



Caractérisation du rôle clé de Mab21l2 dans le développement de la rétine et du rhombencéphale chez le poisson-zèbre

Anaïs Vitrac

► To cite this version:

Anaïs Vitrac. Caractérisation du rôle clé de Mab21l2 dans le développement de la rétine et du rhombencéphale chez le poisson-zèbre. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS164 . tel-03337876

HAL Id: tel-03337876

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03337876>

Submitted on 8 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat
Sorbonne Université

Ecole doctorale 158 : Cerveau-Cognition-Comportement
Neuroscience Paris-Seine

Caractérisation du rôle clé de
Mab2112 dans le développement de
la rétine et du rhombencéphale chez
le poisson-zèbre

Par Anaïs Vitrac

Sous la direction de Jamilé Hazan

Soutenue le 3 avril 2020

Mme Muriel Perron
M. Jean-Michel Rozet
Mme Isabelle Brunet
M. Xavier Nicole
M. Filippo Del Bene
Mme Jamilé Hazan

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Directrice de thèse

Remerciements

Après un peu plus de quatre années passées au sein de l'IBPS, mon travail de thèse s'achève désormais. Même si, la plupart du temps, j'étais seule à maniper, tout ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes, que ce soit sur le plan scientifique ou moral, alors tenez-vous bien car les pages suivantes sont pour vous.

Pour commencer je voudrais remercier mes rapporteurs - Muriel Perron et Jean-Michel Rozet - de prendre le temps d'analyser et juger mon travail de thèse, ainsi que les membres de mon jury - Xavier Nicole, Filippo Del Bene et Isabelle Brunet – pour accepter de venir évaluer mon travail. C'est un honneur pour moi de présenter mes résultats et conclusions devant vous tous.

Je tiens également en particulier à remercier ma directrice de thèse, Jamilé Hazan, qui m'a fait confiance et accueillie au sein de son équipe sans rien savoir de moi. J'ai toqué à ta porte, un peu à la dernière minute, en quête d'un stage de M2 et tu m'as fait confiance pour partir sur un sujet qui diffère grandement de ce que tu avais l'habitude d'étudier. Je te remercie donc pour cette liberté de recherche que tu m'as donnée au cours de ma thèse. J'ai toujours eu l'impression que c'était véritablement mon projet et que je pourrais l'emmener dans les directions que je désirais et cela était très important pour moi. Je te remercie également pour ta bonne humeur et les petites douceurs que tu rapportes souvent au laboratoire. Ce n'est peut-être pas grand-chose mais quand les journées sont difficiles, cela met toujours du baume au cœur. Enfin, je te remercie pour ces derniers mois de thèse où nos discussions scientifiques sur l'avancée du projet se sont particulièrement multipliées et intensifiées. Nous ne sommes plus que toute les deux désormais et ces discussions étaient extrêmement stimulantes pour l'écriture de ce manuscrit donc encore merci à toi.

Je voudrais également remercier les membres de l'ancienne équipe Développement et Dégénérescence des Neurones Moteurs Spinaux : Coralie Fassier, Melody Atkins, Laila Gasmi et Nicolas Jardin. Je remercie grandement Coralie pour toute l'aide technique et scientifique qu'elle m'a apportée au cours de ma présence au laboratoire. Malgré que nous ne travaillions pas sur le même sujet, ni même sur les mêmes organes, tu as toujours été là pour me donner des

conseils et des protocoles alors un grand merci à toi. Même aujourd’hui, alors que tu travailles désormais à l’institut de la vision, tu continues de m’aider sur des techniques nouvelles et que je ne maîtrise pas encore. Je sais que ces dernières années ont été particulièrement chargées et stressantes pour toi, je te remercie donc d’avoir su prendre du temps pour moi aussi bien scientifiquement que moralement. Je te souhaite beaucoup de bien pour la suite et bienvenue dans les joies de la recherche sur le système visuel.

Je remercie également énormément Melody, ma compagne thésarde qui m’a supportée durant sa fin de thèse et le début de la mienne. Si tu n’as pas été là, ma thèse n’aurait pas été aussi sympathique à vivre. Le fait d’avoir une autre étudiante traversant les mêmes choses que moi et avec qui je pouvais partager les moments de doutes comme de joies était très important pour ma santé mentale. Je retiens notamment notre escapade à Budapest pour un congrès, c’était vraiment une petite parenthèse sympathique à partager avec toi. Le laboratoire a paru bien vide après ton départ. Je te souhaite plein de courage pour la suite de ta carrière et surtout plein de réussite, je ne doute pas que tu réussiras à atteindre tes objectifs.

Je remercie Laila pour toutes ces discussions scientifiques et conseils pratiques tout au long de ma thèse ainsi que toutes nos petites discussions non scientifiques. Tu as été d’un grand support durant ces dernières années et je te remercie pour cela. Même maintenant que nous ne travaillons plus dans les mêmes équipes tu continues de venir m’apporter ton aide et de prendre de mes nouvelles. Tu es quelqu’un d’entier et je te remercie pour tout cela.

Enfin, je remercie Nicolas avec qui je n’ai pu partager qu’une seule année de travail avant son départ. Lorsque je suis arrivée, j’étais une jeune stagiaire de M2 qui n’avait pas encore pris ses marques et tu as pris soin de me présenter aux membres de l’institut et de faire en sorte que je me sente accueillie. Je t’en suis grandement reconnaissante. C’est également toi qui m’a appris à m’occuper de l’animalerie aquatique et qui m’a aider à savoir où était rangé tout notre matériel. Tu étais sûrement très occupé, étant en fin de quatrième année de thèse mais tu as toujours su être présent pour moi. Alors pour ça je te dis un grand merci.

Durant cette thèse j’ai également officiellement changé d’équipe puisque Jamilé Hazan a rejoint les membres de l’équipe Neurophysiologie et Comportements dirigée par Philippe Faure. Je tiens à le remercier, lui et toute son équipe au complet, pour leur accueil. Malgré le fait que nous travaillons sur des sujets complètement différents, vous êtes quand même prêts à m’écouter parler de mes résultats et à me donner des conseils pour la suite. De plus, bien que nous ne soyons même pas situés dans les mêmes bureaux, vous m’incluez toujours dans vos événements sociaux d’équipe et je vous en remercie pour cela. Je remercie tout particulièrement

Philippe Faure sans qui cette thèse aurait pris fin au mois de novembre. Bien que ne travaillant pas sur ces thématiques, il m'a quand même financé plusieurs mois de salaire de manière à ce que je puisse achever mon travail de thèse. Il finance également tout le matériel dont je pourrais avoir besoin pour cette fin de thèse donc un énorme merci à lui. Ma thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui sans ce soutien financier.

Je tiens également à remercier les membres actuels et anciens de l'association des doctorants et post-doctorants de l'IBPS (anciennement club des docs et post-docs) : Claire Nguyen, Sophie Fayad, Jennifer Durant, Pauline Monnot, Julie Stoufflet, Estefani Saint-Jour, Pénélope Tignard, Pénélope Darnat, Soumee Bhattacharya, Maxime Chaulet, Elia Mota, Arturo Torres et Josquin Courte. J'ai rejoint vos rangs il y a un peu plus d'un an après que mon équipe se soit grandement réduite et votre présence et votre grain de folie m'ont fait le plus grand bien. Je vous remercie pour votre bonne humeur sans faille et ces moments partagés à essayer d'amener un peu de vie et de cohésion au sein de notre institut, je ne suis pas prête de les oublier. Avoir une petite communauté d'étudiants partageant les mêmes étapes que moi étaient vraiment un soutien important pour cette dernière année. En particulier, je voudrais remercier grandement Claire avec qui j'ai découvert une passion commune pour les danses latines. Je ne pourrais jamais assez te remercier de m'avoir trainée à toutes ces soirées salsa alors que j'étais en train de crouler sous les choses à faire pour l'écriture de ce manuscrit. Toutes ces petites sorties m'ont fait un bien fou et je suis ravie d'avoir eu l'occasion de découvrir une si belle personne. J'espère que notre amitié continuera par la suite même si la distance physique devait s'installer de par les chemins différents que nous allons emprunter.

Je voudrais aussi remercier grandement Christine Vesque et son équipe au sein du département de Développement pour toute son aide technique apportée au cours de ma thèse ainsi que pour tout le matériel qu'elle a pu me procurer tels que des plasmides, sondes etc. Je la remercie également d'avoir pris le temps de faire partie de mes comités de suivis de thèse. Elle a su garder un œil critique et bienveillant sur l'avancement du projet et m'a fourni de nombreux conseils. Merci encore à toi pour toutes ces petites formations et conseils.

Je tiens à remercier chaleureusement toute l'équipe de l'animalerie aquatique de l'institut et en particulier Alex Bois, Stephane Tronche et Abdelkrim Manniou. Vous faites un énorme travail à l'animalerie pour nous permettre de réaliser notre recherche et tout cela serait

bien moins facile sans vous alors je vous dis un grand merci. Merci aussi à Alexis Eschstruth pour sa formation CRISPR/Cas9 au sein de l'animalerie.

Je tiens également à remercier Joanna Diamant, ma gestionnaire, pour toute l'aide administrative qu'elle a pu m'apporter et pour avoir toujours gardé le sourire malgré les problèmes administratifs qu'il pouvait y avoir.

Je remercie Alexandra Rebsam pour sa participation à mes comités de suivi de thèse et ses conseils sur la suite du projet. Ces comités pouvaient être longs mais tu étais toujours souriante et bienveillante.

Enfin, je remercie tous mes collègues de l'IBPS que je croise au détour d'un couloir ou à la cafétéria. Nos échanges étaient parfois bref et parfois très long mais toujours les bienvenues. Vous avez participé à faire de mon environnement un endroit sympathique où j'ai pu m'épanouir en toute sérénité.

Mais je ne peux m'arrêter là sans oublier des personnes très importantes. Une thèse est avant tout un cheminement scientifique mais celui-ci ne serait pas possible sans un bon équilibre personnel et pour cela je me dois de remercier tous mes proches, qui ne comprenaient pas forcément ce que je pouvais bien faire de mes journées, mais qui étaient toujours là pour me soutenir.

Je remercie ainsi du fond de mon cœur toute ma famille – mes parents Jacques Vitrac et Chantal Hervé, mes sœurs Anne-Sophie et Amélie, mes beaux-frères Juan Diego et Renaud ainsi que ma nièce Haylie - pour m'avoir écouté me plaindre les jours où ça n'allait pas et pour avoir, au contraire, supporté mon enthousiasme et mes déblatérations les jours où tout se passait bien. Bien que vous soyez persuadés que je passe mon temps à disséquer des yeux de poissons (ce qui, je le répète, est totalement faux), vous avez toujours été là à m'encourager et à me relever lorsque les choses n'allait pas et ce depuis bien avant que je commence cette thèse. Un grand merci à vous car il est évident que sans votre éducation et votre soutien je n'en serai pas là aujourd'hui. Je pourrais continuer encore pendant des lignes et des lignes, après tout j'ai 27 années de choses à vous remercier, mais je pense que vous savez déjà à quel point vous êtes importants et je vais donc m'arrêter là. J'espère que vous apprécierez ce travail et qu'il vous rendra fiers, ne serait-ce qu'un petit peu.

Et enfin je tiens à remercier tous mes amis qui ont été là pour moi et qui ont su m'aérer l'esprit par leur présence. En premier, je remercie mes fidèles amies d'enfance Emma Briffaut, Adeline Tahan, Marine Lalu, Carole Repérant, Sarah Desagnat et Charlotte Thébault. On se connaît depuis toujours et je sais que même si désormais on habite un peu au quatre coin de la France, voire de la planète, je pourrais toujours compter sur vous. J'ai passé mon enfance avec vous, vous m'avez vu devenir celle que je suis aujourd'hui et rien ne changera jamais cela. Merci à vous d'être toujours les mêmes, surtout ne changez jamais !

Je remercie aussi mes deux sœurs de cœur Hélène François et Stacy Lefebvre. Votre soutien sans faille et votre écoute est très importante pour moi et j'espère que notre amitié ne se fanera jamais. Je sais que vous serez toujours là quoi qu'il advienne, et je vous remercie pour tous ces bons moments partagés durant cette thèse qui m'auront permis de me poser un peu et de m'aérer l'esprit.

Je remercie également mon groupe de folles du master : Samantha Chery, Roselina Lam, Mathilde Audry, Eleonore Mulot, Yetki Aslan ainsi que leur conjoint respectif Paul, Julien, Clément et Norman pour toutes ces après-midi et soirées de fun passées tous ensemble. Vous m'avez fait me remettre au sport, découvrir des tonnes de jeux de sociétés et tellement d'autres choses que je ne vous remercierais jamais assez. C'est toujours un bonheur que de passer du temps avec vous que soit en groupe ou en individuel. Vous avez été de véritables petites escapades hors du temps pendant cette thèse alors encore merci à vous tous.

Et enfin je remercie mes autres amis Anna-Marine Lavaud, Mylène Bun et Antoine Canat. On se voit un petit peu moins souvent mais vous faites aussi parti de mon petit support moral et je tenais à vous remercier pour votre gentillesse et votre amitié.

Table des matières

Table des figures	11
Abréviations	13
Chapitre 1 : Introduction	15
I. Développement du système visuel	17
1. Morphogenèse de l'oeil.....	19
a) Etablissement du champ oculaire	19
b) Séparation du champ oculaire	22
a) Vésicule et cupule optiques	23
2. Différenciation de la rétine.....	26
a) Prolifération	26
b) Différenciation en vagues	28
c) Signaux permettant l'hétérogénéité des cellules de la rétine	29
3. Lamination de la rétine.....	34
a) Migration cellulaire.....	34
b) Migration axonale.....	35
4. Pathologies liées au développement de l'œil : troubles microptalmiques, anophthalmiques et colobomes (MAC).....	41
a) Rôle des facteurs de transcription.....	42
b) Différentes voies de signalisation impliquées.....	44
c) Autres familles de gènes à l'origine de MACs	47
II. La famille mab-21	48
1. Première découverte.....	48
2. Différents paralogues chez les vertébrés	49
a) Mab21l3	50
b) Mab21l1	51
3. Mab21l2.....	54
a) Expression au cours du développement des vertébrés.....	54
a) Conséquences de la perte de mab21l2	55
b) Voies de signalisations de mab21l2	57
c) Mutations chez l'Homme	58
III. Objectifs de la thèse	61

Chapitre 2 : Matériels et méthodes	65
Chapitre 3 : Résultats et discussion	73
I. Rôle de Mab21l2 dans le système visuel	75
1. Expression de <i>mab21l2</i>	75
2. Les outils de la perte de fonction	75
3. La perte de fonction partielle ou totale induit la formation de colobomes	77
4. La perte de Mab21l2 chez les morphants engendre une expansion de Pax2 au détriment de Pax6.....	78
5. La perte de fonction de Mab21l2 entraîne des défauts de trajectoire axonale des RGCs	78
6. La perte de Mab21l2 entraîne également des défauts de formation des photorécepteurs....	81
7. L'absence ou la diminution de Mab21l2 provoque des problèmes de lamination de la rétine.....	82
8. Conséquence de la perte de Mab21l2 sur la mort cellulaire	85
a) L'apoptose est augmentée uniquement chez les morphants	85
b) L'augmentation de l'apoptose chez les morphants est bien significative mais plus faible que prévu....	86
9. Analyse comparative transcriptomique	88
II. Rôle de Mab21l2 dans le développement du rhombencéphale	91
1. Développement du rhombencéphale.....	91
a) Segmentation du rhombencéphale	92
(i) Formation des frontières inter-rhombomériques	93
(ii) Gènes <i>Hox</i> : structure de la segmentation	94
(iii) Les cofacteurs des <i>Hox</i> : les <i>Meis</i> et <i>Pbx</i>	96
(iv) Autres marqueurs des rhombomères.....	98
(v) Les voies de signalisations et le développement du rhombencéphale.....	99
b) Formation et migration des neurones branchio-moteurs crâniens	104
(i) Facteurs communs à l'identité des rhombomères	105
(ii) Autres facteurs de transcription	106
(iii) Importance des signaux extérieurs.....	106
2. Résultats expérimentaux	107
a) La perte transitoire de Mab21l2 altère le développement du cervelet	107
b) Le <i>knockdown</i> de Mab21l2 engendre des défauts de développement du rhombencéphale que l'on ne retrouve que partiellement chez le mutant	108
c) Validation de la spécificité des phénotypes du rhombencéphale	110
d) Les défauts du rhombencéphale sont compensés par Mab21l1 chez les mutants.....	112
e) Effet de l'absence de Mab21l2 sur les marqueurs du rhombencéphale	113

f) Analyse des résultats de notre cible transcriptomique sous l'angle du rhombencéphale	115
Chapitre 4 : Conclusion et perspectives	117
I. Mab21l2 est un élément clé du développement du système visuel.....	119
II. Mais Mab21l2 est également requis dans la formation du rhombencéphale et du cervelet.....	121
III. Morphants et mutants donnent des phénotypes similaires	122
Bibliographie	125
Annexe	167

Table des figures

Figure 1 : Couches cellulaires de la rétine chez les mammifères et le poisson-zèbre	18
Figure 2 : Modèle proposé pour la séparation du champ oculaire	22
Figure 3 : Modèle proposé pour l'évagination de la vésicule optique.....	23
Figure 4 : Le rôle de Shh dans la formation des vésicules optiques suite à l'évagination	24
Figure 5 : Invagination de la cupule optique et création de la fissure choroïdienne	25
Figure 6 : Schéma du réseau de régulation de la sortie du cycle cellulaire	28
Figure 7 : Différenciation en éventail des cellules de la rétine du poisson-zèbre.....	29
Figure 8 : Modèles de la différenciation des RPCs	30
Figure 9 : Modèle de pluripotence des RPCs et de leur régulation	33
Figure 10 : Migration apico-basale des RGCs	35
Figure 11 : Contrôle de la croissance axonale des RGCs.....	40
Figure 12 : Colobomes chez l'Homme et le poisson-zèbre	41
Figure 13 : La mutation de mab-21 entraîne une fusion des raies sensorielles 4, 5 et 6	48
Figure 14 : Perte et gain de fonction de Xmab21l3	50
Figure 15 : Expression différentielle de mab21l1 et mab21l2 chez la souris	51
Figure 16 : Les signes cliniques du syndrome COFG associé à des mutations dans MAB21L1	53
Figure 17 : Expression de mab21l2 chez l'embryon de poisson zèbre	54
Figure 18 : Expression de mab21l2 chez différentes espèces	55
Figure 19 : Tableau récapitulatif des défauts associés à chaque mutation	59
Figure 20 : Mutations de MAB21L2 et phénotypes cliniques associés	60
Figure 21 : Potentiels partenaires d'interaction de Mab21l2	63
Figure 22 : Vérification du motif d'expression de Mab21l2	75
Figure 23 : Création d'une lignée mutante nulle mab21l2	76
Figure 24 : L'absence de mab21l2 entraîne la présence de colobomes	77
Figure 25 : La perte de Mab21l2 modifie l'expression de facteurs de transcriptions	78
Figure 26 : La perte partielle ou totale de Mab21l2 engendre une croissance axonale anormale des RGCs	80
Figure 27 : La déplétion de Mab21l2 entraîne une baisse significative du nombre de photorécepteurs.....	81
Figure 28 : Impact de la diminution ou de l'absence de Mab21l2 sur la lamination de la rétine	83
Figure 29 : Expression d'Islet1 dans les rétines de larves contrôles, morphantes et mutantes	85
Figure 30 : La perte de mab21l2 impacte différemment les morphants et les mutants quant à .. l'apoptose induite	86
Figure 31 : L'augmentation de l'apoptose chez les morphants reste significative même après suppression de celle induite par p53	87
Figure 32 : Perturbation du rhombencéphale suite au knockdown de mab21l2.....	91

Figure 33 : Organisation du rhombencéphale	92
Figure 34 : Expression des gènes Hox dans les rhombencéphales murin et téléosté	96
Figure 35 : Expression de trois marqueurs clés du patterning du rhombencéphale.....	99
Figure 36 : Schéma récapitulatif des acteurs du développement du rhombencéphale.....	103
Figure 37 : Organisation des neurones crâniens du poisson-zèbre	104
Figure 38 : La taille du cervelet est réduite chez les morphants mab21l2	108
Figure 39 : Le knockdown et le knockout de Mab21l2 affectent le développement du rhombencéphale à des degrés différents.....	110
Figure 40 : L'injection du morpholino mab21l2 n'aggrave pas la sévérité des phénotypes mutants.....	111
Figure 41 : Le knockdown de Mab21l1 dans les mutants Mab21l2^{32*} entraîne l'aggravation des phénotypes associés à la perte de Mab21l2 dans le rhombencéphale	113
Figure 42 : Expression de certains marqueurs clés du rhombencéphale après déplétion de Mab21l2	114

Abréviations

Abcb6	ATP-Binding Cassette subfamily B Member 6
AC	Amacrine Cell ou cellule amacrine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Alcam	Activated leukocyte CAM (pour Cell Adhesion Molecule)
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messager
Atoh5	Atonal homologue 5
BC	Bipolar Cell ou cellule bipolaire
bHLH	basic Helix Loop Helix, un facteur de transcription porteur de ce motif
BMP	Bone Morphogenetic Protein ou protéine morphogénétique des os
BMPR1b	BMP Receptor 1b, ou récepteur 1b des BMPs
CAM	Cell Adhesion Molecule ou molécule d'adhérence cellulaire
Ccnd1	Cyclin D1
cGAS	cyclic GMP-AMP Synthase
CMZ	Ciliary Marginal Zone ou zone marginale ciliaire
COFG	syndrome Cérébello-Oculo-Facio-Génital
CRMP4	Collapsin Response Mediator Protein 4 ou protéine médiatrice de réponse à la collapsine 4
Cxcr4	CXC chemokine Receptor type 4 ou récepteur membranaire de la chemokine CXCL12
dpf	day(s) post-fertilization, ou jours post-fécondation
dsRNA	double stranded RNA
EBP	Early Born Progenitors ou progéniteurs précoces
EFTF	Eye Field Transcription Factor ou facteur de transcription du domaine oculaire
FGF	Fibroblast Growth Factor ou facteur de croissance des fibroblastes
GCL	Ganglion Cell Layer ou couche des cellules ganglionnaires
GFP	Green Fluorescent Protein
HC	Horizontal Cell ou cellule horizontale
HDAC	Histone DeAcetylase ou déacétylase d'histones
hpf	hour post-fertilization ou heures post-fécondation
HSPG	Heparan Sulfate ProteoGlycan ou protéoglycane à sulphate d'héparane
INL	Inner Nuclear Layer ou couche nucléaire interne
INM	Interkinetic Nuclear Migration ou migration nucléaire intercinétique
IPL	Inner Plexiform Layer ou couche plexiforme interne
KD	Knockdown, perte de fonction partielle
KO	Knockout, perte de fonction totale
LBP	Late Born Progenitors ou progéniteurs tardifs
Mab21	Male abnormal 21
Mab21l1/2	Mab21-like 1/2
MAC	Microptalmie-Anophtalmie-Colobome
MHB	Mid-Hindbrain Boundary ou frontière mésencéphale-rhombencéphale aussi appelée isthme
miRNA	micro RNA ou miR

MO	Morpholino Oligonucleotide
NrCAM	Neural CAM (pour Cell Adhesion Molecule)
Nrp1	Neuropilin 1
NTase	NucleotidylTransferase
ONL	Outer Nuclear Layer ou couche nucléaire externe
PCP	voie de la Polarité Cellulaire Planaire (Planar Cell Polarity)
PG	Paralogue Group ou groupe paralogue
PTU	Phenyl-2-ThioUrea
r	rhombomère
RA	Retinoic Acid ou acide rétinoïque
RALDH	Retinaldehyde dehydrogenase ou déhydrogénase de retinaldéhyde
RAR	Retinoic Acid Receptor ou récepteur de l'acide rétinoïque
RARB	Retinoic Acid Receptor beta ou récepteur de l'acide rétinoïque beta
RARE	Retinoic Acid Responsive Element ou élément de réponse à l'acide rétinoïque (motif sur l'ADN)
Rb	Rétinoblastome
RGC	Retinal Ganglion Cell ou cellule ganglionnaire de la rétine
RPC	Retinal Progenitor Cell ou cellule progénitrice de la rétine
RPE	Retinal Pigmented Epithelium ou épithélium pigmentaire rétinien
RT	Room Temperature ou température ambiante
RXR	Retinoid X Receptor ou récepteur X aux rétinoïdes
s	somite
Sema	Semaphorin
Sdf-1	Stromal cell-derived factor 1 ou facteur dérivé des cellules stromales
SFRP	Secreted Frizzled-Related Protein ou protéine sécrétée associée au Frizzled
sgRNA	single guide RNA ou ARN guide
Shh/Hh	Sonic hedgehog/Hedgehog
Sma	Small (gène du nematode similaire à Mad chez la drosophile et SMAD chez les vertébrés)
SMAD	Small Mothers Against Decapentaplegic ou effecteur de la voie des TGFβ/BMP
ssRNA	single stranded RNA ou ARN simple brin
Stra6	Stimulated by retinoic acid 6, gène stimulé par l'acide rétinoïque
Tale	Three amino-acid loop extension, motif Tale des homéoprotéines
Tg	Transgenic ou lignée transgénique
TGFβ	Transforming Growth Factor beta ou facteur de croissance transformant β
Val	Valentino, mutant de poisson-zèbre
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor ou facteur de croissance endothérial vasculaire
vHnf1	variant Hepatocyte nuclear factor-1 ou variant du facteur nucléaire des hepatocytes
WT	Wildtype ou sauvage (contrôle)
Yap1	Yes-associated protein 1

Chapitre 1 :

Introduction

I. Développement du système visuel

La rétine est une structure circonstrite et laminée du système nerveux central, facilement accessible pour l'expérimentation, et représente de ce fait un organe de choix pour adresser des problématiques clées du développement neural telles que la neurogénèse, l'établissement du destin cellulaire des neurones (i.e., différenciation et spécification neuronales), ainsi que plus tardivement la migration neuronale, la croissance axonale et la synaptogénèse. De plus, la structure laminée de la rétine et les mécanismes régissant son développement étant très fidèlement conservés chez les vertébrés, l'utilisation de différents modèles animaux a progressivement permis d'améliorer notre compréhension de l'établissement du système visuel chez l'homme (Renninger et al., 2011; Gestri et al., 2012).

La rétine est composée de sept types cellulaires dont six types neuronaux et un type de cellules gliales, qui sont organisés en trois couches nucléaires, séparées par deux couches plexiformes (Livesey and Cepko, 2001) (Figure 1 A-B). Les cellules ganglionnaires de la rétine (RGCs pour *Retinal Ganglion Cells*), qui ont pour rôle d'acheminer l'information visuelle vers le cerveau, occupent la couche la plus interne appelée couche des cellules ganglionnaires (ou GCL pour *Ganglion Cell Layer*) et sont de par leur rôle les seuls neurones dont les axones projettent en dehors de la rétine à travers la tige ou pédoncule optique (i.e., *optic stalk*) jusqu'à leurs cibles spécifiques du mésencéphale dorsal. Cette cible correspond au toit optique ou tectum chez le poisson-zèbre, le xénope et le poulet et au colliculus supérieur chez les mammifères (Figure 1C-D).

Les cellules amacrines (ACs pour *Amacrine Cells*), bipolaires (BCs pour *Bipolar Cells*), horizontales (HCs pour *Horizontal Cells*) et les cellules de Müller (le seul type de cellules gliales) forment la couche nucléaire interne (ou INL pour *Inner Nuclear Layer*), avec pour certaines cellules amacrines une localisation dans la GCL. Les neurones bipolaires transfèrent l'information visuelle des photorécepteurs aux cellules ganglionnaires alors que les cellules amacrines, reliant les neurones bipolaires et ganglionnaires, ainsi que les cellules horizontales, connectées latéralement aux photorécepteurs et aux cellules bipolaires, permettent entre autres d'affiner l'acuité, le contraste et la définition du stimulus visuel en modifiant l'information relayée des photorécepteurs aux cellules ganglionnaires via les neurones bipolaires. Entre l'INL et la GCL se trouve la couche plexiforme interne (IPL pour *Inner Plexiform Layer*) où se situent les axones et dendrites des RGCs, ACs et BCs. Les deux derniers types cellulaires de la rétine sont les photorécepteurs incluant les cônes et bâtonnets (ou *rods* en anglais) qui se situent dans la couche la plus externe, nommée couche nucléaire externe (ou

ONL pour *Outer Nuclear Layer*). Ces cellules, chargées de transformer les photons en signaux chimiques, sont les premières à recevoir l'information visuelle qui voyagera vers les RGCs en passant par les BCs. Entre l'ONL et l'INL se trouve la couche plexiforme externe (OPL pour *Outer Plexiform Layer*), composée des terminaisons nerveuses des HCs, BCs et photorécepteurs. En outre, les cellules amacrines sont localisées plus proches de la GCL et contactent les RGCs alors que les cellules horizontales sont plus proches de l'ONL et contactent les photorécepteurs. Les cellules de Müller ont elles pour rôle de maintenir l'homéostasie de la rétine. Enfin, tout autour de la rétine se trouve une couche supplémentaire, celle de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE pour *Retinal Pigment Epithelium*) qui semble avoir diverses fonctions comme l'absorption de la lumière, la modulation immunitaire, le transport épithelial, etc.

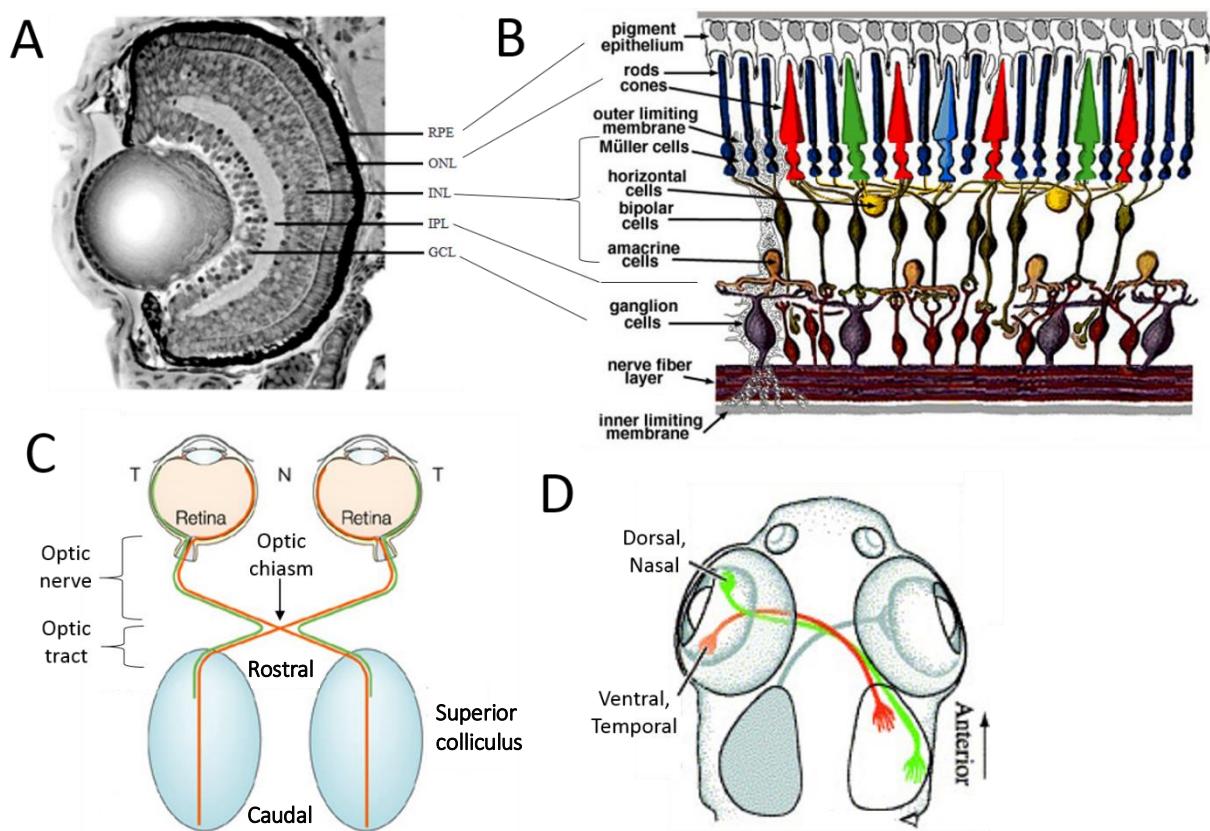


Figure 1 : Couches cellulaires de la rétine chez les mammifères et le poisson-zèbre

(A) Coupe transversale d'œil de poisson-zèbre à 76 heures post-fécondation (hpf). (B) Représentation schématique des couches cellulaires. *RPE*, Retinal Pigment Epithelium; *ONL*, Outer Nuclear Layer; *INL*, Inner Nuclear Layer; *IPL*, Inner Plexiform Layer; *GCL*, Ganglion Cell Layer. Adapté de Neumann, 2001 et Kolb, 1995. Représentations schématiques des projections rétino-tectales d'un mammifère (C) et d'un poisson-zèbre (D). Chez le mammifère, les axones en temporal (T) projettent ipsilatéralement et les axones en nasal (N) projettent controlatéralement tandis que chez le poisson-zèbre, il n'y a pas de projection ipsilatérale. Adapté de Guan et al, 2003 et Curlverwell et al, 2002 respectivement.

J'ai effectué ma thèse sur un modèle vertébré, le poisson-zèbre (ou *Danio rerio* en latin), pour les différents avantages qu'il présente dans l'étude du système visuel et que je détaillerai brièvement ci-dessous. Ainsi, la fécondation et le développement embryonnaire de ce petit poisson d'eau douce se font de manière externe et l'embryogenèse est particulièrement rapide puisqu'à cinq jours (dits 5dpf pour *day post-fertilization*), le développement est achevé et tous les organes sont formés et fonctionnels, rendant les larves de ce téléosté capable de survivre de manière autonome. Chaque couple de poisson-zèbre peut donner régulièrement et en quantité importante de 100 à 200 œufs fécondés, ce qui facilite grandement les études quantitatives. Mais l'un des principaux avantages de l'embryon et de la larve de poisson-zèbre demeure leur transparence optique, permettant l'analyse *in vivo* et en temps réel du développement de n'importe quelle structure par des techniques de vidéomicroscopie, et ce grâce à de vastes collections de lignées transgéniques fluorescentes. En outre, le système visuel du poisson-zèbre est fonctionnel dès 5 jours et à 3 jours (3dpf) tous les types cellulaires de la rétine sont déjà présents. De plus, le fait qu'il n'y ait pas de projection ipsilatérale chez le poisson-zèbre et que tous les axones des RGCs composant le nerf optique croisent la ligne médiane au niveau du chiasma rend plus aisée l'identification de projections aberrantes chez les mutants. Le poisson-zèbre est donc un excellent modèle pour étudier le développement de la rétine ce qui en a fait, depuis les vingt dernières années, un modèle très utilisé pour la caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine du développement de l'œil. Dans la suite de cette introduction, je parlerai majoritairement du développement de l'œil des vertébrés non mammifères comme le poisson-zèbre, mais également le xénope et le medaka, tout en faisant un parallèle avec ce qui est observé chez les mammifères.

1. Morphogenèse de l'œil

a) Etablissement du champ oculaire

Bien que le premier signe apparent du développement de l'œil soit l'évagination de la vésicule optique (entre 12 heures post-fécondation -hpfs- et 14hpfs chez le poisson-zèbre), la formation de l'œil commence dès le début de la gastrulation (à environ 6hpfs chez le poisson-zèbre) par la spécification d'un domaine de la région antérieure de la plaque neurale, nommé champ oculaire (Woo and Fraser, 1995; Chuang and Raymond, 2002). Pour apparaître, le champ oculaire nécessite l'inhibition de la signalisation des morphogènes de type Wnt. En effet, si cette voie de signalisation reste active, le champ oculaire ne peut acquérir son identité cellulaire et adopte à la place une identité de diencéphale (Houart et al., 2002; Wilson and

Houart, 2004). Ceci peut être expliqué par le fait que le maintien de la voie Wnt active l'inhibition de facteurs de transcription du champ oculaire (appelés EFTFs pour *Eye Field Transcription Factors*) (Houart et al., 2002; Lagutin et al., 2003). L'inhibition de la voie Wnt est réalisée via l'expression de protéines inhibitrices issues de la plaque neurale antérieure comme par exemple les *Secreted Frizzled-Related Proteins* (ou SFRPs) (Niehrs et al., 2001; Tendeng and Houart, 2006). De plus, une autre voie clé du développement précoce, celle des morphogènes de type *Bone Morphogenetic Proteins* (ou BMP) doit être également inhibée pour la formation du champ oculaire (Grinblat et al., 1998; Barth et al., 1999).

Ce champ oculaire peut être défini par le domaine d'expression de plusieurs EFTFs, dont les principaux sont *pax6*, *rx3* et *six3* (Zuber et al., 2003). Ces facteurs de transcription forment un réseau de régulation interne, chacun pouvant activer ou inhiber l'autre. L'apparition de ces EFTFs nécessite en premier lieu l'expression d'un autre facteur de transcription, le transcript *otx2*, qui apparaît en premier lieu et sans lequel il n'y aurait pas d'induction de l'expression des EFTFs (Rhinn et al., 1998; Chow and Lang, 2001). *Otx2* est exprimé dans l'ectoderme avant la gastrulation, puis inhibé dans le champ oculaire et à nouveau exprimé dans la vésicule optique (Simeone et al., 1993). Son inhibition dans le champ oculaire est due aux EFTFs *rx3* et *six3* (Loosli et al., 1998) ce qui montre d'une part l'existence de boucle de rétro-régulation (ou *feedback loop*) entre ces différents facteurs de transcription et d'autre part le rôle clé d'*otx2* dans la mise en place précoce du territoire de l'œil et non pas dans la spécification des types cellulaires qui survient plus tardivement au cours de l'embryogenèse au moment où l'expression de ce dernier est inhibée.

Les gènes *rx3*, *six3* et *pax6* sont tous trois des gènes hométiques très conservés chez les vertébrés, dont le rôle crucial dans le développement de l'œil est confirmé par l'apparition d'anophtalmie ou microptalmie chez l'homme, le rongeur ou d'autres organismes vertébrés lors de perturbation de leur fonction :

- *Rx3* est en premier lieu exprimé dans la plaque neurale antérieure puis apparaît dans la vésicule optique ainsi que dans la rétine neurale. Aux stades plus tardifs, il n'est plus exprimé que dans l'INL et les photorécepteurs (Mathers et al., 1997). De manière similaire, ses deux paralogues, *rx1* et *rx2*, (Andreazzoli et al., 1999; Chuang and Raymond, 2001) apparaissent exclusivement dans le champ optique puis dans les photorécepteurs de type cones. De plus, tout concourt à penser que l'expression de l'homéodomaine rx est suffisante pour induire des tissus rétiniens de manière ectopique, aux dépens des tissus nerveux (cerveau antérieur) environnants. À l'inverse, des délétions dans l'équivalent murin *rax* engendrent des souris

anophtalmiques (sans yeux) et des anomalies du cerveau antérieur et de l'hypothalamus (Mathers et al., 1997; Tucker et al., 2001), comme c'est le cas pour les mutants de poisson-zèbre (Loosli et al., 2001, 2003). La perte de marqueurs spécifiques de la rétine en absence de protéines *Rx* laisse également penser qu'elles ont un rôle dans la spécification des cellules progénitrices de la rétine (ou RPCs pour *Retinal Precursor Cell*) (Zhang et al., 2000; Stigloher et al., 2006). En outre, *rx3* serait également impliqué dans la prolifération cellulaire à travers la régulation d'autres EFTFs (Zuber et al., 2003; Del Bene and Wittbrodt, 2005).

- *Six3* est exprimé dans le champ oculaire puis son expression persiste dans la vésicule optique. Aux stades plus tardifs, il est exprimé dans le pédoncule (ou tige) optique ainsi que dans la rétine neurale (Loosli et al., 1999; Zuber et al., 1999). La surexpression de *six3* chez la souris et le poisson entraîne une rétine et un cristallin ectopique, ce qui semble dû à l'induction des gènes *rx* (Loosli et al., 1999). Cette surexpression entraîne également une expression accrue d'un autre facteur de transcription, Pax2, dans le pédoncule optique et au-delà (Kobayashi et al., 1998). Chez l'Homme, des mutations dans *SIX3* entraînent des défauts du développement cérébral de type holoprosencéphalie (malformation congénitale du cerveau consistant en l'absence de séparation du télencéphale en deux hémisphères et deux ventricules) ainsi qu'une microptalmie (Wallis et al., 1999), attestant du rôle clé et conservé de *six3* dans le développement de l'œil et la plaque neurale antérieure. Il a été suggéré que cette action de Six3 se produise via sa fonction inhibitrice de la voie Wnt (Lagutin et al., 2003; Wilson and Houart, 2004).
- *Pax6* a longtemps été considéré comme l'un des maîtres gènes du développement oculaire. Il apparaît en fin de gastrulation dans la plaque neurale antérieure et son expression persiste dans la partie dorsale de la vésicule optique ainsi que dans l'ectoderme qui donnera naissance au cristallin. Par la suite il est exprimé dans toute la cupule optique (ou *optic cup*), puis son expression se restreint aux seuls RGCs et ACs (Grindley et al., 1995; Beleky-Adams et al., 1997). Sa surexpression chez la drosophile ou le xénophage entraîne des structures ectopiques ressemblant à des cupules optiques tandis que les mutants déplétés en *pax6* présentent une microptalmie accompagnée d'une réduction de la taille du cristallin (Grindley et al., 1995; Halder et al., 1995). Des défauts similaires sont observés chez l'Homme lorsque *PAX6* est muté (Jordan et al., 1992; Hanson et al., 1993), ce qui confirme son rôle déterminant et conservé au cours de l'évolution dans la formation de l'œil.

b) Séparation du champ oculaire

Une fois le champ oculaire défini par l'expression des EFTFs, survient la séparation de ce domaine en deux ébauches (*primordia*) de rétine. L'échec de cette séparation entraîne la formation d'un seul œil central, et donc d'un individu cyclope. Cette séparation du champ oculaire se fait sous l'action de facteurs sécrétés par la plaque préchordale (i.e., définie comme un épaississement de cellules localisé en rostral par rapport à la notochorde et dont le rôle organisateur est déterminant pour toute la région cervicale, à l'origine entre autres de la musculature extrinsèque de l'œil), comme : les morphogènes de type TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*) et sonic hedgehog (Shh) ou hedgehog (Hh). Chez le poisson-zèbre, les mutants *cyclops/cyc* présentent une mutation d'un gène codant un ligand de la voie Nodal/Notch, une des sous familles de la voie TGF- β avec les BMPs, qui engendre une cyclopie (Rebagliati et al., 1998; Sampath et al., 1998). En l'absence de ce ligand, les cellules postérieures au champs oculaire (qui donneront l'hypothalamus) n'effectuent pas leur migration antérieure le long de la ligne médiane (*midline*) et par voie de conséquence ne séparent pas le champ oculaire (Figure 2) (Varga et al., 1999; England et al., 2006). En parallèle, il a été montré qu'une absence de *shh* entraîne également une cyclopie chez la souris et le poisson (Chiang et al., 1996; Macdonald et al., 1995), de la même façon que chez l'Homme (Belloni et al., 1996; Roessler et al., 1996). En outre, il a été montré que Nodal est nécessaire pour l'expression de *shh* dans cette région et que les défauts du mutant *cyclops* seraient consécutifs à l'absence d'induction de *shh* par le morphogène Nodal (Muller et al., 2000; Rohr et al., 2001).

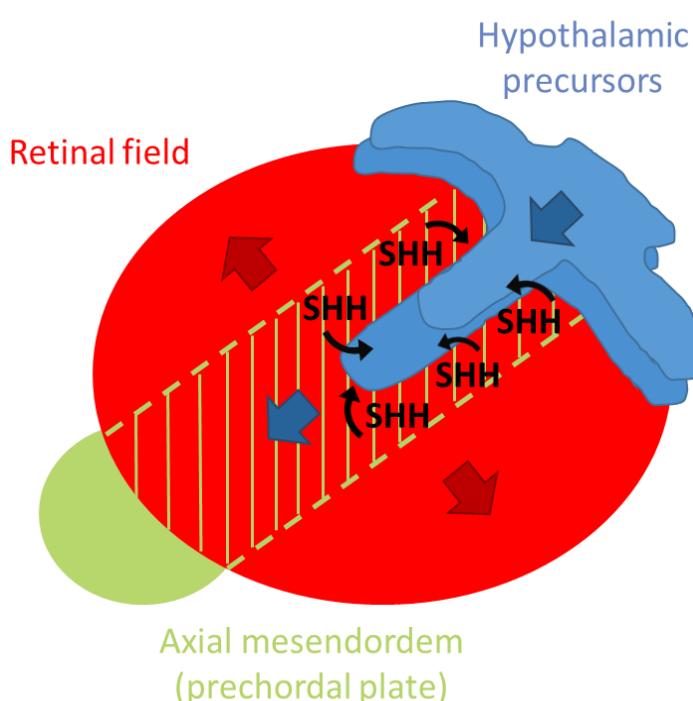
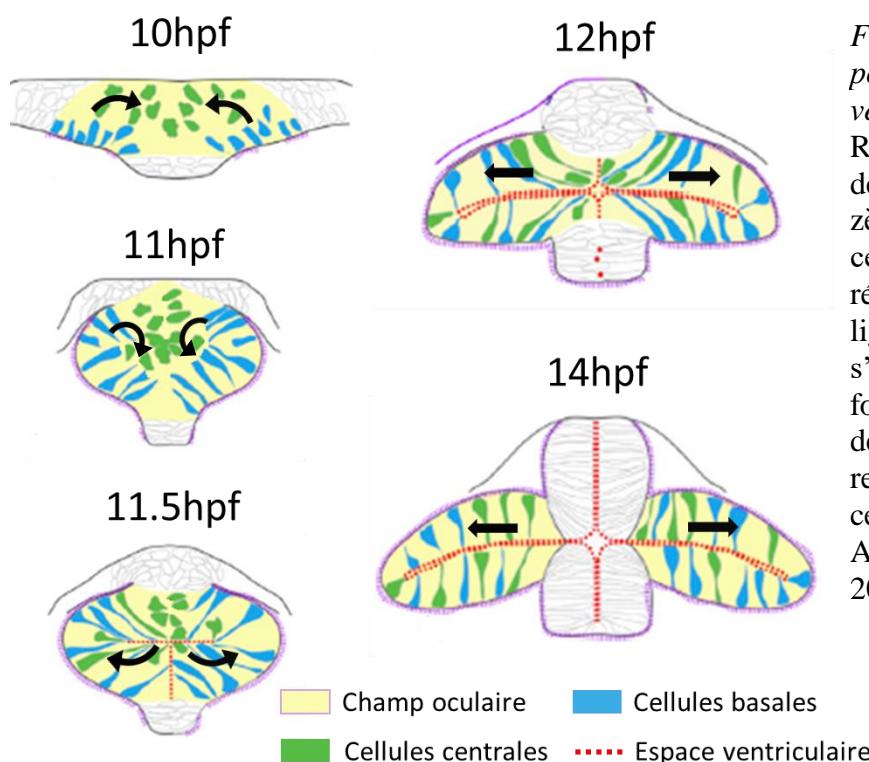


Figure 2 : Modèle proposé pour la séparation du champ oculaire
Les précurseurs hypothalamiques (bleu) migrent antérieurement (flèche bleue) et ventralement à travers le champ oculaire (rouge) sous l'action de sonic hedgehog (SHH) sécrété par le mésendoderme axial (vert hachuré). En conséquence, les précurseurs de la rétine (rouge) migrent latéralement (flèche rouge) et forment une paire d'yeux bilatérale. Antérieur en bas à gauche, postérieure en haut à droite, dorsal en haut. Inspiré de Varga et al, 1999.

a) Vésicule et cupule optiques

À la suite de la séparation du champ oculaire, chaque ébauche de rétine s'arrondit pour former une vésicule optique, et migre latéralement dans un mouvement d'évagination (Figure 3). La formation d'une vésicule optique se fait donc par la migration des cellules progénitrices de la rétine vers la ligne médiane, constituant ainsi une « boule » qui migre par la suite latéralement à l'emplacement des futurs yeux de l'embryon, de part et d'autre de la tête (Rembold et al., 2006; Ivanovitch et al., 2013). Cette migration latérale est rendue possible par l'expression de *rx3* dans la vésicule optique qui inhibe des facteurs attractifs sécrétés par la ligne médiane. Dans la mesure où les RPCs migrent plus lentement vers la ligne médiane que les cellules environnantes, ceux-ci gardent une position latérale lors de la fermeture du tube neural, et n'adoptent donc pas une identité épithéliale, ce qui facilite leur migration latérale par la suite (Brown et al., 2010).

