selects in a heterogeneous population *Pax-QNR* expressing cells unlikely, because cells are selected by a G41

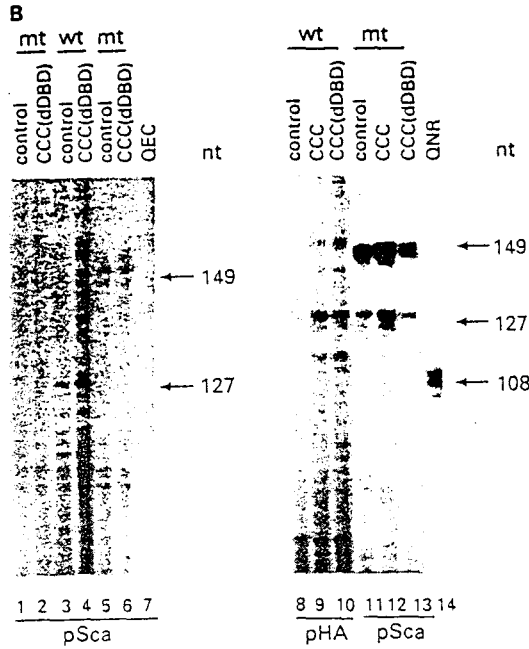
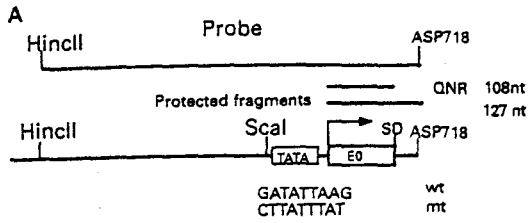


Figure 6 Transactivation of Pax-QNR TATA-box substitution mutants by CCC or CCC(dDBD) expression vectors. (A) Nucleotide sequence comparison of the wild type and mutagenized promoter, as well as the strategic used for the RNAase protection. (B) RNAase protection assays performed on RNA extracted from QEC co-transfected with 10 μ g of the construct pSca (containing the 214 bp Scal-Asp718 Pax-QNR promoter fragment) wild type (lanes 3 and 4) or mutant (lanes 1,2 and 5,6 and 11 to 13) or pHA wild type (lanes 8 to 10) and 10 μ g of CCC or CCC(dDBD) expression vectors. Lane 7, QEC alone. Lanes control, pneoMAV vector. In the left panel, transfections were standardized by co-transfection of 1 μ g of pSVLuciferase plasmid. Total RNA were prepared 48 h after transfection and analysed by RNAase protection with an antisense 653nt XhoI-Asp718 genomic fragment RNA probe described in Plaza *et al.*, 1993. Arrow indicates the 108nt protected fragment obtained with RNA extracted from neuroretina (lane 14); arrows indicate the protected fragment obtained with RNA extracted from transfected QEC. The 127nt band is the correctly initiated transcript, 15 nucleotides longer than in neuroretina RNA due to the presence of intronic sequence. The same initiation site is observed with pSca and pHA reporters. (Left panel, luciferase activity measured on 1% of the cells was 15000, 15560, 17133, 20669, 22276 and 6648)

treatment, and because the transfection efficiency between p75^{c-myb} and neo^R encoding vectors is similar. These results suggest that the p75^{c-myb} is able to maintain (or induce) Pax-QNR expression in G418 selected CNR cells.

Next, we performed *in situ* hybridization in order to demonstrate a co-localization of Pax-QNR/pax-6 and endogenous c-myb expression in the neuroretina. We performed serial sections of the retina hybridized with both probes, but since the Pax-QNR/pax-6 pattern of expression is well described, we essentially showed c-myb localization. C-myb is expressed in the undiffer-

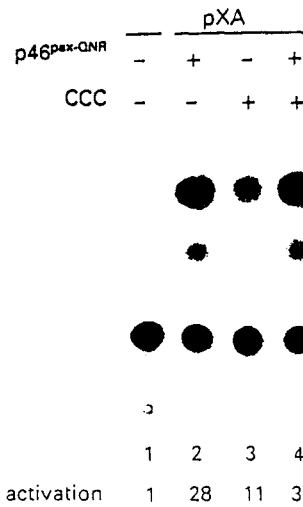


Figure 7 Activation of the Pax-QNR promoter by p46^{Pax-QNR} and p75^{c-myb} is only additive. QEC were co-transfected with 4 μ g of pJ3 Ω and 0.5 μ g of pneoMAV (control vectors lane 1). 5 μ g Pax-QNR expression vector, pJ3 Ω 103 (lane 2), 0.5 μ g of c-myb encoding CCC (lane 3) or both (lane 4). The CAT activities were performed using equal amounts of proteins. Total amount of transfected DNA was kept constant by the addition of the vector control

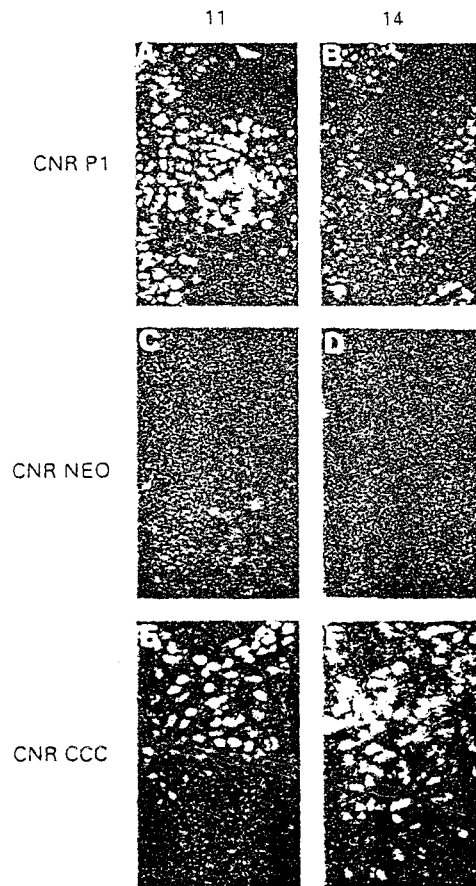


Figure 8 Expression of Pax-QNR products by immunofluorescence in primary, neo^R and c-myb expressing CNR cells. Subcellular localization of Pax-QNR products was assayed by indirect immunofluorescence on fixed CNR cells with anti-Pax-QNR serums, serums 11 (recognizing the paired domain) and 14 (recognizing the carboxyl-terminus of the protein). Anti-Pax-QNR immunoreactive proteins were detected with FITC-labelled goat anti-rabbit immunoglobulin secondary reagent (A and B) normal primary CNR; (C and D) cells selected after geneticin treatment following the transfection of a control vector expressing the neo^R gene alone; panels E and F, neomycin resistant cells selected after geneticin treatment following the transfection of a CCC vector expressing the p75^{c-myb}

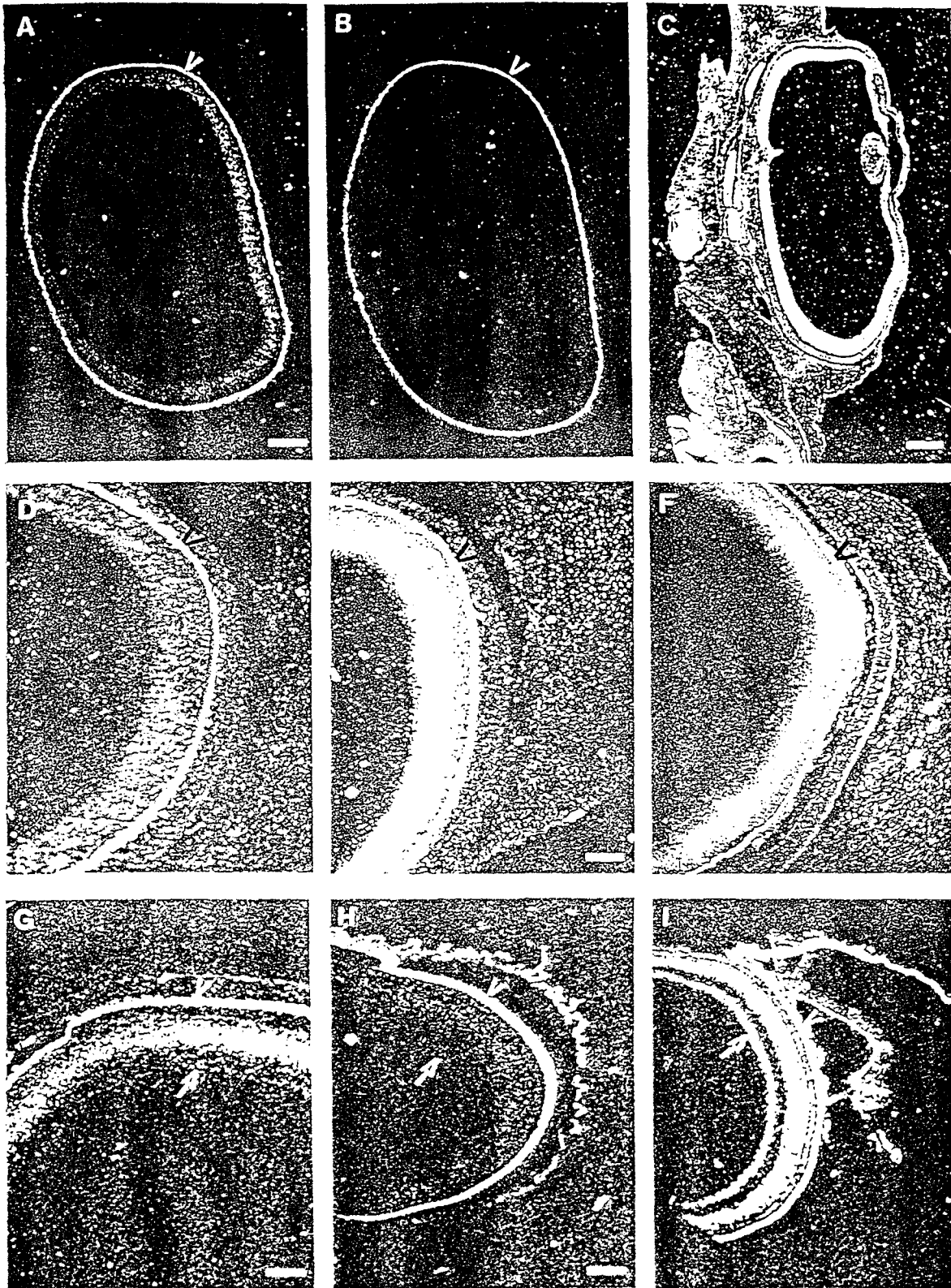


Figure 9 Detection of Pax-QNR and c-myb RNA by *in situ* hybridization in quail and chicken. (A) Hybridization of E5 chicken eye section with a ^{35}S -labelled myb antisense probe. Arrow head, pigmented retina. Bars: 330 μm . (B) Hybridization of E5 chicken eye section with a ^{35}S -labelled myb sense probe (control). (C) Hybridization of E5 chicken eye section with a ^{35}S -labelled Pax-QNR/pax-6 antisense probe. Bars: 930 μm . A, B, C are stereomicroscope views. (D) Hybridization of E5 chicken eye section with a ^{35}S -labelled myb sense probe. No signal over the background is detected. Nuclei were Hoechst 33258 labelled. (E) Hybridization of E5 chicken eye section with a ^{35}S -labelled myb antisense probe. Bars: 300 μm . (F) Hybridization of E7 chicken eye section with a ^{35}S -labelled myb antisense probe. (G) Hybridization of E9 quail eye section with a ^{35}S -labelled myb antisense probe. Arrow indicates the ganglionic cell layer. Bars: 130 μm . (H) Hybridization of E13 quail eye section with a ^{35}S -labelled myb antisense probe. Bars: 300 μm . (I) Hybridization of E13 quail eye section with a ^{35}S -labelled Pax-QNR/pax-6 antisense probe

tiated neuroretina at E5 (compare A, antisense and sense probes). Figure 9 C demonstrates that Pax-QNR mRNA detected with the probe used in the figure 6B (lane 14) and c-myb are simultaneously expressed in the neuroretina at E5. Later, when the different cell layers can be differentiated, c-myb appears also in Pax-QNR/pax-6 negative cells (compare G and I with J). These results show that the cells expressing Pax-QNR also express c-myb at least in the undifferentiated neuroretina.

Discussion

As a first step toward elucidating the mechanisms involved in the control of the expression of the quail Pax-6 (Pax-QNR) gene, we have isolated and characterized the promoter region initiating the synthesis of the MC29-QNR2 mRNA (Plaza et al., 1993). The sequence of Pax-QNR promoter region contains several DNA binding sites for transcription factors, among which three canonical myb-responsive elements (MRE, PyAAC^G, Biedenkapp et al., 1988) -1105/-1100; -472/-467 and +110/+115. The Pax-QNR promoter was able to drive the expression of the CAT gene in quail Pax-QNR expressing (QNR) and Pax-QNR non-expressing (QEC) cells, and can be transactivated by the p46^{Pax-QNR} product *in vitro*. Pax-QNR/pax-6 products are expected to be involved both in proliferation and differentiation processes. During eye formation, this gene is expressed in the optic cup, lens, overlaying epithelium prior to morphological differentiation and later in the neuronal layers of the retina. Three periods in the neuroretina development are defined: (1) cell division from E2 to E8; (2) cell migration and lamination of cell strata from E8 to E10, and (3) terminal differentiation from E10 to hatching. Pax-QNR/pax-6 can be involved in all of these events, and the amount of Pax-QNR/pax-6 mRNA increased by a factor 3 between E5 and E8 (Martin et al., 1992). Implication of Pax-QNR/pax-6 in cellular proliferation is expected, since this gene is able to transform immortalized murine cells when over-expressed (Maulbecker and Gruss, 1993). The c-myb protein is a transcriptional activator that is predominantly expressed in hemopoietic cells and can cause leukemia in its virally-activated form (Lüscher and Eisenman, 1990; Graf, 1992). The c-myb protein also plays a role outside the hemopoietic system, since c-myb decreases dramatically upon differentiation of neuroblastoma cells (Thiele et al., 1988) and antisense myb-oligonucleotides inhibit smooth muscle cells proliferation (Simons, et al., 1992). We found by *in situ* hybridization that c-myb is expressed in the developing neuroretina, specially when the neuroretina cells are proliferating.

To test the possible involvement of c-myb in Pax-QNR/pax-6 regulation, we co-transfected c-myb expression vectors (we used two different expression vectors with similar results) with Pax-QNR-CAT reporter DNA. C-myb is able to efficiently transactivate the Pax-QNR/pax-6 promoter. Based on the evolutionary conservation of specific residues within the myb repeats, an arrangement of 3 α -helices in each repeat is suggested to be homologous to that seen in homeodomains (Frampton et al., 1991; Gabrielsen et

al., 1991). Despite these similarities, transactivation of Pax-QNR/pax-6 promoter by p46^{Pax-QNR} (which contain a DNA-binding homeodomain) and p75^{c-myb} is only additive.

Two features should be noted:

-First, we found by footprinting experiments that the number of myb binding sites in the promoter region is much higher than 3. At least 22 R2R3 binding sites were identified in the 1.5 Kbp XbaI-Asp718 genomic fragment. Numerous myb binding sites were often observed in myb responsive promoters. For the *myc* gene (Nakagoshi et al., 1992), 15 sites were identified in a 862 bp promoter region, and for the PR264 gene, 11 MREs were located in a 1.1 Kbp region (Sureau et al., 1992). Some MREs observed were far from the canonical myb-binding site described (Weston, 1992). It is difficult to know if these sequences are *in vitro* relaxed-binding sites, or represent functional c-myb binding sites. Using 100 μ g of cell nuclear extracts from E5 QNR and the 494bp XbaI-SauI fragment as a probe, we were able to protect MREs 3,5,6,7,8 and 9, but not the MRE4 (data not shown). This suggest that high- and low-affinity myb-binding sites can be occupied with only limited protein amount synthesized *in vivo*. By western blot experiments, we were able to demonstrate p75^{c-myb} in E5 QNR cells (data not shown). In addition, c-myb is able to transactivate through sequences devoid of any canonical MREs (Nakano and Graf, 1992). However, we found that MREs 1 to 9, but not MREs 11 to 17 were able to confer the myb-responsiveness to an heterologous promoter. This indicate that all MREs do not allow myb transactivation with a similar efficiency.

-Second, the myb protein can transactivate the Pax-QNR/pax-6 promoter without DNA-binding domain. This has been previously observed for the HSP70 promoter (Klempnauer et al., 1989). Mutational analysis of the HSP70 promoter showed that myb-inducibility was dependent on the presence of a particular TATA box (Foos et al., 1993). Replacement in the pScA or pHA reporter constructs of the Pax-QNR/pax-6 TATA box by the unresponsive SV40E TATA box (Foos et al., 1993) still allows transactivation by the complete c-myb but no longer by the DNA-binding deleted protein. Other transcription factors, like the homeodomain-containing *fushi tarazu*, are also able to co-transactivate without DNA-binding domain (Ananthan et al., 1993) and the estrogen receptor devoid of DNA binding domain is functional in the ovalbumin gene co-activation with c-fos and c-jun (Gaub et al., 1990).

That DNA-binding dependent transactivation is also operative is suggested by the use of the VVP protein (myb DNA-binding domain fused to the VP16 acidic transactivation domain). Since the LX2 construct devoid of transactivating domain (Chen and Lipsick, 1993) but encoding the myb-DNA binding domain, is able to compete the VVP induced transactivation suggests that binding of the transactivating protein on myb binding sites allows transactivation. However, we could not rule out the possibility that the myb-DNA binding domain binds to another protein which itself binds directly the DNA. We do not favor this hypothesis because the R2R3 DNA-binding peptide is able to footprint the Pax-QNR/pax-6 promoter DNA with high affinity, at least for some sites. Anyway, both

DNA-binding dependent and independent mechanisms are expected to take place in *Pax-QNR/pax-6* promoter transactivation by myb.

An important question is to know whether or not *Pax-QNR/pax-6* is regulated *in vivo* by *c-myb* (or myb-related genes, since we know that the myb family contains at least three members). No obvious abnormalities in the tissues where *pax-6* is expressed (i.e. neural tube, brain, eye, pancreas) have been reported in mice bearing a homozygous disruption of *c-myb* (Mucenski et al., 1991). However, since these embryos died very early, it is not known if these tissues would have differentiated normally. In addition, we were unable to demonstrate *Pax-QNR/pax-6* RNA increase in QEC culture following *c-myb* expression (data not shown). In CCC infected CNR cells, after neomycin selection, *Pax-QNR/pax-6* expression is found in almost all the cells, whereas only few positive cells can be identified in control cells expressing only the neo gene, suggesting that *c-myb* plays a role in the maintenance of *Pax-QNR/pax-6* expression. Also, *c-myb* is found *in vivo* in proliferating neuroretinal cells expressing *pax-6*. Two observations may explain why endogenous *Pax-QNR/pax-6* expression does not follow *c-myb* expression *in vitro*:

First, in transient transfection experiments in QEC, an increase in *c-myb* vector results in a decrease in *Pax-QNR/pax-6* promoter transactivation. This could be explained both by the negative autoregulation of *c-myb* activity by homodimer formation through the leucine zipper (Nomura et al., 1993), or by the negative regulatory carboxy-terminal elements (Dubendorff et al., 1992) and may impair detection of the endogenous *Pax-QNR/pax-6* activation. However, in QNR cells the negative regulation of *c-myb* activity is not observed. In fact, this lack of regulation may explain why in the neuroretina, *c-myb* is biologically active (Garrido et al., 1992b). In this respect, it is interesting to note that a simultaneous deletion of the *c-myb* amino and carboxyl terminus (protein encoded by the dCd vector) resulted in a protein still active at high level in QEC. Since a myb protein only deleted from the carboxyl terminus (protein encoded by the CCd vector), remain negatively regulated at high level on QEC, this suggest that a regulator present in QEC in limited amount and subject to a squelching effect with high amount of *c-myb*, contact the *c-myb* amino terminus and suppress the negative effect of the carboxyl terminus. In fact, truncation of the first DNA-binding repeat of *c-myb* is sufficient to confer a transforming potential to the shortened protein (Dini & Lipsick, 1993) suggesting a regulatory function for this part of the protein.

Second, activation of the first known cellular target gene directly regulated by *c-myb*, *mim-1*, requires the presence of another factor NF-M (or C/EBP) in order to induces *mim-1* in heterologous cells (Ness et al., 1993; Burk et al., 1993). Such factors, yet unknown, may also be required in order to see increased *Pax-QNR/pax-6* expression.

Finally, these results question about the hemopoietic restriction of *c-myb* functions. The role of this transcription factor is clearly broader than previously expected (Thiele et al., 1988; Garrido et

al., 1992b; Simons et al., 1992). The expression of *c-myb* during the neuroretina development and its effect on *Pax-QNR/pax-6* expression may be critical for the regulation of this gene, and more generally for the central nervous system development.

Materials and methods

Cell culture and transfection

Quail neuroretina (QNR) or chicken neuroretina (CNR) cells, prepared from 7-day-old embryos, and quail embryo cells (QEC) were seeded at 5×10^5 cells per 60 mm dish in DMEM 10% FCS, 24 h prior transfection. Transfections were performed by the calcium phosphate method. For the experiments with the vector expressing the *c-myb* or Pax-QNR proteins, cells were co-transfected with 1 μ g of the CAT construct and increasing amounts (1 μ g or 5 μ g usually) of expression vector. The total amount of transfected DNA was kept constant by the addition of empty vector DNA: pJ3 Ω for Pax-QNR, pSG5 or NCl α for *c-myb*, *c-myb* and myb mutants expression vectors were described in Dubendorff et al., 1992. For stable transfection experiments, transfected cells selected in medium containing geneticin (400 μ g ml $^{-1}$) were passaged twice on gelatin-coated dishes before testing.

Immunofluorescence study Normal or transfected cells cultured on collagen-coated 12 mm microscope cover slips were fixed for 20 min with 3.7% paraformaldehyde in PBS. Cells were treated as previously published with sera 11 and 14 (Carrière et al., 1993).

Construction of CAT reporter plasmids The Pax-QNR promoter construct pXA contains the 1.5 Kbp XbaI-Asp718 genomic fragment cloned upstream the CAT gene of pBLCAT5 vector (Plaza et al., 1993). To obtain the 5' deleted CAT constructs, pSA and pHA, the 1.1Kbp SacI-Asp718, and 594 bp HincII-Asp718 fragment were blunt-ended and cloned into the blunt-ended XbaI site of pBLCAT5. To obtain the 3' deleted CAT construct, pXD the 1.4Kbp XbaI-DraI was blunt-ended and cloned into the blunt-ended XbaI site of pBLCAT5. To obtain the 5' and 3' deleted CAT constructs pSD and pHD, the 1.0Kbp SacI-DraI and 494 bp HincII-DraI fragments respectively were blunt-ended and cloned into the blunt-ended XbaI site of pBLCAT5. To obtain the pXSa-mil CAT construct, the minimal chicken *c-mil* promoter from nucleotides +1 to +298 (Ansieau et al., 1993) was inserted after appropriate treatments into the pXA vector, in order to replace in the pXA the Pax-QNR promoter sequence from SauI to the BamHI site in the polylinker sequence just upstream the CAT gene. Similarly, to obtain the pHcSca-mil CAT construct, the minimal chicken *c-mil* promoter was inserted after appropriate treatments into the pHA vector, in order to replace in this construct, the Pax-QNR promoter sequence from ScaI to the BamHI site in the polylinker sequence, just upstream the CAT gene. The pRSVCAT plasmid contains the CAT gene under the control of the Rous sarcoma virus long-terminal repeat (RSV-LTR). The pmil plasmid contains the CAT gene under the control of the minimal chicken *c-mil* promoter from nucleotides -1 to +298 (Ansieau et al., 1993).

CAT assays, luciferase assays and RNAase protection CAT assays were performed as described in Plaza et al., 1993, on cell extracts using equal amounts of total proteins, which were determined by the Bradford method (Bio-Rad). CAT assays were quantified with a Packard Instant Imager.

RNAase protection was performed as previously published (Plaza et al., 1993) with the RNA probe prepared

in the 653 bp XhoI-Asp718 genomic fragment cloned in pEM3. In some experiments, 1 µg of pSVluc plasmid was co-transfected with CCC(dDBD) clone and Pax-QNR/pax-6 promoter-CAT. Luciferase activity assay was performed as described in Crépieux *et al.*, 1993 on 1% of cells and RNAase protection performed on the remaining lysate.

In vitro mutagenesis and DNA sequencing The mutagenesis Pax-QNR TATA box conducted in order to transform Pax-QNR TATA box (GATATTAAG) into the SV40E TATA box, (CTTATTTAT) have been made on the HincII-Asp718 fragment inserted in the M13 mp19 vector. The single stranded directed mutagenesis was conducted with an Amersham oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis system, using a mutated oligonucleotide complementary to Pax-QNR sequence located between nucleotides -37 to -48 (Plaza *et al.*, 1993). Oligonucleotide used is as follow: 5'-CACTAACTTTCCATAAATAAGCACGCC3'. In bold letters are the mutated nucleotides. Nucleotide sequence of mutated clones was determined by the dideoxynucleotide chain-termination method using a ³⁵S sequencing kit (Amersham Pharmacia).

DNAseI footprinting The DNA probes used were the 494 bp XbaI-SauI, the 594 bp HincII-Asp718, the 439 bp XhoI-SauI included in the former fragment and the 214 bp ScaI-SauI fragments, [³²P] dCTP and dATP labeled with the Klenow fragment of DNA polymerase I (Boehringer). Footprinting reactions were performed using 5 ng of end-labeled DNA, variable amount of R2R3 peptide (200 ng to 1 µg) in 10 µl of 20% Glycerol, 60 mM KCl, 20 mM Hepes pH 7.9, 5 mM EDTA, 0.12 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF,

5 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂ with 1 µg of poly dI-dC. Binding was performed 1 h at 4°C and digested for 30 s at 20°C by 20 ng of DNAaseI. Reaction was then stopped by 30 µl of 50 mM EDTA and 0.5 mg ml⁻¹ of proteinase K, phenol extracted, and EtOH precipitated. The recovered DNA was then loaded on a 6% sequencing gel.

In situ hybridization RNA probes were prepared from the 653 bp XhoI-Asp718 genomic fragment cloned in pGEM3 (Plaza *et al.*, 1993). This clone was used to prepare high specific activity ³⁵S-labeled RNA sense and antisense Pax-QNR probes. Chicken c-myb probe was prepared from the CCC vector. The 2.0 Kbp ClaI fragment containing the coding sequence was inserted in the pGEM3 vector. Sense and antisense probes were processed and used as described in Quéva *et al.*, 1992.

Acknowledgements

We thank O Gabrielsen and J Lipsick for generous gift of material, and J Lipsick and HJ Chen for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, Association pour la Recherche contre le Cancer and the Association Française Retinitis Pigmentosa.

References

- Amara M. (1987). *Development*, 101, 1-22.
- Brayman J, et al. (1993). *Mol. Cell. Biol.*, 13, 1599-1609.
- Casasnovas S, et al. (1993). *Genomics*, 18, 537-545.
- Biedenkapp H, Borgenmeyer U, Sippel AE and Klempnauer K-H. (1988). *Nature* (London), 335, 835-837.
- Lawmeester T, et al. (1992). *Mech Dev.*, 37, 57-68.
- Wheeler W, Lampert A, Lipsick JS, and Baluda MA. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4265-4269.
- Wheeler W and Klempnauer K-H. (1991). *EMBO J.*, 10, 3713-3719.
- Wheeler W, Mink S, Ringwald M and Klempnauer K-H. (1993). *EMBO J.*, 12, 2027-2038.
- Crépieux P, et al. (1993). *Mol. Cell. Biol.*, 13, 7257-7266.
- Crépieux P, et al. (1993). *Mol. Cell. Biol.*, 13, 4423-4431.
- Crépieux P, et al. (1988). *Mol. Cell. Biol.*, 8, 884-892.
- Crépieux P, et al. (1983). *Exp. Cell. Res.*, 149, 151-162.
- Crépieux P, et al. (1993). *Gene Expression*, 3, 215-225.
- Crépieux P and Lipsick J. (1993). *Mol. Cell. Biol.*, 13, 7334-7348.
- Dozier C, et al. (1993). *Cell Growth and Differentiation*, 4, 281-289.
- Wendendorff JW, Whittaker LJ, Eltman JT and Lipsick JS. (1992). *Genes Dev.*, 6, 2524-2535.
- Wheeler W, Grimm S and Klempnauer K-H. (1992). *EMBO J.*, 11, 4619-4629.
- Wheeler W, Natour S and Klempnauer K-H. (1993). *Oncogene*, 8, 1775-1782.
- Wheeler W, et al. (1991). *Protein Eng.*, 4, 891-901.
- Gabrielsen O, Sentenac A and Fromageot P. (1991). *Science*, 253, 1140-1143.
- Wheeler W, et al. (1992a). *J. Virol.*, 66, 160-166.
- Wheeler W, et al. (1992b). *J. Virol.*, 66, 6773-6776.
- Wheeler W, et al. (1990). *Cell*, 63, 1267-1276.
- Wheeler W and Bishop JM. (1986). *Mol. Cell. Biol.*, 6, 3677-3684.
- Graf T. (1992). *Current Opinion in Genetics and Development*, 2, 249-255.
- Grässer F, Graf T and Lipsick J. (1991). *Mol. Cell. Biol.*, 11, 3987-3996.
- Grässer F, et al. (1992). *Oncogene*, 7, 1005-1009.
- Hill RE, et al. (1991). *Nature*, 354, 522-525.
- Howe KM, Reakes CF and Watson R. (1990). *EMBO J.*, 9, 161-169.
- Ibanez CE and Lipsick JS. (1990). *Mol. Cell. Biol.*, 10, 2285-2293.
- Ingham PW. (1988). *Nature*, 335, 25-34.
- Kessel M and Gruss P. (1990). *Science*, 249, 374-379.
- Klempnauer KH, Arnold H and Biedenkapp H. (1989). *Genes Dev.*, 3, 1582-1589.
- Klempnauer KH, Symonds G, Evan GI and Bishop JM. (1984). *Cell*, 37, 537-547.
- Lam EW-F, Robinson C and Watson RJ. (1992). *Oncogene*, 7, 1185-1190.
- Lüscher B and Eisenman R. (1990). *Genes Dev.*, 4, 2235-2241.
- Martini P, et al. (1992). *Oncogene*, 7, 1721-1728.
- Maulbecker C and Gruss P. (1993). *EMBO J.*, 12, 2361-2367.
- Moelling K, et al. (1984). *Cell*, 40, 983-9.
- Mucenski M, et al. (1991). *Cell*, 65, 677-689.
- Nakagoshi H, et al. (1992). *Oncogene*, 7, 1233-1240.
- Nakano T and Graf T. (1992). *Oncogene*, 7, 527-534.
- Ness SA, Marknell A and Graf T. (1989). *Cell*, 59, 1115-1125.
- Ness SA, et al. (1993). *Genes Dev.*, 7, 749-759.
- Nomura T, et al. (1993). *J. Biol. Chem.*, 268, 21914-21923.
- Nomura T, et al. (1988). *Nucleic Acids Res.*, 16, 11075-11089.
- Plaza S, Dozier C and Saule S. (1993). *Cell Growth and Differentiation*, 4, 1041-1050.

