

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
(LILLE I)

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

PAR

Vincent DOLEZ

**ROLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION : PAX6, OTX2, MITF et
MAF DANS LA SPECIFICATION DU NEUROEPITHELIUM RETINIEN**

Soutenue le 17 mai 2004 devant la commission d'examen :

Dr. Joël MAZURIER	Président
Dr. Françoise POIRIER	Rapporteur
Dr. Sylvie MAZAN	Rapporteur
Dr. Marie-Paule FELDER-SCHMITTBUHL	Examineur
Pr. Yvan de LAUNOIT	Co-Directeur de thèse
Dr. Simon SAULE	Directeur de thèse

SOMMAIRE

	page
LISTE DES ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION	5
I. LA FORMATION DE L'ŒIL	5
1. Structure et fonction	5
2. Structure et fonctionnement de la rétine	5
3. Le développement de l'œil	9
4. Le développement de la rétine	12
5. Le développement du cristallin	14
6. Transdifférenciation de la rétine	17
II. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET LA MORPHOGENESE OCULAIRE	20
1. Les facteurs de transcription : présentation	20
2. Le domaine HTH	24
3. Le domaine basique b-HLH	24
4. Le domaine b-LZ	25
5. Le doigt de Zinc	25
III. LE GENE <i>PAX6</i>	27
1. La famille Pax	27
2. <i>pax6</i> , un gène maître du développement de l'œil	29
3. Les gènes cibles de Pax6	31
4. Les différentes isoformes de Pax6	34
5. Les éléments de régulation de l'expression de <i>pax6</i>	36
6. Relations entre <i>pax6</i> et <i>pax2</i> au cours du développement de l'oeil	39
IV. LE GENE <i>MITF</i>	40
1. Présentation	40
2. La mélanogenèse	41
3. La famille MiT	42

4. Mitf, structure et isoformes	44
5. Expression au cours du développement embryonnaire	46
6. Gènes cibles de Mitf	48
7. Mitf et la RPE	50
V. LE GENE <i>OTX-2</i> ET LA FAMILLE OTX	52
1. La famille <i>Otx</i>	52
2. <i>Otx1</i>	54
3. <i>Crx</i>	55
4. <i>Otx2</i>	57
a. Fonctions de la protéine <i>Otx2</i>	58
b. Régulation de l'expression d' <i>Otx2</i>	62
VI. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION MAF	63
1. La famille Maf	63
2. La liaison à l'ADN des protéines Maf	64
3. Fonctions des protéines Maf	66
a. Propriétés oncogéniques	66
b. Rôles dans la différenciation	66
c. Les facteurs de transcription Maf et l'oeil	67
c.1. NRL et la neurorétine	67
c.2. Les grands Maf et le développement du cristallin	68
RESULTATS	70
I. <i>Otx2</i> active le programme moléculaire de la différenciation de l'épithélium pigmentaire de la rétine.	71
II. Régulation de l'expression de <i>pax6</i> par les facteurs de transcription Maf	75
DISCUSSION	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103

ABREVIATION

A: Adénine
AA: Acides aminés
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire ou codant
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
b-HLH: basic-Helix-Loop-Helix domain
b-HLH (LZ): b-HLH Leucine Zipper domain
b-LZ: basic Leucine Zipper domain
BMP: Bone Morphogenetic Protein
C: Cytidine
CAT: chloremphenicol acetyltransferase
CGg: couche des cellules ganglionnaires
CPE: couche plexiforme externe
CPI: couche plexiforme interne
CNE: couche nucléaire externe
CNI: couche nucléaire interne
Dac: Dachshund
Dpp: Decapentaplegic
Egfr: Epidermal growth factor receptor
Ey: Eyeless
EPR: épithélium pigmentaire de la rétine
ES: Ectoderme de surface
Exd: Extradenticle
Eya: Eyes absent
Eyg: Eye gone
FGF: Fibroblaste Growth Factor
G: Guanine
HAT: Histone Acetyl Transferase
Hh: Hedgehog
Hth: Homothorax
HTH: Helix-Turn-Helix

HRE: Hormone Responsive Element

INL: Inner Nuclear Layer

K: lysine

kb: kilo paire de bases

Kd: KiloDalton

L: Leucine

MAPK: Mitogen activated protein kinase

N: base azotée quelconque, constituant de l'ADN (A, C, T ou G)

NR: Neurorétine

ONL: Outer Nuclear Layer

P: Proline

pb: paire de bases

Q: Glutamine

RPE: Rétine pigmentaire

RTK: Receptor tyrosine kinase

S: Sérine

So: Sine oculis

T: Thymidine

TDE: Tyrosinase Distal Element

TGF: Transforming Growth Factor

TK: Thymidine kinase

Toy: Twin of eyeless

Tsh: Teashirt

UV: Ultra-violet

W: Tryptophane

INTRODUCTION

I. LA FORMATION DE L'ŒIL

1. Structure et fonction

L'œil est l'organe de la vision et à ce titre ses différents constituants doivent pouvoir laisser passer la lumière, puis traduire cette dernière en influx nerveux qui sera acheminé au cerveau chargé de l'interpréter. Ainsi, la cornée est une surface transparente en forme de disque incurvé placée sur la face antérieure de l'œil (figure 1). Cette dernière est prolongée vers sa partie postérieure par la sclérotique qui constitue l'armature de cet organe. La choroïde est une sorte de méninge tapissant la sclérotique et est composée de vaisseaux sanguins, de cellules de soutien et de mélanocytes issus de la crête neurale. La choroïde se prolonge dans sa partie antérieure par les corps ciliaires et l'iris, un tissu en forme de disque constitué de cellules musculaires lisses, de mélanocytes et percé d'une ouverture, la pupille qui permet l'entrée de la lumière dans l'œil. En arrière de l'iris se trouve le cristallin, transparent et biconvexe, suspendu par des ligaments issus des corps ciliaires et dont les modifications de formes sont essentielles dans l'accommodation. L'espace situé entre l'iris et le cristallin constitue la chambre postérieure. Entre la cornée et l'iris se trouve la chambre antérieure remplie d'un fluide transparent, l'humeur aqueuse. Le cristallin est en contact avec l'humeur vitrée, matrice extracellulaire gélatineuse et transparente, qui tapisse tout l'intérieur de l'œil (figure 1). Entre l'humeur vitrée et la choroïde se trouve la rétine. On distingue la rétine pigmentaire, un épithélium constitué d'une monocouche de cellules qui repose sur la choroïde, et la neurorétine qui repose sur la rétine pigmentaire. C'est la neurorétine constituée de différentes couches de neurones qui permet de traduire (grâce aux photorécepteurs) et de véhiculer (par l'intermédiaire des axones des cellules ganglionnaires) le signal lumineux en influx nerveux au cerveau qui l'interprétera.

2. Structure et fonctionnement de la rétine

La rétine des vertébrés contient deux types de photorécepteur : les cônes et les bâtonnets. Les cônes sont responsables de la vision de jour et de celle des couleurs, alors que les bâtonnets sont responsables de la vision nocturne. Les cônes comme les bâtonnets élaborent des structures spécialisées qui sont les segments externes afin de capter la lumière. Ces segments externes contiennent des pigments visuels qui sont excités par la lumière. Cette excitation déclenche une cascade d'activation enzymatique qui aboutit à la transmission du signal.

La rétine possède d'autres types de neurones qui sont les cellules horizontales, les cellules

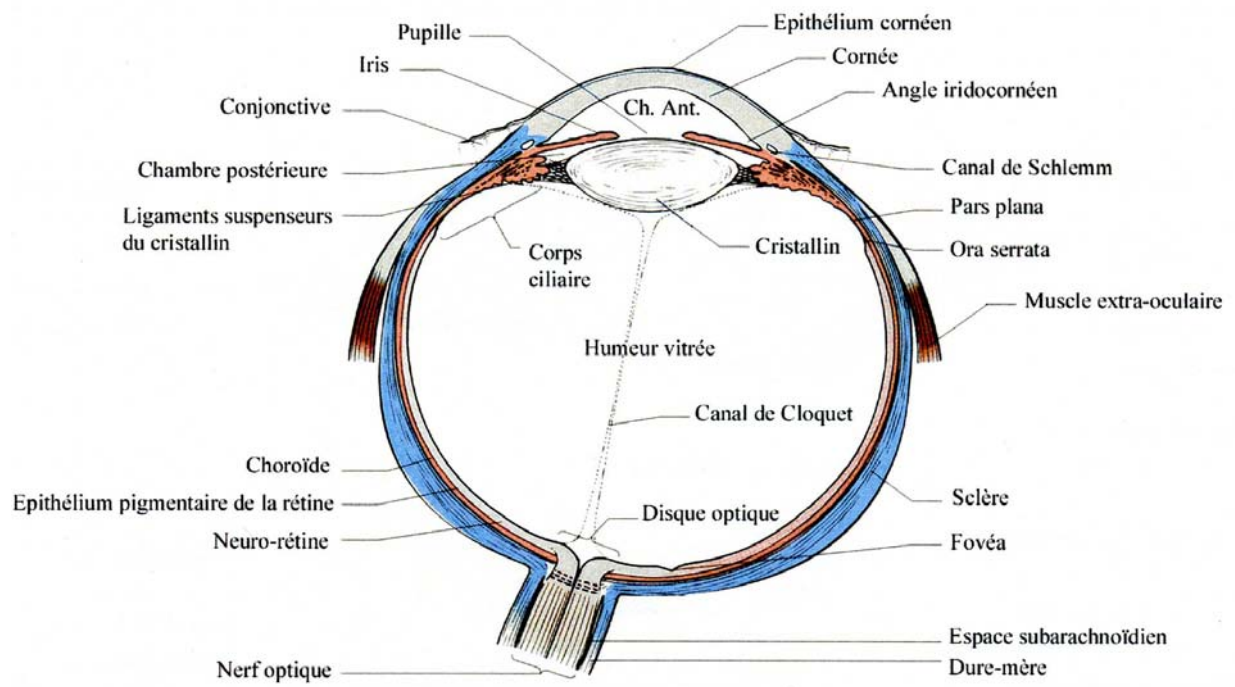


Figure 1: Schéma de l'œil humain. Coupe horizontale. (d'après Forrester et al., 2002)

bipolaires, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires. Les cellules ganglionnaires vont projeter leurs axones vers le cerveau à travers le nerf optique. L'ensemble de ces cellules est associé à des cellules gliales, des cellules de Müller qui ont un rôle nourricier. Ces cellules sont organisées en couches (figure 2). Les corps cellulaires des neurones sont présents dans trois couches distinctes. La couche nucléaire externe CNE qui contient uniquement les noyaux des photorécepteurs. La couche nucléaire interne CNI qui est composée des corps cellulaires des cellules horizontales, des cellules amacrines, des cellules bipolaires et des cellules de Müller. La troisième couche nucléaire correspond aux cellules ganglionnaires CGg. Ces couches nucléaires sont séparées par des zones de connections synaptiques qui sont les couches plexiformes.

Un épithélium est également présent du côté externe de la neurorétine, c'est la rétine pigmentaire ou EPR (Epithélium Pigmentaire de la rétine encore appelé RPE pour Retina Pigmented Epithelium). Cette couche correspond à un épithélium de cellules pigmentées qui présente du côté de la neurorétine des microvillosités qui sont en contact étroit avec les segments externes des photorécepteurs. Ces cellules pigmentées assurent trois fonctions : 1) elles absorbent une partie de la lumière afin d'améliorer la netteté de l'image formée, 2) elles jouent un rôle de barrière entre la neurorétine et le sang permettant ainsi des échanges de métabolites, 3) par la présence des microvillosités qui entourent les segments externes, ces cellules participent au recyclage de ces segments en les phagocytant.

Ainsi dans la rétine, les photorécepteurs vont transmettre un signal aux cellules bipolaires qui vont le transmettre à leur tour aux cellules ganglionnaires qui le communiquent au cerveau. Les cellules horizontales établissent des connections latérales entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires, et les cellules amacrines établissent des connections latérales entre les cellules bipolaires et les ganglionnaires. Ces connections latérales permettent de propager et de renforcer le signal. Cette schématisation de la rétine recouvre en fait une bien plus grande complexité cellulaire (Masland, 2001). Les études neuroanatomiques quantitatives conduites sur la neurorétine de vertébrés ont permis de montrer l'existence d'au moins 55 types distincts de neurones. Trois types de cônes existent, sensibles aux longueurs d'ondes bleues, vertes et rouges. Les photopigments de rhodopsine sont composés d'une protéine membranaire de 40 Kd, l'opsine, possédant 7 hélices transmembranaires couplées à un dérivé de la vitamine A, le 11-cis retinal. Ce sont des mutations dans les opsines qui sont responsables de leur spectre d'absorption lumineuse. L'influx lumineux est absorbé par le 11-cis retinal qui s'isomérisé en all-trans rétinol, conduisant à un changement de conformation de l'opsine. Cet état photo-excité lui permet d'interagir avec une protéine G, la transducine à l'origine d'une cascade biochimique qui conduira à la fermeture des canaux Ca^{++}/Na^{+} , entraînant l'hyperpolarisation membranaire.

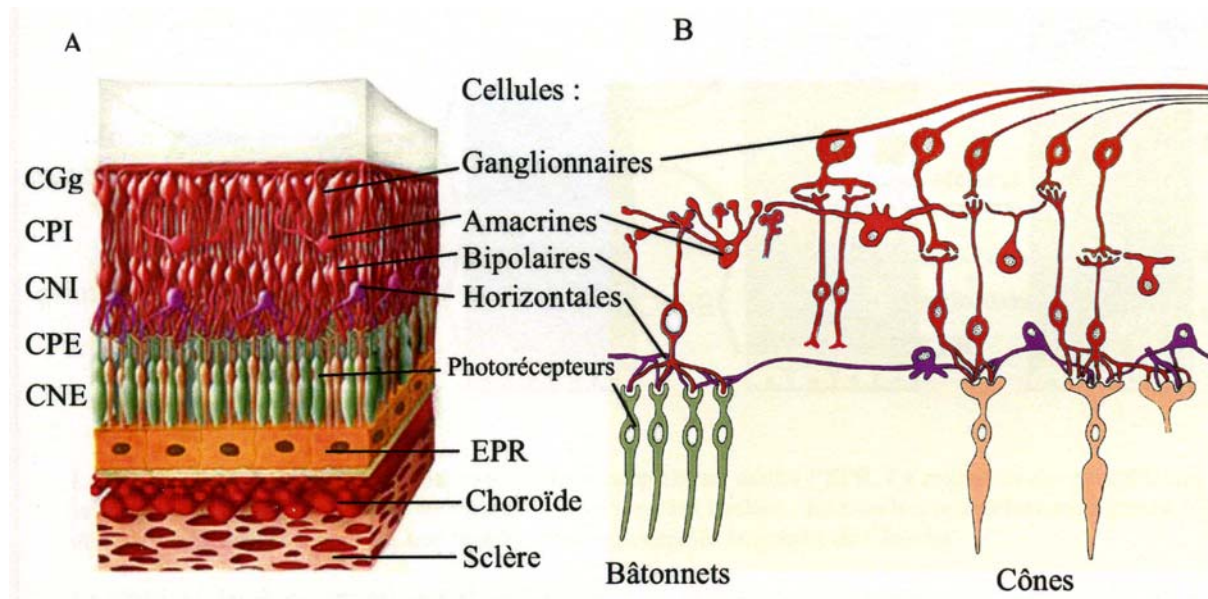


Figure 2 : Structure de la rétine. A, Représentation de l'organisation anatomique de la rétine. B, Représentation des connexions synaptiques de la neurorétine. CGg: couche des cellules ganglionnaires, CPI: couche pléxiforme interne, CNI: couche nucléaire interne, CPE: couche pléxiforme externe, CNE: couche nucléaire externe, EPR: épithélium pigmentaire de la rétine. (d'après Forrester et al., 2002)

Il existe selon les mammifères, entre 9 et 11 types distincts de cellules bipolaires connectées aux cônes. Les bâtonnets sont en moyenne 20 fois plus nombreux que les cônes, mais le réseau de leurs connections est bien plus simple. Les synapses des cônes relarguent du glutamate auquel les cellules bipolaires vont répondre de façon différente selon leur nature, conduisant à la mise en place d'une circuiterie ouverte ou fermée. Les cônes et les bâtonnets sont connectés à deux types de cellules horizontales ; ces dernières ne représentent que 5% des cellules de la couche nucléaire interne. Les 10 à 15 types distincts de cellules ganglionnaires reçoivent la signalisation des cellules bipolaires à travers les contacts synaptiques établis avec l'un des 29 types de cellules amacrines, les contacts directs bipolaires/ganglionnaires étant minoritaires (Masland, 2001). Cette diversité cellulaire sur le plan morphologique se double d'une diversité dans l'expression des neurotransmetteurs, pour conduire à la mise en place de circuits cellulaires dont on doit maintenant comprendre le rôle physiologique.

3. Le développement de l'œil

Cette grande diversité cellulaire de la rétine est le résultat du développement du neuroépithélium. Le système nerveux est issu de l'ectoderme par formation de la plaque neurale après enfoncement du neurectoderme, dont les bords se soulèvent pour former le tube neural (neurulation). Alors que dans la partie postérieure de l'embryon, le tube neural va former la moelle épinière, dans la partie antérieure, il se différencie en trois vésicules : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Le prosencéphale se divise ensuite en télencéphale et diencephale, et le rhombencéphale en métencéphale et myélencéphale. C'est à partir du télencéphale (Cobos et al., 2001) qu'émergent deux vésicules optiques qui donneront les futurs yeux.

Les vésicules optiques sont formées par évagination bilatérale du neuroépithélium. A ce stade, les territoires présomptifs de la neurorétine et de la rétine pigmentaire sont déjà établis. En fait, il est connu depuis 70 ans que le territoire présomptif des yeux existe bien avant la formation de la vésicule optique ; chez la salamandre, une partie de la plaque neurale antérieure peut être isolée 6 heures avant la formation des vésicules optiques et sa culture *in vitro* durant 24 heures fournira un œil histologiquement normal (Lopashov and Stroeva, 1964). Il semble actuellement que la spécification du territoire oculaire soit engagée au stade plaque neurale par l'expression d'une combinatoire de facteurs de transcription incluant ET, Rx1, Pax6, Six3, Lhx2, Tll et Otx2/Six6 (Zuber et al., 2003). Cette combinatoire de facteurs de transcription est modulée en réponse à une modification de l'environnement cellulaire. Cette modification induira une cascade de signalisation dans la cellule dont la conséquence ultime est l'adaptation des facteurs de

transcription aux variations du milieu extracellulaire. Les agents capables d'induire de telles modifications sont très nombreux, et possèdent des récepteurs membranaires présentant des activités biochimiques distinctes (tyrosine kinase, sérine/thréonine kinase, à domaines transmembranaires multiples). Ainsi, les membres de la famille de protéines secrétées Hedghog sont requis pour la séparation du champ oculaire en deux compartiments (Macdonald et al., 1995), et ces protéines sont également impliquées plus tardivement dans la formation de l'axe proximo-distal de la rétine et la différenciation de la rétine pigmentaire (Perron et al., 2003). D'autres facteurs secrétés, comme les membres de la famille des FGF (FGF8) ou de la famille des TGFbeta (BMP4) sont également essentiels pour le développement et la différenciation normale des yeux (Crossley et al., 2001). Ces facteurs diffusibles sont également responsables de la compartimentalisation du neuroépithélium en quadrant dorsal, nasal, temporal et ventral (Huh et al., 1999) (Zhang and Yang, 2001) (Sakuta et al., 2001; Take-uchi et al., 2003). Une telle compartimentalisation de la rétine s'observe grâce à des gènes dont les territoires d'expression définissent ces différents cadrans. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription et leur régionalisation conditionnera l'expression des protéines de guidage axonal à la surface des axones émis par les cellules ganglionnaires (Schulte et al., 1999) (Baumer et al., 2002). Ces guidages conduiront les axones à se projeter dans des régions distinctes dans les territoires d'interprétation visuelle du cerveau.

La partie antérieure de la vésicule, la plus proche de l'ectoderme de surface, donnera la neurorétine et la partie postérieure, la rétine pigmentaire. Malgré leurs différences de structure et de fonctions, la neurorétine et la rétine pigmentaire sont issues de précurseurs communs de la vésicule optique. Les vésicules optiques croissent jusqu'à ce qu'elles touchent l'ectoderme (Figure 3A), puis s'invaginent pour former chacune une cupule optique composée de deux couches cellulaires (Figure 3C). La couche interne va donner la future neurorétine et la couche externe, la future rétine pigmentée (RPE). Les bords de ces deux couches formeront les corps ciliaires, l'iris et les muscles. Le pédoncule optique relie la cupule optique au cerveau et constituera la partie gliale du futur nerf optique. Chez le poulet, la formation des cupules optiques commence au deuxième jour de développement (E2) et la pigmentation apparaît au troisième jour (E3) (Hamburger and Hamilton, 1951).

Simultanément à la formation des cupules optiques, au niveau du point de contact entre l'ectoderme de surface et le neuroépithélium, l'ectoderme s'épaissit pour former la placode cristalline (Figure 3B). Cette placode évolue en une vésicule qui va se différencier ensuite en cristallin (Figure 3C) et en épithélium cornéen. Les développements des vésicules cristallines et optiques sont interdépendants. Les mécanismes d'induction du cristallin et de la rétine sont

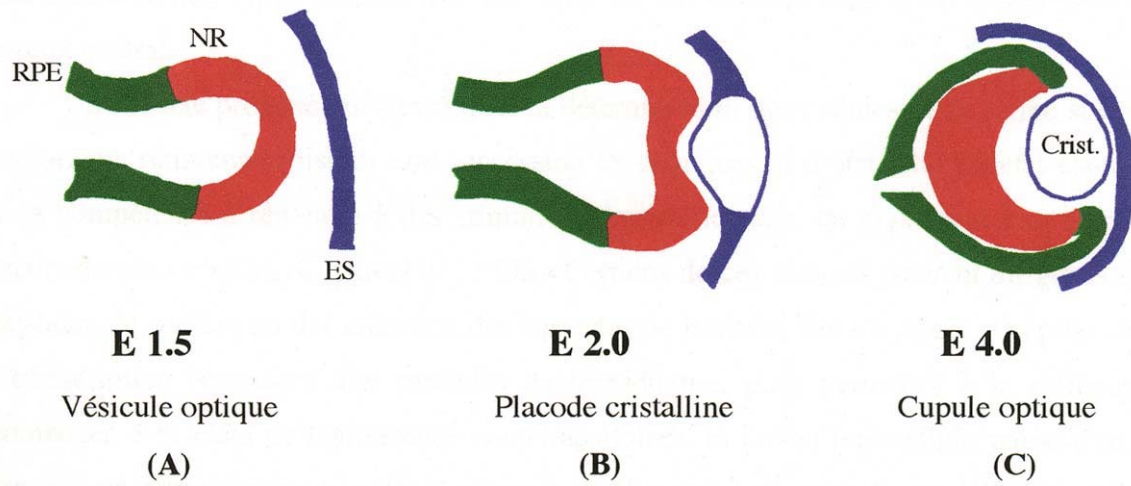


Figure 3 : Morphogenèse de l'œil chez le poulet. Les stades de développement sont indiqués en jours. La future neurorétine est en rouge et la future rétine pigmentaire est en vert. ES : ectoderme de surface ; Crist. : cristallin ; NR : neurorétine ; RPE : rétine pigmentée. (d'après Hyer *et al.*, 1998)

encore largement inconnus, mais on commence à mettre en évidence des gradients de molécules sécrétées par l'ectoderme et le neuroépithélium, qui agissent ensemble pour permettre le développement de ces tissus.

Le neuroépithélium et l'ectoderme de surface ne sont pas les seules structures à participer à la formation de l'œil. En effet, des cellules issues des crêtes neurales crâniennes migrent et viennent coloniser l'œil en développement ; elles formeront les mélanocytes de la choroïde et d'une partie de l'iris (Le Douarin et al., 1992).

4. Le développement de la rétine

Le développement de la neurorétine passe par trois étapes : la prolifération de précurseurs neuroectodermiques, l'organisation en couches cellulaires et la différenciation des cellules postmitotiques. En fait, bien que l'on puisse distinguer trois processus, ces derniers sont étroitement imbriqués les uns dans les autres.

Les cellules de la neurorétine ne se divisent pas toutes au même rythme. L'arrêt de prolifération et la différenciation commencent dans la partie centrale de l'œil et se propagent dans toutes les directions vers la périphérie (Figure 4). Chez l'oiseau, la progression vers la partie temporale précède celle vers la partie nasale. De plus, la partie dorsale de la neurorétine se différencie un peu avant la partie ventrale, la différenciation débutant dans le centre de la rétine, dans l'aire dorso-temporale près du pôle postérieur et de la base du nerf optique (Prada et al., 1991). La rétine pigmentaire suit le même schéma que la neurorétine, dans le sens où l'arrêt de prolifération des cellules commence au centre et se propage vers la périphérie.

Chez le poulet, les premières cellules à arrêter de se diviser et à commencer à se différencier sont les cellules ganglionnaires, à partir de E2 (Figure 5). Viennent ensuite les cellules amacrines, les cellules horizontales, les photorécepteurs et les cellules de Müller. Les cellules bipolaires sont les dernières à se différencier, à partir de E5. Dans toutes les zones de la rétine, les premières cellules qui sortent du cycle, se différencient toujours en cellules ganglionnaires et les dernières, en cellules bipolaires. On ne sait pas exactement pourquoi cet ordre de différenciation existe, ni même pourquoi il est tel qu'il est, le fait est que ce phénomène de délai de différenciation entre les différents types cellulaires et leur position est fréquent dans le développement du système nerveux central.

Un modèle proposé pour expliquer la détermination des cellules de la rétine suggère que les progéniteurs rétiniens subissent une succession de changement d'état, chaque état étant caractérisé par sa compétence à répondre à des stimuli environnementaux, en exprimant une combinaison de facteurs de transcription (Cepko et al., 1996). Certains de ces facteurs peuvent

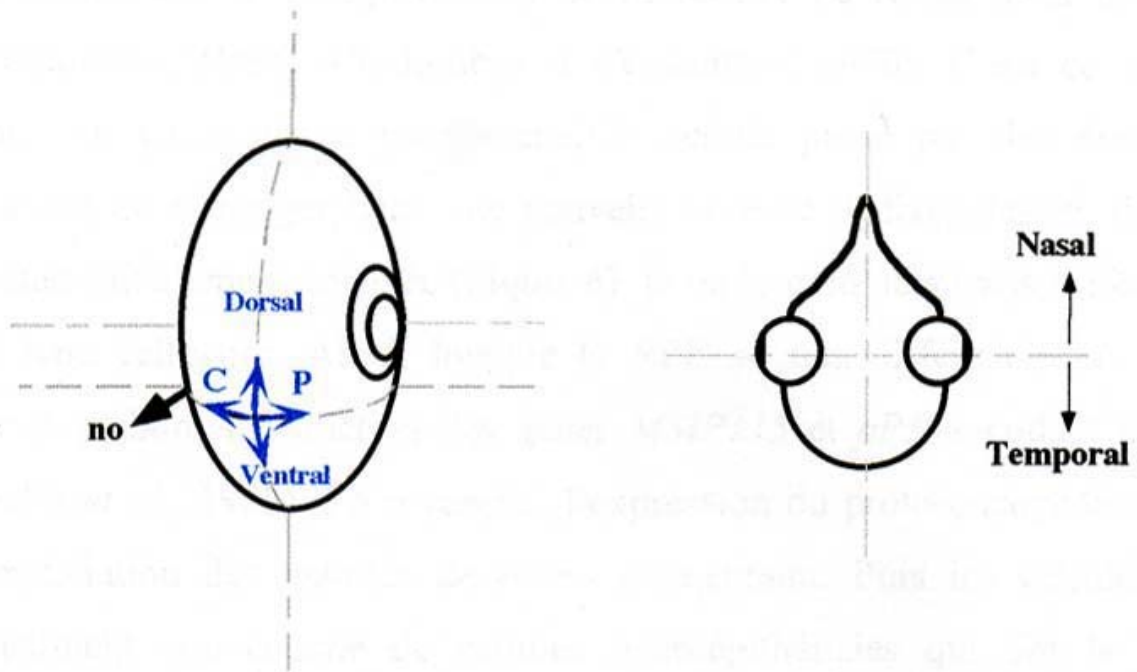


Figure 4 : Repères spatiaux lors de la neurogenèse de la rétine de poulet.
no : nerf optique ; C: central; P: postérieur (d'après Prada *et al.*,1991).

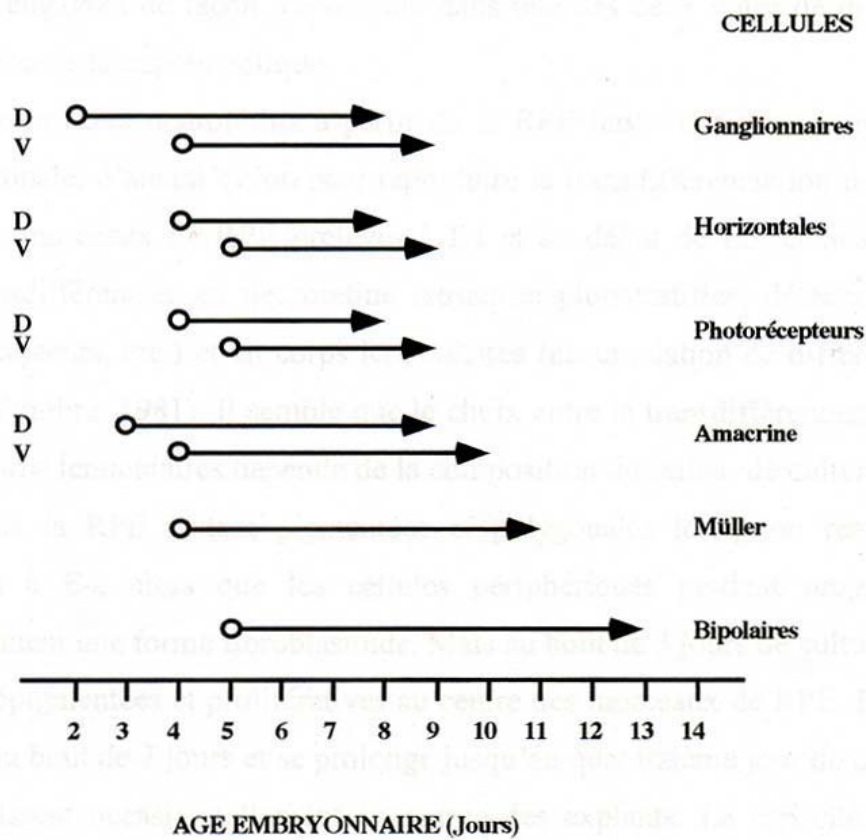


Figure 5 : Les étapes de la différenciation des différents types cellulaires de la rétine de poulet. D : Dorsal ; V : Ventral (d'après Prada *et al.*,1991).

diriger la synthèse de récepteurs de surface ou des éléments des cascades de transduction du signal. De plus, des facteurs de transcription répondent aux cascades de transduction pour permettre à la différenciation de commencer. Le plus souvent, ces cascades de transduction conduisent à des modifications des facteurs de transcription par phosphorylation, qui auront des conséquences multiples en terme d'association avec d'autres facteurs, de stabilisation ou de déstabilisation (par l'envoi vers le protéasome), voir de migration nucléocytoplasmique du facteur ainsi phosphorylé. Les états de compétence sont transitoires, et lorsqu'une cellule passe d'un état à un autre, elle ne peut revenir en arrière. La transition d'un état à un autre pourrait être due à des facteurs extérieurs ou à un programme intrinsèque. Un même état de compétence pourrait donner, en fonction de l'environnement, un ou plusieurs types cellulaires.

5. Le développement du cristallin

Pendant son développement en cristallin, la placode cristalline s'invagine et s'arrondit pour former la vésicule du cristallin. Après s'être fermée et décrochée de l'ectoderme cette vésicule touche l'ectoderme qui la recouvre. La vésicule du cristallin induit alors l'ectoderme à former la cornée transparente. La vésicule cristalline est formée d'une cavité délimitée par l'épithélium du cristallin (figure 6A). La différenciation du cristallin en une lentille transparente capable de diriger la lumière sur la rétine comporte des changements dans la structure et la forme des cellules, ainsi que la synthèse de protéines appelées les cristallines. Les cellules de la partie interne de la vésicule s'allongent et, sous l'influence de la rétine neurale, forment les fibres du cristallin (figure 6B, et C). Tandis que les fibres continuent à grandir, elles synthétisent des cristallines qui, finalement, vont remplir la cellule et provoquer l'extrusion de son noyau (figure 6D). Les fibres qui synthétisent les cristallines continuent à croître et remplissent l'espace entre les deux couches de la vésicule du cristallin. Les cellules antérieures de la vésicule constituent un épithélium germinatif, qui continue à se diviser. Ces cellules en division se déplacent vers l'équateur de la vésicule et, quand elles traversent la région équatoriale, elles aussi commencent à s'allonger. Donc, le cristallin contient trois régions : une zone antérieure de cellules épithéliales qui se divisent, une zone équatoriale de cellules qui s'allongent et une zone postérieure et centrale de cellules-fibres (figure 6E). Cet arrangement persiste pendant toute la vie avec formation continue de fibres.

Il existe relativement peu de mutants affectant le développement du cristallin. Il s'agit essentiellement des facteurs de transcription Pax6 (Grindley et al., 1995), c-maf (Ring et al., 2000), Mab21L1, qui serait situé en aval de Pax6 (Yamada et al., 2003), ainsi que de deux facteurs diffusibles, BMP7 (Wawersik et al., 1999) et BMP4 (Furuta and Hogan, 1998) pour

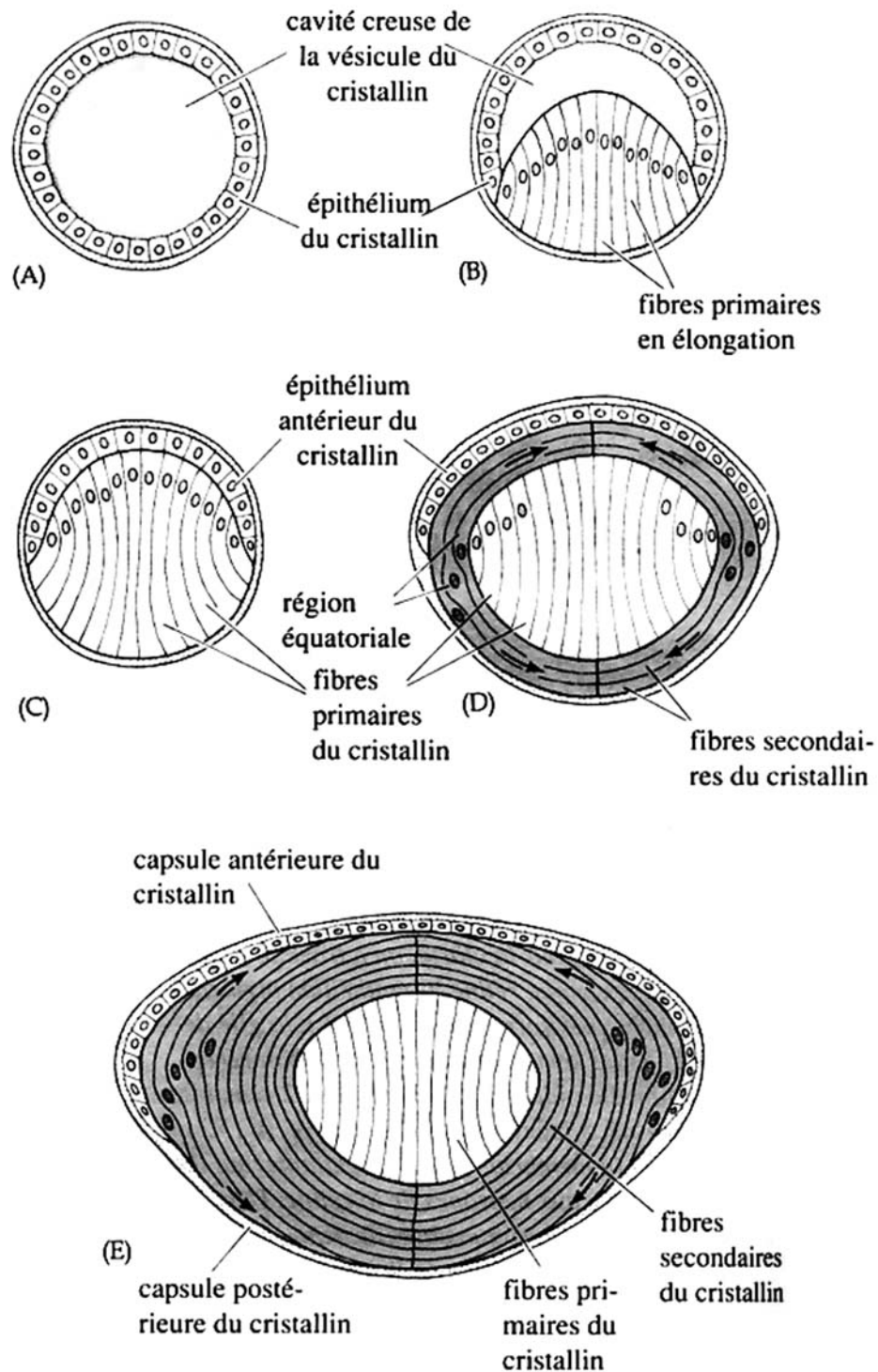


Figure 6: Différenciation du cristallin. Différenciation des cellules du cristallin. (A) Vésicule du cristallin. (B) et (C) Différenciation des fibres primaires du cristallin, élancement des cellules internes formant des fibres du cristallin. (D) Différenciation et élancement des fibres secondaires du cristallin. (E) Au cours de la croissance du cristallin, il y a différenciation de nouvelles fibres et les noyaux dégèrent. (d'après Paton et Craig, 1974)

lesquels l'absence de placode cristalline a été rapportée. Le récepteur BMP de type 2 est présent sur les cellules de la région équatoriale, l'utilisation de récepteurs dominants négatifs des BMP conduit chez les souris transgéniques à un défaut de différenciation des fibres (Faber et al., 2002). A côté des BMP, les membres de la famille des FGF sont également importants pour le développement de la placode cristalline (Faber et al., 2001; Vogel-Hopker et al., 2000) et la différenciation des fibres, en modulant notamment la stabilité du facteur L-maf (Ochi et al., 2003), montrant que les mêmes facteurs diffusibles sont utilisés à des moments distincts pour le développement de la vésicule optique et du cristallin.

Pour focaliser la lumière, le cristallin doit présenter un indice de réfraction plus élevé que le milieu environnant. Cela est atteint par la synthèse des cristallines, qui doivent de plus être très résistantes car ces protéines ne seront pas renouvelées, les cellules fibres ayant perdu leur noyau. De façon étonnante, il est très vite apparu que ces protéines particulières qui peuvent représenter jusqu'à 90% des protéines du cristallin, ne sont en rien spécifiques de celui-ci. De plus, l'analyse des cristallines de différentes espèces ont permis de montrer que de très nombreuses protéines pouvaient jouer ce rôle (Wistow, 1993). Ainsi, il apparaît que le cahier des charges pour qu'une protéine puisse faire une cristalline, est de pouvoir être produite en grande quantité sans s'aggrégér, d'être résistante aux radiations et aux oxydations, et d'être transparente, c'est-à-dire présenter des centres de diffraction inférieurs à la longueur d'onde de la lumière (Delaye and Tardieu, 1983).

Deux types de cristallines existent : les cristallines ubiquistes, présentes chez tous les vertébrés, et des cristallines spécifiques d'espèces.

Les cristallines ubiquistes sont dénommées α , β et γ . La famille α est composée de deux gènes apparentés (αA et αB) dont les produits de 20kD présentent 60% d'identité de séquences. Ces deux gènes produisent à eux seuls 50% du poids sec du cristallin des mammifères. Les αB cristallines sont des petites protéines de choc thermique exerçant une activité chaperonne, qui peut être importante pour la conformation correcte des protéines du cristallin, et la transparence de celui-ci. 7 gènes codent les cristallines β qui forment des hétérodimères, et 6 à 7 autres gènes codent les cristallines γ qui sont monomériques. Les cristallines β et γ sont apparentées entre elles et apparentées à la sphéruline 3a du champignon *Physarum polycephalum*, ainsi que d'autres gènes de la super-famille $\beta\gamma$ non spécifique du cristallin (Rajini et al., 2001). Les protéines de cette super famille ont la particularité de présenter un motif structural particulier, défini grâce à la cristallographie aux rayons X et défini comme « greek-key ». Les cristallines n'ont pas toutes la même répartition dans le cristallin, les cristallines γ étant préférentiellement localisées dans sa région centrale.

Les cristallines spécifiques d'espèces ont en commun d'être, à l'origine, des gènes codant des enzymes. Ces gènes peuvent d'ailleurs être indépendamment recrutés au cours de l'évolution dans des espèces différentes. C'est ainsi que l'aldéhyde déshydrogénase est à la fois la η -cristalline de l'éléphant, et la cristalline oméga de poulpe. De même, la ζ -cristalline de cochon d'inde, qui n'est autre que la quinone réductase est également la cristalline du chameau, lequel n'est pas phylogénétiquement apparenté au cochon d'inde. Ces deux exemples montrent que des gènes codant des enzymes peuvent être recrutés indépendamment au cours de l'évolution pour servir de cristallines. La raison invoquée pour expliquer le grand nombre des cristallines spécifiques d'espèces tient dans la diversité d'indice de réfractons des milieux (eau, air) dans lesquels vivent les animaux, et le cristallin adapte son indice de réfraction à ces différents milieux à l'aide de ces cristallines spécifiques d'espèces (Wistow, 1993).

Comment une enzyme peut-elle être recrutée pour devenir une cristalline ? Un élément de réponse peut être trouvé dans la comparaison des séquences du gène codant la quinone réductase chez le cochon d'inde (cristalline spécifique d'espèce ζ), chez la souris et l'homme où ce gène code exclusivement la quinone réductase. Il apparaît que le premier intron du gène de cochon d'inde possède des éléments de régulation nouveaux, qui font que ce gène peut être exprimé en très grande quantité dans le cristallin par l'intermédiaire des facteurs Pax6 et Maf (Sharon-Friling et al., 1998). Le facteur Pax6, que nous détaillerons plus loin, est essentiel pour la régulation (positive ou négative) de l'expression de nombreux gènes de cristallines. Pax6 est présent dans les cellules cuboïdales de l'épithélium, sur la surface antérieure du cristallin, et la zone proliférative équatoriale. Dans le cristallin embryonnaire, Pax6 est toujours détectable dans le noyau des cellules de fibres post-mitotiques, mais disparaît au moment de leur différenciation (Duncan et al., 1998). Ce facteur active les cristallines αA , αB , $\delta 1$ et ζ mais réprime l'expression de la $\beta B 1$ (Duncan et al., 1998). L'expression de formes tronquées de Pax6 dans le cristallin sous l'influence du promoteur de l' αA cristalline conduit à des cataractes et des anomalies de structure du cristallin, probablement par sa compétition avec le facteur endogène (Duncan et al., 2000a). On sait maintenant que l'expression des cristallines n'est pas restreinte au cristallin. C'est ainsi qu'une étude récente du transcriptome a mis en évidence l'expression de 20 gènes de cristallines dans la neurorétine (Xi et al., 2003). Ce qui est spécifique du cristallin, finalement, c'est la très grande quantité avec laquelle ces protéines y sont produites.

6. Transdifférenciation de la rétine

Le devenir du primordium oculaire n'est pas déterminé d'emblée pour donner la neurorétine et la RPE. Il existe une période au cours de laquelle le devenir de ces deux tissus peut

être reversé. Il est en effet possible de régénérer la neurorétine à partir de la rétine pigmentaire *in vivo*, après extirpation de la neurorétine et réimplantation de morceaux de rétine dans la cavité de l'œil (Coulombre and Coulombre, 1965) (Coulombre and Coulombre, 1970). C'est ce qu'on appelle la transdifférenciation. Au cours de ce phénomène, la cellule passe par des états successifs de dédifférenciation avant de s'engager dans une nouvelle voie de différenciation, distincte de celle dans laquelle elle était initialement engagée (figure 7). D'où le nom de transdifférenciation. Il y a changement de type cellulaire. Ainsi, lorsque la RPE se transdifférencie en neurorétine par exemple, on observe d'abord l'extinction des gènes MMP115 et pP344 codant des protéines de pigmentation (Mochii et al., 1988). En revanche, l'expression du proto-oncogène *c-myc* augmente lors de la dédifférenciation des cellules de rétine pigmentaire. Puis les cellules dépigmentées prolifèrent et constituent une couche de cellules neuroépithéliales qui ont la capacité de se différencier en structure neurorétinienne stratifiée contenant des photorécepteurs. Notons que dans les expériences de Coulombre et Coulombre, la polarité de la neurorétine engendrée par transdifférenciation est inversée.

La régénération de la neurorétine à partir de la RPE ouvre des perspectives d'étude de la différenciation neuronale, d'autant qu'on peut reproduire la transdifférenciation de la RPE *in vitro*. Chez le poulet, des morceaux de RPE prélevés à E4 et au début de E5, et mis en culture, sont capables de se transdifférencier en neurorétine (structure pluristratifiée, détection de cellules de Müller, de photorécepteurs, etc.) et en corps lenticulaires (accumulation de différentes cristallines) (Tsunematu and Coulombre, 1981). Il semble que le choix entre la transdifférenciation de la RPE en neurorétine ou en corps lenticulaires dépende de la composition du milieu de culture. Les cellules de la partie centrale de la RPE restent pigmentées et polygonales lorsqu'on réalise des cultures d'explants prélevés à E4, alors que les cellules périphériques perdent progressivement leur pigmentation et prennent une forme fibroblastoïde. Mais au bout de 3 jours de culture, il apparaît des foyers de cellules dépigmentées et prolifératives au centre des morceaux de RPE. La différenciation neuronale apparaît au bout de 7 jours et se prolonge jusqu'au quatorzième jour de culture. Des corps lenticulaires apparaissent occasionnellement en marge des explants. La capacité de la RPE à se transdifférencier en neurones diminue brutalement au cours du 5^{ème} jour de développement, mais on peut encore déceler de la transdifférenciation cristalline à partir d'embryons donneurs à E5, 8, 9, 10, 11, 15 et même à partir d'un poulet de un an. Notons que la RPE de fœtus humain de trois mois est également capable de former des corps lenticulaires en culture.