Ces processus morphogénétiques et migratoires sont donc à l'origine de deux vésicules optiques, chacune composée de deux couches cellulaires et reliée au cerveau antérieur par le pédoncule optique, futur point de sortie des axones des RGCs dans leur migration vers le mésencéphale. Contrairement à ce que l'on pensait à une époque révolue, la formation des vésicules optiques n'est pas due à l'augmentation de la prolifération cellulaire puisqu'elle se produit même quand la prolifération est bloquée (Harris and Hartenstein, 1991).



Après cette étape d'évagination et formation des vésicules optiques, l'apparition d'une cyclopie est toujours possible en dépit de la séparation actée du champ oculaire. En effet, c'est à ce stade que Shh et Six3 régulent l'expression des gènes *pax2* et *pax6* responsables respectivement de la différenciation du pédoncule optique et de celle de la rétine neurale. Ainsi, l'expression de *six3* dans la vésicule optique est importante pour maintenir l'expression de *shh* dans la plaque préchordale qui, à son tour, maintient l'expression de *six3* dans le diencéphale, formant ainsi une boucle positive de rétro-régulation. La perte de *six3* entraîne la perte de *shh*, et de ce fait une cyclopie (Geng et al., 2008; Jeong et al., 2008). Cette cyclopie peut s'expliquer par le fait que Shh induit l'expression de *pax2* et inhibe celle de *pax6* (Figure 4) (Macdonald et al., 1995). En l'absence de Shh et donc de Pax2, on observe une augmentation de l'expression de *pax6* ce qui engendre la disparition du pédoncule optique et la fusion des deux vésicules optiques, à l'origine de la formation d'un œil unique (Figure 4B).

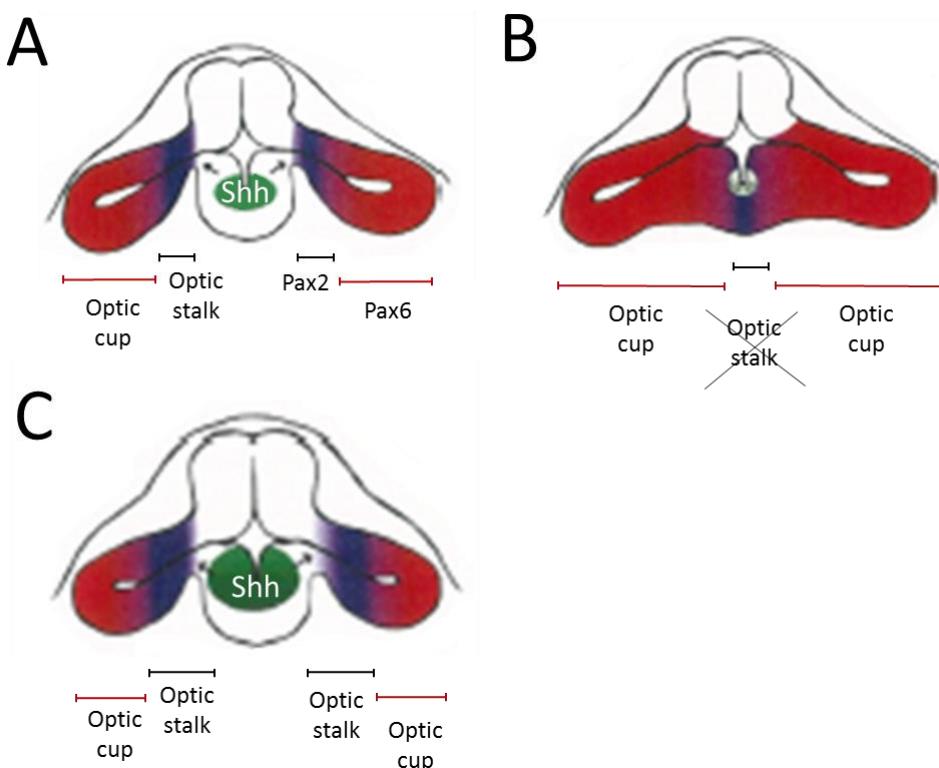


Figure 4 : Le rôle de Shh dans la formation des vésicules optiques suite à l'évagination
 Représentations schématiques de vues frontales du système nerveux central du poisson-zèbre. (A) Embryon contrôle où Pax6 (en rouge) est exprimé dans la rétine neurale et Pax2 (en bleu) dans le pédoncule optique. Shh est sécrété par la ligne médiane ventrale (en vert). (B) Lors d'une diminution de Shh, Pax6 est observé dans le cerveau antérieur et dans les vésicules optiques jusqu'à la ligne médiane. Pax2 est, lui, pratiquement absent et toutes les cellules se différencient en cellule de la rétine neurale, résultant en une cyclopie. (C) Une augmentation de l'expression de *shh* entraîne une augmentation de *pax2* couplée à une diminution de *pax6* ; le pédoncule optique occupe une surface plus grande alors que la rétine est réduite. Dorsal en haut. Inspiré de Macdonald et al, 1995.

Après l'évagination, ont lieu les processus d'invagination et de formation de la cupule optique, dernier étape avant la rétine différenciée, autour de 18hpf chez le poisson-zèbre. La cupule optique se forme par le repliement ou creusement de la vésicule optique le long des axes dorso-ventral et antéro-postérieur de l'embryon sous l'effet d'une constriction basale des RPCs (Martinez-Morales et al., 2009) (Figure 5A). Cette invagination forme une fente qui part de la région ventrale de la rétine et qui suit le pédoncule optique jusqu'au tube neural constituant ce que l'on appelle la fissure choroïdienne ou fissure optique par laquelle sortiront de la rétine les axones des RGCs ainsi que les vaisseaux sanguins (Figure 5B). Cette fissure optique, formée à 24hpf, se fermera entre 30 et 48hpf chez le poisson-zèbre, et un défaut de fermeture entraînera une anomalie caractéristique du développement de l'œil, le colobome, que je détaillerai plus bas. En s'invaginant, la rétine présente une couche épithéliale externe qui donnera l'épithélium rétinien pigmentaire (ou RPE) et une couche neuroépithéliale interne à l'origine de la rétine neurale différenciée.

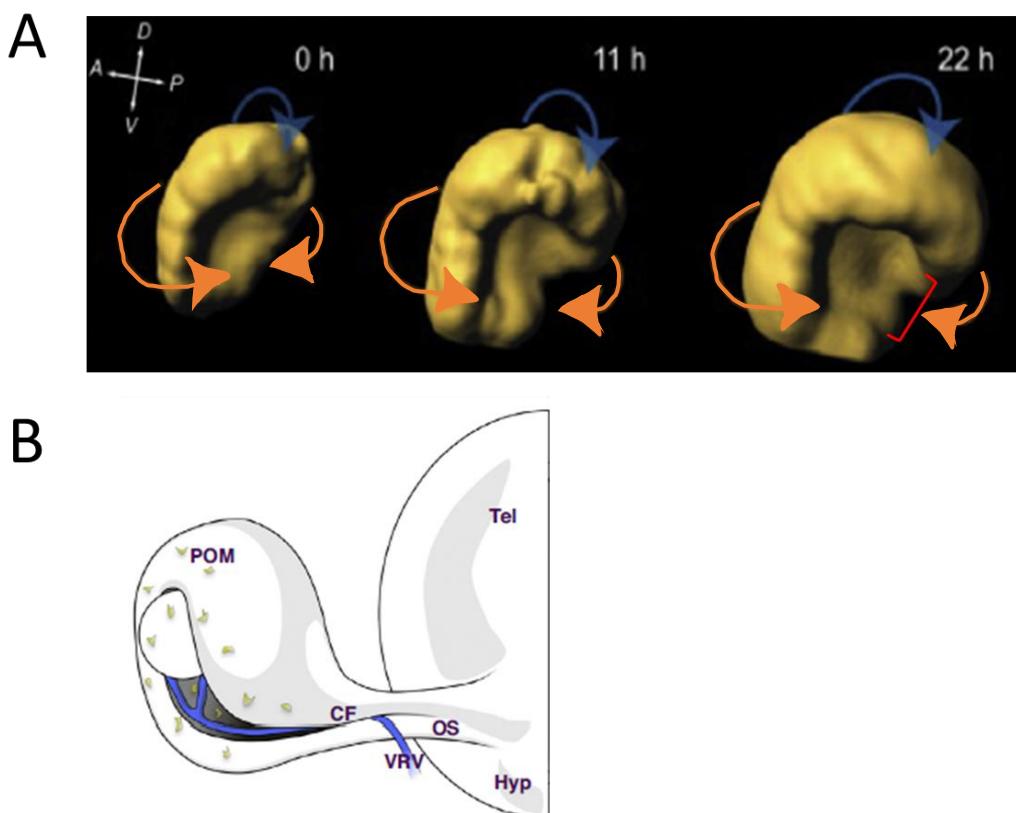


Figure 5 : Invagination de la cupule optique et création de la fissure choroïdienne

(A) Reproduction en 3D de la morphogénèse de la cupule optique chez l'embryon de medaka. Les flèches brunes et bleues indiquent respectivement les mouvements antéro-postérieurs et dorso-ventraux. L'accordéon rouge désigne l'emplacement de la fissure optique. Adapté de Martinez-Morales et al, 2009. (B) Schéma de la fissure optique en position ventrale avant sa fermeture. *POM*, mésenchyme périoculaire ; *CF*, fissure choroïdienne ; *VRV*, vaisseaux ventraux de la rétine ; *OS*, pédoncule optique (ou *optic stalk*) ; *Hyp*, hypothalamus ; *Tel*, télencéphale. Dorsal en haut. Bazin-Lopez et al, 2015.

2. Différenciation de la rétine

a) Prolifération

La génération des différents types cellulaires de la rétine suit un ordre stéréotypé chez tous les vertébrés (Cepko et al., 1996; Livesey and Cepko, 2001). À la suite de la formation de la cupule optique survient une période de prolifération cellulaire afin d'augmenter substantiellement le nombre de RPCs. Puis a lieu une première vague de différenciation en forme d'éventail dans la région ventro-nasale de la rétine du poisson-zèbre, et ce jusqu'à la région temporale, qui donnera naissance aux futures RGCs. Pour passer de la phase proliférative à la phase de différenciation, les RPCs doivent sortir du cycle cellulaire entre les phases G₁ et S. Au cours de cette sortie, les cellules passent de la phase G₁ à une phase irréversible G₀ (Buttitta and Edgar, 2007). La transition de la phase G₁ vers G₀ ou S est contrôlée par l'état de phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb) (Dyer and Cepko, 2001). À l'état non phosphorylée, la protéine Rb est associée au facteur de transcription E2F qu'elle inhibe, les RPCs passent alors en phase G₀. La phosphorylation de Rb par la CyclinD1 (ccnd1) permet la dissociation de E2F qui, libre, peut aller réguler positivement l'expression de gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire, ce qui induit le passage des RPCs en phase S (voir résumé des régulations sur la Figure 6) (Fantl et al., 1995; van den Heuvel and Dyson, 2008). Ccnd1 est donc une protéine clé du maintien de la prolifération. À l'inverse, les protéines p27^{kip1} et p57^{kip2}, deux inhibiteurs de cyclines kinases, sont essentielles au passage en phase G₀ via l'inhibition de *ccnd1* (Dyer and Cepko, 2000; Cunningham et al., 2002). Réciproquement, Ccnd1 peut également inhiber p27^{kip1} et p57^{kip2}, assurant ainsi un équilibre entre ces régulateurs du cycle cellulaire (Dyer and Cepko, 2001; Geng et al., 2001).

Certains facteurs de transcriptions sont également nécessaires pour assurer le maintien de la prolifération ou la sortie du cycle cellulaire. Parmi eux, Pax6 est crucial au maintien de la prolifération : en son absence, on observe en effet une forte réduction du nombre de cellules en phases S et une augmentation du nombre de cellules sortant du cycle cellulaire (Philips et al., 2005; Farhy et al., 2013). Cependant, le rôle de Pax6 dans la régulation du cycle cellulaire est plus complexe qu'il n'y paraît puisqu'il inhibe à la fois les cyclines kinases et leurs inhibiteurs... Il a été suggéré que Pax6 pourrait adopter un rôle activateur ou inhibiteur de la prolifération en fonction de la présence d'autres facteurs de transcription. Deux de ces facteurs de transcription à homéodomaine de la famille des TALE, Meis1 et Meis2, sont impliqués dans la régulation de la prolifération chez plusieurs espèces (Bessa et al., 2002; Hisa et al., 2004) et peuvent contrôler l'expression de *ccnd1* (Barton and Levine, 2008; Heine et al., 2008) et de *pax6* (Hill et al., 1991;

Bessa et al., 2008). A l'inverse de Pax6 et de Meis1/2 qui favorisent la prolifération, le facteur de transcription Prox1 est, quant à lui, impliqué dans la sortie du cycle cellulaire par l'inhibition de *ccnd1* (Dyer et al., 2003) via l'induction de l'expression de p27^{kip1} et p57^{kip2} (Wigle et al., 1999; Mishra et al., 2008). Un autre facteur de transcription clé dans le processus de prolifération est Vsx2 (aussi appelé Chx10) (Burmeister et al., 1996; Wong et al., 2015). Vsx2 inhibe l'expression de p27^{kip1}, via l'activation de *ccnd1* (Green et al., 2003), tout en empêchant la différenciation des RPCs en RGCs par l'inhibition d'*atoh5* (Vitorino et al., 2009; Cid et al., 2010). Lorsque *vsx2* cesse d'être exprimé apparaît *dmbx1*. Ce dernier est exprimé dans les RPCs sortant du cycle cellulaire et est donc nécessaire au maintien en phase G₀ (Wong et al., 2010). Dmbx1 agit ainsi dans une boucle de régulation de l'équilibre entre prolifération et différenciation avec Vsx2, avec un passage de l'expression majoritaire de *vsx2* à celle de *dmbx1* marquant le début de l'acquisition de l'identité cellulaire (Wong et al., 2015). Les rôles dans ce processus de ces facteurs de transcription sont résumés dans la Figure 6. D'autres facteurs clés de ce processus, qui ne sont pas représentés sur cette figure sont les gènes *Rax/Rx*. En effet, ces gènes sont exprimés dans les cellules prolifératives et leur expression varie avec la prolifération cellulaire : la surexpression de ces facteurs entraîne une hyper prolifération de la rétine (Furukawa et al., 1997; Mathers et al., 1997).

Lors de la prolifération, les cellules se divisent horizontalement le long de l'axe apico-basal, ce qui donne pour chaque cellule mère deux cellules filles identiques : il s'agit de la division symétrique. Lors de la différenciation, l'axe de division change et devient perpendiculaire à l'axe apico-basal (on parle alors de division verticale), ce qui entraîne la formation de deux cellules filles différentes : la division est alors dite asymétrique. En effet, certaines molécules de surface ou des facteurs intracellulaires peuvent se trouver majoritairement du côté apical, ce qui conduira à une répartition inégale de ces molécules dans les cellules filles (Chenn and McConnell, 1995; Cayouette and Raff, 2003). Lors du cycle cellulaire, les noyaux des cellules changent de localisation selon leur phase, c'est ce que l'on appelle la migration nucléaire intercinétique (ou INM pour *Interkinetic Nuclear Migration*) (Sauer, 1935). Les noyaux des cellules en phase G₁/S sont localisés du côté basal tandis que les noyaux des cellules en division (phase M) se trouvent du côté apical. Ces mouvements nucléaires sont corrélés aux types de divisions cellulaires (symétrique ou asymétrique) puisqu'il a été montré que lors de la division asymétrique, le noyau localisé en basal tend à appartenir à une cellule post-mitotique, qui sortirait du cycle cellulaire pour amorcer sa différenciation (Baye and Link, 2007), tandis que la cellule au noyau du côté apical resterait en prolifération, ce qui pourrait notamment s'expliquer par la présence d'un gradient notch1 apico-basal (Del

Bene et al., 2008) et impliquerait de ce fait ce morphogène dans le maintien de la prolifération à ce stade du développement.

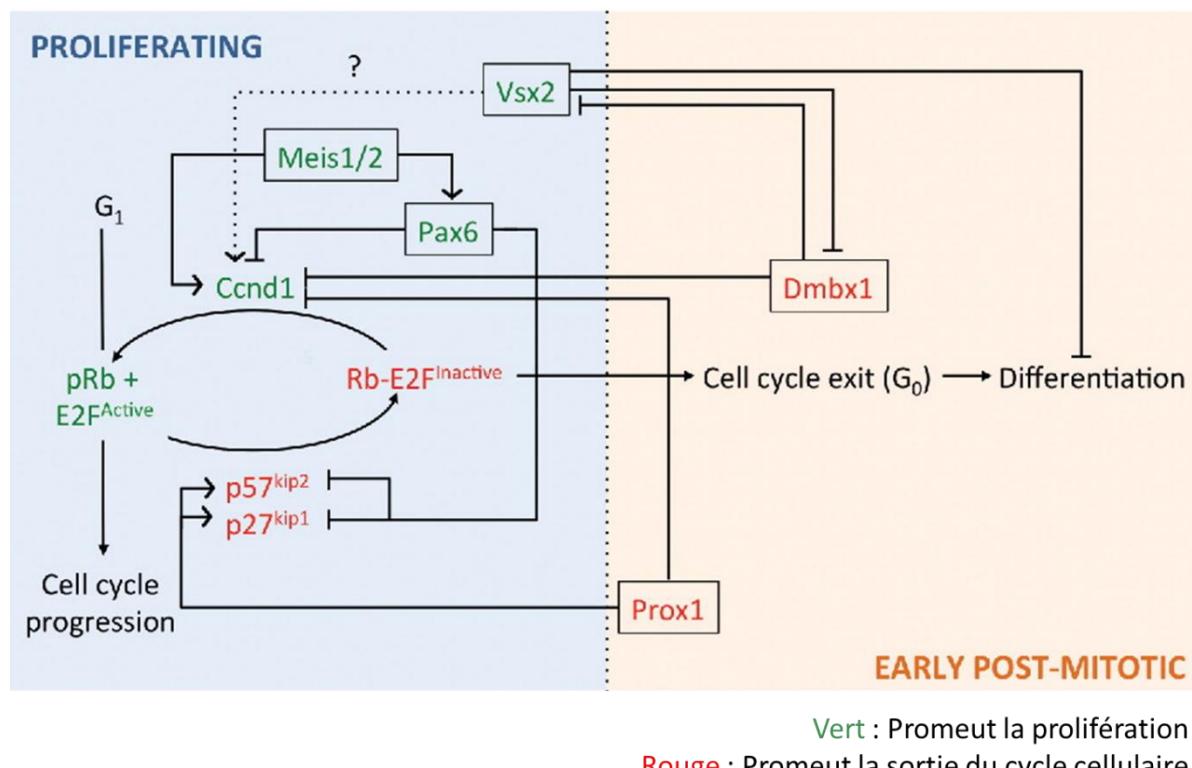


Figure 6 : Schéma du réseau de régulation de la sortie du cycle cellulaire

Les gènes présents dans la zone bleue sont exprimés dans les cellules en prolifération, les gènes présents dans la zone orange sont exprimés dans les RPCs sortant du cycle cellulaire et présentant déjà des signes de différenciation. Les flèches indiquent l'activation, les traits verticaux désignent l'inhibition. Miles et Tropepe 2016.

b) Différenciation en vagues

La première vague de différenciation part de la région centrale de la rétine et se propage jusqu'aux couches extérieures (Hu and Easter, 1999; McCabe et al., 1999). À la suite de cette première vague, d'autres vagues de différenciation donnent naissance aux autres types cellulaires de la rétine, avec les photorécepteurs de type bâtonnets et les cellules de Müller qui ferment la marche de la différenciation (Figure 7). Les premiers neurones RGCs différenciés apparaissent dès 27hpf chez le poisson-zèbre, les cellules amacrines, bipolaires, horizontales ainsi que les premiers photorécepteurs de type bâtonnet sont observés à partir de 36hpf et les premiers cônes se différencient en dernier après 48hpf (Li et al., 2000). À partir de 72hph, la phase de différenciation se termine et commence alors une phase de maturation. Seule une zone de la rétine reste encore indifférenciée et demeurera ainsi même à l'âge adulte du poisson: c'est la zone marginale ciliaire (ou CMZ pour *Ciliary Marginal Zone*). Cette zone située en position

ventrale proche du pédoncule optique est la zone où prolifèrent les RPCs. Elle est active tout au long de la vie du poisson-zèbre et participe à la régénération de la rétine et du remplacement de cellules lors d'atteinte rétinienne (Johns, 1977; Perron and Harris, 2000).

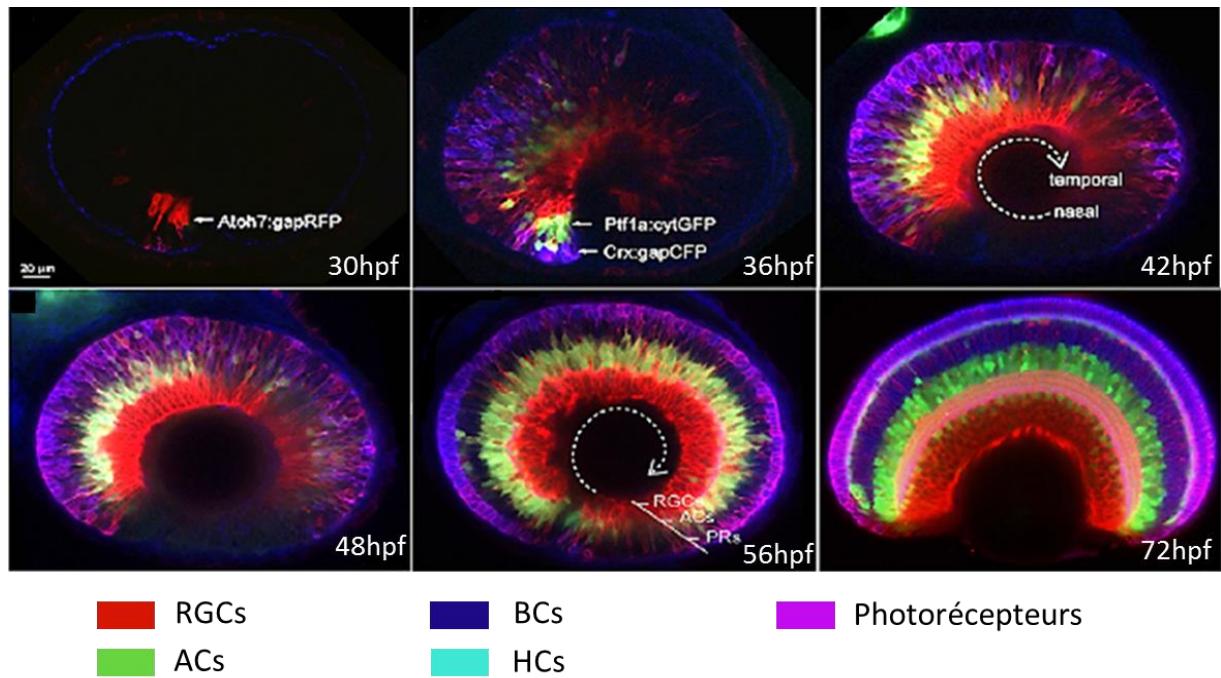


Figure 7 : Différenciation en éventail des cellules de la rétine du poisson-zèbre

Coupes sagittales de rétine à partir de la lignée Spectrum of Fates (ou SoFa) exprimant divers fluorochromes selon le type cellulaire à différent temps du développement. *RGCs*, cellules ganglionnaires de la rétine ; *ACs*, cellules amacrines ; *PRs*, photorécepteurs ; *HGs*, cellules horizontales ; *PRs*, photorécepteurs. Dorsal en haut. Adapté de Almeida et al., 2014.

La première vague de différenciation est caractérisée par l'expression du facteur de transcription de type *basic helix-loop-helix* (ou bHLH) *Atoh5* (pour Atonal homologue 5, aussi nommé *Atoh7*). Ce facteur précède l'apparition des *RGCs* de quelques heures. Il est ainsi admis que c'est l'expression de ce facteur de transcription qui donne la compétence aux RPCs de se différencier en *RGCs* (Yang et al., 2003; Kay et al., 2005). Cette étape de la différenciation est induite par l'expression de *fgf8*, *fgf3* (Martinez-Morales et al., 2005) et *shh* (Neumann and Nuesslein-Volhard, 2000). En leur absence, la vague d'expression d'*atoh5* n'apparaît pas et la rétine reste dans un état indifférencié.

c) Signaux permettant l'hétérogénéité des cellules de la rétine

Les RPCs sont des cellules multipotentes pouvant donner naissance à tous les types cellulaires de la rétine (Turner et al., 1990). Pendant longtemps, on a expliqué l'hétérogénéité des cellules de la rétine par un modèle linéaire où les RPCs perdraient de leur compétence au

fur et à mesure que la différenciation avance pour ne plus donner que certains types particuliers à des temps spécifiques (Figure 8A) (Cepko et al., 1996; Livesey and Cepko, 2001; Cepko, 2014). Jin (2017) propose un nouveau modèle arborisé où les RPCs resteraient multipotents mais donneraient également naissance à des progéniteurs transitoires qui seraient, eux, pluripotents puis bipotents, etc. (Figure 8B). Ce modèle est soutenu par l'observation que des progéniteurs multipotents sont toujours présents même tardivement au cours du processus de différenciation (Turner and Cepko, 1987; Jensen and Raff, 1997). De plus, l'ancien modèle laissait supposer que les cellules naissaient suivant un ordre linéaire, or il a été démontré depuis que différents types cellulaires peuvent apparaître en même temps. D'après les données récentes, il est plus probable qu'il y ait un groupe de progéniteurs se différenciant précocement, les *early born progenitors* (ou EBP) et un groupe se formant plus tardivement, les *late born progenitors* (ou LBP).

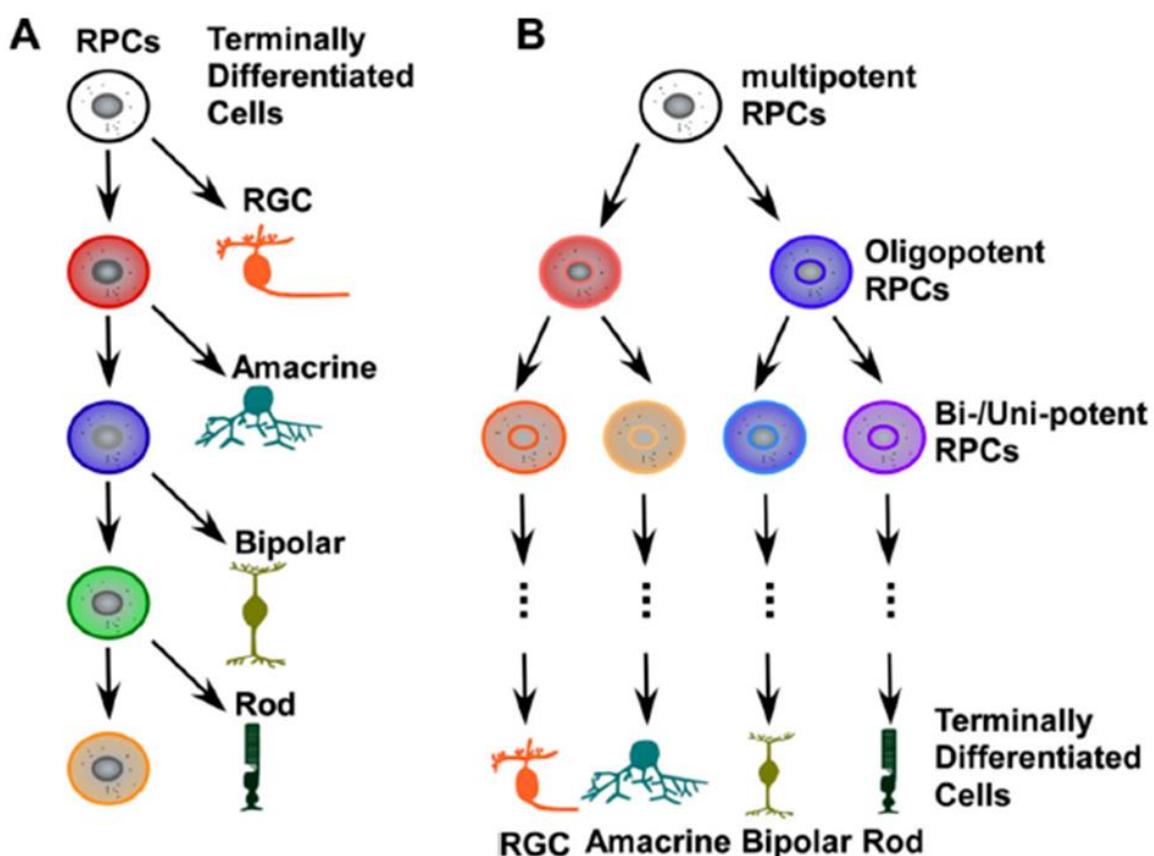


Figure 8 : Modèles de la différenciation des RPCs

(A) Ancien modèle linéaire où les RPCs adoptent une compétence différente selon le temps/stade embryonnaire. (B) Nouveau modèle arborisé où les RPCs multipotents donnent des RPCs transitoires à la compétence réduite. Tout au long de la différenciation, la rétine est composée d'un mélange de ces divers RPCs. Jin K., 2017.

Les EBP donneraient naissance à des RGCs, des cellules amacrines, horizontales et des photorécepteurs de type cône et tous exprimeraient le facteur de transcription Pax6. Une expression en continu de *pax6* entraînerait l'expression d'*atoh5* (Riesenbergs et al., 2009) qui induirait la différenciation des EBPs en RGCs. En absence d'Atoh5, on observe une perte significative des RGCs couplée à une augmentation des ACs et des cônes (Wang et al., 2001). Le fait que la disparition d'un type cellulaire entraîne l'augmentation d'autres types de cellules tend à prouver leur origine commune. En outre, l'expression de *pax6* entraîne l'expression d'*otx2* qui favorise, quant à lui, la différenciation des RPCs en cônes (Oron-Karni et al., 2008). En plus d'exprimer *pax6*, les EBPs expriment également les gènes *onecut1* et *onecut2* en début de différenciation puis c'est au tour des RGCs et des HCs nouvellement formées d'exprimer ces facteurs de transcription paralogues à des stades plus tardifs. En l'absence de *onecut1/2*, il n'y a formation daucun des quatre types cellulaires issus des EBPs (Wu et al., 2012; Sapkota et al., 2014). Ces différentes observations montrent que ces quatre types cellulaires partagent des progéniteurs communs. De plus, il semblerait qu'au sein de cette origine commune, les ACs et HCs appartiennent à une même « branche » et dériveraient d'un même sous-type de progéniteurs. En effet, en absence de *foxn4* (Li et al., 2004) ou *ptf1a* (Fujitani et al., 2006; Nakai et al., 2007), il n'y a ni ACs ni HCs mais les auteurs observent une augmentation du nombre de RGCs et de photorécepteurs. Toutefois, ce sont des facteurs diverses qui induiraient leur devenir cellulaire : en effet, les cellules amacrines se différencieraient spécifiquement sous le contrôle des gènes *neuroD* et *math3* (Morrow et al., 1999a; Tomita et al., 2000; Inoue et al., 2002) tandis que les cellules horizontales dépendraient de l'expression de *lim1* (Poché et al., 2007) (voir résumé graphique des signaux de différenciation sur la Figure 9).

Les LBPs donneraient quant à eux naissance aux photorécepteurs, aux cellules bipolaires et aux cellules gliales de Müller. Aucun facteur commun n'a jusqu'ici été identifié pour tous ces types cellulaires mais une des possibilités évoquées dans la littérature serait qu'ils pourraient exprimer de manière alternative *notch1* (Mizeracka et al., 2013; Dvoriantchikova et al., 2015) et *vsx2* (Burmeister et al., 1996). Ce dernier serait impliqué dans la genèse des cellules bipolaires en inhibant la différenciation des bâtonnets (Livne-bar et al., 2006). De plus, l'absence de *vsx2* entraîne la disparition des BCs tout en conservant le nombre correct de ACs et de HCs, ce qui tendrait à prouver que les BCs ont une origine différente des ACs et HCs (Burmeister et al., 1996). *Notch1* serait quant à lui responsable de la différenciation des cellules gliales au détriment des bâtonnets (Dorsky et al., 1995; Furukawa et al., 1997; Satow et al., 2001). D'autres molécules clés de la différenciation des LBPs ont été également mises en évidence. Ainsi, le répresseur transcriptionnel *blimp1* contrôle la différenciation des

photorécepteurs aux dépens de celle des BCs et des cellules de Müller alors que les ACs, HCs et RGCs se différencient normalement (Brzezinski et al., 2010; Katoh et al., 2010; Wang et al., 2014). Le fait que les types cellulaires issus des EBPs ne soient pas affectés par la disparition des photorécepteurs et/ou des BCs confirme les origines différentes de ces deux groupes de types cellulaires. Une autre preuve de l'origine commune des BCs et des cellules de Müller consiste en la disparition des BCs au profit des cellules de Müller en absence des facteurs de transcription Math3 et Mash1 (Tomita et al., 2000). Enfin, bien que les LBPs et les EBPs aient des origines différentes, les cônes naissant des EBPs et les bâtonnets différenciés à partir des LBPs, deux types de photorécepteurs, doivent partager un progéniteur commun. Ainsi, une mutation *knockout* d'*otx2* entraîne la disparition de tous les photorécepteurs, cônes et bâtonnets sans distinction, toutefois associée à une augmentation combinée des ACs (dérivées des EBPs) ainsi que des BCs et des cellules gliales de Müller (dérivées des LBPs) (Nishida et al., 2003; Sato et al., 2007). *Otx2* agirait donc à la fois sur la différenciation des types cellulaires issus des EBPs et sur celle des LBPs (Figure 9). Il est à noter que tous ces signaux sont des molécules exprimées de manière intrinsèque dans les progéniteurs. Or des signaux extérieurs semblent avoir également leur importance. Par exemple, la voie de signalisation des BMP est déterminante pour la maturation des cellules gliales, dans la mesure où son inhibition entraîne la perte des cellules de Müller (Kurabayashi et al., 2014; Ueki et al., 2015). De même, les éphrines et leur récepteurs Eph interviendraient également dans l'équilibre entre prolifération et différenciation ainsi que dans l'inhibition physiologique de la mort cellulaire (Wilkinson, 2014).

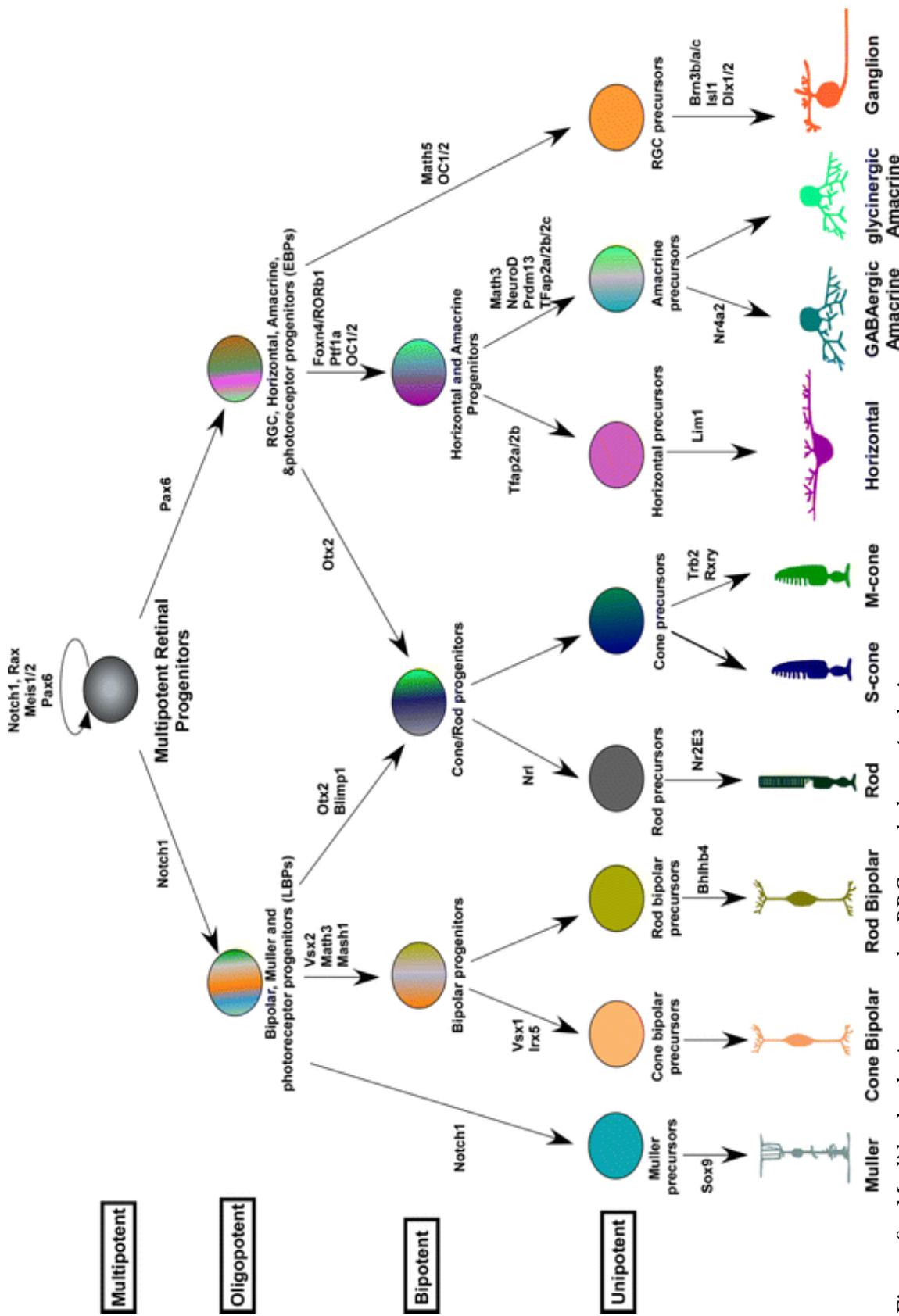


Figure 9 : Modèle de pluripotence des RPCs et de leur régulation
Jin K., 2017

3. Lamination de la rétine

a) Migration cellulaire

Les cellules rétinienennes se différencient parfois loin de leur localisation finale dans la structure laminée de la rétine, elles ont donc besoin de migrer pour atteindre leur emplacement final dans une couche spécifique (Figure 1A,B). Cette organisation en différentes couches de cellules spécifiques constitue la lamination de la rétine. Des défauts de lamination peuvent engendrer des problèmes de connexions axonales et par ce biais des déficits visuels. Les RGCs étant les premières cellules à se différencier, elles sont également les premières à initier leur migration. Ces neurones naissent en effet proche du pôle apical, et par la mise en place d'un processus de liaison avec la surface basale de la rétine, migrent en transloquant leur somata (ou corps cellulaires) vers le pôle basal (Poggi et al., 2005; Zolessi et al., 2006). Une fois arrivées au pôle basal dans la GCL, elles se détachent du pôle apical et migrent tangentially au sein de leur couche (Figure 10). Cette migration s'arrête lorsque les axones des RGCs amorcent leur sortie de la rétine en direction du centre cérébral de la vision. La migration neuronale des RGCs est extrêmement importante car si ces derniers sont mal positionnés dans la rétine, les prochains neurones à se différencier ne parviendront pas à migrer dans leur couche spécifique, et l'organisation de la rétine en sera entièrement perturbée (Icha et al., 2016). Ici, comme pour les étapes de différenciation, certains signaux externes distribués en gradient sont nécessaires à ce processus migratoire comme l'a démontré l'analyse de plusieurs mutants. Ainsi, par exemple, en absence de la molécule de guidage axonal *slit1* et du récepteur *robo3*, la migration des RGCs est ralentie et leur détachement du pôle apical n'a pas lieu (Wong et al., 2012).

À la suite de la migration des RGCs, survient celle des cellules horizontales et amacrines. Bien que les HCs naissent et demeurent en position apicale, on peut les retrouver partout le long de l'axe apico-basal au cours de la différenciation, ce qui atteste de leur migration (Prada et al., 1987; Liu et al., 2000; Wässle et al., 2000). Il s'avère que les HCs migrent avec les ACs vers le pôle basal jusqu'à l'INL puis repartent en direction du pôle apical une fois les cellules amacrines arrivées à destination dans leur couche spécifique (Godinho et al., 2007; Poché et al., 2007; Weber et al., 2014). Cette migration est réalisée de la même manière que celle des RGCs sans toutefois d'attachement au pôle basal. En effet, les HCs attachées au pôle apical, transloquent leur corps cellulaire vers l'INL puis se détachent du pôle apical pour migrer tangentially dans leur couche (Chow et al., 2015). Différentes molécules, du facteur de transcription à la molécule d'adhésion, ont été impliquées dans les divers processus migratoires : ainsi si les ACs ont besoin de la cadherine atypique Fat3 qui en

contrôlant la dynamique du cytosquelette permet la translocation des corps cellulaires (Deans et al., 2011; Krol et al., 2016), la migration des HCs nécessite la présence du facteur de transcription *lim1*. En l'absence de ce dernier, les HCs restent attachées aux ACs et s'installent avec elles dans l'INL (Poché et al., 2007). Pour ce qui est de la migration des cellules bipolaires et des photorécepteurs, peu de choses sont connues à ce jour. Mais il a été suggéré que les photorécepteurs aient un mouvement similaires aux HCs puisqu'ils sont observés tout le long de l'axe apico-basal alors que leur genèse a lieu au pôle apical qui correspond également à leur destination finale (Kaewkhaw et al., 2015; Suzuki et al., 2013).

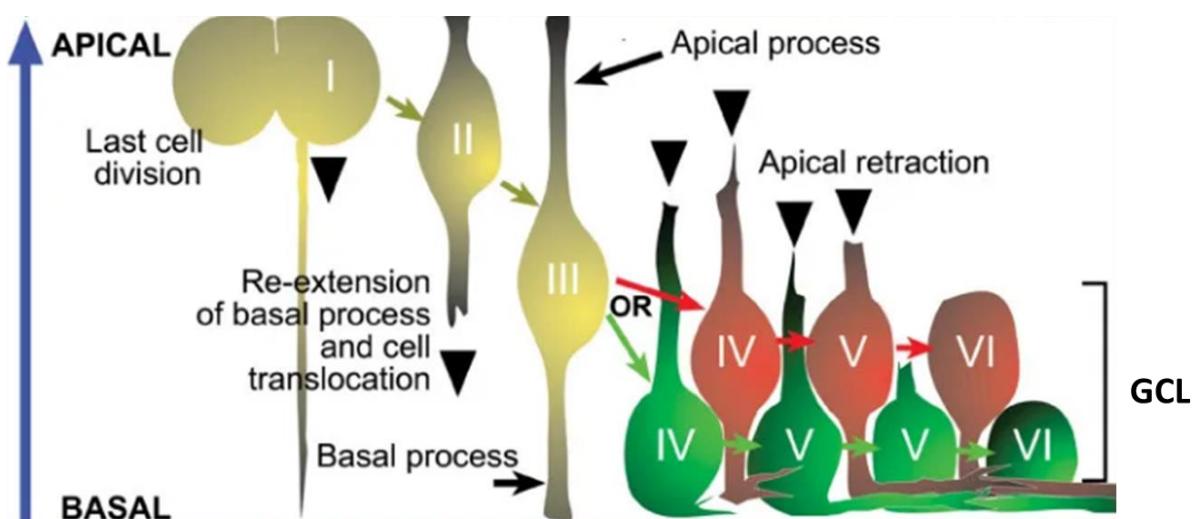


Figure 10 : Migration apico-basale des RGCs

Une fois différenciée en RGC, la cellule étend un processus vers le pôle basal de la rétine, proche du cristallin, puis déplace son soma par translocation le long de l'axe apico-basal. Après avoir atteint le pôle basal, la cellule se détache du pôle apical et migre tangentiellement au sein de la GCL.

b) Migration axonale

Pendant cette phase de migration cellulaire, on observe également la croissance axonale des RGCs en direction du tectum pour les téloéastes et du colliculus supérieur pour les mammifères. J'ai choisi ici de détailler uniquement les mécanismes moléculaires sous-tendant les premières étapes de la migration axonale des projections des RGCs que sont (i) la croissance intra-rétienne, (ii) le point de sortie spécifique de ces axones, (iii) leur cheminement le long du pédoncule optique jusqu'au (iv) point de choix du chiasma optique à la ligne médiane ventrale où les axones décident de croiser ou non cette plaque du plancher. Je n'aborderai donc pas ici les étapes finales de la croissance axonale des RGCs qui conduisent à l'arborisation finale et

très régulée des axones des RGCs dans le centre cérébral de la vision du diencéphale, en raison de la précocité des défauts que j'ai pu observer chez le mutant *mab21l2* que j'ai développé.