- Quéva C, et al. (1992). *Development*, 114, 125-133.
- Ramsay RG, Ikeda K, Rifkind A and Marks PA. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6849-6853.
- Sakura H, et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5758-5762.
- Simons M, et al. (1992). *Nature*, 359, 67-70.
- Stapleton P, et al. (1993). *Nature Genetics*, 3, 292-298.
- Sureau A, et al. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11683-11687.
- Thiele C, Cohen P and Israel A. (1988). *Mol. Cell. Biol.*, 8, 1677-1683.
- Ton CC, et al. (1991). *Cell*, 67, 1059-1074.
- Treisman J, Harris E and Desplan C. (1991). *Genes Dev.*, 5, 594-604.
- Walther C, et al. (1991). *Genomics*, 11, 424-434.
- Walther C and Gruss P. (1991). *Development*, 113, 1435-1449.
- Weston K and Bishop JM. (1989). *Cell*, 58, 85-93.
- Weston K. (1992). *Nucleic Acids. Res.*, 20, 3043-3049.

Overexpression of *A-myb* induces basic Fibroblast Growth Factor dependent proliferation of chicken neuroretina cells

Nathalie Turque, Serge Plaza, Karl-Heinz Klempnauer⁺ and Simon Saule*

CNRS EP56, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex, France.

⁺Hans-Spemann-Laboratory Max-Plank-Institute for Immunobiology Stübeweg 51; D-79108 Freiburg, Germany.

*To whom correspondence should be addressed.

Phone number : (33)20 87 77 86, Fax number : (33)20 87 79 08.

Key words: neuroretina /*A-myb* /*c-myb* /bFGF.

Running Title : *A-myb* and neuroretina cell proliferation.

Abstract

The *v-* or *c-Myb* containing retroviruses (AMV or CCC) induce the proliferation of chicken neuroretina (CNR) cells in minimal medium. Addition of basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) confers to CNR cells the ability to form colonies in soft agar. Infection of CNR cells with a retrovirus encoding the *c-myb* related *A-myb* gene results in cells with distinct biological properties. Like *c-myb* CNR cells, *A-myb* expressing CNR cells are responsive to bFGF, however, they are unable to grow in soft agar. In contrast to the normal CNR, *A-myb* and *c-myb* CNR cells express the *mim-1* gene and maintain a high expression of the Pax-6 gene. Previous work had shown that the c-Myb protein binds to and regulates the Pax-6 promoter. We therefore tested whether A-Myb also regulates this target promoter in transient transfection assays. We observed an efficient activation of the Pax-6 promoters by both c-Myb and A-Myb proteins. Thus, these results demonstrate that the *c-myb* and *A-myb* genes exhibit close (but not identical) biological properties in CNR cells and, as previously reported, share similar target genes.

Results and discussion

Basic FGF, a fundamental regulatory molecule (for review see Gospodarowicz 1990), stimulates the growth of CNR cells infected by an avian retrovirus containing either the *v-myb* or the complete chicken *c-myb* genes and, in contrast to uninfected cells allows them to form colonies in soft agar (Garrido et al., 1992a, 1992b). The *v-myb* protein (*v-Myb*) is a doubly truncated version of its normal cellular counterpart *c-Myb*. The *Myb* proteins display sequence-specific DNA-binding activity and function as transcription factors. Several *myb* target genes have been identified (Ness et al., 1989; Burk and Klempnauer, 1991; Siu et al., 1992; Nakagoshi et al., 1992; Sureau et al., 1992; Plaza et al., 1995a) and *c-myb* plays an essential role in the development of the hematopoietic cells (Mucenski et al., 1991). Besides *c-myb*, two *myb*-related genes, *A-myb* and *B-myb* have been identified (Nomura et al., 1988; Bouwmeester et al., 1992; Foos et al., 1992; Lam et al., 1992). The predicted proteins encoded by these genes exhibit strong amino-acid homology with the DNA-binding domain of *c-Myb*, suggesting that *A-Myb*, *B-Myb* and *c-Myb* form a family of DNA-binding proteins, and recent data show that the transactivation properties of *A-Myb* and *c-Myb* are very similar, suggesting that *A-Myb* and *c-Myb* are functional homologs (Foos et al., 1994; Golay et al., 1994; Trauth et al., 1994).

Several lines of evidence suggest that the *myb* gene family may control cellular differentiation through a direct regulation of gene expression (for review see Graf, 1992; Lüscher and Eisenman, 1990). We recently observed that *c-myb* is expressed in the neuroretina and is able to transactivate the *Pax-6* promoters (Plaza et al., 1995a). *Pax-6* is a paired-box and an homeobox-containing gene expressed in the developing central nervous system, the optic cup, lens, overlying epithelium, in the neuronal layers of the retina and the endocrine pancreas (Walther and Gruss, 1991; Turque et al., 1994). The paired-box encodes the paired domain, a conserved DNA-binding domain (Treisman et al., 1991; Walther et al., 1991), and the homeobox encodes the homeodomain, another DNA-binding domain with a

helix-turn-helix motif (Kissinger et al., 1990). Mutations in the *Pax-6* gene have been associated with the mouse mutant *Small eye* (Hill et al., 1994) the corresponding human gene (*AN*) has been found deleted or mutated in aniridia and other eye anomalies (Ton et al., 1991) and the *Drosophila eyeless* gene is homologous to *Pax-6* (Quiring et al., 1994). Both the *A-myb* and *c-myb* genes are expressed in the neuroretina (Plaza et al., 1995a; Sitzmann et al., 1995; Trauth et al., 1994). To further explore the relationship between the two genes, we therefore wished to know whether *A-myb* and *c-myb* induce similar biological responses in CNR cells.

Primary CNR cells transfected with the CCC (encoding the 75 kDa c-Myb) or pCRNC-*A-myb* viruses (encoding the 86 kDa A-Myb) and selected in the presence of G418, proliferated slowly, were morphologically untransformed but, in contrast to normal epithelial-like CNR, presented a fibroblastic appearance (Figure 1A). We have previously shown that the proliferation of CNR cells expressing the nuclear 75 kDa c-Myb can be stimulated by bFGF (Garrido *et al.*, 1992b). To determine whether cells expressing the 86 kDa A-Myb are bFGF responsive, we tested the effect of bFGF on the proliferation of CNR cells infected by the *A-myb* virus. These cells responded positively to bFGF, and the stimulatory effect of bFGF was dose-dependent in complete or in low-serum medium (Figure 2A and 2B). However, in low-serum medium, the CCC cells responded better to bFGF than the *A-myb* cells (Figure 2B).

The ability of cells to grow under anchorage independent conditions has been shown to correlate with transformation (Kahn and Shin, 1979). We therefore tested the ability of CNR cells to respond to bFGF when maintained in soft agar in the presence of serum supplemented medium. As shown in Table I, helper virus infected cells did not form any colony in absence or in presence of bFGF. As previously shown, CCC CNR cells did grow in soft agar, but only in presence of bFGF. In contrast, *A-myb* CNR cells were unable to grow in soft agar with or without bFGF. In presence of bFGF, these cells yielded only small clusters

of cells, in contrast to the CCC CNR cells (Figure 1B). We conclude that A-*myb*, in contrast to c-*myb*, is not sufficient to induce CNR cell transformation, even in the presence of bFGF.

It has been reported that c-*myb* and E26 v-*myb*, but not AMV v-*myb*, directly transactivate the *mim-1* gene (Ness *et al.*, 1989). In addition, we have previously described that the c-*myb* containing CCC virus and E26, but not AMV, were able to induce the transcription of the endogenous *mim-1* gene in infected CNR cells (Garrido *et al.*, 1992b). Due to the relatedness between c-*myb* and A-*myb*, we analyzed the status of *mim-1* transcription in A-*myb* infected CNR cells. Results presented in Figure 3 show that A-*myb* CNR cells expressing, as expected, high amounts of the A-*myb* RNA (Figure 3) also expressed *mim-1* at similar level than c-*myb* CNR cells. Therefore, as found previously in the hemopoietic HD11 cell line (Foos *et al.*, 1994), A-*myb* is able, like c-*myb*, to induce *myb* target gene transcription in infected CNR cells. Since we have reported that c-*myb* activates the *Pax-6* promoter (Plaza *et al.*, 1995a), we investigated whether *Pax-6* was expressed in G418 selected pCRNC-A-*myb* CNR cells. In contrast to the normal CNR cells, high levels of *Pax-6* products were detected in c-*myb* (Garrido *et al.*, 1992b) as well as in A-*myb* expressing CNR cells (Figure 1C). Therefore, this result raises the possibility that the *Pax-6* promoter is also a target for the A-Myb transcription factor, as demonstrated for c-Myb.

In order to determine if A-Myb is able to directly regulate the *Pax-6* promoters, we co-transfected equal amounts of plasmid pXA (the 1.5 Kbp XbaI-Asp718 genomic P0 promoter fragment linked to the gene encoding the Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT), Plaza *et al.*, 1993) or pPIN^S (the 1.01 Kbp NotI genomic P1 promoter fragment linked to the CAT gene, Plaza *et al.*, 1995b) together with increasing amounts of expression vectors for A-Myb and c-Myb into CNR cells. Cell lysates were collected two days after transfection, and the levels of CAT activity present in the lysates were determined. The *mim-1* promoter, used as an internal control (*mim-1* LUC), was similarly expressed in the CCC or

pCRNC *A-myb* transfected cells (Figure 4A). Co-transfection of the pXA or pPINS^S with 10 µg of the vector expressing the c-Myb protein resulted in a strong increase of CAT activity relative to the vector control (Figure 4B and 4C). Co-transfection of the pXA with 10 µg of the vector expressing the A-Myb protein resulted in a similar increase of CAT activity relative to the vector control (Figure 4B, promoter P0 compare lanes 4 and 5; promoter P1 Figure 4C compare lanes 7 and 8).

Thus, both the 75 kDa c-Myb protein and the 86 kDa A-Myb are transcriptional activators of *Pax-6* promoters. The sequence of the *Pax-6* P0 promoter region contains more than 22 DNA binding sites for c-Myb (Plaza et al., 1995a). This *Pax-6* promoter was able to drive the expression of the CAT gene in several cell types, and can be transactivated by c-Myb. We found by *in situ* hybridization that *c-myb* is expressed in the developing neuroretina, specially when the neuroretina cells are proliferating, and a similar observation has been made in the mouse (Sitzmann et al., 1995). *A-myb* is also expressed in the neuroretina as well as in mitotically active cells of the developing central nervous system (Trauth et al., 1994 and data not shown).

An important question is to know whether or not *Pax-6* is regulated *in vivo* by *myb*-related genes. No obvious abnormalities in the tissues where *Pax-6* is expressed (i.e. neural tube, brain, eye, pancreas) have been reported in mice bearing a homozygous disruption of *c-myb* (Mucenski et al., 1991). However, since these embryos die very early, it is not known if these tissues would differentiate normally and if A-myb may in part replace c-myb in *Pax-6* regulation.

The fact that A-*myb*, a presumed functional homolog of *c-myb*, also activates the *Pax-6* gene suggest that A-*myb* and *c-myb* may have very similar functions during the development of the central nervous system and supports the possibility that the expression of *myb* genes during the neuroretina development may be important for the eye development.

Materials and methods

Materials

Conalbumin, and insulin were obtained from Sigma (St Louis, MO). Dulbecco's modified Eagle's medium-H16 (DMEM) and F-12 medium were obtained from Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY). DF medium was constituted by 50 % v/v H16 and F12. Fetal calf serum (FCS) was obtained from Hyclone (Sterile Systems Inc., Logan, UT). Tissue culture dishes were from Falcon Plastics (Oxnard, CA) and Fungizone from E.R.Squibb & Sons (Princeton, NJ). Gelatinized dishes were coated with 0.2 % gelatin in PBS overnight at 4°C. Bovine pituitary basic FGF (bFGF) was purified as previously described (Gospodarowicz *et al.*, 1984).

Viruses and molecular clones

The viruses used in these study were obtained by co-transfection of the molecularly cloned proviral DNAs with DNA of the helper virus RAV-1 (Rous Associated Virus-1) onto CNR cells as previously described (Amouyel *et al.*, 1989).

Cell culture, growth assay, soft agar cloning and transfection.

Dissociated CNR dissected from 7-day-old chicken embryos were plated in DF medium containing 10 % fetal calf serum, 1 % vitamin MEM 100X, and 10 µg/ml of conalbumin (complete medium). Dishes (60 mm) containing 5×10^6 dissociated cells in complete medium were infected with various viruses at 37°C. The infected cells were passaged four times on gelatin-coated dishes to allow the virus to spread. Transfected cells were selected for one week in medium containing geneticin (400 µg/ml) before testing.

To study the sensitivity of the cells to growth factors, 4×10^4 cells were seeded in 22-mm gelatinized wells in 1 ml medium (supplemented with either 1 or 10% FCS). bFGF was added every other day beginning on the day of plating. After 4 days the cultures were trypsinized and the number of cells determined with a Coulter counter.

To assess the anchorage-independent growth of infected CNR, 4×10^4 cells were suspended in 2 ml of soft agar containing medium (complete medium + 0.4% agar noble, cloning medium). This medium was layered on a hardened base layer of medium containing 1.2% agarose in 35-mm tissue culture dish. bFGF (20 ng/ml) was added every other day on the top of the soft agar until the end of the experiment. Colonies were counted 14 days later.

For transient transfection experiments, CNR cells prepared from 7-day-old embryos, were seeded at 10^5 cells per 6-wells plate in DMEM 10% FCS, 24 h prior transfection. Transfections were performed in duplicate by the calcium phosphate method. For the experiments with the vector expressing the c-Myb or A-Myb proteins, cells were co-transfected with 1 μ g of the CAT construct, 1 μ g of the *mim-1* LUC construct and 10 μ g of expression vector. The luciferase activity assay was performed with a Berthold Lumat LB9501 luminometer.

RNA extraction and northern analysis

RNA was extracted using the guanidinium-isothiocyanate-caesium chloride method. 20 μ g of total cellular RNA separated by electrophoresis in 1% agarose formaldehyde gels was transferred to nitrocellulose filters.

The A-*myb* probe was the 1.6 kbp EcoRI fragment derived from the pCRNA-*myb* vector containing the 3' part of the gene (Foos et al., 1994). The *mim-1* probe (Ness et al., 1989) derived from an 869-bp *mim-1* partial cDNA fragment and was provided by C. Quéva. The α actin probe was a 513 bp PvuII-XbaI fragment from pHMaA-1 (Erba et al., 1986) and was provided by F. Radjvany. The purified inserts were labeled to high specific activity ($2-4 \times 10^9$ dpm/ μ g) with a random primer labelling system (Amersham). Hybridization was done by the standard procedure, and the filters were exposed to Kodak XAR-5 film.

Immunofluorescence analysis.

pCRNC-A-*myb* CNR cells cultured on collagen-coated 12-mm microscope cover slips were fixed for 20 minutes with 3.7% paraformaldehyde in PBS, then treated

with rabbit anti Pax-QNR serum 11 or 14 (Carrière *et al.*, 1993). Bound antibodies were revealed using swine anti rabbit FITC (Dako).

Acknowledgements

We thank Patrick Martin for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Institut Pasteur de Lille, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Association pour la Recherche sur le Cancer, la Ligue Nationale Contre le Cancer and the Association Française Retinitis Pigmentosa..

References

- Amouyel P, Laudet V, Martin P, Li R, Quatannens B, Stéhelin D and Saule S. (1989) *J. Virol.*, **63**, 3382-3388.
- Bouwmeester T, Guehmann S, El-Baradi T, Kalkbrenner F, van Wijk I, Moelling K and Pieler T.(1992). *Mechanisms of Development*, **37**, 57-68.
- Burk O and Klempnauer K-H. (1991) *EMBO J* **10**, 3731-3719.
- Carrière, C., Plaza, S., Martin, P., Quatannens, B., Bailly, M., Stehelin, D. and Saule, S. (1993). *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7257-7266.
- Erba HP, Gunning P and Kedes L. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 5275-5294.
- Foos G, Grimm S and Klempnauer K-H. (1994) *Oncogene* **9**, 2431-2433.
- Foos G, Grimm S and Klempnauer K-H. (1992) *EMBO J* **11**, 4619-4629.
- Garrido C, Grässer F, Lipsick JS, Stéhelin D and Saule S. (1992b) *J. Virol.*, **66**, 6773-6776.
- Garrido C, Leprince D, Lipsick JS, Stéhelin D, Gospodarowicz D and Saule S. (1992a). *J. Virol.*, **66**, 160-166.
- Golay J, Loffarelli L, Luppi M and Introna M.(1994) *Oncogene* **9**, 2469-2479.
- Gospodarowicz D, Cheng J, Lui G-M, Baird A and Bohlen P. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 6963-6967.
- Gospodarowicz D (1990). *Curr. Top. Dev. Biol.* , **24**, 57-93.

- Graf, T. (1992) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2**, 249-255.
- Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B., Ton, C.C., Saunders, G., Hanson, I., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. and Heyningen, V.V. (1991). *Nature*, **354**, 522-525.
- Kahn P and Shin S. (1979) *J. Cell. Biol.*, **82**, 1-16.
- Kissinger C, Liu B, Martin-Blanco E, Kornberg T and Pabo CO. (1990). *Cell*, **63**, 579-590.
- Lam, E.W-F., Robinson, C. and Watson, R.J. (1992). *Oncogene*, **7**, 1185-1890.
- Lüscher B and Eisenman RN. (1990). *Genes & Dev.*, **4**, 2235-2241.
- Mucenski ML, McLain K, Kier AB, Swerdlow SH, Schreiner CM, Miller TA, Pietryga DW, Scott jr WJ and Potter SS. (1991). *Cell*, **65**, 677-689.
- Nakagoshi, H., Kanei-Ishii, C., Sawazaki, T., Mizuguchi, G. and Ishii, S. (1992). *Oncogene*, **7**, 1233-1240.
- Ness SA, Marknell A and Graf T. (1989) *Cell*, **59**, 1115-1125.
- Nomura, T., Takahashi, H., Matsui, M., Ishii, S., Date, T., Sasamoto, S. & Ishizaki, R. (1988). *Nucleic. Acids Res.*, **16**, 11075-11089.
- Plaza. S., Dozier, C. and Saule, S. (1993) *Cell Growth & Diff.* **4**, 1041-1050.
- Plaza S, Turque N, Dozier C, Bailly M and Saule S. (1995a). *Oncogene*, **10**, 329-340.
- Plaza. S., Dozier, C., Turque, N. and Saule, S. (1995b) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3344-3353.
- Quiring R, Walldorf U, Kloter U and Gehering W. (1994). *Science*, **265**, 785-789.
- Sitzmann J, Noben-Trauth K and Klempnauer K-H. (1995). *Oncogene*, **11**, 2273-2279.
- Siu G, Wurster AL, Lipsick JS and Hedrick SM. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1592-1604.
- Sureau A, Soret J, Vellard M, Crochet J and Perbal B. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11683-11687.

- Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil M, Monaghan P, Jordan T, Van Heyningen V, Hastie N, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, Royer-Pokora B, Collins F, Swaroop A, Strong LC and Saunders GF.(1991). *Cell*, 67, 1059-1074.
- Treisman J, Harris E and Desplan C. (1991). *Genes Dev.*, 5, 594-604.
- Trauth K, Mutschler B, Jenkins N A, Gilbert D, Copeland NG and Klempnauer K-H. (1994) *EMBO J* 13, 5994-6005.
- Turque N, Plaza S, Radvanyi F, Carrière C and Saule S.(1994) *Molecular Endocrinology*, 8, 929-938.
- Walther C and Gruss P. (1991). *Development*, 113, 1435-1449.
- Walther C, Guenet J-L, Simon D, Deutch U, Jostes B, Goulding MD, Plachov D, Balling R and Gruss P. (1991). *Genomics*, 11, 424-434.

Figure legends

Figure 1 : A) Morphology of normal (a, c) and *A-myb* expressing CNR cells (b, d). Dissociated CNR cells dissected from 7-day-old chicken embryos were plated in HF medium (50% [vol/vol] H16 and F12) supplemented with 10% fetal calf serum, 1% vitamin X100, and 10 μ g of conalbumin per ml. Dishes (60-mm diameter) containing 5x10⁶ dissociated cells were transfected at 37°C with pCRNC-*A-myb* and RAV-1 proviral DNAs. The transfected cells were selected in G418-containing complete medium for 10 days. Actin filaments (c, d) were labelled with NBD-labelled phalloidin.

B) To assess the anchorage-independant growth of CNR, 4x10⁴ cells were suspended in 2 ml of cloning medium (complete medium plus 0.4% Noble agar) in a 35-mm-diameter tissue culture dish. bFGF (20 ng/ml) was added to duplicate cultures on the top of the soft agar every other day. Colonies were photographed 14 days later, using a phase-contrast microscope. Morphology of CCC clones expressing *c-myb* (a) or *A-myb* (b).

C) Expression of Pax-6/Pax-QNR products by immunofluorescence in *A-myb* expressing CNR cells. Subcellular localization of Pax-QNR products was assayed by indirect immunofluorescence on fixed CNR cells with anti-Pax-QNR serum 11 (recognizing the paired domain) and 14 (recognizing the carboxyl-terminus of the protein). Anti-Pax-QNR immunoreactive proteins were detected with FITC-labelled goat anti-rabbit immunoglobulin secondary reagent.

Figure 2 : Ability of pituitary-derived bFGF to stimulate the growth of infected CNR cells

A) Low-density cultures of CNR cells infected with CCC and *A-myb* viruses, both pseudotyped with the RAV-1 helper virus, or infected with RAV-1 alone, were grown in 22-mm diameter gelatinized wells with 1ml of complete medium (10% of FCS). Basic FGF was added every other day at the concentration indicated in the

Figure. After 4 days in culture, duplicate wells were trypsinized and cells were counted. (○) CCC; (●) A-myb; (■) RAV-1 CNR cells.

B) Same experiment as in A, but the cells were grown in 1% FCS containing medium. (○) CCC; (●) A-myb; (■) RAV-1 CNR cells.

Figure 3 : Expression of *A-myb* and *mim-1* in *A-myb* and CCC infected CNR cells. Northern blotting analyses were performed with twenty micrograms of total cellular RNA in each lane and hybridized with the *mim-1*, *A-myb* (the arrows indicate the genomic and sub-genomic size of the *A-myb* containing RNA) and actin probes.

Figure 4 : Activation of the *mim-1* and *Pax-QNR* promoters by c-Myb and A-Myb proteins. (A) CNR cells were transfected with 1 μ g of CAT construct (*Pax-QNR* 1.5Kbp XbaI-Asp718 promoter P0 fragment or the 1.01 Kbp NotI P1 promoter fragment) plus 1 μ g of *mim-1* Δ 240 LUC construct and 10 μ g of CCC or pCRNC-*A-myb*. As control we used 10 μ g of the empty pCRNC-M expression vector (lane -). The CAT and LUC activities were determined using equal amounts of protein. The luciferase activity assay was determined with a Berthold Lumat LB9501 luminometer. CAT activities were measured with a Phosphor Imager (Molecular Dynamix). Thin lines indicate standard deviations calculated from transfections performed in duplicates.

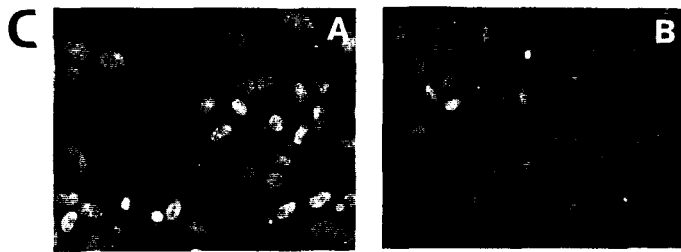
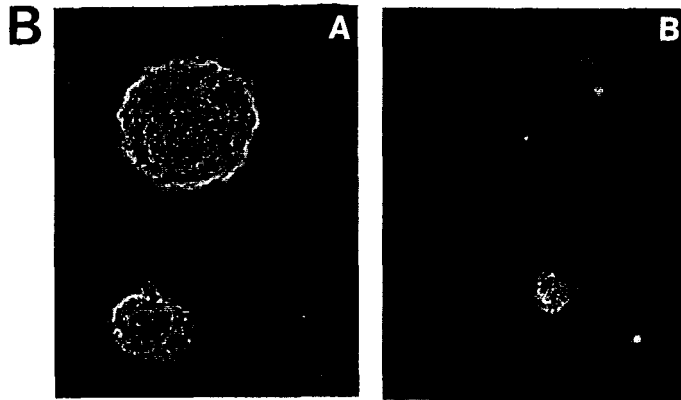
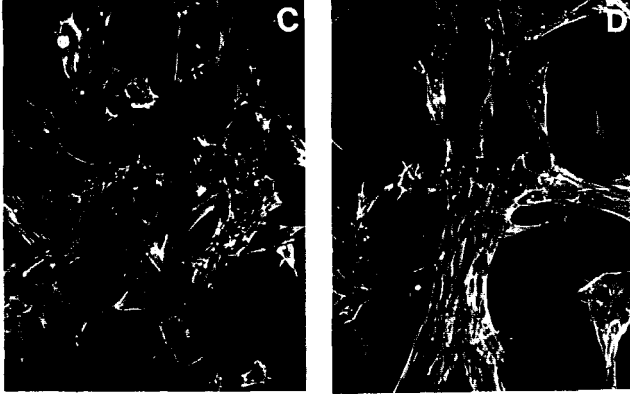
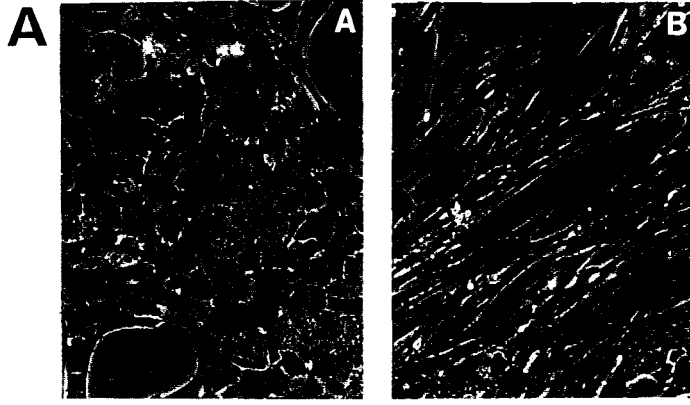


TABLE 1 : Effects of bFGF on CNR expressing A-myb or c-myb

Virus	No. of colonies on soft agar	
	-FGF	+FGF
RAV-1	0	0
CCC	0	980
A-Myb	0	0

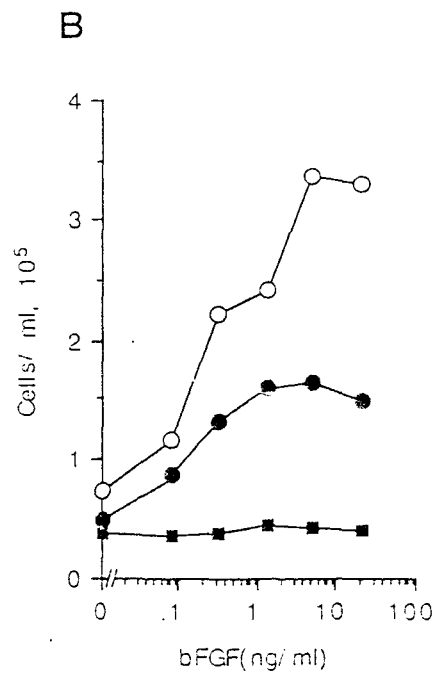
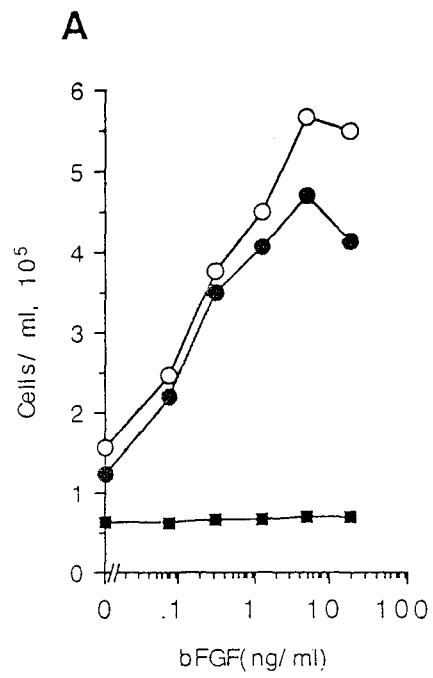