En culture, la neurorétine est, elle aussi, capable de transdifférenciation en cellules pigmentées et en corps lenticulaires. Lorsque l'on dissocie des cellules de neurorétine d'oiseau à

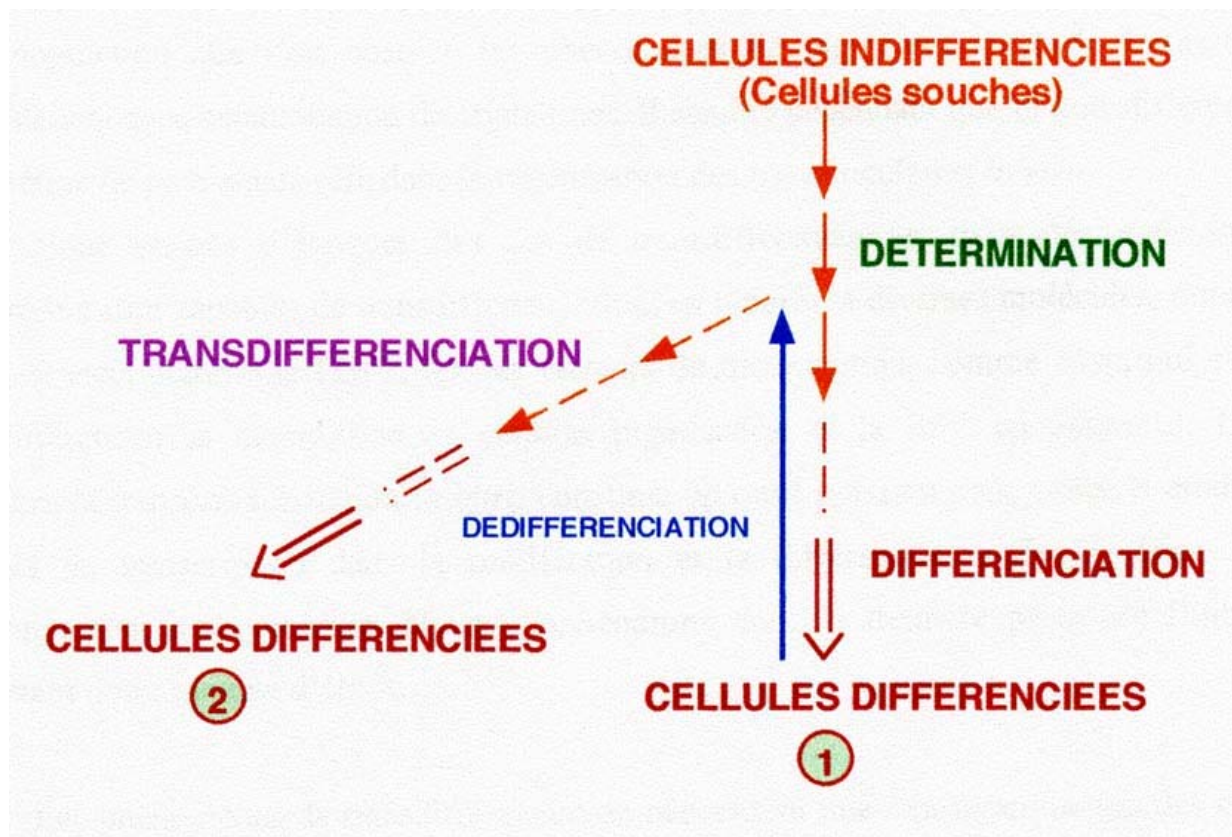


Figure 7 : Les étapes de la transdifférenciation.

E8/E9, on observe un tapis de cellules épithéliales recouvertes d'agrégats de cellules rondes connectées entre elles par ce qui pourraient être des axones, ces cellules correspondant très certainement aux neurones de la neurorétine. Au cours des passages, ces petites cellules rondes disparaissent, phénomène corrélé à la chute d'expression de marqueurs neuronaux comme la choline-acétyltransférase, l'acide glutamique-décarboxylase, etc. Apparaissent alors des petites cellules épithéliales. C'est au sein de cette population que l'on observe les phénomènes de pigmentation et de formation de corps lenticulaires, avec accumulation de cristallines.

Nous venons d'évoquer des cas de transdifférenciation spontanée (provoquée par l'environnement du tissu *in vivo* ou *in vitro*) mais la RPE et la neurorétine sont capables de transdifférenciation, en réponse à diverses molécules définies, dont des facteurs de croissance, comme le FGF2, ou des facteurs de transcription, comme Myc, qui est capable de transdifférencier la neurorétine en cellules pigmentées, et la RPE en neurones (Martin et al., 1992) (Plaza et al., 1999a). La possibilité d'induire la transdifférenciation *in vitro* constitue un outil puissant pour isoler et étudier le rôle de facteurs de transcription dans la prolifération et la différenciation de la rétine au cours du développement embryonnaire.

II. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET LA MORPHOGENESE OCULAIRE

1. Les facteurs de transcription : présentation

La transcription de l'ADN en ARN nécessite un complexe protéique contenant une ARN polymérase. Mais pour que ce complexe puisse accéder à l'ADN, il faut que la zone cible soit accessible. Cela dépend de l'état de compaction de l'ADN autour des histones du nucléosome (Wolffe, 1994). Deux contingents d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) forment le cœur du nucléosome, unité de base autour de laquelle s'enroule l'ADN (Figure 8). Les lysines de la portion aminoterminal de ces histones sont modifiées par des activités enzymatiques (phosphorylation, méthylation et acétylation), qui modulent le repliement de l'extrémité aminoterminal des histones, conduisant à une chromatine compacte ou décompactée.

L'enroulement de l'ADN autour des histones empêche l'accès à l'ADN des facteurs de transcription. Le degré de compaction de la chromatine dépend essentiellement de l'état d'acétylation des lysines aminoterminal des histones contrôlant ainsi leur charge positive. La désacétylation, conduisant à la compaction de la chromatine, constitue un moyen d'empêcher l'expression des gènes. Ainsi, de nombreux facteurs de transcription interagissent directement avec des protéines à fonction histone-acétylase (pour les activateurs) ou désacétylase (pour les répresseurs).

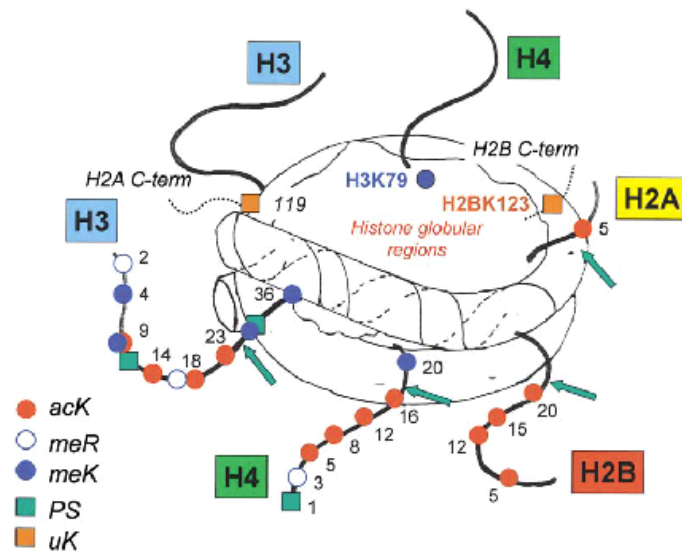


Figure 8 : Structure du nucléosome et modifications post-traductionnelles des histones. Représentation schématique du nucléosome: les queues amino-terminales de 6 des 8 histones formant le nucléosome sont représentées, ainsi que les queues carboxy-terminales de 2 des 8 histones (lignes en pointillé). Les sites de modifications post-traductionnelles sont représentés par les carrés et ronds colorés et sont définis par la légende en bas à gauche. (acK: lysine acétylée; meR: arginine méthyliée; meK: lysine méthyliée; PS: sérine phosphoryliée; uK: lysine ubiquitiniliée) Les numéros des résidus modifiés sont indiqués.

On distingue deux grandes classes de facteurs de transcription : les facteurs de transcription généraux et les facteurs de transcription spécifiques. Les facteurs généraux participent à la transcription de base des gènes. Ils sont en nombre restreint et d'expression ubiquiste. Les facteurs de transcription spécifiques, en revanche, sont très nombreux mais ont le plus souvent une expression restreinte à quelques types cellulaires, et gouvernent la transcription d'un nombre limité de gènes. Ils sont responsables de l'expression « tissu-spécifique » de leurs gènes cibles, en régulant positivement ou négativement leur transcription de base. Ils se fixent sur des séquences de reconnaissance qui leur sont propres, situées dans les promoteurs des gènes, et/ou dans des éléments régulateurs appelés « enhancer », quand il y a activation de la transcription, et « silencer », quand il y a répression. Ces séquences peuvent être situées très loin en amont ou en aval du site de démarrage de la transcription, à des centaines, voire des milliers de bases. Les interactions avec le complexe de base de transcription sont dans ce cas permises par la courbure de l'ADN, suite à la compaction autour des nucléosomes et des repliements de la chromatine (Figure 9). Parfois, un intermédiaire établit un pontage entre les facteurs spécifiques et la machinerie transcriptionnelle de base. Ce peut être le cofacteur ubiquiste CBP ou une protéine très proche appelée p300 (Figure 10B). CBP/p300 fixent un grand nombre de facteurs (Figure 10A). De plus, ils possèdent une activité histone acétyltransférase (HAT), corrélée à leur activité positive sur la transcription.

Les facteurs de transcription contiennent plusieurs domaines fonctionnels, qui parfois se chevauchent. On peut trouver un ou plusieurs domaines de fixation à l'ADN, flanqué(s) d'un ou plusieurs domaines de transactivation, quoique certains facteurs de transcription ne possèdent pas de domaine de fixation à l'ADN ; ce qui souligne l'importance des interactions protéines-protéines dans la transcription. Les domaines d'interactions protéiques d'un facteur de transcription sont parfois aussi importants que le domaine de liaison à l'ADN pour la spécificité d'action du facteur en question. Le domaine de fixation à l'ADN peut lui-même servir aux interactions protéiques. Parfois, il peut exister un domaine répresseur seul (comme dans *Engrailed* (Han and Manley, 1993; Jaynes and O'Farrell, 1991)) ou co-existant avec un domaine activateur (comme dans *Ets1* (Schneikert et al., 1992)). De nombreuses protéines se fixent à l'ADN sous forme d'homo- ou d'hétérodimères. Dans ce cas, on trouve associé au domaine de fixation à l'ADN, un domaine de dimérisation. La façon la plus pratique de classer les facteurs de transcription est de les regrouper en fonction de la structure de leur domaine de liaison à l'ADN. On distingue ainsi plusieurs grands ensembles de facteurs, regroupés en familles, sur la base d'homologies de séquence. Nous allons nous intéresser à des facteurs porteurs d'un domaine de type HTH, b-HLH (LZ), b-LZ ou de doigt de zinc.

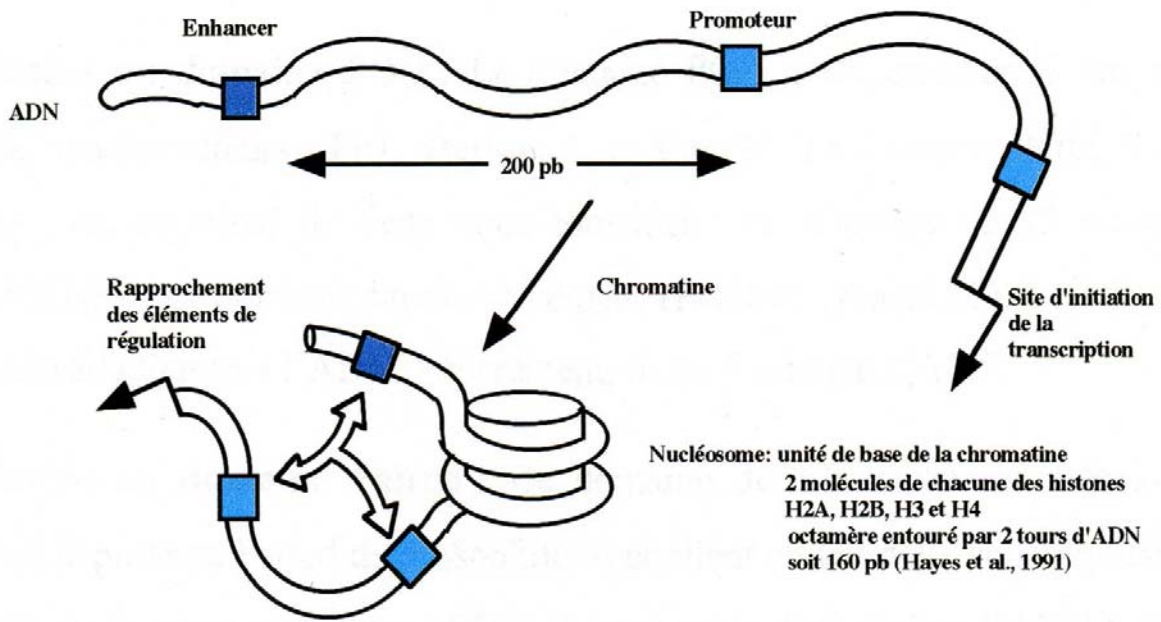


Figure 9 : Enroulement de l'ADN autour des nucléosomes. (d'après Wolffe, 1994)

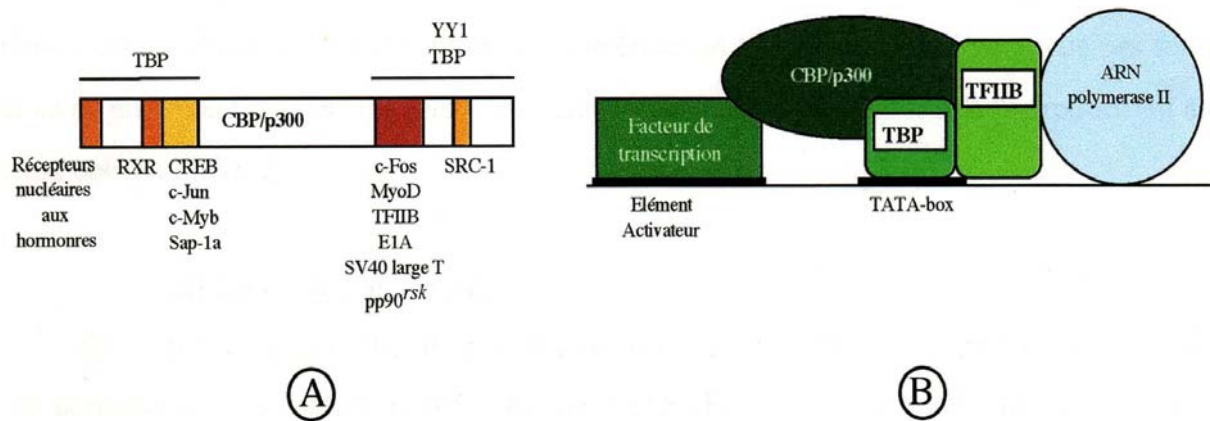


Figure 10 : Structure et fonction de CBP/p300. CBP/p300 peut interagir avec de nombreux facteurs de transcription spécifiques (A) et avec le machinerie transcriptionnelle de base (B). (d'après Janknecht et Hunter, 1996)

2. Le domaine HTH

Le prototype de l'homéodomaine est composé de 60 acides aminés et reconnaît sur l'ADN cible, un motif consensus TAAT, flanqué de séquences adjacentes qui déterminent la spécificité de reconnaissance pour chaque facteur. La fixation à l'ADN est assurée par deux hélices de 8 à 10 acides aminés séparées par un coude β de 3 acides aminés. Le tout est stabilisé par une troisième hélice. Certains facteurs à domaine HTH se fixent sous forme de dimères au niveau de séquences palindromiques, chaque monomère reconnaissant un demi-site. Chez les eucaryotes, de nombreux gènes de segmentation possèdent un tel domaine de fixation à l'ADN. On peut citer par exemple les complexes *Antennapedia*, qui spécifie la partie antérieure de l'embryon, et *Bithorax*, qui en détermine la partie postérieure. Ces gènes constituent le complexe Hom-C (Homeotic Complex) dont l'équivalent vertébré est le complexe Hox. Le domaine homéo est particulièrement bien conservé au cours de l'évolution. On trouve parfois dans les facteurs à homéodomaine, un deuxième domaine de fixation à l'ADN :

◆ **Association au domaine POU :** Le domaine POU a été caractérisé lors de la découverte simultanée de quatre facteurs : **Pit1**, **Oct1** et **2**, et **Unc 86**. Le domaine POU, long de 150 à 160 acides aminés, est constitué de deux sous-domaines : un domaine de 75 acides aminés POU-spécifique (POUs) et un domaine homéo divergent (POU_{HD}) (Figure 11). Les deux sous-domaines sont nécessaires à la liaison à l'ADN. Séparément, ils ne fixent pas l'ADN.

◆ **Association au domaine Paired :** Ce domaine de 128 acides aminés a initialement été découvert dans la protéine Paired de drosophile. Il contient en fait deux sous-domaines de type HTH (Jun, 1996). Contrairement au domaine POU, il est capable de se fixer à l'ADN indépendamment de l'homéodomaine. On le retrouve dans d'autres protéines de drosophile comme Eyeless.

◆ **Association au domaine Lim :** Le domaine LIM de 60 acides aminés dénommé d'après les protéines à homéodomaine **Lin11**, **Isl-1** et **Mec3**. Il s'agit d'un domaine à doigt de Zinc, incapable de se lier à l'ADN et qui constitue un motif d'interaction protéique. Ce motif est notamment présent dans la protéine à homéodomaine **Lxh2**, indispensable pour la formation des yeux et la spécification du territoire oculaire (Bach, 2000) (Zuber et al., 2003).

3. Le domaine basique b-HLH

Le domaine b-HLH associe un domaine basique de liaison à l'ADN (domaine b),

reconnaissant une boîte E (CANNTG), à un domaine de dimérisation constitué de deux hélices amphipathiques de 8 à 24 résidus, séparées par une boucle de 8 acides aminés (HLH pour Helix-Loop-Helix) (Figure 11). Ce motif a d'abord été décrit dans les protéines E12 et E47 qui interviennent dans le développement des muscles. On trouve parfois associée au b-HLH, une crémaillère à leucines qui vient renforcer la dimérisation (LZ) (Myc et Mitf par exemple). La crémaillère à leucines forme une hélice α présentant une leucine tous les 7 acides aminés. 4 à 5 résidus leucine se retrouvent ainsi du même côté de l'hélice.

4. Le domaine b-LZ

Ce domaine est constitué d'un domaine de fixation à l'ADN de type basique, indissociable d'un domaine de dimérisation de type Leucine-Zipper (Figure 11). De nombreux facteurs présentent un tel domaine. On peut citer les oncoprotéines Jun et Fos, du complexe AP-1 (Activator Protein-1), ou encore CREB (c-AMP Responsive Element Binding Protein).

5. Le doigt de Zinc

Initialement cette structure a été proposée comme domaine de fixation à l'ADN pour TFEIIIA, le premier facteur de transcription général caractérisé chez les eucaryotes. Il fait partie du complexe d'initiation entourant l'ARN polymérase III. Il contient dans sa séquence peptidique, un motif répété de 30 acides aminés, dont le repliement de chaque répétition permet la chélation d'un atome de Zinc (Miller, 1985). La structure ainsi formée autour de l'atome de Zinc constitue un doigt qui contacte l'ADN. De nombreuses protéines possèdent un tel domaine de fixation à l'ADN. On les a regroupées en trois classes sur la base de la séquence du doigt de zinc :

- ◆ **Classe I (ou C₂H₂)** : Au sein de cette famille, le Zinc est chélaté par 2 cystéines et 2 histidines. Le nombre de doigts de zinc varie en fonction des facteurs de transcription ; en général, il y en a entre deux et quatre, parfois plus. La fixation à l'ADN se fait sous forme de monomère.

- ◆ **Classe II (ou C₄)** : Ici, ce sont 4 cystéines qui chélatent le Zinc. La structure est constituée de deux modules (Figure 11). Ce motif reconnaît la séquence HRE (Hormone Responsive Element) sur l'ADN. On compte parmi ce type de facteurs, les récepteurs aux hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes, ainsi que les récepteurs à l'acide rétinoïque.

- ◆ **Classe III (ou C₆)** : Cette fois, l'atome de Zinc est contacté par 6 cystéines. Cette structure

Type de domaine

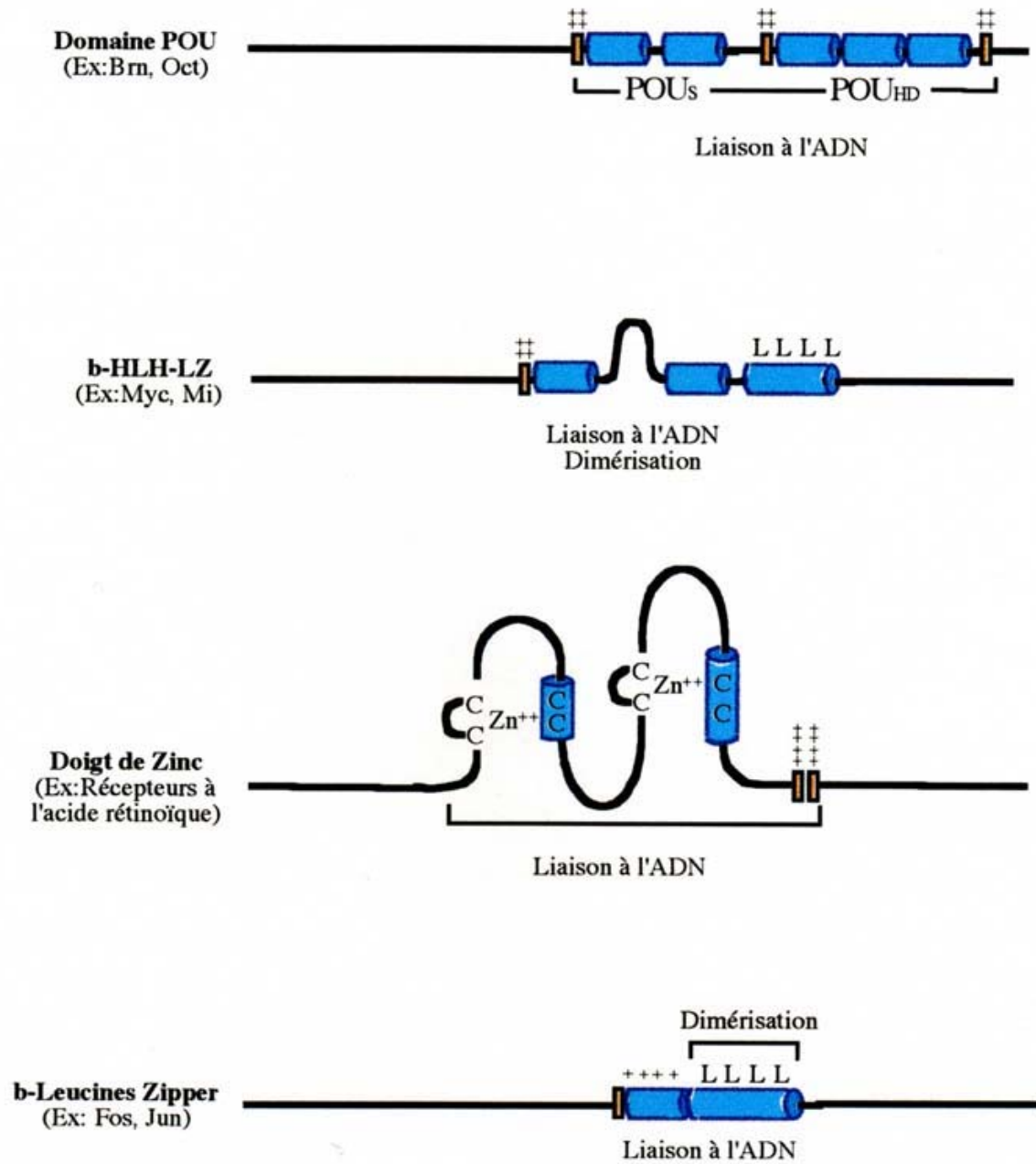


Figure 11 : Quelques types de domaines de fixation à l'ADN.
 Les petits rectangles surmontés de + représentent des domaines Chargés. C : Cystéine ; L : Leucine. (d'après He et Rosenfeld, 1991)

caractérise de nombreux facteurs de levure, comme GAL4. Cette structure caractérise également le domaine LIM qui peut être présent dans des protéines à homéodomaine, dans des kinases ou sous forme de motifs répétés au sein d'une protéine (Bach, 2000).

Les analyses de mutants chez les organismes invertébrés, ont beaucoup apporté à la compréhension du développement du système nerveux. La drosophile et *Caenorhabditis. elegans* ont permis d'identifier beaucoup de facteurs de transcription impliqués dans la neurogenèse, et d'établir les cascades et les connexions qui existent entre les différents facteurs. Bien que la structure de l'œil puisse être très différente chez les invertébrés et les vertébrés, le contrôle génétique de leur morphogenèse met en jeu les mêmes gènes. Les facteurs importants pour la neurogenèse sont particulièrement bien conservés au cours de l'évolution et se retrouvent chez les vertébrés, souvent dupliqués au sein de familles, comme celles des gènes *Pax* ou celles des gènes *Six* par exemple. Nous allons présenter quelques facteurs de transcription mis en jeu dans le développement de l'œil. Un certain nombre de facteurs importants pour la morphogenèse oculaire sont des facteurs à domaine homéo et à domaines b-HLH. D'une façon générale, les gènes agissant le plus précocement sont plutôt des gènes codant des facteurs à homéodomaine (gènes de détermination) et les gènes plus tardifs, des gènes codant des facteurs à b-HLH (gènes de différenciation). Les premiers spécifient le devenir des territoires tissulaires et les seconds la nature de la différenciation affectant les cellules dans ces territoires.

III. LE GENE *Pax6*

1. La famille Pax

Chez les mammifères, la famille des gènes *pax*, pour **Paired Box**, est composée de neuf membres qui sont des facteurs de transcription ayant en commun un domaine de fixation à l'ADN la boîte paired. Ils sont regroupés en quatre sous-familles en fonction de leurs homologies (tableau 1). A l'exception de Pax4 et Pax6, les autres membres possèdent une séquence octapeptidique impliquée dans la dimérisation. Pax1 et Pax9 ne possèdent pas d'homéodomaine du tout et Pax2/5/8 possèdent seulement un homéodomaine partiel.

Les gènes *pax* jouent des rôles importants au cours du développement et plus particulièrement dans le système nerveux. En effet, exception faite de *pax1* et *pax9*, tous les membres de la famille jouent un rôle dans le développement du système nerveux central, mais sont aussi souvent impliqués dans le développement d'autres organes. C'est le cas de *pax6* qui est exprimé dans le tube neural et le pancréas endocrine (Turque et al., 1994). C'est le premier

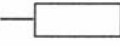












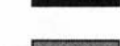

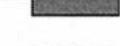







GENE	CHROMOSOME		STRUCTURE			CLASSE
	Souris	Humain	Prd	OCT	HD	
Pax-1	2	20p11				I
Pax-2	19	10q25				III
Pax-3	1	2q35				II
Pax-4	6	7q22-qter				IV
Pax-5	4	9p13				III
Pax-6	2	11p13				IV
Pax-7	4	11p36.2				II
Pax-8	2	2q12-q14				III
Pax-9	12	14q12-q13				I

Tableau 1 : Classification des gènes *pax*. La famille a été divisée en 4 classes en fonction de la structure des gènes (boîtes Prd de même couleur par classe). Prd : domaine paired ; OCT : octapeptide ; HD : homéodomaine. (d'après Gruss et Walther, 1992)

membre de la famille à être exprimé dans le cerveau au cours du développement. On le retrouve dans les futurs télencéphale et diencéphale, dans les ébauches des futures cupules optiques (Walther and Gruss, 1991). Plus tard, son expression dans l'œil s'étendra de la RPE à la neurorétine (Plaza et al., 1995b), au cristallin (Grindley et al., 1995) et à la cornée (Plaza et al., 1995b).

2. *pax6*, un gène maître du développement de l'œil

Le gène *pax6* joue un rôle essentiel au cours du développement de l'œil. En fait, plusieurs observations ont fait de *pax6* un « master gene » du développement de l'œil. Chez la drosophile, des mutations dans *eyeless*, l'orthologue de *pax6*, empêche la formation des yeux (Quiring et al., 1994). L'expression ectopique de *eyeless* dans des cellules de disques imaginaux autres que le disque oeil-antenne, qui est le disque où normalement *eyeless* s'exprime, conduit à la formation d'yeux ectopiques à la place de l'organe normal (Halder et al., 1995); ceci montre que *eyeless* est capable d'induire la cascade des gènes nécessaires à la morphogenèse de l'œil et de changer le devenir du tissu primitif, ce qui suppose la capacité de réprimer les gènes de détermination précédemment exprimés. De la même façon, chez les vertébrés et en particulier chez le xénope, la surexpression de *pax6* peut induire des yeux ectopiques (Chow et al., 1999). De plus, les mutants *Small eye*, affectés dans ce gène, présentent des petits yeux à l'état hétérozygote et sont dépourvus d'yeux à l'état homozygote. Chez l'homme, de nombreuses mutations dans *pax6* sont à l'origine de l'aniridie (malformation oculaire affectant plus ou moins sévèrement l'iris) et l'anomalie de Peter (présence d'adhérence entre le cristallin et la cornée). Les anomalies observées sont causées par la perte de fonction d'un des deux allèles, les mutations étant létales à l'état homozygote. Mais chez la souris, la surexpression de *pax6* par transgénèse induit aussi un phénotype de microphthalmie. En fonction du nombre de copies intégrées du transgène, on peut observer une microphthalmie sévère dans un fond génétique normal (Schedl et al., 1996). Toutes ces données montrent à quel point le juste dosage de la protéine est nécessaire à la morphogenèse oculaire. Un déséquilibre provoqué par une sous-expression ou une surexpression conduit à des malformations.

pax6 est retrouvé dans toutes les espèces à partir des cnidaires. *pax6* pourrait constituer avec le gène de la rhodopsine, les deux gènes essentiels à la genèse d'un oeil ancestral commun, constitué d'une cellule pigmentée et d'un photorécepteur (pour revue : (Gehring and Ikeo, 1999)). Chez la drosophile, il existe un autre orthologue de *pax6*, appelé twin of eyeless (*toy*), apparu par duplication au cours de l'évolution des insectes. Chez le poisson zèbre aussi, *pax6* est

dupliqué en deux gènes très proches, *pax6.1* et *pax6.2*, aux domaines d'expression chevauchants, suggérant qu'il existe un partage des tâches entre ces deux gènes pour le développement du cerveau et de l'œil (Nornes et al., 1998). On ne retrouve pas *pax6.2* chez les vertébrés supérieurs comme le poulet, la souris et l'homme. Le(s) gène(s) *pax6* de différentes espèces (ascidie, calamar, souris, poisson zébre et homme) peuvent induire des yeux ectopiques chez la drosophile, ce qui souligne la conservation de sa fonction depuis les invertébrés jusqu'aux vertébrés (Gehring, 1996; Glardon et al., 1997; Nornes et al., 1998; Tomarev et al., 1997).

De façon tout à fait intéressante, certaines séquences de régulation de *pax6* ont également été conservées entre la drosophile, la souris, la caille et l'homme (Plaza et al., 1995b; Quiring et al., 1994) (Plaza et al., 1995a) (Xu et al., 1999) (Plaza et al., 1999c). Certains éléments régulateurs sont même interchangeables entre la drosophile et la souris (Xu et al., 1999). Chez les vertébrés, Pax6 est capable d'autoréguler positivement sa propre expression, en se fixant directement sur ses promoteurs (Plaza et al., 1993). Chez la drosophile, *twins of eyeless* agit en amont de *eyeless* lors de la morphogénèse de l'œil, en se fixant sur un enhancer de *eyeless* pour l'activer (Czerny et al., 1999). Cette observation souligne un aspect intéressant de l'évolution des schémas morphogénétiques : chez les vertébrés, Pax6 s'autorégule positivement alors que chez la drosophile, après duplication du gène, la boucle autocatalytique s'est transformée en boucle hétérocatalytique dans laquelle des paralogues se régulent, intercalant *eyeless* en aval de *toy* dans le schéma développemental. D'une manière générale, l'intercalation de gènes par duplication et divergence, pourrait expliquer en partie l'évolution de la morphogénèse de l'œil à partir d'un ancêtre commun. Un deuxième moyen serait le recrutement de nouveaux gènes dans la voie morphogénétique, gènes qui se retrouveraient alors placés en aval de séquences de régulations œil-spécifiques. De nombreux exemples de ce genre ont été décrits pour les cristallines qui sont des protéines qui ont souvent une toute autre fonction ailleurs dans l'organisme (pour revue : (Piatigorsky and Wistow, 1989)). Enfin, une troisième façon de faire évoluer les yeux peut reposer sur l'existence d'isoformes protéiques spécifiques d'espèce. Ainsi, pour Pax6, l'exon inséré par épissage alternatif dans la portion amino-terminale du domaine paired, formant ainsi la p48, n'existe pas chez les invertébrés. La fonction de la p48 chez les invertébrés est prise en charge par un autre gène: *eyegone* (Dominguez et al., 2004).

Chez la drosophile, *Toy* n'est pas le seul facteur à activer la transcription de *eyeless*. *Eyes-absent* (*Eya*), *Sine-oculis* (*So*) et *Dachshund* (*Dac*) peuvent également l'activer (Bonini et al., 1997) (Chen et al., 1997a) (Pignoni et al., 1997) (Shen and Mardon, 1997). Ces trois gènes interviennent dans le développement très précoce de l'œil. Ils sont capables d'induire des yeux ectopiques et des mutations « perte de fonction » dans ces gènes conduisent à une absence totale

d'œil (Mardon et al., 1994) (Bonini et al., 1993) (Cheyette et al., 1994) (Halder et al., 1998). *Eya* est dépourvu de domaine de fixation à l'ADN mais contient un nouveau type de domaine d'interaction protéique. *Eya* fait partie d'un complexe de régulation incluant *So*, qu'il contacte au niveau de son domaine *Six* (Pignoni et al., 1997). *So* est le prototype d'une famille de facteurs de transcription à homéodomaine, appelés *Six*. *Dachshund* code une protéine nucléaire exprimée très précocement, et nécessaire à l'initiation de la morphogenèse de l'œil. Ces trois gènes, *eya*, *so* et *dac*, font partie de la boucle hétérocatalytique positive de *eyeless*, bien que leur expression initiale nécessite *eyeless*. Ainsi *eyeless* n'est pas simplement l'initiateur d'une cascade d'activation linéaire de gènes lors de la formation de l'œil, mais fait partie, avec *toy*, *eya*, *so*, *dac* et bien d'autres encore, d'un réseau complexe et enchevêtré de régulation (Figure 12). Des orthologues et paralogues de *eya*, *so* et *dac* ont été isolés chez les vertébrés, suggérant que ces gènes soient impliqués dans les mêmes types de réseaux de régulation au cours de la mise en place de l'œil (Bonini et al., 1997). De fait, chez le xénope, un réseau de facteurs de transcription incluant différents orthologues et paralogues des gènes décrits chez la drosophile, exprimés selon un profil d'expression dynamique et recouvrant, semble responsable de la spécification progressive du territoire oculaire et de la capacité à induire des yeux ectopiques à haute fréquence en cas d'expression simultanée (Zuber et al., 2003).

3. Les gènes cibles de Pax6

La définition des gènes cibles de Pax6 est actuellement en cours. Un gène aussi important pour le développement des yeux doit activer et/ou réprimer une grande quantité de gènes. Les différentes familles de gènes cibles de Pax6 incluent les facteurs de transcription, qui vont avoir un rôle de différenciation en aval de Pax6, des protéines impliquées dans les contacts intercellulaires, des protéases également impliquées dans les remodelages tissulaires, des protéines sécrétées régulatrices de l'activité des facteurs de croissance et des protéines résultant de la différenciation comme les kératines ou les cristallines. Des études récentes de protéomique ont conduit à définir un ensemble de gènes contrôlés par Pax6 (508 sur les 9700 analysés), sans que l'on sache si ce contrôle est direct ou indirect (Chauhan et al., 2002).

-Pax6 contrôle sa propre expression (Plaza et al., 1993; Plaza et al., 1995b) ainsi que celle de certains facteurs de transcription qui peuvent relayer son activité biologique. C'est le cas de *c-maf* (Sakai et al., 2001), des gènes bHLH : *Mash1*, *Math5* et *neurogenine 2* (Marquardt et al., 2001) (Scardigli et al., 2003), gènes de différenciation essentiels pour le devenir des neuroblastes rétiniens (Marquardt, 2003). L'expression de *Six3* et *Prox1* disparaît dans la placode cristalline des souris présentant une délétion spécifique de Pax6 dans cette structure, mais on

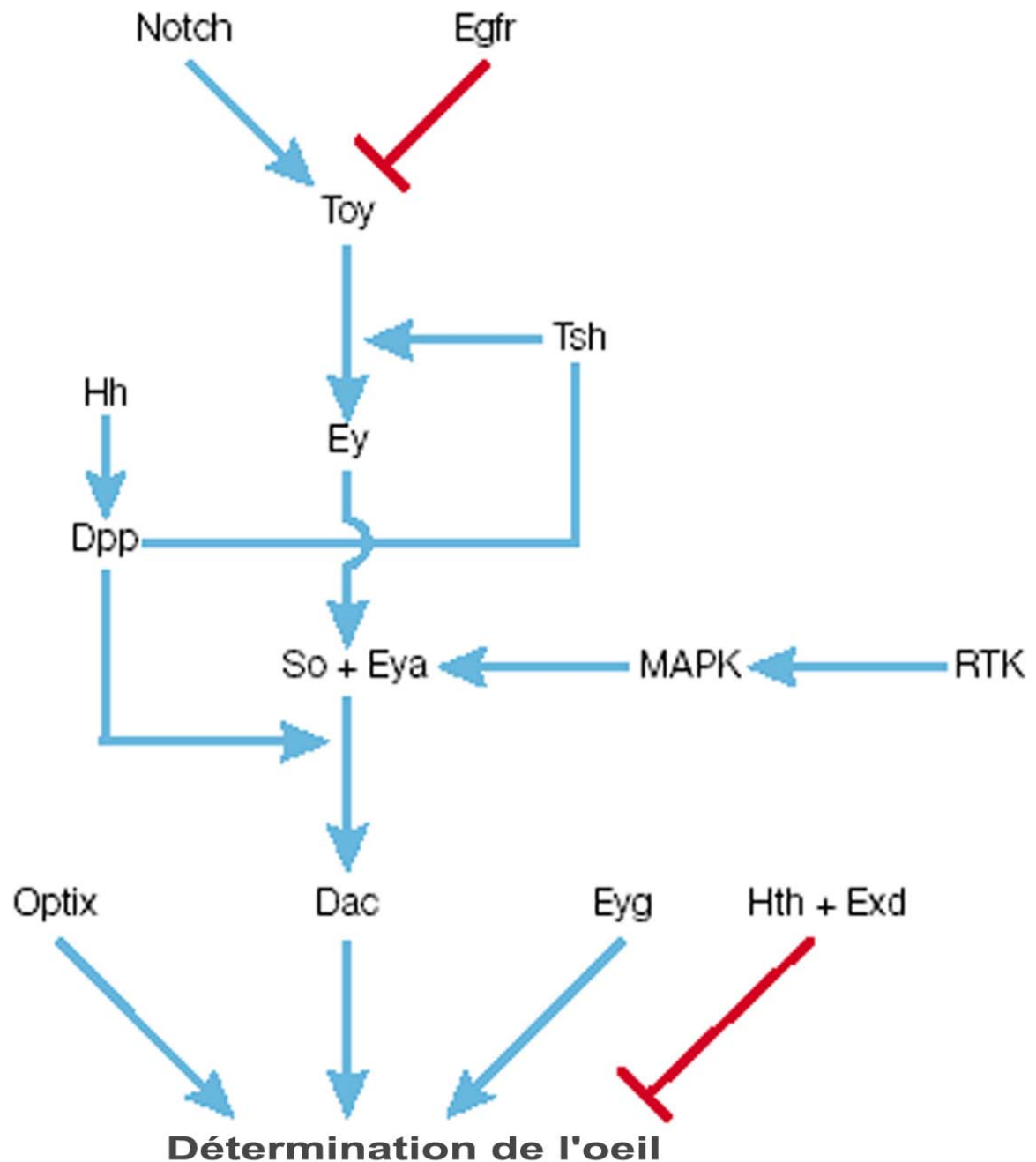


Figure 12 : Schéma du contrôle génétique de la régulation des gènes de détermination de l'œil de drosophile. Un certain nombre de protéines nucléaires, comprenant des facteurs de transcription et des protéines de cascades de transduction du signal, forme un réseau de régulation complexe requis pour déterminer l'œil de drosophile. Les flèches indiquent la direction des relations génétiques, moléculaires et biochimiques entre les protéines. En bleu: les relations activatrices, en rouges: les relations inhibitrices. **Dac:** Dachshund; **Dpp:** Decapentaplegic; **Egfr:** Epidermal growth factor receptor; **Exd:** Extradenticle; **Ey:** Eyeless; **Eya:** Eyes absent; **Eyg:** Eye gone; **Hh:** Hedgehog; **Hth:** Homothorax; **MAPK:** Mitogen activated protein kinase; **RTK:** Receptor tyrosine kinase; **So:** Sine oculis; **Toy:** Twin of eyeless; **Tsh:** Teashirt. (d'après Kumar, 2001)

ignore si leur régulation par Pax6 est directe ou non (Ashery-Padan et al., 2000).

-La différenciation est en grande partie conditionnée par la signalisation induite par les contacts intercellulaires. Un certain nombre de récepteurs présents à la surface des cellules est engagé dans ces interactions. Parmi ceux-ci, le gène codant la cell-adhesion molecule (CAM) L1, un membre de la superfamille des immunoglobulines impliquée dans les interactions neurone-neurone ou neurone-glie et responsable de la croissance axonale, est contrôlé par Pax6 (Meech et al., 1999). Cette observation a également été faite pour le gène codant une autre protéine de la super famille des immunoglobulines, NCAM (Holst et al., 1997). D'autres récepteurs, de la super famille des cadherines (R-cadherines, cadherine 6 et cadherine 8), voient leur expression fortement réduite en cas de mutation de Pax6 (Simpson and Price, 2002). Une modulation négative de ces récepteurs pourrait notamment rendre compte du fait que dans les expériences d'agrégations les cellules d'embryons de souris sauvages et mutantes pour Pax6 ne se mélangent pas (Simpson and Price, 2002).

-La différenciation tissulaire nécessite le remodelage des contacts cellulaires par l'action de protéases, qui vont couper les récepteurs. Pax6 contrôle l'expression du gène de la gélatinase B (Sivak et al., 2000).

-la signalisation cellulaire est sous la dépendance de facteurs diffusibles secrétés dans l'environnement extracellulaire. Le contrôle de l'expression de ces facteurs, de leurs récepteurs ou des modulateurs de leur activité, va avoir un rôle évident dans la différenciation. Ainsi, Pax6 contrôle l'expression de facteurs impliqués dans la voie Wnt, en contrôlant l'expression d'un leurre du récepteur frizzled (secreted frizzled related protein-2) qui va se complexer au facteur Wnt et en abolir l'activité. Pax6 contrôle également l'expression de Wnt7b (Kim et al., 2001). L'importance de la voie Wnt dans le développement des yeux est démontrée par la capacité de Frizzled 3 (il existe 16 gènes wnt différents et 9 gènes frizzled chez les mammifères) à induire des yeux ectopiques chez le xénope (Rasmussen et al., 2001).

-Parmi les gènes codant des protéines qui marquent l'état différencié des cellules, se trouvent, nous l'avons vu, les cristallines α , δ et ζ dont nous savons que Pax6 active les promoteurs, mais également qu'il inhibe l'expression des cristallines β (Gopal-Srivastava et al., 1996) (Cvekl et al., 1995) (Duncan et al., 1998). Il existe également des gènes codant des protéines du cytosquelette, comme les kératines (Liu et al., 1999), ou encore les gènes codant des enzymes spécifiques des neurones, comme l'aldolase (Skala-Rubinson et al., 2002).

A côté des gènes cibles directs, régulés par fixation du facteur de transcription Pax6 sur leur région de promotion existent également des gènes dont l'activité est modulée (de façon positive ou négative) par interaction physique entre leurs protéines et Pax6. Il s'agit de facteurs

de transcription comme Mitf (Planque et al., 2001b), Maf (Planque et al., 2001a), des protéines à homéodomaine (Mikkola et al., 2001) (Plaza et al., 1997) ou des co-facteurs comme Rb (Cvekl et al., 1999).

4. Les différentes isoformes de Pax6

Les différentes études de *pax6* chez les vertébrés ont permis de caractériser différentes isoformes de Pax6, ainsi que ses promoteurs et différents éléments régulant l'expression de ce gène. La caractérisation du gène *pax6* chez la caille a permis de mettre en évidence des produits d'épissages alternatifs et d'initiation interne (Dozier et al., 1993). En effet, trois ARN messagers différents sont formés par épissage alternatif des exons 4a et 5, ces trois ARNm codent pour les protéines p48, p46 et p43 (figure 13). Ces trois protéines possèdent donc un domaine paired différent (figure 13). De plus, des protéines p33 et p32 dépourvues de domaine paired peuvent être synthétisées à partir de ces trois transcrits par initiation interne (Carriere et al., 1993) (Dozier et al., 1993). Ces protéines dépourvues de domaine paired ont été décrites chez l'espèce *Caenorhabditis elegans*, mais ne sont pas produites par un phénomène d'initiation interne. Il existe en effet un promoteur situé en aval du domaine paired qui produit un ARN messenger capable de coder cette protéine. Dans cette espèce, des mutants de la p46 et des p30 existent avec des modifications phénotypiques distinctes, montrant que les p30 ont bien une fonction in vivo (Zhang and Emmons, 1995). Très récemment, des travaux chez les vertébrés (la souris) ont permis de mettre en évidence un site d'initiation interne de la transcription en aval du domaine paired, dans l'exon 7 (Kleinjan et al., 2004). Ainsi, chez les vertébrés, les protéines dépourvues de domaine paired peuvent être aussi produites à partir d'un ARN messenger spécifique. La forme p46 correspond à la protéine Pax6 capable d'induire des yeux surnuméraires en cas d'expression ectopique. L'exon codant la p48 est identique entre la caille et l'homme (Dozier et al., 1993). Une anomalie particulière du développement des yeux (opacité corticale et postérieure du cristallin) affecte les patients qui présentent un déséquilibre dans le rapport entre la p46 et la p48 à la suite d'une mutation dans le site d'épissage de cet exon alternatif (Epstein et al., 1994). De plus, les souris transgéniques sur-exprimant la p48 dans le cristallin souffrent d'une cataracte liée à la surexpression de l'intégrine $\alpha 5\beta 2$, suggérant que cette isoforme particulière de Pax6 possède un sous ensemble de gènes cibles distinct de celui de la p46, et soit particulièrement importante pour le développement du cristallin (Duncan et al., 2000b). Des souris spécifiquement invalidées pour la p48 présentent une hypoplasie de l'iris ainsi que de discrètes anomalies dans la cornée, le cristallin et la rétine (Singh et al., 2002).