Cette migration des axones s'amorce dès que les RGCs ont fini de se différencier et se caractérise tout d'abord par une croissance vers la surface interne de la rétine puis vers la papille optique (*optic disc* en anglais, zone où les axones des RGCs sortent de la rétine en créant un point aveugle dépourvu de photorécepteurs). Chez le poisson-zèbre, les premiers axones sortent de la rétine entre 34 et 36hpf puis suivent le pédoncule optique en formant le nerf optique qui chemine jusqu'à la ligne médiane dans la partie ventrale du diencéphale (Burrill and Easter, 1995; Macdonald and Wilson, 1997). Chez les mammifères, au niveau de la ligne médiane, les axones ont deux choix de trajectoire : ils peuvent soit faire demi-tour et former des projections ipsilatérales (quand la rétine et leur point d'arrivée dans le superior colliculus sont du même côté) ou bien franchir la ligne médiane pour former des projections contralatérales (la rétine et le point d'arrivée dans le superior colliculus sont de côtés opposés). Chez le poisson-zèbre, il n'existe que des projections contralatérales (cf. Figure 1) et l'innervation du tectum commence dès 46hpf.

À l'intérieur de la rétine, la navigation des axones vers la surface interne de la rétine est contrôlée par l'action d'un grand nombre de facteurs. Ainsi, les protéines sécrétées Slit, qui sont localisées dans la GCL comme dans l'INL, inhibent la croissance axonale des RGCs. Slit2 est par exemple sécrétée par le cristallin (Ohta et al., 1999; Thompson et al., 2006) et en son absence, tout comme en absence de Slit1, les axones des RGCs migrent dans la mauvaise direction vers la couche externe de la rétine (Erskine et al., 2000; Niclou et al., 2000; Ringstedt et al., 2000). Ces protéines agissent via le récepteur Robo2 localisé à la surface des RGCs ; en absence de ce dernier, on observe les mêmes défauts qu'en l'absence de ses protéines ligands (Thompson et al., 2006, 2009), ce qui implique leur rôle clé dans le guidage axonal des RGCs vers la surface interne de la rétine. Les inhibiteurs de la voie Wnt comme les SFRPs, issus des RPE, CMZ et GCL, participent également à ce processus « répulsif » des axones des RGCs loin de la surface externe de la rétine ; en leur absence, on observe les mêmes phénotypes qu'en absence de Slit que ce soit chez la souris (Marcos et al., 2015) ou chez d'autres vertébrés comme le poulet et le xénopé (Rodriguez et al., 2005). En outre, la protéine de polarité cellulaire Vangl2 qui est elle exprimée par les RGCs semble de même jouer un rôle dans la navigation axonale des RGCs puisqu'en son absence, ces axones s'accumulent dans l'espace subrétinien (Leung et al., 2016).

Les axones, une fois en chemin vers la surface interne de la rétine s'étendent en direction de la papille optique sous l'effet de signaux chimio-attractifs. Ainsi, la protéine Sdf-1 (pour

Stromal cell derived factor 1), exprimée par le pédoncule optique aux abords de la papille optique, attire les axones vers le point de sortie de la rétine grâce à son interaction avec son récepteur Cxcr4 (pour *CXC chemokine receptor 4*) localisé à la surface membranaire des cônes de croissance (i.e., extrémités des axones) des RGCs. Chez le poisson-zèbre, suite au knockdown de *sdf-1* ou chez le mutant nul, les axones des RGCs migrent loin de la papille optique (Li et al., 2005). La voie de signalisation Shh est également importante dans cette étape de la migration axonale des RGCs vers la papille. En fonction de sa concentration, Shh peut inhiber ou activer la croissance axonale (Kolpak et al., 2005). En son absence totale dans les RGCs, les axones de ces neurones ne migrent plus vers la papille optique (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008). Chez les mutants poisson-zèbre *chameleon* et *sonic you* pour lesquels la voie de signalisation Shh est altérée, on observe le même phénomène avec des axones migrant dans des directions anormales à l'intérieur de la rétine (Brand et al., 1996; van Eeden et al., 1996; Schauerte et al., 1998; Nakano et al., 2004). Des molécules d'adhésion cellulaire ont également été montrées comme importantes dans cette étape de la croissance axonale des RGC : les protéines NrCam (pour *Neural Cell adhesion molecule*), Alcam (pour *Activated leukocyte CAM*) ou L1 sont toutes trois déterminantes pour le guidage des axones vers la papille optique (Brittis et al., 1996; Weiner et al., 2004). Enfin, le facteur de transcription Brn3b exprimé par les RGCs est également requis pour ce processus dans la mesure où en son absence, on observe une défasciculation des axones qui n'atteignent jamais la papille optique (Erkman et al., 2000) (voir Figure 11 pour résumé des signaux impliqués).

Le point de sortie des axones au niveau de la papille optique est régulé par des signaux attractifs, comme pour l'étape précédente de guidage axonal des RGCs. En exemple, la molécule de guidage axonal Netrin-1, qui est exprimée par les cellules de la glie au niveau du pédoncule optique, attire localement les cônes de croissance des RGCs via le récepteur DCC à la surface de ces extrémités axonales. En absence de Netrin-1 ou de DCC, les axones ne sortent pas de la rétine (Deiner et al., 1997). Cette action de la Netrin-1 est contrôlée et affinée par la Laminin-1, protéine de la matrice extracellulaire, localisée autour du pédoncule optique. En effet, elle transforme l'action attractive de Netrin-1 en effet répulsif conduisant ainsi les axones au delà du pédoncule optique pour fasciculer et former le nerf optique (Höpker et al., 1999). Chez le poisson-zèbre, les mutants *bashful*, *grumpy* et *sleepy* porteurs d'une mutation de la Laminin-1 (Parsons et al., 2002; Paulus and Halloran, 2006) ont des défauts de trajectoire axonale des RGCs, dont certains défasciculent et quittent leur route tracée le long du pédoncule optique, alors que d'autres projettent directement en ipsilateral. En absence d'autres signaux de guidage axonal plus classique comme les ephrins et leurs récepteurs Eph, ou bien des

signalisation de type morphogène comme les BMP, cette étape du cheminement axonal des RGCs est également modifiée : par exemple, les récepteurs intrisèques aux RGCs, tels que Bmpr1b (pour *BMP receptor 1b*) ou EphB2 et B3 sont également responsables de la sortie de la rétine des axones des RGCs en un point précis. En effet, chez les mutants murins de bmp1b, les axones tournent abruptement avant la papille optique (Liu et al., 2003) et chez les mutants EphB2/B3, on observe des projections axonales anormales des RGCs qui cheminent vers la région dorsale de la rétine (Birgbauer et al., 2000).

À la sortie de la rétine, les axones des RGCs se regroupent et fasciculent pour former le nerf optique. Et c'est à ce stade que les protéines Slit2 et Semaphorin 5A (Sema5A), secrétées par les cellules gliales autour du nerf optique, contrôlent la fasciculation des axones en maintenant un nerf compact par leur action inhibitrice, de manière à éviter la défasciculation de groupes d'axones qui prendraient d'autres trajectoires que celle de la ligne médiane (Plump et al., 2002; Oster et al., 2003). En outre, la molécule de guidage Slit1 et son récepteur Robo2 participe également à cette étape du contrôle de la trajectoire du nerf optique puisqu'en son absence, on observe des groupes d'axones à des positions ectopiques et un chiasma optique significativement plus large que chez les contrôles (Plump et al., 2002; Plachez et al., 2008). Chez le poisson-zèbre, le mutant *astray* porteur d'une mutation dans le gène *robo2* présentent le même type de défauts avec des erreurs de trajectoire axonale tout au long du chemin emprunté par le nerf optique avant et après le chiasma (Karlstrom et al., 1996; Fricke et al., 2001; Hutson and Chien, 2002). Les protéines SFRPs inhibitrices de la signalisation Wnt, également présentes dans l'environnement du nerf optique, auraient une fonction similaire chez la souris ; on observe en effet un nerf optique moins compact et des défauts de fasciculation des axones des RGCs chez le mutant murin (Marcos et al., 2015). Enfin, toujours chez la souris mais également chez l'Homme, le facteur de transcription Vax1, exprimé par les cellules de la ligne médiane et les cellules gliales jouxtant le nerf optique, joue un rôle parallèle à ce stade de la croissance axonale des RGCs dans la mesure où son absence entraîne un arrêt des axones avant la ligne médiane (Bertuzzi et al., 1999; Hallonet et al., 1999; Slavotinek et al., 2012). De manière intéressante, il a été montré qu'en dehors de son rôle de facteur de transcription, Vax1 était secrétée par les cellules hypothalamiques ventrales pour interagir avec des protéines de type HSPG (pour *Heparan Sulfate ProteoGlycan*) localisées à la membrane des axones des RGCs et que cette nouvelle fonction de Vax1 était déterminante pour le développement du nerf optique (Kim et al., 2014).

Après cette phase de croissance jusqu'à la ligne médiane, vient la phase de choix de la trajectoire au chiasma optique. Ici, c'est au tour de la signalisation de Shh, exprimée autour du

chiasma, mais pas au chiasma même, d'être cruciale dans la décision de la route à emprunter par les axones des RGCs (Marcus et al., 1999; Trousse et al., 2001). Chez les mutants de poisson-zèbre *acerebellar* et *no isthmus*, la voie de Shh est perturbée au chiasma optique (Torres et al., 1996; Macdonald et al., 1997; Shanmugalingam et al., 2000), ce qui entraîne des erreurs de trajectoire axonale avec notamment des projections ipsilatérales. Ceci suggère le rôle clé de Shh qui « force » la traversée de la ligne médiane par les axones des RGCs, tant par son pouvoir répulsif que par un pouvoir attractif, comme démontré chez d'autres mutants souris ou poisson (*iguana* et *umleitung*) (Sekimizu et al., 2004; Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008; Bergeron et al., 2011). D'autres molécules de guidage axonal comme NrCAM et Sema6D, exprimées par les cellules gliales de la ligne médiane, jouent également un rôle déterminant dans la traversée de cette ligne par les axones des RGCs. De manière intéressante, c'est en fait un trio de protéines NrCAM, Sema6D et son récepteur Plexin-A1, localisé à la surface de certains RGCs avec NrCAM (Toyofuku et al., 2004) mais aussi à la surface des neurones autour du chiasma (Williams et al., 2006), qui, ensemble, forment un complexe entre ces cellules, capable de « transformer » l'effet répulsif de Sema6D en un pouvoir attractif de manière à conduire les axones à franchir la ligne médiane (Kuwajima et al., 2012).

Une autre protéine majeure dans la prise de décision des axones au chiasma optique est le récepteur aux sémaphorines ainsi qu'au VEGF-A (pour *Vascular Endothelial Growth Factor A*) : Neuropilin-1 (Nrp1) exprimé à la surface des RGCs. En absence de Nrp1, on observe plus de projections ipsilatérales que ce soit chez la souris (Erskine et al., 2011; Tillo et al., 2015), comme chez le poisson-zèbre qui n'en comporte pas (Dell et al., 2013). Chez ce téléosté, Nrp1 interagit avec Sema3D et Sema3E (Sakai and Halloran, 2006; Dell et al., 2013) et potentiellement avec CRMP4 (pour *Collapsin Response Mediator Protein 4*) une protéine qui coordonne la dynamique du cytosquelette (Liu et al., 2018). En plus de son action directe sur le guidage axonal par le biais des sémaphorines et de VEGF-A, Nrp1 aurait également un rôle dans le contrôle de la neurovasculature au chiasma optique. En effet, chez le mutant murin, les souris présentent significativement plus de vaisseaux sanguins au chiasma, qui forment ainsi une barrière physique empêchant les axones de franchir la ligne médiane (Erskine et al., 2017).

Enfin, certains facteurs de transcription semblent également jouer un rôle clé dans la prise de décision des axones des RGCs de traverser ou non la ligne médiane. Islet2, par exemple, est exprimé dans 40% des axones controlatéraux chez la souris et son absence provoque une augmentation des projections ipsilatérales (Pak et al., 2004; Thaler et al., 2004), et ce à l'instar du poisson-zèbre, chez lequel son rôle inhibiteur des projections ipsilatérales a été démontré (Panza et al., 2015). De même, Brn3b est spécifiquement exprimé dans les RGCs controlatéraux

chez la souris et est nécessaire à l'établissement de leur identité (Quina et al., 2005; Sajgo et al., 2017). Tous ces facteurs nécessaires aux premières étapes de la navigation axonale des RGCs jusqu'au chiasma optique sont résumés dans la Figure 11 ci-dessous.

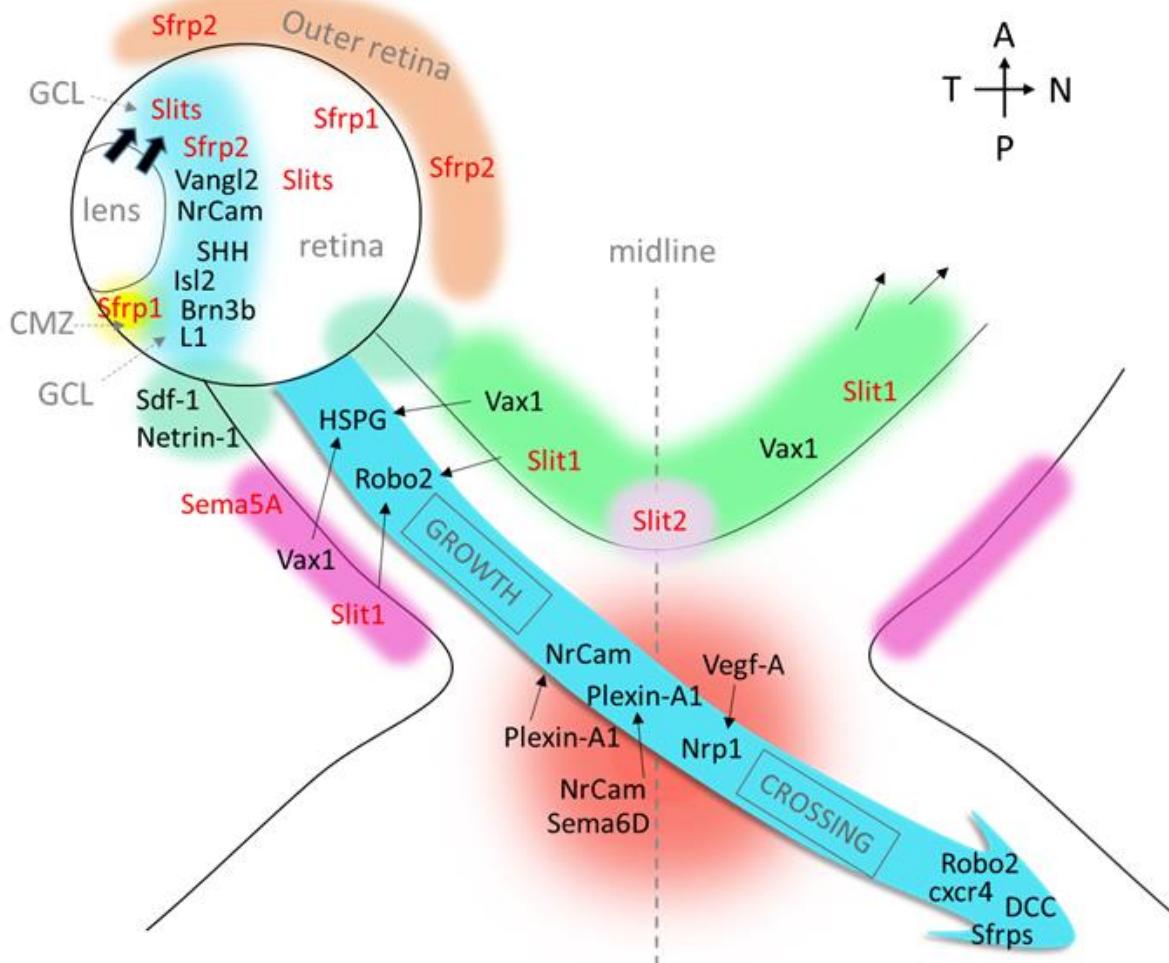


Figure 11 : Contrôle de la croissance axonale des RGCs.

A l'intérieur de la rétine, la croissance axonale est contrôlée par des facteurs attractifs (noirs) et des facteurs répulsifs (rouges) dont certains sont sécrétés par le cristallin (flèche pleine noire), la CMZ (en jaune) ou l'extérieur de la rétine (en marron). La sortie des axones des RGCs par la papille optique se fait sous contrôle de facteurs chimioattractifs présents à l'entrée de la papille et au niveau du pédoncule optique (zone turquoise). Par la suite, la croissance du nerf optique est rendue possible par des signaux inhibiteurs/répulsifs localisés de part et d'autre du nerf (zones roses et verte) le restreignant sur un chemin précis et des signaux attractifs le guidant jusqu'à la ligne médiane dans la partie ventrale du diencéphale. Là, des signaux externes issus des cellules de la ligne médiane (zone rouge) participent en interaction avec leurs récepteurs à la surface membranaire des RGCs (minces flèches noires) à guider les axones à traverser la ligne médiane pour former le chiasma optique.

4. Pathologies liées au développement de l'œil : troubles microptalmiques, anophthalmiques et colobomes (MAC)

Les microptalmies (œil plus petit), anophthalmie (absence d'œil) et colobome (présence d'une « fissure » dans la structure de l'œil) sont des phénotypes différents, toutefois reliés sous une même banière constituant les anomalies du développement embryonnaire de l'œil : les MACs qui ont une prévalence de 6 à 13 naissances sur 100,000, les colobomes étant le défaut le plus fréquent des trois (Skalicky et al., 2013; Williamson and FitzPatrick, 2014; Shah et al., 2015). Les colobomes sont dus à un défaut de fermeture de la fissure optique (qui survient entre 36hpf et 48hpf chez le poisson-zèbre) et peuvent toucher différentes structures de l'œil. Ainsi dans la majorité des cas chez l'Homme, le colobome induit un iris ouvert généralement dans la partie ventrale de l'œil mais cette anomalie développementale peut également affecter le cristallin, la rétine ou le nerf optique (Figure 12). Il est admis que si le défaut de fermeture de la fissure optique survient tôt dans le processus alors le colobome affectera plusieurs structures et sera de ce fait plus sévère que si le défaut se produit plus tardivement dans le développement. Le plus souvent, les colobomes sont symétriques (et affectent donc de la même façon les deux yeux) mais des colobomes asymétriques ont déjà été rapportés dans la littérature (Morrison et al., 2002). Il en résulte une perte totale ou partielle de la vision selon la sévérité de la malformation. Les colobomes sont souvent associés à une microptalmie ou à d'autres anomalies systémiques. Des facteurs environnementaux tels qu'une déficience en vitamine A (Hornby et al., 2003), l'usage de drogues (Miller and Strömland, 1999) et l'abus d'alcool (Strömland and Pinazo-Durán, 2002) peuvent engendrer des colobomes durant la gestation, mais la plupart des MACs proviennent de causes génétiques (Gregory-Evans et al., 2004). A l'heure actuelle, plus de cent gènes ont été impliqués dans le développement des MAC, je vous présenterai ici les gènes que j'ai jugés les plus importants par rapport à mon étude.

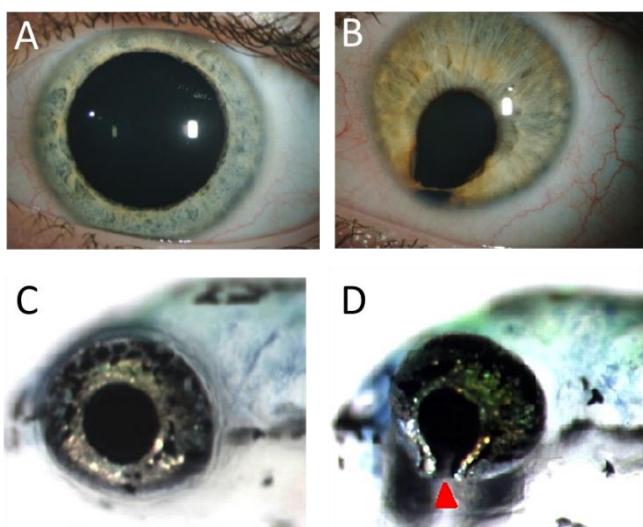


Figure 12 : Colobomes chez l'Homme et le poisson-zèbre
(A,B) Yeux humains non affecté (A) et présentant un colobome (B). **(C,D)** Yeux de poisson-zèbre à 5dpf non affecté (C) et présentant un colobome (D, flèche rouge). Adapté de Brown et al, 2009.

a) Rôle des facteurs de transcription

Parmi les multiples gènes responsables de MACs, on retrouve de nombreux facteurs de transcription dont le rôle dans le développement oculaire avait été préalablement établi chez des modèles animaux :

- En premier lieu, *SOX2* est responsable à lui seul de 20 à 40% des MACs chez l'Homme (Fantes et al., 2003; Gerth-Kahlert et al., 2013). Des mutations dans ce gène sont associées à des anophthalmies (73% des cas) et des microptalmies souvent bilatérales et très sévères, ou unilatérales et plus modérées (Williamson and FitzPatrick, 2014). Certains patients porteurs d'une mutation de *SOX2* présentent également un colobome et/ou une dysgénésie du segment antérieur (i.e., la dysgénésie désigne une malformation d'un tissu ou d'un organe survenant au cours de l'embryogenèse ; dans le cas de celle du segment antérieur de l'œil, elle peut affecter la cornée, l'iris et/ou le cristallin) (Wang et al., 2008; Mihelec et al., 2009), associés à un retard du développement, des troubles cognitifs, des malformations corticales, des défauts génito-urinaires ainsi qu'une petite taille de l'individu (Schneider et al., 2009). *Sox2* est exprimé dans la vésicule optique et l'ectoderme du cristallin présomptif sous le contrôle du morphogène *BMP4* (Kamachi et al., 1995; Furuta and Hogan, 1998), et est particulièrement conservée chez le poulet, la souris ou le poisson-zèbre. En effet, les souris déficientes en *sox2* présentent des MACs comme les patients, et le *knockdown* (KD) de *sox2* par morpholino (MO pour *Morpholino Oligonucleotide*, qui cible soit le site d'initiation de la traduction, soit un site d'épissage pour réduire la quantité de protéine produite par encombrement stérique) chez le poisson-zèbre résulte en des yeux et un corps plus petits couplés à un développement neural anormal (Taranova et al., 2006; Langer et al., 2012; Pavlou et al., 2014).
- Des mutations dans *OTX2* représentent la deuxième principale cause de MACs après les formes liées au gène *SOX2*. Les patients porteurs d'une mutation dans ce gène présentent une anophthalmie dans 43% des cas et dans les 57% restants une microptalmie (Ragge et al., 2005; Williamson and FitzPatrick, 2014), parfois accompagnée de colobomes et/ou de dystrophies de la rétine (Wyatt et al., 2008; Henderson et al., 2009). De la même manière que pour les mutations de *SOX2*, les mutations d'*OTX2* chez l'Homme sont souvent associées à un retard du développement, des troubles cognitifs, des anomalies corticales et des parties génitales ainsi qu'à une petite taille (Schilter et al., 2011). *Otx2* est quant à lui exprimé dans la vésicule optique puis dans la partie dorsale de la rétine en contact avec l'ectoderme de surface et enfin dans le RPE présomptif (Bovolenta et al., 1997). Ce régulateur de l'expression génique est également très conservé chez la souris et le poisson-

zèbre. Les souris mutantes *knockout* (KO) hétérozygotes présentent une anophthalmie ou une microptalmie accompagnée d'anomalies crano-faciales et d'une baisse de la fertilité (Larder et al., 2013) tandis qu'une absence de toutes les structures antérieures de la tête est observée chez les KO homozygotes (Matsuo et al., 1995). Chez le poisson-zèbre, les morphants (i.e., embryons injectés avec un MO, terme donné par analogie aux « mutants ») présentent une légère microptalmie (Chassaing et al., 2012).

- Les mutations de *FOXE3* peuvent, elles, être divisées en deux groupes, celles engendrant une dysgénésie du segment antérieur (Reis and Semina, 2011) et celles à l'origine d'une microptalmie (Valleix et al., 2006). *Foxe3* est exprimé dans le cristallin et le rhombencéphale présomptif (Blixt et al., 2000; Brownell et al., 2000), et sa déplétion chez la souris entraîne des microptalmies et de petits cristallins dont la forme est irrégulière (Brownell et al., 2000). Chez le poisson-zèbre, le KD de *foxe3* conduit à une taille réduite des yeux et de leur cristallin ; il est à noter que les cristallins présentent une morphologie anormale et contiennent des cellules de la rétine dont la localisation ectopique s'explique par des défauts du développement précoce (Shi et al., 2006).

Parmi les facteurs de transcription impliqués de façon plus minoritaire dans les MACs, on compte :

- Une mutation dans le gène *SALL2* a été mise en cause dans une famille dans laquelle ségrège un colobome (Kelberman et al., 2014). *Sall2* est exprimé dans la cupule optique et dans la placode du cristallin au moment de la fermeture de la fissure optique (Böhm et al., 2008). Les souris KO pour ce gène présentent un colobome bilatéral (Kelberman et al., 2014), impliquant ce gène dans la fermeture de la fissure optique.
- Le gène *SIX6* est responsable de microptalmies bilatérales chez l'Homme (Gallardo et al., 2004; Aldahmesh et al., 2013). Il s'exprime tout d'abord dans la vésicule et le pédoncule optiques, puis apparaît dans la rétine et le cristallin (Kumar, 2008). Les souris KO homozygotes présentent une hypoplasie de la rétine et une aplasie du nerf optique (i.e., dans le cas présent une perte importante des RGCs qui explique l'absence quasi totale de nerf optique couplée à une importante diminution des vaisseaux rétiniens) (Li et al., 2002) ; de plus, le KD chez le poisson-zèbre entraîne une diminution significative de la taille de l'œil (Carnes et al., 2014).
- Des mutations dans *ATOH5*, dont nous avons vu qu'il est un gène régulateur clé de la différenciation des RGCs chez l'animal, sont associées chez l'Homme à une microptalmie, une malformation de la rétine, une hypoplasie du nerf optique (i.e., amincissement du nerf dû à la perte d'un nombre significatif de fibres nerveuses/axones) ainsi qu'une cataracte (i.e.,

opacification du cristallin) (Khan et al., 2012). Chez la souris, la perte d'*atoh5* se traduit par une apparence normale des yeux dont le nerf optique est toutefois absent et dont les rétines présentent un nombre réduit de RGCs et une lamination anormale (Brown et al., 2001; Wang et al., 2001). Chez les mutants homozygotes de poisson-zèbre, on retrouve également cette perte importante des RGCs (Kay et al., 2001), ce qui confirme son rôle crucial dans la différenciation de ces cellules (cf. Chapitre 1 I.2.b et c).

- Le gène *PAX2* est associé à des colobomes chez l'Homme (Eccles and Schimmenti, 1999), que l'on retrouve également chez les mutants souris et poisson-zèbre et qui s'accompagnent d'anomalies du développement rénal (Torres et al., 1996; Macdonald et al., 1997). Comme décrit précédemment (cf. Chapitre 1 I.1.a), Pax2 est un facteur déterminant dans la mise en place de la frontière entre le pédoncule et la cupule optique, ce qui lui permet de délimiter le RPE du nerf optique au niveau de la fissure choroïde (Macdonald et al., 1995).
- Le gène *RX/RAX* que nous avons vus précédemment (cf. Chapitre 1 I.1) sont associés à des anophthalmies bilatérales, voire des microphthalmies chez l'Homme (Voronina et al., 2004; Chassaing et al., 2014).
- De même, des mutations du gène *VSX2* (cf. Chapitre 1 I.2.a) sont associées à une microptalmie bilatérale ou une anophthalmie (Ferda Percin et al., 2000; Bar-Yosef et al., 2004) et dans un cas des cas décrits, cette MAC est accompagnée de difficultés d'apprentissage (Iseri et al., 2010). Le KD de *vsx2* chez le poisson-zèbre ainsi que les mutations humaines reproduites chez la souris entraînent une microptalmie et un cristallin de taille réduite chez ces animaux (Vitorino et al., 2009; Zou and Levine, 2012).
- Enfin le dernier facteur de transcription impliqué dans la formation des MACs est *PAX6* donc nous avons détaillé la fonction précédemment (cf. Chapitre 1 I.1,2). Chez l'Homme les mutations dans *PAX6* sont associées à une absence d'iris mais peuvent parfois être la cause de microphthalmies (Dansault et al., 2007; Henderson et al., 2007; Xiao et al., 2012), de colobomes et de malformations du nerf optique (Azuma et al., 2003), ainsi que d'anomalies du développement cérébral (Solomon et al., 2009).

b) Différentes voies de signalisation impliquées

En plus des facteurs de transcription, on retrouve également l'implication dans les MACs de nombreuses voies de signalisation essentielles au développement embryonnaire. Ainsi, des mutations de *shh* engendrent une cyclopie chez les souris (Chiang et al., 1996) ou une microptalmie chez le poisson-zèbre (Schauerte et al., 1998), sans toutefois d'observation

de colobome dans les deux cas. Chez l'Homme à l'inverse, les patients porteurs d'une mutation dans le gène *SHH* présente une microptalmie colobomateuse (Schimmenti et al., 2003). De plus, les gènes dont l'expression est induite par Shh, tels *pax2*, *vax1* et *vax2* induisent des colobomes lorsqu'ils sont mutés chez la souris et le poisson-zèbre (Takeuchi et al., 2003), de même pour les gènes dont l'expression est réprimée par Shh tels *pax6*. Cette observation constitue un argument supplémentaire en faveur de la contribution de Shh aux MACs, comme l'est le fait que des mutations des gènes régulateurs de son activité comme *sox11* et *sox4* (Wen et al., 2015) induisent également des colobomes chez l'Homme et la souris (Wurm et al., 2008; Pillai-Kastoori et al., 2014; Wen et al., 2015). Ces résultats dans leur ensemble indiquent que Shh se trouve au centre d'un réseau génique primordial pour les différentes étapes du développement oculaire et en particulier pour la fermeture de la fissure optique.

Une autre signalisation caractéristique de ces stades précoce de la formation du système visuel est la voie des BMP/TGF- β :

- Bien que l'absence de *BMP4* soit souvent associée avec celle conjointe d'*OTX2* en raison de leur proximité chromosomique, des délétions affectant uniquement *BMP4* ont pu être observées. Les patients porteurs de ces délétions présentent une microptalmie, une anomalie du segment antérieur de l'œil, des troubles cognitifs, des malformations cérébrales et sont généralement de petite taille alors que les patients porteurs d'une mutation ponctuelle ont une anophthalmie (Bakrania et al., 2008; Reis et al., 2011; Martínez-Fernández et al., 2014). L'activité de BMP4 est d'abord restreinte à la zone dorsale de la vésicule optique par Shh (Zhao et al., 2010) ; puis ce morphogène est exprimé dans la cupule optique et est retrouvé à des stades plus tardifs dans le cristallin (Chang et al., 2001; Bakrania et al., 2008). Chez la souris, l'absence complète de BMP4 se traduit par une absence de cristallin et la mort des embryons homozygotes au stade très précoce de la gastrulation (Furuta and Hogan, 1998), tandis que les souris hétérozygotes présentent une anophthalmie ou une microptalmie, des anomalies rénales, crano-faciales et du segment antérieur de l'œil ainsi qu'un colobome affectant le nerf optique (Dunn et al., 1997; Chang et al., 2001).
- Des mutations dans le gène *BMP7* sont associées à une anophthalmie symétrique ou asymétrique ou encore à un colobome unilatéral associé à des difficultés d'apprentissage (Wyatt et al., 2010). *BMP7* est exprimé dans le pédoncule et la cupule optiques, puis plus tardivement dans le cristallin, la rétine et les bords de la fissure optique chez l'Homme. Les souris KO homozygotes pour *bmp7* présentent une anophthalmie ou une microptalmie bilatérale, une absence de fermeture de la fissure optique (et donc un colobome sévère), des

anomalies des reins et du squelette axial ainsi qu'une létalité des mutants au premier jour de vie postnatal (Dudley et al., 1995; Morcillo et al., 2006).

- Le dernier gène de la voie BMP/TGF- β impliqué dans les MACs chez l'Homme est *GDF6*. Bien que des mutations de ce gène sans phénotype oculaire aient été observées (Tassabehji et al., 2008; Asai-Coakwell et al., 2009, 2013), d'autres mutations sont associées à une anophthalmie bilatérale ou à un colobome unilatéral, couplé(e) à une polydactylie et un bec de lièvre (Asai-Coakwell et al., 2007; Chassaing et al., 2014; Williamson and FitzPatrick, 2014). Chez les souris KO hétérozygotes, on observe une cavité dans la papille optique et parfois une microptalmie (Asai-Coakwell et al., 2009). Le KD par morpholino induit une microptalmie ainsi qu'une rétine désorganisée chez le xénope (Hanel and Hensey, 2006; Tassabehji et al., 2008) ; le KD chez le poisson-zèbre entraîne les mêmes phénotypes que chez le xénope qui sont ici associés à des colobomes et à une hypoplasie du nerf optique (Asai-Coakwell et al., 2007, 2009). Des mutations dans *gdf6* engendrent une augmentation de la mort cellulaire (Gosse and Baier, 2009; den Hollander et al., 2010) et une inhibition de la prolifération des RPCs (French et al., 2013) chez le téléostéen. Le rôle de Gdf6 dans la prolifération cellulaire des RPCs pourrait se faire via l'inactivation de la signalisation induite par l'acide rétinoïque (ou RA pour *Retinoic Acid*) (Valdivia et al., 2016).

La voie de l'acide rétinoïque est par ailleurs la troisième voie de signalisation impliquée dans le développement des MACs. Des mutations du gène *ALDH1A3* (également nommé *Raldh3*, et dont la fonction consiste à catalyser l'oxydation du rétinaldéhyde en RA) sont associées à des phénotypes variables : une anophthalmie bilatérale, une microptalmie colobomateuse ou une microptalmie et un colobome l'un sans l'autre (Fares-Taie et al., 2013; Abouzeid et al., 2014). Chez la souris, ce gène est exprimé dans la rétine ventrale (Duester, 2009) et son absence conduit à la disparition de la rétine ventrale ainsi qu'à une absence de fermeture de la fissure optique (Dupé et al., 2003; Molotkov et al., 2006). Chez le poisson-zèbre, le KD entraîne une microptalmie, un retard de la fermeture de la fissure optique et dans certains cas des colobomes (Yahyavi et al., 2013).

Un autre gène de cette voie à l'origine d'un syndrome de type MAC est *stra6* (pour *Stimulated by Retinoic Acid 6*, un récepteur et transporteur membranaire du rétinol). Des mutations de ce gène chez l'Homme provoquent un syndrome polymalformatif sévère de Matthew-Wood avec anophthalmie/microptalmie, malformations pulmonaires, cardiaques et du diaphragme (Chitayat et al., 2007; Pasutto et al., 2007; Chassaing et al., 2009) ou une atteinte plus légère avec seulement une microptalmie colobomateuse (Casey et al., 2011). Bien que

Stra6 soit exprimé dans l'œil, le système nerveux, les muscles, l'appareil urinaire et le système reproducteur de la souris (Bouillet et al., 1997), et que ses mutations entraînent des signes cliniques sévères chez l'Homme, le mutant murin KO présente un phénotype « presque » normal avec une légère anomalie oculaire (Berry et al., 2013). Chez le poisson-zèbre au contraire, une inhibition pharmacologique de l'acide rétinoïque supposée mimer la perte de *stra6* induit un phénotype plus sévère que chez le mutant murin avec une microptalmie colobomateuse et des anomalies cardiaques (Casey et al., 2011). Des mutations dans le gène *RARB* (pour *Retinoic Acid Receptor Beta*) provoquent un phénotype polysystémique similaire au syndrome de Matthew-Wood causé par la perte de *STRA6*, et incluant une anophtalmie ou microptalmie, une dysplasie broncho-pulmonaire, une hernie diaphragmatique et des troubles cognitifs (Srour et al., 2013).

c) Autres familles de gènes à l'origine de MACs

D'autres gènes de fonction parfois inconnue ont été associés à l'apparition de MACs. L'un d'entre eux, *YAPI* (pour *Yes Associated Protein 1*) est un membre de la signalisation Hippo, qui a été trouvé responsable de colobomes bilatéraux, d'une microptalmie sévère, d'une perte de l'audition et de retards mentaux (Williamson et al., 2014; Holt et al., 2017). Chez le poisson-zèbre, son absence entraîne des colobomes et la perte des cellules composant le RPE (Miesfeld et al., 2015). Un autre gène responsable quant à lui de colobomes isolés a été identifié récemment : il s'agit d'*ABCB6* (pour *ATP-Binding Cassette subfamily B member 6*). En effet, une altération de ce gène chez l'Homme comme chez le poisson-zèbre engendre des colobomes (Wang et al., 2012; Prokudin et al., 2014). Enfin, des mutations dans le gène *MAB21L2* dont la fonction exacte reste inconnue en dépit d'une appartenance à la famille des nucléotidyl transférases, ont été associées à des anophtalmies bilatérales, des microptalmies colobomateuses ainsi que divers autres défauts systémiques (Rainger et al., 2014; Deml et al., 2015; Horn et al., 2015). Chez la souris, le xénope, le poulet et le poisson-zèbre, une perte de cette protéine nucléaire induit des anomalies développementales sévères et variées que je présenterai ci-dessous dans le détail.

II. La famille mab-21

1. Première découverte

Le gène *mab-21* (pour *male abnormal 21*) a été découvert pour la première fois en 1991 à la suite d'un crible génétique chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, visant à identifier des mutants du développement des raies sensorielles, localisées sur la queue des mâles (Baird et al., 1991). Chez le mâle nématode, ces raies sensorielles, composées de deux cellules neuronales et d'une cellule épithéliale, sont indispensables au comportement reproducteur et sont réparties en neuf paires bilatérales de part et d'autre de la queue. L'arrangement de ces raies est dépendant du positionnement de cellules précurseurs dites « cellules raies ». Chez le mutant *mab-21*, on observe une fusion des raies 4, 5 et 6 ainsi que la présence d'une dixième raie supplémentaire entre les raies 6 et 7 (Figure 13). Cette dixième raie résulte de la transformation de la cellule épidermique de la raie 7 en cellule précurseur.

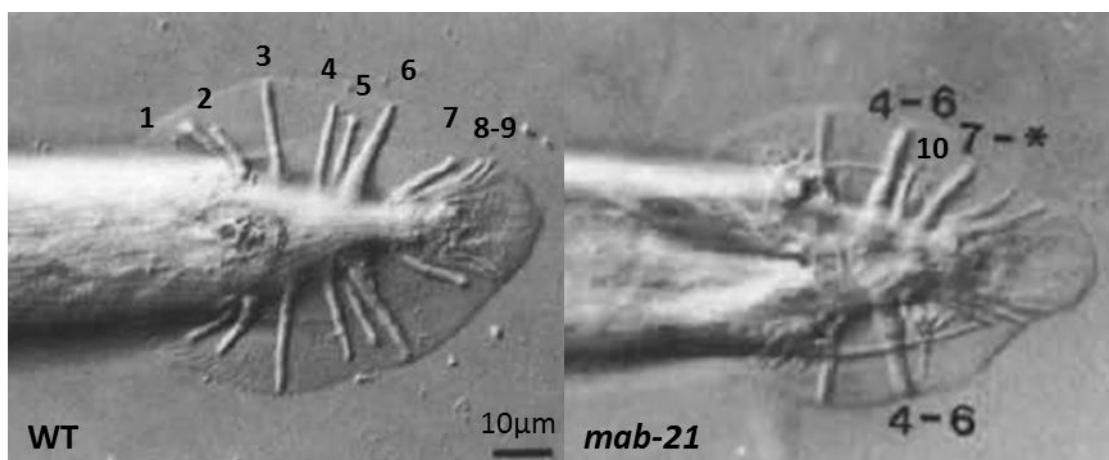


Figure 13 : La mutation de *mab-21* entraîne une fusion des raies sensorielles 4 et 6
Vue ventrale de la queue de mâle nématodes. Adapté de Baird et al., 1991

En 1995, une autre étude s'est focalisée sur ce mutant afin d'élucider les mécanismes pathogéniques à l'origine des défauts observés. Ils ont ainsi mis en évidence que la mutation dans *mab-21* affecte l'identité de quatre cellules différentes, dont trois des quatre cellules qui composent une raie (Chow et al., 1995). Chaque raie sensorielle est en effet constituée de deux neurones, d'une cellule épidermique et d'une cellule hypodermique. Les auteurs montrent que la mutation dans *mab-21* induit une véritable transformation homéotique, impliquant pour la première fois ce gène du nématode dans la reprogrammation du destin cellulaire. Ils font ainsi l'hypothèse que la fusion des raies 4 et 6 résulte de la modification des propriétés de la cellule épidermique de la raie 6 qui, chez le mutant, aurait perdu ses capacités de « reconnaissance

cellulaire ». De même, ils rapportent que l'une des deux cellules neuronales de la raie 6, dont la morphologie est spécifique de cette raie, présente chez le mutant une morphologie caractéristique des neurones des autres raies. La troisième cellule affectée par cette mutation est la cellule hypodermique qui se trouve fusionnée avec une cellule adjacente. Enfin, ils confirment l'observation réalisée par leurs prédecesseurs que la dixième raie résulte de la transformation d'une cellule épidermique en neuroblaste. En parallèle, il est montré que *mab-21* agit de manière cellule autonome dans le choix de l'identité des cellules de la raie 6, mais de manière cellule non-autonome quant à la transformation de la cellule épidermique en neuroblaste. Le gène *mab-21* semble donc être nécessaire au devenir de différents types cellulaires. Les mutants *mab-21* sont également plats et plus petits en comparaison des contrôles et présentent une baisse de fécondité ainsi que des mouvements mal coordonnés. L'ensemble de ces observations suggère que *mab-21* joue un rôle important dans le destin cellulaire au niveau de l'épiderme et du système nerveux.

Comme les phénotypes associés au mutant *mab-21* sont diamétralement opposés aux phénotypes observés pour les mutants de la signalisation *small (sma)* de la voie TGF- β (*sma* étant l'équivalent du Smad des vertébrés), il a été suggéré que *mab-21* interagissait avec cette voie de « manière antagoniste » (i.e., inhibition partielle ou blocage de la signalisation). Ainsi, le développement de doubles mutants *sma/mab* ont montré que *mab-21* est en relation épistatique avec *sma*, et plus exactement qu'il se trouve en aval de la voie des TGF- β et semble être régulé négativement par celle-ci (Morita et al., 1999). De manière intéressante, un crible double-hybride ultérieur a permis de mettre en évidence une interaction entre *mab-21* et *sin-3*, un répresseur transcriptionnel dont le rôle consiste à recruter des histones déacétylases. Le double mutant de ces deux gènes montrent également une interaction synergique entre ces deux protéines dans la régulation du destin cellulaire des raies sensorielles du nématode (Choy et al., 2007).

2. Différents paralogues chez les vertébrés

Contrairement au nématode qui ne possède qu'un seul parologue de *mab-21*, tous les vertébrés, et la mouche du vinaigre *Drosophila Melanogaster* présentent deux orthologues similaires à 97% de ce gène : *mab21l1* (mal-21-like 1) et *mab21l2* (mab-21-like 2) (Mariani et al., 1999; Wong et al., 1999a). Un troisième orthologue, *Xmab21l3* (mab-21-like 3), a pu être identifié chez le xénope mais ce dernier ne présente qu'une homologie de séquence de seulement 40% par rapport à ses paralogues et orthologues (Sridharan et al., 2012). *Mab21l1* et

mab21l2 codent tous les deux des protéines de 41kDa composées de 359 acides aminés et *mab21l2* a été principalement localisé dans le noyau des cellules (Mariani et al., 1999; Baldessari et al., 2004).

a) Mab21l3

Xmab21l3 a été identifié chez le xénope à la suite d'un crible visant à caractériser des gènes clés de la régionalisation de l'embryon. Il comporte un domaine similaire aux autres protéines de la famille *mab-21* qui couvre 85% de sa protéine. La surexpression de *Xmab21l3* entraîne des défauts de formation de la tête ainsi que des protrusions ectopiques dues à une dorsalisation de l'ectoderme et du mésoderme (Figure 14A). Cette protéine serait donc requise pour la régulation de la régionalisation dorso-ventrale de l'embryon (Sridharan et al., 2012), ce qui a été confirmé par l'observation d'un phénotype ventralisé lors d'expériences de perte de fonction de *Xmab21l3* : les embryons morphants sont anophthalmiques et présentent un axe du corps court et courbe avec à des plus fortes doses de MO la perte des structures dorsales de la tête (Figure 14B). Les auteurs ont également montré que l'activité « dorsalisante » de *Xmab21l3* était réalisée via l'inhibition de la signalisation des BMP par suractivation de la voie ERK. *Xmab21l3* agirait donc comme un antagoniste de la voie des BMP.

En outre, il a été montré plus récemment que *Xmab21l3* jouerait un rôle dans la formation de l'épiderme en agissant sur la spécification et la différenciation des ionocytes et des cellules multiciliées (Takahashi et al., 2015). Dans ce cas, *Xmab21l3* agirait en aval d'une autre voie du type TGF β , la signalisation *Notch*, mais en amont de gènes régulateurs clés du destin de ces types cellulaires tels que *multicilin* et *foxi1*.