Fig. 2

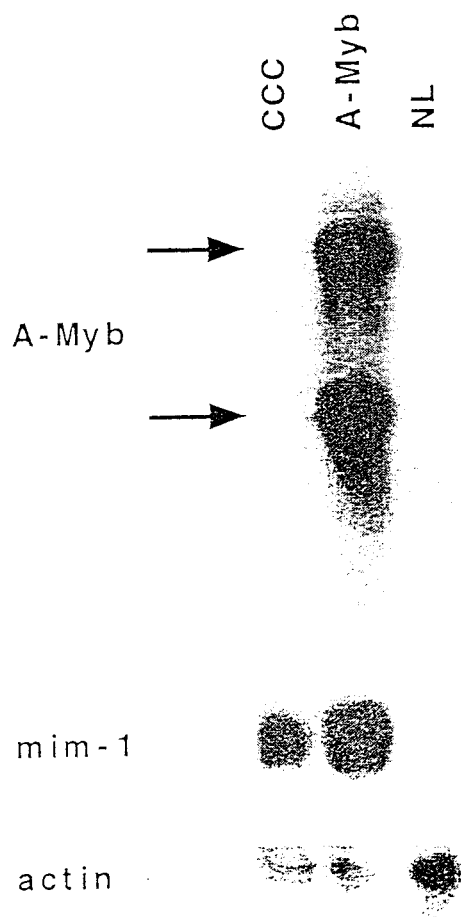


Fig. 3

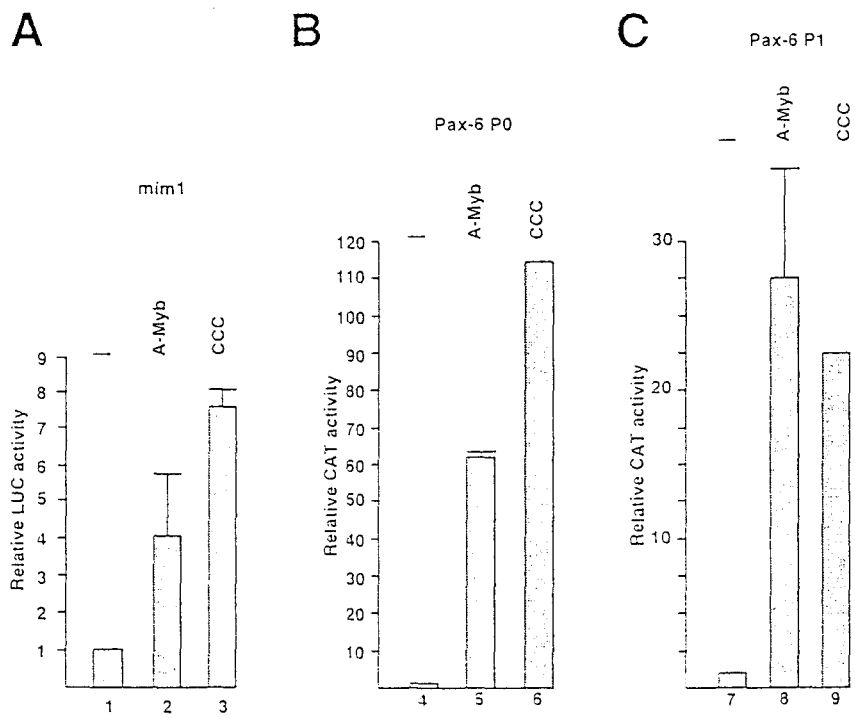


Fig. 4

QUATRIEME PARTIE

**«Characterization of a new melanocyte-specific gene (*QNR-71*) expressed
in the *v-myc* transformed quail neuroretina.»**

Nathalie Turque, Fabienne Denhez, Patrick Martin, Nathalie Planque, Manuella Bailly, Agnes
Bègue, Dominique Stéhelin and Simon Saule

The EMBO Journal , 15, 3338-3350 1996

Caractérisation d'un nouveau gène spécifique des mélanocytes (QNR-71) exprimé dans les cellules de neurorétine de Caille transformées par *v-myc*.

La construction d'une banque d'ADNc de cellules de neurorétine de Caille (QNR) transformées par le virus MC29 (Martin *et al.*, 1992) et le criblage différentiel de celle-ci a permis d'isoler, en-dehors du clone Pax-QNR, un second clone que nous avons appelé QNR-71. Nous montrons avec ce travail que cet ADNc correspond à un gène impliqué dans la mélanogenèse car son produit est apparenté à des protéines de la matrice mélanosomale, ce gène est exprimé dans des tissus mélanisés et enfin son expression serait régulée par les facteurs de transcription Myc et Mi appartenant tout deux à la classe B des facteurs de transcription bHLH (**Tableau 4**).

A. Isolement et homologies de séquences

L'ADN *QNR-71* contenant une phase de lecture ouverte de 393 codons et étant dépourvu de codon d'initiation de la traduction (Figure 1A), nous avons, par la technique de « RACE-PCR », obtenu une extrémité 5' contenant un AUG placé dans un contexte favorable pour être un codon d'initiation (Kozak, 1990) mais localisé toutefois dans une portion de séquence divergeant avec celle de l'extrémité 5' de l'ADNc (Figure 1C). Afin de trancher entre l'hypothèse d'un épissage alternatif ou celle d'une chimère pour le clone QNR-71, nous avons entrepris l'organisation génomique du gène correspondant. Nous ne nous sommes intéressés qu'aux quatre premiers exons (Figure 1B). Les résultats obtenus suggèrent que le fragment isolé par « RACE-PCR » correspond bien au locus *QNR-71* et que le petit fragment (a) de l'ADNc isolé de la banque a une origine alternative à ce locus.

La séquence en acides aminés déduite à partir de la séquence nucléotidique de QNR-71 produit une protéine de 529 acides aminés. La séquence protéique de QNR-71 présente des homologies avec deux protéines impliquées dans la mélanogenèse: Pmel17, MMP115 et Nmb (Figure 2). *Pmel17* est l'équivalent humain du locus murin *silver* dont les mutations sont responsables du blanchiment des poils (Kobayashi *et al.*, 1994) et leur

équivalent aviaire est le gène *MMP115* (Mochii *et al.*, 1991) codant tous les deux des protéines de la matrice mélanosomale. Quant au gène *nmb*, il a été cloné à partir de lignées de mélanomes humains (Weterman *et al.*, 1995). La séquence de la protéine QNR-71 montre la présence d'une séquence de type « signal peptide ». Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression tissulaire de *QNR71*.

B. Expression tissulaire de *QNR71*

L'expression de *QNR-71* n'a été détectée, par «northern blot», que dans des tissus mélanisés, à savoir le derme et la rétine pigmentaire (RPE) (Figure 3). Dans la RPE, par hybridation *in situ*, les messagers de *QNR-71* apparaissent avant que les cellules ne se pigmentent (Figure 5A et 5B). Dans le derme, *QNR-71* est fortement exprimé dans les bourgeons plumaires qui contiennent des mélanocytes, mais pas dans les zones interplumaires (Figure 5C-F), bien que quelques mélanoblastes y stationnent (Teillet, 1971). *QNR-71* est très peu exprimé dans le derme à E8 (Figures 3 et 5), stade où les mélanocytes ne sont pas encore totalement différenciés. Il se dégage donc que les mélanocytes dérivés du SNC (ceux de la RPE) expriment *QNR-71* avant leur différenciation, tandis que les mélanocytes dérivés des crêtes neurales (ceux du derme) ne l'expriment qu'après leur différenciation. Des différences de comportement entre les deux populations mélanocytaires ont déjà été rapportées (Robbins *et al.*, 1993). Ces quelques observations concernant les sites d'expression de *QNR-71* confirment l'implication de *QNR-71* dans la mélanogenèse.

Afin de pouvoir étudier les produits de *QNR-71*, nous avons réalisé chez des Lapins des anticorps polyclonaux dirigés contre les 205 derniers acides aminés de la protéine codées par *QNR-71* (Figure 6A). Nos anticorps sont capables de reconnaître dans des cellules de RPE fraîchement disséquées (Figure 6B) ou en culture (Figure 6c) un doublet protéique de 95kD et 100kD, alors que la taille attendue pour la protéine native est de 68kD, une protéine à cette taille étant par ailleurs visible dans chaque piste. Cette énorme différence de poids moléculaire peut s'expliquer par la présence de 11 sites potentiels de glycosylation dans la séquence en supposant ces sites fonctionnels (Figure 1A et C).

Effectivement, le traitement de cellules de RPE par la tunicamicine, un inhibiteur de la N-glycosylation (Mahnoey et Duksin, 1979), réduit la taille du doublet protéique à une seule bande de 68kD (résultats non montrés).

C. Régulation de *QNR71*

QNR-71 ayant été isolé à partir d'une banque d'ADNc de cellules de neurorétine transformées par *v-myc*, nous avons étudié la régulation transcriptionnelle de *QNR-71* par Myc. Par «northern blot», nous avons montré que *QNR-71* s'expriment dans différents types cellulaires qui ne sont pas concernés par la mélanogenèse mais transformées par MC29, telles que les HD11 (lignée de macrophages) ou les QEC (Figure 4).

Ces premières indications concernant une éventuelle régulation transcriptionnelle de *QNR-71* par Myc, nous ont amenés à cloner un fragment génomique de 4,5 kpb contenant le premier exon (Figure 1B) en orientations sens et antisens en amont du gène CAT dans le vecteur pBLCAT6. Nous avons dans un premier temps vérifié que seule l'orientation sens de ce grand fragment possédait une activité promotrice par des expériences de transfections menées dans des QNR et des RPE (Figure 7). Ensuite nous avons réalisé des expériences de co-transfection en QNR de la construction sens avec des quantités croissantes d'un vecteur exprimant la protéine c-Myc humaine et obtenu jusqu'à 50 fois plus d'expression du promoteur avec c-Myc (Figure 8A).

Mi, un autre facteur de transcription de type bHLHLZ, codé par le gène *mi* pour *microphthalmia*, a été montré essentiel pour la différenciation mélanocytaire en régulant l'expression de gènes spécifiques des mélanocytes comme la tyrosinase ou la TRP-1 (Yasumoto *et al.*, 1994; Hemesath *et al.*, 1994). En réalisant des expériences similaires de co-transfection en QNR de la construction sens de 4,5kpb et d'un vecteur exprimant la protéine Mi de Souris, nous avons observé une réponse du promoteur beaucoup plus importante, jusqu'à 800 fois supérieure au taux de base obtenu avec le vecteur vide (Figure 8B). La région de promotion de *QNR-71* dont nous disposons serait par conséquent activables directement par deux facteurs de transcription de type bHLHLZ, tous les deux

étant exprimés dans des tissus mélanisés, la RPE (Jaffredo *et al.*, 1989; Hodgkinson *et al.*, 1993) et dans le derme *in vivo* (Desbiens *et al.*, 1991; Hodgkinson *et al.*, 1993).

D. Caractérisation des sites de réponse à Mi et Myc dans le promoteur de *QNR-71*

Ces résultats nous ont conduits à séquencer la région de promotion de *QNR-71*. La séquence a été menée sur 1kpb en amont du site présumé d'initiation de la transcription, et nous a révélé la présence de deux « E-Box », sites de fixation CATGTG, proches l'un de l'autre, placés de -106 à -101 (Mi1) et de -52 à -47 (Mi2) (Figure 9A). En utilisant comme sonde un fragment du promoteur de 228 pb, $\Delta 71-220$ contenant les deux sites Mi1 et Mi2, nous avons vérifié la capacité de Mi à se fixer sur ce fragment par des expériences de retard sur gel (Figure 9B).

Des expériences de protection au cuivre phénantroline, ce qui permet de visualiser la fixation d'une protéine sur l'ADN, ont permis de montrer que, dans nos conditions, le site Mi1 n'était pas protégé par la partie C-terminale de Mi utilisée dans ces expériences (Figure 9C). Afin de vérifier l'importance et l'implication de ces sites dans la réponse du promoteur de *QNR-71* à Myc et Mi, nous avons amputé le fragment $\Delta 71-220$ d'une part du site Mi1 ($\Delta 71-175$) et d'autre part des deux sites Mi1 et Mi2 ($\Delta 71-123$). Des cotransfections dans des fibroblastes de Caille (QEC) de ces délétants avec le vecteur exprimant Mi ont montré que $\Delta 71-220$ était mieux transactivé que $\Delta 71-175$ et que l'absence des sites Mi empêche le fragment $\Delta 71-123$ d'être transactivé par Mi (Figure 10). Pour confirmer ces données, nous avons décidé d'intégrer des mutations dans les sites de fixation pour Mi du fragment $\Delta 71-220$ en substituant à la séquence CATGTG la séquence GAGGTG (Figure 11A). Les différentes constructions ont été cotransfectées en QNR avec le vecteur exprimant Mi. La réponse à Mi n'est quasiment pas modifiée lorsque seul le site Mi1 (site non protégé) est muté alors que les mutations du site Mi2 réduisent fortement cette réponse, et totalement dans le cas du double mutant (Figure 11A). Le site Mi2 est donc primordial pour la régulation de *QNR-71* par Mi. Si l'on remplace le vecteur d'expression de Mi par celui de c-Myc, seul $\Delta 71-220$ peut être transactivé par c-Myc, au

contraire des 3 mutants (Figure 11B), encore que d'une façon marginale, suggérant la présence d'autres sites en amont des 228 pb étudiées.

L'expression de *QNR-71* semble donc bien être directement régulée par les deux facteurs MI et Myc.

Enfin, nous avons montré que le gène endogène *QNR-71* répondait en synthétisant davantage de protéines à l'expression de Myc et Mi induite sous promotion virale (Figure 12).

Ces résultats montrent que les produits de *QNR-71* sont des protéines apparentées à des protéines mélanosomales. En outre la séquence peptidique indique que les produits de *QNR-71* sont probablement des protéines ancrées dans la membrane. *QNR-71* apparaît donc comme un nouveau marqueur de la différenciation mélanocytaire.

De surcroît, l'expression de *QNR-71*, liée à la mélanogenèse, peut être directement régulée par le facteur Mi, qui est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des mélanocytes.

QNR-71 apparaît également comme un nouveau gène cible du facteur de transcription Myc dont on connaît l'importance dans de nombreux aspects de la physiologie cellulaire mais dont on connaît très peu de gènes cibles, à savoir le gène codant p53 (Reisman *et al.*, 1993), le gène ECA39 (Benvenisty *et al.*, 1992), le gène codant l'ornithine décarboxylase (Bello-Fernandez *et al.*, 1993) et le gène codant la phosphatase cdc25 que Myc réprimerait (Galaktionov *et al.*, 1996).

Characterization of a new melanocyte-specific gene (*QNR-71*) expressed in *v-myc*-transformed quail neuroretina

Nathalie Turque, Fabienne Denhez^{1,2},
Patrick Martin, Nathalie Planque,
Manuella Bailly, Agnes Bègue¹
Dominique Stéhelin¹ and Simon Saule³

CNRS EP 56 and ¹URA1160, Institut Pasteur de Lille,
1 Rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France

²Present address: Massachusetts General Hospital-Harvard Medical
School, Pediatric Surgical Research Laboratories, Warren 1133,
Boston, MA 02114, USA

³Corresponding author

Quail neuroretina cells (QNR) infected with the *v-myc*-expressing retrovirus MC29 become pigmented after several passages *in vitro*. After differential screening of a cDNA library constructed from these cells, we have isolated a cDNA clone (*QNR-71*) which identifies an RNA expressed only in the pigmented layer of the retina and in the epidermis. This gene can also be induced in other cell types transformed by MC29, suggesting that *QNR-71* may be regulated by the *v-myc* protein. Sequence analysis showed that the *QNR-71* cDNA exhibits stretches of homologies with melanosomal proteins encoding genes. From bacterially expressed *QNR-71* peptides we obtained rabbit antisera able to specifically recognize two proteins of 95 and 100 kDa in pigmented retinal cells, but not in the neuroretina. To study the regulation of *QNR-71*, we used promoter fragments linked to the CAT reporter gene, in transient co-expression assay. We observed an increase in CAT expression with a *c-MYC* and microphthalmia (*mi*) expression vectors. Both *MYC* and *mi* activate the *QNR-71* promoter through direct binding to a CATGTG site present in the promoter fragment.

Keywords: *mi/myc*/neuroretina/pigmentation/
transdifferentiation

Introduction

The vertebrate embryonic eye offers exceptional advantages for investigation of the molecular basis of differentiation, since it exhibits a wide repertoire of possible tissue type interconversions *in vivo* and *in vitro*. Cells of the neuroretina (NR) have the potential to transdifferentiate into lens or pigmented cells (Okada, 1976), and cells from the retinal pigmented epithelium (RPE) have the potential to transdifferentiate into lens or neuronal cells (Park and Hoilenberg, 1989; Pitack *et al.*, 1991; Agata *et al.*, 1993). Cell differentiation is the product of differential gene expression and transcription factors encoded by oncogenes may regulate such events. The avian myelocytomatosis virus strain MC29, which has transduced the *myc* onco-

gene, suppresses the competence for terminal differentiation of myogenic cells, does not alter the differentiation of chondrocytes and induces some differentiated traits in neural crest cells (Alema *et al.*, 1985; Falcone *et al.*, 1985; Fauquet *et al.*, 1990). A great deal of circumstantial evidence suggests that control of *myc* function may be important during differentiation. Differentiation is often accompanied by a reduction in the amount of *c-myc* mRNA (Bentley and Groudine, 1986; Hass *et al.*, 1991). Conversely, resumption of proliferation, loss of differentiation markers and 'retrodifferentiation' are accompanied by a resumption of *c-myc* mRNA expression (Hass *et al.*, 1991) and during the dedifferentiation process RPE cells express high levels of *c-myc* RNA (Agata *et al.*, 1993). *C-myc* is a short-lived nuclear protein that harbors structural motifs seen in a number of transcription factors: a helix-loop-helix motif (HLH) (Murre *et al.*, 1989), a leucine zipper motif (LZ) (Landschultz *et al.*, 1987) and a basic region (b) (Prendergast and Ziff, 1989). These domains appear in several transcription factors, like max, mad, USF, TFEB, TFE3 and mi. They play a role in dimerization and DNA binding properties (Ayer *et al.*, 1993; Hodgkinson *et al.*, 1993; Kadesch, 1993). *Myc* proteins homodimerize and bind DNA poorly (Blackwell *et al.*, 1990; Dang *et al.*, 1991). However, *myc* has been found to interact with max, and binding of the *myc*-max heterodimeric complex to the core hexanucleotide CACGTG sequence is stronger relative to that of max homodimers, suggesting that heterodimers are the preferred species (Blackwood and Eisenman, 1991). *Myc* overexpression activates, whereas max overexpression represses a CACGTG-driven reporter gene (Kretzner *et al.*, 1992). The *myc* transactivation domain is localized in the N-terminus (Kato *et al.*, 1990), whereas the b-HLH-LZ domains are located in the C-terminus of the protein (Lüscher and Eisenman, 1990). Both the transactivation domain (Kato *et al.*, 1990) and the dimerization domains are required for *c-myc* and *v-myc* oncogenic activity (Amati *et al.*, 1993). Recently specific genes containing the core hexanucleotide CACGTG sequence have been found to be activated by *c-myc* protein, including the *p53* gene (Reisman *et al.*, 1993), the embryonically expressed gene *ECA39* (Benvenisty *et al.*, 1992) and the ornithine decarboxylase gene (Bello-Fernandez *et al.*, 1993).

We have previously observed that MC29 is able to stimulate quail NR cells (QNR) to become pigmented (Martin *et al.*, 1992). Conversely, this virus is able to induce neuronal traits in infected quail RPE (Plaza *et al.*, 1995). This suggests that the *myc* transcription factor is able to modulate gene expression leading to these transdifferentiated phenotypes. In order to isolate and characterize the genes potentially controlled by *myc* in the pigmentation process we constructed a cDNA library from the MC29 pigmented QNR and used differential

reening to isolate cDNAs expressed in these cells. One isolated cDNA is the quail homolog of the *Pax-6* gene (Martin *et al.*, 1992) strongly expressed in the NR, but not in the pigmented retina (Martin *et al.*, 1992; Plaza *et al.*, 1995). Here we describe the nucleotide sequence and expression pattern of another cDNA clone, MC29-NR-71. The derived amino acid sequence of this cDNA reveals a significant homology with the human gene product (Pmel17) expected to be equivalent of the mouse *silver* gene (Kwon *et al.*, 1991) and *nmb*, a gene expressed in low metastatic melanoma cell lines (Weterman *et al.*, 1995). Pmel17 encodes a melanosomal membrane protein responsible for T lymphocyte-associated melanoma tumor regression (Kawakami *et al.*, 1994). From bacterially expressed QNR-71 peptides we obtained rabbit antisera capable of specifically recognizing 95 and 100 kDa proteins in RPE and MC29 pigmented QNR cells. Using northern blot experiments and *in situ* hybridization we observed that *QNR-71* is expressed in the pigmented retina and feather epidermis. No signal could be detected in the NR. However, *QNR-71* RNA is rapidly induced in QNR cells propagated *in vitro* or infected with MC29 (RAV-1) virus and this RNA could also be found in some MC29-transformed cells, suggesting that *QNR-71* might be a target for the *v-myc* transcription factor. To study the transcriptional regulation of this gene we isolated the promoter region of the *QNR-71* gene. In transient co-transfection assays we were able to demonstrate a direct effect of *C-MYC*-encoding vectors on the 4.5 kbp promoter-containing genomic fragment. In addition, the microphthalmia-associated transcription factor *mi* (Hodgkinson *et al.*, 1993) strongly activates basal expression of the *QNR-71* promoter region. Two CATGTG *mi* and *myc* binding sites (Blackwell *et al.*, 1993; Hemesath *et al.*, 1994) located -106 to -101 and -52 to -47 nt upstream of the *QNR-71* first exon mediated the *myc* and *mi* response of this promoter. These results indicate that *QNR-71* encodes a new melanocyte-specific gene and that this gene is under the control of two b-HLH-LZ-containing transcription factors, *mi* and *myc*.

Results

Isolation of *QNR-71* cDNA and genomic clones

Experiments leading to the isolation of *QNR-71* were initially performed to identify NR-specific genes that may be involved in proliferation or differentiation of MC29-infected QNR. The cDNA library constructed from these cells was screened with probes complementary to MC29-infected QNR mRNA subtracted from MC29-infected quail embryo cell (QEC) mRNA (Martin *et al.*, 1992). We isolated a cDNA (*QNR-71*) which contained an open reading frame (ORF) of 393 codons (Figure 1A) but lacking an initiation codon. We performed RACE-PCR in order to characterize the missing 5'-part of the cDNA (Frohman *et al.*, 1988). RNAs isolated from MC29-infected QNR were retrotranscribed using an oligonucleotide primer complementary to the nucleotide sequence 175-1192 (primer A). The single-strand DNA obtained was tailed with dATP and used as a template for PCR experiments using oligo(dT) and primer B (an oligonucleotide complementary to the sequence 629-647). The DNA obtained was then cloned and five individual clones were

sequenced. The nucleotide sequence of the longest 164 of these clones is shown in Figure 1C. The other four clones are shorter, but their 5'-ends are within the first 9 nt of the longest one, suggesting that we have isolated the extreme 5'-end of *QNR-71* mRNA. Surprisingly, the nucleotide sequence homology between the fragment isolated by RACE-PCR and the *QNR-71* cDNA diverged 45 nt upstream of primer B and continued, in the same reading frame, for 167 additional codons, starting with an AUG in the context of a favorable start sequence (Kozak, 1990). This suggests that the fragment isolated by RACE-PCR and the *QNR-71* cDNA may be produced from alternatively spliced mRNAs; alternatively, the *QNR-71* cDNA could also be a chimera between two unrelated molecules. In order to clarify this point we isolated several genomic phages from two quail genomic libraries.

The 5' organization of the four overlapping phages isolated with the *QNR-71* cDNA as a probe is shown in Figure 1B. Sequencing of the genomic fragments hybridizing with this probe showed that the divergence between the DNA fragment isolated by RACE-PCR and the *QNR-71* cDNA takes place in exon 4. We were unable to localize the first 93 nt of *QNR-71* in the cloned genomic region or to isolate a distinct genomic phage containing these sequences, called exon a. Since none of the DNA fragments isolated by RACE-PCR contained exon a, if this exon is produced by an alternative splicing event of *QNR-71* this particular transcript is expected to be of low abundance and we will refer to exons 1, 2, 3 and 4 as the 5'-part of *QNR-71*. The remaining part of the isolated *QNR-71* cDNA is present downstream of exon 4, but its exon-intron boundaries were not further investigated. The sequence from exon 1 up to the end of the *QNR-71* cDNA covers 20 kbp of genomic DNA.

Nucleotide sequence comparison of *QNR-71* cDNA

The ORF deduced from the RACE-PCR DNA fragment, linked to the *QNR-71* ORF downstream of exon 4, codes for a protein of 529 amino acids. The first 22 amino acids of the deduced protein show characteristics of a signal peptide of secretory or membrane-associated proteins and fit the -1, -3 rule (Von Heijne, 1983). Eleven potential Asn-linked glycosylation sites are located at amino acid positions 92, 133, 145, 149, 192, 199, 248, 274, 307, 311 and 459 (Figure 1A and C, boxes). The protein exhibits a relatively high percentage of Ser (8.2%) and Thr (9.2%) throughout the protein. There is also a region of the protein equally rich in Ser/Thr/Pro/hydrophobic residues, the Pro being regularly spaced in this sequence (located between amino acids 316 and 349). The significance of such an arrangement of amino acids in this protein remains to be determined.