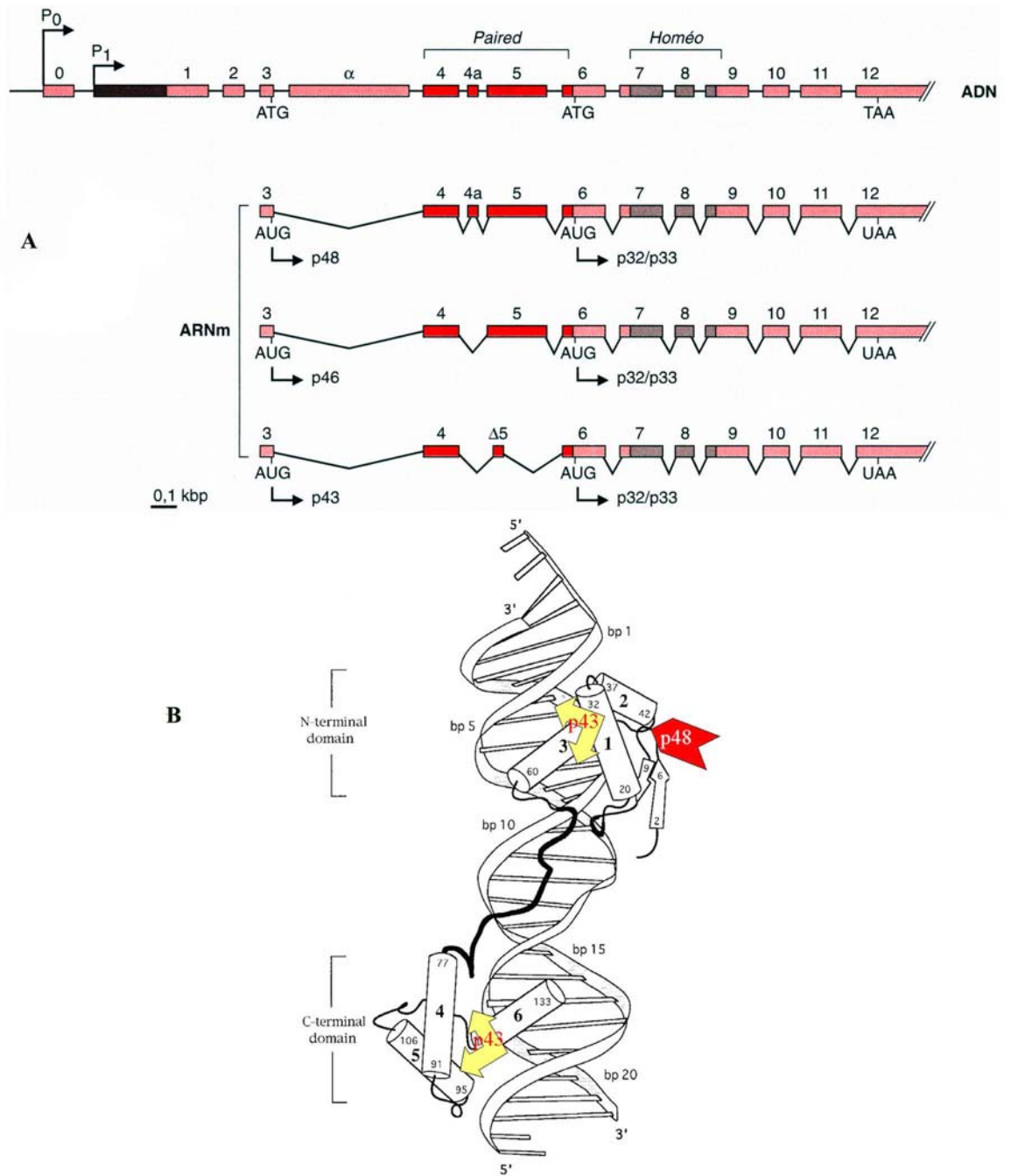


Figure 13 : Schéma des ARNm des différentes isoformes de Pax6. *A*, Représentation des épissages alternatifs du gène *pax6* de caille. Les promoteurs de *pax6* sont localisés devant l'exon 0 pour P0 et l'exon 1 pour P1. *B*, Structure du domaine paired de Pax6. Les cylindres numérotés représentent les Hélices α et les flèches blanches les feuilletts β du domaine paired. Les flèches jaunes indiquent la délétion des hélices 3, 4 et 5 du domaine paired de p43. La flèche rouge indique l'insertion de l'exon 4a formant le domaine paired de p48. (d'après Plaza *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1999)

5. les éléments de régulation de l'expression de *pax6*

Des travaux au sein du laboratoire ont permis de définir deux promoteurs pour le gène *pax6* de caille (Plaza et al., 1993; Plaza et al., 1995b). Ces promoteurs ont été nommés P0 et P1. P0 est le premier à avoir été décrit, il est situé le plus en amont et tous deux sont activés par Pax6. Des expériences de RNase protection conduites avec des sondes permettant de distinguer les messagers initiés à P0 et à P1 montrent qu'à E5 seuls les messagers initiés à P1 sont présents dans la rétine. Ce promoteur voit son activité décliner après éclosion. Les messagers initiés à P0 ne sont détectables qu'après que la différenciation neuronale soit installée dans la rétine, pour décliner également après éclosion (Plaza et al., 1995b). Les transcrits initiés à partir de P1 sont exprimés dans tous les tissus de l'œil, alors que les transcrits initiés à partir de P0 ne sont pas exprimés dans la rétine pigmentaire (Plaza et al., 1995b). Un enhancer de 500bp (enhancer α) situé dans l'intron 4 est actif sur le promoteur P0, mais pas sur le promoteur P1, spécifiquement dans la neurorétine, et pas dans la rétine pigmentaire, ni dans les fibroblastes (Plaza et al., 1995a). La transformation de la rétine pigmentaire par l'oncogène Myc conduit à l'apparition de neurones dans la culture et à la mise en route de P0, suggérant que cet enhancer soit spécifiquement contrôlé par des facteurs présents dans les neurones en cours de différenciation (Plaza et al., 1999a; Plaza et al., 1995b). La combinatoire des facteurs responsables de l'activité de cet enhancer n'est pas connue. Il a toutefois été montré que le facteur à homéodomaine et domaine POU, Brn3b, spécifiquement exprimé dans les cellules ganglionnaires pouvait activer l'enhancer α (Plaza et al., 1999b), suggérant que des facteurs distincts selon le type cellulaire soient capables d'activer cette séquence. Cet "enhancer" particulier se retrouve également dans des ARN messagers dont le promoteur n'a pas été déterminé, et qui pourraient être soit produits par le promoteur P1 (leur profil d'expression étant calqué sur celui de P1) soit produits par initiation interne dans la séquence α . La particularité de ce messenger, est de produire un cadre de lecture ouvert pour coder Pax6 dépourvu de codon d'initiation ATG devant la boîte paired (cet ATG est en effet présent dans l'exon en amont de la séquence α). Ainsi, ce messenger particulier (ARN B1) pourrait ne coder que les protéines dépourvues de domaine paired, les p32/33, avec un très long 5'UTR (Dozier et al., 1993).

La spécificité d'action de l'enhancer α dans la neurorétine a été récemment confirmée *in vivo* par des expériences de transgénèse chez la souris (Kammandel et al., 1999; Marquardt et al., 2001). Ces souris transgéniques exprimant le gène *lacZ* sous le contrôle de l'enhancer α montrent une expression du transgène restreinte à la portion distale de la rétine naso-temporale, ce qui indique que d'autres séquences sont utilisées pour contrôler l'expression de ce gène dans la portion centrale de la rétine. Cet enhancer particulier a été utilisé pour réaliser des

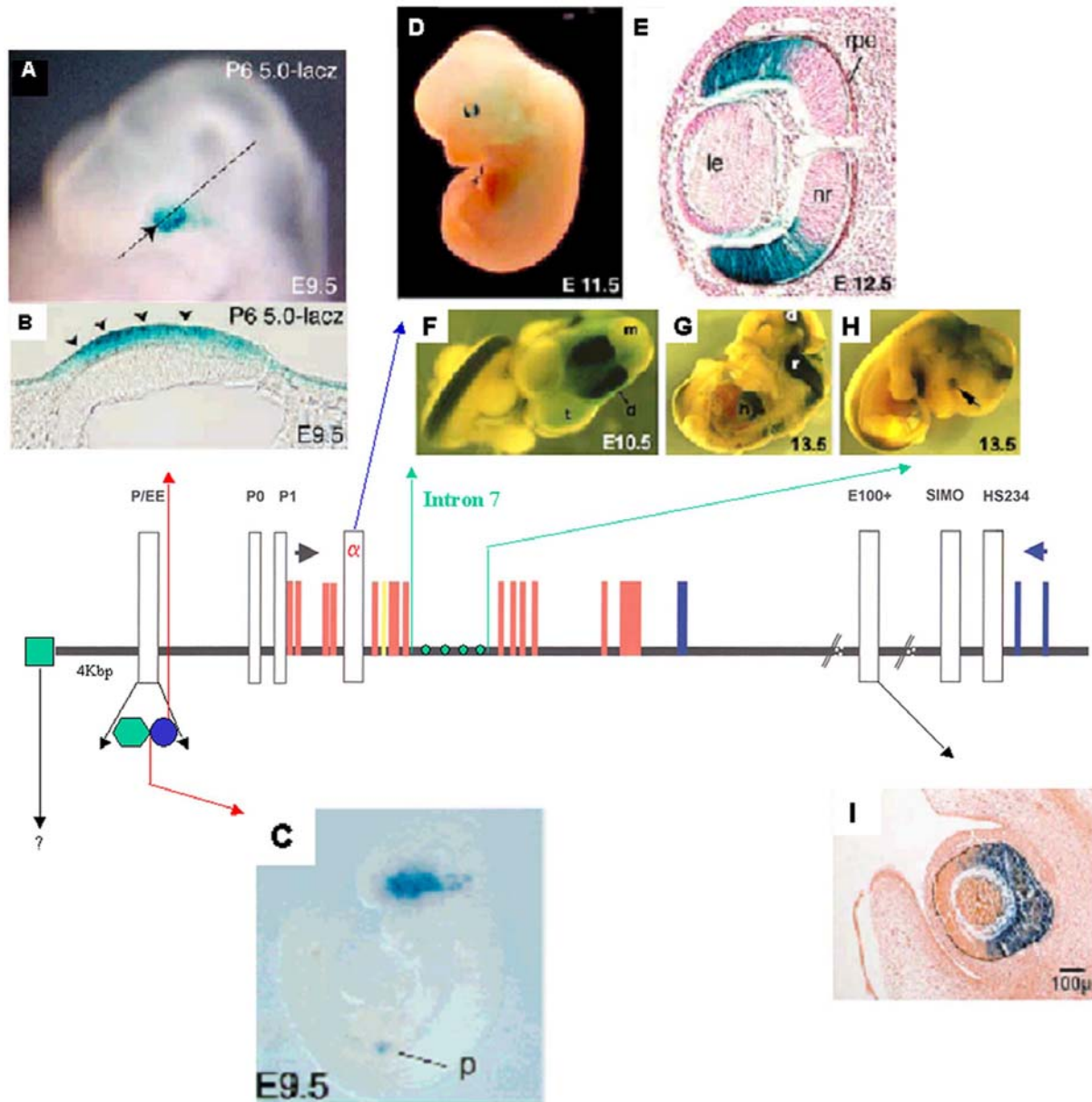


Figure 14: Les éléments de régulation de l'expression de *pax6*. Schéma de l'organisation génomique du gène *pax6* avec ses éléments de régulation. Les 14 exons du gène *pax6* sont représentés par les rectangles rouges, le rectangle jaune correspondant à l'exon alternatif 5a. Les rectangles bleus représentent les derniers exons du gène voisin PAXNEB. Les directions de transcription sont indiquées par les flèches noire et bleue au dessus des exons. Les rectangles blancs correspondent aux différents éléments de régulation de l'expression de *pax6*. Le carré vert correspond à un enhancer spécifique de la neurorétine *in vitro* et dont on ne connaît pas la fonction *in vivo* (Plaza et al., 1999c). P0 et P1: promoteurs de *pax6*. P/EE est un enhancer spécifique du pancréas, de l'ectoderme de surface et du cristallin (A,B,C) (Kammandel et al., 1999), l'héxagone vert correspond à l'élément spécifique du pancréas et le rond bleu à l'élément spécifique de l'ectoderme de surface et du cristallin. A et B: expression chez des souris transgéniques du gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle de l'enhancer P/EE (Kammandel et al., 1999). A: coloration X-gal d'un embryon à E 9,5, expression de *lacZ* dans la placode cristalline. La ligne en pointillé indique le plan de coupe utilisé pour réaliser la coupe observée en B. B: coloration X-gal d'une coupe d'un embryon à E 9,5, expression du transgène dans l'ectoderme de surface et la placode cristalline (têtes de flèches). C: Expression chez une souris transgénique d'un gène rapporteur sous le contrôle de l'enhancer P/EE, embryon à E 9,5, la coloration bleue révèle l'expression du transgène dans l'ectoderme de surface et le pancréas (P) (Ashery-Padan et al., 2000). α: enhancer spécifique de la neurorétine (D et E) (Baumer et al., 2002; Plaza et al., 1995a). D et E: souris transgéniques exprimant le gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle de l'enhancer α (Baumer et al., 2002). D: coloration X-gal d'un embryon à E 11,5, expression du transgène dans les régions nasale et temporale de l'œil. E: coloration X-gal d'une coupe horizontale dans l'œil d'un embryon à E 12,5 exprimant le transgène, expression dans la région naso-temporale distale de la neurorétine. L'intron 7 contient 4 éléments enhancer spécifiques de l'encéphale et de l'œil (Kleinjan et al., 2004). F,G et H: expression chez des souris transgéniques du gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle de la séquence complète de l'exon 7 (Kleinjan et al., 2004). F: coloration X-gal d'un embryon à E 10,5, expression du transgène dans le diencéphale (d). G: coloration X-gal d'une

coupe saggitale d'un embryon à E 13,5, expression du transgène dans le diencephale (d), le rhombencéphale (r) et le cœur (h). **H**: expression du transgène dans l'œil d'un embryon à E 13,5. **I**: expression du gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle de l'enhancer 3': E100+, spécifique de la neurorétine, du diencephale, du bulbe olfactif et de l'épithélium olfactif (Griffin et al., 2002). Coloration X-gal d'une coupe d'un œil de souris transgénique à E 11,5, expression du transgène dans la neurorétine. SIMO: enhancer spécifique du cristallin, du diencephale et du rhombencéphale (Kleinjan et al., 2001). HS234: enhancer spécifique de la neurorétine et de la placode nasale (Kleinjan et al., 2001). d: diencephale; h: cœur (heart); le: cristallin (lens); m: mésencéphale; nr: neurorétine; p: pancréas; r: rhombencéphale; rpe: rétine pigmentaire; t: télencéphale. (d'après van Heyningen et Williamson, 2002; Kammandel *et al.*, 1999; Ashery-Padan *et al.*, 2000; Baumer *et al.*, 2002; Kleinjan *et al.*, 2004; Griffin *et al.*, 2002; Kleinjan *et al.*, 2001)

délétions conditionnelles du gène *pax6*, préalablement modifié par recombinaison homologue afin d'y insérer les sites reconnus par la recombinaison Cre. La recombinaison est exprimée sous le contrôle de cet enhancer. Au moment où l'enhancer fonctionne, le gène *pax6* est délété. La conséquence de cette disparition en cours de différenciation est l'accumulation de cellules amacrines, aux dépens des autres types de neurones et ce spécifiquement dans les territoires d'activité de l'enhancer α (Marquardt et al., 2001).

Deux autres enhancers localisés en amont du promoteur P0 ont également été caractérisés, et présentent *in vitro* les mêmes caractéristiques que l'enhancer α (Plaza et al., 1999c). L'enhancer le plus 3' a été caractérisé *in vivo*, et conditionne l'expression de Pax6 dans le cristallin, l'ectoderme de surface et le pancréas (Ashery-Padan et al., 2000; Dimanlig et al., 2001; Williams et al., 1998). En plus de ses promoteurs, Pax6 a été décrit comme capable de réguler son expression par l'intermédiaire de cet activateur (Aota et al., 2003). L'utilisation de cet enhancer, pour réaliser des souris amputées de Pax6 dans les cellules où cet activateur fonctionne, a permis d'éclairer le rôle de Pax6 dans la formation du cristallin (Ashery-Padan et al., 2000). Les résultats obtenus montrent que Pax6 est requis pour la transition de l'ectoderme de surface (déterminé à former le cristallin) à la formation de la placode cristalline. En effet, le facteur de transcription Sox2, qui est un marqueur de la détermination de l'ectoderme de surface (Furuta and Hogan, 1998; Wawersik et al., 1999), est exprimé chez les souris mutantes pour Pax6; alors que les facteurs de transcription Six3 et Prox1, dont l'expression coïncide avec le stade placode cristalline (Oliver et al., 1995; Oliver et al., 1993), ne le sont pas (Ashery-Padan et al., 2000). Ensuite, le développement du cristallin s'arrête, et la vésicule optique génère de multiples neurorétines, soulignant les relations existantes entre le développement du cristallin et celui de la rétine (Ashery-Padan et al., 2000). De plus, l'expression précoce de Pax6 dans l'œil est suffisante pour induire l'expression de Sox2 dans l'ectoderme mais n'est pas requise pour maintenir cette expression (Ashery-Padan et al., 2000). De façon intéressante, il a été montré l'existence de complexes moléculaires entre Pax6 et Sox2 pour l'activation des cristallines (Kamachi et al., 2001). Le rôle respectif de Sox2, Pax6 et des membres de la famille maf a été

approché par des études *in vitro* et *in vivo* à l'aide des séquences régulatrices du gène codant la delta-cristalline et des souris transgéniques ou des embryons de poulets électroporés avec des vecteurs d'expression codant ces facteurs. Les résultats obtenus montrent que Sox2 est le facteur le plus important, et qu'il est capable de rentrer en synergie avec L-Maf pour induire la delta-cristalline (Shimada et al., 2003). Le rôle de Pax6 est plus complexe, agissant à la fois comme répresseur et comme activateur de ce gène (Muta et al., 2002).

Trois autres activateurs localisés en 3' du gène ont également été décrits (Griffin et al., 2002; van Heyningen and Williamson, 2002), ces séquences localisées en aval de Pax6 dans les séquences introniques d'un gène adjacent dirige l'expression d'un gène rapporteur dans la neurorétine, ce qui souligne la grande complexité du contrôle transcriptionnel de ce gène (van Heyningen and Williamson, 2002). Il existe toutefois une possibilité que ces enhancers soient, en fait, des régulateurs du gène adjacent à Pax6 (PAXNEB).

Récemment, 3 activateurs conduisant à l'expression d'un gène cible dans les différents territoires d'expression de Pax6 dans le système nerveux ont été décrits (Kleinjan et al., 2004) et il est probable que d'autres séquences de régulation existent encore au sein de ce gène.

L'expression de Pax6 dans l'œil en développement est très dynamique. A un stade précoce, toute la vésicule optique exprime ce gène qui voit ensuite son territoire d'expression disparaître dans la partie ventrale, au moment où un autre facteur de la famille : Pax2 s'exprime (Dressler et al., 1990) (Schwarz et al., 2000).

6. Relations entre *pax6* et *pax2* au cours du développement de l'œil

pax2 est l'autre gène *pax* qui intervient dans le développement de l'œil. Pax6 et Pax2 ont des activités antagonistes, largement responsables de la morphogenèse de la cupule optique. De façon intéressante, il semble que chez les cnidaires, il existe un gène ancêtre, *paxB*, combinant à la fois les activités de *pax2* et de *pax6*, lesquelles se seraient ensuite individualisées dans deux gènes distincts chez les triploblastes (Kozmik et al., 2003). Son territoire d'expression est plus restreint que celui de *pax6*. On le trouve dans les cellules de la vésicule optique qui formeront le pédoncule du nerf optique, et en bordure de la vésicule, de part et d'autre de la fissure du nerf optique (Nornes et al., 1990). Il joue un rôle dans l'établissement des trajets axonaux le long du pédoncule du nerf optique (Torres et al., 1996). Des souris mutantes dans *pax2* présentent une extension de la RPE dans le pédoncule, ainsi qu'un défaut de fermeture de la fissure choroïdienne (Torres et al., 1996). Chez les souris déficientes pour *pax2* la différenciation du nerf optique est altérée et on observe une expansion anormale de la rétine (neurorétine et RPE) le long du nerf optique. Des travaux récents, montrent que dans ces souris déficientes pour *pax2* on a une

expansion du territoire d'expression de *pax6* et de certains autres facteurs spécifiques de la rétine. De façon symétrique, chez les souris mutantes pour *pax6*, on constate une extension du domaine d'expression de *Pax2* (Schwarz et al., 2000). Ces résultats suggèrent que la définition des territoires du nerf optique et de la cupule optique soit dépendante de l'expression de *pax6* et *pax2*, et qu'il pourrait y avoir une régulation réciproque négative entre ces deux gènes. Or les auteurs ont montré que les protéines Pax6 et Pax2 pouvaient se fixer sur un enhancer de *pax2* et sur l'enhancer α de *pax6*, que Pax6 réprime l'enhancer de *pax2* et Pax2 réprime l'enhancer de *pax6*. Ces résultats permettent de définir un modèle de spécification des territoires de la cupule optique et du nerf optique. Au cours du développement de l'œil, on aurait deux gradients en sens opposé dans la cupule optique et le pédoncule optique, un de *pax6* et un de *pax2*, avec une zone au niveau de la jonction entre la cupule et le pédoncule optique où les deux gènes sont exprimés ensemble et se répriment réciproquement. Cette inhibition réciproque dans la région où les deux gènes sont exprimés va conduire finalement à une exclusion réciproque de ces gènes dans les territoires où ils sont exprimés et à la définition de la frontière entre la cupule optique et le pédoncule optique (Schwarz et al., 2000).

IV. LE GENE *Mitf*

1. Présentation

Mitf (Microphthalmia Transcription Factor) code une protéine de la même famille que Myc, et sa mutation est responsable *in vivo* de défauts dans la pigmentation, dans la formation des yeux (phénotype microphthalmia chez les homozygotes, d'où le nom *mi* du gène mutant), de surdité, ainsi que de différentes anomalies touchant les systèmes hématopoïétique et osseux (Hodgkinson et al., 1993). La présence d'un gène *mitf* fonctionnel est requise d'une part, pour que les cellules mélanocytaires issues de la crête neurale répondent aux facteurs de croissance et se différencient dans le derme afin de fournir la coloration du pelage (Opdecamp et al., 1997) et d'autre part, pour que la rétine pigmentaire se différencie correctement. Chez différentes souris *mi*, la rétine pigmentaire est en effet pluristratifiée (Nakayama et al., 1998) et transdifférenciée localement en neurorétine (Bumsted and Barnstable, 2000) (Nguyen and Arnheiter, 2000).

La crête neurale est une structure embryonnaire transitoire qui se forme à partir de l'ébauche neurale primitive. Les crêtes neurales sont issues de la partie dorsale du tube neural et sont à l'origine de toutes les cellules pigmentées de l'organisme, à l'exception de celles de la rétine, qui proviennent directement du neuroectoderme (Le Douarin et al., 1992).

A l'aide de chimères caille/poulet, il a été démontré que la migration des mélanoblastes s'effectuait de façon très précise, les cellules empruntant une voie particulière à travers l'embryon. Ils migrent entre le dermomyotome et l'ectoderme selon un trajet dorso-latéral (Teillet, 1970). Plusieurs jours après le début de la migration, les mélanoblastes qui parviennent dans leur site définitif entrent dans une phase de prolifération intense pour s'y différencier en mélanocytes dendritiques et pigmentés.

La mélanogenèse est le terme désignant la synthèse des mélanines et les mécanismes qui la contrôlent. La mélanogenèse s'effectue dans les mélanocytes et dans la RPE. Les origines embryologiques différentes de ces deux types cellulaires conduisent à un décalage temporel dans la mélanogenèse. Chez la souris, la pigmentation apparaît dans la RPE à partir du 11,5^{ème} jour du développement de l'embryon (E 11,5) et seulement après la naissance dans les mélanocytes (Murphy and Bartlett, 1993). Ce décalage temporel est dû à la migration des mélanocytes et de leurs précurseurs à leurs sites périphériques respectifs : peau, poils, cheveux, uvée, leptoméninges, cochlée, organe vestibulaire.

2. La mélanogenèse

La pigmentation est le résultat d'un mélange de deux types de mélanines : l'eumélanine et la phaéomélanine. Elles peuvent être synthétisées au sein du même mélanosome ou bien dans des organites différents (eumélanosomes et phaéomélanosomes) (Hach et al., 1993). En général, on trouve un mélange des eumélanines et des phaéomélanines en différentes proportions. Les eumélanines sont des mélanines de couleur brune ou noire, à haut poids moléculaire, insolubles dans la plupart des solvants. Formées par la polymérisation de plusieurs centaines de radicaux phénols oxydés en fonction quinone, elles se cyclisent pour former un corps chimique absorbant totalement la lumière, d'où leur couleur noire. Les phaéomélanines sont caractérisées par leur couleur jaune orangée, elles sont solubles dans les bases. Elles contiennent de l'azote et du soufre et proviennent de la polymérisation oxydative des cystéinyldopas. Les eumélanines sont surtout connues pour leur effet photoprotecteur en raison de leur large spectre d'absorption dans l'UV, le visible et l'infrarouge.

Dans la rétine, la mélanine contenue dans la RPE protège les photorécepteurs bâtonnets en focalisant la lumière incidente sous un angle étroit. Chez les albinos, cet angle est très ouvert et conduit à un faible pouvoir de résolution de l'œil. Le degré de pigmentation de l'iris est la conséquence, d'une part, de la quantité de mélanine totale des cellules épithéliales et des mélanocytes du stroma et, d'autre part, de la proportion des deux différents types de mélanines.

Cette pigmentation est essentielle dans le contrôle de l'ouverture de la pupille et peut être dans la filtration des UV, comme pour la peau.

Le mélanosome est un organite cellulaire qui a comme fonction la production et le stockage des pigments. Certaines substances intermédiaires de réaction produites lors de la synthèse des mélanines sont toxiques pour la cellule. En confinant la synthèse dans un organite tel le mélanosome, la cellule se trouve protégée. Le mélanosome est constitué d'une matrice fibreuse ou granuleuse plus ou moins organisée, contenue par une structure membranaire. Il est rempli de pigments. Au cours de leur maturation, les mélanosomes qui synthétisent des eumélanines s'aplatissent alors que ceux qui synthétisent des phaeomélanines restent ronds. Dans les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine, les mélanosomes sont nombreux et fortement pigmentés (Orlow and Brilliant, 1999).

La mélanogénèse met en jeu une cascade d'enzymes qui catalysent les différentes étapes de la synthèse (figure 15). La synthèse des mélanines consiste en une série de réactions enzymatiques dont le précurseur est la L-tyrosine, un acide aminé aromatique. Trois enzymes principales participent à la mélanogénèse. Il s'agit de la tyrosinase, de la Trp-1 (tyrosinase related protein-1) ou gp75 et de la Trp-2 (tyrosinase related protein-2), encore appelée DOPA-chrome tautomérase (DCT) (Shibahara et al., 1986) (Jackson, 1988) (Jackson et al., 1992). Ces trois enzymes possèdent environ 40% d'identité dans leur séquence en acides aminés (Hearing et al., 1992). Bien que ces enzymes possèdent des homologies de structure et des caractéristiques communes, elles sont codées par des gènes distincts et possèdent des activités catalytiques différentes (Figure 15). Elles pourraient agir *in vivo* chez la souris sous forme de complexes multi-enzymatiques ancrés dans la membrane du mélanosome (Winder et al., 1994) (Orlow, 1995). Des mutations dans les locus de la tyrosinase sont à l'origine d'anomalies de la couleur du pelage chez la souris, et de formes d'albinisme chez l'homme.

3. La famille MiT

Mitf avec TFE3, TFEB et TFEC constituent une sous-famille de facteurs de transcription à b-HLH-LZ ayant en commun un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de dimérisation très conservés (figure 16) (Hemesath et al., 1994). Des études biochimiques ont montré que les protéines de cette sous-famille peuvent former des homo et des hétérodimères les unes avec les autres mais pas avec d'autres facteurs à b-HLH-LZ comme Myc, Max ou E47 (Hemesath et al., 1994) (Zhao et al., 1993) (Fisher et al., 1991) (Blackwood and Eisenman, 1991).

Ces facteurs sont impliqués dans la régulation de l'expression de gènes spécifiques de différentes lignées cellulaires. Mitf est le membre le mieux caractérisé. TFE3 semble avoir une

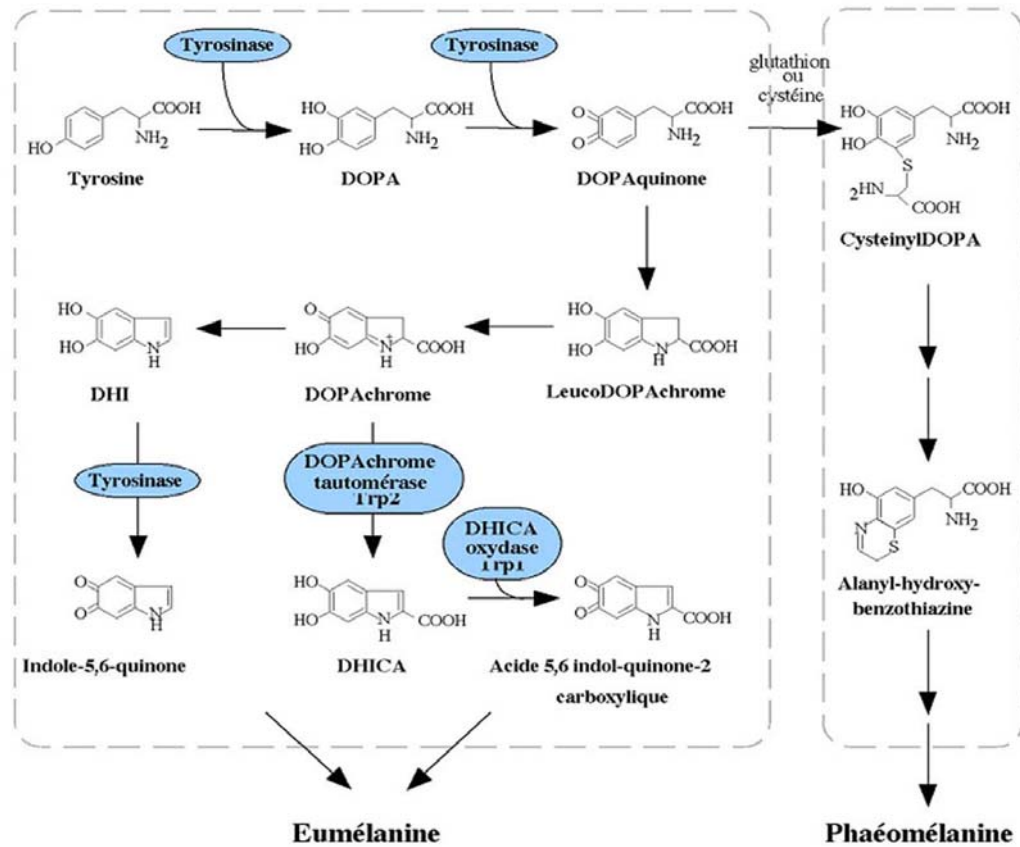


Figure 15: Voies de synthèse des mélanines.

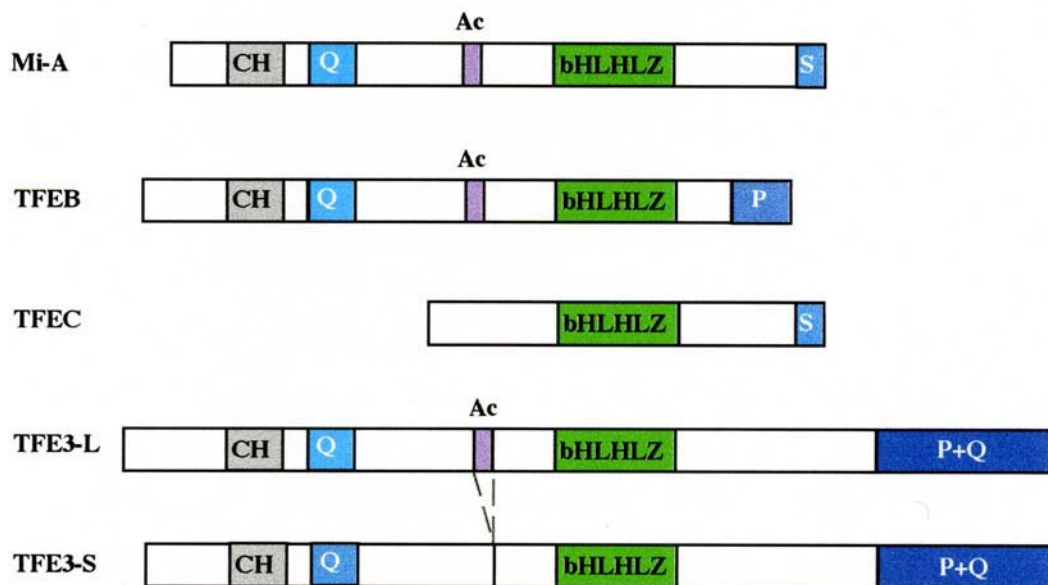


Figure 16 : Structure des membres de la famille MiT. (CH : domaine chargé ; Q : domaine riche en glutamines ; Ac : domaine acide ; S : domaine riche en sérines ; P : domaine riche en prolines ; bHLHLZ : domaine de liaison à l'ADN) La forme TFE3-S agit comme dominant négatif sur la forme longue (TFE3-L). (d'après Rheli *et al.*, 1999)

expression ubiquiste (Beckmann et al., 1990). TFEC possède, lui, une expression restreinte à la lignée monocyte/macrophage (Rehli et al., 1999b). Sa fonction y est encore inconnue. Quant à TFEB, son annulation par recombinaison homologue chez la souris montre qu'il a un rôle important dans la vascularisation du placenta (Steingrimsson et al., 1998).

Mitf et TFE3 pourraient coopérer dans les ostéoclastes pour en assurer le bon fonctionnement (Weilbaecher et al., 1998). En effet, certains allèles récessifs de *mi* n'engendrent pas d'ostéopétrose, ce qui suggère que des partenaires de Mitf puissent prendre le relais. TFE3 est un bon candidat dans la mesure où il est exprimé dans les ostéoclastes et se retrouve avec Mitf dans des expériences de co-immunoprécipitations. En revanche, TFE3 et TFEB ne sont pas exprimés dans la RPE et les crêtes neurales (Nakayama et al., 1998). Ils ne semblent donc pas impliqués dans la fonction des cellules pigmentées.

4. Mitf, structure et isoformes

Mitf code un facteur de transcription à domaine b-HLH-LZ de la classe B (Figure 17) (Hodgkinson et al., 1993). Le facteur de transcription Mitf se fixe à l'ADN par l'intermédiaire du domaine basique (b), les domaines hélice-boucle-hélice (HLH) et crémaillère à leucine (LZ) intervenant dans la reconnaissance inter-protéique (Ferré-D'Amaré *et al.*, 1993). Mitf reconnaît en effet l'ADN sous forme de dimères, homo- et hétéro-dimères (Hemesath et al., 1994). Les parties amino- et carboxy-terminales de la protéine possèdent une activité transactivatrice (Yasumoto et al., 1997) (Sato et al., 1997).

Les bases moléculaires responsables de certains phénotypes mutants sont désormais caractérisées (Steingrimsson et al., 1994) (Jackson and Raymond, 1994) (Moore, 1995). La protéine mutante peut être affectée dans la partie N-terminale, le domaine basique, le HLH, ou encore dans la crémaillère à leucines (LZ) (Figure 17). Il s'agit parfois de mutations ponctuelles changeant un acide aminé en un autre ou créant un codon stop, mais aussi de délétions internes plus ou moins grandes, ou d'ajouts de bases (Figure 17). Chez l'homme, certains patients présentant un syndrome de wardenburg de type 2 (WS2) montrent des aberrations d'épissage dans la partie N-terminale de MITF, et dans certaines familles, des mutations ponctuelles génèrent un codon stop dans les exons 6, 7 et 8 ; ce qui créerait des protéines amputées de leurs domaines de dimérisation et non fonctionnelles (Figure 17) (Tassabehji et al., 1994) (Nobukuni et al., 1996) (Lautenschlager et al., 1996) (Lalwani et al., 1998).

L'organisation génomique du locus *mitf* a été définie chez l'homme et la souris (Figure 17 et 18) (Tassabehji et al., 1994) (Yasumoto et al., 1998) (Shibahara et al., 2001) (Takeda et al., 2002). Il existe six formes de Mitf, générées à partir de promoteurs différents et par épissage

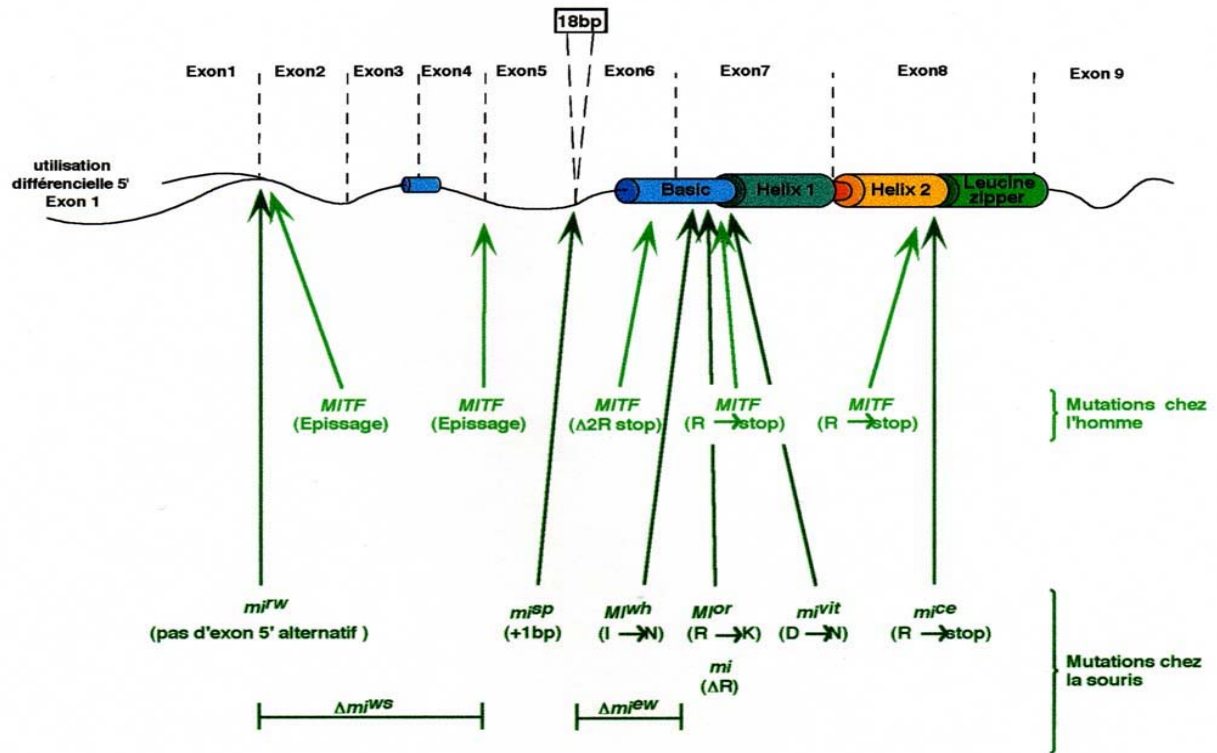


Figure 17 : Structure de la protéine Mitf. (d'après Moore, 1995)

La petite hélice à la jonction des exons 3 et 4 représente le domaine transactivateur. Différentes mutations connues chez l'homme et la souris figurent sous la protéine, ainsi que leurs bases moléculaires.

alternatif : une forme A, une forme B, une forme C, une forme H, une forme M (qui est la forme initialement caractérisée) et une forme D dernièrement caractérisée (Figure 18). Ces six protéines diffèrent dans leur partie N-terminale et deviennent strictement identiques à partir de l'exon 2 (pour revue : (Shibahara et al., 2001) (Takeda et al., 2002)). La forme A est la plus longue. Elle comprend deux domaines : A et B1b, correspondant à deux exons situés en amont de l'exon 2 ; le domaine A lui est spécifique. Les formes B, C et H, tout comme la forme A possèdent le domaine B1b et possèdent chacune respectivement un domaine B1a, C et H qui leur est spécifique. La forme M est la plus courte, possédant un tout petit domaine M de 12 acides aminés. Enfin la forme D ne possède pas de domaine "D" spécifique, mais un domaine B1b amputé de 17 acides aminés dans la partie amino terminale par rapport aux formes A, B, C et H (figure 18) (Amae et al., 1998) (Yasumoto et al., 1998) (Fuse et al., 1999) (Rehli et al., 1999a) (Udono et al., 2000) (Takeda et al., 2002).

Mitf-M n'est détecté que dans les mélanocytes du derme et les mélanomes qui en sont issus. Mitf-A est l'isoforme majeure de la RPE (elle représente 90% des ARN Mitf dans la RPE). Ceci suggère que la forme Mitf-A jouerait un rôle prépondérant dans la différenciation de la rétine pigmentaire, alors que la forme M serait essentielle au développement des mélanocytes périphériques. Cette hypothèse est étayée par l'analyse des mutants Mi^{bw} . Ces souris ont un pelage complètement blanc. En revanche, les yeux sont noirs et la RPE normale. Ce phénotype est dû à l'insertion d'un rétrotransposon L1 dans l'intron 3 (Yajima et al., 1999). Les isoformes natives de Mitf-A et Mitf-H sont présentes mais pas la forme Mitf-M, ce qui pourrait expliquer le phénotype (Yajima et al., 1999).

5. Expression au cours du développement embryonnaire

Chez la souris, les premières cellules à exprimer *mitf* au cours du développement, sont les cellules de la rétine pigmentaire. On détecte l'ARN *mitf* dans les vésicules optiques au stade 24 somites. Puis, on le retrouve dans les cupules optiques, au niveau de la couche externe, et enfin, dans la RPE et dans des cellules du mésenchyme (Il s'agit probablement de mélanoblastes en migration depuis les crêtes neurales, et qui vont aller coloniser la choroïde, l'iris et la peau périorbitale) (Nakayama et al., 1998).

Mitf apparaît dans le tronc aux stades 27/28 somites, au niveau de la ligne médiane dorsale. Enfin, *mitf* est détecté par hybridation *in situ* dans la partie caudale de l'embryon, vers 33/34 somites. Les cellules *mitf*⁺ y sont réparties le long des voies classiques de migration des précurseurs des mélanocytes (Nakayama et al., 1998). A la naissance, *mitf* n'est plus exprimé que dans les follicules pileux. *Mitf* n'est plus exprimé dans les mélanocytes dendritiques et

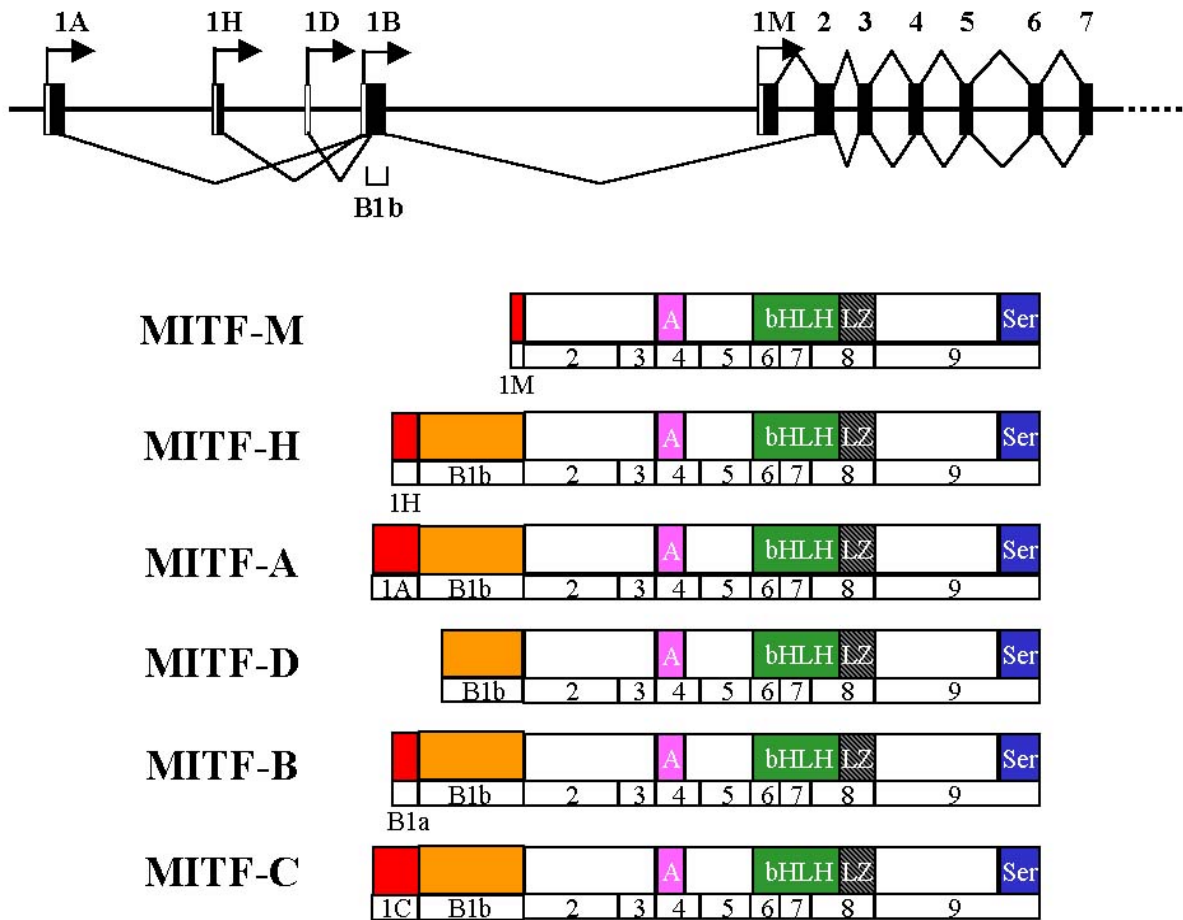


Figure 18 : Les différentes isoformes de Mitf. (A : domaine acide, bHLHLZ : domaine de liaison à l'ADN, Ser : domaine riche en sérines) Le premier exon est spécifique de chaque isoforme (d'après Takeda *et al.*, 2002 ; Udono *et al.*, 2000 ; Fuse *et al.*, 1999)

pigmentés (Opdecamp et al., 1997).