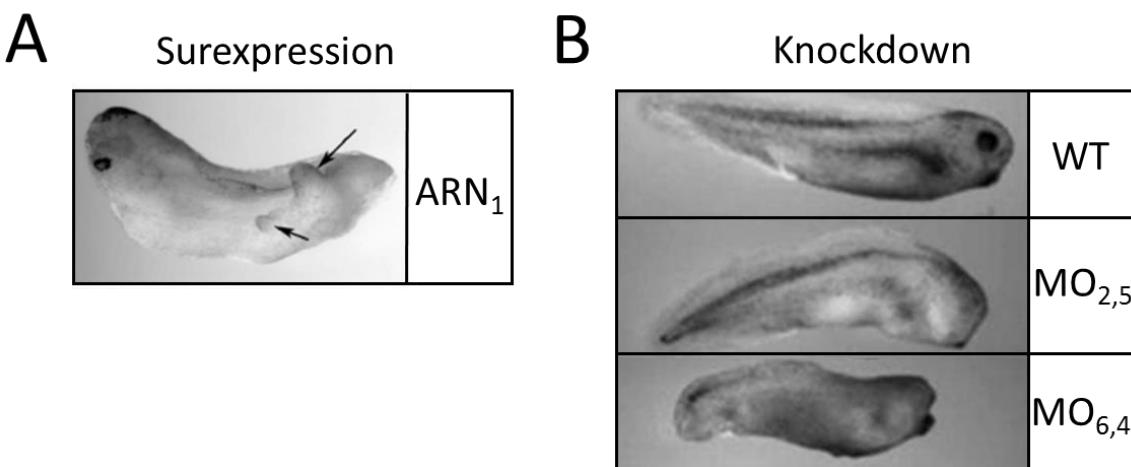


Figure 14 : Perte et gain de fonction de *Xmab21l3*

(A) Vue latérale d'un embryon de xénope au stade 35, injecté avec 1ng d'ARN *xmab21l3*. (B) Vues latérales d'embryons contrôle (WT), et morphants MO_{2,5} (injecté avec 2.5ng du MO *xmab21l3*) et MO_{6,4} (injecté avec 6.4ng de MO *xmab21l3*). Adapté de Sridharan et al., 2012.

b) Mab21l1

Discuter de Mab21l1 revient à discuter de Mab21l2 dans la mesure où ces deux protéines sont homologues à plus de 90% et où leurs profils d'expression se superposent en tout point dans la vaste majorité des tissus. En effet, elles sont toutes deux exprimées majoritairement dans l'œil et le mésencéphale dorsal (au niveau du toit optique chez le poisson et le xénopé) et dans une moindre mesure dans le cerveau antérieur, la moelle épinière, les bourgeons des membres et le rhombencéphale chez certaines espèces dont le poisson-zèbre (Mariani et al., 1999; Wong et al., 1999b; Kudoh and Dawid, 2001; Lau et al., 2001; Wong and Chow, 2002a, 2002b). Toutefois, bien que ces deux paralogues soient exprimés dans des tissus communs, leur expression au sein de ces tissus peut varier. Dans les bourgeons des membres, *mab21l2* présente un large domaine d'expression incluant la région apicale tandis que *mab21l1* est seulement exprimé sur deux petites régions parallèles. En outre, *mab21l1* est exprimé dans les deux tiers antérieurs du tectum tandis que *mab21l2* apparaît dans tout le mésencéphale dorsal. Au niveau de l'œil, *mab21l1* est plus fortement exprimé dans le cristallin tandis que *mab21l2* est exprimé dans les RGCs, le RPE et tout le long du nerf optique (Wong and Chow, 2002a; Yamada et al., 2003). Il y a également des tissus spécifiques de chacun d'entre eux, comme la crête génitale pour *mab21l1* et la paroi ventrale de l'abdomen pour *mab21l2* (Figure 15).

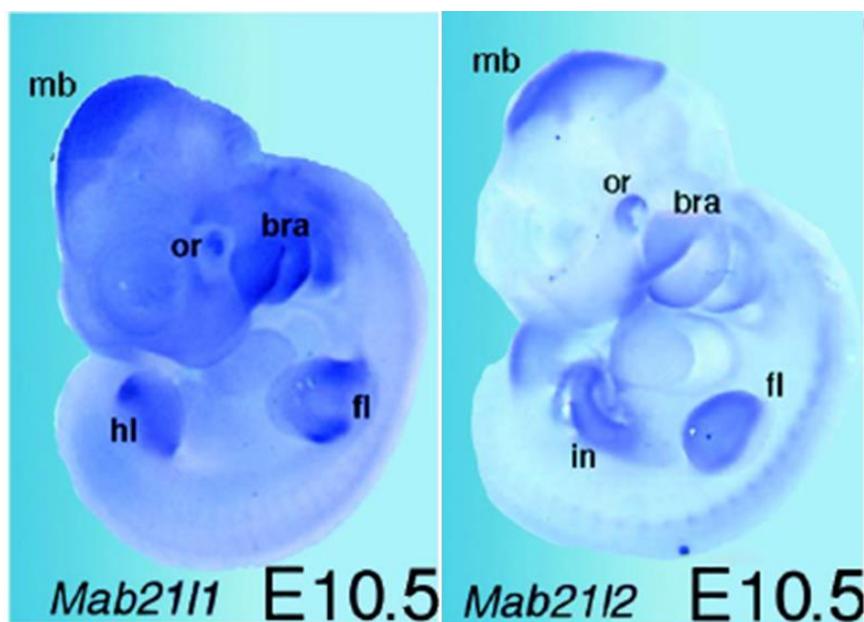


Figure 15 : Expression différentielle de mab21l1 et mab21l2 chez la souris
mb, mésencéphale ; *bra*, arcs branchiaux; *hl*, bourgeon des membres postérieurs; *fl*, bourgeon des membres antérieurs; *or*, évidement optique (*optical recess*); *in*, intestin. Adapté de Mariani et al., 1999.

Les mutants murins homozygotes pour *mab21l1* présentent, à l'âge adulte, de petits yeux par rapport aux contrôles ainsi qu'un cristallin rudimentaire mais conservent d'après les auteurs une lamination normale de la rétine. Chez les embryons mutants, le cristallin est totalement absent de E10 à E16 (E, jour embryonnaire post fécondation), puis apparaît une

ébauche très primitive de cette structure. La malformation du cristallin semble consécutive à une diminution significative de la prolifération cellulaire couplée à une augmentation de l'apoptose, sans, semble t-il, de défaut de différenciation (Yamada et al., 2003). Il a été montré que *mab21l1* agirait de manière cellule autonome et que dans une cascade épistatique, ce dernier se situerait en aval de *Pax6*. Les mutants homozygotes *mab21l1* présentent également de petites glandes préputiales et une infertilité touchant à la fois les mâles et les femelles. Mab21l1 jouerait donc un rôle clé dans la croissance et la formation du cristallin et des glandes préputiales. Il est intéressant de noter que bien que *mab21l1* soit exprimé dans de nombreux tissus, le mutant homozygote n'a de défauts que dans les tissus où *mab21l1* s'exprime seul, sans son alter ego *mab21l2*, ce qui suggère un phénomène de compensation entre les deux paralogues.

D'un point de vue fonctionnelle, une étude cristallographique récente (de Oliveira Mann et al., 2016) a permis de montrer que MAB21L1 présente une structure de nucleotidyltransférase (NTase) s'apparentant à la synthase GMP-AMP cyclique (cGAS pour *cyclic GMP-AMP Synthase*) (Kuchta et al., 2009; de Oliveira Mann et al., 2016). Les NTases sont des protéines capables de catalyser le transfert d'un nucléoside monophosphate provenant d'un donneur nucléoside triphosphate sur un accepteur hydroxyle. La protéine cGAS, structurellement très similaire aux protéines de la famille MAB-21, est, quant à elle, un senseur de l'ADN cytosolique dans le système immunitaire capable de déclencher une réponse immunitaire (Sun et al., 2013). MAB21L1 présente plus précisément une structure analogue à la conformation de cGAS inhibée, en absence de ligand. Et en effet, aucune activité de NTase n'a pu être enregistrée pour MAB21L1, bien que les auteurs émettent l'hypothèse qu'en se liant à un ligand spécifique (à ce jour encore inconnu et dont l'existence n'est pas assurée), la protéine pourrait changer de conformation et acquérir ainsi une activité de NTase. Avec les connaissances actuelles, l'hypothèse la plus probable est que MAB21L1 agit par interaction avec d'autres protéines (comme des facteurs de transcription ?) ou en se liant avec des ssRNA et miRNA pour réguler l'expression génique d'une manière encore obscure, comme il l'a été suggéré pour cGAS (Rainger et al., 2014; Takahashi et al., 2015; de Oliveira Mann et al., 2016; Kranzusch, 2019).

Chez l'Homme, des mutations dans la séquence codante de *MAB21L1* ont été associées à un syndrome Cerebello-Oculo-Facio-Genital (COFG) (Bruel et al., 2017; Rad et al., 2019). Dix patients provenant de cinq familles consanguines présentent une sévère hypoplasie du cervelet, des anomalies ophtalmiques, une agénésie du scrotum, des retards d'apprentissage et

une dysmorphisme cranio-facial (Figure 16). Les mutations associées sont en majorité des mutations non-sens, introduisant des codons STOP dans la protéine et provoquant très probablement la perte de MAB21L1, due au phénomène de dégradation d'ARNm porteurs de mutations non-sens (plus connue sous le nom anglais de *RNA decay*), à l'exception de l'une d'entre elle, une mutation faux-sens. Ces mutations se transmettent de manière autosomique récessive et apparaissent donc à l'état homozygote dans ces familles consanguines. Il est intéressant de noter que ce syndrome s'apparente en partie au phénotype observé chez le mutant homozygote murin décrit ci-dessus (Yamada et al., 2003), ce qui confirme l'importance de ce gène dans le développement des vertébrés.

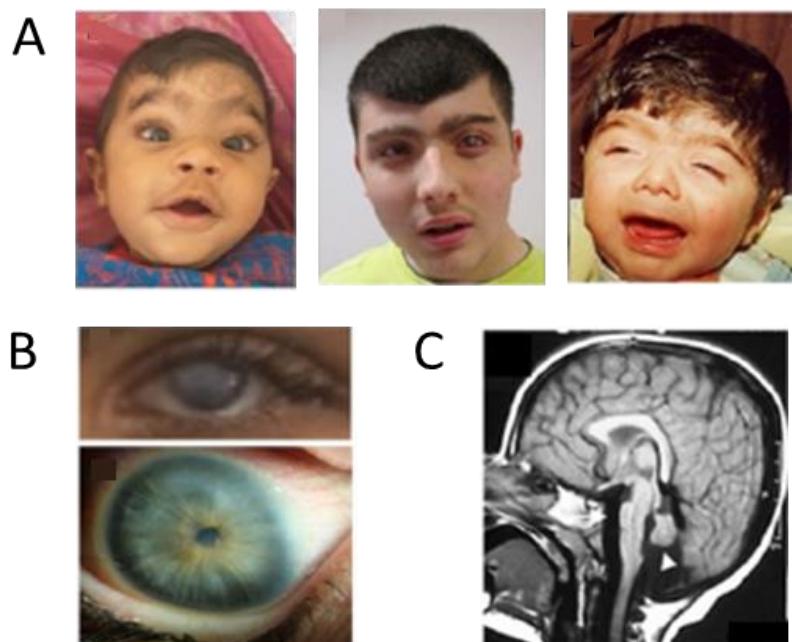


Figure 16 : Les signes cliniques du syndrome COFG associé à des mutations dans MAB21L1

(A) Photographies de trois individus de familles différentes présentant la même dysmorphie cranio-faciale. (B) Opacité de la cornée. (C) IRM montrant l'hypoplasie du cervelet (tête de flèche). Adapté de Rad et al, 2019.

Le lien entre les anomalies cranio-faciales observées chez les patients et la protéine MAB21L1 ont poussé les auteurs du papier décrivant le mutant murin à étudier le développement osseux chez ceux-ci. Et donc, plus récemment, une analyse complémentaire du phénotype de ces souris a mis en évidence des anomalies des os de la voûte crânienne (ou du latin *calvaria*) et une fontanelle ouverte chez les homozygotes *mab21l1^{-/-}*, révélant le rôle encore méconnu de ce gène dans la régulation de la prolifération et la différenciation des cellules du mésenchyme, et/ou dans l'équilibre entre formation et résorption osseuses (Nguyen et al., 2017).

3. Mab21l2

a) Expression au cours du développement des vertébrés

Chez le poisson-zèbre, l'expression de *mab21l2* est visible dès le stade du bourgeonnement (ou *bud stage*) au niveau du champ oculaire. Son domaine d'expression s'agrandit au cours de la somitogénèse pour couvrir la totalité du système visuel, englobant les yeux et le tectum au stade 13 somites (13s). A 24hpf, *mab21l2* est également exprimé dans le rhombencéphale, les arcs branchiaux et la moelle épinière (Figure 17) (Kudoh and Dawid, 2001). *Mab21l2* apparaît donc de manière concomitante à la formation du champ oculaire et se maintient dans la vésicule optique puis dans la cupule optique. L'expression de *mab21l2* chez le poisson-zèbre est très similaire à celle de la souris à peu d'exception près. Ainsi chez le poisson, l'expression commence dans le territoire présomptif de l'œil alors que chez la souris elle apparaît tout d'abord dans le primordium du mésencephale au niveau de la plaque neurale (Mariani et al., 1999). De plus, chez la souris, *mab21l2* est exprimé dans les somites mais n'est pas détecté dans le rhombencéphale, alors que chez le poisson-zèbre c'est la situation inverse (présence dans le rhombencéphale et aucune expression dans les somites).

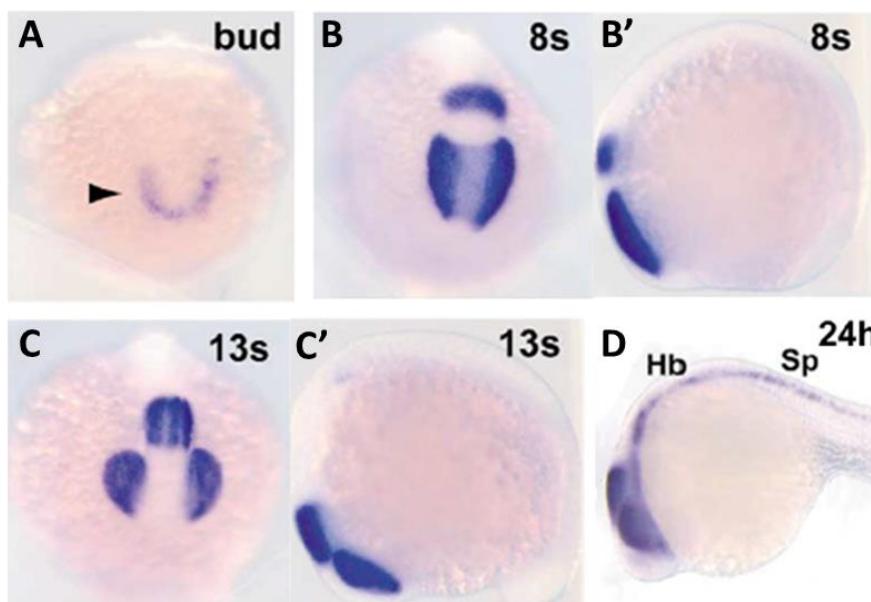


Figure 17 : Expression de *mab21l2* chez l'embryon de poisson zèbre

(A) la flèche pointe le territoire présomptif des yeux, (A,B,C) vues dorsales avec l'antérieur vers le bas, (B',C',D) vues latérales. *Hb*, rhombencéphale (*hindbrain*) ; *Sp*, moelle épinière (*spinal cord*). Adapté de Kudoh and Dawid, 2001.

En examinant l'expression de *mab21l2* dans l'œil, on s'aperçoit que chez la souris, le poulet et le poisson-zèbre, elle commence par couvrir un large domaine dans la vésicule optique puis se restreint à une expression dorsale et ventrale de la cupule optique pour finir par n'être plus exprimée que dans la GCL, l'INL et la CMZ aux stades plus tardifs (Figure 18) (Yamada et al., 2003; Deml et al., 2015; Sghari and Gunhaga, 2018).

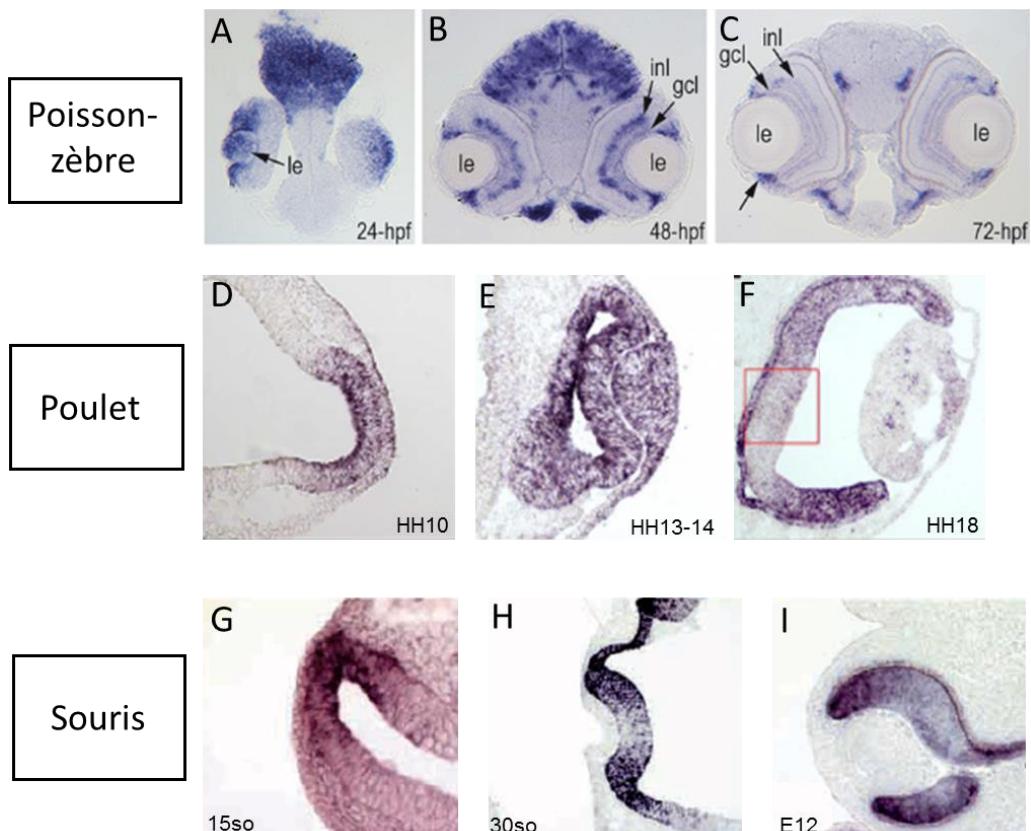


Figure 18 : Expression de *mab21l2* chez différentes espèces

Hybridation *in situ*. (A-C) sections d'embryons de poisson-zèbre, *le*, cristallin (*lens*); *inl*, couche nucléaire interne ; *gcl*, couche de cellules ganglionnaires. Adapté de Deml et al., 2015. (D-F) sections transversales d'embryons de poulets. Adapté de Sghari and Gunhaga, 2008. (G-I) sections transversales d'embryons de souris. Adapté de Yamada et al., 2003.

a) Conséquences de la perte de *mab21l2*

Des expériences de *knockdown* à l'aide de dsRNA (pour *double strand RNA* ou ARN double brin) chez le xénope ont montré que la perte de *Xmab21l2* entraînait une gastrulation incomplète couplée à un défaut de fermeture du tube neural. Les embryons déplétés en *Xmab21l2* présentent des anomalies de l'endoderme, une absence d'œil, et sont partiellement ventralisés et plus petits que les embryons contrôles (Lau et al., 2001). Les auteurs en ont donc conclu que *mab21l2* était requis pour la gastrulation et l'organogenèse du xénope. D'autres expériences de *knockdown* par dsRNA réalisés chez l'embryon de poulet ont mis en lumière les impacts de la suppression de *mab21l2* sur la rétine à différents stades du développement. Ainsi, une perte de *mab21l2* au stade où la vésicule optique se forme entraîne la formation d'une rétine rudimentaire, d'un cristallin de petite taille et d'une malformation du mésencéphale tandis qu'une perte de fonction plus tardive, au stade où la rétinogenèse se produit dans la cupule

optique, induit des colobomes et une hypoplasie du nerf optique due à des défauts d'extension des axones des RGCs (Sghari and Gunhaga, 2018). La diminution de mab21l2 à ce stade plus tardif a également permis de montrer son rôle dans la lamination de la rétine et en particulier dans la différenciation et le positionnement des cellules amacrines et horizontales. En absence de notre protéine d'intérêt, l'ONL et l'INL se distinguent difficilement l'une de l'autre et présentent une diminution du nombre global de ACs et HCs. Les auteurs mettent ainsi en évidence le rôle essentiel de mab21l2 dans le maintien de la prolifération des RPCs aux stades précoce, puis dans la différenciation de différents types cellulaires de la rétine lors de la rétinogénèse.

À l'instar de *mab21l1*, un mutant murin homozygote pour *mab21l2* a été décrit (Yamada et al., 2003). Contrairement au mutant *mab21l1*, la totalité des mutants *mab21l2^{-/-}* meurt in utero au stade E14.5, ce qui semble lié à l'extrusion des organes abdominaux et rend de ce fait impossible la compréhension des mécanismes cellulaires résultant de la perte de *mab21l2* à des stades plus tardifs. En effet, les mutants homozygotes ont une très fine paroi abdominale aux stades précoce ce qui engendre l'extrusion des organes abdominaux et une position anormale du cœur. Les mutants présentent également une absence de RPE et du cristallin ainsi qu'une malformation de la rétine (Yamada et al., 2003). Les défauts observés au niveau de la rétine s'expliquent en partie par une baisse de la prolifération des progéniteurs rétiniens (ou RPCs). Ce mutant murin montre en outre des défauts tant au niveau du cœur que du foie, tous dus à une diminution de la prolifération associée à une augmentation de la mort cellulaire (Saito et al., 2012).

Chez le poisson-zèbre, une lignée mutante porteuse d'une mutation non-sens entraînant une protéine tronquée au tiers de sa taille normale présente des défauts oculaires importants. Dès 24hpf, les embryons mutants homozygotes montrent une microptalmie accompagnée de colobomes plus ou moins sévères, un cristallin de petite taille à la structure désorganisée, et des défauts de la cornée. Les défauts du cristallin et de la cornée sont en partie dûs à un retard de morphogenèse de ces structures, une diminution de la prolifération et une augmentation de la mort cellulaire. Les colobomes résultent quant à eux de défauts de rupture des membranes basales qui est requise à la fermeture de la fissure choroïdienne, couplés à une augmentation de la mort cellulaire dans le pédoncule optique (Gath and Gross, 2019). Une autre lignée mutante nommée *mab21l2^{Q48Sfs*}*⁵, engendrant une protéine tronquée au dixième de sa taille présente elle aussi des défauts sévères de l'œil et une mortalité de 100% des embryons homozygotes passés un certain stade de développement. À 24hpf, les embryons homozygotes ont déjà des défauts oculaires comme une microptalmie associée à des colobomes, une absence complète ou une

réduction significative de la taille du cristallin, une rétine désorganisée, avec de plus des anomalies crano-faciales et un corps plus petit et courbe (Deml et al., 2015). Une augmentation de la mort cellulaire est également observée au niveau de la rétine, du cristallin, de la fissure optique et de certaines régions du cerveau, couplée pour la rétine à une diminution de la prolifération. Au niveau de la régulation de l'activité génique, l'expression de certains gènes essentiels au bon développement de l'œil est altérée chez les mutants : en effet, *pax6b* est inhibé dans la région ventro-temporale de la rétine et totalement absent au niveau du colobome/fissure choroïde, alors que l'expression de *pax2.1* est quant à elle maintenue anormalement dans le centre de la rétine et au niveau de la fissure optique à 48hpf ; enfin *foxe3* est inhibé dans le cristallin.

Ces différentes « sous-expressions » de *mab21l2* suggèrent une conservation fonctionnelle de la protéine au cours de l'évolution dans la mesure où des défauts similaires sont observés au niveau de l'œil de la souris, du poulet, du xénopé et du poisson-zèbre. Chez les quatre espèces de vertébrés décrites, la baisse ou la suppression de l'expression de *mab21l2* entraîne des défauts sévères de la formation de l'œil confirmant son rôle déterminant dans le développement du système visuel.

b) Voies de signalisations de *mab21l2*

Bien que *mab21l2* semble être un gène majeur du développement de l'œil, nous avons encore peu de connaissances sur les voies de signalisation dans lesquelles il pourrait être impliqué à ce niveau. Ainsi, comme vu ci-dessus, chez *C. Elegans*, *mab-21* agit en aval de la voie des TGF-β, amorcée chez le nématode par la protéine CET-1/DBL-1 (Morita et al., 1999; Suzuki et al., 1999). Afin d'étudier plus en détail le rapport entre *mab21l2* et cette voie de signalisation, des expériences de « double » surexpression de *mab21l2* et *BMP4* ont été réalisées chez le xénopé, sachant que *BMP4* est l'équivalent structurel de CET-1/DBL-1 chez les vertébrés. Ces expériences ont permis d'établir que X*mab21l2* agit de manière antagoniste à *BMP4* puisqu'il est capable de sauver les défauts associés à la surexpression de *BMP4* en engendrant la ventralisation des embryons alors que *BMP4* induit une dorsalisation. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont également montré une interaction directe entre X*mab21l2* et SMAD1 (pour *Small Mothers Against Decapentaplegic homolog 1*), le principal effecteur de la voie des BMPs. Cette interaction est plus forte en présence de *BMP4* mais n'en est pas dépendante. Cette action antagoniste pourrait s'effectuer par l'activité répresseur de *mab21l2*. Il a en effet été suggéré *in vitro* par le biais d'un essai luciférase que *Xmab12l2* est capable de réprimer l'activité génique de gènes cibles (Baldessari et al., 2004).

En outre, il a été montré que *mab21l2* est dans une relation épistatique avec *Rx3* et qu'il agit en aval de ce facteur de transcription dans la régulation de la survie des RPCs (Kennedy et al., 2004). Au cours du développement de l'œil, *mab21l2* se trouve également en aval de *pax6*, et ces deux gènes majeurs jouent de manière antagoniste leur rôle dans la formation du cristallin, de la rétine et du cerveau antérieur. En effet, on observe une augmentation de l'expression de *mab21l2* au niveau du cristallin chez les mutants hétérozygotes *pax6^{+/−}*. De plus, deux sites de liaisons reconnus par le facteur de transcription Pax6 ont été identifiés dans la région promotrice de *mab21l2*, confirmant l'hypothèse de relation épistatique entre ces deux gènes (Wolf et al., 2009).

c) Mutations chez l'Homme

Chez l'Homme, des études génomiques réalisées sur une collection de patients atteints de colobomes ont permis de révéler cinq mutations faux-sens dans le gène *MAB21L2* qui se sont avérées être responsables de plusieurs malformations développementales (Figure 20). Sur ces cinq mutations, quatre sont trouvées à l'état hétérozygote chez les patients et se situent toutes dans la même zone de la protéine, à proximité de la région N-terminale. En particulier, il est à noter que trois d'entre elles touchent le même acide aminé, l'arginine 51 (R51), bien qu'associées à des malformations différentes chez les patients. Cet acide aminé est conservé chez toutes les espèces de vertébrés, ce qui atteste de son importance fonctionnelle. La cinquième mutation affecte un acide aminé plus en aval de la protéine, à proximité de la région C-terminale de la protéine et a été trouvée à l'état homozygote chez les patients d'une même famille (Rainger et al., 2014; Deml et al., 2015; Horn et al., 2015). Les différentes mutations entraînent les défauts suivants, qui sont résumés dans le tableau de la Figure 19 :

- La mutation p.Glu49Lys transforme un acide glutamique en lysine et est associée à un dysmorphisme mineur du squelette, une macrocéphalie, une syndactylie partielle des mains et des pieds, des dislocations récurrentes de la rotule et une microptalmie colobomateuse des deux yeux.
- La mutation p.Arg51His transforme une arginine en histidine et est responsable de sévères malformations de l'œil incluant une microptalmie bilatérale et des colobomes couplés à un dysmorphisme facial.
- La mutation p.Arg51Cys, en transformant l'arginine 51 en cystéine, est la plus sévère des mutations décrites. Elle responsable d'une macrocéphalie chez certains patients, et associée à une très sévère dysplasie du squelette, en particulier des membres

inférieurs, des retards d'apprentissage ainsi qu'une anophthalmie bilatérale avec une hypoplasie du nerf optique.

- La mutation p.Arg51Gly transformant une arginine en glycine est associée à une dysplasie du squelette, un défaut du cristallin et l'apparition de colobomes toutefois sans microptalmie.
- Enfin, la mutation p.Arg247Gln transformant une arginine en glutamine est associée une dysmorphie faciale, une microptalmie bilatérale et des colobomes de sévérité variable.

Il est intéressant de noter que bien que la mutation p.Arg247Gln soit trouvée à l'état homozygote, elle provoque les défauts les moins sévères des cinq mutations décrites jusqu'ici. De plus, on remarque que tous les patients porteurs d'une mutation dans *MAB21L2* présentent non seulement des défauts oculaires mais également squelettiques, ce qui reflète les niveaux d'expression et donc l'importance de *mab21l2* dans l'œil et les bourgeons des membres chez les vertébrés. De façon intéressante, les malformations et signes cliniques observés chez les patients sont semblables aux défauts des mutants vertébrés présentant une perte totale de la protéine (cf. Chapitre 1 II.3.a).

Mutation	Colobomes	Microptalmie	Dysplasie du squelette	Retard d'apprentissage
pGlu49Lys	✓	✓	✓	
pArg51Gly	✓		✓	
pArg51Cys	Anophthalmie			✓
pArg51His	✓	✓	✓	
pArg247Gln	✓	✓	✓	

Figure 19 : Tableau récapitulatif des défauts associés à chaque mutation

Afin d'élucider les mécanismes pathogéniques causés par la mutation p.Arg51Gly, une lignée mutante a été conçue chez le poisson-zèbre : la lignée *mab21l2^{R51_F52del}* présentant une délétion en phase de deux acides aminés sensée phénotypier la mutation humaine (Deml et al., 2015). Contrairement à la lignée mutante *mab21l2^{Q48Sfs*5}* décrite précédemment, 13% des embryons homozygotes de cette lignée survivent à l'âge adulte, ce qui suggère un phénotype moins sévère. En effet, ces embryons présentent des défauts des mêmes structures que la lignée mutante *null* mais dont l'atteinte est moindre et l'apparition plus tardive. Par exemple, chez ce mutant, rétine apparaît désorganisée et l'œil globalement microptalmique mais le cristallin

semble normal. On observe également de sévères colobomes, un RPE discontinu, des défauts crano-faciaux et une malformation du cartilage des arcs branchiaux, le tout semblable aux phénotypes des patients porteurs d'une mutation dans *MAB21L2*. À l'instar de la lignée *mab21l2*^{Q48Sfs*5}, la lignée porteuse de la mutation humaine présente une augmentation de la mort cellulaire et une diminution de la prolifération dans l'œil. *Pax6b* et *foxe3* sont réprimés communément chez ces deux mutants mais l'augmentation de l'expression de *pax2.1* n'est pas retrouvée dans la lignée *mab21l2*^{R51_F52del}.

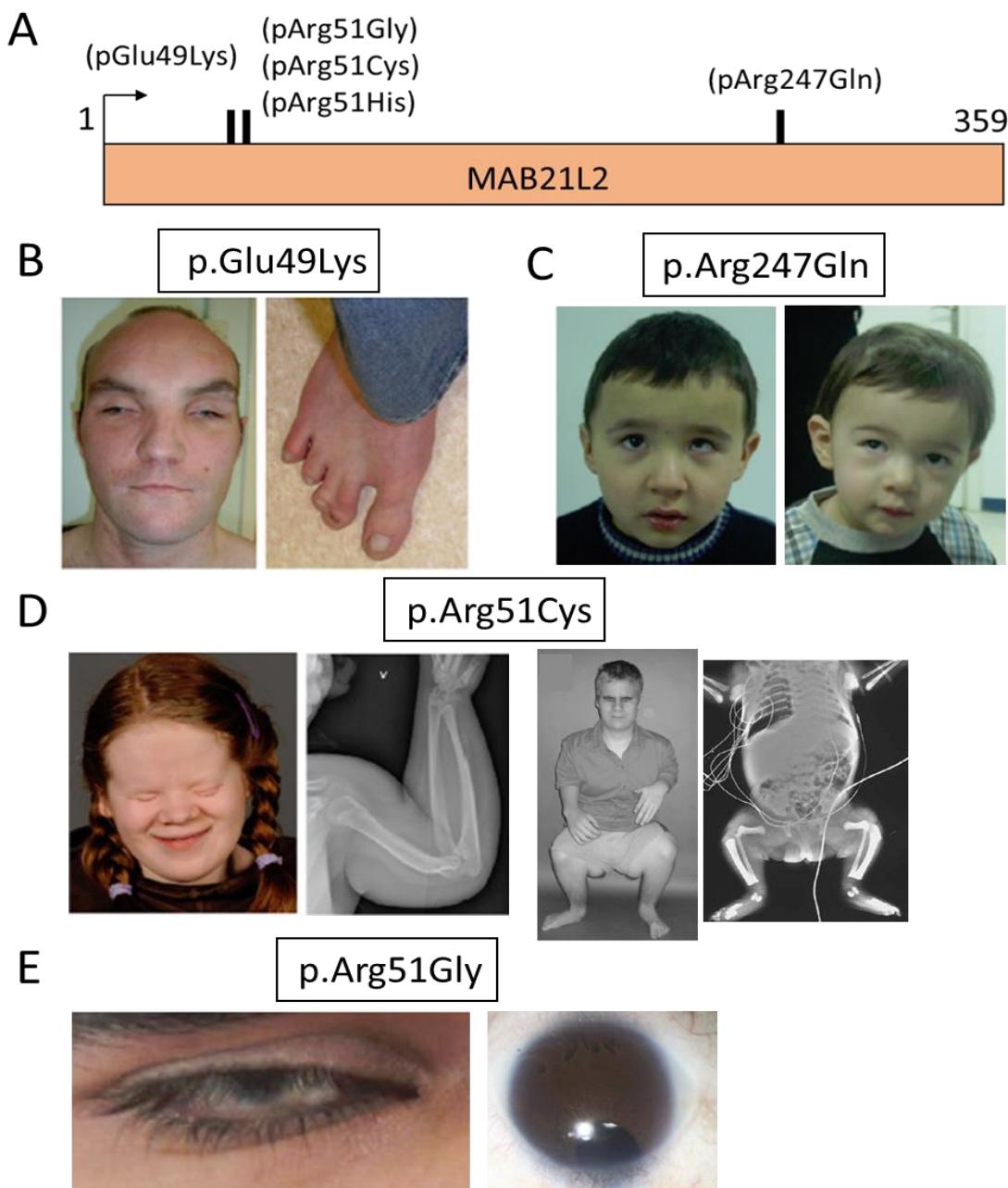


Figure 20 : Mutations de *MAB21L2* et phénotypes cliniques associés

(A) Représentation schématique de la protéine humaine et des différentes mutations observées. (B-E) Photographies de patients porteurs des différentes mutations. Adapté de Rainger et al, 2014.

Des analyses de modification de la mobilité électrophorétique sur la protéine sauvage et les protéines mutantes ont permis de montrer que si MAB21L2 était capable de se lier à l'ARN simple brin (ssRNA pour *single strand RNA*) en condition physiologique, cette capacité serait perdue dans le cas des protéines mutantes (Rainger et al., 2014). De par la forte ressemblance entre *mab21l1* et *mab21l2*, l'étude cristallographique du premier permet de penser que *mab21l2* possède également une structure de type NTase s'apparentant à cGAS. Lors de cette étude, les auteurs ont reproduit leur modèle structurel avec les mutations identifiées chez l'Homme afin d'étudier leur impact sur la stabilisation de la protéine. L'acide aminé 247 touché par la mutation p.Arg247Gln semble être requis pour le maintien d'un pont salin. Dans le cas de la protéine mutée, ce pont serait brisé ce qui entraînerait une diminution importante de la stabilité de MAB21L2. Les acides aminés 49 et 51, affectés par les quatre autres mutations, seraient quant à eux impliqués dans un réseau de ponts salins formant une boucle cruciale pour la stabilité de la structure. Les mutations de ces acides aminés entraîneraient donc également une baisse de la stabilité de la protéine. En outre, cette boucle constituerait potentiellement un site d'interaction protéine-protéine, ce qui expliquerait le pourquoi de la plus grande sévérité des défauts associés aux mutations de ces deux résidus. De plus, une baisse de la stabilité protéique pourrait également rendre compte de la diminution de l'interaction de MAB21L2 mutée avec les ssRNA lors des tests de modification de la mobilité électrophorétique.

III. Objectifs de la thèse

Mab21l2 est une protéine majeure de la mise en place du système visuel, dont des altérations de la fonction chez l'Homme conduisent à des anomalies sévères de la morphogenèse de l'œil et d'autres structures. Cependant, hormis sa localisation nucléaire et son homologie de structure avec certaines nucléotidyltransférases dont cGAS, peu de données informatives quant à sa fonction exacte ont été rapportées à ce jour. Il est probable que Mab21l2 soit impliquée dans la régulation de l'activité génique, entre autres de gènes effecteurs de la voie des BMP (Baldessari et al., 2004). De ce fait, il nous a donc semblé intéressant de caractériser les cascades de signalisation moléculaire situées en aval de Mab21l2 ainsi que ses potentiels partenaires d'interactions afin d'en savoir plus sur son activité cellulaire, et de clarifier sa fonction durant la formation du système visuel.

Afin d'élucider le rôle de Mab21l2, mon projet de thèse a donc été divisé en trois objectifs qui consistaient à :

(i) préciser la caractérisation des défauts associés à la perte de fonction de Mab21l2 par une double approche de *knockdown* par injection de morpholino ainsi que par l'établissement d'une lignée mutante CRISPR/Cas9. Si des malformations du système visuel avaient été décrites par le passé, au moment du démarrage de mon projet de thèse, aucune étude n'avait analysé de manière globale et détaillée les effets de la perte de fonction de Mab21l2 sur la lamination de la rétine et la croissance axonale du nerf optique. Mon travail de recherche a donc consisté en une analyse plus fine des phénotypes observés par certains types cellulaires de la rétine, dont les RGCs et les photorécepteurs. En parallèle, je me suis également attachée à étudier le développement du rhombencéphale, la région postérieure du cerveau, où Mab21l2 est exprimée chez le poisson-zèbre afin d'y déceler l'impact potentiel de la perte de Mab21l2. En effet, ma directrice de thèse, Jamilé Hazan, avait par le passé observé une sévère désorganisation de l'organisation métamérique du rhombencéphale à la suite d'une perte transitoire de Mab21l2 via l'injection d'un morpholino contre notre protéine d'intérêt.

(ii) Identifier d'éventuels gènes cibles de Mab21l2 par une analyse transcriptomique comparative. Afin de définir les cascades de signalisation dans lesquelles Mab21l2 pourrait agir, nous avons réalisé en collaboration avec le Centre National de Séquençage (Genoscope, Evry) une approche de type RNAseq sur des rétines contrôles, mutantes et morphantes à 25hpf ainsi que sur des têtes d'embryons contrôles, mutants et morphants à 10 somites. Cette stratégie était destinée à nous permettre d'évaluer l'/les impact(s) de la perte de fonction, totale (mutants) ou partielle (morphants) en comparaison avec la situation physiologique (embryons contrôles), comme de comparer les conséquences des deux approches de perte de fonction *knockdown* et *knockout*. Afin de déterminer les gènes activés ou réprimés par la perte de fonction de Mab21l2, nous avons choisi de réaliser nos analyses comparatives à deux stades embryonnaires distincts pour y adresser des problématiques différentes : le stade 10 somites, stade auquel la rétine amorce sa formation avec une prolifération accrue des RPCs, et le stade 25hpf à partir duquel les différents types cellulaires de la rétine, et en particulier les RGCs commencent à se différencier. Ces analyses comparatives à deux stades du développement plus ou moins précoce devraient nous permettre d'avoir une vue d'ensemble du rôle de Mab21l2 dans des processus aussi distincts que l'équilibre prolifération/différenciation ou la croissance axonale des RGCs vers leurs cibles tectales. Et enfin,

(iii) caractériser d'éventuels partenaires d'interaction de Mab21l2 par une approche ciblée de type gène candidat couplée à une validation biochimique avec des expériences de co-immunoprecipitation. La base de données String mentionne ainsi que Mab21l2 pourrait interagir physiquement avec des facteurs de transcription connus pour leur rôle déterminant tant

dans le développement du système visuel que dans celui du cerveau postérieur, comme les membres de la famille MEIS et PBX (Figure 21). Afin de vérifier ces interactions et d'en découvrir de nouvelles, des expériences de co-immunoprécipitation sont en cours. L'identification de partenaires de Mab21l2 devait également nous permettre de mieux cerner sa fonction au sein des neurones de la rétine, voire du cerveau postérieur.

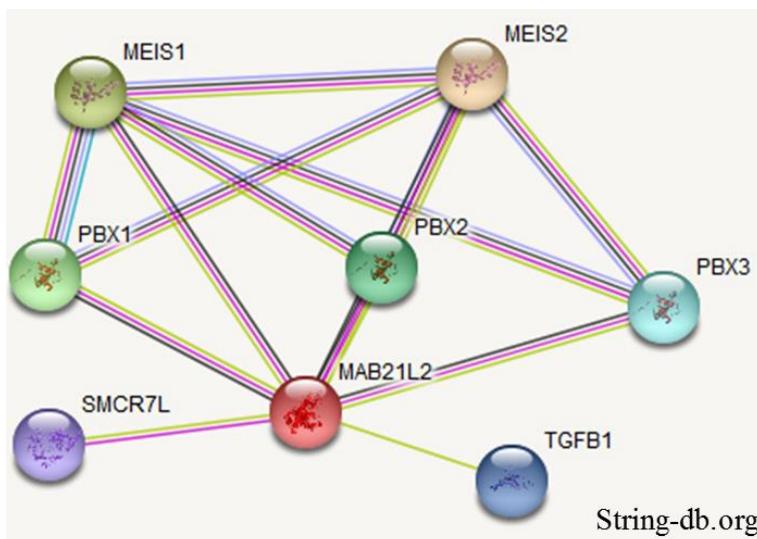


Figure 21 : Potentiels partenaires d'interaction de Mab21l2

Schéma représentant les interactions physiques possibles entre Mab21l2 et des protéines partenaires, d'après la base de données String.

Chapitre 2 :

Matériels et

méthodes

Entretien des poissons

Les embryons de poisson-zèbre (*Danio Rerio*) sont récupérés à partir des pontes de lignées sauvage ou transgéniques comme Tg(*ath5*:GFP), Tg(*islet1*:GFP) et Tg(*olig2*:GFP) qui expriment respectivement la protéine fluorescente verte (GFP) dans les neurones RGCs (Masai et al., 2003), les neurones moteurs crâniens et spinaux (Higashijima et al., 2000) et un mélange spécifique de neurones et d'oligodendrocytes (Shin et al., 2003; Park et al., 2004) ainsi qu'à partir de la lignée mutante CRISPR/CAS9 *mab21l2*^{32*} nouvellement créée. Après fécondation, tous les embryons ont été maintenus dans un milieu E3 (5mM NaCl; 0.17mM KCl; 0.33mM CaCl₂; 0.33mM MgSO₄; 0.00001% bleu de méthylène) à 28°C. Nous avons évalué leur âge/stade de développement à partir du nombre d'heures écoulées post-fécondation et de leur morphologie, comme décrit par Kimmel et al. (1995). Afin d'éviter la pigmentation de l'épiderme, 0.2mM phenyl-2-tiourea (PTU, Sigma) ont été ajoutés au milieu E3 après 24hpf. Toutes nos expérimentations ont été réalisées en accord avec la directive européenne 210/63/EU sur la protection des animaux utilisés à des fins de recherche scientifique et le "Décret 2013–118". La plateforme aquatique a été approuvée par le service pour la protection et la santé des animaux avec le numéro de validation A-75-05-25.

Génération de lignée mutante

Nous avons développé la lignée mutante *mab21l2*^{32*} dans notre laboratoire avec la méthode CRISPR/Cas9 et le sgRNA ciblant une région proche du codon ATG (sgRNA155: 5'-TAATACGACTCACTATAGGAAGATGCCAGGCGCGCAAAGGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'). L'ARN guide a été synthétisé avec le kit de transcription Megascript T7 (Ambion) et purifié avec le Mini kit RNAeasy (QIAGEN). L'ARNm de la Cas9 a été transcrit avec le kit mMessage mMachine T7 (Life Technologies), suivi d'une réaction par la DNase-I polyA-tailing (créant une queue poly-A). Des embryons sauvages ont été injectés au stade 1 cellule avec 1nl d'une solution contenant 1µl de la protéine Cas9 à 30µM et 5µl de sgRNA155 à 200ng/µl. Pour tester l'efficacité du sgRNA, l'ADN génomique a été isolé à partir de huit embryons et amplifié par PCR avec la Taq DNA Polymerase (Invitrogen) en utilisant des amorces encadrant la région ciblée par le CRISPR (FOR: 5'-GTCGCACTGTCTGGATCCA-3'; REV: 5'-GTTGAACACCCCCATCTGGT-3'). Dans ces conditions, 90% des embryons injectés avec le sgRNA155 ont été identifiés comme mutants. Des fondateurs ont été croisés avec des poissons sauvages et leur descendance F1 fut criblée pour des mutations de décalage de cadre par PCR et séquençage Sanger. Un poisson fondateur possédant un codon STOP à l'acide aminé 32 fut sélectionné et croisé avec des sauvages afin de créer la lignée mutante

mab21l2^{32*}. Par la suite, les mutants furent identifiés par une approche dCAPS (Hodgens et al., 2017). Des amorces ont été créées pour identifier la mutation au locus *mab21l2*^{32*} via l'outil indCAPS (FOR : 5'-CAACGAAAGATGCCAGGCTGGC-3' et la même REV que précédemment). Le produit de PCR est alors digéré par l'enzyme de restriction MscI (NEB) et les digestions sont analysées par électrophorèse sur un gel à 2% d'agarose. Les porteurs hétérozygotes de l'allèle mutant (*mab21l2*^{32*/+}) qui présentent deux bandes au lieu d'une, sont ensuite croisés entre eux afin d'obtenir des larves mutantes homozygotes (*mab21l2*^{32*/mab21l2}^{32*}). Les poissons *mab21l2*^{32*/+} ont également été croisés avec les lignées Tg(*atoh5*:GFP) et Tg(*islet1*:GFP) afin de faciliter les analyses.