The nucleotide sequence of *QNR-71* cDNA and the deduced amino acid sequence were compared with computer-based sequence libraries. We found no sequence that had any meaningful homology with the 93 bp exon a. In contrast, we found significant amino acid sequence homologies with the Pmel17 (*Silver*) and Nmb proteins. *QNR-71* is not the avian *silver* counterpart, because another chicken gene, *MMP115* (Mochii *et al.*, 1991), is more closely related to *Pmel17* than *QNR-71* (Figure 2). This suggests that *QNR-71* is of the same family, but not the quail homolog of these genes. *nmb* is a novel gene

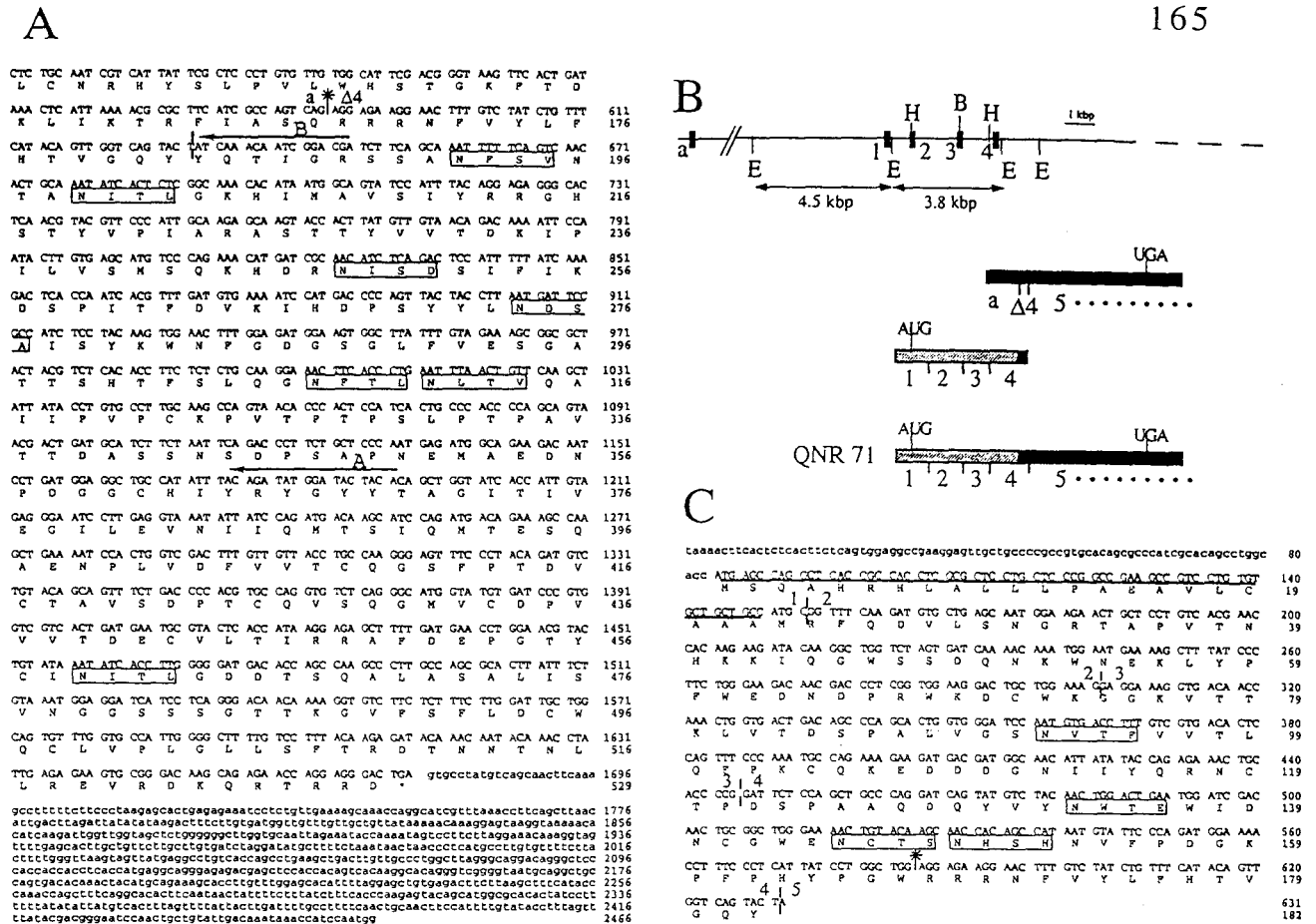


Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *QNR-71*-specific sequence. (A) *QNR-71* cDNA clone isolated from the differential screening. Exon a refers to the cDNA-specific sequence not found in the genomic DNA. Underlined nucleotides B and A represent the oligonucleotides used to perform the RACE-PCR experiment. (B) Schematic organization of the genomic 5'-part of the *QNR-71* gene. E, *EcoRI*; H, *HindIII*; B, *BamHI*. The black box below the genomic DNA, cDNA from (A); gray box, RACE-PCR fragment from (C). (C) *QNR-71* fragment isolated by RACE-PCR. Asterisks indicate the point where the cDNA and the RACE-PCR nucleotide sequences differ. The potential glycosylation sites are boxed. The signal region is underlined with a heavy line. The exon boundaries are indicated by bars with a number. For clarity we started the sequence numbering from the beginning of the RACE-PCR sequence, assuming that the RACE-PCR and the cDNA sequence after $\Delta 4$ are linked in the *QNR-71* transcript.

expressed in low metastatic human melanoma cell lines (Weterman et al., 1995). As shown in Figure 2, there are four regions of similarity in the four proteins: two in the N-terminal portion, one in the middle and one in the C-terminus of the four molecules. Around amino acid 280 there is a new 60 amino acid extracellular polycystic kidney disease (PKD) domain present in Pmel17, MMP115 and Nmb and also found in *QNR-71*. The PKD domain is predicted to be a globular domain that contains an antiparallel β -sheet of unknown function, repeated 14 times in the *PKD1* gene (International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995). The amino acid identity of the homologous regions is 35–39% between *QNR-71* and Pmel17 or MMP115 and 51–57% between Pmel17 and MMP115. If we take into account the similar amino acids, the similarity between *QNR-71* and Pmel17 is 64%. Three sets of repeated 26 amino acid motifs found in the middle of either Pmel17 (Kwon et al., 1991) or MMP115 (Mochii et al., 1991) are not found in *QNR-71*. The overall homology between *QNR-71* and Nmb is 50%, whereas the overall identity between Pmel17 and Nmb is 33%, suggesting a closer relationship between *QNR-71* and Nmb than with Pmel17. These sequence homologies

between *QNR-71* and gene Pmel17 associated with the mutation *Silver* (responsible to the progressive graying of hair due to the loss of functional follicular melanocytes) strongly suggest that, as with *Silver* (Kobayashi et al., 1994) or *nmb* (Weterman et al., 1995) isolated from melanoma cell lines, *QNR-71* is involved in melanogenesis.

***QNR-71* tissue specificity and expression in MC29-infected cells**

We investigated the presence of *QNR-71* mRNA in various tissues from E15 quail and chick embryos (Figure 3). Identical results were obtained for the quail and the chick. The *QNR-71* mRNA size differed in the two species (Figure 4 and data not shown). *QNR-71* exhibits a highly restricted tissue specificity, since the mRNA was detected by Northern blot in the pigmented retina and dermis, but not in the other tissues examined, including the NR. Pigmentation is produced by melanin pigments synthesized by epidermal melanocytes originating in the neural crest; these cells follow the dorsolateral migratory pathway before entering the ectoderm and this migration is com-

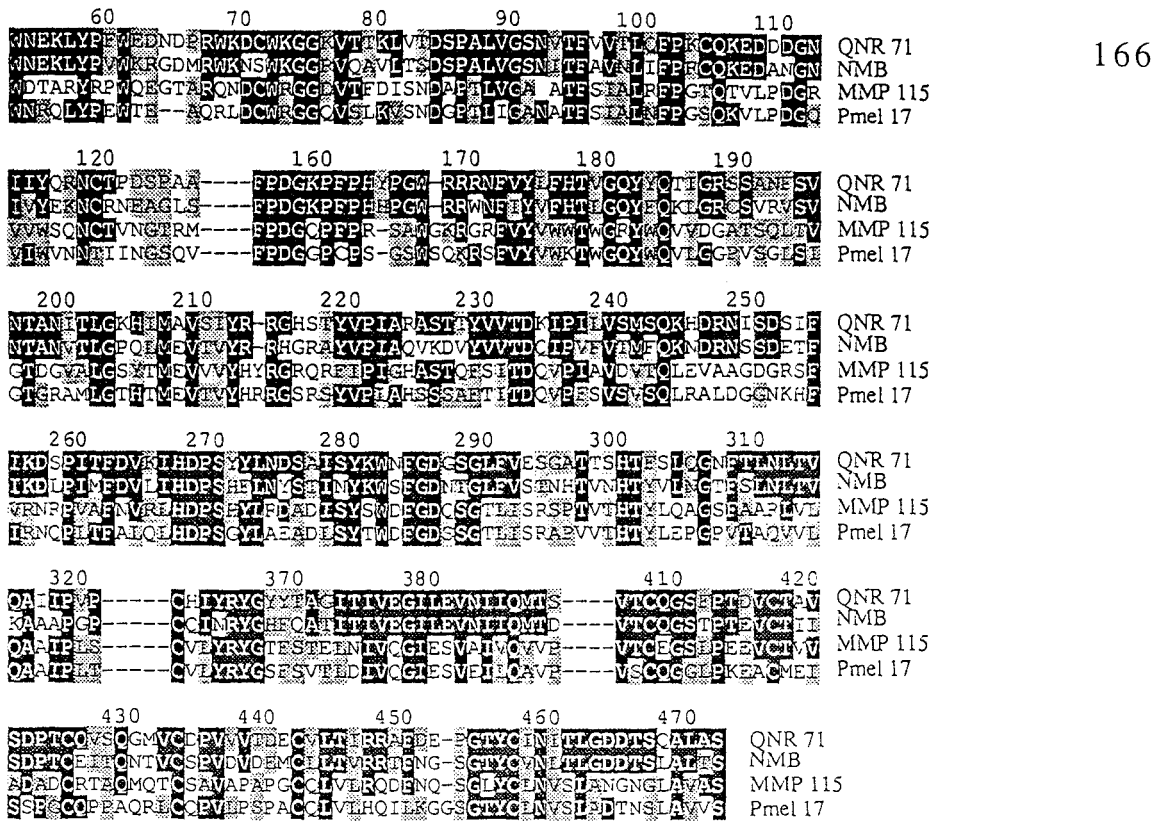


Fig. 2. Protein sequence comparison of QNR-71 with human Pmel17 (Kwon *et al.*, 1991) chicken MMP115 (Moschii *et al.*, 1991) and human Nmb (Weterman *et al.*, 1995). Numbers indicate amino acid positions in QNR-71. Boxes indicate conserved amino acids; black boxes, shared amino acids; grey boxes, amino acids with similar physicochemical character. Gaps (-) are introduced to allow maximal alignment.

pleted in the feather buds at E8 (Teillet, 1971; LeDouarin, 1982; Richardson *et al.*, 1989).

After several passages *in vitro* the QNR cells started to express *QNR-71* mRNA (Figure 4), without phenotypic pigmentation. This induction is most probably related to the pigmented phenotype occurring by transdifferentiation in the NR *in vitro* (Okada, 1976). MC29 induced a pigmented phenotype in QNR cells and these cells expressed the *QNR-71* gene (Figure 4). To study the possibility that the *myc* oncogene of MC29 induced expression of *QNR-71* without any pigmented phenotype we performed Northern blot experiments on different MC29-transformed cell types, some of them (like the macrophage HD11) far from the melanocytic lineage. As shown in Figure 4, some of the MC29-transformed cells, quail fibroblast Q8 (Bister *et al.*, 1977) and chicken macrophage HD11 (Beug *et al.*, 1979), expressed *QNR-71* mRNA. However, several MC29-transformed cells did not express *QNR-71* mRNA: this was the case for the chicken DU 72 epithelial cell line, originating from a MC29-induced hepatoma (Langlois *et al.*, 1976), and was also the case for some mass cultures of MC29-transformed QEC (data not shown). DU 72 and HD11 cells expressed similar amounts of *v-myc* RNA (Coll *et al.*, 1983). This suggests that an additional factor(s) is required together with *myc* to obtain *QNR-71* gene expression in MC29-infected cells.

Localization of QNR-71 expression by *in situ* hybridization

To determine the cellular localization of *QNR-71* mRNA in early embryos we hybridized ³⁵S-labeled RNA probes

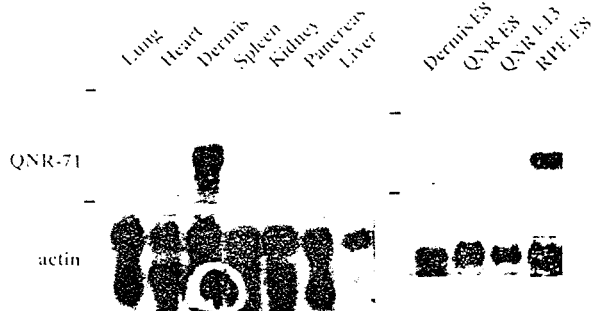


Fig. 3. Northern blot analysis of *QNR-71* transcription in embryonic tissues. Total RNA was extracted from E15 or E8 embryonic tissues as indicated at the top of the figure. A 20 µg aliquot of total RNA was hybridized with a ³²P-labeled *QNR-71* probe encompassing the complete *QNR-71* ORF. Hybridization of the RNA blots with an actin probe was used as a control. Bars on the left side of the figure show the position of 28 and 18S rRNA.

to E3.5 (embryonic day 3.5), E8 and E12 embryo sections. In the early embryos *QNR-71* signal was observed only in the pigmented retinal epithelium, prior to its melanization (compare Figure 5A and B). In E8 chicken embryo sections a very faint signal was observed in the feather buds (Figure 5G) and such a signal was also observed in Northern blot experiments (Figure 3). In E12 chicken embryo sections strong *QNR-71* expression was observed in the developing feather follicle, with transcripts being localized preferentially in the differentiating epidermal sheath comprising the pigmented epidermis (Figure 5C-F). The interplumar epidermis is not labeled. Cross sections at the dermal papilla level (Figure 5F) and feather filament

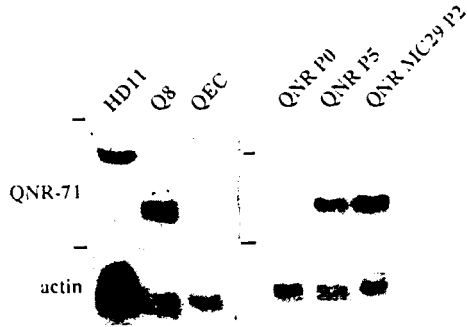


Fig. 4. Northern blot analysis of *QNR-71* transcription in *v-myc*-expressing cells. Total RNA was extracted from the normal or *v-myc*-transformed cell types (HD11, Q8 and QNR-MC29) as indicated at the top of the figure. E8 NR cells were passaged five times (QNR P5) *in vitro* and MC29-infected QNR were passaged twice *in vitro*.

level (Figure 5E) show *QNR-71* labeling in the epidermal sheath and the barb plate (arrow); most of the barb plate epithelium will become keratinized and form the feather barbs themselves. Together these results indicate a clear link between the presence of melanocytes (RPE and feather bud epithelium) and *QNR-71* gene expression. In QNR cells propagated *in vitro* only some cells in the culture exhibited the *QNR-71* transcript (Figure 5H).

Detection of *QNR-71* proteins *in vivo*

To obtain rabbit antiserum able to specifically recognize the QNR-71 protein we expressed the last 205 amino acids of QNR-71 in bacteria, and injected rabbits with gel-purified peptides. The anti-QNR-71 serum (serum 71Cter) was tested in immunoprecipitations using [³⁵S]-methionine-labeled cell extract from Cos-1 cells transfected with a vector encoding the QNR-71 C-terminus protein used in the rabbit immunization. SDS-PAGE analysis of anti-QNR-71 immunoprecipitates revealed a predominant protein with a relative molecular mass of 46 kDa which was not recognized by the cognate pre-immune serum (Figure 6A). QNR-71 protein was precipitated even when the serum was incubated with an excess of MS2 peptide, suggesting that the protein was recognized through specific determinants to the QNR-71 segment of the immunogen (data not shown).

To detect the QNR-71 product *in vivo* 8-day-old quail RPE were dissected out and [³⁵S]-methionine-labeled for 45 min. SDS-PAGE analysis of QNR-71 products immunoprecipitated with serum 71Cter revealed a predominant doublet with relative molecular masses of 95 and 100 kDa (Figure 6B, lane i). These proteins were not detected by the pre-immune serum (lanes pi). After infection by the MC29 virus the size of the upper QNR-71 product increased (Figure 6B), suggesting that *v-myc* expression is able to modulate a post-translational modification of the QNR-71 product. Since the 100 kDa band appears broader and more diffuse than the 95 kDa band, it is possible that MC29-induced transformation increases the glycosylation pattern of QNR-71. These products were absent from [³⁵S]-methionine-labeled retina dissected out and immunoprecipitated with serum 71Cter (Figure 6C), but could be observed in MC29-infected QNR (data not shown). As a control we were able to immunoprecipitate the Pax-QNR product from the QNR lysates (Carrière

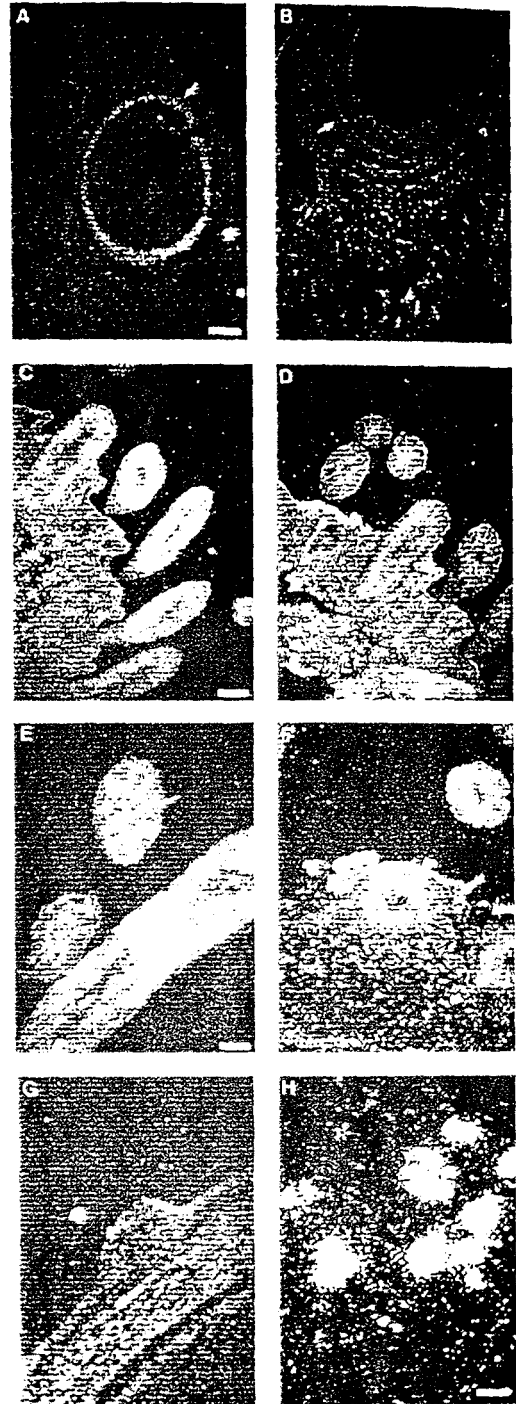


Fig. 5. Detection of *QNR-71* mRNA by *in situ* hybridization in quail and chicken. (A) Hybridization of E3.5 transversal quail section with a [³⁵S]-labeled *QNR-71* antisense probe (encompassing the 5' 600 bp from the clone described in Figure 1A). Arrow, pigmented retina. Bars 94 μ m. (B) Adjacent section hybridized with a [³⁵S]-labeled *QNR-71* sense probe as control. (C) Hybridization of E12 chicken dermis section with a [³⁵S]-labeled *QNR-71* antisense probe. Bars 150 μ m. (D) Adjacent section hybridized with a *QNR-71* sense probe. (E and F) Hybridization of E12 chicken dermis section with a *QNR-71* antisense probe. Arrow, barb plate; arrowhead, epidermal sheath. Bars 94 μ m. (G) Hybridization of E8 chicken dermis section with a *QNR-71* antisense probe. (H) Hybridization of QNR cells after five passages *in vitro* with *QNR-71* antisense probe. All nuclei were labeled with Hoechst stain.

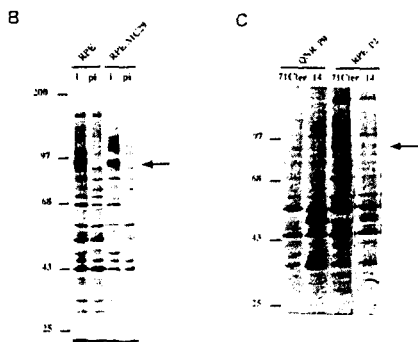


Fig. 6. Expression and characterization of QNR-71 proteins.

A) Characterization of the antiserum directed against QNR-71 protein. The 3'-part of *QNR-71* cDNA encoding the C-terminus of the protein, inserted in the pSG5 expression vector, was transfected into Cos-1 cells. Translated proteins, [³⁵S]methionine-labeled for 45 min. were immunoprecipitated with rabbit serum 71Cter prepared against bacterially expressed peptides (lanes i) and with cognate pre-immune sera (lanes pi). The peptide encoded by the C-terminal part of the QNR-71 protein was eluted after 15% SDS-PAGE of the bacterial proteins and injected into rabbits to prepare serum 71Cter. (B) Eight-day-old chicken pigmented retinas were dissected out or infected with MC-29 and [³⁵S]methionine-labeled for 45 min. Labeled cells were solubilized in 1% SDS buffer. Cell lysates were then immunoprecipitated in RIPA buffer with serum 71Cter (lanes i) and with cognate pre-immune sera (lanes pi). (C) Immunoprecipitations were performed on dissected out E8 QNR or RPE cells passaged twice *in vitro*. As a control we used serum 14, able to recognize the Pax-QNR/Pax-6 product strongly expressed in the NR (Carrière *et al.*, 1993).

et al., 1993). These results show that, as with *Pmel17* and other genes involved in melanogenesis (Kobayashi *et al.*, 1994), *QNR-71* encodes a high molecular weight protein. The protein weight deduced from the nucleotide sequence is expected to be 58 kDa. Figure 6B and C revealed in the immune, but not the pre-immune, lanes a protein of 68 kDa. This protein could represent the native QNR-71 product before any glycosylation, the 13 Pro in the C-terminus of the protein explaining the difference in molecular weight. QNR-71 is expressed in the pigmented retinal epithelium and is induced in QNR cells transformed *in vitro* by MC29.

Cloning and functional analysis of the *QNR-71* promoter

To study if the *QNR-71* gene is a target for the *v-myc* oncogene we cloned the promoter region of this gene. All of the five cDNA clones obtained by 5' RACE-PCR ended in the same region (within 9 bp), indicating that this is the approximate transcriptional start site. This start site is consistent with the size of the RNA seen by Northern blot. In order to determine whether this region exhibits promoter activity a 4.5 kbp *EcoRI* genomic fragment containing *QNR-71* exon I was inserted in both orientations upstream of the bacterial chloramphenicol acetyltransferase (*CAT*) gene of the promoterless pBLCAT6 vector. The resulting plasmids (pP71E^S and pP71E^{AS}) were transiently transfected into QNR and RPE cells, in parallel with pRSVCAT as a positive control and the promoterless pBLCAT6 vector as a negative control, and assayed for *CAT* activity. The results showed that the 4.5 kbp *EcoRI* fragment in the correct orientation (pP71E^S), but not the antisense orientation (pP71E^{AS}), was able to drive expression of the *CAT* gene in the

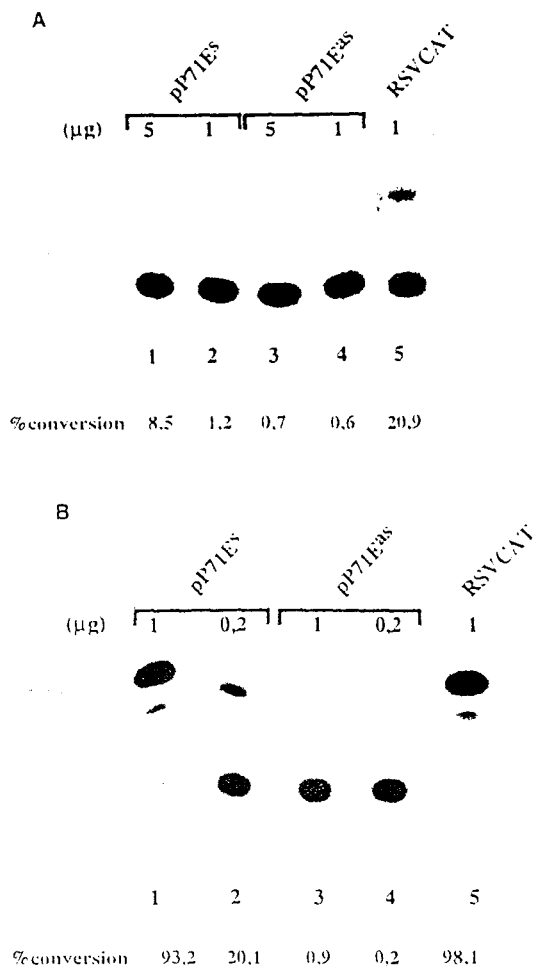


Fig. 7. Activity of a *QNR-71* promoter in the NR or pigmented retina cells. (A) pP71E^SCAT and pP71E^{AS}CAT contain the 4.5 kbp *EcoRI* fragment inserted in both orientations 5' of the *CAT* gene in plasmid pBLCAT6 (Plaza *et al.*, 1993). These plasmids (1–5 µg) were transiently transfected into QNR from E8 embryos and *CAT* activities were measured with an Instant Imager (Packard). The pRSVCAT (1 µg) construct was used as a control. Similar results were obtained in three independent experiments. (B) The same experiment as (A) but RPE cells were used instead of QNR cells.

transfected cells. The promoter was found to be more active in RPE than in QNR cells (compare Figure 7A and B, lanes 1).

In order to determine whether the *myc* protein is able to regulate the *QNR-71* promoter equal amounts of the pP71E^S construct were co-transfected with increasing amounts of the pSG5-MYC vector, which expresses the p64/67 human c-MYC proteins (Martin *et al.*, 1986), into QNR cells. Cell lysates were collected 2 days after transfection and the levels of *CAT* activity present in the lysates were determined. Co-transfection of pP71E^S with the vector expressing the c-MYC proteins resulted in a 50-fold increase in *CAT* activity relative to the vector control (Figure 8A, compare lanes 1 and 4).

The *mi* gene is essential for melanocyte differentiation and is able to activate the promoters of several genes involved in melanogenesis (Hodgkinson *et al.*, 1993; Bentley *et al.*, 1994; Hemesath *et al.*, 1994; Yavuzer, *et al.*, 1995). We tested whether the *mi* gene was able to regulate *QNR-71* promoter expression. Co-transfection of pP71E^S with a vector expressing the murine *mi* protein

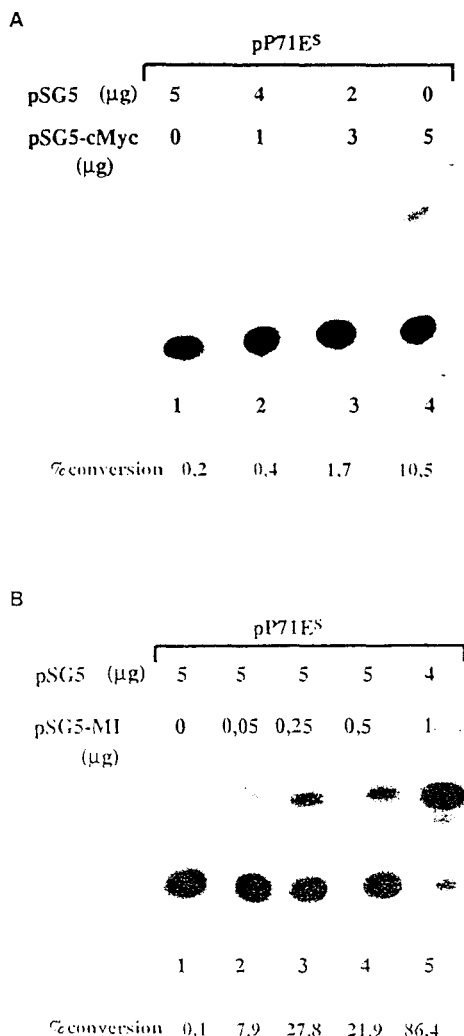


Fig 8. Activation of the *QNR-71* promoter by the b-HLH-LZ proteins. (A) Activation by c-MYC protein. QNR cells were transfected with 1 μg CAT construct and increasing amounts of the c-MYC expression plasmid pSG5-MYC, containing the human c-MYC cDNA insert (Martin *et al.*, 1986). The total amount of DNA in the transfection was kept constant by addition of the vector control pSG5. CAT activities were measured using equal amounts of protein. Similar results were obtained in three independent experiments performed in duplicate using two different DNA preparations. (B) Activation by the murine mi protein. QNR cells were transfected with 1 μg CAT construct and increasing amounts of the mi expression plasmid pSG5mi, containing the mouse mi cDNA insert lacking the 18 bp (nt 689–706) insert corresponding to an alternative splice site (Hodgkinson *et al.*, 1993). The total amount of DNA in the transfection was kept constant by addition of the vector control pSG5. CAT activities were measured using equal amounts of protein. Similar results were obtained in three independent experiments performed in duplicate using two different DNA preparations.

resulted in a 800-fold increase in CAT activity relative to the vector control (Figure 8B, compare lanes 1 and 5).

In order to localize the promoter sequences involved in the *QNR-71* response to the b-HLH-LZ proteins we sequenced the genomic fragment upstream of the first exon. As shown in Figure 9A, two CATGTG mi binding sites were localized at –106 to –101 and –52 to –47 nt, in an antisense orientation. To determine whether the mi protein transactivates the promoter by binding directly to these sites we performed an electrophoretic migration shift assay using the bacterially expressed C-terminus, including

the b-HLH-LZ domain, of the murine *mi* gene and as a probe, a labeled 228 bp fragment (*QNR-71* sequence shown in brackets in Figure 9A, plus the *Hind*III and *Bam*HI linkers) containing two mi binding sites. In contrast to the MS2 peptide alone, the MS2–mi fusion peptide was able to generate a DNA–protein complex (arrow, Figure 9B). To map the sequences recognized by mi within the 220 bp Δ 71 fragment footprinting experiments were performed. A scaled up band shift experiment was performed using bacterially expressed MS2–mi or MS2 alone, as a control. The entire gel was treated with phenanthroline and the free DNA and the DNA bound by the mi C-terminus were eluted from the gel and analyzed on a sequencing gel. One mi binding region was identified, containing the 3' mi binding site identified in the *QNR-71* sequence. No protection of the sequence containing the first mi binding site could be observed. This is intriguing, since this sequence fits very well with the M box sequence (TCATGTGCT) present in the promoter of the tyrosinase gene of different species (Bentley *et al.*, 1994). To map the mi-responsive elements in the *QNR-71* promoter 5' deletion mutants of the promoter were tested for mi sensitivity in transient co-transfection assays in QEC. The Δ 71–220 fragment containing the promoter sequence from –132 to +77 showed strongly increased CAT activity (20-fold) by mi in a co-transfection assay (Figure 10). For comparison, pP71E^S co-transfected with the vector expressing the murine mi protein resulted in a 30-fold increase in CAT activity relative to the vector control in QEC. The Δ 71–175 fragment, containing the promoter sequence from –98 to +77 and deleted of the 5' mi binding site, was still activated by mi (6-fold), in contrast to the Δ 71–123 fragment, containing the sequence from –46 to +77 and deleted of the two mi binding sites, which was insensitive to mi (Figure 10). To further characterize the nucleotides involved in the *QNR-71* response to the b-HLH-LZ proteins we mutagenized the two CATGTG boxes to GAGGTG sites. As with the 5' deletion mutants of the promoter, mutagenesis of the first CATGTG box (Δ 71–220–/+) resulted in a moderate decrease (compare lanes 2 and 6) in mi-induced CAT activity relative to the vector control in QNR. In contrast, mutagenesis of the second CATGTG sequence footprinted in Figure 9C (clone Δ 71–220–/–) resulted in a strong decrease (10-fold) in mi induced CAT activity. As found with the Δ 71–123 fragment, deleted of the two mi binding sites and completely insensitive to mi (Figure 10), the Δ 71–220–/– fragment, bearing the two mutagenized sites, was insensitive to mi (Figure 11A). When MYC instead of mi was used as transactivator only the wild-type Δ 71–220 fragment was found to be responsive (Figure 11B). Mutagenesis of any of the CATGTG boxes resulted in transactivation levels close to background. Taken together all these data suggest that the *QNR-71* promoter is directly regulated by the b-HLH-LZ mi and MYC transcription factors through binding to the CATGTG boxes.