On détecte également un ARN *mitf* dans le cœur, au niveau de l'atrium et dans l'aorte dorsale. Mais son expression diminue avec le temps. En revanche, l'expression persiste dans la paroi des ventricules même chez l'adulte (Nakayama et al., 1998) (Hodgkinson et al., 1993).

6. Gènes cibles de Mitf

Les facteurs à b-HLH-LZ reconnaissent des séquences de type CANNTG appelées boîtes E. Parmi les boîtes E, *in vitro*, Mitf reconnaît préférentiellement la séquence CATGTG, surtout si elle est précédée d'un T sur les deux brins d'ADN (TCATGTGA) (Aksan and Goding, 1998). On peut ainsi imaginer que la présence de séquences flanquantes de part et d'autre de la boîte CATGTG constitue un mécanisme de restriction du répertoire des gènes cibles potentiels. D'ailleurs, le gène *P*, situé sur le locus *pink eyed dilution*, dont le promoteur contient une séquence CATGTG mais non précédée d'un T, n'est pas un gène cible de Mitf.

Mitf intervient directement au niveau de la synthèse des mélanines en activant les gènes codant la tyrosinase, *Trp1* et *Trp2*. On trouve plusieurs boîtes E dans les promoteurs de ces gènes, boîtes que Mitf reconnaît (Figure 19) (Yasumoto et al., 1995) (Yasumoto et al., 1997) (Bertolotto et al., 1998). Dans le promoteur du gène *tyrosinase*, c'est le TDE (Tyrosinase Distal Element) qui est le plus important pour la réponse à Mitf, en terme de taux de transcription (Yasumoto et al., 1994). Le TDE semble nécessaire à l'expression correcte de la tyrosinase dans les cellules pigmentées (Tanaka et al., 1992). Le TPE (Tyrosinase Proximal Element), qui contient une boîte M, semblerait quant à lui, jouer sur l'efficacité de la transcription du gène mais ne participerait pas à la spécificité d'expression dans la lignée mélanocytaire. La boîte M est un élément de réponse spécifique des mélanocytes (M pour Mélanocyte). C'est une séquence de 11 paires de bases contenant en son centre, la séquence TCATGTG. Mitf est capable de se fixer sur cette boîte M (Yasumoto et al., 1994) (Bentley et al., 1994) (Bertolotto et al., 1996). Contrairement à la tyrosinase, pour *Trp1* et *Trp2*, la mutation de la boîte M entraîne une chute drastique du taux d'activation par Mitf (Yasumoto et al., 1995) (Bertolotto et al., 1998). Dans ces deux gènes, Mitf se fixe également sur une boîte E mais avec une affinité plus faible que sur la boîte M (Bertolotto et al., 1998). Il semble donc que la sensibilité à Mitf de ces trois gènes et leurs régulations diffèrent légèrement. Ceci est conforté par le fait que chez certains mutants de *mi*, les gènes *tyrosinase*, *trp1* et *trp2* ne sont pas affectés de la même façon. C'est *trp2* qui est le moins touché. D'ailleurs, dans les souris *mi*^{-/-}, l'expression de *trp2* est tout à fait normale alors que celles de *trp1* et de *tyrosinase* sont très réduites (Nakayama et al., 1998).

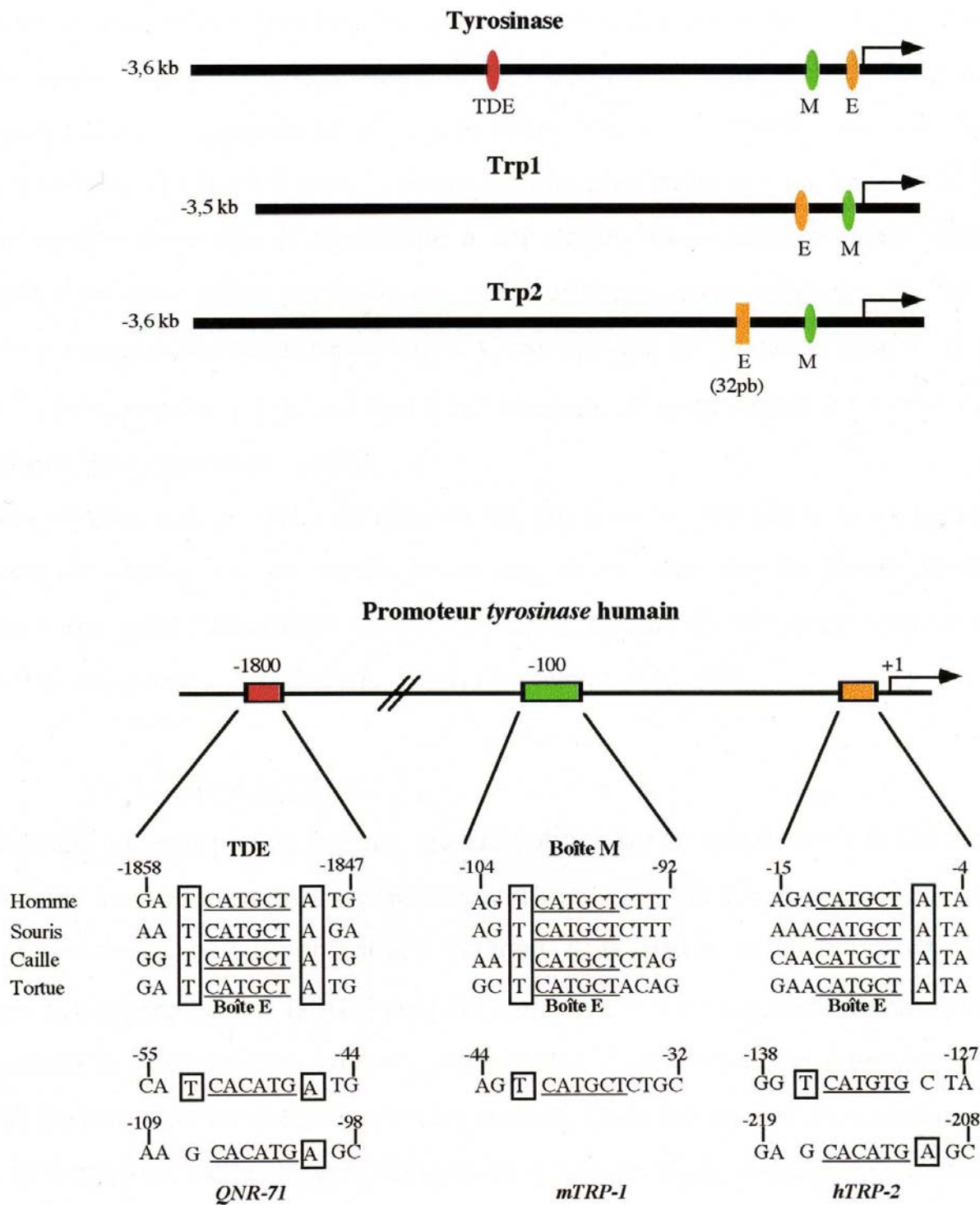


Figure 19: Éléments de fixation pour Mitf sur les promoteurs des gènes *tyrosinase*, *trp-1* et *trp-2*. (d'après Aksan et Goding, 1998)

Les travaux que je viens de résumer ici ont tous été réalisés avec la forme Mitf-M. On sait encore peu de choses sur les autres isoformes, si ce n'est que la forme Mitf-A transactive les promoteurs des gènes *tyrosinase* et *trp1 in vitro*, que la forme H transactive faiblement le promoteur de *tyrosinase* (Amae et al., 1998) (Yajima et al., 1999). Les formes C et D transactivent *in vitro* le promoteur du gène de la *tyrosinase* (Fuse et al., 1999) (Takeda et al., 2002). La forme B transactive *in vitro* les promoteurs des gènes *trp1 et trp2* (Udono et al., 2000).

Des travaux chez la caille ont montré que Mitf pouvait aussi réguler l'expression du gène *QNR71*, qui est un gène spécifique des mélanocytes exprimé dans les cellules de neurorétines de caille transformées par l'oncogène *v-myc* (ces cellules acquièrent un phénotype pigmenté après quelques passages) (Turque et al., 1996). Ces travaux ont permis d'identifier un nouveau gène spécifique des mélanocytes et de montrer que Mitf pouvait réguler son expression *in vitro* en se fixant directement sur un site TCATGTG présent dans la région promotrice du gène (Turque et al., 1996). Comme *QNR71*, protéine mélanosomale, Mitf contrôle aussi l'expression de *Pmel17/Silver* une autre protéine mélanosomale apparentée à *QNR71* (Du et al., 2003).

A côté de ces gènes cibles impliqués dans la pigmentation, Mitf contrôle également l'expression de *Bcl2*, une protéine anti-apoptotique, ce qui pourrait avoir une grande importance dans la résistance des mélanomes aux chimiothérapies (McGill et al., 2002 cell). Un grand nombre de gènes cibles potentiels ont également été décrits dans des expériences de protéomique (McGill et al., 2002).

7. Mitf et la RPE

C'est à cause du phénotype sévère au niveau de l'œil que le locus *mitf* a ainsi été dénommé par les généticiens, « microphthalmia » référant à la petite taille des yeux. Certains mutants présentent une hyperplasie de la RPE (*mi*, *mi^{ew}*, *mi^{wh}*). Cet accroissement du nombre de cellules dans la RPE inhibe la juxtaposition correcte des cellules choroïdiennes et empêche la fermeture de la fissure du nerf optique au cours du développement. Dans les cas les plus extrêmes, il peut y avoir absence de fermeture de la fissure, aboutissant à une pression intraoculaire faible conduisant à la formation de petits yeux. Tous les mutants *mi* microphthalmiques ont, à l'état adulte, une RPE peu, voire pas du tout pigmentée.

L'analyse de ces mutants fait clairement apparaître qu'au cours du développement de l'œil, Mitf joue un rôle capital dans le contrôle du cycle cellulaire de la RPE, et dans sa différenciation pigmentaire. Une expression correcte de Mitf limite la prolifération de la RPE et contribue à en faire une monocouche de cellules pigmentées. Toutes les autres anomalies de l'œil ne sont que des conséquences secondaires de l'hyperplasie de la rétine pigmentaire. Bien que de

nombreux allèles de *mi* aient des effets sur la taille des yeux, les cas les plus extrêmes d'atteinte de l'œil sont associés à des mutations dans le domaine basique, c'est-à-dire le domaine de liaison à l'ADN (*mi*, *mi^{wh}*, *mi^{ew}*, *Mi^{or}*).

Il existe chez la caille, un mutant silver présentant à l'état homozygote, de légères anomalies de l'œil et de la couleur des plumes. Au cours du développement embryonnaire de la RPE, tout se passe normalement jusqu'à E4, si ce n'est que la RPE n'est pas pigmentée. A partir de E5, la partie centrale de la RPE s'épaissit et se transdifférencie en neurorétine de polarité inversée. Ce phénotype a été corrélé à deux mutations dans *Mitf*. L'une remplace une arginine en histidine dans le domaine basique, l'autre supprime deux bases dans le Leucine Zipper, arrêtant prématurément le cadre de lecture. La protéine mutante est encore capable d'activer le promoteur de *MMP115* (une protéine mélanosomale) *in vitro* mais moins que la protéine sauvage (Mochii et al., 1998b). Cette baisse d'activité serait suffisante pour expliquer le phénotype de transdifférenciation *in vivo*.

Une étude *in vitro* menée chez le poulet confirme le rôle de *Mitf* dans la différenciation de la rétine pigmentaire. Sous l'effet du FGF2, la rétine pigmentaire d'oiseau en culture se dédifférencie et se transdifférencie en cellules neuronales et cristallines (Pittack, 1991). Au cours de ce processus, certains gènes, comme *mitf*, *MMP115*, *tyrosinase*, voient leur expression chuter. D'autres, comme *pax-6*, voient au contraire leur expression augmenter (Mochii et al., 1998a) (Agata et al., 1993). La surexpression de *mitf* dans de la RPE de poulet en culture aboutit à une hyperpigmentation des cellules. L'expression des gènes codant la tyrosinase et *MMP115* n'est pas modulée. En revanche, celle de *pax-6* serait diminuée (Mochii et al., 1998a).

L'expression ectopique de *mitf* dans des cellules de neurorétine de poulet transdifférencie ces cellules en cellules pigmentées (Planque et al., 1999). Ceci montre bien que *mitf* joue un rôle dominant dans l'induction de la pigmentation. Au cours de cette étude, il a aussi été observé que les cellules de neurorétines exprimant *mitf* cultivées en présence de FGF2 proliféraient et clonaient en agar alors que les cellules de neurorétine normale en présence de FGF2 ne clonaient pas. Ceci montre que non seulement *mitf* est important pour la pigmentation mais qu'il peut aussi moduler la réponse des cellules aux facteurs de croissance.

Des travaux récents ont décrit une interaction inhibitrice des protéines *Mitf* et *Pax6* (Planque et al., 2001b). Il a été observé que la forme mutée de *Mitf*, (mutation *mi*, délétion d'un codon conduisant à la disparition d'un acide aminé basique dans le domaine de liaison à l'ADN de *Mitf*) qui est responsable de la transdifférenciation de la RPE en neurorétine (Bumsted and Barnstable, 2000) n'interfère plus avec la fonction transactivatrice de *Pax6*. En effet, les deux

protéines sauvages forment un complexe incapable de lier l'ADN et donc d'activer les gènes cibles (Planque et al., 2001b).

On peut imaginer qu'une interaction entre ces deux facteurs de transcription (Pax6 et Mitf) simultanément exprimés *in vivo* dans la future rétine pigmentaire soit responsable du devenir de ce tissu. Un déséquilibre dans le rapport entre ces protéines pourrait avoir de graves conséquences sur le développement de l'œil. De fait, au cours du développement de la vésicule optique, des facteurs de la famille des FGFs sécrétés par l'ectoderme de surface conduisent à la disparition de Mitf dans la portion antérieure du neuroépithélium (Nguyen and Arnheiter, 2000). La dégradation de la protéine Mitf serait consécutive à sa phosphorylation par les MAP-kinases activées par la signalisation FGF. L'effet paradoxal de la phosphorylation de Mitf est de produire une protéine plus active comme facteur de transcription (Wu et al., 2000). Un des rôles de Pax6 dans cette portion du neuroépithélium serait donc d'inactiver cette protéine l'empêchant ainsi d'enclencher la voie de différenciation pigmentaire.

V. LE GENE *Otx-2* ET LA FAMILLE OTX

1. La famille OTX

De façon générale, on peut définir chez les vertébrés trois classes d'orthologie pour les gènes de la famille *Otx*. *Otx1* et *Otx2* représentent respectivement les deux premières classes chez tous les vertébrés. Alors que la troisième classe est représentée par *Crx* pour les mammifères et *Otx5* pour toutes les autres espèces (Germot et al., 2001). Récemment, un nouveau gène nommé *Otx3* a été identifié mais son appartenance à la famille *Otx* reste discutée, c'est pourquoi par la suite je n'en parlerai plus.

Les protéines Otx de mammifères possèdent toutes un homéodomaine très conservé qui diffère de l'homéodomaine d'Otd (orthologue d'Otx chez la drosophile) par 3, 2 et 9 acides aminés respectivement pour Otx1, Otx2 et Crx (figure 20). Tous les membres présentent une lysine en position 50 dans leur homéodomaine. En dehors de l'homéodomaine, peu de similitudes existent entre la protéine Otd et celles de mammifères à l'exception de la séquence PEST (région impliquée dans la dégradation rapide des protéines) qui est présente dans toutes ces protéines (figure 20) (Williams and Holland, 1998). Deux autres domaines sont conservés (figure 20) : le domaine WSP (domaine Tryptophane Sérine Proline) et le motif queue Otx. Les fonctions de ces deux motifs restent actuellement encore non déterminées.

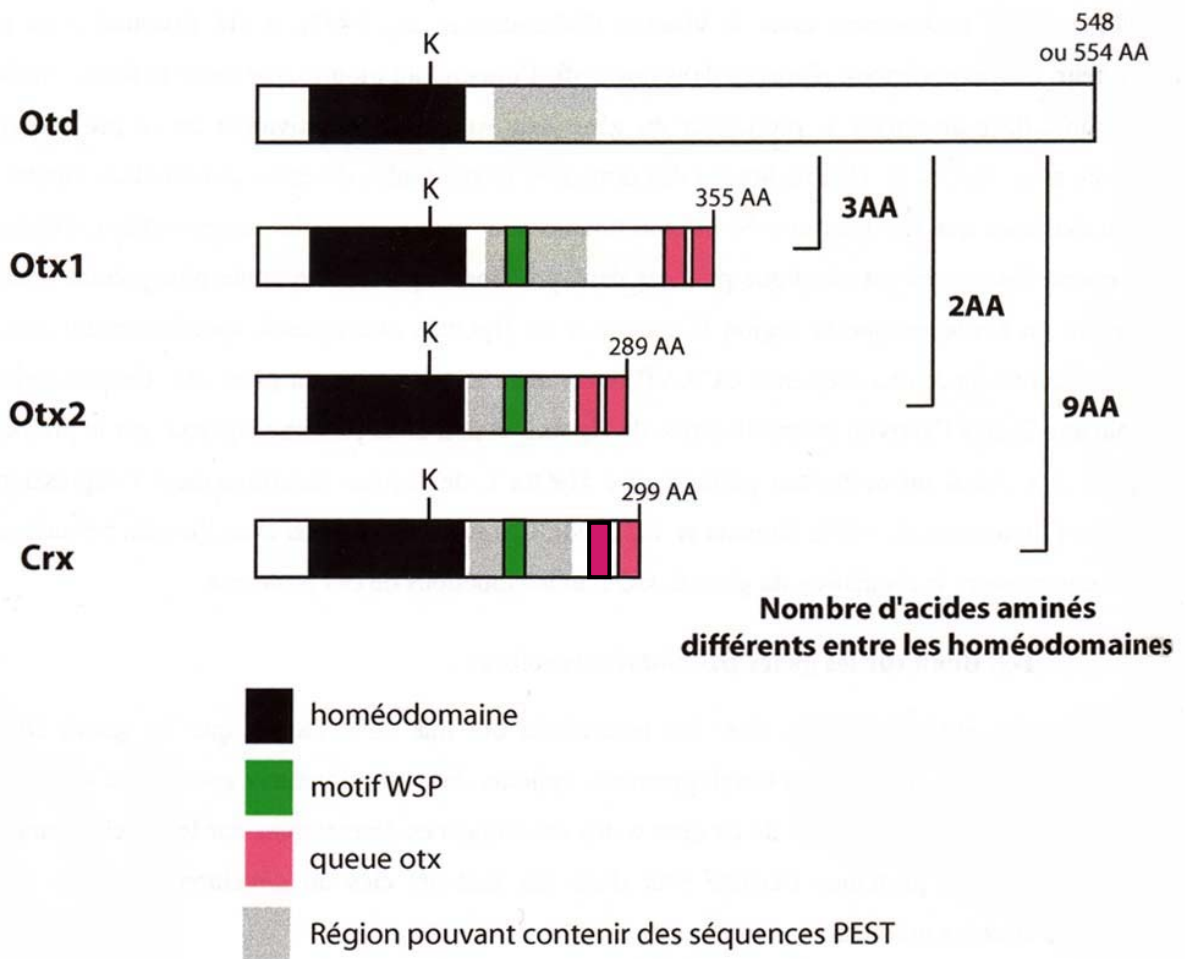


Figure 20 : Structure des protéines Otx chez les mammifères. Représentation de la protéine Otd de drosophile ainsi que les trois protéines Otx de mammifères synthétisées à partir de trois gènes différents (Otx1, Otx2 et Crx). Ces protéines présentent un homéodomaine (en noir) très similaire avec une lysine (K) en position 50. Le nombre d'acides aminés divergents entre l'homéodomaine d'Otd et celui des protéines Otx de mammifères est indiqué. Du côté C-terminal de l'homéodomaine, plusieurs régions présentent de fortes similarités avec le consensus des séquences PEST (en gris) qui sont impliquées dans la dégradation des protéines. Les protéines Otx des mammifères possèdent également un motif WSP (domaine Tryptophane Sérine Proline, en vert) très conservé mais dont la fonction est encore inconnue. De même, un autre domaine, la queue Otx (en rouge) est conservée et correspond à une séquence particulière présente à l'extrémité C-terminale des protéines Otx. AA : acides aminés.

Ces trois protéines Otx de mammifères ont des domaines d'expression spécifiques et des fonctions distinctes, ainsi que des domaines d'expression communs et des fonctions communes.

2. Otx1

Les gènes *Otx1* et *Otx2* ont été identifiés chez les mammifères et sont exprimés dans le cerveau de la souris (Simeone et al., 1992; Simeone et al., 1993). L'expression du gène *Otx2* apparaît très tôt au cours du développement alors que celle d'*Otx1* n'apparaît que plus tardivement au cours du stade embryonnaire 2 à 5 somites soit entre E8,2 et 8,5 (stade embryonnaire de 8,2 et 8,5 jours après la fécondation). Cette expression est restreinte au neuroépithélium du cerveau antérieur (diencéphale) et moyen (mésencéphale) et est incluse dans les domaines d'expression d'*Otx2*. L'expression d'*Otx1* est maintenue dans la zone ventriculaire du cortex et se poursuit au cours de la corticogenèse. *Otx1* est également exprimé dans les précurseurs des organes des sens qui correspondent à la placode olfactive, aux vésicules olfactives et optiques (Simeone et al., 1992; Simeone et al., 1993). Plus tardivement, *Otx1* est exprimé spécifiquement dans le néocortex, le cervelet, l'épithélium olfactif, la saccule, la cochlée et le canal semi-circulaire de l'oreille interne ainsi que dans l'iris, les corps ciliés de l'œil et les glandes lacrymales. A la naissance, *Otx1* est aussi faiblement exprimé dans le lobe antérieur de l'hypophyse.

La protéine Otx1 joue un rôle très important au cours de la corticogenèse et plus particulièrement dans la mise en place des couches de neurones (Frantz et al., 1994) (Frantz and McConnell, 1996). Cette protéine est présente dans le cytoplasme des neurones des couches profondes du cortex (Zhang et al., 2002) et semble impliquée dans la prolifération de ces cellules (Acampora et al., 1996). Son expression dans les aires corticales suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la définition de ces aires. De plus, Otx1 semble avoir un rôle dans la régulation du potentiel excitateur des synapses (Acampora et al., 1996), dans le contrôle de l'élimination des projections axonales exubérantes des neurones de la couche 5 du cortex (Weimann et al., 1999), dans le fonctionnement au stade pré-pubère de l'hypophyse (Acampora et al., 1998). Enfin, Otx1 joue un rôle dans le développement de l'oreille interne et de l'œil. En effet les souris *Otx1*^{-/-} présentent des anomalies de ces structures (Acampora et al., 1996) (Morsli et al., 1999). Dans l'œil, l'expression d'*Otx1* est essentiellement restreinte à l'iris, aux corps ciliés et aux cellules ectodermiques (Acampora et al., 1996). Ces cellules ectodermiques migrent de l'œil en formation pour former les glandes lacrymales et induisent la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules exocrines glandulaires. Chez les souris *Otx1*^{-/-}, les corps ciliaires sont absents, l'iris est très fin et les glandes lacrymales ne se développent pas ; la différenciation

glandulaire ne se produit pas (Acampora et al., 1996). Les cellules ectodermiques normalement présentes dans les composants mésenchymateux ne sont pas identifiables dans ces souris. Ces résultats montrent que le défaut de développement des glandes lacrymales observé chez les souris *Otx1*^{-/-} est la conséquence de l'absence de différenciation des cellules mésenchymateuses par les cellules ectodermiques. Ces cellules ectodermiques n'ayant pas migré, elles ne peuvent induire la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules exocrines glandulaires. La protéine *Otx1* serait donc impliquée dans l'induction de la migration de cellules ectodermiques.

3. *Crx*

Le gène *Crx* a pu être identifié d'une part par une recherche par RT-PCR dégénérée de gènes exprimés spécifiquement dans la rétine en développement (Furukawa et al., 1997) et d'autre part dans une expérience de simple hybride dans la levure où le promoteur du gène codant pour le pigment visuel, la rhodopsine, des photorécepteurs bâtonnets a été utilisé comme appât (Chen et al., 1997b). Le gène *Crx* est tout d'abord exprimé dans la rétine à E12,5 dans les couches externes correspondant à la future couche des photorécepteurs. A ce stade de développement, les photorécepteurs de type cône sont générés alors que ceux de type bâtonnet ne le sont pas encore. Au stade E15,5, la génération des cônes est terminée et celle des bâtonnets commence. L'expression de *Crx* est toujours limitée à la couche des photorécepteurs. Dans la rétine post-natale, l'expression de *Crx* est dans la couche de photorécepteurs et atteint un niveau maximal à 6 jours après la naissance (P6). A P6, la couche pléxiforme externe CPE est visible et sépare les cellules en 2 groupes : celles de la CNE et celles de la CNI (voir figure 2 page 8). Le gène *Crx* est exprimé dans toute la CNE nouvellement établie ainsi que dans certaines cellules de la CNI. A P9, le signal correspondant à *Crx* diminue mais reste discrètement localisé dans la CNE. Cette expression de *Crx* persiste dans les photorécepteurs cônes et bâtonnets différenciés de la rétine adulte (Chen et al., 1997b) (Furukawa et al., 1997). En d'autres termes, le gène *Crx* est exprimé dans les photorécepteurs cônes et bâtonnets et cette expression débute dans les cellules précurseurs post-mitotiques et avant toute différenciation morphologique de ces cellules (Chen et al., 1997b) (Furukawa et al., 1997).

Une expression de *Crx* est également détectée dans l'épiphysse ou glande pinéale. La glande pinéale a pour fonction de traduire l'information photopériodique en une synthèse et une libération rythmée de neurotransmetteurs. Cet organe est lié, au niveau évolutif, aux photorécepteurs de la rétine. Cette expression suit un rythme diurne et atteint un pic la nuit (Chen et al., 1997b).

Des souris knock-out pour le gène *Crx* ($Crx^{-/-}$) ont été réalisées. Ces souris sont viables, fertiles et ne présentent pas d'anomalies morphologiques flagrantes. A P10, les rétines de ces souris ne présentent aucune anomalie par rapport à des rétines de souris sauvages. Par contre, à P14 alors que les segments externes des photorécepteurs sont présents dans la rétine des souris sauvages, aucune structure de ce type n'est observable dans les souris $Crx^{-/-}$. A P21, ces souris mutantes ont une CNE très fine et les corps cellulaires des photorécepteurs sont localisés à proximité de l'épithélium pigmentaire (Furukawa et al., 1999). Des électrorétinogrammes ont été réalisés sur ces souris âgées d'un mois et ont montré que les photorécepteurs de ces souris n'ont aucune activité. Ce résultat suggère que ces souris sont probablement aveugles. Les souris hétérozygotes $Crx^{+/-}$ développent, quant à elles, des segments externes mais à P14 leur longueur est plus courte que celle des segments externes des souris sauvages. A P21, plus aucune différence morphologique n'est observable entre les souris mutantes hétérozygotes et les sauvages. Ces résultats suggèrent que la protéine Crx est nécessaire à la formation des segments externes des photorécepteurs. La glande pinéale des souris $Crx^{-/-}$ à un mois ne présente pas d'anomalie. Cependant, l'expression des gènes codant pour des enzymes clés de la synthèse de mélatonine est fortement réduite (Furukawa et al., 1999). De plus, l'expression des gènes codant pour des facteurs de la phototransduction tels que la rhodopsine, l'opsine bleue des cônes, l'arrestine des cônes qui sont généralement fortement exprimés dans la glande pinéale des rongeurs est complètement absente des souris $Crx^{-/-}$. Par contre, ces souris mutantes gardent un cycle circadien normal dans leur activité physique mais présentent une réponse lente aux changements dans les cycles jour-nuit. Ces résultats suggèrent que la protéine Crx pourrait être impliquée dans la régulation de l'expression des gènes de la glande pinéale.

Des expériences de surexpression ont été réalisées dans la rétine afin de déterminer la fonction de Crx dans la détermination du devenir des cellules de la rétine. Pour cela des rétines à P0 ont été infectées avec des rétrovirus contenant l'ADNc du gène *Crx*. L'expression de Crx apportée par le rétrovirus conduit à une augmentation de cellules de type photorécepteurs bâtonnets. Les interneurons et les cellules amacrines sont complètement absents et le nombre de cellules gliales est réduit. Cependant, toutes les cellules n'adoptent pas un type photorécepteur bâtonnet. Ces résultats montrent que Crx n'est pas suffisant à lui seul pour induire le devenir cellulaire de type photorécepteur bâtonnet mais révèle que la protéine Crx est impliquée dans la différenciation de ces photorécepteurs et qu'elle pourrait inhiber la différenciation des autres types cellulaires (Furukawa et al., 1997). Cette approche par infection de rétines a également permis de déterminer les domaines fonctionnels et nécessaires aux fonctions de la protéine Crx (Chau et al., 2000) (Fei and Hughes, 2000).

4. *Otx2*

Le gène *Otx2* a été identifié en même temps que le gène *Otx1* lors d'un criblage de banque d'ADNc avec une sonde correspondant à l'homéodomaine d'*orthodenticle* (*Otd* : gène de drosophile) (Simeone et al., 1992; Simeone et al., 1993). Les premières études sur ce gène ont montré qu'il présente trois exons et code pour une protéine de 289 acides aminés (Simeone et al., 1992; Simeone et al., 1993). Son expression est détectée très tôt au cours de l'embryogenèse et se poursuit au cours du développement dans le cerveau, l'œil, l'oreille et le système olfactif (Simeone et al., 1992; Simeone et al., 1993). La réalisation de souris déficientes pour ce gène a montré que ce dernier est fondamental dans la formation du cerveau des mammifères.

Otx2 est exprimé avant le début de la gastrulation (avant E5,5) dans l'épiblaste et dans la région distale de l'endoderme viscéral. A la gastrulation, E7 à 7,5, son expression est localisée dans l'AVE (anterior visceral endoderm) et dans la région de l'épiblaste qui correspond au futur neurectoderme antérieur (Mallamaci et al., 1996) (Simeone et al., 1993). Ensuite son expression est détectée dans le télencéphale, le diencephale et le mésencéphale (Simeone et al., 1993). Par la suite, au cours du développement du cerveau, on retrouve l'expression d'*Otx2* dans certaines régions et structures du cerveau antérieur (Mallamaci et al., 1996) (Simeone et al., 1993). Par contre, le gène *Otx2* est absent du métencéphale, du myélencéphale et de la moelle épinière. Dans l'oreille interne de souris, *Otx2* est co-exprimé avec *Otx1* dès E10,25, dans la vésicule otique. Le gène *Otx2* est exprimé dans l'extrémité ventrale de cette vésicule. Au cours du développement, la frontière dorsale des domaines d'expression d'*Otx2* correspond au territoire de l'utricule (Cantos et al., 2000) (Simeone et al., 1993). A partir de E10, la protéine *Otx2* est exprimée dans les placodes olfactives. Quand les placodes s'invaginent, le signal devient plus fort dans la partie profonde de la fosse nasale où l'épithélium olfactif se développe (Mallamaci et al., 1996) (Simeone et al., 1993).

A E9,5, une expression d'*Otx2* est détectée dans la vésicule optique (Martinez-Morales et al., 2001) (Simeone et al., 1993). A E11, cette expression est détectée dans l'épithélium pigmentaire présomptif. A E12,5, *Otx2* est détecté dans la sclérotique, la RPE et dans les leptoméninges entourant le nerf optique. A E13, l'expression dans la neurorétine débute et est diffuse (Baas et al., 2000) (Martinez-Morales et al., 2001) (Simeone et al., 1993). Puis, à E16, les cellules ganglionnaires et la RPE expriment *Otx2*, ainsi que quelques cellules dans la rétine (Baas et al., 2000) (Martinez-Morales et al., 2001) (Simeone et al., 1993). Chez le poulet, *Otx2* est exprimé de manière diffuse à travers toute la vésicule optique dès le début du développement de l'œil (Bovolenta et al., 1997). Par la suite, quand la vésicule optique rentre en contact avec l'ectoderme de surface, l'expression d'*Otx2* se restreint à la partie centrale de la vésicule. Quand

la cupule optique se forme, *Otx2* n'est plus exprimé que dans la couche externe de la cupule qui va former l'épithélium pigmentaire. Ce patron d'expression précoce est complémentaire de *Pax-2* qui est localisé dans la partie ventrale de l'œil en développement et dans le nerf optique. L'expression d'*Otx2* dans l'épithélium pigmentaire est toujours observée à tous les stades de développement analysés, mais aussi dans quelques cellules de la neurorétine en position centrale aux environs du stade 22. Le nombre de cellules exprimant *Otx2* dans la neurorétine augmente au cours du temps selon un gradient allant du centre vers la périphérie de la rétine. La caractérisation des cellules de la neurorétine qui expriment ce gène montre qu'il s'agit de neuroblastes post-mitotiques qui se différencient (Bovolenta et al., 1997). Ces résultats suggèrent qu'*Otx2* pourrait avoir un double rôle dans le développement de l'œil. *Otx2* pourrait être nécessaire à la spécification et au développement de l'épithélium pigmentaire, et pourrait être impliqué dans la différenciation des différentes cellules formant la neurorétine.

a. Fonctions de la protéine Otx2

Les premières informations concernant la fonction de la protéine Otx2 sont issues de la réalisation de souris déficientes pour ce gène. Ces souris ont été réalisées par trois équipes qui ont utilisé des approches différentes. L'étude du phénotype de ces souris a permis de mettre en évidence le rôle fondamental d'*Otx2* dans la formation du cerveau mais aussi au cours du développement de l'œil et de l'oreille interne. Les loci du gène *Otx2* recombinaison obtenus par les différentes équipes sont les suivants (figure 21) :

- le premier consiste au remplacement de la séquence codante du gène *Otx2* par le gène *LacZ* (Acampora et al., 1995)

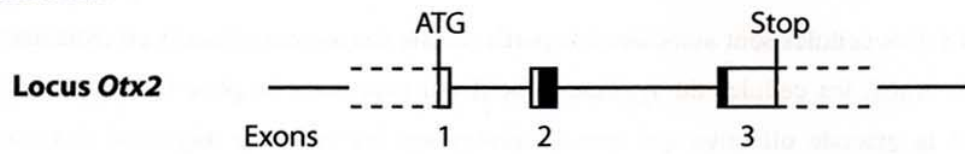
- le second locus recombinaison correspond à une insertion dans l'exon 2 d'*Otx2* du gène *néomycine* qui apporte un site précoce de fin de transcription (Matsuo et al., 1995), cette recombinaison conduit à la synthèse d'une protéine tronquée de 61 acides aminés

- le troisième locus, nommé *Otx2^{hd}*, consiste à la délétion de l'homéodomaine et des introns, seul subsiste l'exon 1 (Ang et al., 1996).

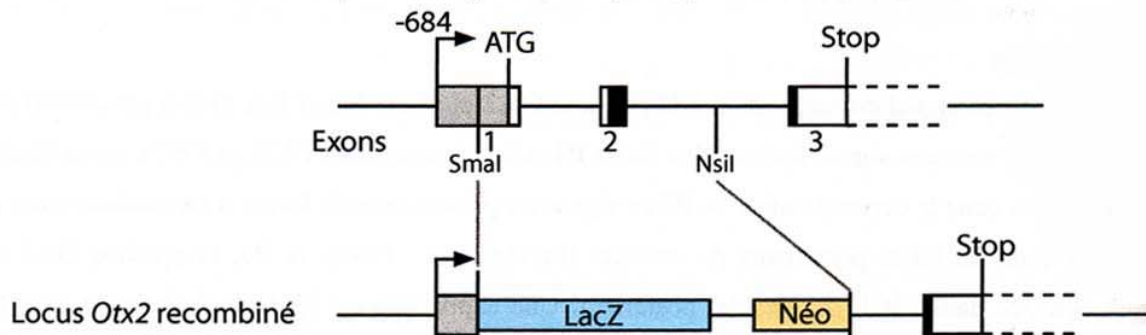
Ces différentes modifications du locus d'*Otx2* aboutissent à des phénotypes similaires chez les souris, mais apportent des informations complémentaires sur les fonctions et la régulation de l'expression d'*Otx2*.

Les souris hétérozygotes pour le premier locus recombinaison ne présentent aucune anomalie (Acampora et al., 1995). Des souris *Otx2^{-/-}* ont été générées à partir des souris *Otx2^{+/-}*. Les souris homozygotes ainsi obtenus meurent *in utero* à environ E10 et ne possèdent aucune structure antérieure correspondant au cerveau antérieur et moyen. Dans la partie la plus antérieure de ces

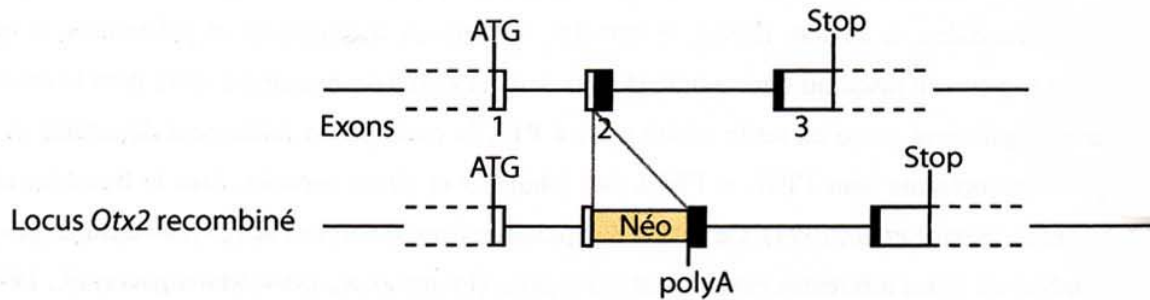
A. Le gène *Otx2*



B. Le locus *Otx2* recombinaé par Acampora *et al.* (1995)



C Le locus *Otx2* recombinaé par Matsuo *et al.* (1995)



D. Le locus *Otx2* recombinaé par Ang *et al.* (1996)

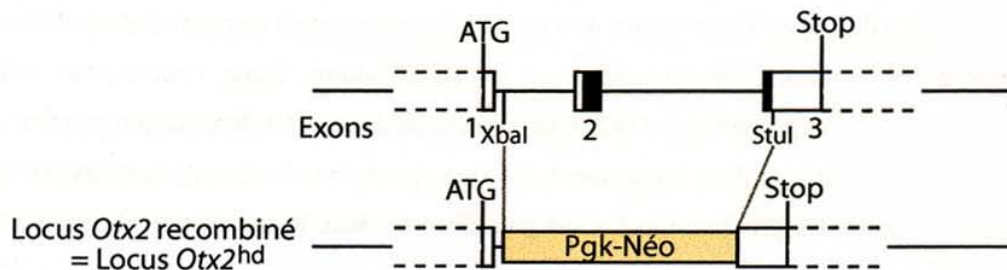


Figure 21 : Structure des loci *otx2* recombinaés pour la réalisation de souris K.O. déficientes pour ce gène. A. Le gène *otx2* : structure décrite par Simeone *et al.*, 1992 et 1993. Ce gène présente 3 exons. La région codant pour l'homéodomaine (en noir) est présente dans les exons 2 et 3. les sites d'initiation et de fin de transcription n'ont pas été cartographiés précisément (traits pointillés). En B., C. et D. représentation des loci recombinaés par les équipes respectives.

embryons, le tube neural s'interrompt brutalement. Le phénotype de ces souris couplé à l'absence de protéines β -galactosidase dans l'épiblaste des souris mutées pour ce gène suggèrent que le neurectoderme antérieur n'ait pas été correctement spécifié, il semble ne pas avoir été induit. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que le gène *Otx2* est impliqué dans l'induction du neurectoderme antérieur et par conséquent serait responsable de la régionalisation de l'épiblaste (Acampora et al., 1995).

Avec le second locus recombiné d'*Otx2*, la majorité des souris hétérozygotes meurt le premier jour après la naissance et présentent une tête anormale. Seul 16% des animaux apparaissent normaux. Une analyse de ces souris révèle qu'elles présentent des phénotypes variés plus ou moins graves. La majorité d'entre elles n'ont pas de mâchoire inférieure, des yeux microphthalmiques ou anophtalmiques. Dans les cas de microphthalmie, les yeux sont soit protubérants soit enfoncés dans l'orbite. Le cristallin, la cornée et l'iris sont souvent absents et l'épithélium pigmentaire ainsi que la neurorétine sont anormaux. La cavité nasale et le bulbe olfactif sont souvent déformés et ont de nombreuses anomalies morphologiques. Dans les cas d'anophtalmie, seulement une trace de cellules pigmentées est détectée à la place de l'œil mais le chiasma optique est normalement présent. Certaines des souris présentent des structures antérieures anormales (holoprosencéphalie), d'autres n'ont pas de structures correspondant au cerveau antérieur et moyen. Les souris hétérozygotes présentant un phénotype normal (16%) ont été croisées pour obtenir des souris homozygotes *Otx2*^{-/-}. Toutes les souris ainsi obtenues n'ont pas de structures antérieures de la tête et meurent aux environs de E10 (Matsuo et al., 1995). La différence de phénotype observée entre les souris *Otx2*^{+/-} obtenues par Matsuo et al. (1995) et celles obtenues par Acampora et al. (1995) a été attribuée au fond génétique des souris utilisées dans ces expériences mais également à des modifications des séquences de régulation de l'expression et de la stabilité des messagers.

Les souris hétérozygotes pour le troisième locus recombiné du gène *Otx2* sont normales et fertiles (Ang et al., 1996). Cependant, quelques souris *Otx2*^{+/-} présentent un tube neural ouvert qui conduit à un défaut du cerveau antérieur et moyen. Les embryons *Otx*^{hd/hd} présentent un phénotype identique aux souris déficientes pour le gène *Otx2* obtenues par les autres équipes. Une étude plus détaillée de la gastrulation montre que ces embryons ont une ligne primitive désorganisée qui conduit au développement anormal du mésoderme.

L'ensemble de ces résultats a révélé que le gène *Otx2* a un rôle crucial lors de la formation du cerveau. L'absence de ce gène est létale et conduit à l'arrêt du développement des structures antérieures de l'animal. De plus, la comparaison des phénotypes obtenus montre que le fond génétique des souris est impliqué dans la pénétrance du phénotype.

Afin de mieux comprendre le rôle des protéines Otx dans la formation du cerveau, des souris présentant des altérations pour les gènes *Otx1* et *Otx2* ont été réalisées. Cette approche réalisée par deux équipes indépendantes apporte des résultats identiques (Acampora et al., 1997) (Suda et al., 1997). Les souris mutantes pour *Otx2* correspondent aux loci 2 et 3 précédemment mentionnés. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris *Otx1*^{-/-} ou *Otx1*^{+/-}. Les souris mutantes homozygotes pour les deux gènes ne sont pas viables. Les souris *Otx1*^{+/-} *Otx2*^{+/-} et *Otx1*^{-/-} *Otx2*^{+/+} sont normales. Par contre les souris *Otx1*^{-/-} *Otx2*^{+/-} ont des anomalies des structures antérieures de la tête différentes de celles observées dans les autres souris mutantes pour ces gènes. Ces souris n'ont pas de mésencéphale et le diencéphale est réduit. Le métencéphale de ces souris est plus étendu rostralement et occupe la région du mésencéphale et la région caudale du diencéphale. Ces résultats suggèrent que le phénotype du cerveau de ces souris pourrait être la conséquence d'un processus de redéfinition des structures du cerveau. La quantité de protéines Otx synthétisées dans les souris *Otx1*^{-/-} *Otx2*^{+/-} semble responsable de cette transformation suggérant que les protéines Otx1 et Otx2, par un effet de dose, sont nécessaires pour spécifier correctement ces structures.

Dans l'œil de souris, les protéines Otx1, Crx et Otx2 sont exprimées. Toutes les souris *Otx1*^{-/-} *Otx2*^{+/-} et 30% des souris *Otx1*^{+/-} *Otx2*^{+/-} présentent des malformations oculaires importantes qui affectent le cristallin, l'épithélium pigmentaire, la neurorétine et le pédoncule optique (Martinez-Morales et al., 2001). Au cours du développement de l'œil, la vésicule optique est sévèrement altérée et l'expression des gènes spécifiques de l'épithélium pigmentaire tels que *Mitf* et *tyrosinase*, est absente suggérant que l'épithélium pigmentaire n'est pas spécifié. Plus tardivement dans le développement, la région de l'épithélium pigmentaire acquiert des caractéristiques de neurorétine. Ces résultats suggèrent qu'une régulation par la quantité de protéine Otx est nécessaire pour un développement normal de l'œil. De plus, ces résultats montrent que la détermination et la différenciation de l'épithélium pigmentaire nécessitent l'expression de ces deux protéines (Martinez-Morales et al., 2001). Le développement de l'œil n'est pas uniquement dépendant d'une dose de protéine Otx, il est également dépendant de l'identité des protéines Otx exprimées. En effet, des anomalies importantes de l'œil sont observées dans les souris *Otx1*^{+/-} *Otx2*^{+/-} mais pas dans les souris *Otx1*^{-/-} *Otx2*^{+/+}. Dans les deux cas, seulement deux allèles Otx sont fonctionnels mais c'est l'absence d'allèles *Otx2* qui semble responsable de l'altération de l'œil. Ce résultat est corroboré par le phénotype des souris hétérozygotes pour *Otx2* qui présentent des microphthalmies ou anophthalmies. Ces résultats ainsi que les patrons d'expression du gène *Otx2* montrent que ce gène pourrait être impliqué dans différentes étapes de la formation de l'œil des vertébrés. Ces étapes correspondent à la

détermination du feuillet où l'œil se forme, la morphogenèse de la cupule optique, la détermination de l'épithélium pigmentaire et la génération spécifique de certains neurones de la rétine (Bovolenta et al., 1997) (Martinez-Morales et al., 2001).

b. Régulation de l'expression d'*Otx2*

La réalisation de transgènes correspondant au promoteur du gène *Otx2* fusionné avec le gène rapporteur *LacZ* a permis d'identifier des séquences régulatrices de l'expression de ce gène (Kimura et al., 1997). Un fragment de 1800 pb présent en 5' du site d'initiation de la traduction a été utilisé dans ces expériences. L'étude de l'expression du transgène dans les embryons a permis dans un premier temps de confirmer, par des expériences de RT-PCR sur des ARNm extraits d'embryons à E9,5, le site d'initiation de démarrage de la transcription identifié préalablement par Simeone et al. (Simeone et al., 1995). Ce site est présent entre 852 et 722 nucléotides en amont du site de démarrage de la traduction. L'identification de ce site a également permis de localiser une boîte TATA dans ce promoteur. Cette étude a ensuite permis de montrer que ce fragment de 1800 pb est nécessaire et suffisant pour exprimer le gène *Otx2* à E10,5, dans le mésenchyme céphalique au niveau du diencéphale et du mésencéphale. Pour identifier les séquences régulatrices des délétions de l'extrémité 5' de ce fragment ont été réalisées. Ces expériences ont mis en évidence une région de 49 pb à environ 900pb du site de démarrage de la traduction qui est nécessaire à l'expression du gène *Otx2* dans le mésenchyme céphalique. Une comparaison avec le promoteur du gène *Otx2* du poisson Fugu a révélé que cette séquence de 49 pb est conservée. La séquence du Fugu est également capable de cibler l'expression du gène rapporteur dans les crêtes mésenchymateuses des embryons de souris.