Injections de morpholino

Nous avons utilisé des morpholinos (MO pour *Morpholino Oligonucleotide*) ciblant le site d'initiation de la traduction chez le poisson-zèbre de l'ARNm de *mab21l2* (MO^{*Mab21l2*}) et *mab21l21* (MO^{*mab21l1*}), synthétisés par GeneTools (Philomath, USA) :

- MO^{*Mab21l2*}, 5'-CTGTAGACCGGAGTTTCGCAGTACG-3'
- MO^{*mab21l1*}, 5'-GCGATCATATTGGACAGAGATCC-3'

Les MO sont resuspendus puis dilués dans de l'eau déionisée et injectés au stade deux cellules avec 2pmol de MO^{*Mab21l2*} et 1,5pmol de MO^{*mab21l1*} par embryon. Les embryons injectés avec MO^{*Mab21l2*} seront par la suite cités comme morphants ou L2 MO. Les co-injections avec le morpholino contre p53 : MO^{p53}, 5'-GCGCCATTGCTTGCAAGAATTG-3' ont été réalisées avec une dose de MO^{p53} 1,5x supérieure à l'autre morpholino selon les recommandations de la littérature (Robu et al., 2007).

Immunohistochimie sur embryons entiers et sur coupes

Les embryons de poisson-zèbre ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 4% (PFA) dilué dans du PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) pendant 2h à température ambiante (RT pour *Room Temperature*), puis lavés à trois reprises dans du PBS-T 1% (1% Triton X-100 dans du PBS 1X) pendant 10 min et perméabilisés dans une solution de trypsine à 0.25% dans du PBS 1X à 25°C. Cette étape a été suivie de quatre lavages de 5 min dans du PBS-T 1% puis les embryons ont subi une étape de blocage des sites non spécifiques pendant 1.5 heure à RT dans du PBS-T 1% supplémenté avec du sérum normal de chèvre (NGS) à 10%. Les embryons sont ensuite incubés sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivant : GFP (dilution 1/1,000, Invitrogen), ZPR1 (dilution 1/150, ZIRC) et Active-caspase 3 (dilution 1/400, R&D systems). Le jour suivant, les embryons sont lavés à au moins 5 reprises dans du PBS-T 1% et incubés

sur la nuit à 4°C avec les anticorps secondaires (Alexa-488 conjugué chèvre anti-souris ou chèvre anti-lapin et Alexa-555 conjugué chèvre anti-souris ou chèvre anti-lapin à une dilution de 1:1000; Molecular Probes). Le troisième jour, les embryons sont lavés dans du PBS-T 1% pour au moins 2 heures puis conservés dans du glycérol à 90% jusqu'à leur observation au microscope.

Pour les coupes, les embryons ont été fixés dans du PFA à 4% sur la nuit à 4°C, lavés 3 fois dans du PBS-T 1% et incubés sur la nuit à 4°C dans du sucre à 30%. Ils ont ensuite été congelés dans de l'OCT (Leica Biosystems) à -60°C et coupés en tranches de 14- μ m au cryostat. Les tranches furent collectées sur des lames et séchées à RT pendant au moins 1 heure. Les lames sont ensuite réhydratées pendant 45 min à RT et lavées 2 fois dans du PBS. Elles sont par la suite « bloquées » dans du PBS-T 0.1% supplémenté avec du NGS à 10% pendant 1 heure à RT dans une chambre humide, puis incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants : ZPR1 (à 1:200) et GFP (à 1:1000). Le jour suivant, les lames sont lavées 4 fois dans du PBS-T 0.1% pendant 10 min et incubées pendant 2 heures à RT dans le noir avec les anticorps secondaires : Alexa-555 conjugué chèvre anti-souris et Alexa-488 conjugué chèvre anti-lapin (tous les deux à 1:1000; Molecular Probes). Les lames sont ensuite lavées 4 fois dans du PBS-T 0.1% pendant 10 min et montées dans du Vectashield contenant du DAPI (CliniSciences).

Les photos sont acquises à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé d'un module Apotome (Zeiss, Axiovert 200M), d'un objectif x20 (NA 0.5), et d'un appareil photo AxioCamMRm (Zeiss) avec le logiciel Axiovision (Zeiss). Le logiciel ImageJ (NIH) fut utilisé pour analyser les acquisitions. Pour les acquis en immuno-histochimie sur embryons entiers, chaque image correspond à une projection de plusieurs tranches de 2 μ m. Au moins 30 embryons ont été regroupés issus de trois expériences indépendantes par condition. Pour les coupes, chaque image correspond à une seule photographie d'une tranche de 14 μ m et au moins 10 larves sur deux expériences indépendantes ont été analysées pour chaque condition.

Hybridation *in situ* sur embryons entiers

Pour étudier l'expression de *mab21l2*, des fragments d'ADNc ont été rétro-transcrits et amplifiés par PCR avec le système SuperScript III One-Step RT-PCR couplé à la Taq Platinum® haute fidélité (ThermoFisher Scientifique), à partir d'ARN totaux extraits d'embryons de poisson-zèbre à 24hpf, en suivant les instructions du fabricant.

Les amores antisens d'ARN marquées avec la digoxigénine ont été synthétisées à partir de produits purifiés des RT-PCRs avec la polymérase ARN T3 (Promega) selon les instructions

du fournisseur. Pour mab21l2, l'amorce suivante a été utilisée : Forward 5’AATTGTAATACGACTCACTATAGGGCTCTAAAGAGTGCTACTCATTGA CG 3’.

Les sondes *krox20*, *pax2.1*, *pax6*, *hoxb1a*, *hoxb1b*, *hoxb2*, *hoxb3*, *hoxb4a*, *hoxb5a*, *hoxb6*, *hoxb7a*, *hoxb8b*, *hoxb9a*, *fgf8*, *fgf3*, *mariposa/foxb1a*, *valentino/mafb* et *meis1.1*, dont les plasmides recombinants contenant tout ou partie de l’ADNc ont été récupérés de Christine Vesque, de l’équipe de Sylvie Schneider-Maunoury (Biologie du Développement, IBPS) ont été synthétisées à partir de plasmides linéarisés avec la polymérase ARN T3, T7 ou SP6 (Promega).

Les expériences d’hybridations *in situ* ont été réalisées selon une procédure standard décrite par Macdonald et al., 1994. Les images en résultant ont été acquises sur une loupe binoculaire combinée à une camera à haute définition (Leica). Les photographies ont été modifiées pour la luminosité et le contraste avec le logiciel Image J.

Analyses statistiques

Toutes les données (à l’exception des coupes) ont été obtenues à partir d’au moins trois expériences indépendantes et sont présentées comme des moyennes \pm SEM. La significativité statistique des données a été évaluée en utilisant le two-tailed t-test paramétrique non pairé ou le t-test Mann–Whitney non paramétrique lors de la comparaison de deux groupes assumant respectivement une distribution Gaussienne ou non-Gaussienne. Cette distribution fut testée avec le test de normalité D’Agostino et Pearson. Le test de Chi-2 et le test exact de Fisher pour les plus petits échantillons ont été utilisés pour comparer la distribution de deux groupes. Toutes les analyses statistiques furent réalisées avec Prism 5.0 (logiciel GraphPad, San Diego, CA). Les valeurs de P (ou *P*-values) inférieures à 0,05 furent considérées comme significatives.

Préparation des ARNs en vue du séquençage transcriptomique par RNAseq

Les ARNs ont été extraits à partir d’une vingtaine de têtes d’embryons en suivant le protocol de De Jong et al., 2010. Pour chaque échantillon, 500 ng d’ARNs ont été utilisés pour réaliser des collections de transcrits pour chaque point. Le kit Truseq Stranded mRNA (Illumina) a permis de développer des banques d’ADNc par rétrotranscription à l’aide d’amorces de type aléatoire, après avoir éliminé les ARN ribosomiques, selon les instructions du fabricant. Les banques ont été par la suite séquencées sur un Illumina Hi-seq 4000 à hauteur d’un total d’environ 5 M de reads par point analysé, en chargeant 12 échantillons sur une demi-piste et en séquençant en *pair-end* (150pb dans le sens *forward* et 150 dans le sens *reverse*).

Analyse des données du séquençage d'ARN (ou RNA-seq)

L'analyse des données de RNA-Seq a été faite par la société GenoSplice. Le séquençage, la qualité des données, la répartition des reads (lecture/séquence) et l'estimation de la taille des inserts ont été réalisés grâce aux logiciels FastQC, Picard-Tools, Samtools et rseqc. Les reads ont été cartographiés sur l'assemblage de la séquence génomique du poisson-zèbre (version 98 sur Ensembl du Sanger Centre) par STARv2.4.0 (Dobin et al., 2013). L'étude de la régulation de l'expression génique entre les différents échantillons a été réalisée comme décrit précédemment (Noli et al., 2015) : les séquences s'alignant sur chaque gène présent dans la dernière version de la banque de données génomiques du poisson-zèbre ont été dénombrées. A partir de ces comptages de reads (séquences), la normalisation et l'expression génique différentielle ont été estimés à l'aide de DESeq2 (Love et al., 2014) sur R (v.3.2.5). Seuls les gènes exprimés dans au moins une des deux conditions expérimentales comparées ont été pris en considération. Les gènes ont été inclus dans l'analyse si leur valeur de rpkm (i.e., *reads per kilobase of transcript per million mapped reads*) était supérieure à 75% de la valeur de rpkm obtenue en bruit de fond à partir des régions intergéniques. Les résultats furent considérés statistiquement significatifs pour des p-values non corrigées $\leq 0,05$ et une augmentation ou diminution de l'expression d'un taux (i.e., *fold-change*) $\geq 1,5$.

Analyse non supervisée

Le regroupement (ou *clustering*) et les représentations graphiques des données (ou *heatmaps*) ont été réalisés avec les fonctions “dist” et “hclust” dans R, avec la distance Euclidienne et le coefficient d'agglomération de la méthode de Ward.

Analyse des voies de signalisations/Gene Ontology (GO) et des facteurs de transcription

L'analyse des enrichissements en termes de GO et des voies de signalisations KEGG et REACTOME a été réalisée en utilisant l'outil d'annotation fonctionnelle DAVID (v6.8). Les termes GO et les voies de signalisation furent considérés comme enrichis si le taux d'enrichissement était $\geq 2,0$, la p-value non corrigée $\leq 0,05$ et un minimum de gènes régulés dans les voies/termes GO $\geq 2,0$. L'analyse fut réalisée trois fois, en utilisant (i) tous les gènes régulés, (ii) seulement les gènes régulés positivement ou (iii) seulement les gènes réprimés. Ces trois analyses ont été mixées afin d'obtenir une seule liste de résultats. Les mêmes seuils et méthodes furent utilisés pour l'analyse des termes GO et celle des voies de signalisation.

Chapitre 3 :

Résultats et discussion

I. Rôle de Mab21l2 dans le système visuel

1. Expression de *mab21l2*

Avant de tenter de préciser la fonction de la protéine mab21l2, j'ai souhaité vérifier tout d'abord son patron d'expression dans les embryons de poissons-zèbre. *Mab21l2* apparaît très largement exprimé dans le champ oculaire et le mésencéphale à 18 somites (Figure 22A). À 24hpf, on l'observe également dans la moelle épinière et le rhombencéphale, plus précisément dans la région des arcs branchiaux (ou pharyngés) tandis que son expression dans la rétine est plus restreinte qu'à 18 somites (Figure 22B et C). À 48hpf, son expression dans le rhombencéphale est plus importante et de manière intéressante, au niveau de l'œil, il est plus particulièrement exprimé au niveau de la fissure optique (Figure 22C et E). À 72hpf, son expression dans la rétine s'affaiblit et il n'est plus guère visible qu'au niveau de l'INL et de la GCL (Figure 22F). L'ensemble de ces résultats est conforme à la littérature existante (Kudoh and Dawid, 2001; Deml et al., 2015).

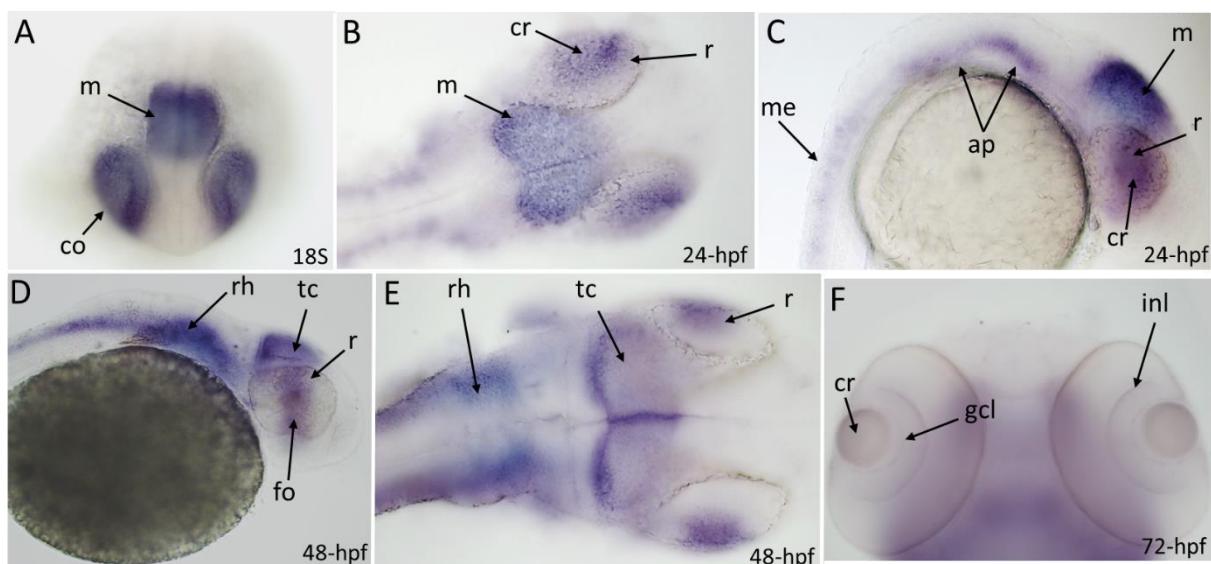


Figure 22 : Vérification du motif d'expression de *Mab21l2*

(A-F) Hybridation *in situ* sur embryons entiers de 18 somites (S) à 72hpf. *m*, mésencéphale ; *co*, champ oculaire ; *cr*, cristallin ; *r*, rétine ; *me*, moelle épinière ; *ap*, région des arcs pharyngés ; *rh*, rhombencéphale ; *tc*, tectum ; *fo*, fissure optique ; *gcl*, couche de cellules ganglionnaires ; *inl*, couche interne nucléaire. (A,B,E) vues dorsales, (C,D) vues latérales, (F) vue ventrale.

2. Les outils de la perte de fonction

Afin d'étudier les conséquences de pertes de fonction partielle ou totale de *Mab21l2*, j'ai utilisé deux approches différentes. La première consiste en un *knockdown* par injection d'un morpholino (oligonucléotide antisens de 25 bases), ciblant dans le cas présent le site d'initiation

de la traduction de Mab21l2, ce qui empêche la synthèse protéique par encombrement stérique. Les embryons injectés par le morpholino (ou MO) sont appelés des morphants par analogie lexicale aux mutants. Cette méthode a pour avantage d'être rapide et peu coûteuse, ce qui facilite les analyses préliminaires, cependant elle peut générer des résultats aspécifiques (Ekker and Larson, 2001; Gerety and Wilkinson, 2011; Eve et al., 2017; Joris et al., 2017; Gentsch et al., 2018), d'où la nécessité d'une validation par une deuxième approche. La deuxième approche que j'ai choisie a consisté à développer une lignée stable mutante par la technologie du CRISPR/Cas9. Cette lignée, que j'appellerai par la suite *mab21l2^{32*}*, présente une délétion de huit nucléotides résultant en une protéine tronquée de 32 acides aminés (a.a.), différente de la protéine sauvage sur les dix derniers acides aminés (la délétion ayant lieu après l'a.a 23 ; Figure 23). Etant donné la toute petite taille de la protéine mutante, mon mutant équivaut à un mutant dit « nul » consécutif un *knockout* du gène *mab21l2*. La mutation à l'origine de la lignée *mab21l2^{32*}* est létale à l'état homozygote : en effet 100% des embryons sont morts à 11 jours post-fécondation (dpf). L'obtention de maternels zygotiques est par conséquent impossible et j'ai donc conservé cette lignée à l'état hétérozygote (qui ne semble présenter aucun phénotype). J'ai donc sélectionné les embryons et larves homozygotes par génotypage à chaque ponte issus de deux parents hétérozygotes afin de les analyser. En outre, j'ai pu observer la concordance des lois de Mendel, puisque j'ai obtenu environ 25% d'homozygotes pour chaque croisement.

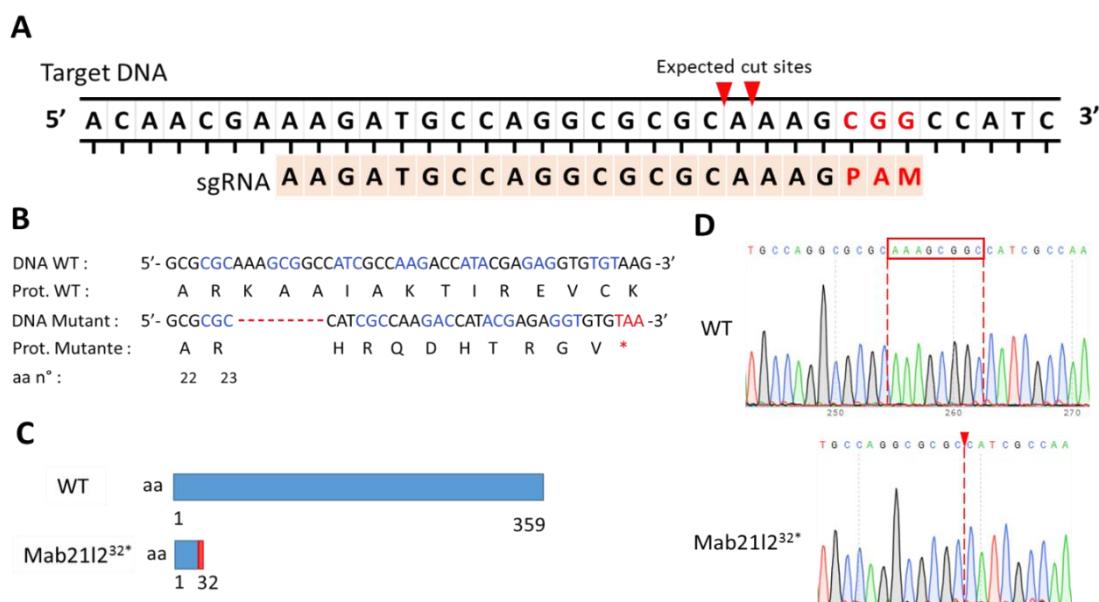


Figure 23 : Crédit d'une lignée mutante nulle *mab21l2*

(A) Schéma du locus *mab21l2* avec le site cible de l'ARN guide et la séquence PAM du CRISPR. (B) Séquences protéiques sauvage et mutante de Mab21l2. La lignée mutante présente un codon stop à l'acide aminé 33 et des modifications sur les dix derniers acides aminés. (C) schéma des protéines sauvage et mutante, la partie en rouge représentant la différence de séquence. (D) Chromatogrammes montrant la délétion de huit nucléotides dans la lignée mutante.

3. La perte de fonction partielle ou totale induit la formation de colobomes

Comme discuté précédemment, chez l'Homme, le gène *MAB21L2* est responsable de malformations oculaires dont des colobomes. Chez les morphants et les embryons *mab21l2^{32*}* homozygotes, j'ai également observé ce type de malformations (Figure 24) et ce, dès 24hpf. C'est d'ailleurs par ce critère morphologique que je distingue les embryons homozygotes *mab21l2^{32*}* des embryons hétérozygotes ou sauvages dans la descendance de deux parents hétérozygotes. Ces colobomes ou rétines béantes peuvent être de gravités variables et affecter les deux yeux de manière différente, ce qui est similaire à ce que l'on observe chez l'Homme et le poulet (Rainger et al., 2014; Deml et al., 2015; Horn et al., 2015; Sghari and Gunhaga, 2018). En dehors de ce phénotype, on peut noter également que tant les morphants que les mutants sont de taille légèrement inférieure à celle des sauvages, et que leur tête en particulier est significativement plus petite. Outre les colobomes, les yeux des morphants et des mutants homozygotes sont également plus petits que la normale : en effet, comparés aux embryons sauvages, les yeux des morphants sont en moyenne deux fois plus petits et ceux des mutants une fois et demie plus petits.

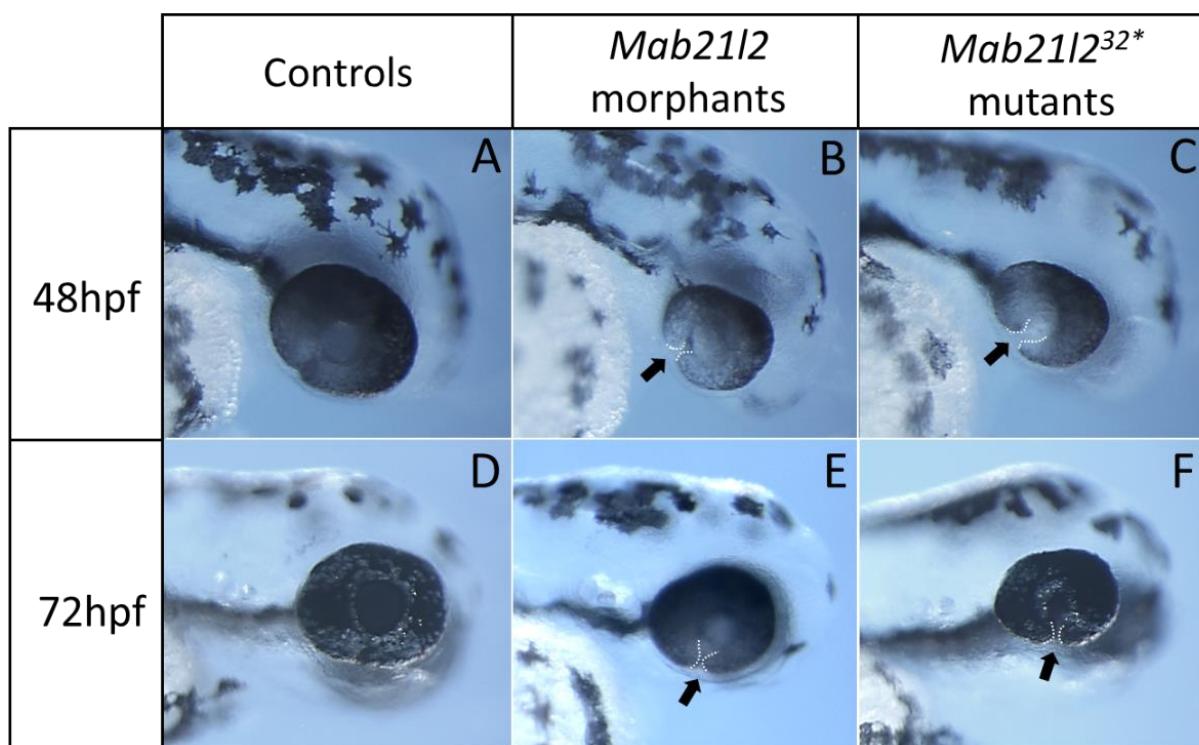


Figure 24 : L'absence de *mab21l2* entraîne la présence de colobomes

(A-F) Photographies des yeux de contrôles, morphants et mutants à 48hpf (panels du haut) et 72hpf (panels du bas). En B, C, E et F, les colobomes indiqués par une flèche noire sont délimités par des pointillés blancs pour une meilleure visibilité.

4. La perte de Mab21l2 chez les morphants engendre une expansion de Pax2 au détriment de Pax6

En raison des colobomes des mutants et des morphants, j'ai voulu tester si l'expression de certains gènes, dont les rôles dans la fermeture de la fissure choroïde avaient été établis dans divers modèles, serait affectée suite à la perte de Mab21l2. En particulier, ma directrice de thèse, Jamilé Hazan, avait, lors de travaux précédents, observé une augmentation de l'expression de *pax2* dans les rétines des embryons morphants *mab21l2* (Figure 25A). J'ai donc débuté mon analyse par l'examen de l'expression des gènes *pax2* et *pax6* par hybridation *in situ* dans les embryons morphants, sachant que des modifications de l'expression de ces deux gènes sont associées à l'apparition de colobomes (cf. Chapitre 1 I.1.a). Et j'ai pu confirmer que la perte partielle de Mab21l2 chez les morphants engendre à 24hpf une expansion de l'expression de *pax2.1* dans la partie ventrale de la rétine couplée à une diminution de l'expression de *pax6* (Figure 25B). Cette expérience suggère qu'il y aurait une expansion du pédoncule optique au détriment de la rétine neurale chez les morphants, ce qui participe à expliquer le défaut de fermeture de la fissure choroïde et l'apparition de colobomes.

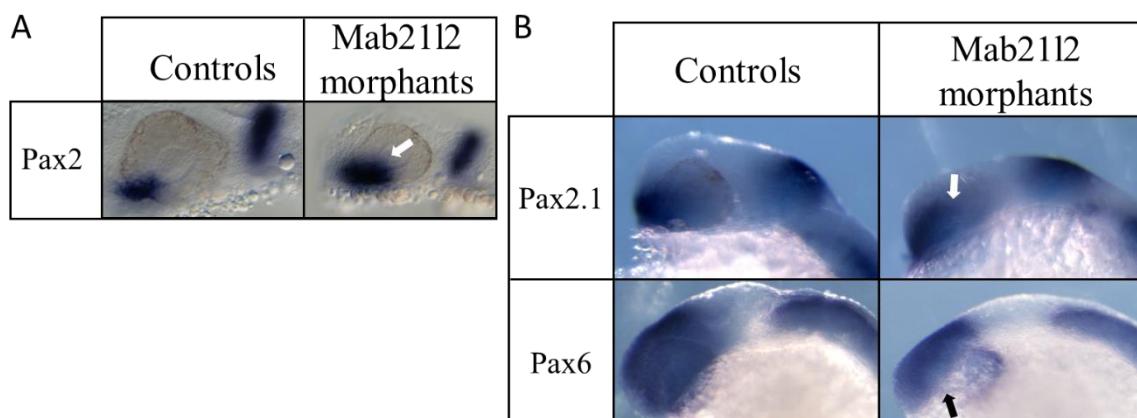


Figure 25 : La perte de Mab21l2 modifie l'expression de facteurs de transcriptions
(A) Vues latérales d'hybridation *in situ* avec une sonde *pax2* d'embryons contrôle (à gauche) et morphant (à droite) obtenus par J. Hazan dans son précédent laboratoire. (B) Vues latérales d'hybridation *in situ* d'embryons contrôles (à gauche) et morphants (à droite) au stade 24hpf que j'ai obtenus et qui montrent l'expression de *pax2.1* (panels du haut) et *pax6* (panels du bas) dans la rétine. Les flèches blanches indiquent l'expansion de *pax2.1* dans la partie ventrale de la rétine morphante et la flèche noire la diminution associée de l'expression de *pax6*.

5. La perte de fonction de Mab21l2 entraîne des défauts de trajectoire axonale des RGCs

Afin d'étudier la formation du système visuel dans son ensemble, et en particulier la croissance du nerf optique, j'ai utilisé la lignée transgénique Tg(*ath5:GFP*) qui exprime la GFP

(i.e., protéine fluorescente verte) dans les RGCs et leurs axones. Pour mes expériences de perte de fonction partielle (ou *knockdown*), j'ai directement injecté mon morpholino dans les embryons de cette lignée tandis que pour étudier l'impact de l'absence de la protéine sur le développement du nerf optique, j'ai au préalable croisé des poissons de cette lignée transgénique avec ceux de ma lignée mutante *mab21l2*^{32*} de façon à obtenir des embryons mutants ayant comme fond génétique Tg(*ath5*:GFP). De cette manière, j'ai pu observer qu'à 48hpf, stade auquel les axones des RGCs contrôles sont sortis de la rétine et se sont déjà croisés au chiasma optique (indiqué par une flèche blanche sur la Figure 26A et D), tant les morphants que les mutants présentent un grand nombre de défauts visibles sur ce fond génétique, comme une réduction du nombre de RGCs causant une hypoplasie du nerf optique, mais également des anomalies de la croissance axonale avec des défasciculations (pointées par des astérisques sur la Figure 25 B-C et E-F) et, dans les cas les plus sévères, une absence de chiasma. On peut également remarquer que les morphants semblent légèrement plus atteints que les mutants avec 60% d'entre eux présentant un phénotype très sévère (absence totale de chiasma) contre 40% des mutants (Figure 26G mais dans l'ensemble, mutants comme morphants présentent les mêmes défauts, ce qui confirme la pertinence de mes observations et valide ces résultats. La diminution du nombre de RGCs pourrait s'expliquer par (i) une augmentation importante de leur mort cellulaire, (ii) une diminution de la prolifération de leurs précurseurs ou encore (iii) par un défaut de différenciation/spécification des RPCs en RGCs. Mab21l2 serait donc potentiellement important pour la formation des RGCs et la croissance axonal à l'origine du nerf optique.

À 72hpf, stade larvaire auquel la majorité des axones des RGCs a atteint le toit optique ou tectum (i.e., leur cible finale dans le cerveau du téléosté), on observe que le phénotype sévère correspondant à une absence totale de chiasma n'est plus apparent que dans environ 10% des morphants et des mutants, ce qui suggérerait que ces défauts sont corrigés au cours du temps. Cependant, la vaste majorité des embryons présente toujours une hypoplasie du nerf optique et des défauts de trajectoire axonale des RGCs. Ces données indiquent que le rôle de Mab21l2 dans le développement du système visuel semble perdurer au cours des stades larvaires tardifs. Il est aussi intéressant de noter que les mutants sont, une fois de plus, moins sévèrement atteints que les morphants, attendu que 27% d'entre eux présentent un phénotype similaire aux contrôles (Figure 26H). En plus de confirmer que certains de ces défauts, comme l'inexistence du chiasma optique, peuvent être corrigés dans le temps, mes résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir également des phénomènes de compensation génique chez le mutant, qui « prendraient le relai » suite à l'absence de Mab21l2 afin d'assurer un développement tout au moins minimal

du nerf optique. Dans l'ensemble, l'analyse morphologique des mutants et morphants a révélé les mêmes défauts entre ces deux populations d'embryons, et seules les proportions de chaque anomalie varient de l'une à l'autre. Cette similitude entre perte de fonction partielle et totale nous permet de confirmer le rôle clé de Mab21l2 dans la formation du système visuel, et plus précisément pour cette étape de la caractérisation dans le développement des RGCs et la croissance axonale des trajectoires rétino-tectales, communément appelé le nerf optique.

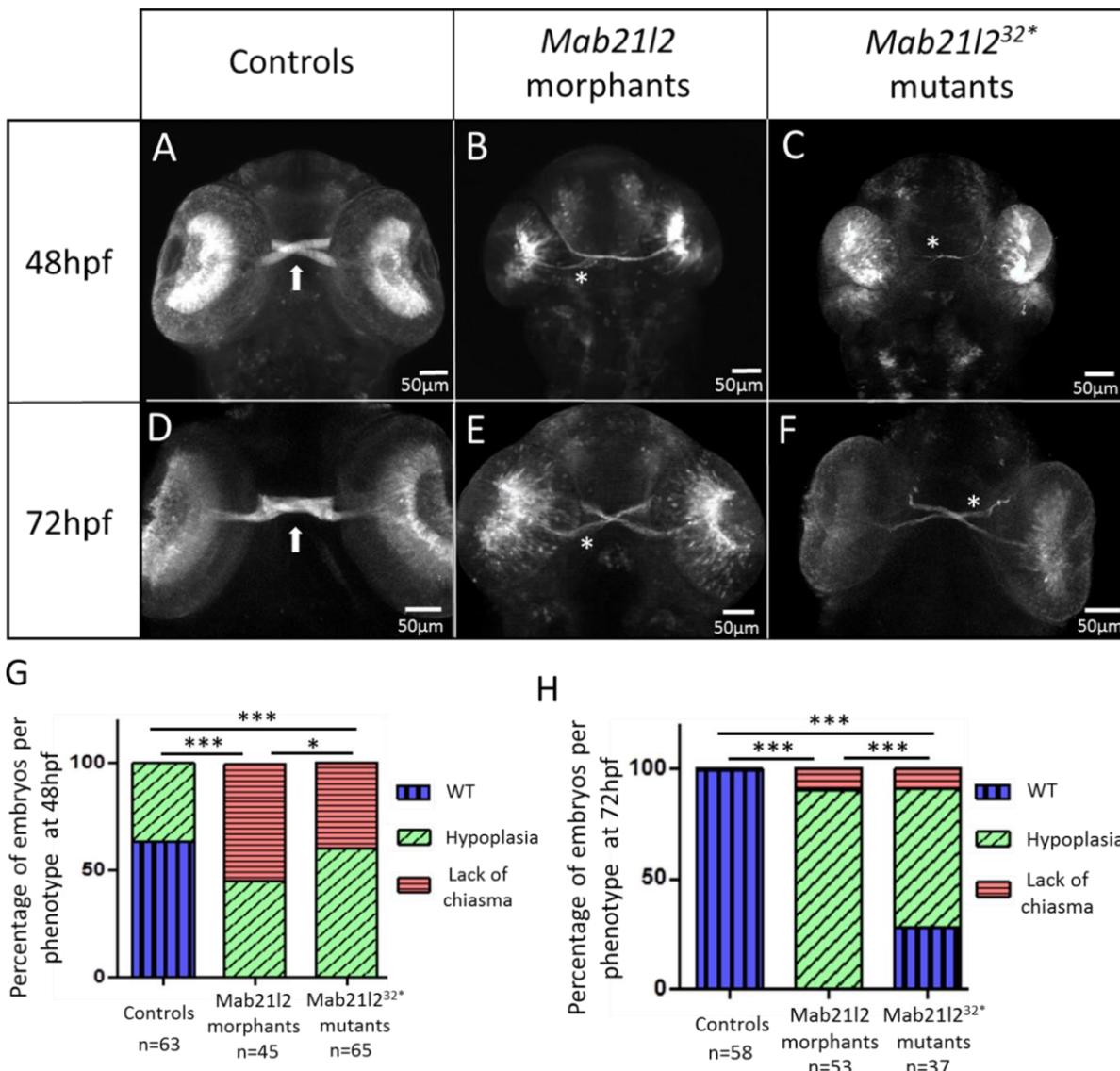


Figure 26 : La perte partielle ou totale de Mab21l2 engendre une croissance axonale anormale des RGCs

(A-F) Vues ventrales d'embryons sur fond génétique Tg(*ath5*:GFP) exprimant la GFP dans les RGCs à 48hpf (panels du haut) et 72hpf (panels du bas). (A,D) Les flèches blanches pointent le chiasma optique. (B,C,E,F) Les astérisques montrent la défasciculation/ou erreurs de guidage axonal du nerf optique. (G,H) Distribution des contrôles, morphants et mutants en fonction de leur phénotype sauvage (WT pour *wild type*, bleu), et du moins sévère (hypoplasie du nerf optique, vert) au très sévère (absence de chiasma, rouge) à 48hpf (G) et 72hpf (H). * p<0.05, *** p<0.001.

6. La perte de Mab21l2 entraîne également des défauts de formation des photorécepteurs

Afin d'étudier les conséquences de la diminution ou de la perte de Mab21l2 sur une autre population de cellules de la rétine, que sont les photorécepteurs, j'ai également réalisé des expériences en immunohistochimie avec un marqueur spécifique de ces cellules chez le poisson-zèbre : l'anticorps ZPR1. À l'issue de ce marquage, j'ai pu observer, chez les contrôles, dès 72hpf, la couche de photorécepteurs, composés d'un grand nombre de cellules réparties tout autour de la rétine (Figure 27A) alors que je ne pouvais détecter que quelques rares spots d'expression, de surcroît très localisés, chez les morphants et mutants au même stade larvaire (Figure 27B et C), où le marquage couvre en moyenne une zone trois fois moins étendue que chez les contrôles (Figure 27G). La perte de Mab21l2 engendre donc une diminution drastique du nombre de photorécepteurs à 72hpf.

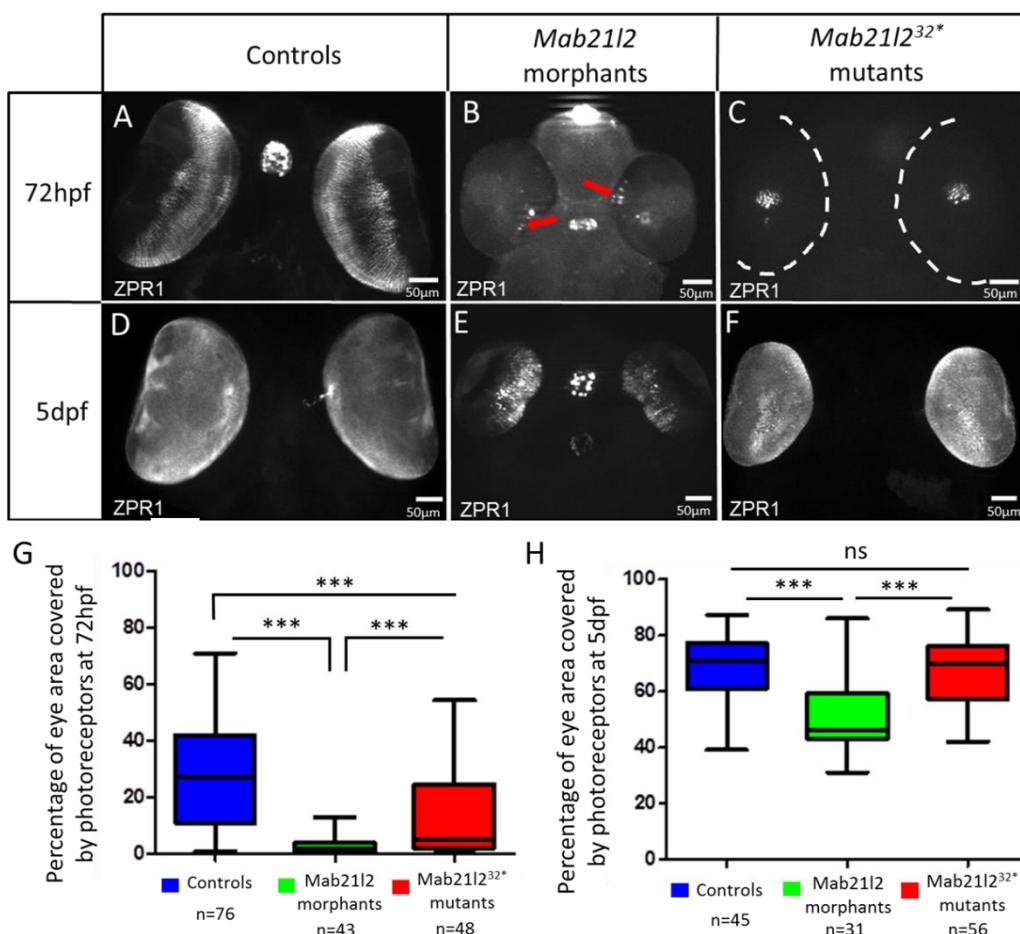


Figure 27 : La déplétion de Mab21l2 entraîne une baisse significative du nombre de photorécepteurs

(A-F) Vues ventrales d'immunohistochimie sur embryons entiers à 72hpf (panels du haut) et 5dpf (panels du bas) marquant les photorécepteurs à l'aide de l'anticorps ZPR1 (pointés par des flèches rouges en B). (C) Les pointillés délimitent l'aire de l'œil. (G,H) Quantifications du pourcentage de photorécepteurs recouvrant la surface de l'œil à 72hpf (G) et 5dpf (H). *** $p < 0.001$; ns, non significatif.

Cette diminution des photorécepteurs pourrait s'expliquer par plusieurs mécanismes : (i) elle serait la conséquence d'une augmentation majeure de l'apoptose ; (ii) Mab21l2 aurait un rôle direct dans la différenciation de ces cellules, (iii) sa perte engendrerait un défaut précoce de prolifération des RPCs qui affecterait le nombre de photorécepteurs comme celui de RGCs ou encore (iv) leur diminution pourrait être le résultat d'une mauvaise lamination de la rétine. En effet, dans la mesure où les photorécepteurs sont les derniers neurones de la rétine à se différencier, un positionnement incorrect des autres cellules de la rétine et/ou de leurs précurseurs pourrait perturber leur spécification. Cependant, à 5dpf, stade auquel les cellules de la rétine sont toutes différenciées et fonctionnelles, les mutants présentent une répartition quasi normale des photorécepteurs sur des yeux certes plus petits, mais dont la rétine est couverte sur presque toute sa surface de cellules photoréceptrices, à l'instar de ce que l'on observe chez les larves contrôles (Figure 27D et F). Ce n'est pas le cas des morphants qui, bien qu'ayant une proportion plus importante de photorécepteurs qu'aux stades plus précoces, présentent toujours une diminution significative du nombre global de ces cellules (Figure 27E et H). On peut ici se demander si les morphants ne présentent pas un retard de développement, assez classique pour les expériences de *knockdown*, comme le suggère la comparaison entre les photos d'une larve contrôle à 72hpf et d'un morphant à 5dpf (Figure 27A et E). Ainsi, à nouveau, mes résultats semblent indiquer que les mutants sont moins affectés par la perte totale de Mab21l2 que ne le sont les morphants par une perte partielle, et qu'ils ont globalement une meilleure capacité d'adaptation ou de restauration d'un phénotype normal puisque certaines anomalies sont compensées ou ne sont plus apparentes à des stades plus tardifs du développement. Cette diminution du nombre de photorécepteurs, m'a par la suite poussée à examiner la lamination des rétines morphantes et mutantes.

7. L'absence ou la diminution de Mab21l2 provoque des problèmes de lamination de la rétine

Afin de visualiser la lamination des rétines des larves contrôles, morphantes et mutantes, j'ai réalisé des sections de tête marquées avec différents anticorps sur un fond génétique Tg(*ath5:GFP*) à différents stades du développement. À 3dpf, en plus de confirmer la diminution de la taille de l'œil et la baisse drastique du nombre de photorécepteurs, j'ai également pu observer des anomalies de lamination de la rétine avec la présence de RGCs dans l'INL des morphants et des mutants, ce qui est tout à fait anormal à ce stade du développement (Figure 28B et C). Cette lamination serait semblable à celle observée chez des contrôles à des stades plus précoces, suggérant à nouveau un retard de développement chez les morphants comme

chez les mutants, bien que ceux-ci aient été datés sur des critères morphologiques et non sur des critères temporels. On remarque de plus que chez les mutants, ce défaut de lamination est également confirmé par la présence anormale de photorécepteurs dans la GCL (indiqués par l'astérisque sur la Figure 28C').

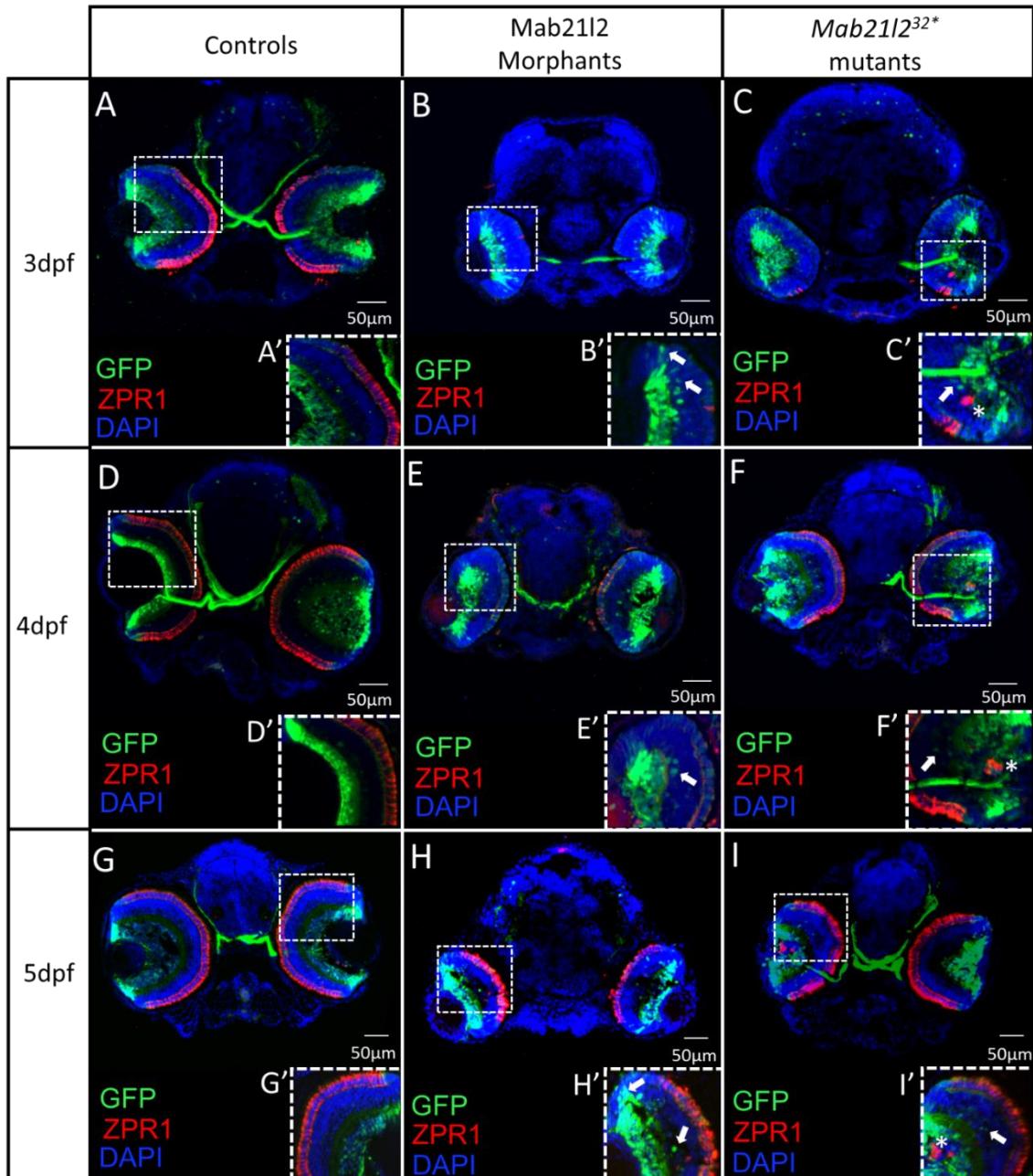


Figure 28 : Impact de la diminution ou de l'absence de *Mab21l2* sur la lamination de la rétine (A-I) Coupes transversales de têtes de larves contrôles (colonne de gauche), morphantes (colonne du milieu) et mutantes (colonne de droite) sur fond Tg(*ath5*:GFP) à 3dpf (A-C), 4dpf (D-F) et 5dpf (G-I). Les RGCs sont marqués en vert (i.e., GFP), les photorécepteurs en rouge (i.e., anticorps ZPR1) et les noyaux cellulaires en bleu (i.e., DAPI). Les inserts A'-I' sont des plus forts grossissements des régions en pointillé dans les panels A-I respectivement. Les flèches blanches pointent la présence anormale de RGCs dans la couche interne de la rétine tandis que les astérisques indiquent la présence anormale de photorécepteurs dans la couche ganglionnaire de la rétine.