Detection of *QNR-71* proteins in RPE cells expressing v-mi or v-myc

To demonstrate that the b-HLH-LZ proteins mi and myc were able to stimulate *QNR-71* expression *in vivo*, 8-day-old quail RPE cells propagated *in vitro* were transfected either with the SFCV-LE (Fuerstenberg *et al.*,

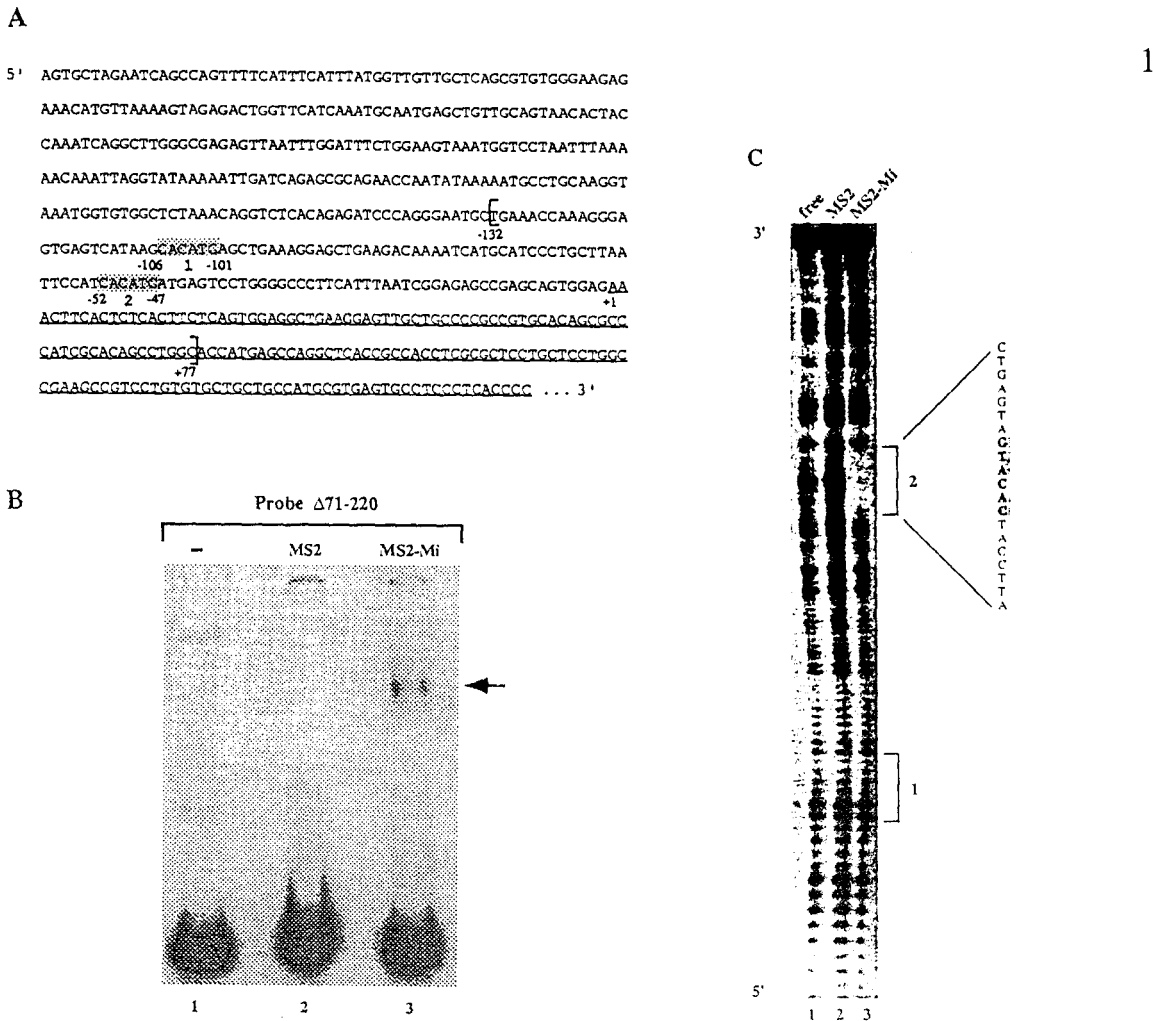


Fig. 9. (A) Nucleotide sequence of the *QNR-71* genomic fragment upstream of exon 1. Underlined sequence, *QNR-71* exon 1; gray boxes, the CATGTG sequences; brackets indicate the sequence of the P $\Delta 71-220$ fragment. (B) Gel retardation analysis of DNA fragment P $\Delta 71-220$. The end-labeled 228 bp *Hind*III-*Bam*HI fragment (from -132 to -77) was incubated without (lane -) or with 1 μ g bacterially expressed MS2 polypeptide or MS2-mi C-terminus. The arrow shows the position of the protein-DNA complex. (C) Orthophenanthroline footprinting of the P $\Delta 71-220$ *QNR-71* DNA fragment. The P $\Delta 71-220$ fragment end-labeled after *Hind*III digestion (5'-labeling) and incubated alone (lane free) or with bacterially expressed fusion protein containing the C-terminus of mi (lane MS2-mi) or the fusion peptide MS2 as a control (lane MS2). Orthophenanthroline footprints of the free and bound DNA were analyzed on a denaturing gel; the protected sequence shown on the left is deduced from a sequence ladder prepared by chemical cleavage of the probe DNA (G-A) and run in the same gel. Boxes 1 and 2 refer to the CATGTG sites boxed in (A).

1990) empty retroviral vector as control (LE), with the SFCV-LE-Mi virus (LE-Mi) encoding mouse *mi* (Hodgkinson *et al.*, 1993) or infected with MC29 (RPE MC29). After G418 treatment the selected cells were [³⁵S]methionine-labeled for 45 min. SDS-PAGE analysis of QNR-71 products immunoprecipitated with serum 14 revealed a strong 95 and 100 kDa doublet in LE-Mi- and MC29-infected RPE cells, but these proteins were only faintly detected in the control RPE LE cells (Figure 12). These proteins, as expected, were not detected by the pre-immune serum (data not shown). As an internal control we performed an immunoprecipitation of the Pax-6 proteins expressed in these cells (Plaza *et al.*, 1995) with serum 14. Similar amounts of Pax-6 proteins were recovered with the three RPE cell lysates (Figure 12, lanes 14). Thus both mi and myc were able to stimulate *QNR-71* expression *in vivo*.

Discussion

By using QNR cells transformed by the *myc*-containing MC29 virus we have isolated a new gene, *QNR-71*. Expression of this gene shows a tissue specificity restricted to pigmented tissues, the pigmented retinal epithelium and the dermis. Comparison of the deduced amino acids sequence of QNR-71 with computer-based sequence libraries showed a significant homology with the products of the human *Pmel17* (Kwon *et al.*, 1991), chicken *MMP115*, a retinal pigment epithelium-specific protein (Mochii *et al.*, 1991), and human *umb* genes, a gene expressed in low metastatic human melanoma cell lines (Weterman *et al.*, 1995). *Pmel17* is believed to encode a melanosomal matrix protein (Kawakami *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1994). Sequencing of the *si* locus from pigmentation mutant *silver* mice reveals

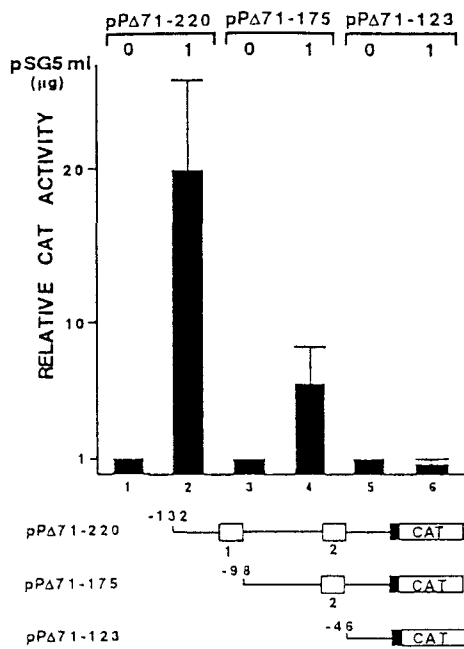


Fig. 10. Structures of the deleted CAT constructs and analysis of their activation by mi. QEC were transfected with 1 μ g CAT construct and, as indicated at the top of the figure, 1 μ g pSG5-mi. The total amount of DNA in the transfection was kept constant by addition of the vector control pSG5. CAT activities were measured using equal amounts of protein. The CAT activity of the promoter constructs in the absence of exogenous transactivator was arbitrarily designated 1. Open boxes, the CATGTG boxed in Figure 9A; black box, QNR71 exon 1 (from nucleotides +1 to +77). Percentage chloramphenicol acetylation of the basal promoters was on average 4.4% for the P Δ 71-220, 0.30% for the P Δ 71-175 and 0.45% for the P Δ 71-123 fragment. Thin lines indicate standard deviations calculated from two transfections performed with two distinct DNA preparations.

that the mutation results in a frameshift near the C-terminus of the Pmel17 protein (cited in Zhou *et al.*, 1994).

Phenotypic pigmentation is not required to obtain QNR-71 expression, since these transcripts are detected by *in situ* hybridization in the pigmented retina at E3.5, before pigmentation of this tissue. QNR-71 is not expressed in the neuroretina *in vivo*, but is induced after MC29 infection or *in vitro* multiplication. NR propagated *in vitro* is able to give rise to pigmented cells by a transdifferentiation event (Okada, 1976). *In situ* hybridization performed on cultured NR shows that not all the cells expressed QNR-71 mRNA. However, detection of QNR-71 expression arises soon after *in vitro* propagation of the NR, well before pigmentation, suggesting again that QNR-71 expression precedes the pigmented phenotype. Therefore, QNR-71 appears to be a marker for melanoblasts and melanocytes. In the dermis QNR-71 transcripts are detected in the feather follicle and epidermal sheath and no signal could be detected in the interplumar spaces. Melanocytes arising from the neural crest are located in the epidermal sheath and are absent from the interplumar spaces (Teillet, 1971). However, some cells of neural crest origin located between the feather germs in the dermis and epidermis remain undifferentiated (Teillet, 1971). Little signal could be detected in E8 feather buds, by both *in situ* hybridization and Northern blot experiments, when the melanocytes are not fully differentiated (Teillet, 1971; Richardson *et al.*, 1989) but are present. Thus it is possible that melanocytes derived from the neural crest express the QNR-71 gene

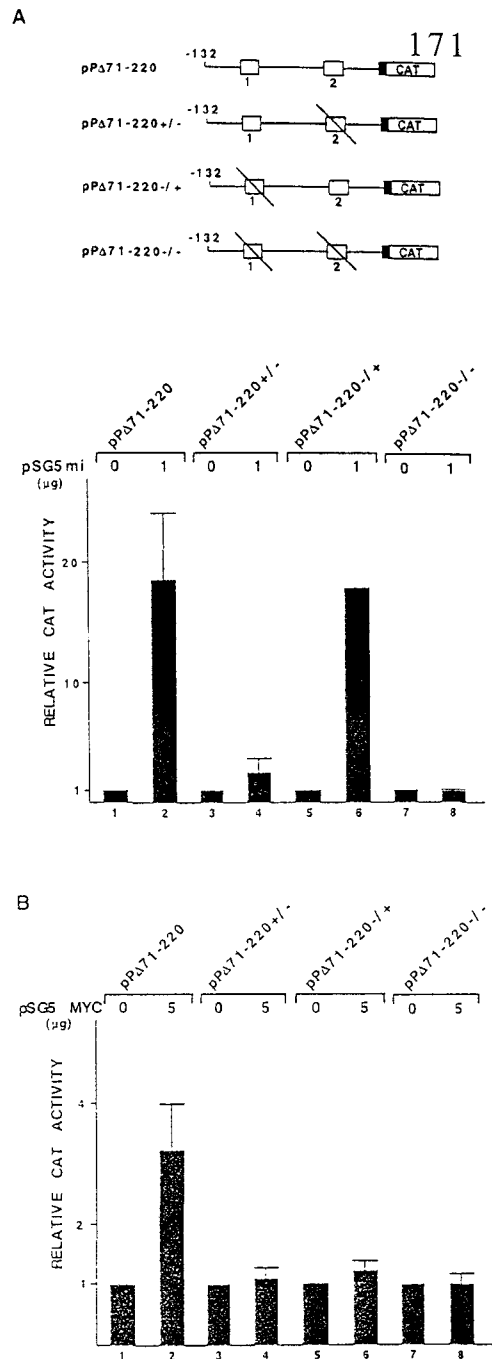


Fig. 11. Structures of the mutagenized CAT constructs and analysis of their activation by MYC and mi. (A) QNR were transfected with 1 μ g CAT construct and, as indicated at the top of the figure, 1 μ g pSG5-mi. The total amount of DNA in the transfection was kept constant by addition of the vector control pSG5. CAT activities were measured using equal amounts of protein. The CAT activity of the promoter constructs in the absence of exogenous transactivator was arbitrarily designated 1. Open boxes, the CATGTG boxed in Figure 9A; crossed out boxes, mutagenized sequence GAGGTG; black box, QNR-71 exon 1 (from nucleotides -1 to -77). (B) QNR were transfected with 1 μ g CAT construct and, as indicated at the top of the figure, 5 μ g pSG5-MYC. Thin lines indicate standard deviations calculated from two transfections performed with two distinct DNA preparations.

only after their differentiation has occurred in the feather bud, in contrast to retina melanoblasts derived from the central nervous system. Other genes have already been

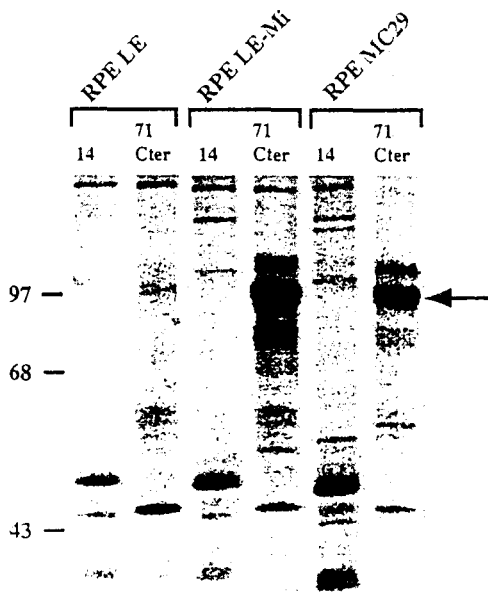


Fig. 12. Eight-day-old quail pigmented retinas cells were infected with MC-29 or transfected with the empty retroviral vector SFCV-LE or SFCV-LE-Mi expressing mouse *mi*. The transfected cells were selected with G418 for 10 days. After selection cells were [³⁵S]methionine labeled for 45 min. Labeled cells were solubilized in 1% SDS buffer. Cell lysates were then immunoprecipitated in RIPA buffer with serum anti-Cter and with serum 14 directed against Pax-6.

shown to be differentially required in neural crest- and RPE-derived melanocytes, e.g. the melanocyte stimulating hormone receptor is required for pigment synthesis in neural crest-derived but not RPE-derived melanocytes (Robbins *et al.*, 1993). The growth factor receptor c-Kit and its ligand Steel are required for survival of neural crest-derived but not RPE-derived melanocytes (Steel *et al.*, 1992). Thus *QNR-71* may be an additional marker useful in the study of melanocyte function.

Since *QNR-71* expression takes place in NR propagated *in vitro*, the involvement of the *v-myc* transcription factor in its expression is unclear. However, several lines of evidence suggest that *QNR-71* is indeed a target gene for b-HLH-LZ-containing transcription factors.

First, *QNR-71* could be induced in MC29-transformed cells, like hematopoietic macrophage HD11 cells, where induction of melanogenesis is not expected. We failed to detect any *QNR-71* expression in normal bone marrow cells or in several transformed hemopoietic cell types, like SFCV-transformed erythroblasts or myeloid cells transformed by AMV virus (Coll *et al.*, 1983). Also, no signal was detected in hemopoietic organs by *in situ* hybridization. Therefore, the *QNR-71* expression seen in the HD11 cells is most probably due to *v-myc* expression in these cells.

Second, *in vivo* the pigmented retinal epithelium expresses a high level of *c-myc* protein at E3 (Jaffredo *et al.*, 1989) and at E11 the *c-myc* and *QNR-71* expression patterns are indistinguishable by *in situ* hybridization in the feather follicles (Desbiens *et al.*, 1991). The NR also expresses the *c-myc* oncogene (Jaffredo *et al.*, 1989) and it is conceivable that this oncogene modulates *QNR-71* expression *in vitro*. In fact, a burst of *c-myc* expression occurs during dedifferentiation of the pigmented retina,

just before expression of lens-specific genes (Agata *et al.*, 1993).

Third, the 4.5 kbp promoter region of *QNR-71* is inducible by the human *c-myc* product in a transient transfection assay and we demonstrate, using *in vitro* mutagenesis experiments, that two CATGTG b-HLH-LZ binding sites localized at -106 to -101 and -52 to -47 nt were involved in the MYC response of the *QNR-71* promoter. Together these results demonstrate that the *QNR-71* gene is a target gene of the *myc* product.

Myc encodes a b-HLH-LZ protein that homodimerizes and binds DNA poorly (Blackwell *et al.*, 1990; Dang *et al.*, 1991). *Myc* has been found to interact with other b-HLH-LZ proteins, like max, and heterodimers are the preferred species for DNA binding (Blackwood and Eisenmen, 1991). Since some MC29-transformed cells did not express the *QNR-71* gene, this suggests that the effect of *myc* protein on this gene requires a b-HLH-LZ partner which remains to be identified. In this respect it is interesting to note that another b-HLH-LZ transcription factor, *mi*, strongly activates the *QNR-71* promoter in transient transfection assays. *Mi* is expressed in the pigmented retina and in the skin (Hodgkinson *et al.*, 1993) and could represent a transcription factor other than *myc* involved in regulation of *QNR-71* gene expression. Several enzyme-encoding genes involved in melanin synthesis and responsible for pigmentation mutants, like tyrosinase (Bentley *et al.*, 1994; Yasumoto *et al.*, 1994), mapping at the *albino* locus, and tyrosinase-related peptide 1, mapping at the *brown* locus, are regulated by *mi* through a CATGTG box (Hemesath *et al.*, 1994; Yasumoto *et al.*, 1994; Yavuzer *et al.*, 1995). Footprinting experiments performed with the b-HLH-LZ-containing C-terminus of mouse *mi* showed protection of the CATGTG site located between -52 and -47, suggesting that *mi* homodimers are able to bind the *QNR-71* promoter DNA. Transient co-transfection experiments performed with the *QNR-71* promoter fragment and a *mi*-encoding vector showed a strong reduction in CAT activity when the promoter fragment was devoid of the 3' CATGTG sequence or when this site was mutagenized, suggesting that in the context of the full-length *mi* protein this site is essential for *QNR-71* promoter activation. It remains to be tested if the *myc* oncogene induces the *mi* factor in NR cells. Therefore, induction of genes involved in melanogenesis may explain why a b-HLH-LZ-containing transcription factor, such as *myc*, is able to induce a pigmented phenotype in avian NR cells.

Materials and methods

Cloning and DNA sequencing

The *QNR-71* cDNA was isolated from a cDNA library constructed from QNR cells transformed by MC29 as previously described (Martin *et al.*, 1992). The *QNR-71* cDNA, as well as homologous genomic DNA, were ligated into M13 vectors mp18 and mp19. The nucleotide sequences were determined in both orientations by the dideoxy sequencing method using an Applied Biosystem 370A automatic sequencer. The EMBL Nucleotide Sequence Database accession No. is X94144.

RACE-PCR

Total RNA (20 µg) was converted to cDNA using the oligonucleotide 5'-ACTCAAGCTTAGTAGTATCCATATCT-3' (oligonucleotide A) as described in Frohman *et al.* (1988). For tailing 1 µl 6 mM dATP and 15 U terminal deoxynucleotidyltransferase (Bethesda Research Laboratories) were added in the appropriate tailing buffer and the mixture

was incubated for 10 min at 37°C. The reaction mixture was diluted to 500 µl in TE and 1–10 µl aliquots were prepared for PCR (Pharmacia apparatus with Taq polymerase, Taq buffer and Bioprobe) with 0.25 µg of appropriate oligonucleotide primers, (dT)₁₇ and 5'-ACTCAAGCTTATCCGATTGTTTAT-3', and amplification primer (oligonucleotide B). Amplifications were carried out in a Cetus apparatus: 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 57°C, 1 min elongation at 72°C. Reaction products were cloned in pUC19 DNA digested with *HincII*. Individual clones were isolated and sequenced.

Isolation of quail genomic clones containing QNR-71 homologous sequences

Four distinct overlapping clones were isolated from a genomic library constructed from peripheral blood DNA of quail embryos in EMBL4 vector screened with the *QNR-71* cDNA probe.

Cell culture and virus infection

Dissociated QNR or RPE dissected from 7-day-old quail embryos were plated in Dulbecco's/F12 medium containing 10% fetal calf serum, 1% vitamin MEM 100X and 10 µg/ml conalbumin (complete medium). Dishes (60 mm) containing 5 × 10⁶ dissociated QNR cells in complete medium were infected with MC29 (RAV-1) virus at 37°C. The infected cells were passaged on gelatin-coated dishes to allow the virus to spread. The SFCV-LE-Mi virus was created by the insertion of the 1.3 kbp *HindIII*-*XbaI* fragment of Mi cDNA into the avian retroviral vector SFCV-LE (Fuerstenberg *et al.*, 1990; kindly provided by Bjorn Venstrom) digested with the same enzymes. For stable transfection experiments cells were transfected with 20 µg of the molecular clone DNA and the transfected cells, selected in medium containing geneticin (400 µg/ml), were passaged twice on gelatin-coated dishes before testing.

Construction of CAT reporter plasmids, in vitro mutagenesis, transfection and CAT assays

The 4.5 kbp *EcoRI* genomic fragment was cloned in both orientations into the *EcoRI* site of the promoterless vector pBLCAT6. The P71 promoter sequence in the sense or antisense orientation with respect to the *CAT* gene was designated pP71E^S and pP71E^{AS} respectively. The pPΔ71-220 fragment was obtained from the *QNR-71* plasmid as template in PCR experiments using an oligonucleotide corresponding to the sequence 5'-ACTAAGCTTGAACCAAAAGGGAGTGAG-3'; the pPΔ71-175 fragment was obtained using an oligonucleotide corresponding to the sequence 5'-CTGAAAGGAGCTGAAGAC-3'; the pPΔ71-123 fragment was obtained using an oligonucleotide corresponding to the sequence 5'-ACTAAGCTTATGAGTCCTGGGGCCCTT-3'. The second oligonucleotide used in each PCR experiment was 5'-GCCCCA-TCCGACAGCTGGATCCCGT-3'.

Mutagenesis of the pPΔ71-220 fragment, conducted in order to mutagenize the CATCTG boxes, was on the *BamHI*-*HindIII* PΔ71-220 fragment inserted in M13 mp19 phage DNA. The single-stranded directed mutagenesis, using a SculptorTM *in vitro* mutagenesis system kit from Amersham, was conducted with two mutated oligonucleotides located between nt -97 to -112 and -37 to -56. The oligonucleotides used were 5'-CATAAGCACCTCAGCTG-3' and 5'-CCATCACCTCATGAGTC-CTG-3' (the mutated nucleotides are in bold). Mutagenized clones were selected for the first, second or both mutagenized sites. All selected clones were subjected to nucleotide sequencing. The pRSVCAT plasmid contains the *CAT* gene under the control of the Rous sarcoma virus long terminal repeat (RSV-LTR). QNR cells, quail pigmented epithelium cells and quail embryo cells were seeded at 5 × 10⁵ cells/60 mm dish in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal calf serum for 24 h prior to transfection, performed by the calcium phosphate method. Cells were co-transfected with 1 or 5 µg *CAT* construct. For the experiments with the vector expressing the c-MYC or mi proteins cells were co-transfected with 1 µg *CAT* construct and increasing amounts of pSG5c-MYC or pSG5mi, as described in Plaza *et al.* (1993).

Northern blot analysis

Total RNA was extracted from tissues dissected from embryos or from cell cultures by the RNAzol method (Chomezynski and Sacchi, 1987). RNA was denatured at 68°C in a formaldehyde/formaldehyde mixture, separated by electrophoresis in a 1% agarose-2.2 M formaldehyde gel, transferred to a nitrocellulose filter in 20× SSC (standard saline citrate) and hybridized to DNA probes labeled by nick translation or random priming. The *QNR-71* probe was the 1.7 kbp *EcoRI*-*BglI* fragment containing the full ORF. The γ -actin probe was a 513 bp *PvuII*-*XbaI* fragment from pHMa-1 (Erba *et al.*, 1986) and was provided by F.Radvanyi.

In situ hybridization

A 650 bp *EcoRI*-*NsiI* *QNR-71* fragment cloned into the pSP67 (antisense RNA) and pSP65 (sense RNA) vectors (Promega Biotec, Madison, WI) was used to synthesize the RNA probes specific for *QNR-71* mRNA. Sense and antisense RNA probes were prepared with [³⁵S]CTP and used as described previously (Turque *et al.*, 1994).

Expression of proteins in bacteria

The appropriate fragment was obtained from the *QNR-71* plasmid as template in PCR experiments using oligonucleotides corresponding to sequences present in the C-terminal domains of *QNR-71*: 5'-GAGTGG-ATCCCGTAACACCCCACTCCA-3' and 5'-ACTCAAGCTTAGTCCCT-CCTGGTTCT-3'. To produce the mi C-terminus the appropriate fragment was obtained from plasmid pSG5mi as template in PCR experiments using oligonucleotides 5'-TAGGGATCCCTTGGCTAAAGAGAGG-CAG-3' and 5'-ATCAAGCTTACTAACACGCATGCTCCCGT-3'. The expected bands were subjected to *BamHI*-*HindIII* restriction enzyme digestion and inserted between the *BamHI* and *HindIII* sites of the pLc24 vector. The subcloning results in in-frame fusion of the desired sequence to the first 99 amino acids of the polymerase of phage MS2. For expression plasmids grown in LE392(λ) were transferred into an *E. coli* host (SG4044) containing a temperature-sensitive repressor of the PL promoter. Cultures of exponentially growing bacteria carrying the desired vector were induced at 42°C for 3 h. Bacterial pellets were washed twice, boiled in sample buffer and subjected to 15% SDS-PAGE. Proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue and cut from the gel.

EMSA and orthophenanthroline footprinting

The DNA probe used was the 228 bp Δ71220 fragment (from -132 to +77), [³²P]dCTP- and dATP-labeled with the Klenow fragment of DNA polymerase I (Boehringer) after *HindIII* cleavage of the fragment (5'-labeling). Gel retardation assays were performed with 1 µg bacterially expressed mi C-terminal domain as described previously (Plaza *et al.*, 1993). Orthophenanthroline-copper (Cu²⁺) footprinting was carried out essentially as described previously (Plaza *et al.*, 1993) using the 228 bp Δ71-220 fragment and bacterially expressed MS2-mi C-terminus peptides or fusion peptide MS2.

Cell labeling and immunoprecipitation

Transfected Cos-1 cells, quail RPE or infected cells were incubated for 45 min in the presence of 100 µCi/ml L-[³⁵S]methionine (Amersham; sp. act. 1000 Ci/mmol), lysed by boiling for 5 min in 1% SDS containing 5% β-mercaptoethanol, then adjusted in RIPA buffer and immunoprecipitated with rabbit anti-QNR-71 serum 71Cter. Immunoprecipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by fluorography.

Acknowledgments

We thank M.-A.Mirabel, who performed *in situ* hybridizations in a preliminary step of this work, H.Arnheiter for the gift of the mi clone, S.Plaza for help with the footprinting experiment, B.Quatannens for help in rabbit immunization and B.Lafyatis for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, the Association Française Retinitis Pigmentosa and the Association pour la Recherche contre le Cancer.

References

- Agata, K., Kobayashi, H., Itoh, Y., Mochii, M., Sawada, K. and Eguchi, G. (1993) Genetic characterization of the multipotent dedifferentiated state of pigmented epithelial cells *in vitro*. *Development*, **118**, 1025–1030.
- Alema, S., Tato, F. and Boettiger, D. (1985) *myc* and *src* oncogenes have complementary effects on cell proliferation and expression of specific extracellular matrix components in definitive chondroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 538–544.
- Amati, B., Brooks, M., Levy, N., Littlewood, T., Evan, G. and Land, H. (1993) Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell*, **72**, 233–245.