L'étude de ces transgènes a également permis de localiser la séquence régulatrice responsable de l'expression d'*Otx2* dans l'endoderme viscéral (Kimura et al., 2000). Cette séquence correspond à une région de 140 pb localisée dans les 1800 pb présents avant le site de démarrage de la traduction. Notons que des travaux ont montré que les régions 5' UTR (UnTranslated Region) et 3' UTR sont impliquées dans le contrôle de la traduction des ARNm d'*Otx2* (Acampora et al., 2001). Deux autres promoteurs ont été caractérisés dans le gène *Otx2* de souris (Courtois et al., 2003). En effet, ces travaux ont permis de mettre en évidence deux nouveaux sites d'initiation de la transcription situés respectivement à -5017 pb et -2598 pb du site d'initiation de la traduction, et de montrer que le premier site qui avait déjà été décrit (Simeone et al., 1995) est situé à -207 pb et non 500 à 800 pb en amont. Les trois transcrits ainsi obtenus ne diffèrent que dans leurs extrémités 5' non codantes. Ces travaux ont permis de caractériser deux nouveaux promoteurs situés respectivement entre les nucléotides -7800 et -

4925 et entre les nucléotides -4655 et -2503. Deux des promoteurs de *Otx2* ont également été caractérisés dans le travail présenté dans la partie résultats.

Enfin, des expériences de « knock-in » remplaçant les séquences codantes de *Otx2* par celles de *Otx1* tout en gardant certaines séquences de régulations de *Otx2* conduisent à la genèse de souris normales, suggérant que les différences entre *Otx2* et *Otx1* sont plutôt liées aux différences dans leurs séquences de régulation que dans leur séquence codante (Acampora et al., 2003).

VI. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION MAF

c-maf est le premier membre de la famille qui a été isolé sous sa forme oncogénique, ce qui fait de lui en quelque sorte le prototype de la famille. L'oncogène v-maf a été identifié à partir d'un rétrovirus aviaire oncogénique, l'AS42, capable d'induire des fibrosarcomes musculoaponeurotiques *in vivo* chez le poulet et de transformer des fibroblastes embryonnaires de poulet *in vitro* (Nishizawa et al., 1989). L'analyse de la séquence de la protéine Maf (MusculoAponeurotic Fibrosarcoma) a permis de la classer parmi les protéines de type b-Zip. Les similitudes de séquence et d'organisation structurale ont fait de Maf un nouveau membre de la super famille des facteurs de transcription AP1. L'isolement et la caractérisation de nouvelles protéines Maf ont permis par la suite d'établir que ces protéines forment une sous-famille de facteurs de transcription à domaine b-Zip.

1. La famille Maf

Chez les vertébrés, la famille des gènes *maf* est composée de sept membres qui sont donc des facteurs de transcription ayant en commun un domaine de liaison à l'ADN de type B-LZ ou b-Zip (basic-Leucine Zipper). Ils peuvent être regroupés en fonction de leurs homologies en deux classes : les grands membres qui possèdent un domaine de transactivation dans leur partie amino-terminale, et les petits membres qui en sont dépourvus (figure 22). Les protéines c-Maf aviaire (Kataoka et al., 1993; Kurschner and Morgan, 1995) appelée Maf-2 chez le rat (Yoshida et al., 1997), MafB aviaire (Kataoka et al., 1994a) également appelée Krml1 ou Kr (Kreissler) chez la souris (Cordes and Barsh, 1994; Huang et al., 2000) ou Maf-1 chez le rat (Yoshida et al., 1997) ou encore valentino/Zkrml chez le poisson zèbre (Moens et al., 1998; Schvarzstein et al., 1999), Nrl (Neural Retina Leucine zipper) isolée chez l'homme et la souris (Farjo et al., 1993; Swaroop et al., 1992) et enfin MafA/L-Maf isolée plus récemment chez la caille et la poule (Benkhelifa et

al., 1998; Ogino and Yasuda, 1998) forment la classe des grands Maf qui possèdent un domaine de transactivation. Au contraire, les protéines MafF (Fujiwara et al., 1993), MafG (Kataoka et al., 1995) et MafK (Fujiwara et al., 1993) appelée p18 chez la souris (Andrews et al., 1993; Igarashi et al., 1995) ne contiennent pas ce domaine et du fait de leur faible masse moléculaire constituent les petits membres de cette famille. Les homologues de *mafG* et *mafK* ont été clonés chez l'homme (*hmafG* et *hmafK*) (Blank et al., 1997; Toki et al., 1997). Il est important de noter que seuls les grands membres de la famille Maf ont des capacités transactivatrices liées à leur domaine transactivateur (domaine acide) et à la présence de répétition d'acides aminés histidine et glycine entre le domaine transactivateur et le domaine de liaison à l'ADN (figure 22) (Kataoka et al., 1994a; Kataoka et al., 1996; Kumar et al., 1996).

2. La liaison à l'ADN des protéines Maf

Les protéines Maf sont très similaires dans leur domaine de liaison à l'ADN (Kerppola and Curran, 1994) (Kataoka et al., 1996). En plus de leur domaine b-Zip de liaison à l'ADN, les protéines Maf possèdent une région d'homologie étendue appelée "Ancillary domain", cette région est nécessaire à leur liaison à l'ADN et peut également leur conférer une spécificité de liaison (Kerppola and Curran, 1994). Elle est constituée d'acides aminés chargés au sein desquels se trouve une répétition de résidus hydrophobes non chargés tous les 3-4 acides aminés. De ce fait, elle n'est pas considérée comme une extension du domaine basique mais plutôt comme une unité séparée. Ce domaine conservé chez les protéines de la famille Maf est une particularité car il n'est retrouvé chez aucun autre facteur de transcription de type b-Zip.

Les protéines Maf peuvent se lier à l'ADN sous la forme d'homodimères au niveau de séquences palindromiques appelées MARE (MAF Responsive Element) (Kataoka et al., 1994b) (Kerppola and Curran, 1994). Ces séquences MARE représentent également des sites consensus pour les protéines des familles AP1 et CREB. Ces séquences sont de type TRE ou CRE et lient respectivement les protéines de la famille Fos/Jun et de la famille ATF/CREB. De ce fait, les protéines Maf reconnaissent les séquences de type TRE pour T-MARE : **TGCTGACTCAGCA**; ou CRE pour C-MARE : **TGCTGACGTCAGCA**. Les mutations dans la partie centrale du palindrome affectent peu la liaison des protéines Maf (Kerppola and Curran, 1994). Par contre, les nucléotides situés aux extrémités 5' et 3' des séquences MARE (TGC et GCA) sont déterminants pour la fixation des protéines Maf (Kerppola and Curran, 1994). La région d'homologie étendue (ancillary domain) est responsable de la reconnaissance des extrémités des sites, quant au domaine basique du domaine b-Zip il reconnaît les séquences centrales des sites.

Les protéines Maf peuvent aussi former des hétérodimères entre elles ou avec d'autres

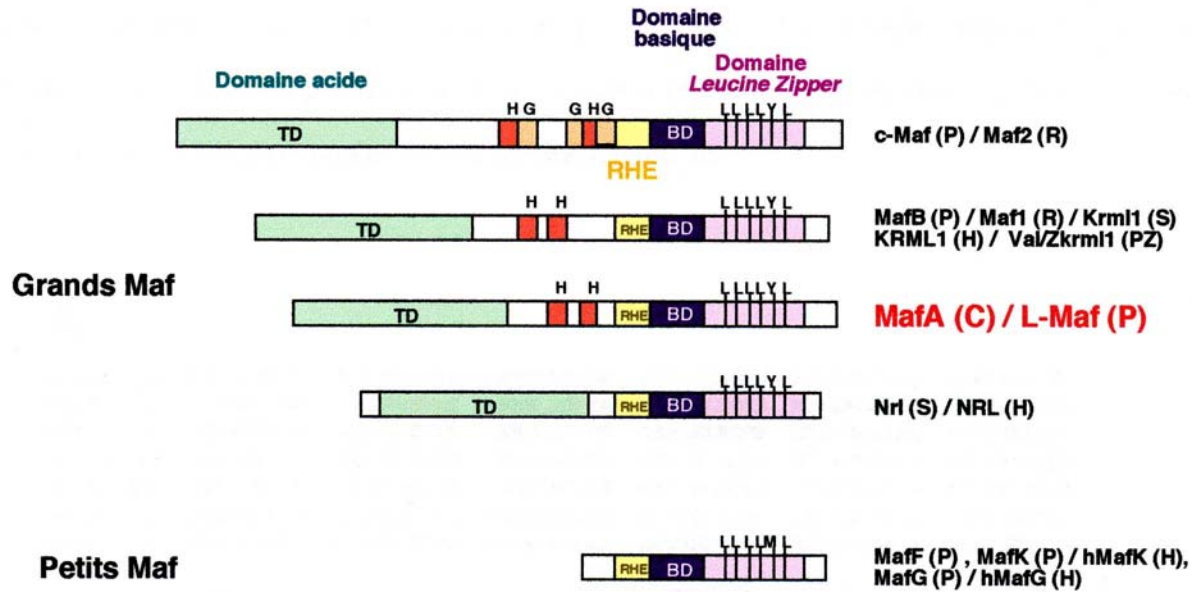


Figure 22: Schéma des différents membres de la famille des facteurs de transcription Maf. H: répétitions d'Histidine; G: répétitions de Glycine; RHE: Région d'Homologie Etendue; LZ: Leucine Zipper; BD: Binding Domain; TD: Transactivating Domain. (P): Poule; (C): Caille; (S): Souris; (R) : Rat; (H): Homme; (PZ): Poisson Zèbre.

protéines de type b-Zip. La spécificité de liaison des hétérodimères formés dépend alors de chacun des partenaires engagés (Kerppola and Curran, 1994).

3. Fonctions des protéines Maf

Comme il a déjà été mentionné, la famille des facteurs de transcription Maf a initialement été caractérisée à partir d'un rétrovirus aviaire oncogène codant l'oncoprotéine v-Maf (Nishizawa et al., 1989). Bien que les protéines Maf présentent des propriétés oncogéniques, les proto-oncogènes *maf* jouent aussi un rôle important dans différents processus de différenciation (pour revue (Blank and Andrews, 1997; Motohashi et al., 1997))

a. Propriétés oncogéniques

A l'exception de la protéine NRL pour laquelle les propriétés transformantes n'ont pas été testées, l'ensemble des autres membres Maf est capable de transformer avec des efficacités différentes des fibroblastes embryonnaires de poule (Fujiwara et al., 1993; Kataoka et al., 1994a; Kataoka et al., 1993; Nishizawa et al., 2003). De plus, la dérégulation de l'expression de *c-maf* a été observée dans un nombre significatif de myélomes (Chesi et al., 1998). Il a aussi pu être établi que l'induction de certains mélanomes par le virus MuLV (Murine Leukemia Virus) est la conséquence de l'intégration de ce virus dans le génome, à proximité du locus *c-maf*, et de la surexpression de ce gène qui en résulte (Li et al., 1999; Li et al., 1998).

b. Rôles dans la différenciation

L'étude des profils d'expression de certains membres de la famille ainsi que la nature des gènes cibles de ces protéines suggèrent fortement que cette famille de facteurs de transcription joue un rôle dans la mise en place et le maintien de l'état différencié de certains tissus et de certains types cellulaires.

Ainsi, MafB/Kr est, chez la souris comme chez le poulet, exprimé dans le système nerveux et d'autres tissus ou organes tels que l'intestin, le foie, la rate et la moelle osseuse (Eichmann et al., 1997). Dans le système nerveux, le profil d'expression de *mafB/kr* est le même chez les mammifères et les oiseaux : ce gène est exprimé dans la moelle épinière et le rhombencéphale. Des souris mutantes homozygotes pour ce gène sont sourdes, tournent en rond et ne savent pas nager. Le phénotype de ces souris résulte d'un défaut de formation de certains rhombomères du rhombencéphale (dont celui correspondant à l'oreille interne), ceci étant dû au fait que MafB/Kr régule l'expression de certains gènes *hox* (*hoxa-3* et *hoxb-3*) impliqués dans la segmentation du rhombencéphale (Cordes and Barsh, 1994; Manzanares et al., 1999; Manzanares

et al., 1997; Theil et al., 2002). De plus, MafB est aussi important dans la différenciation myélonocyttaire. En effet, la surexpression de cette protéine induit la différenciation de myéloblastes en macrophages, alors que la surexpression d'une forme mutée dominante négative de MafB inhibe la différenciation de myéloblastes en macrophages (Kelly et al., 2000). De plus, MafB est capable d'inhiber la différenciation érythrocytaire, ceci dépendrait de la capacité de MafB à interagir avec Ets-1 et à inhiber la transactivation par ce dernier de ces gènes cibles (Sieweke et al., 1996; Sieweke et al., 1997).

c-Maf quant à lui inhibe l'expression d'une protéine CD13/APN, qui est spécifiquement exprimée par les granulocytes et les macrophages (Hedge et al., 1998). L'expression de cette protéine est régulée positivement par les facteurs de transcription c-Myb et Ets-1 de façon coopérative, or c-Maf en interagissant avec c-Myb forme un complexe inhibiteur de la transcription de ce gène (Hedge et al., 1998). Ceci suggère que la régulation de l'activité transcriptionnelle de c-Myb par c-Maf pourrait être un mécanisme important de régulation de l'expression de gènes au cours du développement des cellules hématopoïétiques.

c. Les facteurs de transcription Maf et l'œil

Les grands membres de la famille Maf sont exprimés dans l'œil, il n'est donc pas surprenant que cette famille de facteurs de transcription joue un rôle dans le développement de cet organe.

c.1. NRL et la neurorétine

Le profil d'expression de *nrl* coïncide avec l'établissement de la différenciation dans le cerveau et la rétine au cours du développement embryonnaire de la souris et suggère un rôle de celui-ci dans le maintien de l'état différencié de la neurorétine adulte (Liu et al., 1996; Swaroop et al., 1992). Au cours du développement, Nrl est exprimé dans tous les neurones post mitotiques et dans le cristallin, pour se restreindre ensuite aux photorécepteurs (Liu et al., 1996). Nrl est capable d'activer l'expression du gène codant la rhodopsine en se fixant directement sur son promoteur (Kumar et al., 1996; Rehemtulla et al., 1996). La rhodopsine est un constituant spécifique des photorécepteurs de type bâtonnet, elle est en association avec d'autres protéines essentielles pour la cascade de phototransduction. De plus, il a été montré que Nrl agit en synergie avec le facteur de transcription Crx (qui est important pour le développement des photorécepteurs) pour réguler l'expression de la rhodopsine (Chen et al., 1997b), cette action synergique pouvant se faire via une interaction physique entre ces deux protéines (Mitton et al., 2000). Les mutations de la sérine 50 de Nrl en thréonine (S50T) et de la proline 51 en leucine

(P51U) ont été associées à une forme autosomale de rétinite pigmentaire (Bessant et al., 1999; Martinez-Gimeno et al., 2001). La mutation S50T entraînerait une augmentation de la synergie avec Crx, ce qui aurait pour conséquence l'augmentation de la concentration en rhodopsine au niveau des photorécepteurs qui conduit à une mortalité importante de ces cellules. Enfin, plus récemment, la réalisation du "knock out" de *nrl* chez la souris a permis de définir le rôle de Nrl dans la neurorétine (Mears et al., 2001). Chez ces souris les photorécepteurs ont tous une morphologie de type cône et l'analyse de l'expression des gènes dans ces cellules montrent qu'il n'y a plus de photorécepteurs de type bâtonnet. Ces résultats suggèrent donc que Nrl induit la différenciation des photorécepteurs de type bâtonnet, en activant directement les gènes spécifiques des bâtonnets, et en inhibant simultanément la voie de différenciation en cellules de type cône.

c.2. Les grands Maf et le développement du cristallin

Nous venons de voir la fonction de Nrl dans la neurorétine. Or, c-Maf, MafB et L-Maf/MafA sont quand à eux exprimés dans le cristallin (Eichmann et al., 1997; Kawauchi et al., 1999; Kim et al., 1999; Ogino and Yasuda, 1998; Ring et al., 2000; Sakai et al., 1997).

Le rôle de c-Maf dans le développement du cristallin a pu être élucidé par l'invalidation de ce gène par trois équipes différentes (Kawauchi et al., 1999; Kim et al., 1999; Ring et al., 2000). Les souris dépourvues de c-Maf ont un développement defectueux du cristallin. En fait, on observe une absence d'élongation des fibres cristallines postérieures corrélée avec une altération de l'expression des gènes de certaines cristallines. En effet, on constate une absence d'expression de l'alphaA-cristalline et de toutes les bêta-cristallines (Ring et al., 2000). Des expériences *in vitro* montrent que c-Maf se fixe au niveau de sites TRE sur les promoteurs de l'alphaA, de la bêtaB2 et de la bêtaA4 cristallines (Ring et al., 2000) et qu'il active l'expression de la gamma cristalline (Kim et al., 1999). Ces résultats montrent que c-Maf est nécessaire pour la différenciation des fibres du cristallin, notamment, en régulant directement l'expression de certaines cristallines.

L-maf/maf-A a été isolé et caractérisé simultanément chez la poule et la caille (Ogino and Yasuda, 1998) (Benkhelifa et al., 1998). Ce gène est exprimé dans le cristallin mais aussi dans le cerveau et la rétine, et notamment son expression est régulée au cours du développement de la rétine. L'expression de *L-maf* est d'abord détectée dans la placode cristalline et est ensuite restreinte aux cellules du cristallin (Ogino and Yasuda, 1998). L'expression ectopique de *L-maf* induit l'expression des cristallines alpha, bêta et gamma dans différents types de cellules et sa surexpression dans des cellules de neurorétine en culture induit la transdifférenciation de ces

cellules en cellules fibres du cristallin (Ogino and Yasuda, 1998). De plus, *in ovo*, l'expression ectopique de L-Maf induit la formation de cellules fibres du cristallin à partir de cellules ectodermiques de la tête. Ces résultats suggèrent que L-Maf pourrait jouer un rôle dans l'induction et la différenciation du cristallin. Des résultats plus récents chez le poulet, obtenus par électroporation *in ovo*, montrent que lorsque l'on électropore des formes dominantes négatives de Pax6 on observe une répression de l'expression des gènes *L-maf*, *Prox1* et *δ-cristalline* (Reza et al., 2002). Cette répression s'accompagnant d'un défaut de formation du cristallin. L'expression des gènes réprimés peut être rétablie si L-Maf est coexprimé avec les dominants négatifs de Pax6. De plus, l'électroporation d'un dominant négatif de L-Maf inhibe l'expression de *Prox1* et *δ-cristalline*, alors que la surexpression de L-Maf active l'expression de ces gènes. Ces résultats montrent que *L-maf* est un gène cible de Pax6 et que L-Maf médie l'activité de Pax6 au cours du développement du cristallin. Cependant, L-maf ne doit pas être l'unique cible de Pax6 pour médier son activité dans le cristallin. En effet, il a aussi été montré que Pax6 peut réguler l'expression de *c-maf* dans des fibroblastes de souris en culture (Sakai et al., 2001). c-Maf et L-Maf pourrait donc agir de façon redondante dans le développement du cristallin.

Quant à MafB, bien qu'il soit exprimé dans le cristallin on ne connaît pas encore exactement son rôle dans le développement de celui-ci. Cependant chez le xénope, MafB est exprimé dans les cellules épithéliales du cristallin et active l'expression de certaines cristallines et de *pax6* (Ishibashi and Yasuda, 2001). Ce qui suggère que MafB pourrait avoir un rôle différent des autres grands Maf dans le cristallin.

RESULTATS

La capacité que présente la neurorétine en culture à se transdifférencier, soit dans la voie pigmentaire, soit dans la voie lenticulaire fait de ce système cellulaire un modèle extrêmement intéressant pour étudier au niveau moléculaire les événements contrôlant les processus de différenciation dans ces différentes voies. C'est ainsi que notre laboratoire a montré que l'oncogène myc était capable d'induire une transdifférenciation pigmentaire à partir de neurones, propriété partagée par le facteur Mitf (Planque et al., 1999 ; Plaza et al., 1999 oncogene, Martin et al., 1992). Plus récemment, nous avons montré que pax6 contrôlait négativement l'activité de Mitf (Planque et al., 2001b), ce qui pourrait avoir un rôle important pour permettre la partition du neuroépithélium de la vésicule optique en rétine pigmentaire (dans sa portion postérieure) et en neurorétine (dans sa portion antérieure) in vivo. Le gène Otx2 est exprimé dans la partie postérieure de ce neuroépithélium, et les souris invalidées dans les gènes Otx1 et Otx2 montrent une transdifférenciation de la rétine pigmentaire en neurorétine (Martinez-Morales et al., 2001), un phénotype semblable à celui observé dans le cas de mutations dans le gène Mitf (Nguyen and Arnheiter, 2000). Nous avons donc étudié le rôle de Otx2 dans la différenciation pigmentaire.

Enfin, les cellules de rétine en culture permettent l'étude de la combinatoire des facteurs responsables de l'utilisation des enhancers tissus spécifiques de Pax6. Il est en effet possible d'observer l'activité de promoteurs liés à différents enhancers dans ce système et d'en moduler l'activité avec des facteurs définis. Pax6 activant l'expression de c-maf (Sakai et al., 2001) nous avons étudié l'influence réciproque des membres de la famille Maf sur l'activité des séquences régulatrices de Pax6.

I. *Otx2* active le programme moléculaire de la différenciation de l'épithélium pigmentaire de la rétine.

L'expression ectopique de *mitf* dans des cellules de neurorétine en culture induit un phénotype pigmenté, montrant que ce facteur de transcription a la capacité d'induire le programme de différenciation de la rétine pigmentaire (Planque et al., 1999). Les travaux présentés ici montrent: 1) qu'*Otx2* induit également un phénotype pigmenté lorsqu'il est surexprimé dans des cellules de neurorétine, 2) qu'il régule positivement, en se fixant directement sur leurs promoteurs, les gènes cibles de *mitf*: les gènes de la *tyrosinase*, *trp-1* et *QNR71*. De plus, *Otx2* et *Mitf* interagissent physiquement *in vitro*, et ils sont co-distribués dans les noyaux de cellules de RPE lorsqu'ils sont co-transfectés. Enfin, leur co-expression conduit à l'activation synergique des promoteurs des gènes de la *tyrosinase* et de *QNR71* (Martinez-Morales et al., 2003).

1. *Otx2* induit un phénotype pigmenté

Afin de déterminer si *Otx2*, comme *Mitf*, est capable d'induire le programme de différenciation de la rétine pigmentaire nous avons réalisé des transfections stables de cellules de neurorétine de caille avec un vecteur d'expression contenant le gène *Otx2*. Comme contrôle positif, nous avons transfecté des cellules avec des vecteurs codant les isoformes *MitfA* et *MitfM*, et comme contrôle négatif nous avons transfecté le vecteur vide. Après sélection au G418 (ces vecteurs portent en effet le gène de résistance à la néomycine), on observe des foyers de cellules, certains de ces foyers étant pigmentés, non seulement dans les boîtes transfectées avec *MitfA* et *MitfM* mais aussi dans la boîte transfectée avec *Otx2* (figure 1, A-D). Aucun foyer pigmenté n'est observé avec le vecteur vide. Un certain nombre de cellules expriment *Mitf* dans les foyers pigmentés induit par *Otx2* et réciproquement un certain nombre de foyers pigmentés expriment *Otx2* dans les foyers induits par *Mitf* (figure 1, E et F). Ces résultats montrent qu'*Otx2*, tout comme *Mitf*, peut induire un phénotype pigmenté lorsqu'il est surexprimé dans des cellules de neurorétine, et qu'il peut exister une boucle de régulation positive entre *Otx2* et *Mitf*.

2. *Otx2* régule le promoteur d'un transcrit alternatif nouvellement identifié

Les résultats précédents soulignent l'importance des gènes *Mitf* et *Otx2* dans l'induction d'un phénotype pigmenté mais ne nous renseignent pas sur les relations hiérarchiques qui existent entre ces deux facteurs de transcription. Tout d'abord nous avons décidé de vérifier si *Mitf* pouvait réguler l'expression d'*Otx2* et réciproquement. Après séquençage d'un fragment

d'ADN de 8,2 kb situé en amont de la séquence codante du gène *Otx2* de souris, alignement avec la séquence humaine et comparaison avec les banques de données EST, Juan Ramon Martinez-Morales a pu mettre en évidence deux ARN messagers différents d'*Otx2* qui sont conservés phylogénétiquement. Ces deux transcrits sont obtenus par épissage alternatif, ils codent tous les deux la même protéine mais sont différents dans leurs parties 5' non codantes et par conséquent différent par leurs régions promotrices (figure 2, A). Ces deux transcrits ont été appelés T0 et T1, ce dernier étant déjà décrit (Simeone et al., 1993). Les deux ARNm sont transcrits avec des intensités relatives différentes dans les embryons de souris à E9,5 ainsi que dans l'œil 2 jours après la naissance et dans l'œil adulte (figure 2, B). Ces résultats sont confirmés par hybridation *in situ* avec des sondes spécifiques des extrémités 5' et une sonde commune de la région 3' (figure 2, C). Notons cependant que les transcrits T0 sont plus fortement exprimés. Les résultats d'hybridation *in situ* correspondent au patron d'expression déjà décrit (Bovolenta et al., 1997) (Simeone et al., 1993).

Outre la mise en évidence de deux transcrits différents pour *Otx2*, ces travaux ont permis de cloner un fragment de 1kb en amont du site d'initiation du deuxième transcrit (T0). Ce fragment a été inséré dans un vecteur rapporteur contenant le gène de la luciférase afin de tester sa potentielle capacité promotrice, le plasmide ainsi obtenu a été appelé pOTX2luc-974. Nous avons ainsi pu tester en transfection les capacités promotrices de cette région et les comparer avec la région promotrice du transcrit T1 déjà caractérisée (plasmide pOTX2-1219). On observe que ces deux constructions présentent des activités promotrices (figure 3, A). Par des expériences de cotransfection, nous avons observé qu'*Otx2* active le promoteur du transcrit T0, alors qu'il est sans effet sur le promoteur de T1 (figure 3, B). De plus, nous avons observé que *Mitf* n'activait pas les promoteurs d'*Otx2* (figure 3, B). Enfin, *Otx2* n'active pas le promoteur du gène *MitfA* ainsi que *Mitf* lui-même (figure 3, C). Ces résultats suggèrent que si des boucles de régulations entre *Otx2* et *Mitf* existent, soit elles nécessitent l'action d'autres facteurs intermédiaires, soit nous n'avons pas isolé les éléments de réponse à *Otx2* et *Mitf* des différents promoteurs.

3. *Otx2* régule les promoteurs de gènes de la pigmentation

De nombreux foyers pigmentés obtenus avec *Otx2* n'exprimant pas *Mitf*, nous avons voulu tester si *Otx2* pouvait réguler directement l'expression de gènes spécifiques de la rétine pigmentaire. Pour cela, nous nous sommes concentrés sur trois gènes qui sont : *QNR71*, *tyrosinase* et *trp-1*. Le premier code une glycoprotéine transmembranaire (Le Borgne et al., 2001; Turque et al., 1996), les deux autres codent des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la mélanine. Les régions promotrices de ces gènes ont déjà été caractérisées et il a été démontré

que Mitf régule ces gènes (Goding, 2000). Ainsi, nous avons réalisé des cotransfections avec des plasmides contenant les promoteurs de *QNR71*, *tyrosinase* et *trp-1* couplés à des gènes rapporteurs et des vecteurs d'expression d'Otx2, d'Otx1 et de Mitf. Nous avons observé qu'Otx2 active de manière significative et dose dépendante les promoteurs de *QNR71*, *tyrosinase* et *trp-1* (figure 4, A). Par contre, le mutant d'Otx2 (Q50), dans lequel la lysine en position 50 dans l'homéodomaine a été substituée par une glutamine empêchant celui-ci de se lier sur l'ADN au niveau de séquences consensus de type bicoïde, n'active pas les promoteurs des trois gènes (figure 4, A). Ce résultat montre la spécificité de la transactivation par Otx2 des trois promoteurs. On observe aussi qu'Otx1 active les promoteurs de la *tyrosinase* et de *trp-1* mais de façon moins importante, et la cotransfection d'Otx2 avec Otx1 n'aboutit pas à une activation synergique des promoteurs (figure 4, A) suggérant que ces deux facteurs se lient sur l'ADN au niveau de séquences identiques. Comme il a déjà été montré, Mitf active les promoteurs des trois gènes (figure 4, B) et de façon tout à fait intéressante agit en coopération avec Otx2 sur ces promoteurs (figure 4, B). Ceci suggère que l'action coordonnée de Mitf et Otx2 puisse être nécessaire à l'activation de ces gènes.

L'analyse des séquences des promoteurs des gènes *QNR71*, *tyrosinase* et *trp1* nous a permis de trouver plusieurs séquences de type bicoïde (figures 5, A ; 6, A et 7, A) à proximité de boîtes M (CATGTG) déjà décrites dans ces promoteurs (Turque et al., 1996) et qui sont des sites de fixation pour Mitf. Afin de déterminer si la liaison à l'ADN d'Otx2 était requise où si ce facteur nécessitait la présence de cofacteurs pour s'y lier, nous avons cherché à définir quels pouvaient être les sites impliqués dans la transactivation des promoteurs par Otx2. Par des expériences de retard sur gel, nous avons pu vérifier que Mitf peut se fixer sur le promoteur de *trp-1* au niveau du site mitf1 (figure 5, A et B) et démontrer qu'Otx2 peut se fixer sur ce même promoteur au niveau de deux sites OtxA et OtxB (figure 5, A, C et D). Des expériences similaires avec le promoteur *tyrosinase* ont permis de montrer qu'Otx2 peut se fixer sur deux sites : OtxD et OtxF à proximité d'un des trois sites Mitf : Mitf2 (figure 6, A-C). Enfin, Otx2 peut se fixer sur le promoteur de *QNR71* au niveau de deux sites : Otx2 et Otx4 proches du site de fixation de Mitf (figure 7, A-B). La mutation des sites de fixation d'Otx2 abolissant la fixation de ce dernier (figure 7, A-B), nous avons étudié quelle pouvait être la conséquence fonctionnelle de cette perte de fixation. Par des expériences de cotransfection avec des vecteurs rapporteurs contenant le promoteur de *QNR71* muté dans le site Mitf ou dans les sites Otx2, nous avons observé que la mutation du site de fixation Mitf abolit la transactivation du promoteur par Mitf mais n'abolit pas la transactivation synergique avec Otx2 (figure 7, C). Par contre, la mutation des sites de fixation pour Otx2 abolit la transactivation par Otx2 et la transactivation synergique

avec Mitf (figure 7, C). Ces résultats montrent qu'Otx2 transactive le promoteur de *QNR71* en se fixant directement à celui-ci au niveau de séquences bicoïde et suggèrent que Mitf puisse non seulement réguler le promoteur de *QNR71* en se fixant directement à celui-ci mais aussi sans s'y fixer, en présence d'Otx2. De plus, ces résultats suggèrent fortement une interaction entre ces deux protéines.

4. Otx2 interagit physiquement avec Mitf via le domaine b-HLH-LZ

Afin de tester cette hypothèse nous avons réalisé des expériences de corétention protéique entre Otx2 et Mitf. Nous avons ainsi pu montrer que Mitf et Otx2 interagissent physiquement *in vitro* et que cette interaction nécessite le domaine b-HLH-LZ de Mitf (figure 8). De plus, comme Otx2 et Mitf interagissent *in vitro* nous avons voulu savoir ce qu'il en était dans les cellules de la RPE. Pour cela, nous avons regardé la localisation nucléaire de ces deux protéines, lorsqu'elles sont surexprimées dans des cellules de RPE en culture, à l'aide d'une technique de microscopie 3D à déconvolution. Nous avons donc cotransfecté des cellules de RPE avec des vecteurs exprimant MitfA ou MitfM fusionnées à une protéine fluorescente DsRed (rouge) et un vecteur exprimant Otx2 fusionnée à une protéine fluorescente GFP (verte). Nous observons que MitfA et MitfM colocalisent avec Otx2 dans les noyaux des cellules, la superposition du vert et du rouge donnant un signal jaune (figures 9, A-F). Afin de montrer que cette colocalisation n'était pas simplement due à l'expression de deux facteurs de transcription, nous avons réalisé la même expérience en utilisant la protéine MycGFP, car Myc n'interagit pas avec Mitf *in vitro*. Dans ce cas nous n'observons que très peu de signal jaune (figure 9, G-I).

L'ensemble de ces données montre que Otx2 peut réguler tout comme Mitf le programme moléculaire de la différenciation de la rétine pigmentaire. De plus, Otx2 peut agir en synergie avec Mitf, probablement au sein d'un même complexe, pour activer des gènes impliqués dans la différenciation pigmentaire. Enfin, nos résultats suggèrent l'existence d'une boucle de régulation positive d'expression entre ces deux gènes.

II. Régulation de l'expression de *pax6* par les facteurs de transcription Maf

1. Introduction

L'expression de *pax6* au cours du développement est particulièrement régulée dans les différents tissus qui composent l'œil. En effet, comme nous l'avons présenté dans le chapitre III partie 5, l'expression de *pax6* est contrôlée par deux promoteurs P0 et P1, P1 étant un promoteur ubiquiste et P0 un promoteur inductible spécifique de la neurorétine (Plaza et al., 1995b). Ce promoteur P0 est aussi sous le contrôle de différents enhanceurs, qui sont eux-mêmes tissu-spécifiques (voir chapitre III partie 5). L'un de ces enhanceurs a été découvert et particulièrement étudié au sein du laboratoire, il s'agit de l'enhancer α (Plaza et al., 1995a). Cet enhancer est spécifique de P0 et de la neurorétine (Plaza et al., 1995a). L'étude de l'enhancer α a permis, grâce à des expériences de protection à la Dnase1 avec des extraits nucléaires de neurorétine, de définir quatre régions nommées respectivement DF1, DF2, DF3 et DF4 où se fixent des protéines spécifiques de la neurorétine (Plaza et al., 1995a). Des expériences de cotransfection avec des vecteurs dans lesquels ont été clonés ces différentes "boîtes" multimérisées en position enhancer montrent que les répétitions de la région DF4 confèrent une activité enhancer qui augmente avec le nombre de copies clonées, alors que les autres régions ne confèrent pas ce type d'activité. Le même type d'expériences, mais cette fois en réalisant des délétions des différentes "boîtes", montrent que la délétion de DF1 ou DF4 réduit considérablement l'activité enhancer et que la délétion supplémentaire de DF2 ou DF3 réduit encore davantage cette activité. Bien que, la multimérisation de la région DF4 dans ces expériences mime l'activité de l'enhancer α , les résultats pris dans leur ensemble suggèrent que les différentes régions DF coopèrent pour fournir l'activation maximale de l'enhancer α (Plaza et al., 1995a). De plus, des expériences de gel retard montrent que des protéines de la neurorétine peuvent se fixer sur les quatre régions et d'autres ne se fixent que sur une seule région, ce qui renforce l'idée que ces régions coopèrent. La recherche des protéines qui peuvent se fixer sur cet enhancer a été entreprise. Il a ainsi pu être montré que le facteur de transcription Brn3b, qui est un facteur important pour la différenciation des cellules ganglionnaires (Wang et al., 2002), peut se fixer au niveau de la région DF4 sur l'enhancer α et activer la transcription de *pax6* (Plaza et al., 1999b). Une autre protéine a aussi été isolée par sa capacité à se fixer sur l'enhancer α , il s'agit de la PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) qui est une protéine qui intervient dans la réparation de l'ADN et qui pourrait aussi influencer sur la régulation de l'expression de *pax6* (Plaza et al., 1999a) en favorisant la formation des complexes protéiques sur l'activateur α .

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les facteurs de transcription Pax6 et Maf sont importants pour le développement de l'œil. De plus, ces facteurs de transcription sont capables d'interagir et de réguler de façon synergique l'expression d'un gène cible (Planque et al., 2001a). Mais aussi, Pax6 peut réguler l'expression de *c-maf*, *in vitro*, dans des cellules en culture (Sakai et al., 2001). Enfin, *L-maf* est un gène cible de Pax6 dans le cristallin (Reza et al., 2002). Ces données, et le fait que l'expression de *pax6* puisse être régulée par des facteurs de transcription qui sont situés en aval de celui-ci, nous ont conduit à envisager que les facteurs de transcription de la famille Maf pouvaient peut être réguler l'expression de *pax6*.

2. Matériels et méthodes

a. Vecteurs utilisés

Le vecteur d'expression pcDNA3-MafA a été obtenu en insérant un fragment EcoRI, correspondant à l'ADNc de MafA, dans le site EcoRI du vecteur pcDNA3 en phase avec la séquence codant l'épitope HA (Benkhelifa et al., 2001). La réalisation des mutants MafA correspondant à MafA-LZ (mutation L2PL4P : les leucines 2 et 4 du domaine Leucine Zipper de dimérisation sont remplacées par des prolines) qui ne peut plus se dimériser et donc se lier à l'ADN, et à Δ mafA (délétion des 172 premiers acides aminés contenant notamment le domaine acide de transactivation) qui n'est plus capable de transactiver a déjà été décrite par Sofia Benkhelifa (Benkhelifa et al., 1998). Ces mutants ont ensuite été clonés dans le vecteur pcDNA3 (Benkhelifa et al., 1998). Le vecteur d'expression pEF-BOS-MafA utilisé dans les expériences a déjà été décrit par Sofia Benkhelifa (Benkhelifa et al., 1998). Les vecteurs d'expression pEF-BOS-MafB, pEF-BOS-v-Maf et pEF-BOS-v-MafR22E utilisé dans les expériences ont déjà été décrits par Kohsuke Kataoka (Kataoka et al., 1994a). Le vecteur d'expression pVNC3-Otx2 a été obtenu en insérant un fragment EcoRI correspondant à l'ADNc d'Otx2 dans le site EcoRI du vecteur pVNC3 (Martinez-Morales et al., 2001). Les vecteurs d'expression pVNC3-Crx et pVNC3-Nrl nous ont été donnés par Sylvie Mazan. Le vecteur rapporteur P0-CAT correspond à l'insertion d'un fragment XbaI-Asp718 d'environ 1,5 kb d'ADN génomique correspondant au promoteur P0 dans le vecteur rapporteur pBL-CAT5 (Plaza et al., 1993), et le vecteur rapporteur P1-CAT correspond à l'insertion d'un fragment NotI-NotI d'environ 1 kb d'ADN génomique correspondant au promoteur P1 dans le vecteur rapporteur pBL-CAT6 (Plaza et al., 1995b). Le vecteur rapporteur P0HA-CAT correspond à l'insertion d'un fragment HincII-Asp718 de 594 pb (P0 délété en 5' de 919 pb) en amont du gène CAT dans le vecteur pBLCAT5, le vecteur rapporteur P0HD-CAT correspond à l'insertion du fragment HincII-DraI de 494 pb (P0 délété en

5' de 919 pb et en 3' de 100 pb) en amont du gène CAT dans le vecteur pBLCAT5 (Plaza et al., 1993). Les constructions pHP et pHE-CAT contiennent respectivement un fragment de 9,5 kb d'ADN génomique comprenant les promoteurs P0, P1 et l'enhancer α (HindIII-PstI) et un fragment de 9 kb amputé des 500 pb contenant l'enhancer α (HindIII-EcoRV) cloné en amont du gène CAT dans le vecteur pBLCAT6 (Plaza et al., 1995a). Le vecteur TK-CAT correspond au vecteur pBLCAT5 qui contient le gène CAT (chloremphenicol acetyltransferase) sous le contrôle du promoteur thymidine kinase (TK). Le vecteur TK-CAT-E α a été construit en clonant le fragment de 460 pb, contenant l'enhancer α , dans son orientation génomique normale en aval du gène CAT dans le vecteur pBLCAT5 (Plaza et al., 1995a). Les vecteurs TK-CAT-DF1 \times 3, TK-CAT-DF2 \times 3, TK-CAT-DF3 \times 4 et TK-CAT-DF4 \times 3 ont été réalisés en clonant les boîtes: DF1 multimérisée 3 fois, DF2 multimérisée 3 fois, DF3 multimérisée 4 fois et DF4 multimérisée 3 fois, en aval du gène CAT dans le vecteur pBLCAT5 (Plaza et al., 1995a). Le vecteur pPHP0 a été construit en clonant le fragment de 870 pb PstI-HindIII d'ADN génomique du gène *pax6* (contenant l'enhancer spécifique du cristallin (Dimanlig et al., 2001)) dans le vecteur P0-CAT en amont de P0 (Plaza et al., 1999c). Les vecteurs P0HDmut1, P0HDmut2, P0HDmut3, P0HDmut1mut3 et P0HDmut2mut3 ont été réalisés par mutagenèse dirigée en utilisant le kit: QuickChange Site-Directed Mutagenesis de STRATAGENE, le vecteur P0HD-CAT comme matrice et les oligonucléotides suivants: mut1sens, 5'GCCTGGCCCCGGGCGGGGGCC GTAACGTAAGTGCCGTCGGGGCGGGCGGCGGCCG3'; mut1antisens; 5'CGGCCGCCGCC CGCCCCGACGGCACTTACGTTACGGCCCCCGCCGGGGCCAGGC3'; mut2sens, 5'CTCA TTAGCTAAGTACTGTCCGCGGGGCGCCACCGGGGCGGCCAGCCAATGGG3'; mut2 antisens, 5'CCATTGGCTGGGCCGCCCGGTGGCGCCCCGGCGGACAGTACTTAGCTA ATGAG3'; mut3sens, 5'GCAGCACCCCTCTTTTATTATAATTTACATTTCTAGAGGATCCG G3'; mut3antisens, 5'CCGGATCCTCTAGAAATGTAAATTATAATAAAAGAGGGGTGCTG C3'.

b. Culture cellulaire, transfections et tests des activités CAT et β -galactosidase

Les cellules BHK21 (Baby Hamster Kidney) sont cultivées avec du milieu de culture DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12) avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% d'une solution de vitamines 100 fois concentrée. Ces cellules sont transfectées, lorsqu'elles sont à 60% de confluence (24H après division), avec du polyéthylène imine (PEI, EX GEN 500 de Euromedex) selon les instructions du fabricant. La quantité totale d'ADN transfectée est normalisée à 2 μ g par ajout d'ADN du vecteur d'expression vide (pcDNA3 ou pEF-BOS). 10ng de vecteur pcDNA3-lacZ sont cotransfectés afin de normaliser les tests CAT. Les tests d'activités

enzymatiques sont réalisés sur les lysats cellulaires 48h après transfection. Le dosage de l'activité β -galactosidase est réalisé par un test chimioluminescent (Kit Galacto-Star de Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant et la lecture des résultats se fait avec un chimioluminomètre. Les tests d'activité CAT (Chloramphénicol Acétyl Transférase) sont réalisés selon la méthode décrite par Serge Plaza (Plaza et al., 1993). Les cellules de neurorétine de caille, disséquées à 8 jours de développement embryonnaire, sont cultivées dans le même milieu que les cellules BHK21, avec l'ajout de conalbumine à 10 μ g/ml. Ces cellules sont transfectées 24h après ensemencement par la méthode du précipité de phosphate de calcium (Plaza et al., 1993). La quantité totale d'ADN transfecté est normalisée à 20 μ g par ajout de vecteurs d'expression vides. 100ng de vecteur pcDNA3-lacZ sont cotransfectés afin de normaliser les tests CAT.

3. Résultats

Régulation des promoteurs P0 et P1 de *pax6* par les membres de la famille Maf

Afin de tester, si les facteurs de transcription Mafs peuvent réguler l'expression de *pax6*, nous avons réalisé des expériences de cotransfection dans les cellules BHK21. Pour cela, nous avons cotransfecté des vecteurs dans lesquels l'expression du gène rapporteur est sous le contrôle des promoteurs P0 ou P1 (figure 23) de *pax6*, avec des vecteurs d'expression de MafA et MafB dans un premier temps.

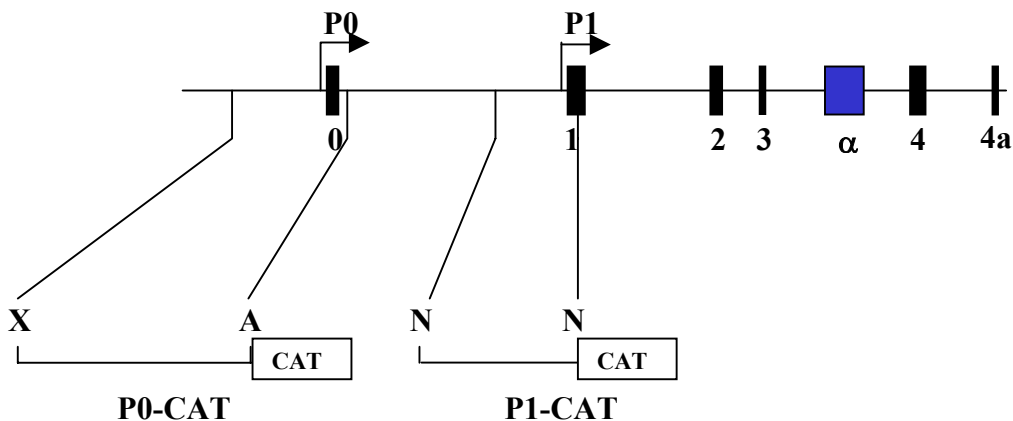


Figure 23 : Structure partielle du gène *pax6*, localisation des promoteurs P0 et P1. Les promoteurs de *pax6* sont localisés : devant l'exon 0 pour P0 et l'exon 1 pour P1. P0-CAT correspond à l'insertion d'un fragment XbaI-Asp718 d'environ 1,5 kb d'ADN génomique correspondant au promoteur P0 dans le vecteur rapporteur pBL-CAT5 (Plaza et al., 1993), P1-CAT correspond à l'insertion d'un fragment NotI-NotI d'environ 1 kb d'ADN génomique correspondant au promoteur P1 dans le vecteur rapporteur pBL-CAT6 (Plaza et al., 1995b). A, Asp718; N, NotI; X, XbaI. Les rectangles noirs numérotés correspondent aux exons, le rectangle bleu correspond à l'enhancer α . Les flèches représentent les points d'initiation de la transcription des ARN messagers.