À 4dpf, les mutants présentent cette fois un nombre « correct » de photorécepteurs dans l’ONL au contraire des morphants dont les trop rares spots de cellules photoréceptrices perdurent à ce stade (Figure 28E et F). Il semblerait donc que la restauration du nombre de photorécepteurs décrite précédemment (cf. I.6) surviendrait entre 3dpf et 4dpf et que leur diminution plus précoce serait probablement due à un retard de développement. Cependant, bien que le nombre de photorécepteurs semble « corrigé » à ce stade chez les mutants, la lamination de la rétine demeure anormale chez eux comme chez les morphants avec, à nouveau, la présence de RGCs dans l’INL et de photorécepteurs dans la GCL des mutants (Figure 28E’ et F’). Cette lamination incorrecte est par ailleurs toujours observable à 5dpf (Figure 28H’ et I’), ce qui tendrait à montrer que ces défauts de lamination sont définitifs et irréversibles, contrairement à ceux liés au développement des photorécepteurs chez les mutants (entre 3dpf et 4dpf). Le positionnement anormal de ces cellules (RGCs et photorécepteurs) pourraient s’expliquer de deux manières : (i) les progéniteurs auraient migré anormalement pour se retrouver dans la mauvaise couche de la rétine ou (ii) le processus même de différenciation de ces cellules ne serait pas passé correctement. Etant donné les précédents travaux impliquant Mab21l2 dans la détermination du destin cellulaire (Baird et al., 1991; Sghari and Gunhaga, 2018), cette deuxième hypothèse serait la plus probable.

Une autre observation m’a permis de favoriser l’hypothèse d’un défaut de différenciation. En effet, l’analyse des effets de la perte de Mab21l2 sur fond génétique Tg(*Islet1*:GFP), dont l’expression dans le rhombencéphale conduit à une étude détaillée du développement de cette structure (cf. Chapitre 3 II), a révélé la présence anormale de cellules qui exprimaient la GFP (et donc positives pour le marqueur *Islet1*) au stade 72hpf dans les rétines mutantes au niveau de la GCL et débordant dans certains cas sur l’INL (Figure 29). Les rétines contrôles et morphantes ne présentent jamais des cellules positives pour ce marqueur dans la rétine à ce stade tardif. Après une analyse plus approfondie à différents stades du développement, il semblerait que ces cellules apparaissent peu avant 60hpf et se maintiennent par la suite. De manière intéressante, *Islet1* est bien exprimé dans la rétine en condition physiologique et s’avérerait d’ailleurs être un facteur requis pour la différenciation des RGCs, ACs, BCs et HC (voir pour revue Bejarano-Escobar et al., 2015). Toutefois, la lignée transgénique Tg(*islet1*:GFP) ne permet normalement pas d’observer cette expression transitoire, ce qui est le cas tant chez les sauvages que chez les morphants. Est-il donc envisageable que l’expression d’*Islet1* soit modifiée (i.e., plus forte ou perdurant plus longtemps) chez les mutants de manière à permettre sa visualisation ? Son stade d’apparition concorde avec celui de la spécification des ACs et HC, mais est-il possible que la mutation

mab21l2^{32}* induise la différenciation anormale de ces cellules. Toutefois, le fait que ces positionnements ectopiques ne soient pas détectés chez les morphants demeure une source de questionnements. De manière générale, la perte de Mab21l2, qu'elle soit transitoire et partielle (par *knockdown*) ou permanente et totale (mutation), perturbe la lamination de la rétine et au vu du rôle des orthologues de Mab21l2 dans d'autres espèces, potentiellement via des défauts de différenciation.

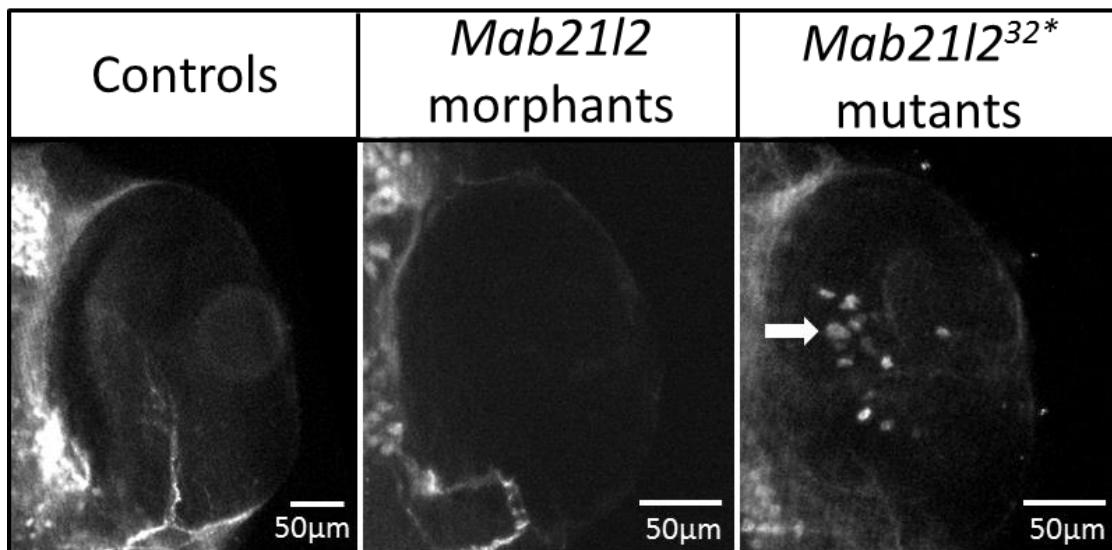


Figure 29 : Expression d'*Islet1* dans les rétines de larves contrôles, morphantes et mutantes

Vues ventrales d'yeux d'embryons contrôle (panel de gauche), morphant (panel du milieu) et mutant (panel de droite) au stade 72hpf sur fond génétique Tg(*islet1*:GFP). La flèche blanche indique les cellules exprimant *Islet1* dans la rétine mutante.

8. Conséquence de la perte de Mab21l2 sur la mort cellulaire

a) L'apoptose est augmentée uniquement chez les morphants

Dans le but d'étudier si la diminution du nombre de RGCs ou de photorécepteurs des embryons mutants et morphants est due à une augmentation de l'apoptose, j'ai utilisé l'anticorps anti-caspase 3 activée, qui marque les cellules apoptotiques, dans des expériences d'immunomarquage sur embryons entiers. J'ai ainsi observé une très forte augmentation du nombre de cellules en apoptose dans l'œil mais aussi plus globalement dans toute la tête chez les embryons morphants, et ce, tant à 48hpf que plus tardivement (Figure 30). Cependant, cette augmentation de l'apoptose n'apparaît pas chez les mutants, qui présentent un nombre similaire de cellules apoptotiques que celui des contrôles. L'apoptose induite via le facteur de transcription p53 étant l'un des premiers effets hors-cibles (pour *off-target*) de l'injection de

morpholinos (Robu et al., 2007), je me suis demandé si cette augmentation significative de l'apoptose était ou non spécifique de la perte de mab21l2.

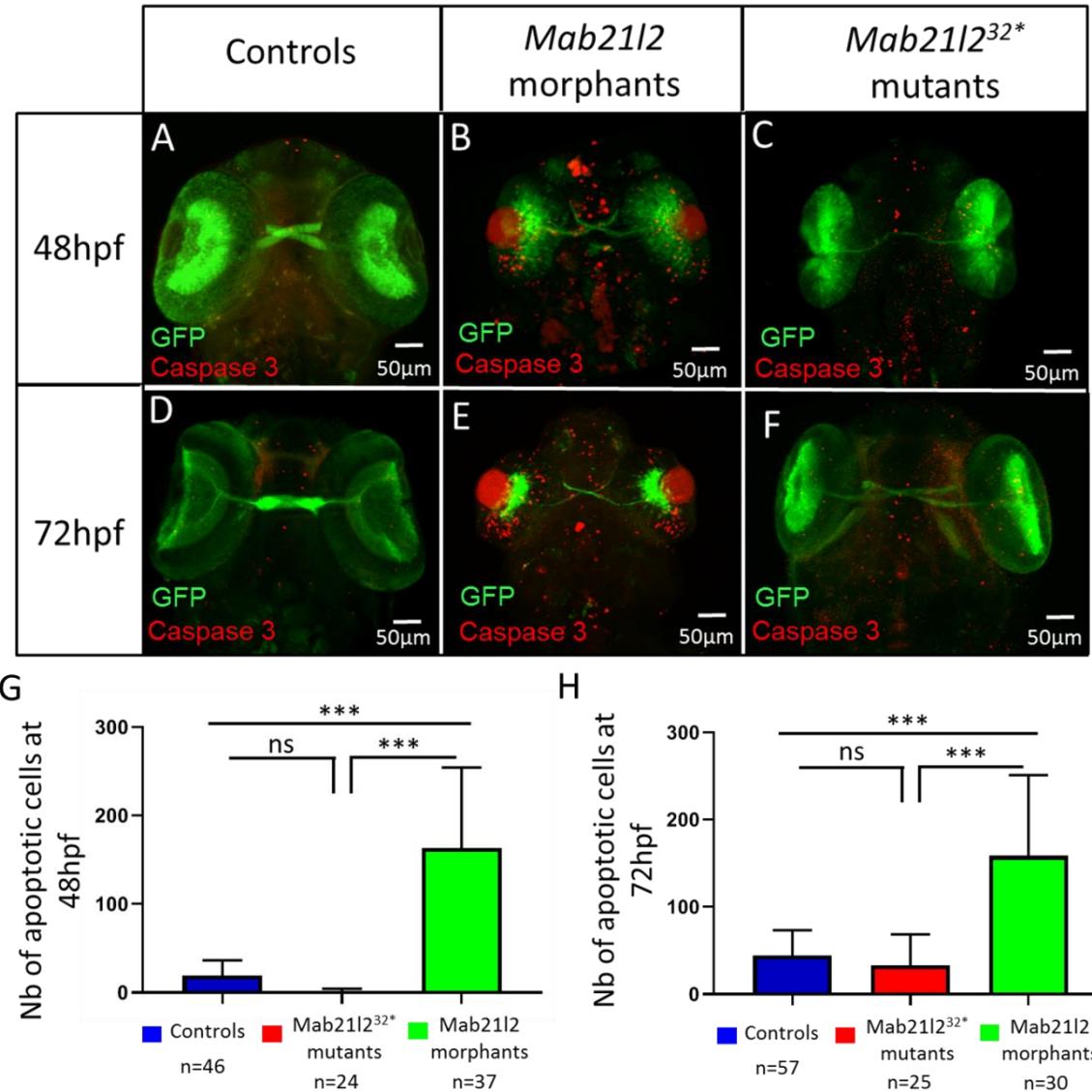


Figure 30 : La perte de mab21l2 impacte différemment les morphants et les mutants quant à l'apoptose induite

(A-F) Vues ventrales de larves contrôles, morphantes et mutantes sur fond Tg(*ath5*:GFP) à 48hpf (panels du haut) et 72hpf (panels du bas). Les RGCs sont marqués en vert (i.e., GFP) et les cellules apoptotiques en rouge (i.e., anticorps anti-caspase 3 activée). (G-H) Quantifications du nombre de cellules apoptotiques à 48hpf (G) et 72hpf (H). *** p<0.001 ; ns, non significatif.

b) L'augmentation de l'apoptose chez les morphants est bien significative mais plus faible que prévu...

Afin de tester la spécificité de l'augmentation de l'apoptose chez les morphants, j'ai co-injecté un morpholino dirigé contre *p53* avec mon morpholino contre *mab21l2*, ce qui est recommandé par la communauté pour supprimer l'apoptose générée de façon non spécifique par l'injection de MOs. Suite à cette co-injection, j'ai pu observer une baisse de l'apoptose chez

les morphants co-injectés comparés aux simples morphants injectés avec le MO *mab21l2*, ce qui confirme l'existence d'apoptose aspécifique liée à l'expérience de *knockdown per se*. Cependant, chez ces morphants co-injectés par les deux MOs, la quantité de cellules apoptotiques reste significativement supérieure à celle des contrôles (Figure 31). Le *knockdown* de Mab21l2 entraîne donc bien une légère augmentation de l'apoptose au niveau de la rétine, ce qui n'est pas observé chez les mutants. Il est toutefois possible que des phénomènes de compensation aient lieu chez les mutants, dont une des conséquences serait de limiter l'apoptose. Cependant, cette faible augmentation de l'apoptose ne peut expliquer à elle seule la diminution drastique du nombre de RGCs, ni celle des photorécepteurs. Il est donc probable que d'autres mécanismes pathogéniques soient à l'origine de ces défauts. C'est pourquoi, afin de découvrir les mécanismes moléculaires sous-tendant les phénotypes observés lors de la perte de Mab21l2, nous avons réalisé une analyse transcriptomique comparative des rétines contrôles, morphantes et mutantes. Cette étude avait pour but de définir les voies de signalisation impactées par la perte de Mab21l2 et de pouvoir ainsi mieux cerner la fonction cellulaire de Mab21l2.

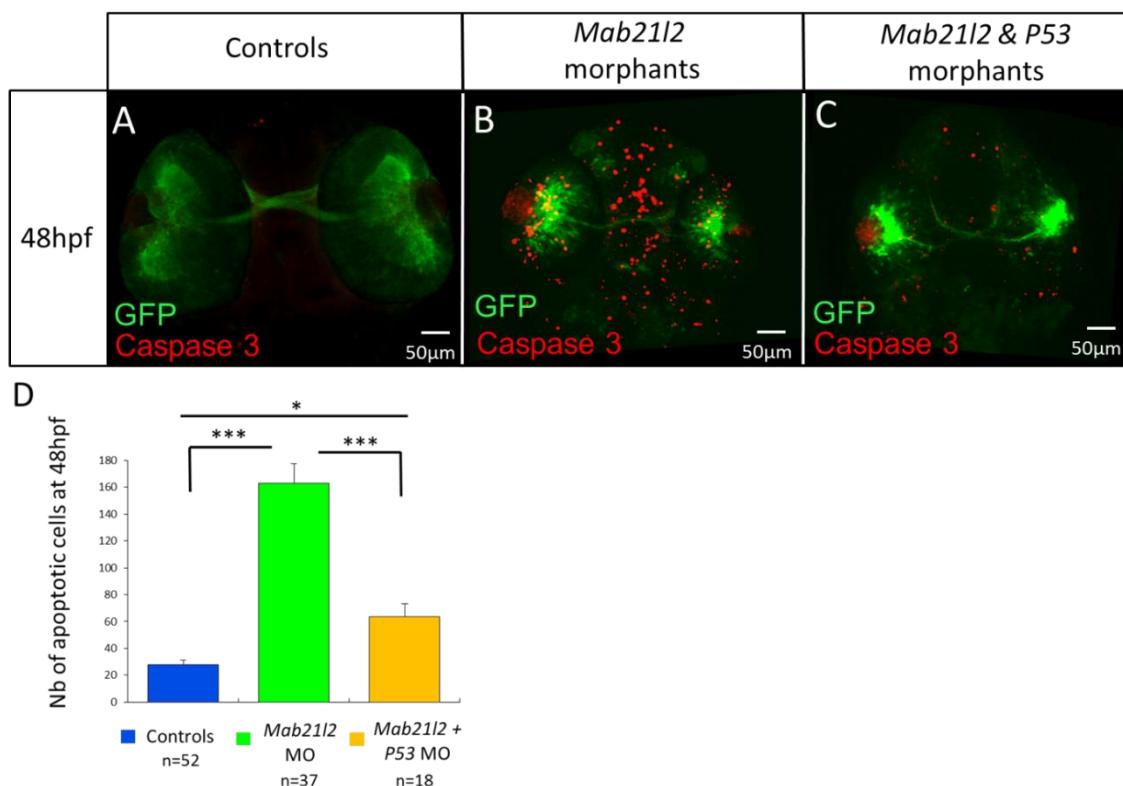


Figure 31 : L'augmentation de l'apoptose chez les morphants reste significative même après suppression de celle induite par p53

(A-C) Vue ventrales d'embryons contrôles (A), morphants *mab21l2* (B) et double morphants *mab21l2/p53* (C) à 48hpf sur fond Tg(*ath5:GFP*). Les RGCs sont marquées en vert (GFP) et les cellules apoptotiques en rouge (immuno marquage par l'anti caspase 3 activée). (D) Quantification du nombre de cellules apoptotiques à 448hpf. *p<0.05, *** p<0.001.

9. Analyse comparative transcriptomique

L'analyse transcriptomique que nous avons réalisée était destinée à couvrir plusieurs questions et en premier lieu l'identification de gènes cibles activés ou inhibés lors de la perte totale (mutant) ou partielle (morphants) de Mab21l2. L'exercice consistait donc à rechercher des gènes régulés positivement ou négativement en commun chez les mutants et les morphants. En outre, et à l'instar de la première étude ayant démontré un phénomène de compensation génique chez les mutants « nuls » en comparaison des morphants (Rossi et al., 2015), nous avons cherché à savoir s'il existait des gènes dont l'expression était fortement enrichie ou au contraire significativement amoindrie entre morphants et mutants de manière à pouvoir expliquer les éventuelles différences de sévérité d'atteinte ainsi que les phénotypes spécifiques des morphants jamais observés chez les mutants.

Dans ce but, nous avons donc entrepris six comparaisons différentes à partir des $\approx 5M$ de séquences produites par échantillon à Genoscope (Evry) : (i) les mutants versus les contrôles, (ii) les morphants vs les contrôles et (iii) les mutants vs les morphants, et ce, à deux stades du développement plus ou moins précoce et englobant différentes structures de l'embryon (la tête incluant le rhombencéphale à 10 somites et la rétine à 25hpf). L'analyse initiale des séquences et l'assemblage des *reads* (i.e., séquences) sur la dernière version du génome annoté du poisson-zèbre (*Ensembl*, Sanger Centre, Cambridge, UK) a été effectuée par la société Genosplice (Paris) avec les paramètres que nous avions convenus ensemble. Cette méta-analyse a produit six tableaux de gènes sur- ou sous-exprimés dans une condition par rapport à l'autre avec comme valeur de rapport d'expression 1,5 et une probabilité de confiance (Pvalue) bornée à $\leq 0,05$.

Les résultats quantitatifs obtenus quant au nombre de gènes différentiellement exprimés entre deux conditions furent les suivants : à 10 somites, on observe 249 gènes sur- ou sous-exprimés entre embryons mutants et contrôles, 1328 gènes sur- ou sous-exprimés entre morphants et contrôles, et 1586 gènes sur- ou sous-exprimés entre mutants et morphants ; les rétines à 25hpf présentent quant à elles 1336 gènes sur- ou sous-exprimés entre mutants et contrôles, 814 gènes sur- ou sous-exprimés entre morphants et contrôles, et 2376 gènes sur- ou sous-exprimés entre mutants et morphants. De manière intéressante, certaines processus cellulaires et grandes voies de signalisation sont plus particulièrement représentés en terme de nombre de gènes : par exemple les gènes codant des protéines impliquées dans (i) le cycle cellulaire (à 10 somites : 27 différentiellement exprimés, dont 9 activés et 18 réprimés entre les embryons morphants et contrôles et 26 gènes dont 17 activés et 9 réprimés entre mutants et

morphants), ou dans (ii) la maturation des protéines au sein du réticulum endoplasmique (9 gènes différentiellement exprimés, dont 7 activés et 2 réprimés entre les embryons mutants et contrôles à 10 somites), incluant la maturation de récepteurs des grandes voies de signalisation essentielles au développement des structures concernées (œil et cerveau postérieur) ; ou en ce qui concerne les voies moléculaires, les protéines de (iii) la signalisation Wnt (17 gènes différentiellement exprimés, dont 11 activés et 6 réprimés entre les rétines mutantes et contrôles à 25hpf) et (iv) Notch dont 1/5^{ème} des gènes de cette voie sont activés dans les rétines mutantes vs les rétines morphantes à 25hpf, ou encore les protéines associées à la (v) signalisation p53 (et à l'apoptose) à 10 somites comme à 25hpf, dont nombre d'entre elles sont surexprimées chez les morphants en comparaison des contrôles et des mutants, ce qui est consistent avec mes résultats d'immunomarquage et de *knockdown* de p53 sur les rétines morphantes.

Dans le but de nous focaliser sur ce qui nous semblait le plus intéressant dans cette multitude de données prometteuses, et après discussion avec des collaborateurs de l'équipe qui avaient analysé des quantités de données issues d'analyses transcriptomiques comparables, nous avons choisi de cibler les gènes dont la différence d'expression correspondait à un rapport supérieur ou égal à 5 fois plus ou moins exprimé dans une condition par rapport à l'autre. En outre, pour la suite du projet concernant la partie « œil », nous n'avons retenu que des transcrits différentiellement exprimés présents dans les deux analyses comparatives « morphants et mutants » versus contrôles, alors que pour le projet rhombencéphale (décrit plus loin) nous avons recherché les gènes sur- ou sous-exprimés entre mutants et morphants afin de justifier les différences de sévérité d'atteinte entre ces deux populations d'embryons déplétés plus ou moins pour Mab21l2.

Enfin nous nous sommes attachées à définir le rôle de Mab21l2 dans certains processus cellulaires ou mécanismes moléculaires clés dans le développement de la rétine, comme par exemple l'équilibre entre prolifération des RPCs et différenciation. Dans ce cadre, le premier gène que nous allons valider par qPCR mais également par hybridation *in situ* sera *vsx2* qui apparaît réprimé tant chez les embryons mutants (ratio de 23,5) que chez les morphants (ratio de 14,6) comparés aux contrôles à 10 somites. Ce gène est toujours réprimé mais de façon moindre entre mutants/morphants (ratio tournant autour de 5) et contrôles à 25hpf. Dans la mesure où le rôle de Vsx2 dans la régulation du cycle cellulaire des RPCs via la cyclinD1 a été établi (Wong et al., 2015) et attendu que des mutations dans son orthologue humain sont responsables de MACs (Ferda Percin et al., 2000; Bar-Yosef et al., 2004), il nous semble un

candidat très prometteur pour adresser la question du rôle de Mab21l2 dans la sortie du cycle cellulaire des RPCs et l'entrée dans un processus de différenciation.

D'autres gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire au niveau de la rétine embryonnaire seront également étudiés : ce sera le cas notamment des gènes *nub1*, également réprimé à 10 somites chez les mutants comme chez les morphants (ratio de 9,8 pour les deux cas) par rapport aux contrôles, et du gène *gas2a* dont l'expression est quant à elle activée chez les mutants (ratio de 13,3) et les morphants (ratio de 12,5) comparés aux contrôles à 10 somites. Brièvement, Nub1 (pour *NEDD8 Ultimate buster 1*) est un régulateur du cycle cellulaire qui agit indirectement sur la CyclinD1 dont le rôle dans l'équilibre prolifération/différenciation des RPCs a été discuté dans l'introduction, et qui interagit avec la protéine AIPL1 altérée dans une maladie neurodégénérative de la rétine, l'amaurose congénitale de Leber (Akey et al., 2002). Gas2 est elle aussi une protéine impliquée dans la sortie du cycle cellulaire mais par son interaction direct avec le cytosquelette d'actine (Brancolini et al., 1992; H. Lee et al., 1999; Zhang et al., 2011).

Enfin, d'autres protéines, comme le facteur de transcription Engrailed 2 dont le rôle dans le développement de la rétine et en particulier dans le guidage axonal des RGCs, a été démontré chez la souris (Brunet et al., 2005; Zhang et al., 2019) présentent des différences d'expression significatives entre les morphants/mutants et les contrôles. Quant aux voies moléculaires impliquées dans la mise en place du système visuel, ce sont les voies Wnt et Fgf qui sont à l'honneur de ce crible avec l'identification de leur antagoniste Shisa4 qui agit via la maturation post-traductionnelle de leurs nombreux récepteurs dans le réticulum endoplasmique (Katoh and Katoh, 2005; Yamamoto et al., 2005; Furushima et al., 2007; Hedge and Mason, 2008) et se trouve fort réprimé chez les morphants et de façon moindre chez les mutants mab21l2 en comparaison des sauvages dans notre crible. Il est à noter qu'un autre régulateur de la signalisation Fgf, impliquée dans le développement de l'œil comme dans celle du rhombencéphale, la protéine Canopy4 (Hirate and Okamoto, 2006) est également sous-exprimée de l'ordre de 600 fois, cette fois entre les embryons mutants et les morphants, ce qui fait d'elle un candidat à examiner pour expliquer les différences de sévérité entre la perte partielle et totale de Mab21l2.

II. Rôle de Mab21l2 dans le développement du rhombencéphale

En parallèle de ces travaux sur le système visuel, j'ai également étudié l'impact de la perte de Mab21l2 sur le développement du rhombencéphale et des nerfs crâniens. En effet, lors de travaux antérieurs à mon arrivée, ma directrice de thèse, Jamilé Hazan, avait observé des défauts sévères du rhombencéphale suite à l'injection de morpholino dirigé contre *mab21l2*. Ces défauts consistaient en une sévère perturbation de l'organisation métamérique du rhombencéphale couplée à des anomalies du ganglion trijumeau (Figure 32). Lors de ma thèse, j'ai donc tenté de reproduire ses premiers résultats par injection de morpholino et ai poussé l'analyse de cette structure en observant le rhombencéphale dans ma lignée mutante. Cependant, avant de présenter mes résultats, nous allons tout d'abord revenir sur les notions de base du développement du rhombencéphale et des nerfs crâniens.

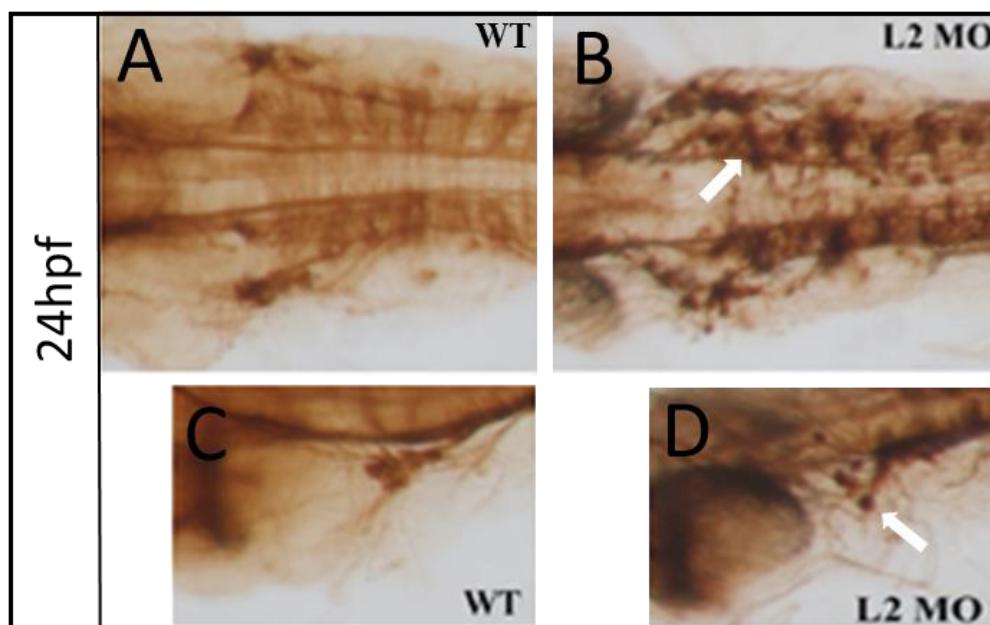


Figure 32 : Perturbation du rhombencéphale suite au knockdown de mab21l2

(A-D) Photos d'expériences d'immunohistochimie réalisées à l'aide d'un anticorps contre la Tubuline α -acétylée chez des contrôles (WT, panels de gauche) et des morphants *mab21l2* (L2 MO, panels de droite). À 24 hpf, on observe une désorganisation du rhombencéphale (B, flèche blanche) et un ganglion trijumeau anormal (D, flèche blanche) chez les morphants comparés aux contrôles (A,C). (A,B) vues dorsales; (C,D) Vues latérales, antérieur à gauche.

1. Développement du rhombencéphale

Le rhombencéphale, ou cerveau postérieur, est formé de la moelle allongée (médulla oblongata) dans la partie postérieure, et du pont et du cervelet dans la partie antérieure (Figure 33A), ces deux derniers formant le tronc cérébral. Le rhombencéphale contrôle de nombreux

processus physiologiques tels que l'activité motrice, la respiration, le sommeil et bien d'autres encore et sert également d'organe de communication entre le cerveau antérieur et la moelle épinière. Il est organisé en sept à huit régions segmentées que l'on nomme des rhombomères, chaque rhombomère (*r*) ayant une identité propre avec une expression génique spécifique. On retrouve cette organisation métamérique chez de nombreuses espèces avec le *r*1 (rhombomère 1) en position rostrale, formant la frontière entre le mésencéphale et le rhombencéphale (*MHB* pour *Midbrain-Hindbrain Boundary*) et *r*7/8 en position caudale constituant la frontière avec la moelle épinière (Figure 33B) (Lumsden and Keynes, 1989; Murphy et al., 1989; Gill and Baker, 1993). Le rhombencéphale contient également huit des douze paires de nerfs crâniens, du nerf V au nerf XII (noté *n* suivi d'un chiffre latin sur la Figure 33C).

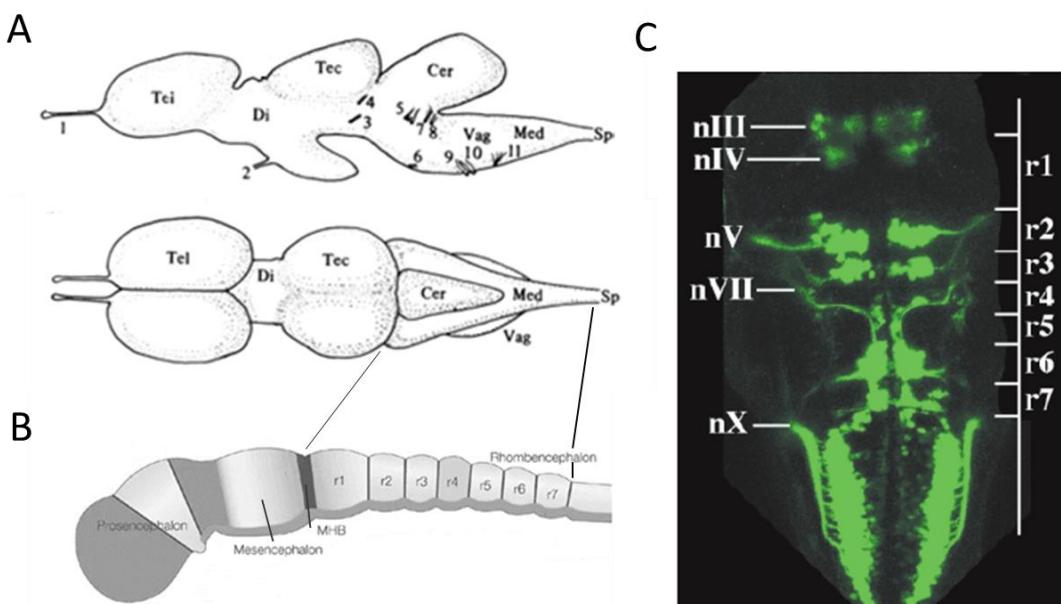


Figure 33 : Organisation du rhombencéphale

(A) Cerveau de poisson-zèbre, vue latérale (panel du haut) et dorsale (panel du bas), antérieur à gauche. *Tel*, télencéphale ; *Di*, diencéphale ; *Tec*, tectum ; *Cer*, cervelet ; *Vag*, lobe vaginal ; *Med*, medulla oblongata ; *sp*, moelle épinière. Les chiffres en latin correspondent au positionnement des nerfs crâniens selon l'axe antéro-postérieur. Adapté de Hurtado-Parrado, 2010. (B) Organisation métamérique du rhombencéphale du poisson-zèbre. *MHB*, Midbrain-Hindbrain Boundary ; *r*, rhombomère. Vue latérale, antérieur à gauche. Adapté de Kiecker et Lumsden, 2005. (C) Lignée transgénique *Tg(islet1:GFP)* montrant la disposition des nerfs (*n*) issus des neurones branchiomoteurs selon les rhombomères (*r*). Vue dorsale, antérieur en haut. Adapté de Moens et Prince, 2002.

a) Segmentation du rhombencéphale

Chez le poisson-zèbre, la segmentation du rhombencéphale est visible dès le stade 26 somites par l'apparition de renflements au niveau de la vésicule otique (Hanneman et al., 1988). Ces renflements, qui vont constituer les futurs rhombomères, commencent à former des

« barrières » entre eux afin d’acquérir une identité propre à chacun (Moens et al., 1998). Contrairement à ce que l’on attendait et qui a été observé sur d’autres structures comme la formation des somites et des nerfs moteurs spinaux, la mise en place de frontières entre chaque rhombomère ne se produit pas graduellement de l’antérieur vers le postérieur, mais plutôt de manière désordonnée. Ainsi, le rhombomère 4 est le premier à s’individualiser avec la formation des frontières r3/r4 puis r4/r5. S’ensuivent la formation des frontières r1/r2, r2/r3, r6/r7 et pour finir r5/r6. Le fait que r4 apparaisse en premier pourrait refléter son importance et surtout sa spécificité tandis que l’apparition tardive de la frontière entre r5 et r6 suggère une origine cellulaire commune. Les cellules comprises dans le rhombomère 1 participeront par la suite à la formation du cervelet avec les cellules de la MHB ou isthme (Zinyk et al., 1998). L’organisation du rhombencéphale est également régie par une périodicité s’étalant sur deux segments, chaque paire de rhombomères étant à l’origine d’un nerf crânien moteur (r2/r3 pour le trijumeau, r4/r5 pour le facial, r6/r7 pour le glossopharyngien). En effet, les axones des branchiomotoneurones sortent dans la périphérie pour innérer leurs cibles dans les arcs branchiaux via les rhombomères pairs tandis que la différenciation est retardée dans les rhombomères impairs. De plus, les rhombomères pairs, comme les rhombomères impairs présentent entre eux des caractéristiques communes, dont des cellules adhésives de propriétés différentes entre les pairs et les impairs (Lumsden and Keynes, 1989; Guthrie and Lumsden, 1991; Lumsden et al., 1991; Guthrie et al., 1993; Schilling and Kimmel, 1994; Bally-Cuif et al., 1998).

(i) Formation des frontières inter-rhombomériques

La formation des frontières entre deux rhombomères est régie par l’interaction des éphrines et de leurs récepteurs Eph. En particulier, le récepteur EphA4 est exprimé dans les rhombomères 1, 4 et 7 et interagit avec le ligand ephrinb3b exprimé dans les rhombomères 2, 4 et 6. De même, EphB2a présent dans r1, r4 et r7 interagit avec ephrinb4a présent dans r5 et r6 (Xu et al., 1995; Xu and Wilkinson, 1997; Chan et al., 2001; Cooke et al., 2001). Ces interactions sont nécessaires au tri des cellules de part et d’autre d’une frontière et de ce fait à la mise en place de frontières nettes et distinctes (Xu et al., 1995, 1999; Cooke et al., 2005). L’établissement des frontières est réalisé grâce aux propriétés d’adhérence des cellules constituant deux rhombomères voisins. Lorsque les cellules entrent en contact via les éphrines et leurs récepteurs, on observe un clivage de la protéine E-cadhéchine (une molécule majeure de l’adhérence cellulaire), qui induit une baisse de l’adhérence et une augmentation de la ségrégation cellulaire (Solanas et al., 2011). Les éphrines peuvent également promouvoir

l'adhérence cellulaire entre des neurones d'un même rhombomère lorsque leur signalisation associée est faible ou qu'elles se lient à des récepteurs tronqués (Holmberg et al., 2000). À l'opposé, les éphrines B peuvent promouvoir une répulsion bidirectionnelle au niveau de la frontière entre rhombomères (Mellitzer et al., 1999; Rohani et al., 2011), c'est-à-dire qu'au niveau de la zone de contact entre éphrines et récepteurs, les cellules stopperaient leur migration et réorienteraient leur trajectoire dans le sens inverse. C'est ce phénomène de répulsion, plus que celui d'adhérence, qui jouerait un rôle clé dans la formation des frontières inter-rhombomériques (Rohani et al., 2011). Une fois les frontières délimitées, apparaissent des câbles d'actomyosine qui viennent les renforcer et les maintenir dans la durée. Ces câbles se formeraient par un mécanisme impliquant EphA4 (Calzolari et al., 2014; Cayuso et al., 2019). La migration cellulaire joue donc un rôle nécessaire mais non suffisant dans l'établissement de ces frontières. En effet, d'autres mécanismes, impliquant la plasticité cellulaire et l'acquisition d'une identité propre à chaque rhombomère rentrent également en jeu.

(ii) Gènes *Hox* : structure de la segmentation

Les gènes *Hox* codent des facteurs de transcription exprimés le long de l'axe antéro-postérieur des vertébrés qui participent à la mise en place de l'identité positionnelle (Duboule and Dollé, 1989; Carroll, 1995; Lumsden and Krumlauf, 1996). Il existe 39 gènes *Hox* regroupés en 13 groupes paralogues (noté PG pour *paralogous group*, suivi du numéro de groupe), dont 4 groupes sont exprimés dans le rhombencéphale, les groupes PG-1 à PG-4 (Figure 34). Le groupe PG-1 qui comprend les gènes *Hoxb1b* (équivalent à *Hoxa1* chez la souris), *Hoxb1a* (équivalent à *Hoxb1* chez la souris) et *Hoxd1* s'est avéré très important pour la spécification précoce du rhombencéphale, attendu qu'il constitue le premier groupe de gènes à être exprimé dans le rhombencéphale présomptif dès la gastrulation (Wilkinson et al., 1989a; Frohman et al., 1990; Sundin et al., 1990; Murphy and Hill, 1991; Frohman and Martin, 1992; Godsave et al., 1994; Kolm et al., 1997). *Hoxb1a* en particulier est exprimé uniquement dans le r4 (Figure 34 et Figure 35), et est considéré comme un gène régulateur majeur de l'identité de r4 et des projections axonales constituant le nerf facial. Chez la souris, quand *Hoxa1* ou *Hoxb1* sont déplétés, le territoire de r4 est réduit au profit de celui de r3. Lors de la déplétion de *Hoxa1* chez la souris, les nerfs faciaux et glossopharyngiens sont affectés et r5 est absent de l'organisation métamérique du rhombencéphale (Lufkin et al., 1991; Chisaka et al., 1992; Carpenter et al., 1993; Dollé et al., 1993; Mark et al., 1993; Goddard et al., 1996; Studer et al., 1996). Chez le poisson-zèbre, on observe les mêmes conséquences à la suite de la déplétion de *Hoxb1b* (McClintock et al., 2002). Lorsque les deux facteurs de transcription *Hoxb1a* et

Hoxb1b sont déplétés ensemble, on observe des conséquences plus sévères : ainsi r4 et r5 ne sont pas spécifiés correctement, voire sont absents (Gavalas et al., 1998; Studer et al., 1998; Rossel and Capecchi, 1999; McClintock et al., 2002). En outre, le phénotype est encore plus sévère lorsque les trois gènes composant le PG-1 sont mutés. Dans le cas du triple mutant, les rhombomères 2 à 7 sont absents et l'on observe un unique r1 plus large et une absence de segmentation (McNulty et al., 2005). Ce résultat s'explique par le fait que PG-1 est nécessaire à l'induction de l'expression des autres groupes de gène *Hox* (Dibner et al., 2004; McNulty et al., 2005).

Le second groupe de paralogues englobe les gènes *Hoxa2* et *Hoxb2*. *Hoxa2* est exprimé le plus antérieurement, dès la frontière r1/r2, et de façon plus marquée dans les rhombomères 2 à 5 (Prince and Lumsden, 1994) tandis que l'expression de *Hoxb2* est plus intense dans les rhombomères 3 à 5. La mutation de *Hoxa1* entraîne un changement d'identité du rhombomère 2 qui acquiert l'identité du rhombomère 1 (Ren et al., 2002; Oury et al., 2006) alors que la perte de *Hoxb2* affecte la formation des nerfs de r4 de façon similaire aux défauts associés à l'absence de *Hoxb1* (Barrow and Capecchi, 1996). De plus, la mutation de *Hoxb2* provoque une réduction de l'expression de *Hoxb4* (PG-4, dont les paralogues sont exprimés dans la partie postérieure du rhombencéphale) ; or ces deux gènes sont responsables ensemble de la fermeture de la paroi ventrale (Barrow and Capecchi, 1996). Lorsque tout le PG-2 est délété, les frontières r2/r3 et r3/r4 disparaissent mais la segmentation du rhombencéphale reste globalement présente (Davenne et al., 1999).

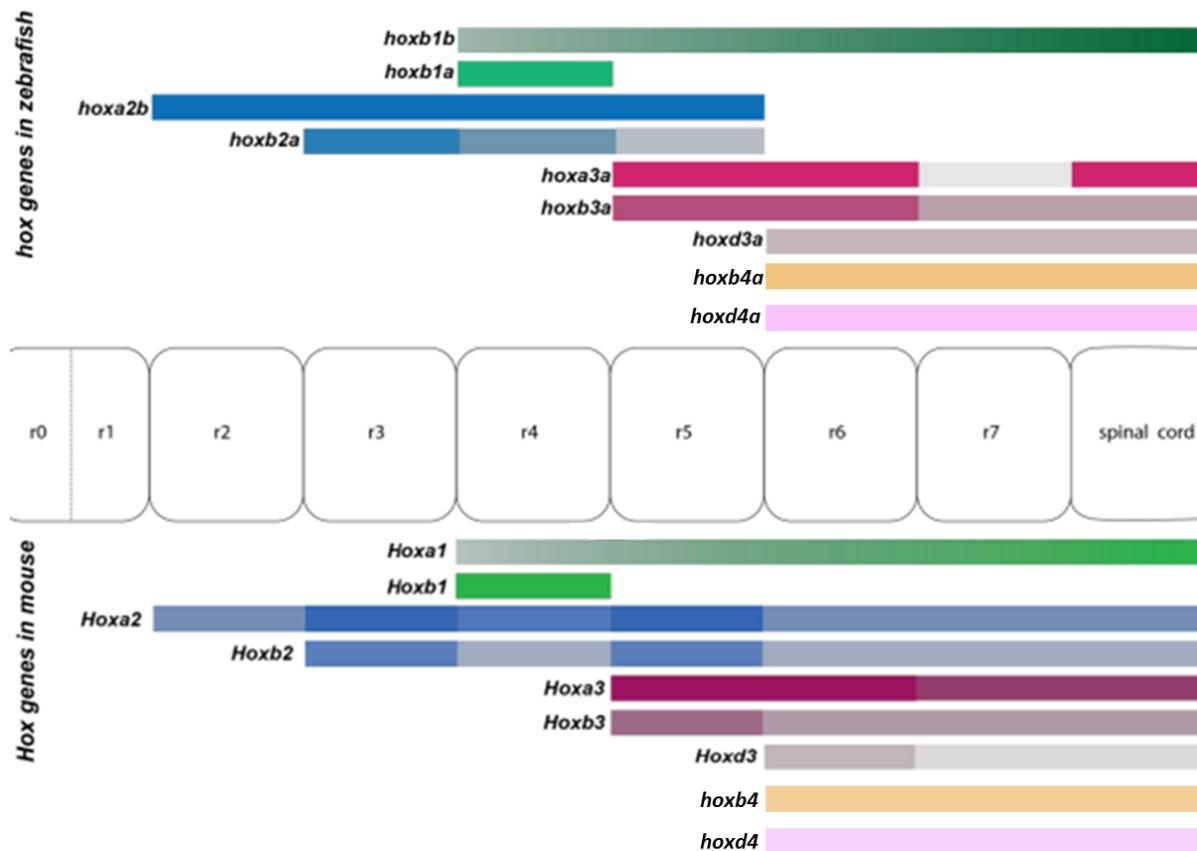


Figure 34 : Expression des gènes Hox dans les rhombencéphales murin et téléosté
Les différents patrons d'expression des gènes Hox dans le rhombencéphale de la souris (en bas) et du poisson-zèbre (en haut) sont ici schématisés. Antérieur à gauche. Adapté de Ghosh et Sagerström, 2018.

PG-3, quant à lui, comprend *Hoxa3*, *Hoxb3* et *Hoxd3*. L'absence de ce groupe de paralogues affecte les rhombomères 5 et 6, avec r6 adoptant une identité de type r4, comme en témoigne l'expression de *Hoxb1* dans ce rhombomère caudal (Gaufo et al., 2003). Il a également été montré que le facteur de transcription *Hoxb3* régule négativement l'expression de *Hoxb1* afin de maintenir ce dernier dans r4 (Wong et al., 2011). Enfin, bien qu'exprimé dans les rhombomères caudaux, l'absence de PG-4 n'entraîne pas de défaut de développement du cerveau postérieur (Horan et al., 1995). Les gènes Hox codent donc des facteurs essentiels à l'acquisition de l'identité segmentaire du rhombencéphale avec l'un d'entre eux, *Hoxb1* (*Hoxb1b* chez le poisson-zèbre) qui occupe une position particulière en tant que marqueur spécifique du r4.