- yer, D., Kretzner, L. and Eisenmann, R. (1993) Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes *myc* transcriptional activity. *Cell*, **72**, 211–222.
- ello-Fernandez, C., Packham, G. and Cleveland, J. (1993) The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of *c-myc*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 7804–7808.
- entley, D. and Groudine, M. (1986) A block of elongation is largely responsible for decreased transcription of *c-myc* in differentiated HL60 cells. *Nature*, **321**, 702–706.
- entley, N.J., Eisen, T. and Goding, C. (1994) Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7996–8006.
- envenisty, N., Leder, A., Kuo, A. and Leder, P. (1992) An embryonically expressed gene is a target for *c-myc* regulation via the *c-myc*-binding sequence. *Genes Dev.*, **6**, 2513–2523.
- eug, H., von Kirchbach, A., Döderlein, G., Conscience, J.-F. and Graf, T. (1979) Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell*, **18**, 375–390.
- ister, K., Hayman, M.J. and Vogt, P.K. (1977) Defectiveness of avian myelocytomatosis virus MC29: Isolation of long-term nonproducer cultures and analysis of virus-specific polypeptide synthesis. *Virology*, **83**, 431–448.
- lackwell, K., Kretzner, L., Blackwood, E., Eisenman, R. and Weintraub, H. (1990) Sequence-specific DNA binding by the *c-myc* protein. *Science*, **250**, 1149–1151.
- lackwell, T.K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F.W., Eisenman, R. and Weintraub, H. (1993) Binding of Myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5216–5224.
- lackwood, E. and Eisenman, R. (1991) Max: a helix–loop–helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA binding complex with Myc. *Science*, **251**, 1211–1217.
- arrière, C., Plaza, S., Martin, P., Quatannens, B., Bailly, M., Stehelin, D. and Saule, S. (1993) Characterization of quail pax-6 (Pax-QNR) proteins expressed in the neuroretina. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7257–7266.
- homczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159.
- oll, J., Saule, S., Martin, P., Raes, M.B., Lagrou, C., Graf, T., Beug, H., Simon, E. and Stehelin, D. (1983) The cellular oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-erb* are transcribed in defined types of avian hemopoietic cells. *Exp. Cell Res.*, **149**, 151–162.
- ang, C., Barrett, J., Villa-Garcia, M., Resar, L., Kato, G. and Fearon, E. (1991) Intracellular leucine zipper interactions suggest *c-Myc* heterooligomerization. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 954–962.
- esbiens, X., Quéva, C., Jaffredo, T., Stehelin, D. and Vandenbunder, B. (1991) The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-ets-1* during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development*, **111**, 699–713.
- rba, H.P., Gunning, P. and Kedes, L. (1986) Nucleotide sequence of the human gamma cytoskeletal actin mRNA: anomalous evolution of vertebrates non-actin genes. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 5275–5294.
- alcone, G., Tuto, F. and Alema, S. (1985) Distinctive effects of the viral oncogenes *myc*, *erb*, *fps*, and *vrc* on the differentiation program of quail myogenic cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**, 426–430.
- auquet, M., Stehelin, D. and Saule, S. (1990) *myc* products induce the expression of catecholaminergic traits in quail neural crest-derived cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 1546–1550.
- rohman, M., Dush, M. and Martin, G. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85**, 8998–9002.
- uerstenberg, S. et al. (1990) Ectopic expression of the erythrocyte band 3 anion exchange protein, using a new avian retrovirus vector. *J. Virol.*, **64**, 5891–5902.
- ass, R. et al. (1991) Protein kinase C activation and proto-oncogene expression in differentiation/retrodifferentiation of human U-937 leukemia cells. *Cell Growth Differentiat.*, **2**, 167–176.
- emesath, T. et al. (1994) Microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes Dev.*, **8**, 2770–2780.
- odgkinson, C., Moore, K., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N., Jenkins, N. and Arnheiter, H. (1993) Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic–helix–loop–helix–zipper protein. *Cell*, **74**, 395–404.
- International Polycystic Kidney Disease Consortium (1995) Polycystic Kidney Disease: The complete structure of the *PKD1* gene and its protein. *Cell*, **81**, 289–298.
- Jaffredo, T., Vandenbunder, B. and Dieterlen-Lievre, F. (1989) *In situ* study of *c-Myc* protein expression during avian development. *Development*, **105**, 679–695.
- Kadesch, T. (1993) Consequences of heteromeric interactions among helix–loop–helix proteins. *Cell Growth Differ.*, **B**, 49–55.
- Kato, G., Barrett, J., Villa, G. and Dang, C. (1990) An amino-terminal *c-myc* domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 5914–5920.
- Kawakami, Y. et al. (1994) Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with *in vivo* tumor rejection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 6458–6462.
- Kobayashi, T., Urabe, K., Orlow, S., Higashi, K., Imokawa, G., Kwon, B., Potterf, B. and Hearing, V. (1994) The Pmel17/Silver locus protein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 29198–29205.
- Kozak, M. (1990) Downstream secondary structures facilitate recognition of initiator codons by eucaryotic ribosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 8301–8305.
- Kretzner, L., Blackwood, E. and Eisenman, R. (1992) Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature*, **359**, 426–429.
- Kwon, B. et al. (1991) A melanocyte-specific gene, *Pmel17* maps near the silver coat color locus on mouse chromosome 10 and is in a syntenic region on human chromosome 12. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 9228–9232.
- Landschultz, W.H., Johnson, P. and McKnight, S.L. (1987) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, **240**, 1759–1764.
- Langlois, A.J., Ishizaki, R., Beaudreau, G.S., Kummer, J.F., Beard, J.W. and Bolognesi, D.P. (1976) Virus-infected avian cell line established *in vitro*. *Cancer Res.*, **36**, 3894–3904.
- LeDouarin, N. (1982) *The Neural Crest*. Cambridge University Press, London.
- Lüscher, B. and Eisenman, R. (1990) New light on Myc and Myb. Part I. *Myc. Genes Dev.*, **4**, 2025–2035.
- Martin, P., Henry, C., Ferre, F., Duterque-Coquillaud, M., Lagrou, C., Ghysdael, J., Debuire, B., Stehelin, D. and Saule, S. (1986) Transformation of quail embryo fibroblasts by a retrovirus carrying a normal human *c-myc* gene. *EMBO J.*, **5**, 1529–1533.
- Martin, P., Carrière, C., Dozier, C., Quatannens, B., Mirabel, M., Vandenbunder, B., Stehelin, D. and Saule, S. (1992) Characterization of a paired-box- and homeobox-containing quail gene (pax-QNR) expressed in the neuroretina. *Oncogene*, **7**, 1721–1728.
- Mochii, M., Agata, K. and Eguchi, G. (1991) Complete sequence and expression of a cDNA encoding a chicken 115-kDa melanosomal matrix protein. *Pigment Cell Res.*, **4**, 41–47.
- Murre, C., McCaw, P. and Baltimore, D. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD and Myc proteins. *Cell*, **56**, 777–783.
- Okada, T.S. (1976) In Ebert, J.D. and Marois, M. (eds), *Tests of Teratogenicity In Vitro*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 91–105.
- Park, C. and Hollenberg, M. (1989) Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. *Dev. Biol.*, **134**, 201–205.
- Pittack, C., Jones, M. and Reh, T. (1991) Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina *in vitro*. *Development*, **113**, 577–588.
- Plaza, S., Dozier, C. and Saule, S. (1993) Quail Pax-6 (Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and transactivate its own promoter. *Cell Growth Differentiat.*, **4**, 1041–1050.
- Plaza, S., Dozier, C., Turque, N. and Saule, S. (1995) Quail Pax-6 (Pax-QNR) are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3344–3353.
- Prendergast, G.C. and Ziff, E.B. (1989) DNA binding motifs. *Nature*, **341**, 392.
- Reisman, D., Elkind, N., Roy, B., Beamon, J. and Rotter, V. (1993) *c-Myc* transactivates the *p53* promoter through a required CACGTG motif. *Cell Growth Differentiat.*, **4**, 57–65.
- Richardson, M., Hornbruch, A. and Wolpert, L. (1989) Pigment pattern expression in the plumage of the quail embryo and the quail–chick chimera. *Development*, **107**, 805–818.
- Robbins, L., Nadeau, J., Johnson, K., Kelly, M., Rosselli-Rehffuss, L., Baack, E., Mountjoy, K. and Cone, R. (1993) Pigmentation phenotypes

- of variant extension locus result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*, 72, 827-834.
- Steel,K., Davidson,D. and Jackson,I. (1992) TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. *Development*, 115, 1111-1119.
- Teillet,A.M. (1971) Recherches sur le mode de migration et de la différenciation des mélanoblastes cutanés chez l'embryon d'oiseau: étude expérimentale par la méthode des greffeshétérospécifiques entre embryons de caille et de poulet. *Annls Embryol. Morphol.*, 4, 95-109.
- Turque,N., Plaza,S., Radvanyi,F., Carrière,C. and Saule,S. (1994) Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol. Endocrinol.*, 8, 929-938.
- Von Heijne,G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.*, 133, 17-21.
- Weterman,M.A.J., Ajubi,N., van Dinter,I.M.R., Degen,W.G.J., van Muijen,G.N.P., Ruiter,D.J. and Bloemers,H.P.J. (1995) *umb*, a novel gene is expressed in low-metastatic human melanoma cell lines and xenografts. *Int. J. Cancer*, 60, 73-81.
- Yasumoto,K.-I., Yokoyama,K., Shibata,K., Tomita,Y. and Shibahara,S. (1994) Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 8058-8070.
- Yavuzer,U., Keenan,E., Lowings,P., Vachtenheim,J., Currie,G. and Goding,C. (1995) The microphthalmia gene product interacts with the retinoblastoma protein *in vitro* and is a target for deregulation of melanocyte-specific transcription. *Oncogene*, 10, 123-134.
- Zhou,B.-K., Kobayashi,T., Donatien,P., Bennett,D., Hearing,V. and Orlow,S. (1994) Identification of a melanosomal matrix protein encoded by the murine si (silver) locus using 'organelle scanning'. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 7076-7080.

Received on June 20, 1995; revised on November 24, 1995

DISCUSSION

DISCUSSION

Dans le laboratoire deux gènes ont été caractérisés après criblage différentiel d'une banque construite avec des ARNm de cellules de neurorétine de Caille transformées par l'oncogène *v-myc*. Ces deux gènes, dont l'organisation génomique a été établie, ont été baptisés *Pax-QNR* et *QNR-71*. Le but de ce criblage était d'obtenir des gènes potentiellement régulés par *v-myc* et impliqués dans la mise en place du phénotype pigmenté. *Pax-QNR* s'est en fait avéré être l'orthologue aviaire du gène murin *Pax-6* (Martin *et al.*, 1994) qui code un facteur de transcription essentiel pour la genèse des yeux tandis que *QNR-71* code probablement une protéine structurale du mélanosome.

Une partie du travail de cette thèse a porté sur la caractérisation des territoires d'expression de *Pax-QNR*. En effet, son expression dans le SNC avait déjà été documentée chez d'autres espèces (Walther et Gruss, 1991), mais nous avons apporté comme information supplémentaire l'expression de *Pax-QNR* dans le pancréas endocrine. Ceci nous a particulièrement frappé car cet organe est d'origine endodermique alors que les autres sites d'expression de *Pax-QNR*, à savoir le tube neural et la rétine sont d'origine neuroectodermiques (Le Douarin, 1988; Teitelman, 1990). Néanmoins, d'une part les cellules du pancréas endocrine expriment plusieurs marqueurs neuronaux (Polack *et al.*, 1984; Teitelman, 1990), et à ce titre *Pax-QNR* semble en constituer un supplémentaire, et d'autre part, si pratiquement tous les membres de la famille des gènes *Pax* s'expriment dans des territoires neuronaux, ils sont également présents dans des organes d'origines embryologiques différentes (*pax-3* et *pax-7* dans les cellules musculaires, *pax-5* dans les organes lymphopoiétiques, *pax-2* et *pax-8* dans le rein, etc....) dont ils représentent des marqueurs précoces de différenciation, l'élaboration de ces organes étant altérée lorsque chez la Souris ces gènes sont mutés. L'originalité de *Pax-QNR* réside justement dans le fait que les Souris *Sey*, qui sont mutées dans *pax-6*, si elles sont effectivement dépourvues de yeux à l'état homozygotes (Hill *et al.*, 1991) et atteintes de malformation au niveau du SNC, leur pancréas ne présente par contre aucune anomalie macroscopiques (résultats non montrés). *Pax-QNR* est pourtant exprimé au début du développement du pancréas, laissant

présager une implication de ce gène dans la différenciation du tissu endocrine. La fonction de *Pax-QNR* n'a pas la même importance dans la neurorétine et le pancréas. Dans l'équipe, nous avons montré que *Pax-QNR* codait 5 isoformes protéiques (Carrière *et al.*, 1993), chacune des protéine étant pourvue de propriétés différentes. Les mêmes isoformes sont synthétisées dans le pancréas endocrine et dans la neurorétine aviaires. Mais si des mutations dans un seul des allèles sont suffisantes pour perturber le développement de l'oeil, cela ne semble pas être le cas pour le pancréas. Cette différence peut reposer sur la différence de nature des cofacteurs susceptibles de coopérer avec les protéines de *Pax-QNR*. De plus en plus d'exemples illustrent la possibilité pour les protéines à homéodomaines d'interagir avec d'autres protéines de ce type (Chan *et al.*, 1994; Van Dijk et Mune, 1994). De nombreuses protéines à homéodomaines sont exprimées dans la neurorétine ou dans le pancréas endocrine. De ce point de vue il faut noter que la protéine à homéodomaine ISL1, essentielle pour la genèse des îlots β du pancréas, est considérée comme un marqueur des neurones ganglionnaires de la rétine (Karlson *et al.*, 1990). Le rôle de *Pax-QNR* dans le pancréas endocrine est donc encore loin d'être éclairci, même si l'on peut déjà exclure un rôle précoce dans sa différenciation à l'inverse de la protéine PDX1, qui contient un homéodomaine et qui est exprimée dans les îlots de cellules à insuline. Les Souris mutées dans le gène *PDX1* ne développent qu'un bourgeon pancréatique abortif (Ahlgren *et al.*, 1996). Peut-être faut-il chercher dans les Souris *Sey* des anomalies plus subtiles affectant le fonctionnement du pancréas endocrine et établir si les rapports entre cellules à insuline et ceux à glucagon sont les mêmes que chez les Souris normales par exemple. *Pax-QNR* pourrait être plus impliqué comme co-facteur positif ou négatif dans la régulation transcriptionnelle des gènes codant les hormones peptidiques, ou bien codant des protéines d'adhérence nécessaires à l'intégrité des îlots.

L'existence de plusieurs ADNc divergeant dans leur extrémité 5' isolés avait conduit à caractériser la région de promotion de *Pax-QNR*. Les deux promoteurs P0 et P1 identifiés ont ensuite permis de caractériser des facteurs capables de contrôler leur activité. Ces deux promoteurs sont transactivables par la protéine *Pax-QNR* de 46kD; ceci établit une boucle d'autorégulation qui pourrait être nécessaire dans le maintien de l'expression

de *Pax-QNR*. En recherchant des sites de fixation à l'ADN pour des facteurs de transcription connus, des sites de fixation pour le facteur c-Myb ont été relevés dans le promoteur P0. Effectivement c-Myb peut activer la transcription à partir de ce promoteur d'une façon directe mais également d'une façon indépendante de la liaison de c-Myb à l'ADN. Plus récemment nous avons montré que A-Myb était également capable d'activer ce promoteur. Ces deux facteurs peuvent aussi réguler la transcription initiée à partir du promoteur constitutif interne P1. Ces deux gènes, dont les produits partagent des capacités de transactivation, sont exprimés dans la neurorétine au cours de son développement, plus particulièrement dans les mêmes couches cellulaires que *Pax-QNR* avant que la rétine ne soit différenciée. Aussi, *Pax-QNR*, au même titre que *mim1*, isolé à l'origine comme gène cible de Myb dans le système hématopoïétique, qui est induit dans cellules de neurorétines de Poulet exprimant *c-myb* ou *A-myb*, apparaît comme étant un gène cible de la famille des facteurs de transcription Myb. Ces facteurs de transcription dont l'action avait été restreinte au système hématopoïétique (Mucenski *et al.*, 1991), seraient des acteurs capables de moduler l'induction de la transcription initiée à partir de P0 et de P1, avec pour résultat une modulation du taux de synthèse des protéines, la définition de la quantité de protéines Pax requise pour la mise en place de la rétine dans les premiers stades de son développement étant particulièrement importante. Il se trouve que les cellules de neurorétine exprimant de façon constitutive, en étant sous promotion virale, c-Myb ou A-Myb ne se comportent pas de manière identique en terme de transformation: l'expression forcée de c-Myb transforme les cellules en présence de bFGF, contrairement aux cellules exprimant A-Myb qui pourtant répondent à ce facteur. Mais il n'en demeure pas moins que les facteurs c-Myb et A-Myb ont des gènes cibles communs: *mim1* et les promoteurs P0 et P1 de *Pax-QNR*. Cette dernière observation pourrait expliquer pourquoi dans les Souris mutées dans le gène *c-myb* (Mucenski *et al.*, 1991), aucune anomalie morphologique n'a été relevée dans les cupules optiques. La disparition de *c-myb* étant létale, il n'est pas possible de vérifier que les yeux se développent correctement chez ces Souris. *A-myb*, exprimé dans ces structures, pourrait compenser la perte de *c-myb* dans les stades précoces du développement.

C-myb est également exprimé dans le pancréas (Quéva *et al.*, 1992). Toutefois, aucun messenger initié à partir de P0 n'est détectable dans cet organe. C-Myb, dans l'environnement pancréatique, ne suffit pas à induire l'activation de P0, ce qui n'exclue en rien l'hypothèse d'une régulation de P1 par c-Myb dans le pancréas. Ceci confirme l'importance de la présence de facteurs supplémentaires dans la régulation de *Pax-QNR*.

L'induction de P0 dans la neurorétine est concomitante avec la différenciation neuronale alors que l'activité de P1 reste inchangée avant et après l'induction de la neurogenèse. L'hypothèse d'une implication de facteurs spécifiques aux neurones de la rétine dans le contrôle de P0 a pu être étudiée dans un système cellulaire *in vitro* dans lequel il est possible, grâce à l'oncogène *v-myc* de faire apparaître des neurones. L'infection de cellules de la rétine pigmentaire par le virus MC29 permet, selon les conditions de culture d'induire (culture en basse densité) ou non (haute densité) la différenciation de neurones. Dans les cultures où les neurones apparaissent, nous avons mis en évidence l'induction de P0. Ceci confirme que les ARN de *Pax-QNR* sont initiés à partir de P0 au moment de la différenciation neuronale. Les neurones induits dans la RPE par *v-myc* ne sont pas des neurones normaux. En effet, ces cellules sont transformées et prolifèrent. Nos efforts de caractérisation ont permis de montrer que ces cellules expriment la NSE (contrairement aux cellules de la RPE infectées par MC29 et gardées sous forme épithéliale). Nous n'avons pu mettre en évidence l'expression de marqueurs de photorécepteurs (nous avons recherché la visinine) et les neurofilaments peuvent être mis en évidence occasionnellement dans quelques cellules. Le rôle de *myc* dans l'induction de cette différenciation pourrait être de stimuler l'expression des gènes proneuraux. Une observation remarquable est que la transdifférenciation neuronale apparaît toujours dans des cellules dispersées. Cela suggère l'influence d'un contact inhibiteur produit par les cellules voisines et rappelle les mécanismes d'inhibition latérale que nous avons vus être à l'oeuvre avec l'activation des gènes *Notch* et *Delta*. De fait ces foyers de cellules expriment les messagers de ces gènes et il serait intéressant de pouvoir replacer le facteur de transcription c-Myb dans la cascade des gènes proneuraux et neurogènes.

Par ses effets sur la différenciation, *v-myc* apparaît comme un élément pivot des conversions possibles entre neurorétine et rétine pigmentaire puisque cet oncogène peut aussi induire la différenciation pigmentaire de cellules de la neurorétine. L'isolement du gène *QNR-71* est lié à cette faculté. Nous avons caractérisé ce gène, son organisation génomique, ses territoires d'expression, à savoir le derme et la rétine pigmentaire, et sa région de promotion. *QNR-71* code une protéine glycosylée apparentée aux produits des gènes *Pmel17* et *nmb*. La mutation *Pmel17*, mutation *silver*, est responsable du blanchiment précoce du poil par perte des mélanocytes. Le mécanisme supposé repose sur une fuite de la mélanine toxique dans le cytoplasme cellulaire. Cette fuite serait due à une mutation codée par *Pmel17/silver* (Kobayashi *et al.*, 1994). Il faut noter que *QNR-71* présente plus d'homologies avec le gène *nmb* qu'avec *silver* mais nous ne savons toujours pas si *QNR-71* est l'équivalent aviaire de *nmb* ou simplement un gène apparenté. Les protéines de cette famille présentent un grand intérêt pour la lutte anticancéreuse qui vient de la propriété (démontrée pour *silver*) d'induire des lymphocytes cytotoxiques dirigés contre les cellules du mélanome (Kawakami *et al.*, 1994). Ces lymphocytes réinjectés aux patients sont capables dans certains cas d'induire une fonte spectaculaire du mélanome (Kawakami *et al.*, 1994). Outre le fait de représenter un nouveau marqueur de différenciation finale des mélanocytes, *QNR-71* est aussi un nouveau gène cible de Myc. Nous avons caractérisé la présence de deux sites de fixation des facteurs Mi et Myc dans le promoteur de *QNR-71*. Il faut noter que la réponse du fragment de promoteur utilisé (220pb) est bien plus forte avec Mi qu'avec Myc. Cela suggère que le promoteur de ce gène doit contenir d'autres éléments d'interaction avec Myc que ceux décrits.

Enfin, selon le modèle de régulations entre protéines bHLH bien décrit dans la différenciation musculaire, il serait intéressant d'étudier l'éventuelle implication de Mi dans la transdifférenciation mélanocytaire induite par *myc* dans la neurorétine.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

REFERENCES

- Adams, B., Dörfler, P., Kozmik, Z., Urbànek, P., Maurer-Fogy, I. and Busslinger, M.** (1992). *Pax-5* encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes & Dev.* **6**, 1589-1607.
- Adamson, E.D. and Woodland, H.R.** (1974). Histone synthesis in early amphibian development: histone and DNA synthesis are not coordinated. *J. Mol. Biol.* **88**, 263-285.
- Adler, R.** (1993). Plasticity and differentiation of retinal precursor cells. *Int. Rev. Cytol.*, **146**, 145-190.
- Ahlgren, U., Jonsson, J. and Edlund, H.** (1996). The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* **122**, 1409-1416.
- Al Moustafa, A.E., Raes, M.B., Saule, S. and Dieterlen-Lievre, F.** (1988). Target of v-myc tumorigenesis in the avian embryo depend on time and not on site of retroviral infection. *Cell. Differ. Dev.* **25**, 119-134.
- Amati, B., Dalton, S., Brooks, M.W., Littlewood, T.D., Evan, G.I. and Land, H.** (1992). Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* **359**, 423-426.
- Amati, B., Brooks, M.W., Levy, N., Littlewood, T.D., Evan, G.I. and Land, H.** (1993a). Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* **72**, 233-245.
- Amati, B., Littlewood, T. D., Evan, G.I. and Land, H.** (1993b) The c-myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *EMBO J.* **12**, 5083-5087.
- Amati, B. and Land, H.** (1994). Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**, 102-108.
- Amouyel, P., Laudet, V., Martin, P., Li, R., Quatannens, B., Stehelin, D. and Saule, S.** (1989). Two nuclear oncogenic proteins, p135gag-myb-ets and p61/63 myc, cooperate to induce transformation of chicken neuroretina cells. *Journal of Virology* **63**, 3382-3388.
- Anderson, W. F., Ohlendorf, D. H., Takeda, Y. and Matthews, B. W.** (1981). Structure of the cro repressor from bacteriophage λ and its interaction with DNA. *Nature* **290**, 754-758.
- Anderson, D. J.** (1989). The neural crest cell lineage problem : neurogenesis? *Neuron* **3**, 1-12.
- Arber, S., Halder, G. and Caroni, P.** (1994). Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* **78**, 221-231.
- Arnold, H. H. and Braun, T.** (1996). Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 345-363.
- Atchley, W. R. a. F., W.M.** (1995). *Myc* and *Max*: molecular evolution of a family of proto-oncogene products and their dimerization partner. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* **92**, 10217-10221.

Ayer, D.E., Kretzner, L. and Eisenman, R.N. (1993). Mad: A heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* **72**, 211-222.

Ayer, D.E., Lawrence, Q.A. and Eisenman, R.N. (1995). Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of the yeast repressor Sin3. *Cell* **80**, 767-776.

Bachnou, N., Laudet, V., Jaffredo, T., Quatannens, B., Saule, S. and Dieterlen-lievre. (1991). Cooperative effect of *v-myc* and *v-erbA* in the chick embryo. *Oncogene* **6**, 1041-1047.

Baker, N.E. and Zitron, A.E. (1995). Drosophila eye development: Notch and Delta amplify a neurogenic pattern conferred on the morphogenetic furrow by scabrous. *Mech. Dev.* **49**, 173-189.

Baker, S.J. and Reddy, E.P. (1995). B cell differentiation: role of E2A and Pax5/BSAP transcription factors. *Oncogene* **3**, 413-426.

Baldwin, C.T., Hoth, C.F., Amos, J.A., da-Silva, E.O. and Milunski, A. (1992). An exonic mutation in the *HuP2* paired domain gene causes Waardenburg's syndrome. *Nature* **355**, 637-638.

Balling, R., Deutsch, U. and Gruss, P. (1988). *Undulated*, a mutation affecting the development of the mouse skeleton, has a point mutation in the paired box of *Pax-1*. *Cell* **55**, 531-535.

Barberis, A., Superti-Furga, G., Vitelli, L. K., I. and Busslinger, M. (1989). Developmental and tissue-specific regulation of a novel transcription factor of the sea urchin. *Genes & Dev.* **3**, 663-675.

Baroffio, A., Dupin, E. and Le Douarin, N.M. (1988). Clone-forming ability and differentiation potential of migratory neural crest cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5325-5329.

Baroffio, A., Dupin, E. and Le Douarin, N.M. (1991). Common precursors for neural and mesectodermal derivatives in the cephalic neural crest. *Development* **112**, 301-305.

Barrett, J., Birrer, M. J., Kato, G. J., Dosaka, A. H. and Dang, C. V. (1992). Activation domains of L-Myc and c-Myc determine their transforming potencies in rat embryo cells. *Mol Cell Biol* **12**, 3130-7.

Barsh, G.S. (1996). The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet.* **12**, 299-305.

Baylor, D. (1996). How photons start vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 560-565.

Benezra, R., R. L. Davis, D. Lockshon, D. L. Turner and H. Weintraub. (1990). The protein Id : a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, **61**, 49-59.

Bengal, E., L. Ransone, R. Scharfmann, V. J. Dwarki, S. J. Tapscott, H. Weintraub and I. M. Verma. (1992). Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins : a direct physical association. *Cell* **68**, 507-519.

Bentley, N. J., Eisen, T. and Goding, C. R. (1994). Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7996-8006.

Berberich, S., Hyde-DeRuyscher, N., Espenshade, P. and Cole, M. (1992). max encodes a sequence-specific DNA-binding protein and is not regulated by serum growth factors. *Oncogene* **7**, 775-779.

Berko-Flint, Y., Levkowitz, G. and Vardimon, L. (1994). Involvement of c-Jun in the control of glucocorticoid receptor transcriptional activity during development of chicken retinal tissue. *EMBO J.* **13**, 646-654.

Bettex-Galland, M. and Wiesmann, U. 1987. Differentiation of L6 myoblastic cells into chondrocytes. *Experientia* **43**, 610-611

Birkenmeier, E. H. and Gordon, J. J. (1986). Developmental regulation of a gene that encodes a cysteine-rich intestinal protein and maps near the murine immunoglobulin heavy chain locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2516-2520.

Bishop, J.M.(1985). Viral Oncogene. *Cell* **42**, 23-38

Blackwell, T.K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F.W., Eisenman, R.N. and Weintraub, H. (1993). Binding of Myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5216-5224.

Blackwood, E. M. and Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* **251**, 1211-7.

Blackwood, E. M., Lüscher, B. and Eisenman, R. N. (1992). Myc and Max associate *in vitro*. *Genes & Dev.* **6**, 71-80.

Bober, E., Lyons, G.E., Braun, T., Cossu, G., Buckingham, M. and Arnold, H.H. (1991). The muscle regulatory gene Myf-6 has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J. Cell. Biol.* **113**, 1255-1265.

Bober, E., Franz, T., Arnold, H. H., Gruss, P. and Tremblay, P. (1994a). Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* **120**, 603-612.

Bober, E., Brand-Saberi, B., Ebersperger, C., Wilting, J., Balling, R., Paterson, B., Arnold, H.H. and Christ, B. (1994b). Initial steps of myogenesis in somites are independent of hte influence from axial structures. *Development* **120**, 3073-3082.

Bodner, M., Castrillo, J. L., Theill, L. E., Deerinck, T., Ellisman, M. and Karin, M. (1988). The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* **55**, 505-518.

Bohmann, D., Ellis, M.C., Staszewski, L.M. and Mlodzik, M. (1994). Drosophila Jun mediates Ras-dependent photoreceptor determination. *Cell* **78**, 973-986.

Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G. and Noll, M. (1986). Conservation of a large protein domain in the segmentation gene *paired* and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* **47**, 1033-1040.

Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G. and Noll, M. (1989a). Conservation of a large protein domain in the segmentation gene *paired* and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* **47**,

Bopp, D., Jamet, E., Baumgartner, S., Burri, M. and Noll, M. (1989b). Isolation of two tissue-specific *Drosophila* paired box genes, Pox meso and Pox neuro. *EMBO* **8**, 3347-3457.

- Bouchard, B.** (1993). Les protéines de régulation de la mélanogénèse. Génétique moléculaire des albinismes cutanés. *médecine/sciences*, **9**, 425-430.
- Brand-Saberi, B., Wilting, J., Epensperger, C. and Christ Bodo** (1996). The formation of somite compartments in the avian embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 411-420.
- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E. and Arnold, H.-H.** (1989a). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *The European Molecular Biology Journal* **8**, 701-709.
- Braun, T., Bober, E., Winter, B., Rosenthal, N. and Arnold, H.-H.** (1990a). *Myf-6*, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *The European Molecular Biology Journal* **9**, 821-831.
- Braun, T., Rudnicki, M. A., Arnold, H.-H. and Jaenisch, R.** (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene *Myf-5* results in abnormal distal rib development and early postnatal death in homozygous mouse mutants. *Cell* **71**,
- Braun, T., Bober, E., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R. and Arnold, H.-H.** (1995). MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in *Myf-5* mutant mice. *Development* **120**, 3083-3092.
- Burmeister, M., Novak, J., Liang, M.Y., Basu, S., Ploder, L., Hawes, N.L., Vidgen, D., Hoover, F., Goldman, D., Kalnins, V.I., Roderick, T.H., Taylor, B.A., Hankin, M.H. and McInnes, R.R.** (1996). Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nat. Genet.* **12**, 376-384.
- Cagan, R.L. and Ready, D.F.** (1989). The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Dev. Biol.* **136**, 346-362.
- Calothy, G., F. Poirier, G. Dambrine, P. Mignatti, P. Combes and B. Pessac.** (1980). Expression of viral oncogenes in differentiating chick embryo neuroretinal cells infected with avian tumor viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **44**, 983-990.
- Calvaruso, G., Giuliano, M., Taibi, G., Maxia, L., Vento, R. and Tesoriere, G.** (1992). Development of chick embryo retina : roles played by insulin. *Italian Journal of Biochemistry* **41**, 355A-356A.
- Caré, A., Silvani, A., Meccia, E., Mattia, G., Stoppacciaro, A., Parmiani, G., Peschle, C. and Colombo, M.P.** (1996). HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4842-4851.
- Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M. and Ezzeddine, D.** (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Genes & Dev.* **93**, 589-595.
- Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P. and Bernstein, A.** (1988). The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* **335**, 88-89.
- Chakraborty, S. K., Platt, J., Kim, K.K., Kwon, B.S., Bennett, D.C. and Pawelek, J.M.** (1996). Polymerization of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin by the pmel 17/silver locus protein. *Eur. J. Biochem.* **236**, 182-188.

Chalepakis, G., Goulding, M., Read, A., Strachan, T. and Gruss, P. (1994a). Molecular basis of Splotch and Waardenburg *Pax-3* mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3685-3689.

Chalepakis, G., Wijnholds, J., Giese, P., Schachner, M. and Gruss, P. (1994b). Characterization of *Pax-6* and *Hoxa-1* binding to the promoter region of the neural cell adhesion molecule L1. *DNA and Cell Biology* **13**, 891-900.

Chan, S. K. and Mann, R. S. (1993). The segment identity functions of Ultrabithorax are contained within its homeodomain and carboxy-terminal-sequences. *Genes & Dev* **7**, 796-811.

Chan, S.K., L. Jaffe, M. Capovilla, J. Botas, and R.S. Mann. (1994). The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with Extradenticle, another homeoprotein. *Cell* **78**: 603-615.

Charron, J., Malynn, B.A., Fisher, P., Stewart, V., Jeannotte, L., Goff, S.P., Robertson, E. and Alt, F.W. (1992). Embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption of the *N-myc* gene. *Genes & Dev.* **6**, 2248-2257.

Chen, H., b. Li and J. L. Workman. (1994). A histone-binding protein, nucleoplasmin, stimulates transcription factor binding to nucleosome and factor-induced nucleosome disassembly. *EMBO J.*, **13**, 380-390.

Chenn, A. and McConnell, S.K. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in Mammalian neurogenesis. *Cell* **82**, 631-641.

Chevallier, A., Kieny, M. and Mauger, A. (1977). Limb-somite relationship: Origin of the limb musculature. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **41**, 245-258.

Clark, K. L., Halay, E.D., Lai, E. and Burley, S.K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/forkhead DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* **364**, 412-420.

Clerc, R. G., Corcoran, L. M., LeBowitz, J. H., Baltimore, D. and Sharp, P. A. (1988). The B-cell-specific Oct-2 protein contains POU box-and homeo box-type domains. *Genes & Dev* **2**, 1570-1581.

Cohen, M. A. and Konigsberg, I.R. (1975). A clonal approach to the problem of neural crest determination. *Dev. Biol.* **46**, 262-280.

Corcoran, L. M., Karvelas, M., Nossal, G. J., Ye, Z. S., Jacks, T. and Baltimore, D. (1993). Oct-2, although not required for early B-cell development. *Genes & Dev.***7**, 570-582.

Cullen, K., M. P. Kladde and M. A. Seyfred. (1993). Interaction between transcription regulatory regions of prolactin chromatin *Science*, **261**, 203-206.

Cvekl, A., Kashanchi, F., Sax, C.M., Brady, J.N. and Piatigorsky, J. (1995). Transcriptional regulation of the mouse α A-crystallin gene: activation dependent on a cyclic AMP-responsive element (DE1/CRE) and a *Pax6* binding site. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 653-660.

Czerny, T., G. Schaffner and M. Busslinger. (1993). DNA sequence recognition by *Pax* proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes & Dev.* **7**, 2048-2061.

Dang, C.V., Dolde, C. Gillison, M.L. and Kato, G.J. (1992). Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **89**, 599-602.

Davidson, E. H. (1986). Gene activity in early development. *Orlando:Academic press*

Daston, G., Lamar, E., Olivier, M. and Goulding, M. (1996). *Pax-3* is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development* **122**, 1017-1027.

Davis, R. L., Weintraub, H. and Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000.

Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R. and Bradley, A. (1993). A null *c-myc* mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes & Dev.* **7**, 671-682

Dehbi, M., Ghahremani, M., Lechner, M., Dressler, G. and Pelletier, J. (1996). The paired-box transcription factor, *PAX2*, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (*WT1*). *Oncogene* **13**, 447-453.

De Pablo, F., Scott, L.A. and Roth, J. (1990). Insulin and insulin-like growth factor I in early development : peptides, receptors and biological events. *Endocrinol. Rev.* **11**, 558-577.

DePinho, R. A., Hatton, K. S., Tesfaye, A., Yancopoulos, G. d., and Alt, F. W. (1987). The human *myc* gene family: structure and activity of L-*myc* and an L-*myc* pseudogene. *Genes. Dev.* , **1**, 1311-1326.

DePinho, R. A., N. Schreiber Agus, and F. W. Alt. (1991). *myc* family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res.* , **57**, 1-46.

Desbiens, X., Quéva, C., Jaffredo, T., Stehelin, D. and Vandenbunder, B. (1991). The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-ets-1* during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development* **111**, 699-713.

Deutsch, U., Dressler, G. R. and Gruss, P. (1988). *Pax 1*, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell* **53**, 617-625.

Deutsch, J. et Le Guyader, H. (1995). Le fond de l'oeil; l'oeil de la drosophile est-il homologue de celui de la souris. *médecine/sciences* **11**, 1447-1452.

Dieterlen-lievre, F., Jaffredo, T., Bachnou, M., Moustafa, A.E.A. and Saule, S. (1990). Oncogenes and avian development. *Int. J. Dev. Biol.* **34**, 61-68.

Dolle, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morris-Kay, G. and Chambon, P. (1990). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. *Development* **110**, 1133-1151.

Dolle, P., Fraulob, V., Kastner, P; and Chambon, P. (1994). developmental expression of murine *retinoid X receptor (RXR)* genes. *Mech. Dev.* **45**, 91-104.

Dowling, J. E. (1987). The Retina-An approachable part of the brain. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA

Downs, K. M., Martin, G. R., Bishop, J. M. (1989). Contrasting patterns of *myc* and

N-myc expression during gastrulation of the mouse embryo. *Genes. Dev.* , **3**, 860-869.

Dozier, C., C. Carrière, D. Grévin, P. Martin, B. Quatannens, D. Stéhelin and S. Saule. (1993). Structure and DNA-binding properties of *Pax-QNR*, a paired box- and homeobox-containing gene. *Cell Growth & Differ.* **4**, 281-289.

Dressler, G. R. and Douglass, E. C. (1992). *Pax-2* is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **89**, 1179-1183.

Dressler, G. R., J. E. Wilkinson, U. W. Rothenpieler, L. T. Patterson, L. Silliams-Simons and H. Westphal. (1993). Deregulation of *Pax-2* expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature* **362**, 65-67.

Duboule, D.(1994). Guidebook to the Homeobox Genes. *Oxford University Press*.

Dulac, C. (1993). Le développement embryonnaire du système mélanocytaire et sa pathologie. *médecine et sciences* **9**, 417-424.

Dupin, E., Baroffio, A., Dulac, C., Cameron-Curry, P. and Le Douarin, N.M. (1990). Schwann-cell differentiation in clonal cultures of the neural crest, as evidenced by the anti-Schwann cell myelin protein monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **87**, 1119-1123.

Eccles, M.R., Yun, K., Reeve, A.E. and Fidler, A.E. (1995). Comparative in situ hybridization analysis of *PAX2*, *PAX8* and *WT1* gene transcription in human fetal kidney and Wilms' tumor. *Am. J; Pathol.* **146**, 40-45.

Edmonson, D. G. and Olson, E. N. (1989). A gene with homology of the *myc* similarity region of *MyoD1* is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes & Dev.* **3**, 628-640.

Eguchi, G. (1986). Instability in cell commitment of vertebrate pigmented epithelial cells and their transdifferentiation into lens cells. T. S. Okada and H. Kondoh, Orlando and Tokyo, Academic Press.

Eguchi, G. (1988). Cellular and molecular background of Wolffian lens regeneration. *Cell Diff. Devt.* **25 (Supplement)**, 147-158.

Eguchi, G. and R. Kodama. (1993). Transdifferentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 1023-1028.

Ekker, S.C., Ungar, A.R., Greenstein, P., Von Kessler, D.P., Moon, R.T.,and Beachy, P.A. (1995). Parrerning activities of vertebrate hedgehog proteeins in the developing eye and brain. *Curr. Biol.* **5 (8)**, 944-955.

Enrietto, P. J. (1987). The *myc* oncogene in avian and mammalian carcinogenesis. *Cancer Surv.* , **6**, 85-99.

Ephrussi, A. (1985). Cell-type-specific contacts to immunoglobulin enhancers in nuclei. *Nature* **6**, 798-801.

Epstein, D. J., M. Vekemans and P. Gros. (1991). *splotch* (*Sp^{2H}*), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of *Pax-3*. *Cell*, **67**, 767-774.

Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M. and Yamada, T. (1992). Early Stages of Motor Neuron Differentiation Revealed by Expression of Homeobox Gene *Islet-1*. *Science* **256**, 1555-1550.

Erickson, C.A. and Goins, T.L. (1995). Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. *Development* **121**, 915-924.

Erkman, L., McEvelly, R.J., Luo, A.K., Hooshmand, F., O'Connell, S.M., Keithley, E.M., Rapaport, D.H., Ryan, A.F., and Rosenfeld, M.G. (1996). Role of transcription factors *Brn-3.1* and *Brn-3.2* in auditory and visual system development. *Nature* **381**, 603-606.

Evan, G. I., Hancock, D. C., Littlewood, T .D. and Gee, N. S. (1986). Characterisation of human myc proteins. *Curr. Top. Microbiol. immunol.* , **132**, 362-374.

Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. and Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**, 119-28.

Evan, G. I. and Littlewood, T .D. (1993). The role of c-myc in cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 44-49.

Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I. and Dickson, C. (1995). Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev.* **9**, 2364-2372.

Fickenscher, H. R., Chalepakis, G. and Gruss, P. (1993). Murine *Pax-2* protein is a sequence-specific transactivator with expression in the genital system. *DNA and Cellular Biology* **12**, 381-391.

Finney, M., Ruvkun, G. and Horvitz, H. R. (1988). The *C. elegans* cell lineage and differentiation gene *unc-86* encodes a protein with a homeodomain and extended similarity to transcription factors. *Cell* **55**, 757-769.

Finney, M. and Ruvkun, G. (1990). The *unc-86* gene product couples cell lineage and cell identity in *C.elegans*. *Cell* **63**, 895-905.

Flanagan, J., Chan,D. and Leder,P. (1991). Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing is missing in the *Sl^d* mutant. *Cell* **64**, 1025-1035.

Fleischman, R.A., Saltman, D.L., Stastny, V. and Zneimer, S. (1991). Deletion of the c-kit protooncogene in the human developmental defect piebald trait. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **88**, 10885-10889.

Fortini, M.E. and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell* **79**, 273-282.

Frade, J.M., Marti, E., Bovolenta, P., Angeles Rodriguez-Pena, M., Perez-Garcia, D., Rohrer, H., Edgar, D. and Rodriguez-Tebar, A. (1996). Insulin-like growth factor-1 stimulates neurogenesis in chick retina by regulationg expression of the $\alpha 6$ integrin subunit. *Development*, **122**, 2497-2506.

Francis-Lang, H., Price, M., Polycarpou-Schwarz, M. and Di Lauro, R. (1992). Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxydase promoter indicates common mecanisms for the thyroid-specific gene expression. *Molecular and Cellular Biology* **12**, 576-588.

Franz, T., Kothary, R., Surani, M.A.H., Halata, Z. and Grim, M. (1993). The splotch mutation interferes with muscle development in the limbs. *Anat. Embryol.* **187**, 153-160.

Freyd, G., Kim, S. K. and Horvitz, H. R. (1990). Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *C.elegans* lineage gene *lin-11*. *Nature* **344**, 876-879.

Galaktionov, K., Chen, X. and Beach. (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* **382**, 511-517.

Gan, L., Xiang, M., Zhou, L., Wagner, D.S., Klein, W.H. and Nathans, J. (1996). POU domain factor Brn-3b is required for the development of a large set of retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3920-3925.

Gandarillas, A. and Watt, F.M. (1995). Changes in expression of members of the fos and jun families and myc network during terminal differentiation of human keratinocytes. *Oncogene* **11**, 1403-1407.

Garber, J., Kuroiwa, A. and Gehring, W. (1983). Genomic end cDNA clones of the homeotic locus *Antennapedia* in *Drosophila*. *EMBO Journal* **2**, 2027-2036.

Gazzolo, L., Samarut, J., Bouabdelli, M. and Blanchet, J. P. (1980). Early precursors in the erythroid lineage are the specific target cells of avian erythroblastosis virus in vitro. *Cell*, **22**, 683-691.

Gehring, W. (1966). Bildung eines vollständigen Mittelbeines mit Sternopleura in der Antennenregion bei der Mutant *Nasobemia* (Ns) von *Drosophila melanogaster*. *Jul. Klaus. Arch.* **41**, 44-54.

Gehring, W. J., Affolter, M. and Bürglin, T. (1994). Homeodomain proteins. *Annuals Reviews of Biochemistry* **63**, 487-526.

German, M. S., Wang, J., Chadwick, R. B. and Rutter, W. J. (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeodomain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes & Dev* **6**, 2165-2176.

Gerrero, M. R., McEvilly, R. J., Turner, E., Lin, C. R., O'Connell, S., Jenne, K. J., Hobbs, M. V. and Rosenfeld, M. G. (1993). Brn-3.0: a POU-domain protein expressed in the sensory, immune and endocrine systems that functions on elements distinct from known octamer motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10841-10845.

Geissler, E., Ryan, M. and Housman, D.E. (1988). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* **55**, 185-192.

Giebel, L.B. and Spritz, R.A. (1991). Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8696-8699.

Giguère, V. (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocrine Rev.* **15**, 61-79.

Gittes, G.K., Galante, P.E., Hanahan, D., Rutter, W.J. and Debas, H.T. (1996). Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* **122**, 439-447.

Godfrey, P., Rahal, J.O., Beamer, W.G., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Mayo, K.E. (1993). GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nature Genetics* **4**, 227-232.

Gold, M.R. and Defranco, A.L. (1994). Biochemistry of B lymphocyte activation. *Adv. Immunol.* **55**, 221-295.

Goulding, P. D., Chalepkis, G., Deutsch, U., Erselius, J. R. and Gruss, P. (1991). *Pax-3*, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *European Molecular Biology Journal* **10**, 1135-1147.

Goulding, M., Lumsden, A. and Paquette, A. J. (1994a). Regulation of *Pax-3* expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* **120**, 957-971.

Goulding, M. and Paquette, A. (1994b). *Pax* genes and neural tube defects in the mouse. Neural tube defects. *Chichester, Ciba Foundation Symposium* **181**. 103-117.

Graf, T. and Beug, H. (1978). Avian leukemia viruses: interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **516**, 269-299.

Grant, P. (1978). Biology of Developing Systems. *Holt-Rinehart and Winston International, New York*

Grondona, J. M., Kastner, P., Gansmuller, A., Décimo, D., Chambon, P. and Mark, M. (1996). Retinal dysplasia and degeneration in RAR β 2/RAR γ 2 compound mutant mice. *Development* **122**, 2173-2188.

Gu, D., Lee, M.-S., Krahl, T. and Sarvetnick, N. (1994). Transitional cells in the regenerating pancreas. *Development* **120**, 1873-1881.

Gu, W., Bhatia, K., Magrath, I.T., Dang, C.V. and Dalla-Favera, R. (1994). Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107. *Science* **264**, 251-254.

Gurdon, J. B., Fairman, S., Mohun, T.J. and Brennan, S. (1985). The activation of muscle-specific actin genes in *Xenopus* development by an induction between animal and vegetal cells of a blastula. *Cell* **41**, 913-922.

Gurdon, J. B. (1992). The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* **68**, 185-199.

Hach, P., Borovansky, J. and Vedralova, E. (1993). Melanosome--a sophisticated organelle. *Sb Lek* **94**, 113-23.

Halder, Callaerts, P. and Gehring, W.T. (1995). New perspectives on eye evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 602-609.

Harrington, E. A., Fanidi, A. and Evan, G. I. (1994). Oncogenes and cell death. *Curr. opin. Cell Biol.* , **4**, 120-129.

Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J., Olson, E. N. and Klein, W. H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* **364**, 501-506.

Heberlein, U. and Moses, K. (1995a). Mechanisms of *Drosophila* retinal morphogenesis: the virtues of being progressive. *Cell* **81**, 987-990.

Heberlein, U, Singh, C.M., Luk, A.Y. and Donohoe, T.J. (1995b). Growth and differentiation in the *Drosophila* eye coordinated by hedgehog. *Nature* **373**, 709-711.

Hemesath, T.J., Steingrimsson, E., McGill, G., Hansen, M.J., Vaught, J., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Fisher, D.E. (1994). *microphthalmia*, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes Dev.* **8**, 2770-2780.

Herr, W., R. A. Sturm and R. G. Clerc. (1988). The POU domain : a large conserved region in the mammalian *pit-1*, *oct-2* and *Caenorhabditis elegans unc-86* gene products. *Genes & Dev.*, **2**, 1513-1516.

Hill, R. E., J. Favor, B. L. M. Hogan, C. C. T. Ton, G. F. Saunders, I. M. Hanson, J. Prosser, T. Jordan, N. D. Hastie and V. van Heyningen. (1991). Mouse *Small eye* results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* **354**, 522-525.

Hirning, U., Schmid, P., Schulz, W.A., Rettenberger, G. and Hameister, H. (1991). A comparative analysis of N-myc and c-myc expression and cellular proliferation in mouse organogenesis. *Mech. Dev.* **33**, 119-125.

Hirobe, T. (1992). Control of melanocyte proliferation and differentiation in the mouse epidermis. *Pigment Cell Res* **5**, 1-11.

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

Hogan, B.L., Holland, P.W. and Lumsden, A. (1988). Expression of the homeobox gene, *Hox 2.1*, during mouse embryogenesis. *Cell Differ. Dev.* **25**, 39-44.

Holst, B. D., Goomer, R. S., Wood, I. C., Edelmn, G. M. and Jones, F. S. (1994). Binding the Activation of the Promoter for the Neural Cell Adhesion Molecule by *Pax-8*. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 22245-22252.

Hoth, C. F., A. Milunsky, N. Lipsky, R. Sheffer, C. S.K. and C. T. Baldwin. (1993). Mutations in the paired domain of the human *PAX3* gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I). *Amer. J. Hum. Genet.*, **52**, 455-462.

Hu, J.S., Olson, E.N. and Kingston, R.E. (1992). HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1031-1042.

Huang, E., Nocka, K., Buck, J. and Besmer, P. (1992). Differential expression and processing of two cell associated forms of the c-kit ligand: Kl-1 and Kl-2. *Mol. Biol. Cell.* **3**, 349-362.

Hughes, A. E., Newton, V. E., Liu, X. L. and Read, A. P. (1994). A gene for Waardenburg Syndrome type 2 maps close to the human homologue of the *microphthalmia* gene at the chromosome 3p12-p14.1. *Nature Genetics* **7**, 509-512.

Hurst, H.C. (1994). Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile* **1**, 123-168.

Ingraham, H. A., Chen, R., Mangaiam, H., Elsholtz, S., Flynn, C. R., Lin, D. M., Simmons, L., Swanson, L. and Rosenfeld, M. G. (1988). A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* **55**, 519-529.

Ito, K. and Sieber-Blum, M. (1991). *In vitro* clonal analysis of Quail cardiac neural crest development. *Dev. Biol.* **148**, 95-106.

Ito, K., Morita, T. and Sieber-Blum, M. (1993). *In vitro* clonal analysis of mouse neural crest development. *Dev. Biol.* **157**, 517-525.

Jackson, I. J. (1988). A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the mouse brown locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4392-4396.

Jackson, I. J., Chambers, D.M., Tsukamoto, K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J. et al. (1992). A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J.* **11**, 527-535.

Jaffredo, T., Vandenbunder, B. and Dieterlen-Lievre, F. (1989). In situ study of c-myc protein expression during avian development. *Development* **105**, 679-695.

Jackson, I. J. and Raymond, S. (1994) Manifestations of microphthalmia. *Nat Genet*, **8**(3), 209-210.

Jan, Y.N. and Jan, L.Y.(1993). HLH proteins, Fly neurogenesis, and Vertebrate myogenesis. *Cell* **75**, 827-830.

Jan, Y.N. and Jan, L.Y.(1994). Neuronal fate specification in Drosophila. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 8-13.

Janknecht, R. and Hunter, T. (1996). A growing coactivator network. *Nature* **383**, 22-23.

Jostes, B., Walther, C. and Gruss, P. (1991). The murine paired box gene, *Pax7*, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. Mechanisms of *Devevelopment* **33**, 27-38.

Jun, S. and Desplan, C. (1996). Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* **122**, 2639-2650.

Kadesch, T. (1993). Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Differ.*, **4**, 49-55.

Kaehn, V., Jacob, H.J., Christ, B., Hinrichsen, K. and Poelmann, R.E. (1988). The onset of myotome formation in the chick. *Anat. Embryol.* **177**, 191-201.

Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T. et al. (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* **344**, 879-882.

Kastner, P., Grondona, J.M., Mark, M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Decimo, D., Vonesch, J.-L., Dollé, P. and Chambon, P. (1994). Genetic Analysis of RXRa Developmental Function: Convergence of RXR and RAR Signalling Pathways in Heart and Eye Morphogenesis. *Cell* **78**, 987-1003.

Kato, G. J., W. M. F. Lee, L. Chen and C. V. Dang. (1992). Max : functional domains and interaction with c-Myc. *Genes & Dev.*, **6**, 81-92.

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C., Robbins, P., Sakaguchi, K., Appella, E., Yannelli, J., Adema, G., Miki, T. and Rosenberg, S.(1994a). Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91** : 6458-6462.

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C., Robbins, P., Rivoltini, L., Topalian, S., Miki, T. and Rosenberg, S.(1994b). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma

antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91** : 3515-3519.

Keller, S. A., Jones, J. M., Boyle, A., Barrow, L. L., Killen, P. D., Green, D. G., Kapousta, N. V., Hitchcock, P. V. and Swank, R. T. (1994). Meisler, M.H. Kidney and retinal defects (Krd), a transgene-induced mutation with a deletion of mouse chromosome 19 that includes the *Pax-2* locus. *Genomics* **23**, 309-320.

Kerppola, T. K. and Curran, T. (1994). Maf and Nrl can bind to AP-1 sites and form heterodimers with Fos and Jun. *Oncogene* **9**, 675-684.

Kessel, M. (1991). Molecular coding of axial positions by *Hox* genes. *Semin; Dev. Biol.* **2**, 367-373.

Kessel, M. and Gruss, P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **67**, 89-104.

Kinzler, K. W., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Trent, J.M., Law, M.L., O'Brien, S.J., Wong, A.J. and Vogelstein, B. (1987). Identification of amplify, highly expressed gene in a human glioma. *Science* **236**, 70-73.

Kissinger, C. R., Liu, B. and Martin-Blanco, E. (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution : a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* **63**, 579-590.

Kobayashi, T., Urabe, K., Orlow, S.J., Higashi, K., Imokawa, G., Kwon, B. S., Potterf, B., and Hearing, V.J. (1994). The Pmel 17/Silver Locus Protein. *J. Biol. Chem.* **18**, 29198-29205.

Koseki, H., Wallin, J., Wilting, J., Mizutani, Y., Kispert, A., Ebensperger, C., Herrmann, B. G. C., B. and Balling, R. (1993). A role for *Pax-1* as a mediator of notochord signals during the dorsoventral specification of vertebrae. *Development* **119**, 649-660.

Kozmik, Z., Wang, S., Dörfler, P., Adams, B. and Busslinger, M. (1992). The promoter of the *CD19* gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2662-2672.

Kozmik, Z., Kurzbauer, R., Dörfler, P. and Busslinger, M. (1993). Alternative Splicing of *Pax-8* Gene Transcripts Is Developmentally Regulated and Generated Isoforms with Different Transactivation Properties. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6024-6035.

Krauss, S., Johansen, T., Korsh, V. and Fjose, A. (1991). Expression pattern of zebrafish *pax* genes suggests a role in early brain regionalization. *Nature* **353**, 267-270.

Kriedberg, J. A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell* **7**, 679-691.

Ku, M. and Melton, D.A. (1993). *Xwnt-11*: a maternally expressed *Xenopus wnt* gene. *Development* **119**, 1161-1173.

Kwon, B. S., Chintamaneni, C., Kozak, C., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N., Barton, D., Francke, U., Kobayashi, Y., and Kim, K.K. (1991). A melanocyte-specific gene, Pmel 17, maps near the silver coat color locus on mouse chromosome 10 and is in a syntenic region on human chromosome 12. **88**, 9228-9232.

- Lai, E., Clark, K., Burley, S.K. and Darnell, J.E.** (1993). Hepatocyte nuclear factor 3/ Fork head or « winged helix » proteins: A family of transcription factors of diverse biologic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10421-10423.
- Landchshultz, W. H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L.** (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764.
- Lassar, A. B., R. L. Davis, E. W. Woodring, T. Kadesch, C. Murre, A. Voronova, D. Baltimore and H. Weintraub.** (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins *in vivo*. *Cell*, **66**, 305-315.
- Laughton, A.** (1991). DNA binding specificity of homeodomains. *Biochemistry* **30**, 11357-11367.
- Lecoin, L., Lahav, R., Martin, F.H., Teillet, M.A. and Le Douarin, N.M.** (1995). *Steel* and *c-kit* in the development of avian melanocytes: a study of normally pigmented birds and of the hyperpigmented mutant silky fowl. *Developmental dynamics* **203**, 106-118.
- Le Douarin N and Barq, G.** (1969). Use of Japanese quail cells as « biological markers » in experimental embryology. *C.R.Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* **269**, 1543-1546.
- Le Douarin, N. M.** (1979). Cell lineage, stem cells and cell determination. *INSERM Symposium N°10 North-Holland publishing company*.
- Le Douarin N** (1988) On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell* **53** : 169-171
- Lee, E.C., Hu, X., Yu, S.Y. and Baker, N.E.** (1996). The scabrous gene encodes a secreted glycoprotein dimer and regulates proneural development in *Drosophila* eyes. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1179-1188.
- Lewis, J. H. and Wolpert, L.** (1976). The principle of non-equivalence development. *J. Theor. Biol.* **62**, 479-490.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-570.
- Li, P., He, X., Gerrero, M.R., Mok, M., Aggarwal, A. and Rosenfeld, M.G.** (1993). Spacing and orientation of bipartite DNA-binding motifs as potential functional determinants for POU domain factors. *Genes & Dev.* **7**, 2483-2496.
- Li, S., Crenshaw, E.B., Rawson, E.J. Simmons, D.M., Swanson, L.W. and Rosenfeld, M.G.** (1990). Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *pit-1*. *Nature* **347**, 528-533.
- Lin, S. C., Lin, C.R., Gukovsky, I., Lusic, A.J., Sawchenko, P.E. and Rosenfeld, M.G.** (1993). Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell-specific growth. *Nature* **364**, 208-213.
- Lin, S. C., Li, S., Drolet, D.W. and Rosenfeld, M.G.** (1994). Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals *Pit-1*-independent and *Pit-1*-dependent origins of the thyrotrope. *Development* **120**, 515-522.
- Littlewood, T.D. and Evan, G.** (1994). Transcription Factors 2: helix-loop-helix. *Protein Profile* **1**, 639-669.