Lorsque l'on cotransfecte un vecteur codant MafA avec P0 ou P1 on observe une augmentation de l'activité CAT de 10 fois pour P0 et de 4 fois pour P1 (figures 24A ; pistes 1-4

et 24B ; pistes 1-4), de plus cette augmentation varie en fonction de la quantité de vecteur d'expression transfectée. Ce qui suggère que MafA peut activer l'expression de *pax6* à partir de P0 et P1, avec une efficacité supérieure pour P0, et ce de manière dose dépendante. A l'opposé, quand on cotransfecte MafB avec P0 ou P1, on n'observe pas d'augmentation d'activité CAT (figures 24A ; pistes 5-7 et 24B ; pistes 5-7) et ce quelle que soit la quantité de vecteur d'expression MafB transfecté, mais plutôt une repression. Ce qui suggère que les différents membres des facteurs de transcription Maf (les grands Maf) ne vont pas réguler l'expression de *pax6* de la même façon. Enfin, si l'on cotransfecte MafA et MafB avec les promoteurs de *pax6*, on observe une légère diminution de l'effet de MafA, ceci étant compatible avec la possibilité que MafB puisse être un répresseur (figures 24A ; pistes 3,6,8 et 24B ; pistes 3,6,8).

Dans un deuxième temps, les mêmes expériences de cotransfection ont été réalisées avec v-Maf, gène viral dont l'original cellulaire est c-Maf. v-Maf ne diffère de c-Maf que par un acide aminé dans le domaine de liaison à l'ADN, et cette différence ne modifie en rien la capacité transactivatrice de v-Maf par rapport à c-Maf. De plus, nous disposons d'un mutant ponctuel de v-Maf, dans lequel une substitution R22E a été effectuée dans le domaine basique de liaison à l'ADN de v-Maf et qui rend la protéine ainsi mutée incapable de se lier à l'ADN et donc de transactiver un gène cible.

Lorsque l'on cotransfecte v-Maf avec P0 ou P1, on observe une augmentation de l'activité CAT de 5 fois pour P0 et de 4 fois pour P1 (figure 25 pistes 1-3, 6-8), ce qui suggère que v-Maf peut activer l'expression de *pax6* à partir de P0 et de P1 tout comme MafA. En revanche, la cotransfection du mutant v-Maf-R22E, qui n'est plus capable de se lier à l'ADN, avec les promoteurs de *pax6* ne fait pas varier l'activité CAT de ces derniers (figure 25 pistes 4-5 et 9-10) ce qui suggère que la régulation des promoteurs P0 et P1 par v-Maf nécessite la fixation à l'ADN de celui-ci. De plus, le fait que v-Maf ne diffère de c-Maf que par un acide aminé laisse supposer que c-Maf pourrait réguler l'expression de *pax6*.

Par la suite, nous nous sommes limités à utiliser MafA dans les expériences de cotransfection. MafA ayant un effet activateur plus important sur P0 que sur P1, nous nous sommes attachés à caractériser cet effet sur P0 et à définir la région de P0 qui médie l'activation par MafA. Au laboratoire, nous disposons de différentes constructions de P0, avec des délétions des régions en 5' ou en 3' du promoteur P0. P0HA correspond au promoteur P0 délété en 5' d'environ 900pb et P0HD correspond au promoteur P0 délété en 5' d'environ 900pb et en 3' d'environ 100pb (figure 26A). Le site d'initiation de l'ARN se situe 23 nucléotides en

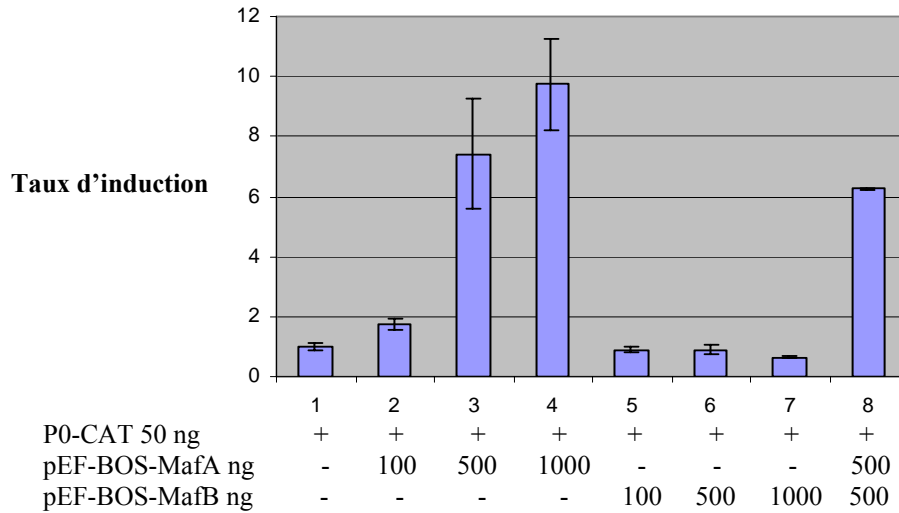
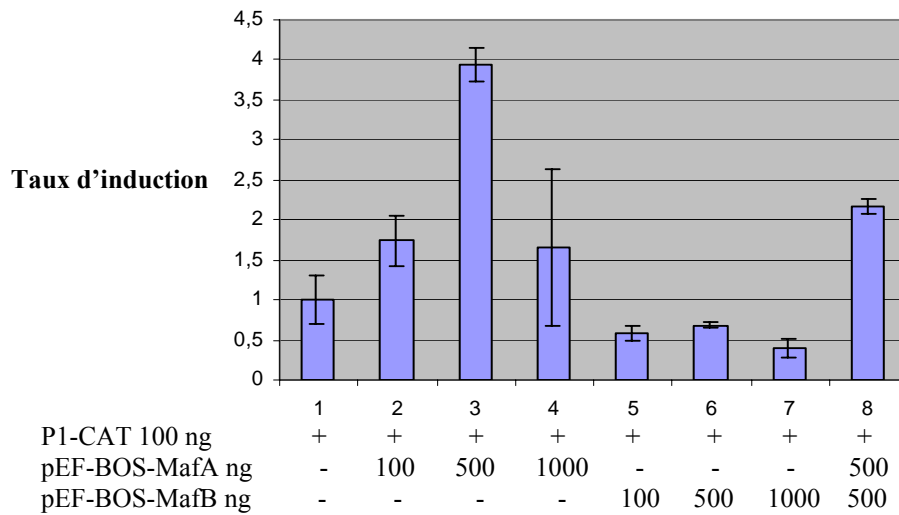
A**B**

Figure 24 : Régulation des promoteurs P0 et P1 par les facteurs de transcription MafA et MafB. **A**, Des cellules BHK21 ont été cotransfectées transitoirement avec 50 ng de plasmide pP0-CAT5, 10 ng de vecteur pCDNA3-lacZ, des gammes croissantes (100, 500 et 1000 ng) de plasmides pEF-BOS-MafA ou pEF-BOS-MafB et avec 500 ng des plasmides pEF-BOS-MafA et pEF-BOS-MafB. Le taux d'ADN transfecté est maintenu constant par ajout de vecteur pEF-BOS vide et les activités CAT normalisées par rapport à l'activité β -galactosidase. **B**, Des cellules BHK21 ont été cotransfectées transitoirement avec 100 ng de plasmide pP1-CAT6, 10 ng de vecteur pCDNA3-lacZ, des gammes croissantes (100, 500 et 1000 ng) de plasmides pEF-BOS-MafA ou pEF-BOS-MafB et avec 500 ng des plasmides pEF-BOS-MafA et pEF-BOS-MafB. Le taux d'ADN transfecté est maintenu constant par ajout de vecteur pEF-BOS vide et les activités CAT normalisées par rapport à l'activité β -galactosidase.

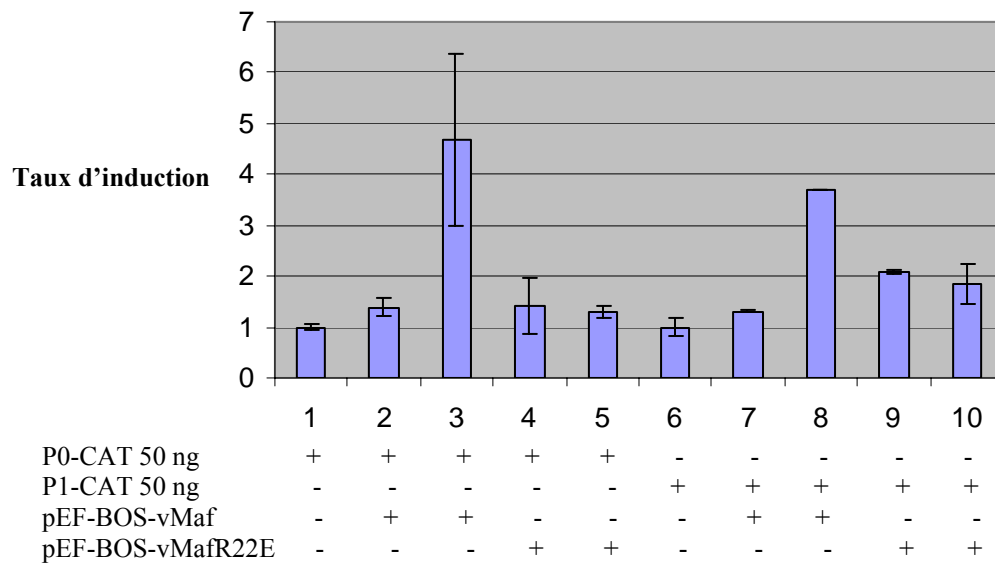


Figure 25 : Régulation des promoteurs P0 et P1 par v-Maf. Des cellules BHK21 ont été cotransfectées transitoirement avec 50 ng de plasmide pP0-CAT5 (pistes 1 à 5) ou pP1-CAT6 (pistes 6 à 10), 10 ng de vecteur pCDNA3-lacZ, 100 ng de plasmide pEF-BOS-vMaf (pistes 2 et 7), 500 ng de plasmide pEF-BOS-vMaf (pistes 3 et 8), 100 ng de plasmide pEF-BOS-vMafR22E (pistes 4 et 9), 500 ng de plasmide pEF-BOS-vMafR22E (pistes 5 et 10). Le taux d'ADN transfecté est maintenu constant par ajout de vecteur pEF-BOS vide et les activités CAT normalisées par rapport à l'activité β -galactosidase.

amont du site DraI (Plaza et al., 1993). Lorsque l'on cotransfecte un vecteur codant MafA avec P0, P0HA ou P0HD, on observe une activation de la transcription équivalente avec ces trois constructions (figure 26B). Ceci suggère que la région d'environ 500pb contenue dans la construction P0HD médie à elle seule la régulation de l'expression par MafA au niveau de P0.

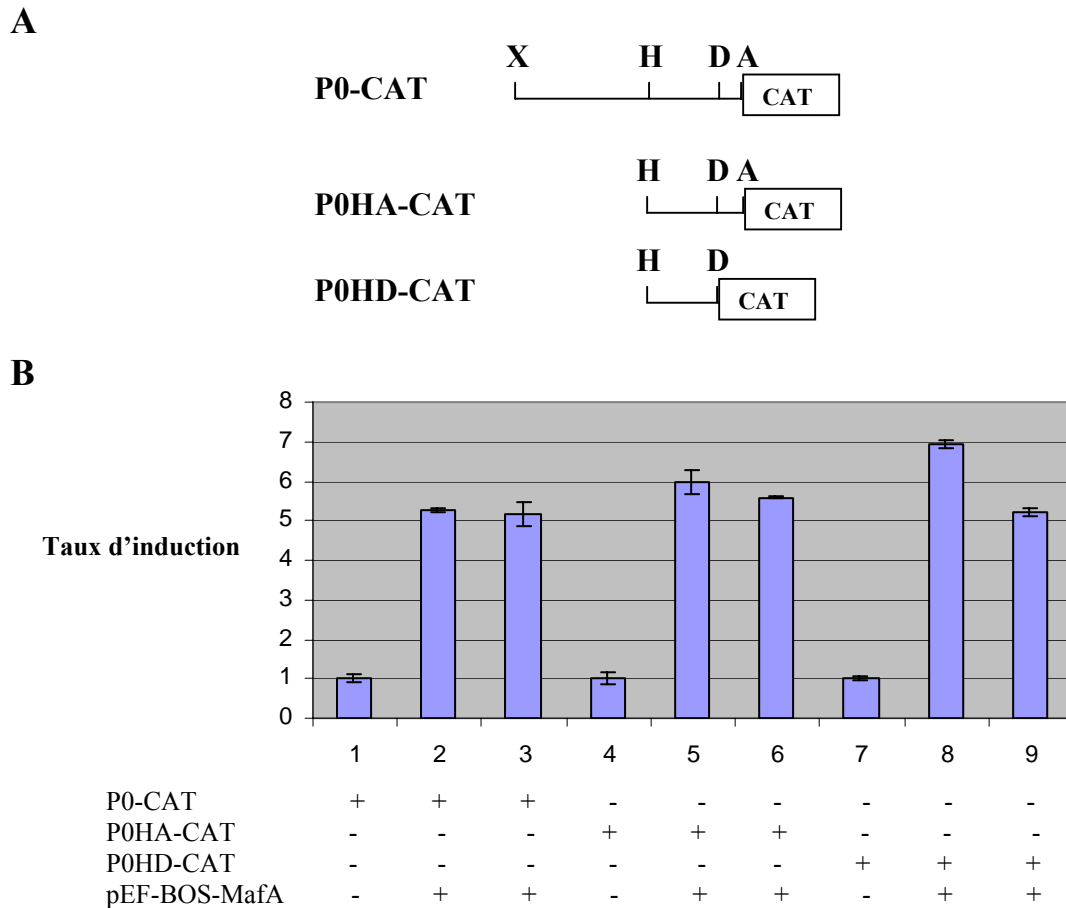


Figure 26 : Activation du promoteur P0 de *pax6* par MafA. A, structure des constructions CAT délétées. La construction P0-CAT correspond à l'insertion d'un fragment XbaI-Asp718 de 1,5 kb d'ADN génomique de *pax6* en amont du gène CAT dans le vecteur pBLCAT5, P0HA-CAT correspond à l'insertion du fragment HincII-Asp718 de 594 pb (délété en 5' de 919 pb) en amont du gène CAT dans le vecteur pBLCAT5, P0HD-CAT correspond à l'insertion du fragment HincII-DraI de 494 pb (délété en 5' de 919 pb et en 3' de 100 pb) en amont du gène CAT dans le vecteur pBLCAT5 (Plaza et al., 1993). A, Asp718; D, DraI; H, HincII; X, XbaI. B, Des cellules BHK21 ont été cotransfectées transitoirement avec 50 ng de plasmide pP0-CAT5 (pistes 1 à 3) ou 50 ng de plasmide pP0HA-CAT5 (pistes 4 à 6) ou 50 ng de plasmide pP0HD-CAT5 (pistes 7 à 9), 10 ng de vecteur pCDNA3-lacZ, 500 ng de plasmide pEF-BOS-MafA (pistes 2, 5 et 8), 1000 ng de plasmide pEF-BOS-MafA (pistes 3, 6 et 9). Le taux d'ADN transfecté est maintenu constant par ajout de vecteur pEF-BOS vide et les activités CAT normalisées par rapport à l'activité β -galactosidase.

Afin d'étudier l'effet d'éventuels cofacteurs sur la régulation par MafA, nous avons effectué des cotransfections avec des mutants de MafA. Pour cela, nous disposons de deux mutants, un mutant ponctuel appelé MafA-LZ dont les leucines 2 et 4 du Leucine Zipper ont été remplacées par des prolines (L2PL4P) conduisant à l'absence de formation des homodimères de MafA et donc à l'absence de liaison à l'ADN, le deuxième mutant appelé Δ MafA correspond à

une délétion des 172 premiers acides aminés amputant ainsi MafA de son domaine acide de transactivation et rendant la protéine Δ mafA incapable de transactiver un gène cible (Benkhelifa et al., 1998).

Lorsque l'on cotransfecte P0HD, qui est le promoteur P0 le plus court répondant à MafA (figure 26A et figure 27 pistes 2 et 3), avec un vecteur codant Δ MafA on n'observe pas d'activation de la transcription (figure 27 pistes 1, 4 et 5) comparé à celle observée avec un vecteur codant MafA (figure 27 pistes 1, 2 et 3) ce qui suggère que la protéine MafA transactive directement P0. Toutefois, quand on cotransfecte P0HD avec un vecteur codant le mutant MafA-LZ, qui ne peut plus se dimériser et donc se lier à l'ADN, on observe encore une transactivation du promoteur (figure 27 pistes 1, 6 et 7) mais cette transactivation est moins importante que celle observée avec la protéine MafA normale (figure 27 pistes 1, 2 et 3) ce qui suggère que MafA doit se fixer directement à l'ADN P0HD pour activer la transcription à partir de P0.

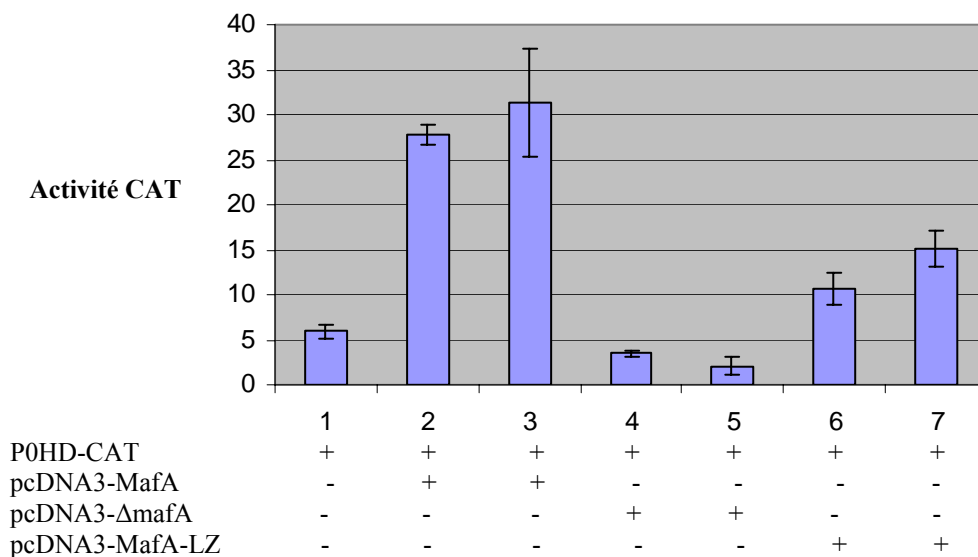


Figure 27 : Analyse des mutants de MafA sur le promoteur P0. Des cellules BHK21 ont été cotransfectées transitoirement avec 50 ng de plasmide pP0HD-CAT5 (pistes 1 à 7), 10 ng de vecteur pCDNA3-lacZ, 500 ng ou 1000 ng de plasmide pcDNA3-MafA (pistes 2 et 3), 500 ou 1000 ng de plasmide p cDNA3- Δ MafA (pistes 4 et 5) et avec 500 ou 1000 ng de plasmide pcDNA3-MafA-LZ (pistes 6 et 7). Le taux d'ADN transfecté est maintenu constant par ajout de vecteur pcDNA3 vide et les activités CAT normalisées par rapport à l'activité β -galactosidase.

A partir de ces résultats, nous nous sommes interrogés sur l'existence de sites de fixation pour MafA dans la séquence du promoteur P0 qui nous permettraient de confirmer une régulation directe. La recherche de sites potentiels de fixation pour MafA dans P0 montre que l'on ne trouve pas de site consensus strict, en revanche on trouve des hémi-sites et un site palindromique de type CRE qui peuvent être reconnus par les protéines Maf (Kataoka et al., 1994b) (Kerppola and Curran, 1994). Ainsi dans P0 on trouve 5 hémi-sites et un site de type CRE (site 2) comme on peut le voir sur la figure 6. il est intéressant de noter que le site 3 contient en fait deux hémi-sites en miroir. Trois de ces sites se situent dans la région correspondant à la construction P0HD (entre les sites de restriction HincII et DraI) ce qui suggère que les trois autres sites situés en 5' de cette région ne soient pas impliqués dans la régulation par MafA. En effet la délétion de la région 5' contenant ces trois sites ne modifie pas la transactivation par MafA dans les expériences de cotransfection (figure 26). J'ai donc entrepris de muter les trois sites contenus dans P0HD (sites 1, 2 et 3) par mutagenèse dirigée. Les mutations introduites ont été choisies de manière à déstructurer la séquence des sites pour que MafA ne les reconnaisse plus (figure 28). Plusieurs constructions ont été réalisées, tout d'abord un seul site à été muté à la fois ce qui donne les constructions : P0HDmut1, P0HDmut2 et P0HDmut3 ; puis des combinaisons avec plusieurs sites mutés : P0HDmut1mut3 et P0HDmut2mut3 (figure 28). Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage.

Lorsque l'on cotransfecte P0HDmut1 avec MafA, on n'observe pas de diminution de la transactivation par MafA du promoteur muté par rapport au promoteur sauvage (figure 29 pistes 1 à 4 et 5 à 8), on observe même une transactivation par MafA du promoteur mutant 2 fois supérieure à celle du promoteur sauvage. Ce qui suggère que la mutation introduite dans le site 1 n'abolit pas la fixation de MafA au niveau de ce site, voire augmente l'affinité de celui-ci pour ce site. De la même façon, quand on cotransfecte P0HDmut2 avec MafA, on observe les mêmes résultats que précédemment avec P0HDmut1 (figure 29 pistes 9 à 12). Par contre, lorsqu'on cotransfecte P0HDmut3 avec MafA, on observe une diminution de la transactivation par celui-ci d'un facteur 2 par rapport à la transactivation observée avec le promoteur sauvage (figure 29 pistes 1 à 4 et 13 à 16). Ce résultat suggère que le site 3 est nécessaire pour la réponse à MafA du promoteur P0, mais le fait que la mutation de ce site n'abolisse pas complètement la réponse laisse supposer que ce site n'est pas seul responsable de la réponse à MafA du promoteur P0. Enfin, quand on cotransfecte les promoteurs mutés dans deux des trois sites : P0HDmut1mut3 et P0HDmut2mut3, avec MafA, on observe une diminution de la transactivation de ces promoteurs d'un facteur 2 à 3 par rapport à celle observée pour les promoteurs sauvages pour le site 3 (figure 29 pistes 1 à 4, 17 à 20 et 21 à 24).

XbaI

TCTAGAGGGTTTCCTTCAGGTTACACCGTTTCCCGCAGCGGTCCCGGCCCGCAGCCCGCACATCGCCGAGTAA
ACAAGCGGTTCTGATGTGCTTATTATTATTGCTCAAGTTCTGCTTGGGTAGAGAATTAACGCTCATTATTACACC
 GCGTGCCGCGGATCGCCCCATCCCTGAGAGCTCGGGGCTTCGGGGCACCTCGGGAAGGGGATTAAGAAAGAGC
 AACTCCTCGTCGCGGTGGAATCGAAGACGTACAGAGTTTATCAGCGTGCAACGCTCAACGGAGCAACACCCGGA
 GGGGACACGGGGTTCTCGCGCCATCGCCCAAACACGGGCACACCAGGGACACCCACGCGGGCAATGGGGCG
 CAGAGCTCAGGCTGCCCCGCGTGCTTCGGGAGCATCGCTTTGCAGCTTCCCCCTCCCTTATCCTATTTATTTTT
 ATTATTTTTATTATTATTATTTTCTGCGGCCTCTACGGCGCTCCTCAGGCACACGCGGCCCGCTCTTCTCCTCC
 TCCTCTCGCACTCCGCTCGGCTCGGATTTTTCCGAGGAGATAAAAAGCGCAAACAGAGCGCGCGGTGCTGCG
 AGGGCACCGTGTGCCCGCCGAGCGCTCCGCTTTACGCTCAGCAGCTTCTGGAGAGCGGCACGGCGCGGGGCGG
 CAGCACCTGGCCCTGCTGCGGGAGCCGTCTCCGCTGCTGACAGGCGGATAAACGGGCTGGAGCCTCGGCATCC
 CGTCTCTCCCTCCCTCGAGGGCCCCCGGGTTCGCGGGTCTCGGCCCTTCGTCGTCAGCGGCTCACGGCCGC
 AGCCCGGGGCGGGGTCACCCGCGGGGCCGTACCTCGAGGGGGCGGCGGGACGGGCTCGCAGCCCCCCC

HincII

GCTCATCGGCAGCTCCGTTAACACCGAGTACAGTCCCACAGAGCAGCAGGGCCGGTGAGGGGGGGGGTGCCTCT
 GTGGCCGTACGTTTCGTTACCCTCCGACACGTGAGCGCCGGTTCGTAGCCCCCTCTCTGCGGGCGGGACCCACGTCG
 GGGCCGGGCACGGCTGCCACAGCCCTAAACGTGGGCCCCGGGACGAAGCAGAGCGGGGCGGGGTAGAGCCGTCGGG
 GACGAGGGGTAACCCAGGAGGCCCGTTCGACGGGGTGAGGGGCAGCCGGTCCGGGGTAGGGGGGGGGCGGGGGC

Site 1

GATCCGGCAGCCTGGCCCCGGGCGGGGGCGGTGCGGGGCGGGCGGGCCGGGCTCGTGTTCG

Site 2

CCTAAAATGTCTCATTAGCTAAGTACTGTCCGCGGTGACGTCACCGGGGCGGCCAGCCAATGGGGGAGGCGCTG

Site 3

DraI

GCGTGATATTAAGGGAAAGTTAGTGCAAAGGCAGCACCCCTCTTTTATTGTCATTGACATTTAAACTGTGTGGC
 AGGTTCCGGCGTAGGAATCGCCGAGCGGAGCCGCCAGGTGCCTCCTCGGGCCCGCGCCCGGACAGGTAACG

Asp718

GCCCCCTCGGTACC

Site 1 GTGCCGTCAGTG

Site 1 muté GTAACGTAAGTG

Site 2 CCGTGACGTCAC

Site 2 muté CCGGGCGCCAC

Site 3 TTGTCATTGACA

Site 3 muté TTATAATTACA

consensus TRE TGCTGACTCAGCA

consensus CRE TGCTGACGTCAGCA

Figure 28 : Séquence du promoteur P0 de *pax6*. Séquence du fragment d'ADN génomique XbaI-Asp718 d'environ 1,5 Kpb correspondant au promoteur P0. Les séquences soulignées correspondent aux sites enzymatiques utilisés pour réaliser les constructions rapportrices de P0 et les constructions délétées de P0 (P0HD et P0HA). Les séquences en bleu correspondent à des héli-sites ou des sites potentiels de type CRE. Les sites 1, 2 et 3 sont les sites contenus dans P0HD qui est activé par MafA. Seul le site 2 est un site palindromique, les sites 1 et 3 sont des héli-sites. Les nucléotides rouges correspondent aux mutations introduites dans les sites potentiels.

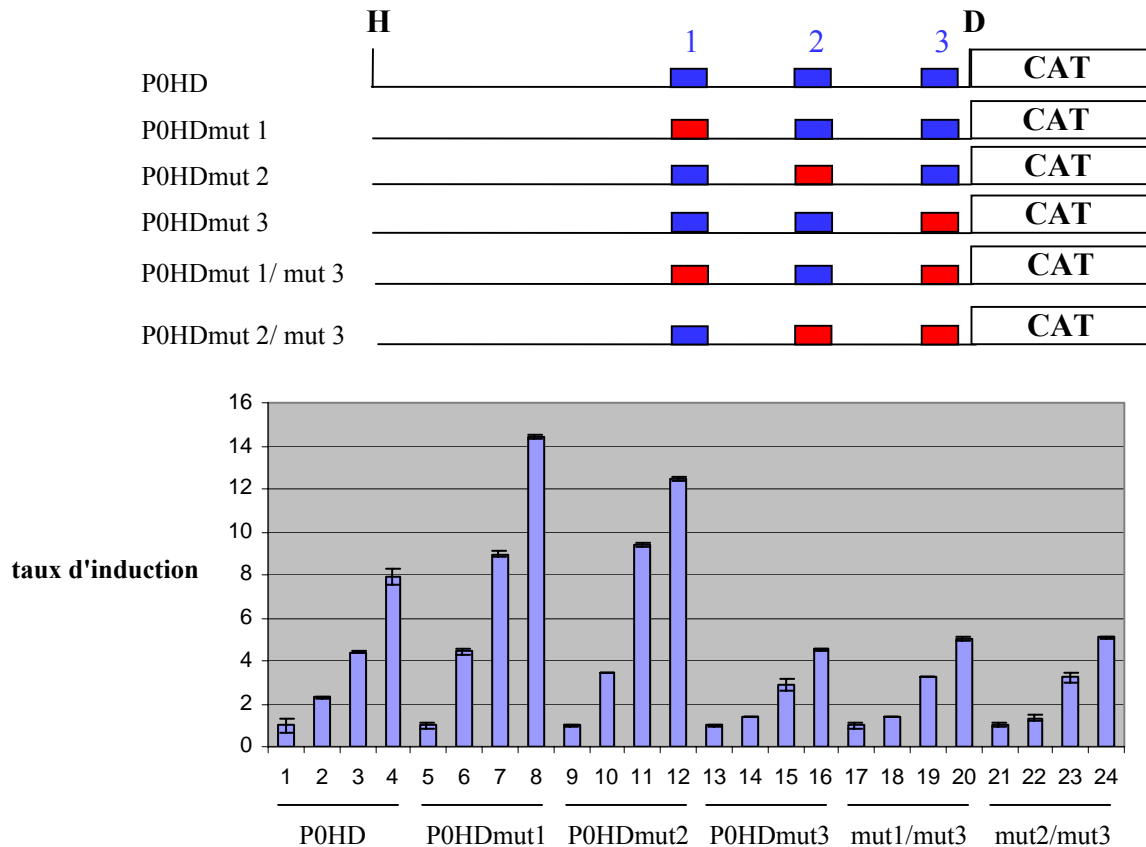


Figure 29 : Régulation par MafA des promoteurs mutés dans les sites AP1. Des cellules BHK21 ont été cotransfectées transitoirement avec 50 ng de plasmide pP0HD-CAT5 (pistes 1 à 4) ou 50 ng de pP0HDmut1 (pistes 5 à 8) ou 50 ng de pP0HDmut2 (pistes 9 à 12) ou 50 ng de pP0HDmut3 (pistes 13 à 16) ou 50 ng de pP0HDmut1mut3 (pistes 17 à 20) ou pP0HDmut2mut3 (pistes 21 à 24), 10 ng de vecteur pCDNA3-lacZ, 100 ng de plasmide pEF-BOS-MafA (pistes 2, 6, 10, 14, 18 et 22), 500 ng de plasmide pEF-BOS-MafA (pistes 3, 7, 11, 15, 19 et 23), 1000 ng de plasmide pEF-BOS-MafA (pistes 4, 8, 12, 16, 20 et 24). Le taux d'ADN transfecté est maintenu constant par ajout de vecteur pEF-BOS vide et les activités CAT normalisées par rapport à l'activité β -galactosidase.

Ces résultats confirment donc l'importance du site 3 dans la réponse du promoteur P0 à l'activation par MafA.

Régulation des enhancer de *pax6* par MafA

Le promoteur P0 de *pax6* étant sous le contrôle de plusieurs enhancers, il est légitime de se demander si MafA peut également réguler l'expression de *pax6* par P0 via ces enhancers. Nous nous sommes en premier lieu intéressés à l'enhancer α , car cet enhancer qui contrôle l'expression de *pax6* est spécifique de P0 et de la neurorétine. Afin de tester l'effet de MafA sur l'enhancer α dans le contexte génomique, nous avons tout d'abord utilisé deux constructions appelées pHP et pHE. pHP correspond à l'insertion dans le vecteur pBLCAT6 d'un fragment d'ADN génomique de 9,5 kb contenant les promoteurs P0, P1 et l'enhancer α ; alors que pHE correspond au fragment de pHP amputé des 500 pb contenant cet enhancer (figure 30A)(Plaza et al., 1995a). L'enhancer α étant spécifique de la neurorétine, les expériences de cotransfection ont

été effectuées dans des cellules de neurorétine d'embryons de caille (QNR) mises en cultures à 8 jours de développement.

Quand on cotransfecte pHP ou pHE avec un vecteur codant MafA dans les QNR, on observe tout d'abord que les activités basales des deux constructions sont très différentes (figure 30B pistes 1 et 5). En effet, pHP a une activité basale 50 fois supérieure à pHE due à la présence de l'enhancer α (Plaza et al., 1995a). Lorsque MafA est exprimé, on observe une chute de l'activité CAT de pHP de plus de 60% (figure 30B pistes 1 à 4), alors que l'activité CAT de pHE ne chute pas, mais augmente d'un facteur 2 (figure 30B pistes 5 à 8). Ces résultats suggèrent que MafA, bien qu'il active la transcription à partir de P0, pourrait jouer un rôle inhibiteur sur l'enhancer α .

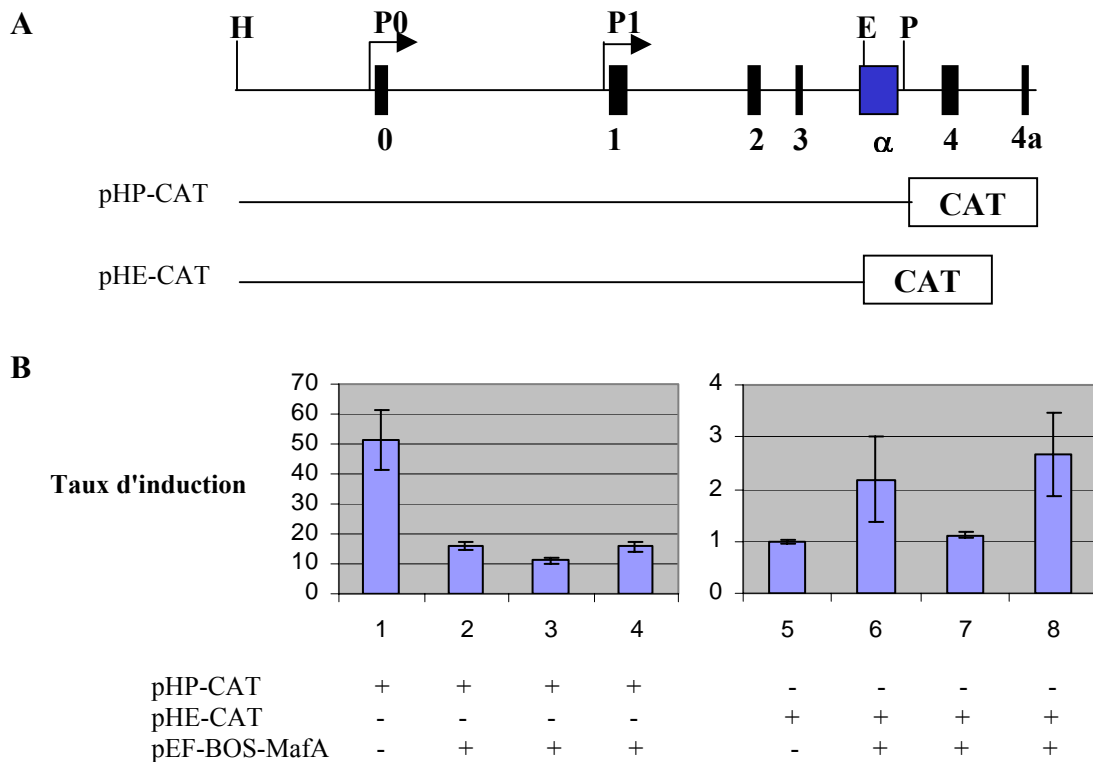


Figure 30 : Effet de MafA sur l'enhancer α . **A**, Séquence partielle du gène pax6 avec ses exons représentés en rectangles noirs. La position des sites de restriction des enzymes HindIII (H), PstI (P) et EcoRV (E) utilisés pour générer les constructions rapportrices est indiquée. Les constructions pHP et pHE-CAT contiennent respectivement un fragment de 9,5 kb (HindIII-PstI) et un fragment de 9 kb (HindIII-EcoRV) d'ADN génomique cloné en amont du gène CAT dans le vecteur pBLCAT6 (Plaza et al., 1995a). **B**, Des cellules de neurorétine de caille disséquées à E8 et mises en culture ont été cotransfectées transitoirement avec 10 μ g de vecteur pHP-CAT (pistes 1 à 4) ou 10 μ g de vecteur pHE-CAT (pistes 5 à 8), 100 ng de vecteur pcDNA3-lacZ, 3 μ g de vecteur pEF-BOS-MafA (pistes 2 et 6), 5 μ g de vecteur pEF-BOS-MafA (pistes 3 et 7), 7 μ g de vecteur pEF-BOS-MafA (pistes 4 et 8). Le taux d'ADN transfecté est maintenu constant par ajout de vecteur pEF-BOS vide et les activités CAT normalisées par rapport à l'activité β -galactosidase.

Afin de confirmer cette observation nous avons utilisé en cotransfection avec un vecteur codant MafA des vecteurs rapporteurs dans lesquels ont été insérés en position enhancer soit

l'enhancer α , soit les différentes boites DF1, DF2, DF3 et DF4 multimérisées (Plaza et al., 1995a). Ces vecteurs ont leur gène rapporteur CAT sous le contrôle du promoteur thymidine kinase (TK) dont on sait qu'il est, comme P0, activé par l'enhancer α (Plaza et al., 1995a).

On observe que le vecteur rapporteur vide (TK-CAT) a une activité basale très basse et que son activité varie très peu en présence de MafA (figure 31 pistes 1 à 5), donc MafA ne régule pas le promoteur thymidine kinase. Par contre, le vecteur TK-CAT-E α , présente une activité basale 20 fois supérieure au vecteur TK-CAT (figure 31 pistes 1 et 6), ce qui traduit l'activité de l'enhancer α dans les cellules de neurorétine. Quand on exprime MafA avec ce vecteur on observe une perte de l'activité CAT d'environ 50% (figure 31 pistes 6 à 10), ce qui montre que MafA peut inhiber en partie l'activité de l'enhancer α . MafA inhibant l'enhancer α , nous avons cherché à savoir quelles régions de l'enhancer pouvaient être responsables de cet effet. Pour cela, nous avons cotransfecté MafA avec les vecteurs rapporteurs contenant les différentes boites : DF1, DF2, DF3 et DF4 multimérisées. On observe, en premier lieu, comme cela avait été montré (Plaza et al., 1995a), que seule la construction contenant DF4 multimérisé x3 a une activité basale proche de celle de l'enhancer complet, bien qu'ici cette activité soit deux fois inférieure à celle de l'enhancer (figure 31 pistes 6, 11, 16, 21 et 26). Quand on cotransfecte MafA avec les différentes constructions (DF1, DF2, DF3 et DF4), on observe une augmentation de l'activité de la boite DF1 et cette augmentation dépend de la quantité de MafA cotransfectée (figure 31 pistes 11 à 15). En effet, on observe une augmentation d'un facteur 2,5 à 17 en fonction de la quantité de MafA cotransfectée. En revanche, pour les boites DF2 et DF3, excepté pour la plus grande quantité de MafA cotransfectée (augmentation de 4 fois et de 5 fois de l'activité CAT pour respectivement DF2 et DF3) on n'observe pas ou peu d'augmentation de l'activité CAT (figure 31 pistes 16 à 20 et 21 à 25). Enfin, quand on cotransfecte la construction contenant DF4 avec une dose croissante de MafA on observe une diminution de l'activité CAT jusqu'à 50% par rapport à l'activité basale (figure 31 pistes 26 à 30). Ces résultats montrent que MafA peut inhiber l'activité de l'enhancer α dans différents contextes nucléotidiques et que cette inhibition est médiée par la boite DF4. Cependant, il est intéressant de noter que MafA peut activer la transcription à partir de DF1, bien que cet effet activateur soit complètement masqué dans l'enhancer α par l'effet inhibiteur de MafA via DF4. On peut ainsi imaginer que, selon l'environnement transcriptionnel, un membre de la famille Maf puisse quand même activer *pax6* par l'intermédiaire de l'enhancer α .

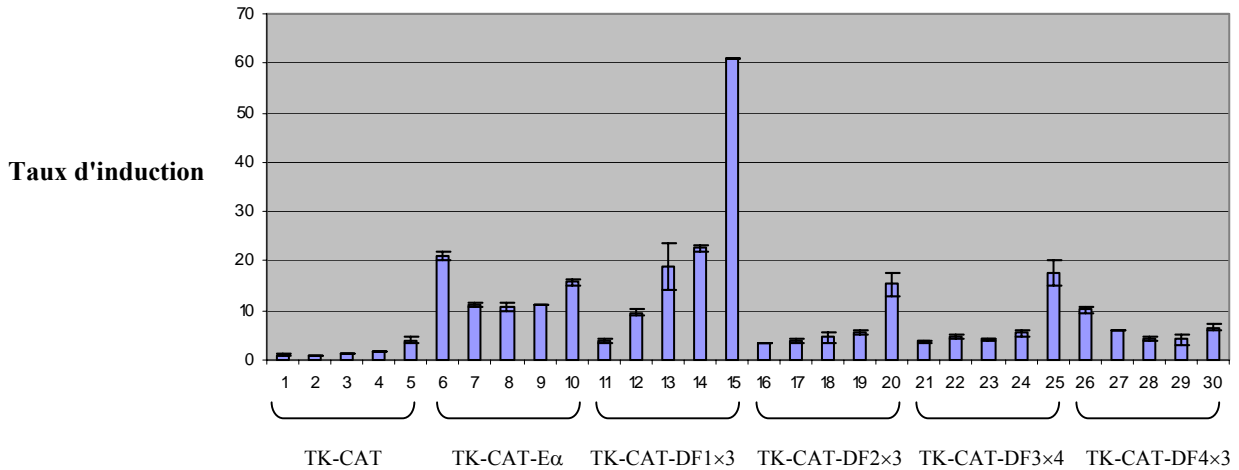


Figure 31 : Rôle des différentes régions de l'enhancer α dans la régulation par MafA. Des cellules de neurorétine de caille disséquées à E8 et mises en culture ont été cotransfectées transitoirement avec 10 μ g de vecteur TK-CAT (pistes 1 à 5) ou 10 μ g de vecteur TK-CAT-E α (pistes 6 à 10) ou 10 μ g de vecteur TK-CAT-DF1 \times 3 (pistes 11 à 15) ou 10 μ g de vecteur TK-CAT-DF2 \times 3 (pistes 16 à 20) ou 10 μ g de vecteur TK-CAT-DF3 \times 4 (pistes 21 à 25) ou 10 μ g de vecteur TK-CAT-DF4 \times 3 (pistes 26 à 30), 100 ng de vecteur pcDNA3-lacZ, 1 μ g de vecteur pEF-BOS-MafA (pistes 2, 7, 12, 17, 22 et 27), 2 μ g de vecteur pEF-BOS-MafA (pistes 3, 8, 13, 18, 23 et 28), 4 μ g de vecteur pEF-BOS-MafA (pistes 4, 9, 14, 19, 24 et 29), 8 μ g de vecteur pEF-BOS-MafA (pistes 5, 10, 15, 20, 25 et 30). Le taux d'ADN transfecté est maintenu constant à l'aide de vecteur pEF-BOS vide et les activités CAT normalisées par rapport à l'activité β -galactosidase.

Le promoteur P0 est non seulement sous le contrôle de l'enhancer α qui est un enhancer spécifique de la neurorétine (Kammandel et al., 1999; Plaza et al., 1995a), mais il est aussi sous le contrôle d'autres enhanceurs situés en amont (Kammandel et al., 1999; Plaza et al., 1999c). L'enhancer 5' le plus proche de P0 nous intéresse tout particulièrement puisqu'il est spécifique du cristallin (Ashery-Padan et al., 2000; Dimanlig et al., 2001; Kammandel et al., 1999; Williams et al., 1998), or les gènes des grands Maf y sont exprimés et jouent un rôle important dans le développement du cristallin. Au laboratoire, cet enhancer a été isolé chez la caille et il a été montré que cet enhancer se comporte comme l'enhancer α lorsqu'il est transfecté dans des cellules de neurorétine de caille en culture (Plaza et al., 1999c). Nous avons donc regardé l'effet de Maf sur cet enhancer en cotransfection dans les cellules de neurorétine. Nous avons pour cela utilisé le vecteur rapporteur P0-CAT déjà utilisé précédemment et le vecteur pPHP0-CAT dans lequel nous avons inséré en amont du promoteur P0 le fragment PstI-HindIII de 870 pb correspondant à l'enhancer (Plaza et al., 1999c).