(iii) Les cofacteurs des Hox : les Meis et Pbx

En plus de leur importance intrinsèque, les facteurs de transcription Hox sont régulés par des cofacteurs de la classe des protéines à homéodomaine TALE (pour Three Amino-acid

Loop Extension) qui inclut les protéines Meis (1-3), Prep et Pbx (1-4). Les Pbx et Meis sont exprimées très précocément, dès la gastrulation, et sont nécessaires à l'expression des gènes *Hox PG-1* (Pöpperl et al., 2000; Dibner et al., 2001; Waskiewicz et al., 2001; Elkouby et al., 2010). Plus tard au cours du développement, les Hox, Meis et Pbx peuvent se lier entre eux (par formation de dimères ou trimères) et s'autoréguler mutuellement. Les protéines Meis sont cruciales pour le développement du rhombencéphale et leur absence entraîne la disparition de certaines régions du rhombencéphale et conjointement de l'expression de marqueurs spécifiques dont les *Hox PG-1* (Choe et al., 2002; Maeda et al., 2002; Elkouby et al., 2010). Meis1 et 2 sont exprimés plus antérieurement que Meis 3 et sont communs à de nombreuses espèces (souris, poisson, xénopée, poulet...)(Oulad-Abdelghani et al., 1997; Maeda et al., 2001; Zerucha and Prince, 2001; Bumsted-O'Brien et al., 2007). Meis3 est exprimé à la fin de la gastrulation puis dans les rhombomères 2 et 4 (Salzberg et al., 1999; Dibner et al., 2001; Vlachakis et al., 2001; Waskiewicz et al., 2001). Sa surexpression entraîne l'apparition ectopique de rhombencéphale aux dépens du cerveau antérieur (Gutkovich et al., 2010) alors que des expériences de *knockdown* ont montré qu'il participe avec Hoxb1b à l'induction de Hoxb1a et de Krox20 (deux marqueurs clés de r3 et r5 ; Vlachakis et al., 2001). Chez le xénopée, il a également été montré que Meis3 participe à l'organisation du rhombencéphale via son gène cible Hoxd1 (Dibner et al., 2004; Gutkovich et al., 2010).

Les protéines Pbx jouent également un rôle clé dans le *patterning* du cerveau postérieur. Pbx4, par exemple, est exprimé dans le rhombencéphale présomptif où son expression chevauche celle de Meis3 et de Hoxb1b (Vlachakis et al., 2001). En son absence, l'expression des gènes *Hox* est anormale et on observe des défauts de segmentation postérieure avec les rhombomères 2 à 6 qui conservent une identité de rhombomère 1 (Pöpperl et al., 2000; Waskiewicz et al., 2002). Pbx4 est un cofacteur de Hoxb1b (Pöpperl et al., 1995; Waskiewicz et al., 2002) et il peut également interagir avec Meis1 et Meis3, le premier étant capable de sauver le phénotypes induit par la perte de Pbx4 (Vlachakis et al., 2001; Waskiewicz et al., 2001). Pbx1 est, quant à lui, exprimé dans le cerveau antérieur, le rhombencéphale et la crête neurale (Maeda et al., 2001). Sa déplétion entraîne la perte de Krox20, marqueur spécifique de r3 et r5. Pbx1 interagit avec Meis1 tandis que leurs patrons d'expression se chevauchent au niveau du rhombencéphale et de la cupule optique (Maeda et al., 2002). Chez le xénopée, il a également été montré qu'il interagit avec Hoxd1 afin d'induire l'expression de Hoxb1 (Dibner et al., 2004). Enfin, le complexe formé par Pbx1/Hox peut passer d'activateur à répresseur de l'activité génique par le recrutement d'histones déacétylases (HDAC 1 et 3 ; Saleh et al., 2000).

Les Meis/Pbx peuvent également agir ensemble via la formation de complexes. Ils peuvent se lier aux promoteurs des gènes *Hox* comme *Hoxb1a* et *Hoxb2a*. En se liant au co-facteur Pbx, Meis détache les HDACs des séquences promotrices sous le contrôle des facteurs Hox et participe ainsi à lever l'inhibition (Choe et al., 2009). De cette façon, le complexe Meis/Pbx en lien avec *Hoxb1b* est un activateur du promoteur de *Hoxb1a* (Choe et al., 2014). Pbx2 et Meis3 peuvent également, en se liant à *Hoxb1*, participer à son autorégulation et restreindre son expression à r4 (Ferretti et al., 2005). D'autres gènes *Hox* requièrent également la présence des cofacteurs Meis et Pbx pour l'induction de leur expression, comme les gènes *Hoxb4*, *Hoxd4*, *Hoxa3*, *Hoxb2* et *Hoxa2* (Gould et al., 1997; Ferretti et al., 2000; Manzanares et al., 2001; Serpente et al., 2005; Lampe et al., 2008), ce qui atteste du rôle déterminant de ces cofacteurs dans la régulation génique et donc dans le *patterning* du rhombencéphale.

(iv) Autres marqueurs des rhombomères

Il existe trois autres facteurs de transcription interconnectés et essentiels à l'acquisition de l'identité des rhombomères : *Vhnf1* (pour *Variant hepatocyte nuclear factor-1*), *Krox20* et *Valentino/ Kreisler/Mafb* (*Valentino* ou *val* chez le poisson-zèbre et *Kreisler* ou *Mafb* chez la souris). Chez le poisson-zèbre, *Vhnf1* est le facteur de transcription exprimé le plus précocement dans les rhombomères 3 à 6 où il induit l'expression de *Krox20* dans r5 et celle de *Mafb* dans r5 et r6. En son absence, les rhombomères 5 et 6 sont restreints au profit de r4 (Sun and Hopkins, 2001; Wiellette and Sive, 2003; Hernandez et al., 2004). Chez la souris, il a été montré que *Mafb* initie l'expression de *Vhnf1* via son interaction sur un site de liaison situé en amont de la séquence génomique du gène *Mafb* (Kim et al., 2005). *Krox20* est lui exprimé spécifiquement dans les rhombomères 3 et 5 (Wilkinson et al., 1989b; Gilardi et al., 1991; Schneider-Maunoury et al., 1993) (Figure 35). Lors de son *knockdown*, on observe une transformation homéotique du r3 en r2 ou r4, et du r5 en r6 démontrant son rôle dans la mise en place de la périodicité des segments (paire et impaires) (Voiculescu et al., 2001). En plus d'être régulé par *Vhnf1* et par le complexe Meis/Pbx, *Krox20* est également capable de s'autoréguler via des boucles complexes de rétroaction (Giudicelli et al., 2001; Chomette et al., 2006; Bouchoucha et al., 2013; Thierion et al., 2017). Il permet aussi d'activer le récepteur EphA4 dans les rhombomères 3 et 5 afin de consolider les frontières entre rhombomères (Theil et al., 1998). En outre, *Krox20* est lui-même inhibé par *Pax6* qui apparaît dans la partie dorsale du rhombencéphale (Engelkamp et al., 1999; Kayam et al., 2013). Enfin, *Mafb* est exprimé dans les rhombomères 5 et 6 (Figure 35) et son absence entraîne la perte de ces rhombomères au profit du r4 (Moens et al., 1996; Prince et al., 1998). Son contrôle de la formation des r5 et r6

est réalisé via sa régulation de l'ephrinB2a qui à son tour inhibe le développement du r4 et favorise les r5/6 (Cooke et al., 2001).

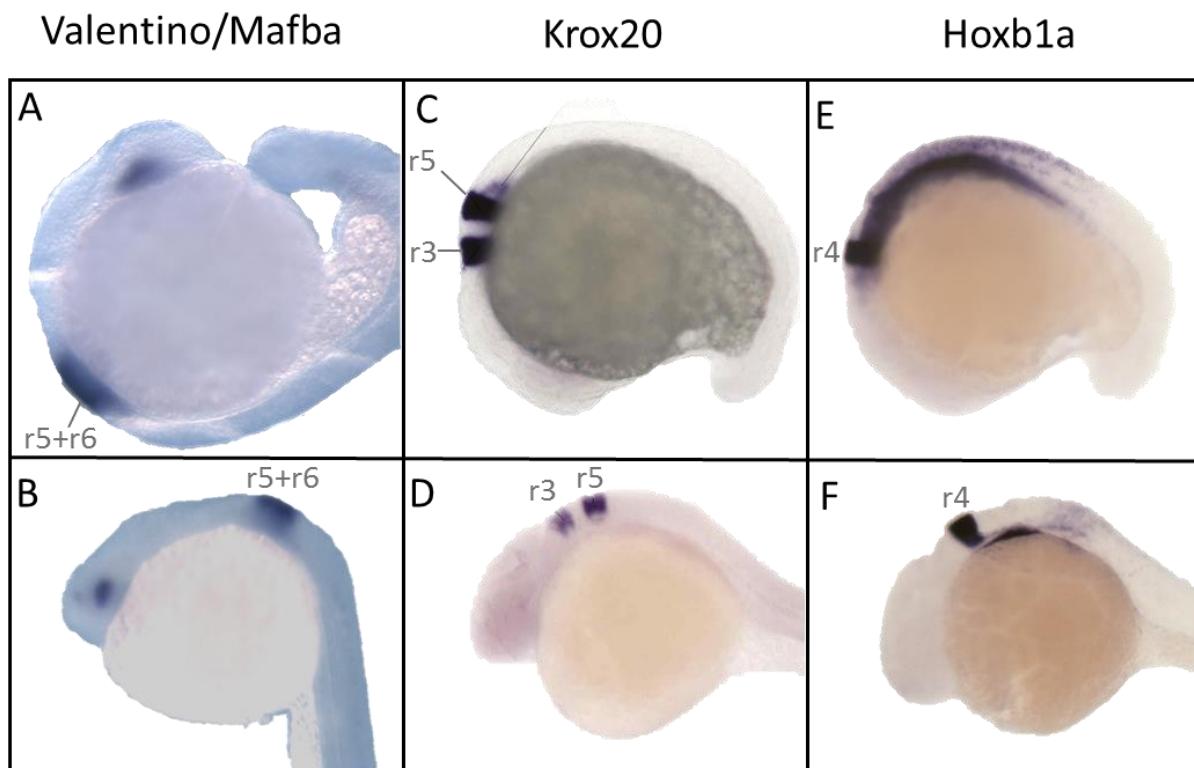


Figure 35 : Expression de trois marqueurs clés du patterning du rhombencéphale
Hybridations *in situ* révélant le patron d'expression de *mafba* (A,B), *krox20* (C,D) et *hoxb1a* (E,F) chez le poisson-zèbre à 16 somites (C,E), 20 somites (A), 24hpf (B) et 36hpf (D,F). Les images de C à F proviennent de Thisse et al, 2001-2005.

(v) Les voies de signalisations et le développement du rhombencéphale

La formation du rhombencéphale est également régulée par des voies de signalisation majeures telles que celles des morphogènes Fgf (pour *Fibroblast growth factor*), Wnt et l'acide rétinoïque (RA pour *Retinoic Acid*). La voie Fgf est nécessaire mais insuffisante à l'induction du rhombencéphale (Muhr et al., 1999) et agit dans la mise en place du cerveau postérieur via les protéines Fgf3 et Fgf8 qui sont exprimées dans les rhombomères 3, 4 et 5, dès l'épibolie chez le poisson-zèbre. Dans le rhombomère 4, seul Fgf3 continue d'être exprimé une fois la segmentation finie. La diminution de la signalisation Fgf ne provoque de défauts du rhombencéphale que lorsque Fgf3 et Fgf8 sont tous deux déplétés. On observe alors une absence de tous les rhombomères à l'exception de r4 (Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002). La protéine Fgf3 est conservée chez les vertébrés (Mahmood et al., 1995, 1996; Lombardo et al., 1998; Maves et al., 2002), mais chez le poulet et la souris, elle est également exprimée dans r2 et r6 (Powles et al., 2004; Weisinger et al., 2008; Sela-Donenfeld et al., 2009). De plus,

l'expression précoce de Fgf3/8 dans le r4 ferait de ce rhombomère un premier centre d'induction génique. En effet, l'expression ectopique de Fgf3/8 induit l'expression de marqueurs des r5/r6 tels que Krox20 et Mafb (Marin and Charnay, 2000; Maves et al., 2002)..

Parmi toutes les protéines de la voie Wnt, cinq sont exprimées dans la région du rhombencéphale : Wnt1, Wnt3a (Molven et al., 1991; Roelink and Nusse, 1991; Wolda et al., 1993; Hollyday et al., 1995; McGrew et al., 1995), Wnt4 (McGrew et al., 1992; Hollyday et al., 1995), Wnt10 (Kelly et al., 1993) qui sont toutes exprimées dans le mésoderme adjacent au rhombencéphale alors que Wnt8 est directement exprimée dans r3, r4 et r5 (Hume and Dodd, 1993). Quand la voie Wnt est bloquée, on observe une augmentation de l'expression des marqueurs du cerveau antérieur (comme Otx2 et Pax6) couplée à une diminution des marqueurs du rhombencéphale (tels Gbx2, Krox20 et Hoxb4) ainsi que des défauts morphologiques du cervelet (McGrew et al., 1997; Nordström et al., 2002, 2006), ce qui confirme son importance dans la morphogenèse de cette région. Les souris KO pour Wnt1 présentent une absence de mésencéphale associée à des défauts de la partie antérieure du rhombencéphale (McMahon et al., 1992) tandis que l'absence de Wnt3a entraîne une réduction commune du mésencéphale et du rhombencéphale. L'absence conjuguée de Wnt1 et Wnt3 empêche la fermeture du tube neural au niveau crânien ainsi que des anomalies de la moelle épinière (Augustine et al., 1993, 1995). Les souris KO pour Wnt3a présentent également une augmentation des marqueurs du cerveau antérieur (Otx2) et une baisse de ceux du rhombencéphale (Hoxb1, Hoxd1, Gbx2 et Meis3 ; Liu et al., 1999; Elkouby et al., 2010). Wnt8 est quant à lui nécessaire à la postériorisation du rhombencéphale (Erter et al., 2001; Lekven et al., 2001) et son absence conjuguée à celle de Wnt3a provoque la perte des structures postérieures au profit de structures antérieures (Riley et al., 2004; Shimizu et al., 2005). Wnt1 et Wnt10, pour leur part, n'ont pas d'effet sur le rhombencéphale du poisson-zèbre mais sur la frontière entre le mésencéphale et le rhombencéphale (Lekven et al., 2003; Riley et al., 2004), voire plus tardivement sur la formation du cervelet.

Enfin, l'acide rétinoïque est un dérivé de la vitamine A impliqué dans de nombreux processus développementaux (voir revue Rhinn and Dollé, 2012; Das et al., 2014). Sa principale source de production se fait grâce à l'alimentation, mais sa concentration est également régulée par deux groupes d'enzymes métaboliques : les RALDH (pour *Retinaldehyde Dehydrogenase*) qui le synthétisent et Cyp26 qui le dégrade (Fujii et al., 1997; Niederreither et al., 1997; Moss et al., 1998; Swindell et al., 1999). Son rôle clé dans la formation du rhombencéphale a été démontré par l'observation qu'une baisse graduelle de RA entraîne une progression des gènes exprimés antérieurement vers la partie postérieure et que l'absence totale de RA provoque la

disparition des rhombomères au delà de r3 chez de nombreuses espèces (Blumberg et al., 1997; Kolm et al., 1997; Van der Wees et al., 1998; Dupe et al., 1999; White et al., 2000). Il existe donc un gradient de RA dans le rhombencéphale de la partie postérieure où il est très enrichi à la partie antérieure où il est faiblement présent. Ce gradient peut s'expliquer par la distribution des enzymes RALDH dans le mésoderme para-axonal (situé autour du rhombencéphale postérieur ; Begemann et al., 2001) et la localisation inverse de Cyp26 dans la partie antérieure du rhombencéphale (Dobbs-McAuliffe et al., 2004; Emoto et al., 2005; Reijntjes et al., 2005; Sirbu et al., 2005; Hernandez et al., 2007; White et al., 2007). Dans le r4, Cyp26 est également nécessaire au maintien de frontières précises en favorisant l'expression de Hoxb1 et en diminuant celle de Krox20 (Addison et al., 2018; Wilkinson, 2018). L'acide rétinoïque fonctionne par sa liaison à des récepteurs de type RAR (retinoic acid receptor) ou RXR (retinoid X receptors), qui s'associent à des éléments RARE (retinoic acid responsive element) en 3' et 5' de certains gènes sur la séquence génomique (Giguere et al., 1987; Petkovich et al., 1987 et reviews Leid et al., 1992; Balmer and Blomhoff, 2002). Ces RAREs ont été trouvés sur Hoxb4 par exemple où ils sont nécessaires à son expression initiale (Serpente et al., 2005; Gould et al., 1998) mais également sur Hoxb1 (Langston et al., 1997; Studer et al., 1998), Hoxa1 (Frasch et al., 1995; Dupe et al., 1997), Hoxd4 (Pöpperl and Featherstone, 1993; Nolte et al., 2003) ainsi que Vhnf1 (Pouilhe et al., 2007). Le RA peut également s'autoréguler par le fait que des complexes Hoxa1/Pbx/Meis2 peuvent réguler l'activation de RALDH2 (Vitobello et al., 2011).

Selon le positionnement de la molécule dans la signalisation de l'acide rétinoïque, les mutations de gènes membres de cette voie n'auront pas le même impact sur le rhombencéphale. Ainsi le phénotype le plus grave est observé à la suite de la perte de Raldh2 ou de Cyp26 avec un rhombencéphale très réduit et une organisation métamérique anormale chez le poisson-zèbre et le xénope (Holleman et al., 1998; Begemann et al., 2001). Viennent ensuite les défauts sévères associés à la perte des RXR et RAR. En l'absence de l'un d'entre eux, l'expression de marqueurs de la partie postérieure du rhombencéphale est significativement retardée ce qui entraîne des malformations des rhombomères postérieurs qui, cependant, ne disparaissent pas (Maden et al., 1996; Kastner et al., 1997; Dupé and Lumsden, 2001). Lorsque plusieurs RAR/RXR sont supprimés, les défauts observés sont globalement plus sévères (Dickman et al., 1997; Dupe et al., 1999; Linville et al., 2009). Enfin, des mutations dans les séquences RAREs sont associées aux défauts les moins sévères et engendrent un simple retard dans l'expression de certains gènes qui est restauré à des stades ultérieurs (Dupe et al., 1997; Studer et al., 1998).

En outre, ces trois voies de signalisation peuvent interagir entre elles, ce qui ajoute un niveau de complexité à l'analyse. Ainsi, en absence de Raldh2 on observe la perte de Fgf3 (Maden et al., 1996; Niederreither et al., 1999) qui entraîne à son tour une diminution de Wnt8a dans r4 (Urness et al., 2010). De la même façon, une surexpression de Fgf8 ou la suppression de son inhibiteur entraîne l'expression ectopique de Wnt8a (Urness et al., 2010; Mahoney Rogers et al., 2011), démontrant l'existence de régulations complexes entre les voies Wnt et Fgf. De plus, il a été montré que la mise en place de l'organisation du rhombencéphale et des frontières séparant les différents rhombomères nécessite la présence des signalisations conjuguées RA et Fgf (Corral and Storey, 2004; Shimizu et al., 2006). En conclusion, ces trois voies de signalisation s'autorégulent entre elles. En effet, Fgf et Wnt restreignent l'expression de Cyp26 à la partie postérieure du rhombencéphale tout en maintenant l'expression de RALDH2, favorisant ainsi la signalisation du RA (Kudoh et al., 2002; White et al., 2007), tandis que le RA régule positivement l'expression de Wnt1 et Wnt3a ainsi que des cibles de Fgf dans le rhombencéphale postérieur (Zhao and Duester, 2009). Le développement du rhombencéphale est donc un processus complexe régulé à plusieurs niveaux par des facteurs redondants (Figure 36).

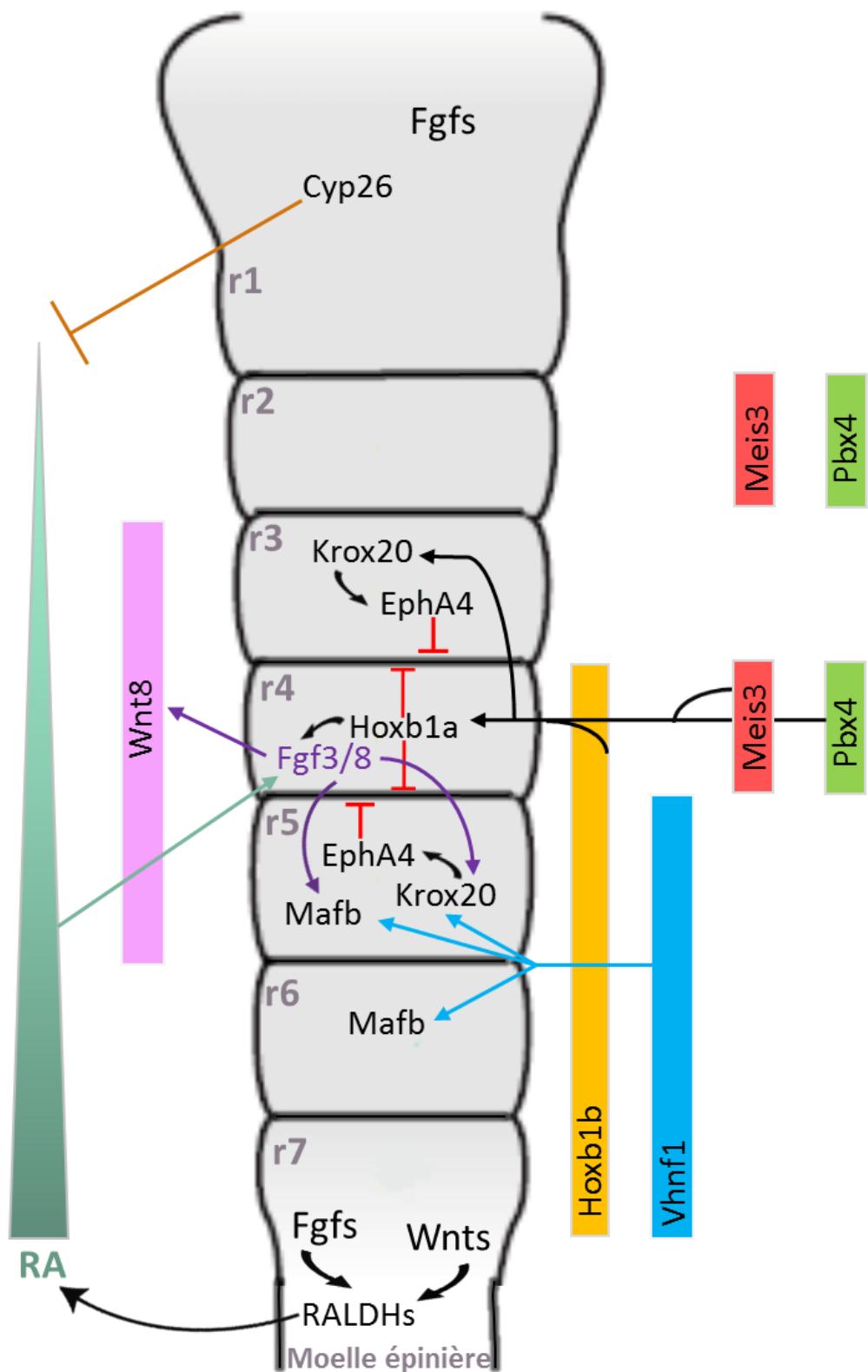
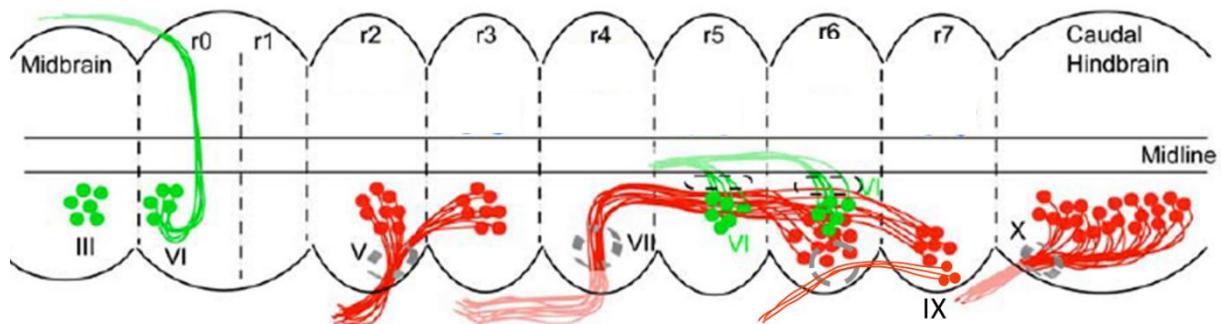


Figure 36 : Schéma récapitulatif des acteurs du développement du rhombencéphale
 Représentation non exhaustive des échanges entre voies de signalisation et facteurs de transcription requis dans le développement des rhombomères et la spécification de leur identité. Les flèches pleines représentent des régulations positives de l'expression des cibles tandis que la barre perpendiculaire marron pointe l'inhibition de Cyp26 sur la voie du RA, engendrant de ce fait son gradient d'expression. Les barres perpendiculaires rouges indiquent l'inhibition de la migration cellulaire aux frontières afin d'empêcher le mélange de cellules aux identités différentes.

b) Formation et migration des neurones branchio-moteurs crâniens

Il existe trois types de nerfs crâniens : (i) les neurones somato-moteurs qui innervent les muscles striés de l'orbite, de la langue et des muscles superficiels du cou, (ii) les neurones viscéro-moteurs, à l'origine du système parasympathique crânien, qui innervent des glandes diverses ainsi que les muscles lisses des systèmes pulmonaires, cardiovasculaires et gastro-intestinal et enfin (iii) les neurones branchio-moteurs (ou branchiomotoneurones) qui innervent les muscles des arcs branchiaux (ou pharyngées), incluant les muscles de la mâchoire, du visage, du larynx et du pharynx. Ces trois types de neurones peuvent se trouver dans le rhombencéphale, avec les neurones somato-moteurs principalement localisés dans le mésencéphale (Kandel, 2000). Les axones des neurones branchio-moteurs fasciculent pour former les nerfs V, VII, IX et X. Le nerf V, ou nerf trijumeau, innervé la mâchoire, et se forme initialement dans le r2 (où se trouve également son point de sortie dans la périphérie) à partir de noyaux de neurones du r2 et du r3. Le nerf VII, ou nerf facial, innervé comme son nom l'indique les muscles responsables des expressions faciales. Les neurones le constituant naissent dans r4 puis migrent caudalement jusqu'en r6 et r7. Le nerf IX, ou nerf glosso-pharyngien innervé quant à lui le pharynx et la langue. Ses neurones se différencient dans r6 et migrent en r7. Enfin, le nerf X, ou nerf vague, se constitue dans la partie la plus postérieure du rhombencéphale (r8) et innervé le cœur, les poumons et le système gastro-intestinal. Les neurones le composant naissent dans la partie ventrale du r8 et migrent latéralement vers la partie centrale/dorsale (Figure 37).



Somatic Motor Neurons

Branchiomotor Neurons

Figure 37 : Organisation des neurones crâniens du poisson-zèbre

Représentation schématique de l'organisation métamérique des neurones crâniens localisés dans le rhombencéphale. Les noyaux des neurones branchio-moteurs (en rouge) apparaissent dans une zone restreinte (cercles gris) puis migrent vers leur destination finale. Leurs axones sortent dorsalement des rhombomères pairs tandis que ceux des neurones somato-moteurs (en vert) sortent ventralement. Adapté de Zannino D. 2009.

(i) Facteurs communs à l'identité des rhombomères

Il existe une multitude de molécules nécessaires à la formation et à la migration des neurones crâniens, certaines jouant également un rôle dans l'acquisition de l'identité de chaque rhombomère. Par exemple, l'absence de Krox20 qui provoque la suppression des rhombomères 3 et 5 engendre également la perte du nerf trijumeau (nV) et des défauts de trajectoire axonale du nerf glossopharyngien (nIX). Au contraire, on peut observer qu'un groupe d'axones des branchiomotoneurones du r2 et du r7 sortent anormalement par le point de sortie du nerf facial (ou nVII) (Schneider-Maunoury et al., 1997). Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : soit (i) les nerfs issus des branchiomotoneurones du r2 et du r6, dont les axones constituent normalement les nerfs trijumeau (nV) et glossopharyngien (nIX), sont attirés vers le r4 (avec l'implication potentielle d'un changement d'identité de ces neurones), ou au contraire (ii) des neurones dont les axones fasciculent en nerf facial (nVII) migrent jusqu'au r2 en absence de signaux inhibiteurs provenant normalement du r3, avec une situation analogue pour les r6 et r7. En absence de Krox20, on observe également la perte du nerf somato-moteur (nVI) situé dans le r5. En effet, les neurones constituant ce nerf migrent prématûrement de façon radiaire due à l'absence du rhombomère 5 (Garel et al., 2000). La trajectoire du nerf facial (nVII) est également affectée par l'absence de Valentino/Mafb qui cause non seulement une migration anormale des corps cellulaires des branchiomotoneurones du r4, mais également la défasciculation des axones composant nVII (Chandrasekhar et al., 1997). L'absence de Mafb provoque également la perte du nerf glossopharyngien (nIX), dont le point de sortie vers la périphérie est localisé dans le r6 où Mafb est enrichi.

De plus, certains gènes *Hox* sont de la même manière impliqués dans ce double processus d'acquisition d'identité de certains rhombomères et de croissance axonale des nerfs en résultant. Par exemple, l'absence de Hoxa2 normalement exprimé dans le r2 provoque la « disparition » de ce rhombomère et la fasciculation des axones constituant normalement le nerf trijumeau (nV) avec ceux du nerf facial, qui sortent ensemble par le point de sortie du r4 (Gavalas et al., 1997). Le facteur de transcription Hoxa2 aurait donc un rôle déterminant dans la mise en place de l'identité neuronale des branchiomotoneurones du r2 et dans la croissance axonale du nV, ce qui a été confirmé par des expériences de surexpression de ce gène conduisant à l'apparition de neurones à l'identité nV dans des territoires ectopiques du rhombencéphale (Jungbluth et al., 1999). Par ailleurs, l'absence de Hoxb1(b) (chez la souris comme chez le poisson-zèbre) n'entraîne pas de défaut de la formation initiale du nVII dans le r4 mais altère la migration de ces neurones vers le r5 et r6, ce qui provoque finalement la disparition complète du nerf facial chez ces mutants. Ce défaut semble causer par la spécification incorrecte des

branchiomotoneurones issus du r4 en l'absence de Hoxb1b (Goddard et al., 1996; Studer et al., 1996; McClintock et al., 2002). En outre, des expériences d'expression ectopique dans le r2 confirment l'importance de Hoxb1 dans la mise en place de l'identité des neurones dont les axones constituent le nVII (Bell et al., 1999). De manière similaire, l'absence de Pbx4 provoque également des défauts de migration du noyau de neurones VII vers le r6, ainsi qu'une sortie des axones du nV par le point de sortie du nVII dans le r4, ce qui est également le cas en absence de Hoxa2 (Cooper et al., 2003). Enfin, l'absence de Pax6 induit en parallèle une diminution du nombre de neurones composant le nVI et une augmentation de neurones dont les axones constituent le nVII, avec des changements probables d'identité de ces neurones localisés à terme dans le même rhombomère r6 (Ericson et al., 1997; Osumi et al., 1997).

(ii) Autres facteurs de transcription

En plus des molécules citées précédemment, d'autres facteurs de transcription semblent également jouer un rôle dans ces processus d'acquisition de l'identité et de croissance axonale des neurones du rhombencéphale. Ainsi, Nkx6.1 est exprimé dans certains neurones branchiomoteurs et son absence chez la souris entraîne une diminution de la migration caudale des neurones dont les axones forment les nerfs trijumeau (nV) et facial (nVII) au profit d'une migration radiale ce qui provoque un positionnement aberrant de leurs corps cellulaires (Müller et al., 2003; Pattyn et al., 2003). De façon similaire, l'absence de Math3 (facteur de transcription de type bHLH) entraîne également une augmentation de la migration radiale des neurones constituant les nV et nVII au détriment de la migration caudale (Ohsawa et al., 2005). De même, les facteurs de transcription Phox2a et Phox2b, exprimés dans les progéniteurs des neurones branchio-moteurs et dont l'expression perdure dans les neurones post-mitotiques pour Phox2b, ou exclusivement exprimé dans les branchiomotoneurones post-mitotiques pour Phox2a, jouent également un rôle dans le développement de ces noyaux de neurones et de ce fait dans la croissance axonale des nerfs en résultant. L'absence de Phox2a entraîne la perte du noyau de neurones nIII (Pattyn et al., 1997) tandis que celle de Phox2b entraîne la perte de tous les neurones branchio-moteurs (Pattyn et al., 2000).

(iii) Importance des signaux extérieurs

D'autres études ont également montré l'importance des molécules impliquées dans la polarité cellulaire planaire (PCP) dans ces mêmes processus de migrations cellulaire et axonale des noyaux de neurones du rhombencéphale. Ainsi, Vangl2 (Bingham et al., 2002; Jessen et al., 2002), Scribble1 (Wada et al., 2005), Frizzled3a et Celsr2 (Wada et al., 2006) seraient

déterminants pour la migration caudale des neurones branchio-moteurs vers d'autres rhombomères. En leur absence, les cellules restent dans leur rhombomère d'origine et migrent seulement de façon radiale. Ces molécules de la voie PCP serviraient à empêcher les neurones de pénétrer dans la couche neuroépithéliale. Une autre molécule de la signalisation PCP, Prickle1, serait également impliquée, en tant que signal répulsif au niveau du neuroépithélium (Carreira-Barbosa et al., 2003) et, de ce fait, nécessaire à la migration des branchiomotoneurones faciaux du r4 via une activité nucléaire (Mapp et al., 2011).

Il existerait également des signaux attractifs présents dans l'environnement des neurones qui favoriseraient leur migration d'un rhombomère à l'autre. Ainsi, le couple formé par le VEGF (pour Vasal Endothelial Growth Factor) et le récepteur neuropilin-1 à la surface des neurones serait nécessaire à la migration caudale des corps cellulaires du r4 vers le r5 (Schwarz et al., 2004), tandis que la Reelin serait requise dans la migration radiale des branchiomotoneurones du r6, les cellules demeurant en position ventrale en son absence (Ohshima et al., 2002; Rossel et al., 2005).

Enfin, plus récemment, des études ont également montré l'importance des interactions entre neurones dans la migration caudale. En effet, la migration des corps cellulaires des neurones consituant le nVII s'initialise par des cellules pionnières qui migrent les premières et qui par des interactions avec d'autres branchiomotoneurones, entraîne leur migration. Ces contacts entre neurones seraient dépendant de la molécule N-cadherin (Cdh2 chez le poisson-zèbre) (Stockinger et al., 2011; Wanner and Prince, 2013).

2. Résultats expérimentaux

a) La perte transitoire de Mab21l2 altère le développement du cervelet

Attendu que le cervelet est une structure à cheval entre le mésencéphale et le rhombencéphale, et que mon équipe disposait de la lignée transgénique Tg(*olig2:GFP*) permettant de visualiser en temps réel la formation de cette structure, j'ai réalisé des injections de morpholino contre Mab21l2 dans ce fond génétique afin d'examiner l'impact de la perte de notre protéine d'intérêt sur le développement du cervelet. J'ai ainsi pu observer qu'à 3dpf et 5dpf, la taille du cervelet est de 1,5 à 2 fois plus petite chez les morphants que chez les contrôles (Figure 38). En plus de cette réduction significative de la taille, j'ai constaté que la morphologie du cervelet était anormale. En effet, chez la larve contrôle de poisson-zèbre à 3dpf, le cervelet a la forme d'une "moustache", alors que les neurones le composant constituent deux noyaux ovales et latéraux chez les larves morphantes (Figure 38B). De même à 5dpf, on peut

constater que l'écart entre les parties droite et gauche de la « moustache » du cervelet, au niveau de la ligne médiane de la larve, est nettement plus important chez les morphants que chez les contrôles (Figure 38D). Ces données préliminaires suggèrent un rôle encore non démontré de Mab21l2 dans la formation du cervelet, cependant ces résultats, observés uniquement chez les morphants, doivent être validés chez les mutants.

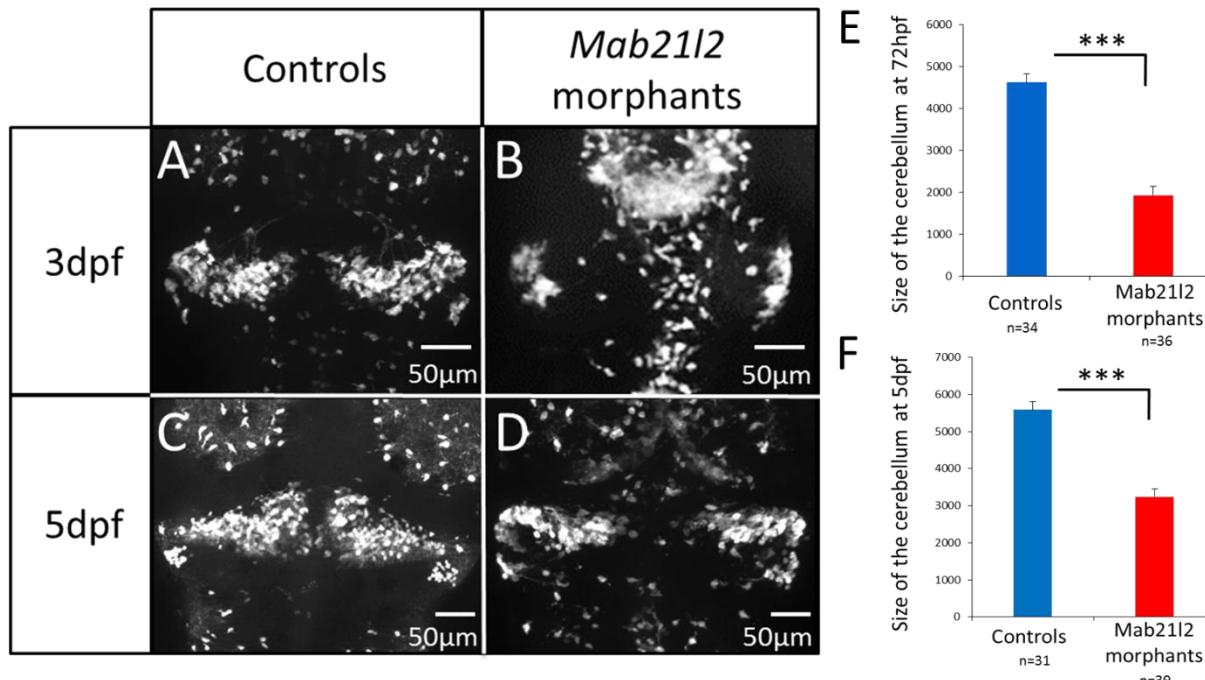


Figure 38 : La taille du cervelet est réduite chez les morphants *mab21l2*

(A-D) Vues dorsales d'embryons contrôles et morphants à 3dpf (panels du haut) et 5dpf (panels du bas) sur fond Tg(*olig2:GFP*) qui permet de visualiser l'ébauche du cervelet (ou lèvre rhombique). (E-F) Quantification de la taille du cervelet à 3dpf (E) et 5dpf (F). *** p<0.001.

b) Le *knockdown* de Mab21l2 engendre des défauts de développement du rhombencéphale que l'on ne retrouve que partiellement chez le mutant

Afin de reproduire les résultats observés précédemment dans le rhombencéphale par ma directrice de thèse (cf. Chapitre 3 II.1), j'ai utilisé la lignée transgénique Tg(*islet1:GFP*) qui exprime la GFP dans les neurones moteurs crâniens et spinaux, afin de visualiser le développement du rhombencéphale en temps réel. De cette manière, j'ai ainsi pu observer qu'à 26hpf, stade auquel la segmentation du rhombencéphale est initiée et où les neurones branchiomoteurs sont en cours de différenciation, la perte de Mab21l2 entraîne des défauts sévères du développement du cerveau postérieur chez 70% des embryons morphants : en effet, ces derniers présentent des défauts de trajectoire axonale d'un ou plusieurs nerf(s) crânien(s) par embryon, avec parfois des anomalies du positionnement des somata, voire même du nombre

de neurones branchio-moteurs (Figure 39B et G). Ces défauts peuvent affecter le nIII (nerf oculomoteur, situé dans le mésencéphale) et les nV (nerf trijumeau), nVIII (nerf facial) et nX (nerf vague) situés tous trois dans le rhombencéphale comme nous l'avons vu précédemment. Chez les mutants, bien que ces défauts à 26hpf aient tendance à survenir en plus grand nombre que chez les contrôles (50% vs 40%, cf. Figure 39G), la différence n'est pas significative pour l'assigner spécifiquement à la perte de Mab21l2. Cependant, j'ai pu constater qu'à 72hpf, stade où le développement du rhombencéphale touche à sa fin, les mutants présentent le même défaut que les morphants (bien qu'en proportions moindres) quant à la désorganisation de la structure très stéréotypée du rhombencéphale postérieure avec une augmentation des cellules positives pour Islet1 qui se trouvent de plus à des localisations aberrantes (Figure 39E, F et H). L'architecture du rhombencéphale apparaît tellement désorganisée qu'il en devient difficile de distinguer les différents nerfs ou d'observer avec précision la trajectoire des projections axonales. J'ai donc pu confirmer le phénotype observé par Jamilé Hazan auparavant, et ce, avec un morpholino différent, cependant toujours dirigé contre le site d'initiation de la traduction de Mab21l2. Il semblerait donc que la perte de Mab21l2 entraîne des défauts de développement du rhombencéphale affectant plusieurs sous-types de nerfs crâniens, en dépit d'une atteinte moindre des mutants comparés aux morphants.

Ce rôle de Mab21l2 dans le rhombencéphale n'ayant jusqu'ici jamais été établi et en raison du phénotype moins sévère des mutants, il m'a fallu m'assurer de la spécificité de ces défauts afin de pouvoir les assigner de façon certaine à la perte de Mab21l2. Toutefois, certains arguments étaient en faveur de notre hypothèse, sachant d'une part que la désorganisation du rhombencéphale à 72hfp était observée dans deux populations distinctes de morphants (via l'injection de deux morpholinos différents) et que les mutants présentaient des défauts similaires, même si en moindres proportions. Cependant, il est d'usage aujourd'hui de vérifier les éventuelles conséquences aspécifiques du processus d'injection du MO, en l'injectant dans des embryons mutants pour vérifier qu'il n'y a pas d'aggravation du phénotype (Stainier et al., 2017). Si c'était le cas, les défauts supplémentaires seraient irrémédiablement attribués aux effets hors cible (i.e., off-target) de la technique de *knockdown*.

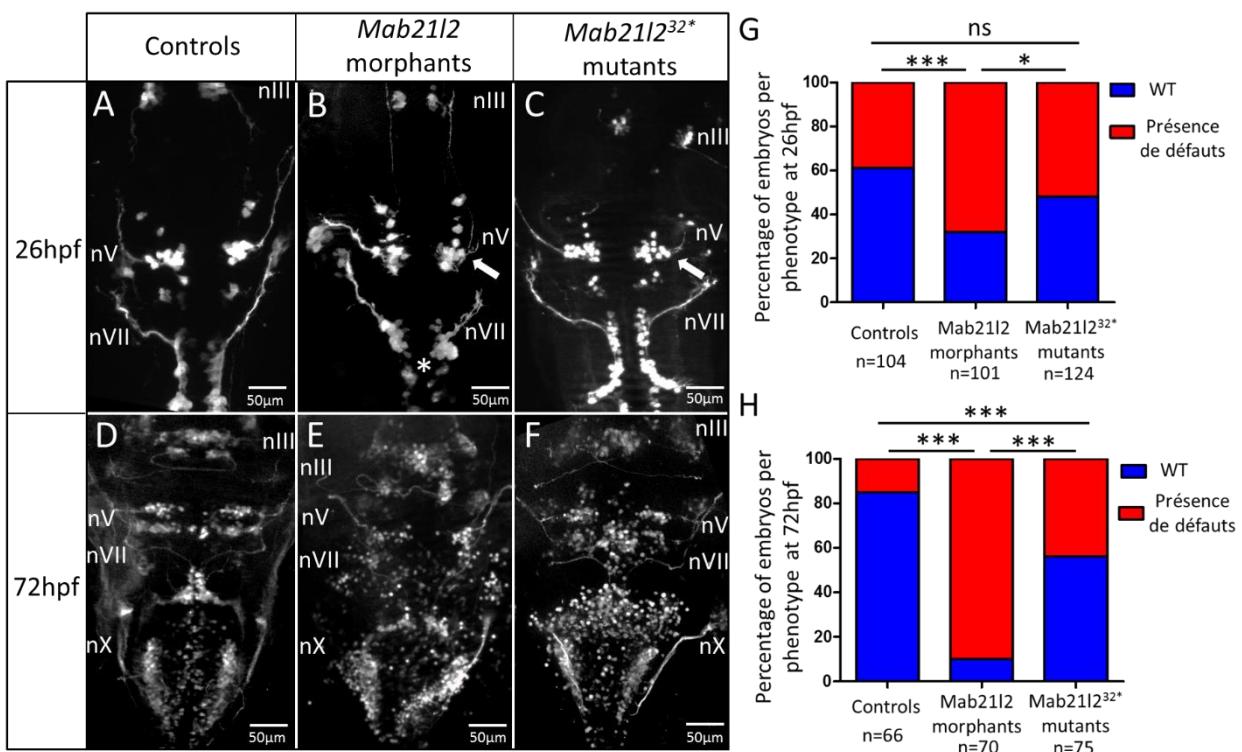


Figure 39 : Le knockdown et le knockout de Mab21l2 affectent le développement du rhombencéphale à des degrés différents

(A-F) Vues dorsales d'embryons contrôles, morphants et mutants à 26hpf (panels du haut) et 72hpf (panels du bas) sur fond génétique Tg(islet1:GFP). Les flèches blanches en B et C indiquent des erreurs de trajectoire ou hypoplasies des nerfs crâniens ; l'astérisque en B pointe le positionnement anormal d'un noyau de neurones. nIII, nerf oculo-moteur ; nV, nerf trijumeau ; nVII, nerf facial ; nX, nerf vague. (G-H) Distribution des contrôles, morphants et mutants en fonction de leur phénotype sauvage (WT en bleu) ou anormal (en rouge) avec la présence d'au moins un nerf crânien affecté par l'embryon à 26hpf ou la présence de cellules mal positionnées à 72hpf. * p<0.05 ; *** p<0.001 ; ns, non significatif.

c) Validation de la spécificité des phénotypes du rhombencéphale

Afin de vérifier que les défauts du rhombencéphale chez les morphants étaient spécifiques de la perte de fonction de Mab21l2, j'ai injecté le morpholino contre cette protéine dans les embryons mutant *mab21l2^{32*}* à la même dose que dans les expériences de knockdown classique dans les contrôles. J'ai ainsi pu constater qu'à 26hpf et 72hpf, les mutants injectés avec le morpholino (notés par la suite mutants/morphants) et les mutants non injectés présentaient les mêmes anomalies du développement du rhombencéphale dans les mêmes proportions (Figure 40). L'injection de morpholino *mab21l2* n'aggrave donc pas les phénotypes des mutants, ce qui suggère que les défauts observés chez les morphants sont bien spécifiques et non le produit d'effets hors-cibles.