Mansouri, A., Stykova, A., Torres, M. and Gruss, P. (1996). Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in *Pax7*^{-/-} mutant mice. *Development* **122**, 831-838.

Marcu, K. B., Bossone S. A., and Patel A. J., (1992). *myc* function and regulation. *Annu. Rev.* , **61**, 809-860.

Martin, P., Henry,C., Ferre,F., Duterque-coquillaud,M., Lagrou,C., Ghysdael,J., Debuire,B., Stehelin,D. and Saule,S. (1986). Transformation of quail embryo fibroblasts by a retrovirus carrying a normal human *c-myc* gene. *EMBO J.* **5**, 1529-1533.

Martin, P., C. Carrière, C. Dozier, B. Quatannens, M.-A. Mirabel, B. Vandebunder, D. Stéhelin and S. Saule. (1992). Characterization of a paired box- and homeobox-containing quail gene (*Pax-QNR*) expressed in the neuroretina. *Oncogene*, **7**, 1721-1728.

Marusich, M. F. and Weston, J. A. (1991). Development of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev* **1**, 221-9.

Matsuno, K., Diederich, R.J., Go, M.J., Blaumueller, C.M. and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* **121**, 2633-2644.

Maulbecker, C. C. and Gruss, P. (1993). The oncogenic potential of *Pax* genes. *The European Molecular Biology Journal* **12**, 2361-2367.

McKay, D. B. and Steitz, T. A. (1981). Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding of left-handed B-DNA. *Nature* **290**, 744-749.

Meyer, D. B. (1977). The avian eye and its adaptations. In F. Crescitelli (ed) : *The Visual System in Vertebrates*. Berlin : Springer-Verlag 549-611.

Millar, S. E., Miller,M.W., Stevens,M.E. and Barsh,G.S. (1995). Expression and transgenic studies of the mouse *agouti* gene provide insight into the mechanisms by which mammalian coat color patterns are generated. *Development* **121**, 3223-3232.

Miller, J., McLachlan, A.D., Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4**, 1609-1614.

Miller, J. B. (1991). Myoblasts, myosins, MyoDs and the diversification of muscle fibers. *Neuromuscular Disorders* **1**, 7-17.

Miner, H. H. and Wold, B. (1990). Herculin, a fourth member of the *MyoD* family of myogenic regulatory genes. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **87**, 1089-1093.

Mintz, B. (1967). Gene control of mammalian pigmentary differentiation. I. Clonal origin of melanocytes. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **58**, 344-351.

Mizuno, K., Okano, I., Ohashi, K., Nunoue, K., Kuna, K., Miyata, T. and Nakamura, T. (1994). Identification of human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene* **9**, 1605-1612.

Moase, C. E. and Trasler, D.G. (1990). Delayed neural crest cell emigration from Sp and Spd mouse neural tube explants. *Teratology* **42**, 171-182.

Mochii, M., Agata, K. and Eguchi, G. (1991). Complete sequence and expression of a cDNA encoding a chicken 115kDa melanosomal matrix protein. *Pigment Cell Research* **4**, 41-47.

Molkentin, J.D. and Olson, E.N. (1996). Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9366-9373.

Morrison-Graham, K. a. W., J. (1993). Transient Steel factor dependence by neural-crest-derived melanocyte precursors. *Dev. Biol.* **159**, 346-352.

Mountjoy, K.G., Robbins, L.S., Mortrud, M.T. and Cone, R.D. (1992). The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* **257**, 1248-1251.

Mucenski M, McLain K, Kier A, et al. (1991). A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hematopoiesis. *Cell* **65**: 677-89.

Mukherjee, B., Morgenbesser, S. D. and DePinho, R. A. (1992). Myc family oncoproteins function through a common pathway to transform normal cells in culture: cross-interference by Max and trans-acting dominant mutant. *Genes & Dev.* **6**, 1480-1492.

Mumberg, D., F. C. Lucibelle, M. Schuermann and R. Müller. (1991). Alternative splicing of *fosB* transcripts results in differentially expressed mRNAs encoding functionally antagonistic proteins. *Genes & Dev.*, **5**, 1212-1223.

Murphy, M., Reid, K., Williams, D.E., Lyman, S.D. and Bartlett, P.F. (1992). Steel factor is required for maintenance, but not differentiation of melanocyte precursors in the neural crest. *Dev. Biol.* **153**, 396-401.

Murre, C., McCaw, M. S. and Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**, 777-783.

Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I. and Nabeshima, Y. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* **364**, 532-535.

Nakabeppu, Y. and D. Nathans. (1991). A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell*, **64**, 751-759.

Nalik, P., Panayotova-Heiermann, M. and Pongs, O. (1989). Characterization of an oestradiol-stimulated mRNA in the brain of adult male rats. *Mol. and Cell. Endocrinology* **62**, 235-242.

Navascues, J., Amale, M., Almandros, A., Martin-Teva, J.L. and Cuadros, M.A. (1995). Origin of Microglia in the Quail Retina: Central-to-peripheral and Vitreal-to-Scleral Migration of Microglial Precursors During Development. *The Journal of Comparative Neurology.* **354**, 209-228.

Nornes, H.O., Dressler, G.R., Knapik, E.W., Deutsch, U. and Gruss, P. (1990). Spatially and temporally restricted expression of *Pax2* during murine neurogenesis. *Development.* **109**, 797-809.

Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I. and Caudy, M. (1994). Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of Drosophila sensory organ formation. *Genes & Dev.* **8**, 2743-2755.

Olson, E.N. and Rosenthal, N. (1994). Homeobox genes and muscle patterning. *Cell* **79**, 9-12.

Olson, E.N., Arnold, H.H., Rigby, P.W. and Wold, B.J. (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* **85**, 1-4.

Orkin, S.H., Swan, D. and Leder, P. (1975). Differential expression of alpha- and beta-globin genes during differentiation of cultured erythroleukemic cells. *J. Biol. Chem.* **250**, 8753-8760.

Orlow, S. J. (1995). Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol* **105**, 3-7.

Oro, A.E., McKeown, M. and Evans, R.M. (1992). The Drosophila retinoid X receptor homolog ultraspiracle functions in both female reproduction and eye morphogenesis. *Development* **115**, 449-462.

Pabo, C. O. and Lewis M. (1982). The operator-binding domain of λ repressor: structure and DNA recognition. *Nature* **298**, 443-447.

Paroush, Z., Finley, R.L., Kidd, T., Wainwright, S.M., Ingham, P.W., Brent, R. and Ish-Horowicz, D. (1994). Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* **79**, 805-815.

Pavan, W.J. and Tilghman, S.M. (1994). Piebald lethal acts early to disrupt the development of neural crest-derived melanocytes. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **91**, 7159-7163.

Pavletich, N. P., and Pabo, C.O. (1993). Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives of zinc fingers. *Science* **261**, 1701-1707.

Perkins, A., Kongsuwan, K., Visvader, J., Adams, J. M. and Cory, S. (1990). Homeobox gene expression plus autocrine growth factor production elicits myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **81**, 8398-8402.

Philipp, A., Schneider, A., Vasrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Alitalo, K. and Eilers, M. (1994). Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4035-4043.

Plaza, S., Dozier, C. and Saule, S. (1993). Quail *Pax-6* (*Pax-QNR*) encodes a transcription factor able to bind and transactivate its own promoter. *Cell Growth Differ.*, **4**, 1041-1050.

Polack JM, Bloom SR, and Maramgo PJH (1984) Neuron-specific enolase ; a marker for neuroendocrine cells. in : Steiner DF, Frenkel m (eds) Evolution and Tumor Pathology of the Neuroendocrine System, *American Physiology Society, Washington*, **1** : 25-66

Poleev, A., Fickenscher, H., Mundlos, S., Winterpacht, A., Zabel, B., Fidler, A., Gruss, P. and Plachov, D. (1992). *PAX8*, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Development* **16**, 611-623.

Pourquié, O., Coltey, M., Teillet, M.-A., Ordahl, C. and Le Douarin, N.M. (1993). Control of dorsoventral patterning of somitic derivatives by notochord and floor plate. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **90**, 5242-5246.

Prioleau, M.N., Huet, J., Sentenac, A. and Mechali, M. (1994). Competition between chromatin and transcription complex assembly regulate gene expression during early development. *Cell* **77**, 439-449.

Prioleau, M.N., Buckle, R.S. and Mechalie, M. (1995). Programming of a repressed but committed chromatin structure during early development. *EMBO J* **14**, 5073-5084.

Puro, D. G. a. A., E. (1984). Insulin-mediated regulation of neuronal maturation. *Science* **225**, 1170-1172.

Qian, Y. Q., Billeter, M. and Otting, G. (1989). The structure of the *Antennapedia* homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution : comparison with prokaryotic repressors. *Cell* **59**, 573-580.

Quinn, J. C., West, J. and Hill, R.E. (1996). Multiple functions for *Pax6* in mouse eye and nasal development. *Genes & Dev.* **10**, 435-446.

Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. and Gehring, W. J. (1994). Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science* **265**, 785-789.

Richardson, M. K. and Sieber-Blum, M (1993). Pluripotent neural crest cells in the developing skin of the quail embryo. *Dev. Biol.* **157**, 348-358.

Rhodes, S. and Konieczny, S. F. (1989). Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes & Dev.* **3**, 2050-2061.

Rhyu, M.S, Jan, Y.L. and Jan, YN.(1994). Asymmetric distribution of Numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* **76**, 477-491.

Rhyu, M.S. and Knoblich, J.A. (1995). Spindle orientation and asymmetric cell fate. *Cell* **82**, 523-526.

Robbins, L.S., Nadeau, J.H., Johnson, K.R., Kelly, M.A., Rosselli-Rehfuess, L., Baack, E., Mountjoy, K.G. and Cone, R.D. (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* **72**, 827-834.

Roberts, R. C. (1967). *Small eyes*, a new dominant mutant in the mouse. *Genetic Research* **9**, 121-122.

Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 327-335.

Romanoff, A. L. (1960). The avian embryo. Structural and functional development. New York: Macmillan Company

Rosenfeld, M. G. (1991). POU-domain transcription factors : pou-er-ful developmental regulators. *Genes & Dev* **5**, 897-907.

Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W. and Standt, L.M. (1990). A Pou-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* **345**, 686-692.

Rothenpieler, U. W. and Dressler, G. R. (1993). *Pax-2* is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development. *Development* **119**, 711-720.

Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommeus, C., Beug, H., Graf, T. and Stehelin, D. (1979). **281**, 452-455.

- Rudnicki, M. A., Braun, R., Hinuma, S. and Haenisch, R.** (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation on the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**, 383-390.
- Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N. J., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H. and Jaenisch, R.** (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**, 1351-1359.
- Ryan, G., Steele-Perkins, V., Morris, J.F., Rauscher, F.J., III and Dressler, G.R.** (1995). Repression of *Pax2* by WT1 during normal kidney development. *Development* **121**, 867-875.
- Sadler, I., Crawford, A. W., Michelsen, J. W. and Beckerle, M. C.** (1992). Zyxin and cCRP : two LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* **119**, 1573-1587.
- Sanchez-Garcia, I. and Rabbitts, T. H.** (1993). LIM domain proteins in leukemia and development. *Seminars Cancer Biology* **4**, 349-358.
- Sanchez-Garcia, I. and Rabbitts, T. H.** (1994). The LIM domain : a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends in Genetic* **10**, 315-320.
- Satoh, M. and Ide, H.** (1987). Melanocyte-stimulating hormone affects melanogenic differentiation of quail neural crest cells in vitro. *Dev. Biol.* **119**, 579-586.
- Saule, S., Merigaud, J.P., Moustafa, A.E.A., Ferre, F., Rong, P.M., Amouyel, P., Quatannens, B., Stehelin, D. and Dieterlen-lievre, F.** (1987). Heart tumors specifically induced in young avian embryos by the v-myc oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7982-7986.
- Scheidereit, C., Cromlish, J. A., Gerster, T., Kawakawi, K., Balmaceda, C. G., Currie, R. A. and Roeder, R. G.** (1988). A human lymphoid-specific transcription factor that activates immunoglobulin genes is a homeobox protein. *Nature* **336**, 551-5557.
- Schild, C., F.-X. Claret, W. Wahli and A. P. Wolffe.** (1993). A nucleosome-dependent static loop potentiates estrogen-regulated transcription from the *Xenopus* vitellogenin B1 promoter *in vitro*. *EMBO J.*, **12**, 423-433.
- Schmeichel, K. L. and Beckerle, M. C.** (1994). The LIM domain is a modular protein-binding domain. *Cell* **79**, 211-219.
- Schneider, J.W., Gu, W., Zhu, L., Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B.** (1994). Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/- muscle cells. *Science* **264**, 1467-1471.
- Schreiber-Agus, N., Chin, L., Chen, K., Torres, R. Rao, G., Guida, P., Skoultchi, A.I. and DePinho, R.** (1995). An amino-terminal domain of Mx11 mediates anti-Myc oncogenic activity and interacts with a homolog of the yeast transcriptional repressor SIN3. *Cell* **80**, 777-786.
- Seiji, M., Shima, K., Birbeck, M.S.C., and Fitzpatrick, T.B.** (1963). Subcellular localization of melanin biosynthesis. *Ann. NY Acad. Sci.* **100**, 497-533.
- Selleck, M. and Stern, C.D.** (1991). Fate mapping and cell lineage analysis of Hensen's node in the chick embryo. *Development* **112**, 615-626.
- Shah, B. H. and Hausman, R.E.** (1993). Effect of insulin on GABAergic development in the embryonic chick retina. *Dev. Brain Res.* **72**, 151-158.

Shang, Z., Isaac, V. E., Li, H., Patel, L., Catron, C. M., Curran, T., Montelione, G. T. and Abate, C. (1994). Design of a "minimAL" homeodomain: the N-terminal arm modulates DNA binding affinity and stabilizes homeodomain structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8373-77.

Scherr, C.J., Kato, J., Quelle, D.E., Matsuoka, M. and Roussel, M.F. (1994). D-type cyclins and their cyclin-dependent kinases: G1 phase integrators of the mitogenic response. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **59**, 11-19.

Sicinski, P., Donaher, J.L., Parker, S.B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S.Z., Bronson, R.T., Elledge, S.J., Weinberg, R.A. (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* **82**, 621-630.

Sieber-Blum, M. and Cohen, A.M. (1980). Clonal analysis of quail neural crest cells: they are pluripotent and differentiate in vitro in the absence of noncrest cells. *Dev. Biol.* **80**, 96-106.

Slack, J.M.W. (1991). From egg to embryo: Regional specification in early development. *Cambridge University Press, New York.*

Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J., Chakraborty, A., Mazurkiewicz, J.E. and Mihm, M. (1995). Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin. *FEBS Lett.* **374**, 113-116.

Spencer, C. A. and Groudine, M. (1991). Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res*; **56**, 1-48.

Stanton, B.R., Perkins, A.S., Tessarolo, L., Sassoon, D.A. and Parada, L.F. (1992). Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes & Dev.* **6**, 2235-2247.

Stapleton, P., Weith, A., Urbanek, P., Kozmik, Z. and Busslinger, M. (1993). Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nature Genetics* **3**, 292-298.

Steel, K. and Barkway, C. (1989). Another role for melanocytes: their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear. *Development* **107**, 453-463.

Steel, K., Davidson, D. and Jackson, I. (1992). TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that Steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. *Development* **115**, 1111-1119.

Steingrimsson, E., Moore, K.J., Lamoreux, M.L., Ferré-D'Amaré, A.R., Burley, S.K., Zimring, D.C., Skow, L.C., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G. et al. (1994). Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat. Genet.* **8**, 256-263.

Stoykova, A. and Gruss, P. (1994). Roles of Pax-Genes in Developing and Adult Brain as Suggested by Expression Patterns. *The Journal of Neuroscience* **14**, 1395-1412.

Stuart, E. and Gruss, P. (1995). PAX genes: what's new in developmental biology and cancer? *Human Molecular genetics* **4**, 1717-1720.

Sturn, R. A., Das, G. and Herr, W. (1988). The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes & Dev* **2**, 1582-1599.

Sun, X.-H. and D. Baltimore. (1991). An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell*, **64**, 459-470.

Swaroop, A., Xu, J.Z., Pawar, H., Jackson, A., Skolnick, C. and Agarwal, N. (1992). A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 266-270.

Tachibana, M., Perez-Jurado, L. A., Nakayama, A., Hodgkinson, C. A., Li, X., Schneider, M., Miki, T., Fex, J., Francke, U. and Arnheiter, H. (1994). Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to the chromosome 3p14.1-p12.3. *Human Molecular genetics* **3**, 553-557.

Tassabehji, M., Newton, V. E., Leverton, K., Seemanova, E., Kunze, J., Sperling, K., Strachan, T. and Read, A. P. (1994a). *PAX3* gene structure and mutations: close analogies between Waardenburg syndrome and the *Spotch* mouse. *Human Molecular Genetics* **3**, 1069-1074.

Tassabehji, M., Newton, V. and Read, A. P. (1994b). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nature Genetics* **8**, 251-255.

Tata, F. and Hartley, D.A. (1993). The role of the enhancer of split complex during cell fate determination in *Drosophila*. *Dev. Suppl.* 139-148.

Teillet, M. A. and Le Douarin, N. (1970). The migration of pigmentary cells studies by method of heterospecific grafts of neural tube in bird embryo. *C.R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* **270**, 3095-3098.

Teillet, M. A. (1971). Recherches sur le mode de migration et la différenciation des mélanoblastes cutanés chez l'embryon d'oiseau: étude expérimentale par la méthode des greffes hétérospécifiques entre embryons de caille et de poulet **4**, 95-109.

Teitelman G 1990 Insulin cells of pancreas extend neurites but do not arise from the neurectoderm. *Dev Biol* **142** : 368-379

Tesoriere, G., Calvaruso, G., Vento, R., Giuliano, M., Lauricella, M. and Carabillo, M. (1994). Insulin synthesis in chick embryo retinas during development. *Neurochemical Research* **19**, 821-825.

Timmons, P. M., Wallin, J., Righby, P. W. J. and Balling, R. (1994). Expression and function of *Pax 1* during development of the pectoral girdle. *Development* **120**, 2773-2785.

Treacy, M. M., He, X. and Rosenfeld, M. G. (1991). I-POU: a POU-domain protein that inhibits neuron-specific gene. *Nature* **350**, 577-584.

Treisman, J., Göncsy, P., Vashishtha, M., Harris, E. and Desplan, C. (1989). A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* **59**, 553-562.

Treisman, J., Harris, E. and Desplan, C. (1991). The paired box encodes a second DNA-binding domain in the Paired homeo domain protein. *Genes & Dev.* **5**, 594-604.

Treisman, J., Harris, E., Wilson, D., Desplan, C. (1992). The homeodomain : a new face for the helix-turn-helix? *BioEssays* **14**, 145-150.

- Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S.B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessel, T.M. and Pfaff, S.L.** (1994). Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell* **79**, 957-970.
- Tsujimura, T., Morii, E., Nozaki, M., Hashimoto, K., Moriyama, Y., Takebayashi, K., Kondo, T., Kanakura, Y. and Kitamura, Y.** (1996). Involvement of transcription factor encoded by the mi locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice. *Blood* **88**, 1225-1233.
- Tsukamoto, K., M. Jimenez and V. J. Hearing.** (1992). The nature of tyrosinase isozymes **2**, 84-9.
- Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T. and Kawaichi, M.** (1994). Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res.* **22**, 965-971.
- Turner, E. E., Jenne, K. J. and Rosenfeld, M. G.** (1994). Brn-3.2: a Brn-3-related transcription factor with distinctive central nervous system expression and regulation by retinoic acid. *Neuron* **12**, 205-218.
- Urbanek, P., Wang, Z.-Q., Fetka, I., Wagner, E. F. and Busslinger, M.** (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking *Pax5/BSAP*. *Cell* **79**, 901-912.
- van Dijk, M. A. and C. Murre.** (1994). extradenticle raises the DNA binding specificity of homeotic selector gene products. *Cell* **78**: 617-624.
- Van Doren, M., Powell, P.A., Pasternak, D., Singson, A. and Posakony, J.W.** (1992). Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross-activation of achaete is antagonized by extramacrochaetae. *Genes & Dev.* **6**, 2592-2605.
- Verrijzer, C.P., Alkema, M.J., van Weperen, W.W. et al.,**(1992). The DNA binding specificity of the bipartite POU domain and its subdomains. *EMBO J.* **11**, 4993-5003.
- Wadman, I., Li, J., Bash, R. O., Forster, A., Osada, H., Rabbitts, T. H. and Baer, R.** (1994). Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *European Molecular Biology Journal* **13**, 4831-4839.
- Wallin, J., Mizutani, Y., Imai, K., Miyashita, N., Moriwaki, K., Tanigushi, M., Koseki, H. and Balling, R.** (1993). A new *Pax* gene, *Pax-9*, maps to the mouse chromosome 12. *Mammalian Genome* **4**, 354-358.
- Wallin, J., Wilting, J., Koseki, H., Fritsch, R., Christ, B. and Balling, R.** (1994). The role of *Pax-1* in axial skeleton development. *Development* **120**, 1109-1121.
- Wallin, J., Eibel, H., Neubuser, A., Wilting, J., Koseki, H., and Balling, R.** (1996). *Pax1* is expressed during development of the thymus epithelium and is required for normal T-cell maturation. *Development.* **122**, 23-30.
- Walther, C. and Gruss, P.** (1991). *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**, 1435-1449.
- Walther, C., Guénet, J.-L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M., Plachov, D., Balling, R. and Gruss, P.** (1991b). *Pax*: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* **11**, 424-434.
- Wassle, H. and Boycot, B.B.** (1991). Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.* **71**, 447-479.

Way, J. C. and Chalfie, M. (1988). *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* **54**, 5-16.

Way, J. C., Wang, L., Run, J.Q and A.Wang (1991). The *mec-3* gene contains cis-acting elements mediating positive and negative regulation in cells produced by asymmetric cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Dev.***5**, 2199-2211.

Way, J. C. and Chalfie, M. (1989). The *mec-3* gene of *Caenorhabditis elegans* requires its own product for maintained expression and is expressed in three neuronal types. *Genes & Dev.***3**, 1823-1833.

Weeks, D.L. and Melton, D.A.(1987). A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF- β . *Cell* **51**, 861-867.

Wegner, M., Drolet, D. W. and Rosenfeld, M. G. (1993). POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Current Opinion in Cellular Biology* **5**, 488-498.

Wehrle-Haller, B. a. W., J.A. (1995). Soluble and cell-bound forms steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. *Development* **121**, 731-742.

Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lassar, A.B. and Miller, A.D. (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **86**, 5434-5438.

Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S. et al (1991). The myoD gene family : nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* **251**, 761-766.

Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* **75**, 1241-1244.

Weintraub, H., T. Genetta and T. Kadash. (1994). Tissue-specific gene activation by MyoD : determination of specificity by cis-acting repression elements. *Genes & Dev.*, **8**, 2203-2211.

Williams, B. A. and Ordhal, C.P. (1994). *Pax-3* expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* **120**, 785-796.

Wilson, D., Sheng, G., Lecuit, T., Dostatni, N. and Desplan, C. (1993). Cooperative dimerization of Paired class homeo domains of DNA. *Genes & Dev* **7**, 2120-5124.

Wilson, D. S., Guenther, B., Desplan, C. and Kuriyan, J. (1995). High Resolution Crystal Structure of a Paired (*Pax*) Class Cooperative Homeodomain Dimer on Dna. *Cell* **82**, 709-719.

Wolberger, C., Vershon, A. K. and Liu, B. (1991). Crystal structure of a MATA2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* **67**, 517-528.

Wolffe, A. P. (1994). Nucleosome positioning and modification : chromatin structures that potentiate transcription. *TIBS* **19**, 240-244.

Wolpert, L. (1994). The evolutionary origin of development: cycles, patterning, privilege and continuity. *Development supplement*, 79-84.

Woodland, H.R and Adamson, E.D. (1977). The synthesis and storage of histone during the oogenesis of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **84**; 364-371.

Xiang, M., Zhou, L., Peng, Y.W., Eddy, R.L., Shows, T.B. and Nathans, J. (1993). Brn-3b : a POU domain gene expressed in a subset of retinal ganglion cells. *Neuron* **11**, 689-701.

Xu, L., Morgenbesser, S. D., and DePinho, R. A. (1991). Complex transcriptional regulation of myc family gene expression in the developing mouse brain and liver. *Mol. Cell. Biol.* , **11**, 6007-6015.

Xu, L, Wallen, R., Patel, V. and DePinho, R.A. (1993). Role of first exon/intron sequences in the regulation of myc family oncogenic potency. *Oncogene* **8**, 2547-2553.

Xu, W., Rould, M., Jun, S., Desplan, C. and Pabo, C. (1995). Crystal structure of a paired domain-DNA at 2.5Å resolution reveals structural basis for *Pax* developmental mutations. *Cell* **80**, 639-650.

Xuan, S., Baptista, C.A., Balas, G., Tao, W., Soares, V.C. and Lai, E. (1995). Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron*, **14**, 1141-1152.

Xue, D., Yuan, T. and Chalfie, M. (1993). Cooperative interactions between the *Caenorhabditis elegans* homeoproteins UNC-86 and MEC-3. *Science* **261**, 1324-1328.

Yamada, T., Pfaff, S.L., Edlund, T. and Jessell, T.M. (1993). Control of cell pattern in the neural tube: Motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* **73**, 673-686.

Yamagata, K., Goto, K., Kuo, C.-H., Kondo, H. and Miki, N. (1990). Visinin : a novel calcium binding protein expressed in retinal cone cells. *Neuron* **2**, 469-476.

Yasumoto, K. I., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y. and Shibahara, S. (1994). Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol* **14**, 8058-8070.

Yen, J., R. M. Wisdom, I. Tratner and I. M. Verma. (1991). An alternative spliced form of FosB is a negative regulator of transcriptional activation and transformation by Fos proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5077-5081.

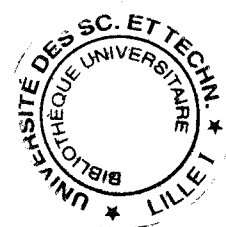
Yuan, D., Ma, X. and Ma, J. (1996). Sequences outside the homeodomain of bicoid are required for protein-protein interaction. *J. Biol. Chem.* **271**, 21660-21665.

Zannini, M., Francis-Lang, H., Plachov, D. and Di Lauro, R. (1992). *Pax-8*, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Molecular and Cellular Biology* **12**, 4230-4241.

Zappavigna, V., Sartori, D. and Mavilio, F. (1994). Specificity of HOX protein function depends on DNA-protein and protein-protein interactions, both mediated by the homeodomain. *Genes & Dev* **8**, 732-744.

Zhao, G. Q., Zhao, Q., Shou, X., Mattei, M. G. and DeCrombrughe, B. (1993). TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4505-4512.

Zhu, A. and Kuziora, M.A. (1996). homeodomain interaction with the b subunit of the general transcription factor TFIIE. *J. Biol. Chem.* **271**, 20993-20996.



RESUME

Par criblage différentiel d'une banque d'ADNc construite à partir d'ARNm provenant de cellules de neurorétine de Caille infectées par le rétrovirus MC29 porteur de l'oncogène *v-myc*, ont été isolés deux clones: l'un correspond au gène *Pax-QNR*, orthologue aviaire du gène *pax-6/PAX6* codant un facteur de transcription essentiel pour la formation des yeux, et le second, *QNR-71*, code une protéine du mélanosome apparentée au produit du gène *silver*.

A côté de son expression déjà documentée dans le système nerveux central, nous avons mis en évidence une expression de *Pax-QNR* dans le pancréas, et plus particulièrement le pancréas endocrine. L'expression de *pax-6* est sous le contrôle de deux promoteurs, P0 et P1. P1, promoteur interne, est constitutif dans les tissus qui expriment *Pax-QNR* alors que P0 s'induit au moment de la différenciation neuronale dans la rétine. Nous avons montré que l'oncogène *myc* était capable d'induire la différenciation de la rétine pigmentaire en neurones, ces cellules exprimant alors *Pax-QNR* à partir de P0. P0 et P1, qui sont activés par la protéine p46 codée par *Pax-QNR*, sont également stimulés par les produits de la famille Myb, A-Myb et c-Myb, ces deux facteurs étant exprimés dans la neurorétine. Par ailleurs, nous montrons que les cellules de neurorétine exprimant *A-myb* prolifèrent en réponse au bFGF, une propriété qui avait déjà été observée pour *c-myb*.

QNR-71 s'exprime dans les tissus mélanisés, rétine pigmentaire et mélanocytes de la peau. Le promoteur de ce gène, dont l'expression est spécifique des mélanocytes, répond directement à la fois à Myc et à Mi, deux facteurs de transcription de la famille bHLHLZ, par l'intermédiaire de deux sites de fixation CATGTG. D'autre part, l'expression sous promotion virale de Myc et de Mi conduit à une expression accrue du gène *QNR-71* endogène. Nos travaux montrent que le facteur de transcription v-Myc est capable de reprogrammer la différenciation de la neurorétine vers la voie pigmentaire, et celle de la rétine pigmentaire dans la voie neuronale, suggérant un rôle central pour les facteurs de cette famille dans les phénomènes de différenciation de la rétine.