Quand on transfecte les cellules de neurorétine avec les vecteurs rapporteurs seuls, on observe que le vecteur pPHP0-CAT présente une activité 6 fois supérieure à celle de P0-CAT (figure 32 pistes 1 et 10) ce qui montre bien l'activité enhancer du fragment PstI-HindIII sur le promoteur P0 comme cela a déjà été montré (Plaza et al., 1999c). Lorsque l'on cotransfecte P0-

CAT avec MafA ou Nrl on observe une augmentation de l'activité CAT respectivement d'environ un facteur 20 et un facteur 12 (figure 32 pistes 1 à 3). Ceci d'une part confirme l'effet activateur de MafA sur le promoteur P0 observé dans les cellules BHK21 mais cette fois dans un contexte neurorétine, et d'autre part montre que Nrl, un autre membre de la famille Maf, a aussi le même effet. La même cotransfection réalisée cette fois avec le vecteur pPHP0-CAT, on observe (comme avec P0-CAT) une augmentation de l'activité CAT d'un facteur 2 avec MafA et d'un facteur 2,5 avec Nrl (figure 32 pistes 10 à 12). Ces résultats suggèrent que MafA et Nrl peuvent activer P0 via l'enhancer spécifique du cristallin dans les cellules de neurorétine de caille. Nous avons aussi testé l'effet des facteurs de transcription Otx, une synergie ayant déjà été décrite entre Crx et Nrl dans l'activation du promoteur de la rhodopsine (Mitton et al., 2000). Lorsque l'on cotransfecte Otx2 ou Crx, avec P0-CAT on observe une augmentation de l'activité CAT respectivement d'un facteur 12 et d'un facteur 14 (figure 32 pistes 1, 4 et 5). Ce qui suggère qu'Otx2 et Crx pourraient activer la transcription de *pax6* à partir de P0. Si on cotransfecte maintenant Otx2 et Crx avec pPHP0-CAT on observe une augmentation de l'activité CAT respectivement d'environ un facteur 4 et un facteur 2 (figure 10 pistes 10, 13 et 14). Ces résultats suggèrent que Otx2 et Crx comme MafA et Nrl pourraient activer P0 via cet enhancer. Toujours en réalisant des cotransfections, nous avons testé des combinaisons MafA plus Otx2 ou Crx et Nrl plus Otx2 ou Crx afin de voir si ces facteurs de transcription peuvent coopérer à la régulation de l'expression de *pax6* à partir de P0 et de l'enhancer. Lorsque l'on cotransfecte MafA avec Otx2 ou Crx et P0-CAT, on observe une augmentation de l'activité CAT respectivement d'un facteur 37 et d'un facteur 30 (figure 32 pistes 1, 6 et 7), ce qui suggère que MafA pourrait coopérer avec Otx2 ou Crx pour activer P0. Quand on fait la même expérience avec pPHP0-CAT, on observe une augmentation de l'activité CAT d'un facteur 10 pour MafA avec Otx2 et d'un facteur 5 pour MafA avec Crx (figure 32 pistes 10, 15 et 16). Ces résultats suggèrent que MafA pourrait coopérer avec Otx2 ou Crx pour activer la transcription à partir de P0 via cet enhancer. Lorsque l'on cotransfecte maintenant Nrl avec Otx2 ou Crx et P0-CAT, on observe une augmentation de l'activité CAT respectivement d'un facteur 14 et d'un facteur 25 (figure 32 pistes 1, 8 et 9), ce qui suggère que Nrl pourrait coopérer avec Crx pour activer P0 et ne pas coopérer avec Otx2. Quand on fait la même expérience avec pPHP0-CAT, on observe une augmentation de l'activité CAT d'un facteur 8 pour Nrl avec Otx2 et d'un facteur 3 pour Nrl avec Crx (figure 32 pistes 10, 17 et 18). Ces résultats suggèrent que Nrl pourrait coopérer avec Otx2 ou Crx pour activer la transcription à partir de P0 via cet enhancer.

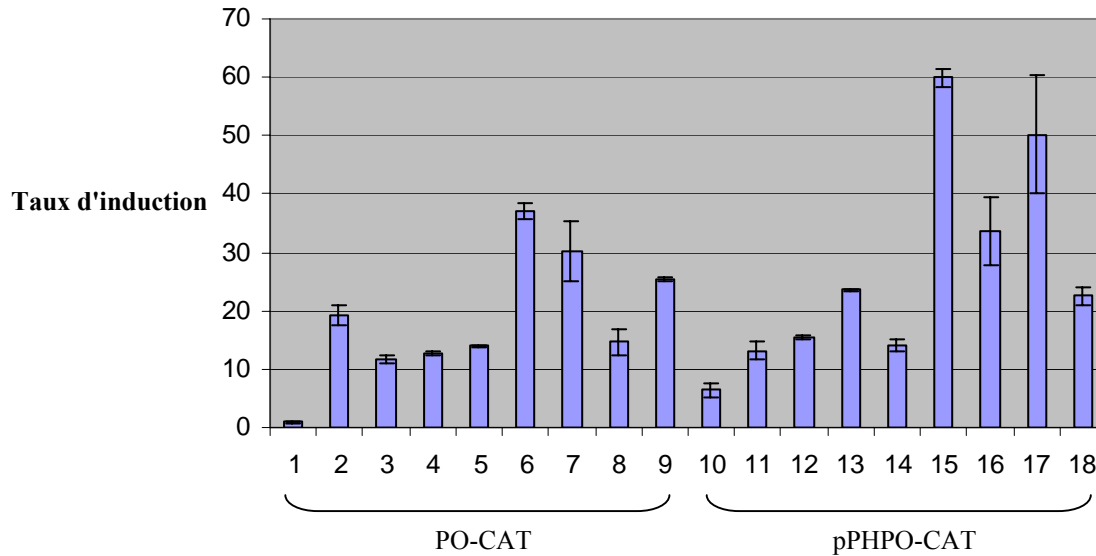


Figure 32 : Régulation de l'enhancer spécifique du cristallin par Maf et Otx. Des cellules de neurorétine de caille disséquées à E8 et mises en culture ont été cotransfectées transitoirement avec 10 μ g de vecteur P0-CAT (pistes 1 à 9) ou 10 μ g de vecteur pPHPO-CAT (pistes 10 à 18), 100 ng de vecteur pcDNA3-lacZ, 4 μ g de vecteur pEF-BOS-MafA (pistes 2 et 11), 4 μ g de vecteur pVNC3-Nrl (pistes 3 et 12), 4 μ g de vecteur pVNC3-Otx2 (pistes 4 et 13), 4 μ g de vecteur pVNC3-Crx (pistes 5 et 14), 4 μ g de vecteur pEF-BOS-MafA et pVNC3-Otx2 (pistes 6 et 15), 4 μ g de vecteur pEF-BOS-MafA et Crx (pistes 7 et 16), 4 μ g de vecteur pVNC3-Nrl et pVNC3-Otx2 (pistes 8 et 17), 4 μ g de vecteur pVNC3-Nrl et pVNC3-Crx (pistes 9 et 18). Le taux d'ADN transfecté est maintenu constant par ajout de vecteur vide et les activités CAT normalisées par rapport à l'activité β -galactosidase.

Suite à ces résultats nous avons testé l'effet de Otx2 sur l'enhancer α en cotransfectant Otx2 avec les vecteurs rapporteurs pHP-CAT et pHE-CAT. Lorsque l'on cotransfecte Otx2 avec pHP-CAT on observe une diminution de l'activité CAT d'environ 85% (figure 33 pistes 1 à 4), alors que lorsqu'on cotransfecte Otx2 avec pHE-CAT on observe une augmentation de l'activité CAT d'environ un facteur 2 (figure 33 pistes 5 à 8). Ces résultats suggèrent que Otx2, bien qu'il active la transcription de *pax6* à partir de P0 et de l'enhancer du cristallin, puisse aussi inhiber la transcription de *pax6* à partir de l'enhancer α tout comme MafA.

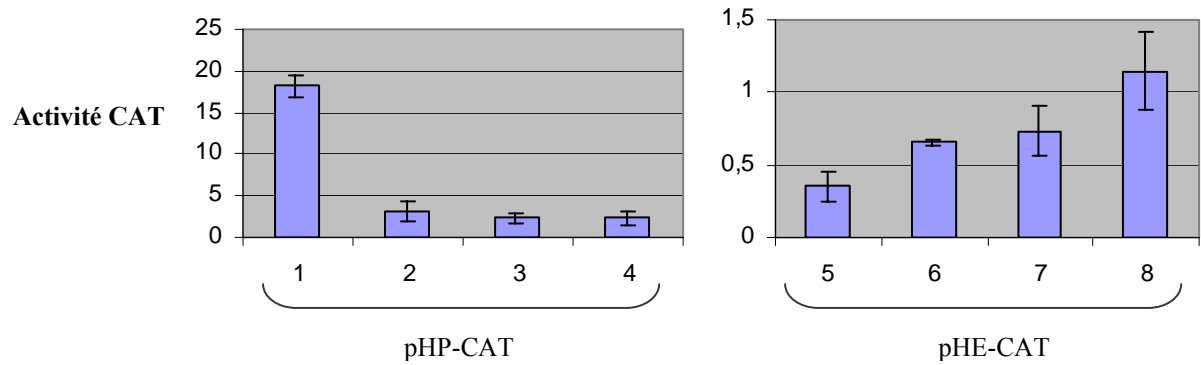


Figure 33 : Régulation de l'enhancer α par Otx2. Des cellules de neurorétine de caille disséquées à E8 et mises en culture ont été cotransfectées transitoirement avec 10 μ g de vecteur PHP-CAT (pistes 1 à 4) ou 10 μ g de vecteur pPHE-CAT (pistes 5 à 8), 100 ng de vecteur pcDNA3-lacZ, 3 μ g de vecteur pVNC3-Otx2 (pistes 2 et 6), 5 μ g de vecteur pVNC3-Otx2 (pistes 3 et 7), 7 μ g de vecteur pVNC3-Otx2 (pistes 4 et 8). Le taux d'ADN transfecté est maintenu constant par ajout de vecteur vide et les activités CAT normalisées par rapport à l'activité β -galactosidase.

DISCUSSION

Les analyses génétiques et moléculaires ont montré que *Mitf* a un rôle important dans le développement des cellules produisant la mélanine : que ce soit les mélanocytes issus de la crête neurale ou les cellules de la RPE (Goding, 2000). Des études génétiques récentes, ont quant à elles mis en évidence que les gènes *Otx* sont également impliqués dans le développement de la RPE (Martinez-Morales et al., 2001). La subdivision du neuroépithélium de la vésicule optique en neurorétine et en RPE à partir des mêmes cellules progénitrices est un processus important du développement de l'œil. Ce processus est très complexe et la façon dont les cellules progénitrices acquièrent leur identité neurorétine ou RPE n'est pas encore complètement éclaircie. Cependant, on sait que la régionalisation d'un certain nombre de facteurs de transcription, comme *Mitf* et *Otx2* qui sont initialement coexprimés dans toute la vésicule optique, est cruciale pour la différenciation de la RPE. L'inactivation fonctionnelle de l'un ou l'autre chez la souris conduit à la perte d'identité de la RPE qui est alors remplacée par une seconde neurorétine et à la perte d'expression de l'autre gène (Bumsted and Barnstable, 2000; Martinez-Morales et al., 2001; Nguyen and Arnheiter, 2000). Ceci suggère que ces deux gènes, *Mitf* et *Otx2*, soient requis ensemble pour le développement de la RPE.

Nous avons montré qu'*Otx2* peut activer le programme moléculaire de différenciation et de pigmentation de la RPE et qu'il peut interagir et coopérer pour cela avec *Mitf*.

Des expériences de gain de fonction avec des cellules de neurorétine de caille ont déjà permis de montrer que *Mitf*^M est suffisant pour induire un phénotype pigmenté dans les cultures (Planque et al., 1999). Nous avons montré que *Mitf*^A (qui est la forme majoritaire de *Mitf* dans la RPE) et *Otx2* ont la même capacité. Cette propriété à induire un phénotype pigmenté n'est pas partagée par beaucoup de gènes, en effet on observe aucune formation de foyer pigmenté lorsque l'on transfecte des cellules de neurorétine en culture avec des gènes comme : *erbA*, *erbB*, *ras*, *src*, *mil*, *fos*, *jun*, *ski* ou *E1A*. De manière tout à fait intéressante, certains foyers pigmentés induits par *Otx2* expriment *Mitf* et vice et versa, ce qui peut être interprété comme une régulation mutuelle de ces deux facteurs et nous en reparlerons un peu plus loin. Cependant, nous avons aussi observé des foyers pigmentés induits par *Otx2* qui n'expriment pas *Mitf*, suggérant qu'*Otx2* seul soit capable d'induire les gènes de la pigmentation *in vitro*. Les expériences de transfections transitoires montrent qu'*Otx2* est en effet capable d'activer les promoteurs de gènes spécifiques de la pigmentation : les gènes *tyrosinase*, *trp-1* et *QNR71*. Cette activation se fait via une fixation directe sur les promoteurs de ces gènes. Il a été montré qu'*Otx2* est un activateur de la transcription et qu'il agit en tant que tel en se fixant à l'ADN au niveau d'une séquence

consensus de type bicoïde : TAATC(C/T) (Bobola et al., 1999; Kelley et al., 2000). Nos résultats sont en accord avec ces études. En effet, les promoteurs des trois gènes que nous avons utilisé dans notre étude contiennent plusieurs copies de la séquence bicoïde et l'interaction spécifique d'Otx2 avec certains de ces sites a pu être démontrée par les expériences de gel retard. De plus, cette spécificité d'interaction est confirmée par l'utilisation d'un mutant d'Otx2 (Q50) qui est muté dans l'homéodomaine et qui ne se fixe plus sur la séquence consensus bicoïde (Pannese et al., 1995) d'une part et d'autre part les mutations des séquences consensus bicoïde dans le promoteur du gène *QNR71* suffisent à abolir la transactivation par Otx2. Otx2 active donc directement les gènes de la mélanogenèse et ce, indépendamment de Mitf. En fait l'expression de Mitf est transitoire dans la RPE, et ce gène s'éteint quand la différenciation pigmentaire est établie (Nakayama et al., 1998). Il est intéressant de noter que la morphologie épithéliale des cellules constituant les foyers négatifs pour Mitf est différente de celle, dendritique, des cellules composant les foyers positifs pour Mitf.

Cependant nous avons aussi observé une interaction entre Otx2 et Mitf. En effet, ces deux facteurs interagissent physiquement via le domaine bHLH-LZ de Mitf et cette interaction conduit à une activation synergique des promoteurs des gènes *tyrosinase* et *QNR71*. Une interaction entre le domaine bHLH-LZ de Mitf et Pax6 a déjà été décrite dans le laboratoire. Cette interaction conduit à l'inhibition de la fixation à l'ADN de Pax6 ainsi qu'à l'inhibition de la transactivation par Pax6 (Planque et al., 2001b), suggérant que l'interaction synergique entre Mitf et Otx2 n'est pas une propriété commune à toutes les protéines à homéodomaine.

D'autres exemples d'interaction entre facteurs de transcription à bHLH et homéodomaine ont été rapportés. Dans le cas de Pitx (une protéine à homéodomaine de type bicoïde) et Pan1 (Poulin et al., 2000), l'interaction entre ces deux facteurs se traduit par la transactivation synergique d'un promoteur cible. Les auteurs ont montré que la fixation à l'ADN de Pitx n'est pas nécessaire pour l'activation synergique avec Pan1. Les résultats de nos expériences de transfections transitoires avec le promoteur *QNR71* sont différents et suggèrent que la fixation d'Otx2 à l'ADN soit requise pour médier la coopération des deux facteurs. En effet, la mutation des sites de fixation pour Otx2 abolit l'activation par Otx2 et la synergie avec Mitf sans affecter l'activation par ce dernier. Alors que la mutation du site de fixation de Mitf abolit la transactivation par ce dernier mais ne modifie pas l'activation synergique du promoteur *QNR71* par Otx2 et Mitf, indiquant que Mitf peut aussi contribuer à l'activation de ce promoteur en interagissant avec Otx2.

Les recherches d'un super-complexe Otx2/Mitf en gel retard sur les promoteurs des gènes *tyrosinase*, *trp-1* et *QNR71* n'ont pas abouti. L'absence de mise en évidence d'un tel complexe

dans nos expériences peut être dû à l'instabilité du complexe protéique au cours de la migration électrophorétique. *In vivo*, d'autres protéines peuvent contribuer à la formation d'un complexe transcriptionnel. Ces protéines pourraient modifier la fixation à l'ADN d'Otx2 et Mitf soit en stabilisant leur interaction soit en modifiant la structure de la région promotrice. Une étude récente a montré que MitfM interagit avec LEF-1 (Lymphoid Enhancing Factor 1), un facteur de transcription médiant la voie de signalisation Wnt. Cette coopération fonctionnelle conduit à la transactivation synergique du promoteur du gène *trp-2* (Yasumoto et al., 2002). Bien que LEF-1 ne soit pas exprimé dans la RPE, un autre membre de cette famille de facteurs de transcription : TCF-1 a été détecté dans ce tissu et pourrait être un candidat possible pour former un complexe avec Mitf et Otx2.

Dans notre étude nous avons décrit deux sites conservés d'initiation de la transcription du gène Otx2 de mammifère que nous avons nommé T0 et T1, T1 étant le site déjà décrit (Simeone et al., 1993). Nous avons aussi isolé des régions régulatrices de ces deux transcrits. La transcription du nouveau transcrit T0 est activé par Otx2 lui-même (et dans une moindre mesure par Otx1) ceci étant en accord avec l'idée que l'expression d'Otx2 dépend d'une boucle d'autorégulation (Gammill and Sive, 1997). Bien que l'analyse des souris invalidées pour *mitf* ou *otx2* et que les expériences de transfections stables que nous avons réalisé suggèrent une possible régulation croisée de l'expression entre *mitf* et *otx2*, nous n'avons pas pu montrer qu'une telle régulation existait. Toutefois, nos résultats ne permettent pas non plus d'exclure cette possibilité, qui pourrait mettre en jeu d'autres promoteurs ou d'autres enhanceurs. De plus, dans nos expériences nous avons utilisé le promoteur de *mitfA* qui est une des formes de *mitf* les plus abondantes dans la RPE, nous ne pouvons donc pas exclure que d'autres formes de *mitf* (avec une préférence pour *mitfD* (Takeda et al., 2002)), qui sont sous le contrôle de promoteurs distincts (Takeda et al., 2002; Udono et al., 2000), pourraient être exprimées dans la RPE en réponse à Otx2. Réciproquement, la régulation de l'expression d'Otx2 par Mitf, si elle existe, pourrait faire appel à d'autres régions régulatrices que celles que nous avons utilisées dans notre étude. Il existe en effet un troisième site d'initiation de la transcription du gène *otx2* et donc un troisième promoteur (Courtois et al., 2003). Enfin, on ne peut pas exclure que la régulation croisée entre Otx2 et Mitf soit indirecte et fasse intervenir d'autres facteurs de transcription intermédiaires.

Des expériences récentes de « knock-in » remplaçant la séquence codante de Otx2 par celle de Otx1 tout en gardant certaines séquences de régulations de Otx2 conduisent à la genèse de souris normales, suggérant que les différences entre Otx2 et Otx1 sont plutôt liées aux différences dans leurs séquences de régulation que dans leur séquence protéique (Acampora et

al., 2003). On peut donc se demander si les autres membres de la famille *otx*, *otx1* et *crx*, sont capables eux aussi, *in-vitro*, d'induire un phénotype pigmenté.

Quelle peut être l'importance de ces observations pour comprendre le développement précoce des yeux ? Des travaux précédents du laboratoire ont montré que l'interaction inhibitrice entre Pax6 et Mitf pouvait expliquer la genèse de la neurorétine dans la partie antérieure du neuroépithélium de la vésicule optique. En effet, dans ces cellules soumises à l'influence de FGF(s) produits par l'ectoderme de surface (ES) (Nguyen and Arnheiter, 2000) le facteur Mitf est phosphorylé par l'activité des MAP kinases activées. Cette phosphorylation conduit à la dégradation de Mitf (figure 34). De fait, l'introduction d'un vecteur codant les protéines de cette voie dans la rétine pigmentaire conduit à l'extinction de Mitf et à la transdifférenciation de ce tissu en neurorétine (Galy et al., 2002). Cependant, cette phosphorylation de Mitf augmente son pouvoir transactivateur (Wu et al., 2000), ce qu'il faut empêcher pour éviter la mise en route du phénotype pigmentaire. C'est l'interaction inhibitrice avec Pax6 qui pourrait bloquer l'activité de Mitf jusqu'à sa dégradation par le protéasome (figure 34). Ce scénario n'explique pas le devenir de la partie postérieure des cellules de la vésicule optique, qui expriment également Pax6 et qui pourtant se différencie en RPE. Une différence clé entre les cellules postérieures et antérieures du neuroépithélium pourrait venir de l'expression des membres de la famille Otx dans la partie postérieure (Martinez-Morales et al., 2001). Otx2 pourrait ainsi rentrer dans une boucle d'activation fonctionnelle positive avec Mitf et en agissant de façon négative sur l'expression de Pax6 (voir figure 33) pourrait contribuer à diminuer la quantité de ce facteur dans ces cellules, permettant à Otx2 et Mitf d'induire les gènes de la pigmentation (figure 34).

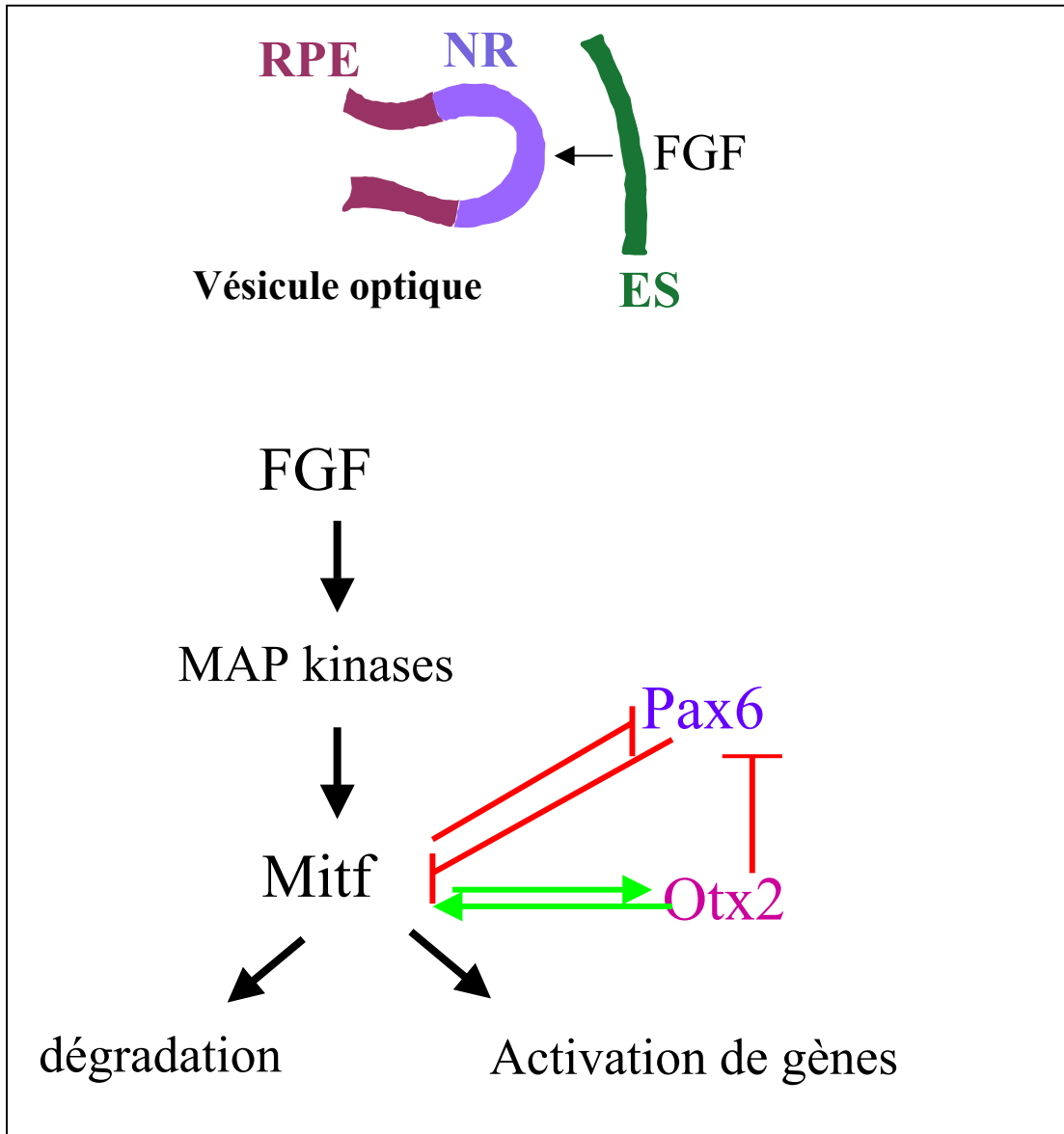


Figure 34: Modèle proposé des relations impliquants les facteurs de transcription Mitf, Otx2 et Pax6 dans la détermination de la rétine. Les flèches indiquent la direction des relations génétiques, moléculaires et biochimiques entre les protéines. En noir et vert: les relations activatrices, en rouge: les relations inhibitrices.

pax6 est un gène codant un facteur de transcription essentiel pour le développement de l'œil, puisque des mutations dans ce gène conduisent à des anomalies de l'œil voire à l'absence d'yeux chez les invertébrés et les vertébrés (Quiring et al., 1994). De plus, l'expression ectopique de ce gène chez la drosophile comme chez les vertébrés (le xénope) conduit à la formation d'yeux ectopiques (Chow et al., 1999; Halder et al., 1995). Enfin, la surexpression de ce gène chez la souris entraîne des anomalies de formation de l'œil du même type que celles observées quand *pax6* est muté (Schedl et al., 1996). Ces études montrent que le juste dosage de *pax6* est important pour le développement correct de l'œil. La transcription des ARN messagers de *pax6* se fait à partir des promoteurs P0 et P1, et P0 se distingue de P1 du fait que ce promoteur est sous le contrôle de plusieurs enhancers tissus spécifiques (Ashery-Padan et al., 2000; Dimanlig et al., 2001; Griffin et al., 2002; Plaza et al., 1995a; Plaza et al., 1999c; van Heyningen and Williamson, 2002; Williams et al., 1998). La régulation de l'expression de *pax6* par ces différents éléments montre bien la complexité de cette régulation et l'importance qui en découle pour le développement de l'œil. En fait, il est probable que le taux de Pax6 conditionne la nature des gènes cibles exprimés (Chauhan et al., 2004). On sait que selon la nature de la séquence nucléotidique, l'affinité de Pax6 pour cette dernière varie, et il existe ainsi des gènes avec une haute ou une faible affinité pour ce facteur (Czerny and Busslinger, 1995; Epstein et al., 1994). La nature des gènes exprimés dépendra de façon critique de la quantité de protéine *pax6* présente dans la cellule. Le fait que Pax6 possède une mosaïque complexe d'enhancers, permet à ce gène de moduler son expression de façon quasiment cellule-spécifique, en fonction de la combinatoire de facteurs de transcription qui y est présente. Ces facteurs régulateurs de *pax6* sont certainement importants, par contre coup, pour le développement des yeux.

Ainsi, les facteurs de transcription Maf, interviennent dans la différenciation des photorécepteurs (Mears et al., 2001) ou la formation du cristallin (Ishibashi and Yasuda, 2001; Kawauchi et al., 1999; Kim et al., 1999; Ogino and Yasuda, 1998; Reza et al., 2002; Ring et al., 2000). Des études au sein du laboratoire ont montré que Pax6 et MafA peuvent interagir physiquement et activer de façon synergique le promoteur du glucagon (Planque et al., 2001a). Pax6 peut réguler l'expression de *c-maf*, *in vitro* (Sakai et al., 2001). Enfin, *L-maf* est un gène cible de Pax6 dans le cristallin (Reza et al., 2002).

Des expériences de transfections transitoires nous ont permis de montrer que MafA et v-Maf (c-Maf) peuvent activer la transcription de *pax6*, à partir des promoteurs P0 et P1. De la même façon nous avons observé que MafB n'active pas la transcription de *pax6*. Ces résultats suggèrent donc que les facteurs Maf n'agissent pas de la même façon, contrairement à ce qui a été observé dans la synergie avec Pax6, où MafB est aussi efficace que MafA dans la

transactivation synergique du promoteur du glucagon (Planque et al., 2001a). Nous avons utilisé v-Maf dans les expériences de cotransfection car nous disposons d'un mutant incapable de se lier à l'ADN qui nous a permis de vérifier la spécificité de l'effet de v-Maf sur les promoteurs de *pax-6*. De plus, le fait que v-Maf active la transcription de *pax6* comme MafA et que v-Maf soit la forme virale de c-Maf suggère que c-Maf peut lui aussi activer la transcription de *pax6*. Par la suite, nous avons restreint notre étude au promoteur P0, car celui-ci contrairement à P1 est un promoteur inductible et il est sous le contrôle de plusieurs enhancers dont certains sont spécifiques soit de la neurorétine soit du cristallin. Nous avons ainsi pu définir qu'une région d'environ 500 pb du promoteur P0 (POHD) était suffisante pour médier l'activation par MafA. Les expériences de transfections transitoires avec les mutants de MafA (MafA-LZ et Δ MafA) montrent que l'activation de P0 nécessite la fixation de MafA à l'ADN et suggèrent que cette activation soit directe. Nous avons donc recherché des sites potentiels de fixation pour MafA dans la séquence de P0. Nous avons ainsi trouvé trois sites potentiels de fixation pour les grands Maf que nous avons nommé site 1, site 2 et site 3. En fait, ce ne sont pas des sites MARE (T-MARE ou C-MARE) stricts mais plutôt des hémi-sites pour les sites 1 et 3 et un site de type C-MARE pour le site 2 (les extrémités du site ne sont pas homologues avec celle du consensus C-MARE), et le site 3 contient deux hémi-sites "en miroir". Nous avons réalisé des mutations dans ces sites et testé en cotransfection l'effet de ces mutations sur la régulation par MafA. Pour les sites 1 et 2, les mutations introduites ne conduisent pas à une diminution de la transactivation par MafA mais plutôt à une augmentation. Cependant, les mutations introduites dans le site 3 entraînent une diminution significative de la transactivation par celui-ci. Ce résultat suggère donc que le site 3 soit nécessaire pour la régulation de P0 par MafA. Ceci est confirmé par le fait que lorsque l'on réalise des combinaisons avec deux sites mutés (sites 1 et 3 ou sites 2 et 3) on observe une réponse semblable à celle obtenue avec le site 3 muté tout seul. La réalisation d'expériences de gel retard permettra de déterminer plus précisément quels sont les sites reconnus par MafA.

Le promoteur P0 de *pax6* étant sous le contrôle d'enhancers spécifiques de différents tissus comme la neurorétine et le cristallin où les facteurs Maf sont exprimés, nous avons cherché à savoir si les facteurs Maf pouvaient réguler l'expression de *pax6* via ses enhancers. En premier, nous nous sommes intéressés à l'enhancer α qui est spécifique de la neurorétine (Kammandel et al., 1999; Marquardt et al., 2001; Plaza et al., 1995a). Bien que MafA active la transcription de *pax6* *in vitro* à partir de P0, nous avons montré que MafA inhibe la transcription de *pax6* via l'enhancer α . Nous avons pu montrer que MafA exerce son inhibition au niveau de l'enhancer α via la boîte DF4, cependant nous avons aussi observé qu'il peut activer la transcription à partir de

P0 via la boîte DF1 bien que cet effet activateur soit totalement masqué lorsque nous considérons l'enhancer α dans son ensemble (effet represser dominant dans ce contexte). La boîte DF4 peut donc médier selon les facteurs de transcription qui s'y fixent une activation ou une inhibition de la transcription de *pax6*.

Un autre enhancer de *pax6* nous intéresse particulièrement, il est situé en 5' de P0 à environ 2,5 kb de P0 chez la caille et se comporte comme l'enhancer α dans les cellules de neurorétine (Plaza et al., 1999c). Cet enhancer, qui est conservé chez la souris et l'homme (Kammandel et al., 1999), conditionne l'expression de *pax6* dans le cristallin et l'ectoderme de surface comme l'ont montré des études *in vivo* par transgénèse (Ashery-Padan et al., 2000; Dimanlig et al., 2001; Williams et al., 1998). Nous avons observé que MafA active la transcription à partir de P0 via cet enhancer *in vitro* dans les cellules de neurorétine. Il semble donc que MafA puisse réguler différemment l'expression de *pax6* selon l'enhancer que l'on considère et donc par conséquent de manière tissu spécifique voir cellule spécifique. De la même façon nous avons observé que Nrl, un autre membre de la famille Maf active la transcription de *pax6* à partir de P0 dans les cellules de neurorétine (il semble que MafB soit le seul membre des grands Maf à ne pas activer la transcription de *pax6* à partir de ces promoteurs) et qu'il active la transcription à partir de P0 via l'enhancer spécifique du cristallin tout comme MafA. Bien que Nrl soit exprimé dans le cristallin, on ne lui connaît pas de fonction particulière dans le développement de ce dernier (Mears et al., 2001). Cependant Nrl est également exprimé dans la neurorétine où il est important pour la différenciation des photorécepteurs de type bâtonnet (Liu et al., 1996; Mears et al., 2001). De façon tout à fait intéressante, *pax6* qui est exprimé dans toute la rétine au début du développement de l'œil voit ensuite son expression se restreindre à certains types cellulaires de la neurorétine. En particulier, alors que *pax6* est exprimé dans les cellules précurseurs des photorécepteurs, il n'est par la suite plus exprimé dans ces cellules lorsque la différenciation des photorécepteurs se met en place. Nrl se comportant comme MafA vis à vis de l'enhancer du cristallin, on peut donc s'attendre à ce que Nrl (tout comme Otx2) inhibe l'expression de *pax6* à partir de l'enhancer α *in vitro* et cette inhibition pourrait rendre compte *in vivo* de l'absence d'expression de *pax6* dans les photorécepteurs lors de leur différenciation. De fait, les territoires d'expression des gènes Mafs sont très dynamiques et chez l'oiseau, MafA, c-Maf et MafB sont tous exprimés dans l'œil en développement, plus précisément dans le cristallin (Lecoin et al., 2004). Il est particulièrement intéressant de noter que c-maf est le membre de la famille qui s'exprime le plus intensément dans la rétine, et ses territoires d'expression sont ceux où les taux d'expression de *pax6* sont les plus faibles, soit dans la partie ventrale et dorsale des yeux. On peut observer sur l'hybridation *in situ*, *in toto* sur un œil de poule à E3, avec un temps

de révélation court afin de révéler les différences d'expression de *pax6*, que le maximum de signal se révèle dans les cadrans nasal et temporal, là où fonctionne *in vivo* l'enhancer α (figure 35) (Kammandel et al., 1999). Il est possible que l'absence de c-Maf dans ces territoires, contrairement à ce qui se passe dans les régions dorsales et ventrales (Lecoin et al., 2004), permette à cet enhancer d'y contrôler l'expression de P0.

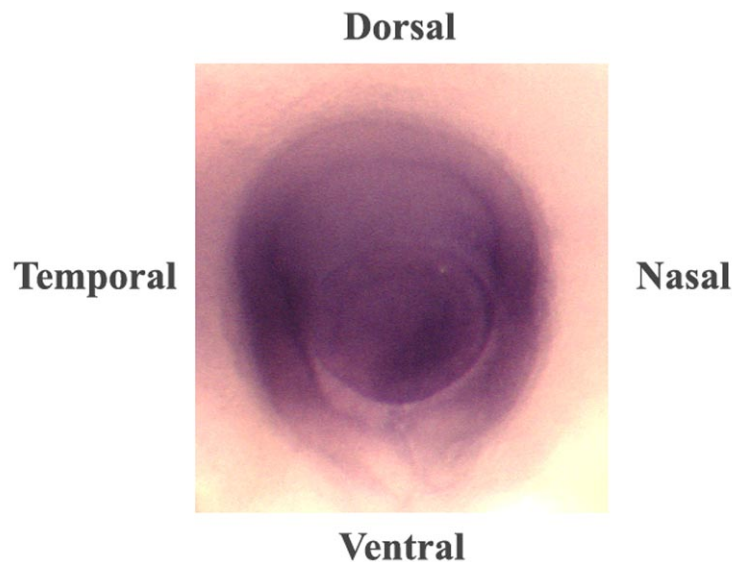


Figure 35: Expression de *pax6* dans l'œil d'un embryon de poule à E3. Détection des ARN messagers de *pax6* par hybridation *in situ*. Le maximum d'expression est détecté dans le cristallin et les régions nasale et temporale de la rétine.

Les facteurs de transcription Maf peuvent interagir avec d'autres facteurs de transcription pour réguler des gènes cibles comme par exemple : Sox2 (Shimada et al., 2003), Pax6 lui-même (Planque et al., 2001a) ou encore Crx qui est un membre de la famille des facteurs Otx (Chen et al., 1997b; Mitton et al., 2000). Nous nous sommes donc intéressés à une éventuelle coopération entre les facteurs de transcription Maf et Otx pour réguler l'expression de *pax6* via ses enhancers spécifiques de la neurorétine et du cristallin. En effet, Otx2 et Crx sont exprimés dans les photorécepteurs au cours de leur différenciation tout comme Nrl, et notamment Otx2 est exprimé avant Crx dont il active l'expression (Baas et al., 2000; Bovolenta et al., 1997; Chen et al., 1997b; Furukawa et al., 1997; Martinez-Morales et al., 2001; Nishida et al., 2003; Simeone et al., 1993). De plus, Otx2 est exprimé dans l'ectoderme de surface qui va former le futur cristallin avant Pax6 et Sox2 chez le xénope (Zygar et al., 1998), et toutes les souris Otx1^{-/-} Otx2^{+/-} ainsi que 30% des souris Otx1^{+/-} Otx2^{+/-} présentent des malformations oculaires importantes qui affectent le cristallin, l'épithélium pigmentaire, la neurorétine et le pédoncule optique (Martinez-Morales et al., 2001). Nous avons observé que Otx2 et Crx peuvent activer *in vitro* l'expression

de *pax6* à partir de P0 et aussi via l'enhancer cristallin, et qu'ils peuvent coopérer avec MafA ou Nrl. Ces résultats suggèrent que Otx2 puisse réguler *in vivo* l'expression de *pax6* dans l'ectoderme de surface qui va former le futur cristallin ainsi que dans le cristallin. Cependant, on ne dispose pas de données suffisantes sur l'expression d'Otx2 dans le cristallin pour affirmer que Otx2 et les facteurs de transcription Maf sont exprimés en même temps et dans les mêmes cellules au cours du développement du cristallin.

Ces travaux contribuent à mieux comprendre comment la régulation de Pax6 peut s'effectuer en prenant en compte l'activité d'enhancers et de facteurs régulateurs définis. Il reste à déterminer comment la cellule fait la synthèse de ces différents signaux, souvent contradictoires, pour adapter le taux de transcription de *pax6* de façon à activer les gènes cibles requis au moment du développement considéré. L'étude de ces enhancers apporte par ailleurs des outils précieux (par l'intermédiaire de la recombinaise CRE) pour étudier *in vivo*, par le biais de la délétion conditionnelle de gènes floxés, la fonction de ces gènes précisément dans les cellules où ces enhancers fonctionnent.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acampora, D., Annino, A., Puellas, E., Alfano, I., Tuorto, F. and Simeone, A. (2003) OTX1 compensates for OTX2 requirement in regionalisation of anterior neuroectoderm. *Gene Expr Patterns*, **3**, 497-501.
- Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Barone, P., Reichert, H., Finkelstein, R. and Simeone, A. (1998) Murine Otx1 and Drosophila otd genes share conserved genetic functions required in invertebrate and vertebrate brain development. *Development*, **125**, 1691-1702.
- Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F. and Simeone, A. (1997) Genetic control of brain morphogenesis through Otx gene dosage requirement. *Development*, **124**, 3639-3650.
- Acampora, D., Boyl, P.P., Signore, M., Martinez-Barbera, J.P., Ilengo, C., Puellas, E., Annino, A., Reichert, H., Corte, G. and Simeone, A. (2001) OTD/OTX2 functional equivalence depends on 5' and 3' UTR-mediated control of Otx2 mRNA for nucleo-cytoplasmic export and epiblast-restricted translation. *Development*, **128**, 4801-4813.
- Acampora, D., Mazan, S., Avantaggiato, V., Barone, P., Tuorto, F., Lallemand, Y., Brulet, P. and Simeone, A. (1996) Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the Otx1 gene. *Nat Genet*, **14**, 218-222.
- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A. and Brulet, P. (1995) Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development*, **121**, 3279-3290.
- 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.
- Aksan, I. and Goding, C.R. (1998) Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol*, **18**, 6930-6938.
- Amae, S., Fuse, N., Yasumoto, K., Sato, S., Yajima, I., Yamamoto, H., Udono, T., Durlu, Y.K., Tamai, M., Takahashi, K. and Shibahara, S. (1998) Identification of a novel isoform of microphthalmia-associated transcription factor that is enriched in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 710-715.
- Andrews, N.C., Kotkow, K.J., Ney, P.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Orkin, S.H. (1993) The ubiquitous subunit of erythroid transcription factor NF-E2 is a small basic-leucine zipper protein related to the v-maf oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11488-11492.
- Ang, S.L., Jin, O., Rhinn, M., Daigle, N., Stevenson, L. and Rossant, J. (1996) A targeted mouse Otx2 mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development*, **122**, 243-252.
- Aota, S., Nakajima, N., Sakamoto, R., Watanabe, S., Ibaraki, N. and Okazaki, K. (2003) Pax6 autoregulation mediated by direct interaction of Pax6 protein with the head surface ectoderm-specific enhancer of the mouse Pax6 gene. *Dev Biol*, **257**, 1-13.
- Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X. and Gruss, P. (2000) Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev*, **14**, 2701-2711.
- Baas, D., Bumsted, K.M., Martinez, J.A., Vaccarino, F.M., Wikler, K.C. and Barnstable, C.J. (2000) The subcellular localization of Otx2 is cell-type specific and developmentally regulated in the mouse retina. *Brain Res Mol Brain Res*, **78**, 26-37.
- Bach, I. (2000) The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev*, **91**, 5-17.

- Baumer, N., Marquardt, T., Stoykova, A., Ashery-Padan, R., Chowdhury, K. and Gruss, P. (2002) Pax6 is required for establishing naso-temporal and dorsal characteristics of the optic vesicle. *Development*, **129**, 4535-4545.
- Beckmann, H., Su, L.K. and Kadesch, T. (1990) TFE3: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer muE3 motif. *Genes Dev*, **4**, 167-179.
- Benkhelifa, S., Provot, S., Lecoq, O., Pouponnot, C., Calothy, G. and Felder-Schmittbuhl, M.P. (1998) mafA, a novel member of the maf proto-oncogene family, displays developmental regulation and mitogenic capacity in avian neuroretina cells. *Oncogene*, **17**, 247-254.
- Benkhelifa, S., Provot, S., Nabais, E., Eychene, A., Calothy, G. and Felder-Schmittbuhl, M.P. (2001) Phosphorylation of MafA is essential for its transcriptional and biological properties. *Mol Cell Biol*, **21**, 4441-4452.
- 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.
- Bertolotto, C., Bille, K., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. (1996) Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *J Cell Biol*, **134**, 747-755.
- Bertolotto, C., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. (1998) Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol Cell Biol*, **18**, 694-702.
- Bessant, D.A., Payne, A.M., Mitton, K.P., Wang, Q.L., Swain, P.K., Plant, C., Bird, A.C., Zack, D.J., Swaroop, A. and Bhattacharya, S.S. (1999) A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, **21**, 355-356.
- 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**, 1211-1217.
- Blank, V. and Andrews, N.C. (1997) The Maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem Sci*, **22**, 437-441.
- Blank, V., Knoll, J.H. and Andrews, N.C. (1997) Molecular characterization and localization of the human MAFG gene. *Genomics*, **44**, 147-149.
- Bobola, N., Briata, P., Ilengo, C., Rosatto, N., Craft, C., Corte, G. and Ravazzolo, R. (1999) OTX2 homeodomain protein binds a DNA element necessary for interphotoreceptor retinoid binding protein gene expression. *Mech Dev*, **82**, 165-169.
- Bonini, N.M., Bui, Q.T., Gray-Board, G.L. and Warrick, J.M. (1997) The Drosophila eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development*, **124**, 4819-4826.
- Bonini, N.M., Leiserson, W.M. and Benzer, S. (1993) The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing Drosophila eye. *Cell*, **72**, 379-395.
- Bovolenta, P., Mallamaci, A., Briata, P., Corte, G. and Boncinelli, E. (1997) Implication of OTX2 in pigment epithelium determination and neural retina differentiation. *J Neurosci*, **17**, 4243-4252.
- Bumsted, K.M. and Barnstable, C.J. (2000) Dorsal retinal pigment epithelium differentiates as neural retina in the microphthalmia (mi/mi) mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**, 903-908.
- Cantos, R., Cole, L.K., Acampora, D., Simeone, A. and Wu, D.K. (2000) Patterning of the mammalian cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11707-11713.
- Carriere, 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.

- Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M. and Ezzeddine, D. (1996) Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 589-595.
- Chau, K.Y., Chen, S., Zack, D.J. and Ono, S.J. (2000) Functional domains of the cone-rod homeobox (CRX) transcription factor. *J Biol Chem*, **275**, 37264-37270.
- Chauhan, B.K., Reed, N.A., Yang, Y., Cermak, L., Reneker, L., Duncan, M.K. and Cvekl, A. (2002) A comparative cDNA microarray analysis reveals a spectrum of genes regulated by Pax6 in mouse lens. *Genes Cells*, **7**, 1267-1283.
- Chauhan, B.K., Yang, Y., Cveklova, K. and Cvekl, A. (2004) Functional properties of natural human PAX6 and PAX6(5a) mutants. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**, 385-392.
- Chen, R., Amoui, M., Zhang, Z. and Mardon, G. (1997a) Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila* [see comments]. *Cell*, **91**, 893-903.
- Chen, S., Wang, Q.L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. and Zack, D.J. (1997b) Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron*, **19**, 1017-1030.
- Chesi, M., Bergsagel, P.L., Shonukan, O.O., Martelli, M.L., Brents, L.A., Chen, T., Schrock, E., Ried, T. and Kuehl, W.M. (1998) Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood*, **91**, 4457-4463.
- Cheyette, B.N., Green, P.J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V. and Zipursky, S.L. (1994) The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron*, **12**, 977-996.
- Chow, R.L., Altmann, C.R., Lang, R.A. and Hemmati-Brivanlou, A. (1999) Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development*, **126**, 4213-4222.
- Cobos, I., Shimamura, K., Rubenstein, J.L., Martinez, S. and Puellas, L. (2001) Fate map of the avian anterior forebrain at the four-somite stage, based on the analysis of quail-chick chimeras. *Dev Biol*, **239**, 46-67.
- Cordes, S.P. and Barsh, G.S. (1994) The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell*, **79**, 1025-1034.
- Coulombre, J.L. and Coulombre, A.J. (1965) Regeneration of neural retina from the pigmented epithelium in the chick embryo. *Developmental Biol.*, **12**, 79-92.
- Coulombre, J.L. and Coulombre, A.J. (1970) Influence of mouse neural retina on regeneration of chick neural retina from chick embryonic pigmented epithelium. *Nature*, **228**, 559-560.
- Courtois, V., Chatelain, G., Han, Z.Y., Le Novere, N., Brun, G. and Lamonerie, T. (2003) New Otx2 mRNA isoforms expressed in the mouse brain. *J Neurochem*, **84**, 840-853.
- Crossley, P.H., Martinez, S., Ohkubo, Y. and Rubenstein, J.L. (2001) Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience*, **108**, 183-206.
- Cvekl, A., Kashanchi, F., Brady, J.N. and Piatigorsky, J. (1999) Pax-6 interactions with TATA-box-binding protein and retinoblastoma protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**, 1343-1350.
- Cvekl, A., Sax, C.M., Li, X., McDermott, J.B. and Piatigorsky, J. (1995) Pax-6 and lens-specific transcription of the chicken delta 1-crystallin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4681-4685.
- Czerny, T. and Busslinger, M. (1995) DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol Cell Biol*, **15**, 2858-2871.
- Czerny, T., Halder, G., Kloter, U., Souabni, A., Gehring, W.J. and Busslinger, M. (1999) twin of eyeless, a second Pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of eyeless in the control of eye development. *Mol Cell*, **3**, 297-307.
- Delaye, M. and Tardieu, A. (1983) Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature*, **302**, 415-417.

- Dimanlig, P.V., Faber, S.C., Auerbach, W., Makarenkova, H.P. and Lang, R.A. (2001) The upstream ectoderm enhancer in Pax6 has an important role in lens induction. *Development*, **128**, 4415-4424.
- Dominguez, M., Ferres-Marco, D., Gutierrez-Avino, F.J., Speicher, S.A. and Beneyto, M. (2004) Growth and specification of the eye are controlled independently by Eyegone and Eyeless in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*, **36**, 31-39.
- Dozier, C., Carriere, C., Grevin, D., Martin, P., Quatannens, B., Stehelin, D. and Saule, S. (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., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H.O. and Gruss, P. (1990) Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development*, **109**, 787-795.
- Du, J., Miller, A.J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S. and Fisher, D.E. (2003) MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol*, **163**, 333-343.
- Duncan, M.K., Cvekl, A., Li, X. and Piatigorsky, J. (2000a) Truncated forms of Pax-6 disrupt lens morphology in transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**, 464-473.
- Duncan, M.K., Haynes, J.I., 2nd, Cvekl, A. and Piatigorsky, J. (1998) Dual roles for Pax-6: a transcriptional repressor of lens fiber cell-specific beta-crystallin genes. *Mol Cell Biol*, **18**, 5579-5586.
- Duncan, M.K., Kozmik, Z., Cveklova, K., Piatigorsky, J. and Cvekl, A. (2000b) Overexpression of PAX6(5a) in lens fiber cells results in cataract and upregulation of (alpha)5(beta)1 integrin expression. *J Cell Sci*, **113 (Pt 18)**, 3173-3185.
- Eichmann, A., Grapin-Botton, A., Kelly, L., Graf, T., Le Douarin, N.M. and Sieweke, M. (1997) The expression pattern of the mafB/kr gene in birds and mice reveals that the kreisler phenotype does not represent a null mutant. *Mech Dev*, **65**, 111-122.
- Epstein, J.A., Glaser, T., Cai, J., Jepeal, L., Walton, D.S. and Maas, R.L. (1994) Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev*, **8**, 2022-2034.
- Faber, S.C., Dimanlig, P., Makarenkova, H.P., Shirke, S., Ko, K. and Lang, R.A. (2001) Fgf receptor signaling plays a role in lens induction. *Development*, **128**, 4425-4438.
- Faber, S.C., Robinson, M.L., Makarenkova, H.P. and Lang, R.A. (2002) Bmp signaling is required for development of primary lens fiber cells. *Development*, **129**, 3727-3737.
- Farjo, Q., Jackson, A.U., Xu, J., Gryzenia, M., Skolnick, C., Agarwal, N. and Swaroop, A. (1993) Molecular characterization of the murine neural retina leucine zipper gene, Nrl. *Genomics*, **18**, 216-222.
- Fei, Y. and Hughes, T.E. (2000) Nuclear trafficking of photoreceptor protein crx: the targeting sequence and pathologic implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **41**, 2849-2856.
- Fisher, D.E., Carr, C.S., Parent, L.A. and Sharp, P.A. (1991) TFEB has DNA-binding and oligomerization properties of a unique helix-loop-helix/leucine-zipper family. *Genes Dev*, **5**, 2342-2352.
- Forrester, J.V., Dick, A.D., McMenamin, P. and Lee, W.R. (2002) *The eye, basic sciences in practice*. 2nd Edition, Harcourt Publishers Limited, Saunders Company Ltd, London.
- Frantz, G.D. and McConnell, S.K. (1996) Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron*, **17**, 55-61.
- Frantz, G.D., Weimann, J.M., Levin, M.E. and McConnell, S.K. (1994) Otx1 and Otx2 define layers and regions in developing cerebral cortex and cerebellum. *J Neurosci*, **14**, 5725-5740.
- Fujiwara, K.T., Kataoka, K. and Nishizawa, M. (1993) Two new members of the maf oncogene family, mafK and mafF, encode nuclear b-Zip proteins lacking putative trans-activator domain. *Oncogene*, **8**, 2371-2380.

- Furukawa, T., Morrow, E.M. and Cepko, C.L. (1997) Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell*, **91**, 531-541.
- Furukawa, T., Morrow, E.M., Li, T., Davis, F.C. and Cepko, C.L. (1999) Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice. *Nat Genet*, **23**, 466-470.
- Furuta, Y. and Hogan, B.L. (1998) BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev*, **12**, 3764-3775.
- Fuse, N., Yasumoto, K., Takeda, K., Amae, S., Yoshizawa, M., Udono, T., Takahashi, K., Tamai, M., Tomita, Y., Tachibana, M. and Shibahara, S. (1999) Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus. *J Biochem (Tokyo)*, **126**, 1043-1051.
- Galy, A., Neron, B., Planque, N., Saule, S. and Eychene, A. (2002) Activated MAPK/ERK kinase (MEK-1) induces transdifferentiation of pigmented epithelium into neural retina. *Dev Biol*, **248**, 251-264.
- Gammill, L.S. and Sive, H. (1997) Identification of otx2 target genes and restrictions in ectodermal competence during *Xenopus* cement gland formation. *Development*, **124**, 471-481.
- Gehring, W.J. (1996) The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes Cells*, **1**, 11-15.
- Gehring, W.J. and Ikeo, K. (1999) Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet*, **15**, 371-377.
- Germot, A., Lecointre, G., Plouhinec, J.L., Le Mentec, C., Girardot, F. and Mazan, S. (2001) Structural evolution of Otx genes in craniates. *Mol Biol Evol*, **18**, 1668-1678.
- Glardon, S., Callaerts, P., Halder, G. and Gehring, W.J. (1997) Conservation of Pax-6 in a lower chordate, the ascidian *Phallusia mammillata*. *Development*, **124**, 817-825.
- Goding, C.R. (2000) Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*, **14**, 1712-1728.
- Gopal-Srivastava, R., Cvekl, A. and Piatigorsky, J. (1996) Pax-6 and alphaB-crystallin/small heat shock protein gene regulation in the murine lens. Interaction with the lens-specific regions, LSR1 and LSR2. *J Biol Chem*, **271**, 23029-23036.
- Griffin, C., Kleinjan, D.A., Doe, B. and van Heyningen, V. (2002) New 3' elements control Pax6 expression in the developing pretectum, neural retina and olfactory region. *Mech Dev*, **112**, 89-100.
- Grindley, J.C., Davidson, D.R. and Hill, R.E. (1995) The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development*, **121**, 1433-1442.
- Gruss, P. and Walther, C. (1992) Pax in development. *Cell*, **69**, 719-722.
- Hach, P., Borovansky, J. and Vedralova, E. (1993) Melanosome--a sophisticated organelle. *Sb Lek*, **94**, 113-123.
- Halder, G., Callaerts, P., Flister, S., Walldorf, U., Kloter, U. and Gehring, W.J. (1998) Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during *Drosophila* compound eye development. *Development*, **125**, 2181-2191.
- Halder, G., Callaerts, P. and Gehring, W.J. (1995) Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science*, **267**, 1788-1792.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol*, **88**, 49-92.
- Han, K. and Manley, J.L. (1993) Functional domains of the *Drosophila* Engrailed protein. *Embo J*, **12**, 2723-2733.
- Hayes, J.J., Clark, D.J. and Wolffe, A.P. (1991) Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6829-6833.
- He, X. and Rosenfeld, M.G. (1991) Mechanisms of complex transcriptional regulation: implications for brain development. *Neuron*, **7**, 183-196.

- Hearing, V.J., Tsukamoto, K., Urabe, K., Kameyama, K., Montague, P.M. and Jackson, I.J. (1992) Functional properties of cloned melanogenic proteins. *Pigment Cell Res*, **5**, 264-270.
- Hedge, S.P., Kumar, A., Kurschner, C. and Shapiro, L.H. (1998) c-Maf interacts with c-Myb to regulate transcription of an early myeloid gene during differentiation. *Mol Cell Biol*, **18**, 2729-2737.
- 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.
- 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.
- Holst, B.D., Wang, Y., Jones, F.S. and Edelman, G.M. (1997) A binding site for Pax proteins regulates expression of the gene for the neural cell adhesion molecule in the embryonic spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1465-1470.
- Huang, K., Serria, M.S., Nakabayashi, H., Nishi, S. and Sakai, M. (2000) Molecular cloning and functional characterization of the mouse mafB gene. *Gene*, **242**, 419-426.
- Huh, S., Hatini, V., Marcus, R.C., Li, S.C. and Lai, E. (1999) Dorsal-ventral patterning defects in the eye of BF-1-deficient mice associated with a restricted loss of shh expression. *Dev Biol*, **211**, 53-63.
- Hyer, J., Mima, T. and Mikawa, T. (1998) FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain. *Development*, **125**, 869-877.
- Igarashi, K., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Matuzaki, Y., Nakauchi, H., Nishizawa, M. and Yamamoto, M. (1995) Activity and expression of murine small Maf family protein MafK. *J Biol Chem*, **270**, 7615-7624.
- Ishibashi, S. and Yasuda, K. (2001) Distinct roles of maf genes during *Xenopus* lens development. *Mech Dev*, **101**, 155-166.
- Jackson, I.J. (1988) A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mouse [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Feb;86(3):997]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 4392-4396.
- Jackson, I.J., Chambers, D.M., Tsukamoto, K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. and Hearing, V. (1992) A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *Embo J*, **11**, 527-535.
- Jackson, I.J. and Raymond, S. (1994) Manifestations of microphthalmia. *Nat Genet*, **8**, 209-210.
- Janknecht, R. and Hunter, T. (1996) Transcription. A growing coactivator network. *Nature*, **383**, 22-23.
- Jaynes, J.B. and O'Farrell, P.H. (1991) Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *Embo J*, **10**, 1427-1433.
- Jun, S.a.D., C. (1996) Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development*, **122**, 2639-2650.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R. and Kondoh, H. (2001) Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev*, **15**, 1272-1286.
- Kammandel, B., Chowdhury, K., Stoykova, A., Aparicio, S., Brenner, S. and Gruss, P. (1999) Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of the Pax6 gene activity. *Dev Biol*, **205**, 79-97.
- Kataoka, K., Fujiwara, K.T., Noda, M. and Nishizawa, M. (1994a) MafB, a new Maf family transcription activator that can associate with Maf and Fos but not with Jun. *Mol Cell Biol*, **14**, 7581-7591.

- Kataoka, K., Igarashi, K., Itoh, K., Fujiwara, K.T., Noda, M., Yamamoto, M. and Nishizawa, M. (1995) Small Maf proteins heterodimerize with Fos and may act as competitive repressors of the NF-E2 transcription factor. *Mol Cell Biol*, **15**, 2180-2190.
- Kataoka, K., Nishizawa, M. and Kawai, S. (1993) Structure-function analysis of the maf oncogene product, a member of the b-Zip protein family. *J Virol*, **67**, 2133-2141.
- Kataoka, K., Noda, M. and Nishizawa, M. (1994b) Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol*, **14**, 700-712.
- Kataoka, K., Noda, M. and Nishizawa, M. (1996) Transactivation activity of Maf nuclear oncoprotein is modulated by Jun, Fos and small Maf proteins. *Oncogene*, **12**, 53-62.
- Kawauchi, S., Takahashi, S., Nakajima, O., Ogino, H., Morita, M., Nishizawa, M., Yasuda, K. and Yamamoto, M. (1999) Regulation of lens fiber cell differentiation by transcription factor c-Maf. *J Biol Chem*, **274**, 19254-19260.
- Kelley, C.G., Lavorgna, G., Clark, M.E., Boncinelli, E. and Mellon, P.L. (2000) The Otx2 homeoprotein regulates expression from the gonadotropin-releasing hormone proximal promoter. *Mol Endocrinol*, **14**, 1246-1256.
- Kelly, L.M., Englmeier, U., Lafon, I., Sieweke, M.H. and Graf, T. (2000) MafB is an inducer of monocytic differentiation. *Embo J*, **19**, 1987-1997.
- Kerppola, T.K. and Curran, T. (1994) A conserved region adjacent to the basic domain is required for recognition of an extended DNA binding site by Maf/Nrl family proteins. *Oncogene*, **9**, 3149-3158.
- Kim, A.S., Anderson, S.A., Rubenstein, J.L., Lowenstein, D.H. and Pleasure, S.J. (2001) Pax-6 regulates expression of SFRP-2 and Wnt-7b in the developing CNS. *J Neurosci*, **21**, RC132.
- Kim, J.I., Li, T., Ho, I.C., Grusby, M.J. and Glimcher, L.H. (1999) Requirement for the c-Maf transcription factor in crystallin gene regulation and lens development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3781-3785.
- Kimura, C., Takeda, N., Suzuki, M., Oshimura, M., Aizawa, S. and Matsuo, I. (1997) Cis-acting elements conserved between mouse and pufferfish Otx2 genes govern the expression in mesencephalic neural crest cells. *Development*, **124**, 3929-3941.
- Kimura, C., Yoshinaga, K., Tian, E., Suzuki, M., Aizawa, S. and Matsuo, I. (2000) Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. *Dev Biol*, **225**, 304-321.
- Kleinjan, D.A., Seawright, A., Childs, A.J. and van Heyningen, V. (2004) Conserved elements in Pax6 intron 7 involved in (auto)regulation and alternative transcription. *Dev Biol*, **265**, 462-477.
- Kleinjan, D.A., Seawright, A., Schedl, A., Quinlan, R.A., Danes, S. and van Heyningen, V. (2001) Aniridia-associated translocations, DNase hypersensitivity, sequence comparison and transgenic analysis redefine the functional domain of PAX6. *Hum Mol Genet*, **10**, 2049-2059.
- Kozmik, Z., Daube, M., Frei, E., Norman, B., Kos, L., Dishaw, L.J., Noll, M. and Piatigorsky, J. (2003) Role of Pax genes in eye evolution: a cnidarian PaxB gene uniting Pax2 and Pax6 functions. *Dev Cell*, **5**, 773-785.
- Kumar, J.P. (2001) Signalling pathways in Drosophila and vertebrate retinal development. *Nat Rev Genet*, **2**, 846-857.
- Kumar, R., Chen, S., Scheurer, D., Wang, Q.L., Duh, E., Sung, C.H., Rehemtulla, A., Swaroop, A., Adler, R. and Zack, D.J. (1996) The bZIP transcription factor Nrl stimulates rhodopsin promoter activity in primary retinal cell cultures. *J Biol Chem*, **271**, 29612-29618.

- Kurschner, C. and Morgan, J.I. (1995) The *maf* proto-oncogene stimulates transcription from multiple sites in a promoter that directs Purkinje neuron-specific gene expression. *Mol Cell Biol*, **15**, 246-254.
- Lalwani, A.K., Attaie, A., Randolph, F.T., Deshmukh, D., Wang, C., Mhatre, A. and Wilcox, E. (1998) Point mutation in the *MITF* gene causing Waardenburg syndrome type II in a three-generation Indian family. *Am J Med Genet*, **80**, 406-409.
- Lautenschlager, N.T., Milunsky, A., DeStefano, A., Farrer, L. and Baldwin, C.T. (1996) A novel mutation in the *MITF* gene causes Waardenburg syndrome type 2. *Genet Anal*, **13**, 43-44.
- Le Borgne, R., Planque, N., Martin, P., Dewitte, F., Saule, S. and Hoflack, B. (2001) The AP-3-dependent targeting of the melanosomal glycoprotein QNR-71 requires a di-leucine-based sorting signal. *J Cell Sci*, **114**, 2831-2841.
- Le Douarin, N.M., Dupin, E., Baroffio, A. and Dulac, C. (1992) New insights into the development of neural crest derivatives. *Int Rev Cytol*, **138**, 269-314.
- Lecoin, L., Sii-Felice, K., Pouponnot, C., Eychene, A. and Felder-Schmittbuhl, M.P. (2004) Comparison of *maf* gene expression patterns during chick embryo development. *Gene Expr Patterns*, **4**, 35-46.
- Li, M., Huang, X., Zhu, Z. and Gorelik, E. (1999) Sequence and insertion sites of murine melanoma-associated retrovirus. *J Virol*, **73**, 9178-9186.
- Li, M., Xu, F., Muller, J., Hearing, V.J. and Gorelik, E. (1998) Ecotropic C-type retrovirus of B16 melanoma and malignant transformation of normal melanocytes. *Int J Cancer*, **76**, 430-436.
- Liu, J.J., Kao, W.W. and Wilson, S.E. (1999) Corneal epithelium-specific mouse keratin K12 promoter. *Exp Eye Res*, **68**, 295-301.
- Liu, Q., Ji, X., Breitman, M.L., Hitchcock, P.F. and Swaroop, A. (1996) Expression of the bZIP transcription factor gene *Nrl* in the developing nervous system. *Oncogene*, **12**, 207-211.
- Lopashov, G.V. and Stroeve, O.G. (1964) Development of the eye; experimental studies. Jerusalem: Israel Program for Scientific Translations.
- Macdonald, R., Barth, K.A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I. and Wilson, S.W. (1995) Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development*, **121**, 3267-3278.
- Mallamaci, A., Di Blas, E., Briata, P., Boncinelli, E. and Corte, G. (1996) OTX2 homeoprotein in the developing central nervous system and migratory cells of the olfactory area. *Mech Dev*, **58**, 165-178.
- Manzanares, M., Cordes, S., Ariza-McNaughton, L., Sadl, V., Maruthainar, K., Barsh, G. and Krumlauf, R. (1999) Conserved and distinct roles of *kreisler* in regulation of the paralogous *Hoxa3* and *Hoxb3* genes. *Development*, **126**, 759-769.
- Manzanares, M., Cordes, S., Kwan, C.T., Sham, M.H., Barsh, G.S. and Krumlauf, R. (1997) Segmental regulation of *Hoxb-3* by *kreisler*. *Nature*, **387**, 191-195.
- Mardon, G., Solomon, N.M. and Rubin, G.M. (1994) *dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development*, **120**, 3473-3486.
- Marquardt, T. (2003) Transcriptional control of neuronal diversification in the retina. *Prog Retin Eye Res*, **22**, 567-577.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. and Gruss, P. (2001) Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell*, **105**, 43-55.
- Martin, P., Carriere, C., Dozier, C., Quatannens, B., Mirabel, M.A., 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.
- Martinez-Gimeno, M., Maseras, M., Baiget, M., Beneito, M., Antinolo, G., Ayuso, C. and Carballo, M. (2001) Mutations P51U and G122E in retinal transcription factor *NRL*

- associated with autosomal dominant and sporadic retinitis pigmentosa. *Hum Mutat*, **17**, 520.
- Martinez-Morales, J.R., Dolez, V., Rodrigo, I., Zaccarini, R., Leconte, L., Bovolenta, P. and Saule, S. (2003) OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *J Biol Chem*, **278**, 21721-21731.
- Martinez-Morales, J.R., Signore, M., Acampora, D., Simeone, A. and Bovolenta, P. (2001) Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development*, **128**, 2019-2030.
- Masland, R.H. (2001) The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*, **4**, 877-886.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N. and Aizawa, S. (1995) Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev*, **9**, 2646-2658.
- McGill, G.G., Horstmann, M., Widlund, H.R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E.K., Lin, Y.L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H.F., Jordan, S.A., Jackson, I.J., Korsmeyer, S.J., Golub, T.R. and Fisher, D.E. (2002) Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell*, **109**, 707-718.
- Mears, A.J., Kondo, M., Swain, P.K., Takada, Y., Bush, R.A., Saunders, T.L., Sieving, P.A. and Swaroop, A. (2001) Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet*, **29**, 447-452.
- Meech, R., Kallunki, P., Edelman, G.M. and Jones, F.S. (1999) A binding site for homeodomain and Pax proteins is necessary for L1 cell adhesion molecule gene expression by Pax-6 and bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2420-2425.
- Mikkola, I., Bruun, J.A., Holm, T. and Johansen, T. (2001) Superactivation of Pax6-mediated transactivation from paired domain-binding sites by dna-independent recruitment of different homeodomain proteins. *J Biol Chem*, **276**, 4109-4118.
- Miller, J., McLachlan, A.D., Klug, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO*, **4**, 1609-1614.
- Mitton, K.P., Swain, P.K., Chen, S., Xu, S., Zack, D.J. and Swaroop, A. (2000) The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation. *J Biol Chem*, **275**, 29794-29799.
- Mochii, M., Agata, K., Kobayashi, H., Yamamoto, T.S. and Eguchi, G. (1988) Expression of gene coding for a melanosomal matrix protein transcriptionally regulated in the transdifferentiation of chick embryo pigmented epithelial cells. *Cell Differ*, **24**, 67-74.
- Mochii, M., Mazaki, Y., Mizuno, N., Hayashi, H. and Eguchi, G. (1998a) Role of Mitf in differentiation and transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cell. *Dev Biol*, **193**, 47-62.
- Mochii, M., Ono, T., Matsubara, Y. and Eguchi, G. (1998b) Spontaneous transdifferentiation of quail pigmented epithelial cell is accompanied by a mutation in the Mitf gene. *Dev Biol*, **196**, 145-159.
- Moens, C.B., Cordes, S.P., Giorgianni, M.W., Barsh, G.S. and Kimmel, C.B. (1998) Equivalence in the genetic control of hindbrain segmentation in fish and mouse. *Development*, **125**, 381-391.
- Moore, K.J. (1995) Insight into the microphthalmia gene. *Trends Genet*, **11**, 442-448.
- Morsli, H., Tuorto, F., Choo, D., Postiglione, M.P., Simeone, A. and Wu, D.K. (1999) Otx1 and Otx2 activities are required for the normal development of the mouse inner ear. *Development*, **126**, 2335-2343.
- Motohashi, H., Shavit, J.A., Igarashi, K., Yamamoto, M. and Engel, J.D. (1997) The world according to Maf. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2953-2959.
- Murphy, M. and Bartlett, P.F. (1993) Molecular regulation of neural crest development. *Mol Neurobiol*, **7**, 111-135.

- Muta, M., Kamachi, Y., Yoshimoto, A., Higashi, Y. and Kondoh, H. (2002) Distinct roles of SOX2, Pax6 and Maf transcription factors in the regulation of lens-specific delta1-crystallin enhancer. *Genes Cells*, **7**, 791-805.
- Nakayama, A., Nguyen, M.T., Chen, C.C., Opdecamp, K., Hodgkinson, C.A. and Arnheiter, H. (1998) Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. *Mech Dev*, **70**, 155-166.
- Nguyen, M. and Arnheiter, H. (2000) Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF. *Development*, **127**, 3581-3591.
- Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I. and Furukawa, T. (2003) Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci*, **6**, 1255-1263.
- Nishizawa, M., Kataoka, K., Goto, N., Fujiwara, K.T. and Kawai, S. (1989) v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7711-7715.
- Nishizawa, M., Kataoka, K. and Vogt, P.K. (2003) MafA has strong cell transforming ability but is a weak transactivator. *Oncogene*, **22**, 5938-5946.
- Nobukuni, Y., Watanabe, A., Takeda, K., Skarka, H. and Tachibana, M. (1996) Analyses of loss-of-function mutations of the MITF gene suggest that haploinsufficiency is a cause of Waardenburg syndrome type 2A. *Am J Hum Genet*, **59**, 76-83.
- 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.
- Nornes, S., Clarkson, M., Mikkola, I., Pedersen, M., Bardsley, A., Martinez, J.P., Krauss, S. and Johansen, T. (1998) Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mech Dev*, **77**, 185-196.
- Ochi, H., Ogino, H., Kageyama, Y. and Yasuda, K. (2003) The stability of the lens-specific Maf protein is regulated by fibroblast growth factor (FGF)/ERK signaling in lens fiber differentiation. *J Biol Chem*, **278**, 537-544.
- Ogino, H. and Yasuda, K. (1998) Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. *Science*, **280**, 115-118.
- Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Gruss, P. (1995) Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development*, **121**, 4045-4055.
- Oliver, G., Sosa-Pineda, B., Geisendorf, S., Spana, E.P., Doe, C.Q. and Gruss, P. (1993) Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech Dev*, **44**, 3-16.
- Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M.T., Hodgkinson, C.A., Pavan, W.J. and Arnheiter, H. (1997) Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development*, **124**, 2377-2386.
- Orlow, S.J. (1995) Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol*, **105**, 3-7.
- Orlow, S.J. and Brilliant, M.H. (1999) The pink-eyed dilution locus controls the biogenesis of melanosomes and levels of melanosomal proteins in the eye. *Exp Eye Res*, **68**, 147-154.
- Pannese, M., Polo, C., Andreazzoli, M., Vignali, R., Kablar, B., Barsacchi, G. and Boncinelli, E. (1995) The *Xenopus* homologue of Otx2 is a maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions. *Development*, **121**, 707-720.

- Paton, D. and Craig, J.A. (1974) Cataracts: Development, diagnosis, and management. *Ciba Clin. Symp*, **26**, 2-32.
- Perron, M., Boy, S., Amato, M.A., Viczian, A., Koebernick, K., Pieler, T. and Harris, W.A. (2003) A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development*, **130**, 1565-1577.
- Piatigorsky, J. and Wistow, G.J. (1989) Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell*, **57**, 197-199.
- Pignoni, F., Hu, B., Zavitz, K.H., Xiao, J., Garrity, P.A. and Zipursky, S.L. (1997) The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in Drosophila eye development [published erratum appears in Cell 1998 Feb 20;92(4):following 585]. *Cell*, **91**, 881-891.
- Pittack, C., Jones, M., Reh, T.A. (1991) Basic Fibroblast Growth Factor Induces Retinal Pigmented Epithelium to Generate Neural Retina *in vitro*. *Development*, **113**, 577-588.
- Planque, N., Leconte, L., Coquelle, F.M., Benkhelifa, S., Martin, P., Felder-Schmittbuhl, M.P. and Saule, S. (2001a) Interaction of Maf transcription factors with Pax-6 results in synergistic activation of the glucagon promoter. *J Biol Chem*, **276**, 35751-35760.
- Planque, N., Leconte, L., Coquelle, F.M., Martin, P. and Saule, S. (2001b) Specific Pax-6/microphthalmia transcription factor interactions involve their DNA-binding domains and inhibit transcriptional properties of both proteins. *J Biol Chem*, **276**, 29330-29337.
- Planque, N., Turque, N., Opdecamp, K., Bailly, M., Martin, P. and Saule, S. (1999) Expression of the Microphthalmia associated basic-helix-loop-helix- Leucine Zipper transcription factor Mi in avian neuroretina cells induces a pigmented phenotype. *Cell Growth & Diff.*, **10**, 525-536.
- Plaza, S., Aumercier, M., Bailly, M., Dozier, C. and Saule, S. (1999a) Involvement of poly (ADP-ribose)-polymerase in the Pax-6 gene regulation in neuroretina. *Oncogene*, **18**, 1041-1051.
- Plaza, S., Dozier, C., Langlois, M.C. and Saule, S. (1995a) Identification and characterization of a neuroretina-specific enhancer element in the quail Pax-6 (Pax-QNR) gene. *Mol Cell Biol*, **15**, 892-903.
- Plaza, S., Dozier, C. and Saule, S. (1993) Quail Pax-6 (Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and trans-activate its own promoter. *Cell Growth Differ*, **4**, 1041-1050.
- Plaza, S., Dozier, C., Turque, N. and Saule, S. (1995b) Quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol Cell Biol*, **15**, 3344-3353.
- Plaza, S., Hennemann, H., Moroy, T., Saule, S. and Dozier, C. (1999b) Evidence that POU factor Brn-3B regulates expression of Pax-6 in neuroretina cells. *J Neurobiol*, **41**, 349-358.
- Plaza, S., Langlois, M.C., Turque, N., LeCornet, S., Bailly, M., Begue, A., Quatannens, B., Dozier, C. and Saule, S. (1997) The homeobox-containing Engrailed (En-1) product down-regulates the expression of Pax-6 through a DNA binding-independent mechanism. *Cell Growth Differ*, **8**, 1115-1125.
- Plaza, S., Saule, S. and Dozier, C. (1999c) High conservation of cis-regulatory elements between quail and human for the Pax-6 gene. *Dev Genes Evol*, **209**, 165-173.
- Poulin, G., Lebel, M., Chamberland, M., Paradis, F.W. and Drouin, J. (2000) Specific protein-protein interaction between basic helix-loop-helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol Cell Biol*, **20**, 4826-4837.
- Prada, C., Puga, J., Perez-Mendez, L., Lopez, R. and Ramirez, G. (1991) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *European Journal of Neuroscience*, **3**, 559-569.
- 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.

- Rajini, B., Shridas, P., Sundari, C.S., Muralidhar, D., Chandani, S., Thomas, F. and Sharma, Y. (2001) Calcium binding properties of gamma-crystallin: calcium ion binds at the Greek key beta gamma-crystallin fold. *J Biol Chem*, **276**, 38464-38471.
- Rasmussen, J.T., Deardorff, M.A., Tan, C., Rao, M.S., Klein, P.S. and Vetter, M.L. (2001) Regulation of eye development by frizzled signaling in *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3861-3866.
- Rehemtulla, A., Warwar, R., Kumar, R., Ji, X., Zack, D.J. and Swaroop, A. (1996) The basic motif-leucine zipper transcription factor Nrl can positively regulate rhodopsin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 191-195.
- Rehli, M., Den Elzen, N., Cassady, A.I., Ostrowski, M.C. and Hume, D.A. (1999a) Cloning and characterization of the murine genes for bHLH-ZIP transcription factors TFEC and TFEB reveal a common gene organization for all MiT subfamily members. *Genomics*, **56**, 111-120.
- Rehli, M., Lichanska, A., Cassady, A.I., Ostrowski, M.C. and Hume, D.A. (1999b) TFEC Is a Macrophage-Restricted Member of the Microphthalmia-TFE Subfamily of Basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper Transcription Factors. *J Immunol*, **162**, 1559-1565.
- Reza, H.M., Ogino, H. and Yasuda, K. (2002) L-Maf, a downstream target of Pax6, is essential for chick lens development. *Mech Dev*, **116**, 61-73.
- Ring, B.Z., Cordes, S.P., Overbeek, P.A. and Barsh, G.S. (2000) Regulation of mouse lens fiber cell development and differentiation by the Maf gene. *Development*, **127**, 307-317.
- Sakai, M., Imaki, J., Yoshida, K., Ogata, A., Matsushima-Hibaya, Y., Kuboki, Y., Nishizawa, M. and Nishi, S. (1997) Rat maf related genes: specific expression in chondrocytes, lens and spinal cord. *Oncogene*, **14**, 745-750.
- Sakai, M., Serria, M.S., Ikeda, H., Yoshida, K., Imaki, J. and Nishi, S. (2001) Regulation of c-maf gene expression by Pax6 in cultured cells. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1228-1237.
- Sakuta, H., Suzuki, R., Takahashi, H., Kato, A., Shintani, T., Iemura, S., Yamamoto, T.S., Ueno, N. and Noda, M. (2001) Ventroptin: a BMP-4 antagonist expressed in a double-gradient pattern in the retina. *Science*, **293**, 111-115.
- Sato, S., Roberts, K., Gambino, G., Cook, A., Kouzarides, T. and Goding, C.R. (1997) CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. *Oncogene*, **14**, 3083-3092.
- Scardigli, R., Baumer, N., Gruss, P., Guillemot, F. and Le Roux, I. (2003) Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by Pax6. *Development*, **130**, 3269-3281.
- Schedl, A., Ross, A., Lee, M., Engelkamp, D., Rashbass, P., van Heyningen, V. and Hastie, N.D. (1996) Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell*, **86**, 71-82.
- Schneikert, J., Lutz, Y. and Wasylyk, B. (1992) Two independent activation domains in c-Ets-1 and c-Ets-2 located in non-conserved sequences of the ets gene family. *Oncogene*, **7**, 249-256.
- Schulte, D., Furukawa, T., Peters, M.A., Kozak, C.A. and Cepko, C.L. (1999) Misexpression of the Emx-related homeobox genes cVax and mVax2 ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map. *Neuron*, **24**, 541-553.
- Schwarzstein, M., Kirn, A., Haffter, P. and Cordes, S.P. (1999) Expression of Zkrml2, a homologue of the Krml1/val segmentation gene, during embryonic patterning of the zebrafish (*Danio rerio*). *Mech Dev*, **80**, 223-226.
- Schwarz, M., Cecconi, F., Bernier, G., Andrejewski, N., Kammandel, B., Wagner, M. and Gruss, P. (2000) Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development*, **127**, 4325-4334.
- Sharon-Friling, R., Richardson, J., Sperbeck, S., Lee, D., Rauchman, M., Maas, R., Swaroop, A. and Wistow, G. (1998) Lens-specific gene recruitment of zeta-crystallin through Pax6, Nrl-Maf, and brain suppressor sites. *Mol Cell Biol*, **18**, 2067-2076.

- Shen, W. and Mardon, G. (1997) Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed dachshund expression. *Development*, **124**, 45-52.
- Shibahara, S., Takeda, K., Yasumoto, K., Udono, T., Watanabe, K., Saito, H. and Takahashi, K. (2001) Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation. *J Invest Dermatol Symp Proc*, **6**, 99-104.
- Shibahara, S., Tomita, Y., Sakakura, T., Nager, C., Chaudhuri, B. and Muller, R. (1986) Cloning and expression of cDNA encoding mouse tyrosinase. *Nucleic Acids Res*, **14**, 2413-2427.
- Shimada, N., Aya-Murata, T., Reza, H.M. and Yasuda, K. (2003) Cooperative action between L-Maf and Sox2 on delta-crystallin gene expression during chick lens development. *Mech Dev*, **120**, 455-465.
- Sieweke, M.H., Tekotte, H., Frampton, J. and Graf, T. (1996) MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell*, **85**, 49-60.
- Sieweke, M.H., Tekotte, H., Frampton, J. and Graf, T. (1997) MafB represses erythroid genes and differentiation through direct interaction with c-Ets-1. *Leukemia*, **11 Suppl 3**, 486-488.
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A. and Boncinelli, E. (1992) Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature*, **358**, 687-690.
- Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M.R., Nigro, V. and Boncinelli, E. (1993) A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *Embo J*, **12**, 2735-2747.
- Simeone, A., Avantaggiato, V., Moroni, M.C., Mavilio, F., Arra, C., Cotelli, F., Nigro, V. and Acampora, D. (1995) Retinoic acid induces stage-specific antero-posterior transformation of rostral central nervous system. *Mech Dev*, **51**, 83-98.
- Simpson, T.I. and Price, D.J. (2002) Pax6; a pleiotropic player in development. *Bioessays*, **24**, 1041-1051.
- Singh, S., Mishra, R., Arango, N.A., Deng, J.M., Behringer, R.R. and Saunders, G.F. (2002) Iris hypoplasia in mice that lack the alternatively spliced Pax6(5a) isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6812-6815.
- Sivak, J.M., Mohan, R., Rinehart, W.B., Xu, P.X., Maas, R.L. and Fini, M.E. (2000) Pax-6 expression and activity are induced in the reepithelializing cornea and control activity of the transcriptional promoter for matrix metalloproteinase gelatinase B. *Dev Biol*, **222**, 41-54.
- Skala-Rubinson, H., Vinh, J., Labas, V., Kahn, A. and Phan, D.T. (2002) Novel target sequences for Pax-6 in the brain-specific activating regions of the rat aldolase C gene. *J Biol Chem*, **277**, 47190-47196.
- Steingrimsson, E., Moore, K.J., Lamoreux, M.L., Ferre, D.A.A.R., Burley, S.K., Zimring, D.C., Skow, L.C., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G. and et al. (1994) Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences [see comments]. *Nat Genet*, **8**, 256-263.
- Steingrimsson, E., Tessarollo, L., Reid, S.W., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (1998) The bHLH-Zip transcription factor Tfeb is essential for placental vascularization. *Development*, **125**, 4607-4616.
- Suda, Y., Matsuo, I. and Aizawa, S. (1997) Cooperation between Otx1 and Otx2 genes in developmental patterning of rostral brain. *Mech Dev*, **69**, 125-141.
- 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 U S A*, **89**, 266-270.
- Takeda, K., Yasumoto, K., Kawaguchi, N., Udono, T., Watanabe, K., Saito, H., Takahashi, K., Noda, M. and Shibahara, S. (2002) Mitf-D, a newly identified isoform, expressed in the

- retinal pigment epithelium and monocyte-lineage cells affected by *Mitf* mutations. *Biochim Biophys Acta*, **1574**, 15-23.
- Take-uchi, M., Clarke, J.D. and Wilson, S.W. (2003) Hedgehog signalling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of *Vax* gene activity. *Development*, **130**, 955-968.
- Tanaka, M., Tanaka, S., Miura, H., Yasumoto, H., Kikuchi, H. and Takeuchi, T. (1992) Conserved regulatory mechanisms of tyrosinase gene in mice and humans. *Pigm. cell. rech.*, **5**, 304-311.
- Tassabehji, M., Newton, V.E. and Read, A.P. (1994) Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (*MITF*) gene [see comments]. *Nat Genet*, **8**, 251-255.
- Teillet, M.A.a.L.D., N.M. (1970) *C. R. Acad. Sci.*, **270**, 3095-3098.
- Theil, T., Ariza-McNaughton, L., Manzanares, M., Brodie, J., Krumlauf, R. and Wilkinson, D.G. (2002) Requirement for downregulation of *kreisler* during late patterning of the hindbrain. *Development*, **129**, 1477-1485.
- Toki, T., Itoh, J., Kitazawa, J., Arai, K., Hatakeyama, K., Akasaka, J., Igarashi, K., Nomura, N., Yokoyama, M., Yamamoto, M. and Ito, E. (1997) Human small *Maf* proteins form heterodimers with *CNC* family transcription factors and recognize the NF-E2 motif. *Oncogene*, **14**, 1901-1910.
- Tomarev, S.I., Callaerts, P., Kos, L., Zinovieva, R., Halder, G., Gehring, W. and Piatigorsky, J. (1997) Squid *Pax-6* and eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2421-2426.
- Torres, M., Gomez-Pardo, E. and Gruss, P. (1996) *Pax2* contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development*, **122**, 3381-3391.
- Tsunematu, Y. and Coulombre, A.J. (1981) Demonstration of transdifferentiation of of neural retina from pigmented retina in culture. *Development, Growth and Differentiation*, **23**, 297-311.
- Turque, N., Denhez, F., Martin, P., Planque, N., Bailly, M., Begue, A., Stehelin, D. and Saule, S. (1996) Characterization of a new melanocyte-specific gene (*QNR-71*) expressed in *v-myc*-transformed quail neuroretina. *Embo J*, **15**, 3338-3350.
- Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carriere, 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.
- Udono, T., Yasumoto, K., Takeda, K., Amae, S., Watanabe, K., Saito, H., Fuse, N., Tachibana, M., Takahashi, K., Tamai, M. and Shibahara, S. (2000) Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters. *Biochim Biophys Acta*, **1491**, 205-219.
- van Heyningen, V. and Williamson, K.A. (2002) *PAX6* in sensory development. *Hum Mol Genet*, **11**, 1161-1167.
- Vogel-Hopker, A., Momose, T., Rohrer, H., Yasuda, K., Ishihara, L. and Rapaport, D.H. (2000) Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (*FGF-8*) in chick eye development. *Mech Dev*, **94**, 25-36.
- Walther, C. and Gruss, P. (1991) *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*, **113**, 1435-1449.
- Wang, S.W., Mu, X., Bowers, W.J., Kim, D.S., Plas, D.J., Crair, M.C., Federoff, H.J., Gan, L. and Klein, W.H. (2002) *Brn3b/Brn3c* double knockout mice reveal an unsuspected role for *Brn3c* in retinal ganglion cell axon outgrowth. *Development*, **129**, 467-477.
- Wawersik, S., Purcell, P., Rauchman, M., Dudley, A.T., Robertson, E.J. and Maas, R. (1999) *BMP7* acts in murine lens placode development. *Dev Biol*, **207**, 176-188.
- Weilbaecher, K.N., Hershey, C.L., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Hemesath, T.J., Tashjian, A.H. and Fisher, D.E. (1998) Age-resolving osteopetrosis: a rat model implicating microphthalmia and the related transcription factor *TFE3*. *J Exp Med*, **187**, 775-785.

- Weimann, J.M., Zhang, Y.A., Levin, M.E., Devine, W.P., Brulet, P. and McConnell, S.K. (1999) Cortical neurons require Otx1 for the refinement of exuberant axonal projections to subcortical targets. *Neuron*, **24**, 819-831.
- Williams, N.A. and Holland, P.W. (1998) Gene and domain duplication in the chordate Otx gene family: insights from amphioxus Otx. *Mol Biol Evol*, **15**, 600-607.
- Williams, S.C., Altmann, C.R., Chow, R.L., Hemmati-Brivanlou, A. and Lang, R.A. (1998) A highly conserved lens transcriptional control element from the Pax-6 gene. *Mech Dev*, **73**, 225-229.
- Winder, A., Kobayashi, T., Tsukamoto, K., Urabe, K., Aroca, P., Kameyama, K. and Hearing, V.J. (1994) The tyrosinase gene family--interactions of melanogenic proteins to regulate melanogenesis. *Cell Mol Biol Res*, **40**, 613-626.
- Wistow, G. (1993) Lens crystallins: gene recruitment and evolutionary dynamism. *Trends Biochem Sci*, **18**, 301-306.
- Wolffe, A.P. (1994) Nucleosome positioning and modification : chromatin structures that potentiate transcription. *TIBS*, **19**, 240-244.
- Wu, M., Hemesath, T.J., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Price, E.R., Fisher, D.Z. and Fisher, D.E. (2000) c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev*, **14**, 301-312.
- Xi, J., Farjo, R., Yoshida, S., Kern, T.S., Swaroop, A. and Andley, U.P. (2003) A comprehensive analysis of the expression of crystallins in mouse retina. *Mol Vis*, **9**, 410-419.
- Xu, P.X., Zhang, X., Heaney, S., Yoon, A., Michelson, A.M. and Maas, R.L. (1999) Regulation of Pax6 expression is conserved between mice and flies. *Development*, **126**, 383-395.
- Yajima, I., Sato, S., Kimura, T., Yasumoto, K., Shibahara, S., Goding, C.R. and Yamamoto, H. (1999) An L1 element intronic insertion in the black-eyed white (Mitf^{mi-bw}) gene: the loss of a single Mitf isoform responsible for the pigmentary defect and inner ear deafness. *Hum Mol Genet*, **8**, 1431-1441.
- Yamada, R., Mizutani-Koseki, Y., Hasegawa, T., Osumi, N., Koseki, H. and Takahashi, N. (2003) Cell-autonomous involvement of Mab2111 is essential for lens placode development. *Development*, **130**, 1759-1770.
- Yasumoto, K., Amae, S., Udono, T., Fuse, N., Takeda, K. and Shibahara, S. (1998) A big gene linked to small eyes encodes multiple Mitf isoforms: many promoters make light work [In Process Citation]. *Pigment Cell Res*, **11**, 329-336.
- Yasumoto, K., Mahalingam, H., Suzuki, H., Yoshizawa, M. and Yokoyama, K. (1995) Transcriptional activation of the melanocyte-specific genes by the human homolog of the mouse Microphthalmia protein. *J Biochem (Tokyo)*, **118**, 874-881.
- Yasumoto, K., Takeda, K., Saito, H., Watanabe, K., Takahashi, K. and Shibahara, S. (2002) Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *Embo J*, **21**, 2703-2714.
- Yasumoto, K., 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 [published erratum appears in Mol Cell Biol 1995 Mar;15(3):1833]. *Mol Cell Biol*, **14**, 8058-8070.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Takahashi, K., Tomita, Y. and Shibahara, S. (1997) Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J Biol Chem*, **272**, 503-509.
- Yoshida, K., Imaki, J., Koyama, Y., Harada, T., Shinmei, Y., Oishi, C., Matsushima-Hibiya, Y., Matsuda, A., Nishi, S., Matsuda, H. and Sakai, M. (1997) Differential expression of maf-1 and maf-2 genes in the developing rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **38**, 2679-2683.
- Zhang, X.M. and Yang, X.J. (2001) Temporal and spatial effects of Sonic hedgehog signaling in chick eye morphogenesis. *Dev Biol*, **233**, 271-290.

- Zhang, Y. and Emmons, S.W. (1995) Specification of sense-organ identity by a *Caenorhabditis elegans* Pax-6 homologue. *Nature*, **377**, 55-59.
- Zhang, Y.A., Okada, A., Lew, C.H. and McConnell, S.K. (2002) Regulated nuclear trafficking of the homeodomain protein *otx1* in cortical neurons. *Mol Cell Neurosci*, **19**, 430-446.
- Zhao, G.Q., Zhao, Q., Zhou, X., Mattei, M.G. and de Crombrughe, 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.
- Zuber, M.E., Gestri, G., Viczian, A.S., Barsacchi, G. and Harris, W.A. (2003) Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development*, **130**, 5155-5167.
- Zygar, C.A., Cook, T.L. and Grainger, R.M., Jr. (1998) Gene activation during early stages of lens induction in *Xenopus*. *Development*, **125**, 3509-3519.

RESUME

Le développement de l'œil, comme de tout autre organe, fait appel à plusieurs événements : des inductions entre tissus par l'intermédiaire de facteurs diffusibles et des interactions cellulaires, conduisant à la mise en place d'une combinatoire spécifique de facteurs de transcription.

Otx2 est une protéine à homeodomaine exprimée dans la rétine pigmentaire puis dans la neurorétine. Nous avons montré qu'Otx2 peut transdifférencier des cellules de neurorétine en cellules pigmentées *in vitro* et qu'il peut activer des gènes de la pigmentation, tout comme Mitf, facteur à domaine bHLHLZ et acteur majeur de la différenciation pigmentaire. Nous avons observé que ces deux facteurs interagissent physiquement et peuvent entrer en synergie pour activer la pigmentation.

Nous avons aussi étudié la régulation de l'expression de *pax6*, un gène maître du développement de l'œil qui code une protéine à homéodomaine et domaine paired. Nous avons analysé le rôle des facteurs de transcription Maf, protéines à domaine bLZ, dans le contrôle transcriptionnel de *pax6*. Nous avons montré que les membres de la famille Maf peuvent réguler différemment l'expression de *pax6 in vitro*, en fonction des éléments régulateurs considérés (promoteurs ou enhanceurs). De plus, Maf pourrait interagir avec Otx2 pour un contrôle fin de l'expression de *pax6*.

Les mots-clés : neurorétine, rétine pigmentaire, cristallin, développement de l'oeil, transdifférenciation, facteur de transcription, régulation de l'expression, promoteur, enhancer, Maf, Mitf, Otx2, Pax6.