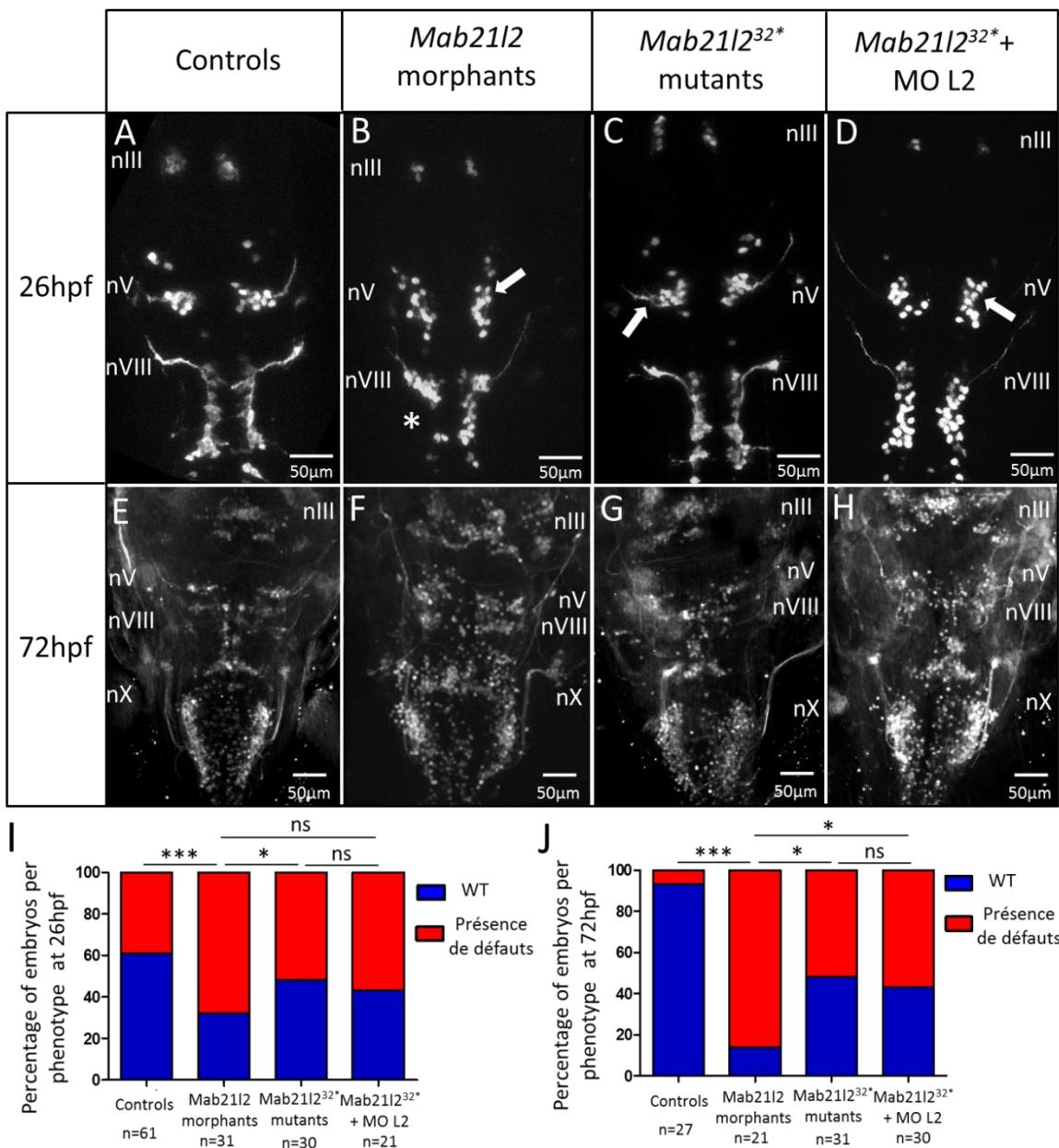


Figure 40 : L'injection du morpholino mab21l2 n'aggrave pas la sévérité des phénotypes mutants

(A-H) Vues dorsales d'embryons contrôles, morphants, mutants et mutants/morphants à 26hpf (panels du haut) et 72hpf (panels du bas) sur fond génétique Tg(*islet1:GFP*). Les flèches blanches indiquent des défauts de trajectoires axonales et l'astérisque un défaut au niveau des corps cellulaires. nIII, nerf oculo-moteur ; nV, nerf trijumeau ; nVII, nerf facial ; nX, nerf vague. (I-J) Répartition des embryons en fonction de leur phénotype wild-type (bleu) ou affecté (rouge, présentant au moins un nerf touché à 26hpf ou une désorganisation cellulaire à 72hpf). * p<0.05 ; *** p<0.001 ; ns, non significatif.

On constate néanmoins que les mutants/morphants sont toujours moins affectés que les morphants seuls, ce qui non seulement confirmerait que le morpholino n'a pas de raison d'agir sur une protéine déjà inexistante mais suggère également un phénomène de compensation

génique chez les mutants comme démontré dans plusieurs études récentes chez le poisson-zèbre (Rossi et al., 2015; El-Brolosy et al., 2019; Ma et al., 2019). La perte partielle et transitoire de Mab21l2 semblerait donc bien être à l'origine des défauts embryonnaires du rhombencéphale. En outre, l'observation fréquente selon laquelle les mutants présentent un phénotype moins sévère que ceux détectés chez les morphants serait consécutive à un phénomène de compensation génique mis en place par les cellules afin de pallier le manque d'une protéine clé. Le *knockdown* par injection d'un morpholino, même s'il conduit à une baisse de 90% du taux physiologique d'une protéine, n'induit pas ces phénomènes compensatoires tant que la perte de la protéine n'est que transitoire et partielle.

d) Les défauts du rhombencéphale sont compensés par Mab21l1 chez les mutants

Afin de vérifier si un tel phénomène de compensation génique a été mis en place chez notre mutant nul, dans la mesure où le paralogue de *mab21l2*, *mab21l1*, est également exprimé dans le cerveau postérieur du téléosté, j'ai dans un premier temps focalisé ma caractérisation d'un éventuel phénomène compensatoire sur la protéine la plus proche en structure et fonction de ma protéine d'intérêt (97% d'homologies sur la séquence primaire). Dans ce but, j'ai injecté un morpholino ciblant le site d'initiation de la traduction de Mab21l1 dans les embryons mutants *mab21l2*^{32*}. Pour réaliser cette injection, j'ai dû tout d'abord déterminer la dose *ad hoc* de morpholino *mab21l1* qui, seule, ne provoquait pas de phénotype visible sur le rhombencéphale des simples morphants afin de valider a priori mes résultats. En effet, si une aggravation du phénotype était observée chez les mutants/morphants L1, elle pourrait ainsi être attribuée à l'absence conjuguée de Mab21l2 et Mab21l1. La dose *ad hoc* établie, j'ai observé que les mutants injectés avec le morpholino *mab21l1* présentaient des défauts du rhombencéphale de même sévérité et dans les mêmes proportions que ceux que j'avais observés chez les simples morphants *mab21l2*, et ce tant à 26hpf qu'à 72hpf (Figure 41 Ceci m'a permis de confirmer mon hypothèse de départ, à savoir qu'il existe chez les mutants *mab21l2*^{32*} un phénomène compensatoire par la protéine Mab21l1 qui prend le relais de Mab21l2 afin de pallier son absence dans le rhombencéphale.

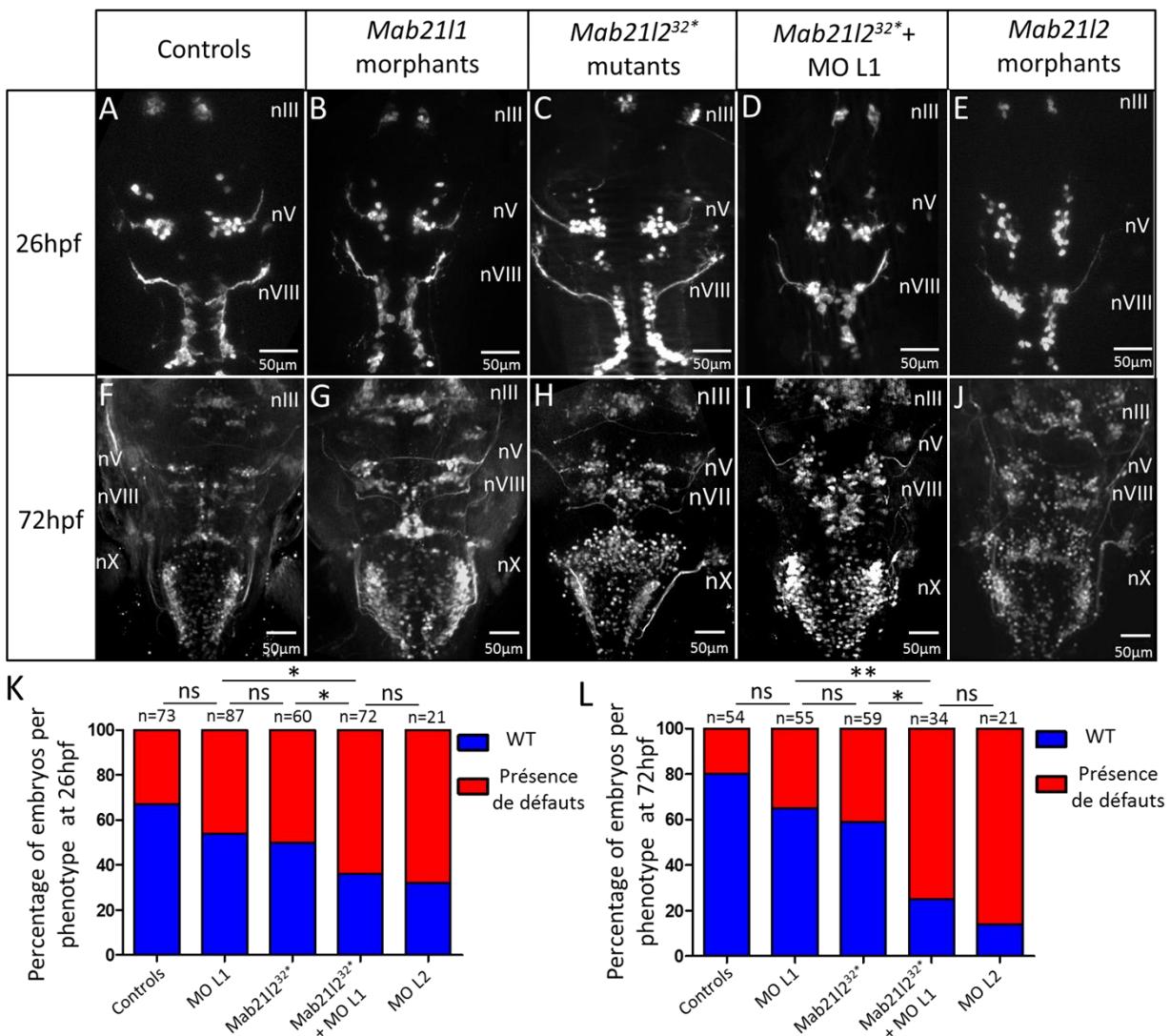


Figure 41 : Le knockdown de *Mab21l1* dans les mutants *Mab21l2^{32*}* entraîne l'aggravation des phénotypes associés à la perte de *Mab21l2* dans le rhombencéphale

(A-J) Vues dorsales d'embryons contrôles, morphants *mab21l2* (L2), morphants *mab21l1* (L1), mutants *mab21l2^{32*}* et mutants/morphants L1 à 26hpf (panels du hauts) et 72hpf (panels du bas) sur fond génétique Tg(islet1:GFP). (K-L) Répartition des embryons en fonction de leur phénotype sauvage (WT en bleu) ou présentant des défauts déjà décrits de développement du rhombencéphale (en rouge). MO L1, morpholino *mab21l1*; MO L2, morpholino *mab21l2*; * p<0.05 ; ** p<0.01 ; ns, non significatif.

e) Effet de l'absence de *Mab21l2* sur les marqueurs du rhombencéphale

Après avoir démontré le rôle crucial de *Mab21l2* dans le développement du rhombencéphale, j'ai souhaité vérifier par hybridation *in situ* si les profils d'expression de certains marqueurs spécifiques de la segmentation du cerveau postérieur et des différents rhombomères, comme *krox20*, *hoxb1a*, *mafb* et *fgf8*, étaient également perturbés (cf. Chapitre 3 II.1.a). Au stade 20 somites (Figure 42) et 24hpf (données non présentées ici), je n'ai pu observer aucune différence d'expression de ces quatre marqueurs entre les contrôles et les

morphants. D'autres gènes dont le rôle clé dans le développement du rhombencéphale a été établi, ont également été testés, dont *hoxb1b*, *hoxb2*, *hoxb3*, *hoxb4a*, *hoxb5a*, *hoxb6*, *hoxb7a*, *hoxb8b*, *hoxb9a*, *hgf3*, *mariposa/foxb1a* et *meis1.1*. L'expression de ces gènes ne semble pas plus modifiée dans les embryons morphants comparés aux contrôles que les quatre transcrits présentés ci-dessous. Afin de déterminer les gènes cibles potentiels de Mab21l2, nous avons par la suite analysé nos résultats de transcriptomique comparative avec un focus particulier sur les gènes nécessaires au bon développement du cerveau postérieur.

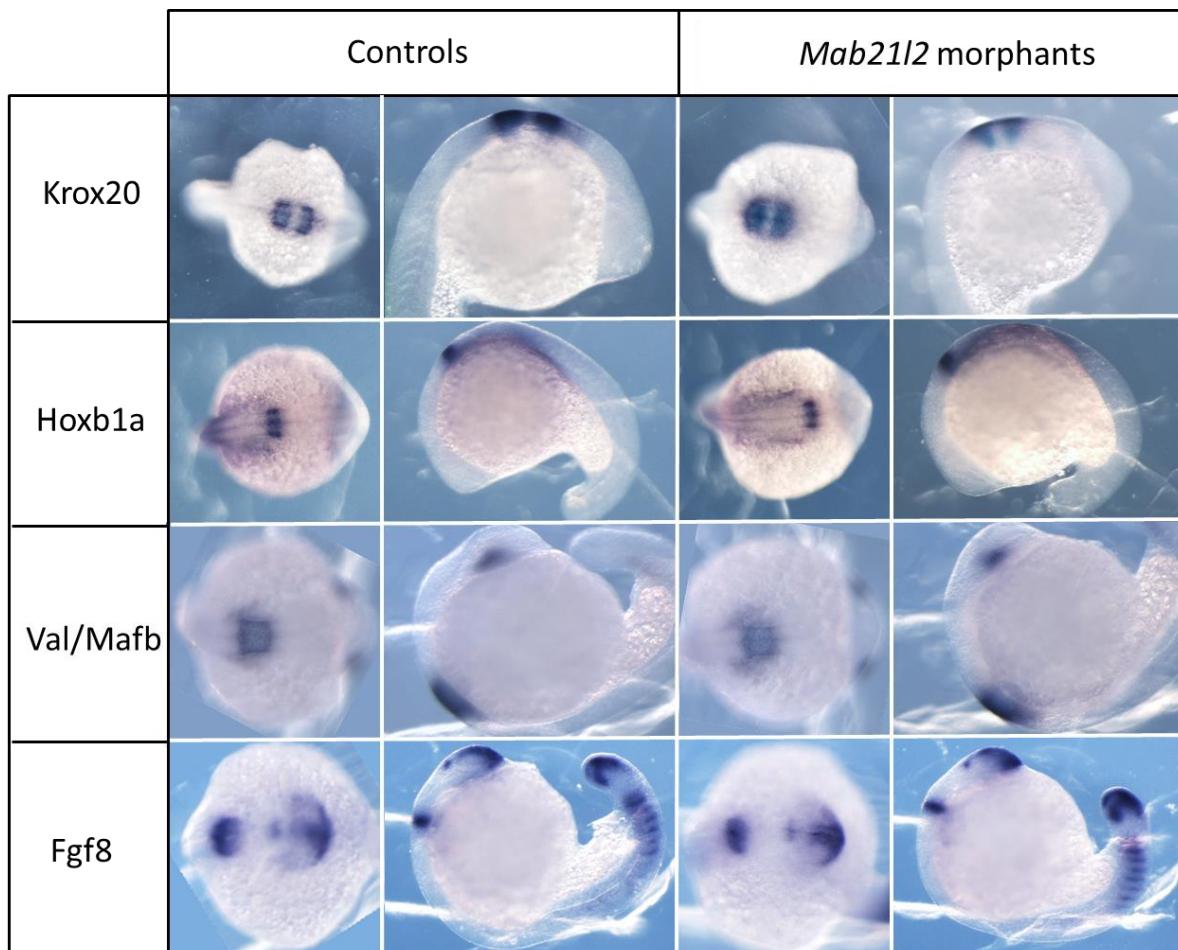


Figure 42 : Expression de certains marqueurs clés du rhombencéphale après déplétion de *Mab21l2*

Hybridation *in situ* d'embryons contrôles et morphants au stade 20 somites. Pour chaque condition, sont représentées à gauche les vues dorsales et à droite les vues latérales.

f) Analyse des résultats de notre cible transcriptomique sous l'angle du rhombencéphale

Pour expliquer les différences de sévérité observées entre morphants et mutants au niveau du phénotype du rhombencéphale et potentiellement de celui du cervelet, nous avons cherché à savoir si certains gènes impliqués dans le développement de cette région postérieure du cerveau ressortaient de notre analyse transcriptomique comparative entre perte partielle et perte totale de fonction de Mab21l2. Or, si un antagoniste commun des deux voies Wnt et Fgf, la protéine Shisa4 (Yamamoto et al., 2005), apparaît fortement réprimé chez les morphants et plus modérément chez les mutants, comparés aux contrôles à 10 somites, l'expression de celui-ci varie aussi significativement entre mutants et morphants à 10 somites comme à 25hpf. En outre, un activateur de la voie Fgf, la protéine Canopy4, est quant à lui fortement réprimé chez les embryons mutants comparés cette fois aux morphants et ce tant chez des embryons au stade 10 somites, qui incluaient le rhombencéphale (Canopy4 est alors 600 fois moins exprimé chez les mutants que chez les morphants), que dans les rétines d'embryons à 25hpf (où Canopy4 est 230 fois moins exprimés chez les mutants que chez les contrôles). Si ces deux voies Wnt et Fgf sont importantes pour le développement de la rétine, elles le sont tout autant pour la formation du rhombencéphale, des nerfs crâniens et même plus tardivement pour le développement de la lèvre rhombique qui donnera naissance au cervelet. Il serait donc particulièrement judicieux d'essayer de décrypter l'implication de ces deux voies dans les phénotypes du tronc cérébral et du cervelet des embryons et larves déplétés de Mab21l2, et de démêler leurs éventuelles différences d'implication entre une situation de perte totale (mutant) et de perte partielle et transitoire (*knockdown*) de Mab21l2.

En outre, les résultats de nos analyses transcriptomiques mettent également en lumière un ensemble de protéines dont le rôle dans le développement et l'altération pathologique du cervelet lors d'un processus neurodégénératif n'est plus à démontrer : il s'agit de la famille des ataxines impliquées dans les ataxies spino-cérébelleuses (ou SCA ; Orr, 2012; Seidel et al., 2012). Or, les gènes orthologues des gènes *SCA1*, *SCA2* et *SCA7* chez l'Homme, codant les ataxines 1b, 2 et 7 de téléoste subissent tous une activation transcriptionnelle chez les embryons morphants comparés aux contrôles (avec des rations d'environ 7 pour l'Ataxin7, à 21,5 pour l'Ataxin1b et 29,3 pour l'Ataxin2) et de façon plus modérée aux mutants. Si la surexpression de ces protéines sauvage ou avec expansion de triplets pathologiques est connue depuis des années pour altérer le développement et le maintien de l'homéostasie du cervelet (Fernandez-Funez et al., 2000), il est apparu plus récemment que certaines de ces protéines sont également impliquées dans des pathologies de la rétine. C'est entre autre le cas de l'ataxin2 incriminée

dans la survenue de glaucome à angle ouvert (Bailey et al., 2016), et des ataxin1 et ataxin7 dans les maculopathies impliquant les photorécepteurs (Morrow et al., 1999b; Thurtell et al., 2011). Il est donc à double titre intéressant de se pencher sur cette surexpression des ataxines 1, 2 et 7 chez les morphants pour mieux comprendre si et comment ces protéines peuvent influer sur la survenue et/ou la sévérité des phénotypes de l'œil, du rhombencéphale et plus tardivement du cervelet, observés dans le cadre de la perte de fonction partielle et transitoire de Mab21l2 chez le poisson-zèbre.

Chapitre 4 :

Conclusion et

perspectives

I. Mab21l2 est un élément clé du développement du système visuel

Au cours de ma thèse j'ai pu montrer par deux approches de perte de fonction que Mab21l2 joue un rôle majeur dans le développement de l'œil du poisson-zèbre. En effet, le *knockdown* par injection de morpholino contre Mab21l2 et le *knockout* via la création d'une lignée mutante par la stratégie du CRISPR/Cas9 montrent tous deux des défauts variés et sévères de la rétine, affectant les RGCs comme les photorécepteurs, ainsi que la lamination de cette structure ou encore la croissance et le guidage des axones des cellules ganglionnaires. Comme précédemment décrit chez le poulet, la souris, et le poisson-zèbre (Yamada et al., 2003; Deml et al., 2015; Sghari and Gunhaga, 2018; Gath and Gross, 2019), et par l'identification de mutations pathogènes chez l'Homme (Rainger et al., 2014; Deml et al., 2015; Horn et al., 2015) la perte de Mab21l2 engendre la présence de colobomes d'intensités variables. Ces colobomes peuvent être le résultat d'une augmentation du pédoncule optique au détriment de la rétine neurale démontrée par l'augmentation de l'expression de *pax2.1* et la diminution concomitante de *pax6* à 24hpf. La diminution de l'expression de *Pax6* a également été détectée dans une autre lignée mutante de poisson-zèbre qui présente également des colobomes (Deml et al., 2015) ainsi que lors d'expériences de *knockdown* par dsRNA chez le poulet (Sghari and Gunhaga, 2018). Il est intéressant de noter qu'une autre étude a permis de révéler une augmentation de l'expression de *mab21l2* chez des mutants *pax6*, ce qui suggèrerait l'existence d'une boucle de rétro-contrôle (Wolf et al., 2009). Mab21l2 activerait l'expression de *pax6* qui à son tour inhiberait l'expression de *mab21l2*. Si nous retrouvons le même phénomène que les mutants décrits dans la littérature quant à la réduction de *pax6*, la situation concernant l'augmentation du patron de *pax2.1* est légèrement différente. Dans les lignées mutantes *mab21l2^{Q48Sfs*5}* et *mab21l2^{R51_F52del}*, l'augmentation de l'expression de *pax2.1* n'est détectée qu'à partir de 48hpf et non à 24hpf comme j'ai pu l'observer (Deml et al., 2015). Cette petite discordance pourrait s'expliquer par la différence de stratégies de perte de fonction utilisées: Deml et co. ont analysé l'expression de *pax2.1* dans leur lignée mutante alors que nous l'avons étudiée chez nos morphants. Cette expression sera dans un futur proche analysée dans ma lignée mutante *mab21l2^{32*}* afin de vérifier à quel stade exactement apparaît cette augmentation d'expression. Il doit être noté, toutefois, qu'une altération de l'expression de *pax2.1* à un stade plus précoce comme 24hpf est en accord avec la formation de colobomes.

Une autre observation importante concerne la diminution du nombre de RGCs associée à l'hypoplasie du nerf optique et aux défauts de leur trajectoire axonale au niveau du chiasma

optique lors de la perte de fonction de Mab21l2. Si la baisse du nombre de RGCs et l'hypoplasie du nerf optique à la sortie de la rétine avaient déjà été observées par le passé (Rainger et al., 2014; Deml et al., 2015; Sghari and Gunhaga, 2018), les défasciculations et trajectoires axonales anormales au niveau du chiasma optique constitue un nouvel apport d'informations. Au vu des données précédentes quant au rôle de Mab21l2 dans le destin cellulaire, il est probable que ces défauts du nerf optique soient consécutifs à une spécification incorrecte des RGCs qui, de fait, entraînerait l'incapacité des axones à reconnaître et intégrer la signalisation établie par les molécules de guidage. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de RGCs et de photorécepteurs localisés dans les mauvaises couches cellulaires lors de l'examen de la lamination des rétines morphantes et mutantes *mab21l2*^{32*}. Il semblerait donc que Mab21l2 joue un rôle déterminant dans la spécification des différents types cellulaires au cours de la rétinogénèse. Lors de ma thèse je n'ai observé que les RGCs et photorécepteurs, en raison du fait qu'elles sont les premières et dernières cellules à se différencier, une étude récente a toutefois montré qu'une perte de fonction partielle et transitoire de *mab21l2* par dsRNA chez l'embryon de poulet induit également une diminution significative des marqueurs des cellules amacrines et horizontales (Sghari and Gunhaga, 2018). Il semblerait donc que tous les types cellulaires de la rétine soient affectés par la perte de Mab21l2 ce qui renforce son rôle « global » dans le développement de la rétine. Un point de différence existe cependant entre cette étude et mes travaux de thèse : j'ai en effet observé que les mutants *mab21l2*^{32*} présente des spots d'expression ectopique d'Islet1 dans la GCL et l'INL, alors que Sghari et Gunhaga ont, eux, observé une diminution des RGCs positives pour Islet1. Cette contradiction apparente pourrait s'expliquer de plusieurs manières liées entre elles: la première étant bien évidemment la différence de modèle animal, et donc une différence potentielle entre poisson et poulet ; la deuxième étant le stade observé sachant que l'expression d'Islet1 dans la rétine varie au cours du temps et qu'il est difficile d'associer précisément un stade embryonnaire d'étude entre le poulet et le téléostéen. Enfin, l'expression intrinsèque d'Islet1 pourrait être différente entre poisson-zèbre et poulet, et ce en fonction des stades de développement ou non: en effet *mab21l2* est par exemple exprimé, voire enrichi, dans le rhombencéphale de poisson-zèbre et de souris, mais il n'apparaît jamais dans le cerveau postérieur de l'embryon de poulet quel que soit le stade (données personnelle de Jamilé Hazan).

Au cours de ma thèse, j'ai également pu observer que la perte de fonction partielle mais pas totale de Mab21l2, conduit à une légère augmentation de l'apoptose. Si cette augmentation peut être associée à l'usage des morpholinos *per se*, sachant que c'est l'un des effets hors cibles les plus fréquents de l'injection de MOs, il faut noter qu'une augmentation de l'apoptose a

également été observée chez les mutants de poisson-zèbre préalablement décrits (Deml et al., 2015; Gath and Gross, 2019) ainsi que chez le mutant murin (Saito et al., 2012) et ce, couplée à une diminution de la prolifération. En outre, la voie de signalisation p53 est fortement activée chez les morphants, comme en témoignent les nombreux gènes liés à cette voie que l'on retrouve dérégulés lors de nos analyses transcriptomiques comparatives chez les morphants. Si certains de ces gènes ont été déjà impliqués dans des effets hors-cibles liés à l'usage des morpholinos, d'autres semblent plus spécifiques de processus cellulaires qui conduisent éventuellement à une mort cellulaire programmée et dans lesquels Mab21l2 pourrait être impliqué. La question qui se pose maintenant est de savoir si l'augmentation de l'apoptose induite par l'activation de la voie p53 n'est qu'aspécifique chez les morphants ou non ? Et dans ce cas quels seraient les mécanismes compensatoires qui l'inhiberaient lors de la perte totale de Mab21l2 chez les mutants ?

II. Mais Mab21l2 est également requis dans la formation du rhombencéphale et du cervelet

En plus de son rôle dans le développement de l'œil, mon travail de thèse a également permis de révéler l'implication de Mab21l2 dans la formation du rhombencéphale. A 72hpf, les mutants et les morphants montrent tous deux une sévère désorganisation du cerveau postérieur avec des cellules localisées de façon anarchique et des trajectoires axonales anormales de certains nerfs crâniens. Ce rôle de Mab21l2 dans le rhombencéphale n'avait jusqu'alors jamais été mis en évidence bien qu'il y soit fortement exprimé chez le poisson comme chez la souris. Il serait maintenant intéressant d'analyser si Mab21l2 joue la même la fonction cellulaire dans l'œil et dans le rhombencéphale ou bien s'il est impliqué dans différents processus cellulaires et/ou moléculaires en fonction de sa région d'expression. Il est en effet concevable qu'il agisse de manière similaire dans ces deux régions du système nerveux dans la mesure où de nombreuses molécules essentielles au développement *ad hoc* de ces deux structures sont communes : je fais ici référence entre autres à Pax6, Meis, ou encore les voies Fgf, Wnt (retrouvées dérégulées entre morphants, mutants et contrôles lors de nos analyses transcriptomiques comparatives), etc.

Il est cependant intéressant de noter que l'on observe des défauts plus précoces du rhombencéphale chez les morphants, et ce dès 24hpf, que chez les mutants, ce qui met en évidence des différences de sévérité de phénotypes entre ces deux populations d'embryons déplétés partiellement ou totalement de Mab21l2. Ces différences de sévérité ont pu également

être constatées dans le système visuel dans la mesure où les mutants récupèrent un nombre *ad hoc* de photorécepteurs plus tôt que les morphants (4dpf vs 5dpf). Cette plus grande sévérité des phénotypes morphants n'est pas complètement surprenante, puisque le *knockdown* par injection de morpholino est fréquemment associé à des effets hors cibles (Stainier et al., 2017). Cependant, dans notre cas, l'injection du morpholino dans des embryons mutants n'aggrave en aucune façon les phénotypes mutants qui semblent donc spécifiques. Ceci suggère qu'il existerait un phénomène de compensation génique chez le mutant, comme il l'a été montré par plusieurs études (Rossi et al., 2015 ; El-Brolosy et al., 2019 ; Ma et al., 2019). En outre, j'ai pu montrer que le *knockdown* de *mab21l1* dans les embryons mutants *mab21l2*^{32*} engendre une aggravation des phénotypes du mutant non injecté pour atteindre le niveau de sévérité des morphants *mab21l2*. Il semble donc que Mab21l2 et Mab21l1 agissent de concert dans le développement du rhombencéphale. Pour valider définitivement cette observation, il me faudra vérifier si la double injection de morpholinos contre Mab21l1 et Mab21l2 donnent le même résultat, voire d'analyser le phénotype d'une lignée mutante *mab21l1* générée par le Sanger Centre.

Une éventuelle interaction génique entre *mab21l2* et *mab21l1* au niveau du cervelet serait également envisageable. J'ai en effet pu observer que la perte partielle de Mab21l2 entraîne une hypoplasie du cervelet, résultat qui reste encore à confirmer chez mon mutant. Or, de manière intéressante, Mab21l1 a récemment été associé chez l'Homme à des malformations génétiques multisyndromiques incluant une hypoplasie sévère du cervelet (Bruel et al., 2017; Rad et al., 2019). Il serait donc envisageable que Mab21l2 et Mab21l1 agissent de concert au niveau du cervelet, et dans cette hypothèse, nous étudierons le développement de cette structure dans mes mutants *mab21l2*^{32*} sur fond génétique Tg(*Olig2:GFP*) ainsi que dans la lignée mutante *mab21l1* qui devrait arriver prochainement dans notre animalerie. En plus de Mab21l1, d'autres protéines issues de notre cible transcriptomique, dont les ataxines 1b, 2 et 7, ou encore les régulateurs des voies Wnt et Fgf seront testés pour leur implication éventuelle dans les phénomènes compensatoires probables chez le mutant *mab21l2*³².

III. Morphants et mutants donnent des phénotypes similaires

Ce travail de thèse réalisé en parallèle sur des embryons morphants et une lignée mutante CRSPR/Cas9 a permis de mettre en lumière plusieurs observations quant à l'usage très décrié des morpholinos. En effet depuis 2015, l'utilisation de morpholinos et plus globalement les

stratégies de *knockdown* ont été beaucoup remises en question, en raison de leurs « nombreux effets hors-cibles ». Cependant, ma caractérisation des phénotypes liés à la perte de fonction partielle ou totale de Mab21l2 montre que les morphants et les mutants présentent des phénotypes très similaires entre eux au niveau du système visuel, et qu'en outre, ces phénotypes ressemblent également beaucoup à ceux décrits pour les mutants préalablement rapportés dans la littérature. Il semblerait donc que dans le cadre de mon étude, le morpholino contre Mab21l2 n'engendre que très peu de défauts non spécifiques. Le morpholino étant un outil peu couteux, simple et rapide d'utilisation, il serait peu judicieux de se passer de son utilisation que ce soit pour des études préliminaires nécessitant des réponses rapides ou pour une analyse plus détaillé dans la mesure où certains phénotypes spécifiques n'apparaissent pas chez les mutants en raison de phénomènes compensatoires (Rossi et al., 2015; El-Brolosy et al., 2019; Ma et al., 2019). En cas d'observations différentes entre mutants et morphants, il est alors important de réaliser plusieurs contrôles de spécificité du morpholino tels que son injection dans une lignée mutante, ainsi que l'injection d'un deuxième, voire d'un troisième morpholino qui reconnaît une séquence différente sur le transcrit, etc. (Stainier et al., 2017). Un autre contrôle de la spécificité du phénotype consiste à réaliser des expériences de sauvetages phénotypiques en injectant conjointement le morpholino et le transcrit de la protéine de la protéine d'intérêt provenant d'une autre espèce, et pour des raisons d'intérêt en génétique humaine par exemple l'ARNm humain avec ou sans variant. Cette validation par sauvetage présente toutefois certaines limitations, dont la taille du transcrit, et la dose à trouver lorsque la protéine d'intérêt s'avère toxique en surexpression ou conduisant à un phénotype de gain de fonction.

En conclusion, je pense que les morpholinos doivent continuer à être utilisés avec prudence mais qu'ils restent des outils utiles et rapides pour observer les défauts engendrés par la perte de fonction d'une protéine donnée.

Bibliographie

- Abouzeid, H., Favez, T., Schmid, A., Agosti, C., Youssef, M., Marzouk, I., El Shakankiry, N., Bayoumi, N., Munier, F.L., and Schorderet, D.F. (2014). Mutations in ALDH1A3 Represent a Frequent Cause of Microphthalmia/Anophthalmia in Consanguineous Families. *Human Mutation* 35, 949–953.
- Addison, M., Xu, Q., Cayuso, J., and Wilkinson, D.G. (2018). Cell Identity Switching Regulated by Retinoic Acid Signaling Maintains Homogeneous Segments in the Hindbrain. *Developmental Cell* 45, 606-620.e3.
- Akey, D.T., Zhu, X., Dyer, M., Li, A., Sorensen, A., Blackshaw, S., Fukuda-Kamitani, T., Daiger, S.P., Craft, C.M., Kamitani, T., et al. (2002). The inherited blindness associated protein AIPL1 interacts with the cell cycle regulator protein NUB1. *Hum Mol Genet* 11, 2723–2733.
- Aldahmesh, M.A., Khan, A.O., Hijazi, H., and Alkuraya, F.S. (2013). Homozygous truncation of SIX6 causes complex microphthalmia in humans. *Clinical Genetics* 84, 198–199.
- Almeida, A.D., Boije, H., Chow, R.W., He, J., Tham, J., Suzuki, S.C., and Harris, W.A. (2014). Spectrum of Fates: a new approach to the study of the developing zebrafish retina. 11.
- Andreazzoli, M., Gestri, G., Angeloni, D., Menna, E., and Barsacchi, G. (1999). Role of Xrx1 in Xenopus eye and anterior brain development. *Development* 126, 2451–2460.
- Asai-Coakwell, M., French, C.R., Berry, K.M., Ye, M., Koss, R., Somerville, M., Mueller, R., van Heyningen, V., Waskiewicz, A.J., and Lehmann, O.J. (2007). GDF6, a Novel Locus for a Spectrum of Ocular Developmental Anomalies. *The American Journal of Human Genetics* 80, 306–315.
- Asai-Coakwell, M., French, C.R., Ye, M., Garcha, K., Bigot, K., Perera, A.G., Staehling-Hampton, K., Mema, S.C., Chanda, B., Mushegian, A., et al. (2009). Incomplete penetrance and phenotypic variability characterize Gdf6-attributable oculo-skeletal phenotypes. *Hum Mol Genet* 18, 1110–1121.
- Asai-Coakwell, M., March, L., Dai, X.H., DuVal, M., Lopez, I., French, C.R., Famulski, J., De Baere, E., Francis, P.J., Sundaresan, P., et al. (2013). Contribution of growth differentiation factor 6-dependent cell survival to early-onset retinal dystrophies. *Hum Mol Genet* 22, 1432–1442.
- Augustine, K., Liu, E.T., and Sadler, T.W. (1993). Antisense attenuation of Wnt-1 and Wnt-3a expression in whole embryo culture reveals roles for these genes in craniofacial, spinal cord, and cardiac morphogenesis. *Dev. Genet.* 14, 500–520.
- Augustine, K.A., Liu, E.T., and Sadler, T.W. (1995). Interactions of Wnt-1 and Wnt-3a are essential for neural tube patterning. *Teratology* 51, 107–119.

Azuma, N., Yamaguchi, Y., Handa, H., Tadokoro, K., Asaka, A., Kawase, E., and Yamada, M. (2003). Mutations of the PAX6 Gene Detected in Patients with a Variety of Optic-Nerve Malformations. *The American Journal of Human Genetics* 72, 1565–1570.

Bailey, J.N.C., Loomis, S.J., Kang, J.H., Allingham, R.R., Gharakhani, P., Khor, C.C., Burdon, K.P., Aschard, H., Chasman, D.I., Igo, R.P., et al. (2016). Genome-wide association analysis identifies TXNRD2, ATXN2 and FOXC1 as susceptibility loci for primary open-angle glaucoma. *Nature Genetics* 48, 189–194.

Baird, S.E., Fitch, D.H.A., Kassem, I.A.A., and EMMONSt, S.W. (1991). Pattern formation in the nematode epidermis: determination of the arrangement of peripheral sense organs in the *C. elegans* male tail. 12.

Bakrania, P., Efthymiou, M., Klein, J.C., Salt, A., Bunyan, D.J., Wyatt, A., Ponting, C.P., Martin, A., Williams, S., Lindley, V., et al. (2008). Mutations in BMP4 Cause Eye, Brain, and Digit Developmental Anomalies: Overlap between the BMP4 and Hedgehog Signaling Pathways. *The American Journal of Human Genetics* 82, 304–319.

Baldessari, D., Badaloni, A., Longhi, R., Zappavigna, V., and Consalez, G.G. (2004). MAB21L2, a vertebrate member of the Male-abnormal 21 family, modulates BMP signaling and interacts with SMAD. *BMC Cell Biology* 13.

Bally-Cuif, L., Dubois, L., and Vincent, A. (1998). Molecular cloning of Zco2, the zebrafish homolog of Xenopus Xco2 and mouse EBF-2, and its expression during primary neurogenesis. *Mechanisms of Development* 77, 85–90.

Balmer, J.E., and Blomhoff, R. (2002). Gene expression regulation by retinoic acid. *J. Lipid Res.* 43, 1773–1808.

Barrow, J.R., and Capecchi, M.R. (1996). Targeted disruption of the Hoxb-2 locus in mice interferes with expression of Hoxb-1 and Hoxb-4. *Development* 122, 3817–3828.

Barth, K.A., Kishimoto, Y., Rohr, K.B., Seydler, C., Schulte-Merker, S., and Wilson, S.W. (1999). Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development* 126, 4977–4987.

Barton, K.M., and Levine, E.M. (2008). Expression patterns and cell cycle profiles of PCNA, MCM6, cyclin D1, cyclin A2, cyclin B1, and phosphorylated histone H3 in the developing mouse retina. *Developmental Dynamics* 237, 672–682.

Bar-Yosef, U., Abuelaish, I., Harel, T., Hendler, N., Ofir, R., and Birk, O.S. (2004). CHX10 mutations cause non-syndromic microphthalmia/anophthalmia in Arab and Jewish kindreds. *Hum Genet* 115, 302–309.

Baye, L.M., and Link, B.A. (2007). Interkinetic Nuclear Migration and the Selection of Neurogenic Cell Divisions during Vertebrate Retinogenesis. *J. Neurosci.* 27, 10143–10152.

Bazin-Lopez, N., Valdivia, L.E., Wilson, S.W., and Gestri, G. (2015). Watching eyes take shape. *Current Opinion in Genetics & Development* 32, 73–79.

- Begemann, G., Schilling, T.F., Rauch, G.-J., Geisler, R., and Ingham, P.W. (2001). The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development* 128, 3081–3094.
- Bejarano-Escobar, R., Álvarez-Hernán, G., Morona, R., González, A., Martín-Partido, G., and Francisco-Morcillo, J. (2015). Expression and function of the LIM-homeodomain transcription factor Islet-1 in the developing and mature vertebrate retina. *Experimental Eye Research* 138, 22–31.
- Belecky-Adams, T., Tomarev, S., Li, H.S., Ploder, L., McInnes, R.R., Sundin, O., and Adler, R. (1997). Pax-6, Prox 1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1293–1303.
- Bell, E., Wingate, R.J.T., and Lumsden, A. (1999). Homeotic Transformation of Rhombomere Identity After Localized Hoxb1 Misexpression. *Science* 284, 2168–2171.
- Belloni, E., Muenke, M., Roessler, E., Traverse, G., Siegel-Bartelt, J., Frumkin, A., Mitchell, H.F., Donis-Keller, H., Helms, C., Hing, A.V., et al. (1996). Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 14, 353–356.
- Bergeron, S.A., Tyurina, O.V., Miller, E., Bagas, A., and Karlstrom, R.O. (2011). brother of cdo (umleitung) is cell-autonomously required for Hedgehog-mediated ventral CNS patterning in the zebrafish. *Development* 138, 75–85.
- Berry, D.C., Jacobs, H., Marwarha, G., Gely-Pernot, A., O’Byrne, S.M., DeSantis, D., Klopfenstein, M., Feret, B., Dennefeld, C., Blaner, W.S., et al. (2013). The STRA6 Receptor Is Essential for Retinol-binding Protein-induced Insulin Resistance but Not for Maintaining Vitamin A Homeostasis in Tissues Other Than the Eye. *J. Biol. Chem.* 288, 24528–24539.
- Bertuzzi, S., Hindges, R., Mui, S.H., O’Leary, D.D.M., and Lemke, G. (1999). The homeodomain protein Vax1 is required for axon guidance and major tract formation in the developing forebrain. *Genes Dev.* 13, 3092–3105.
- Bessa, J., Gebelein, B., Pichaud, F., Casares, F., and Mann, R.S. (2002). Combinatorial control of Drosophila eye development by Eyeless, Homothorax, and Teashirt. *Genes Dev.* 16, 2415–2427.
- Bessa, J., Tavares, M.J., Santos, J., Kikuta, H., Laplante, M., Becker, T.S., Gomez-Skarmeta, J.L., and Casares, F. (2008). meis1 regulates cyclin D1 and c-myc expression, and controls the proliferation of the multipotent cells in the early developing zebrafish eye. *Development* 135, 799–803.
- Bingham, S., Higashijima, S., Okamoto, H., and Chandrasekhar, A. (2002). The Zebrafish trilobite Gene Is Essential for Tangential Migration of Branchiomotor Neurons. *Developmental Biology* 242, 149–160.
- Birgbauer, E., Cowan, C.A., Sretavan, D.W., and Henkemeyer, M. (2000). Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development* 127, 1231–1241.

- Blixt, Å., Mahlapuu, M., Aitola, M., Pelto-Huikko, M., Enerbäck, S., and Carlsson, P. (2000). A forkhead gene, FoxE3, is essential for lens epithelial proliferation and closure of the lens vesicle. *Genes Dev.* *14*, 245–254.
- Blumberg, B., Bolado, J., Moreno, T.A., Kintner, C., Evans, R.M., and Papalopulu, N. (1997). An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development* *124*, 373–379.
- Böhm, J., Buck, A., Borozdin, W., Mannan, A.U., Matysiak-Scholze, U., Adham, I., Schulz-Schaeffer, W., Floss, T., Wurst, W., Kohlhase, J., et al. (2008). Sall1, Sall2, and Sall4 Are Required for Neural Tube Closure in Mice. *The American Journal of Pathology* *173*, 1455–1463.
- Bouchoucha, Y.X., Reingruber, J., Labalette, C., Wassef, M.A., Thierion, E., Desmarquet-Trin Dinh, C., Holcman, D., Gilardi-Hebenstreit, P., and Charnay, P. (2013). Dissection of a Krox20 positive feedback loop driving cell fate choices in hindbrain patterning. *Molecular Systems Biology* *9*, 690.
- Bouillet, P., Sapin, V., Chazaud, C., Messaddeq, N., Décimo, D., Dollé, P., and Chambon, P. (1997). Developmental expression pattern of Stra6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein. *Mechanisms of Development* *63*, 173–186.
- 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.
- Brancolini, C., Bottega, S., and Schneider, C. (1992). Gas2, a growth arrest-specific protein, is a component of the microfilament network system. *J Cell Biol* *117*, 1251–1261.
- Brand, M., Heisenberg, C.P., Warga, R.M., Pelegri, F., Karlstrom, R.O., Beuchle, D., Picker, A., Jiang, Y.J., Furutani-Seiki, M., Eeden, F.J. van, et al. (1996). Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Development* *123*, 129–142.
- Brittis, P.A., Silver, J., Walsh, F.S., and Doherty, P. (1996). Fibroblast Growth Factor Receptor Function Is Required for the Orderly Projection of Ganglion Cell Axons in the Developing Mammalian Retina. *Molecular and Cellular Neuroscience* *8*, 120–128.
- Brown, J.D., Dutta, S., Bharti, K., Bonner, R.F., Munson, P.J., Dawid, I.B., Akhtar, A.L., Onojafe, I.F., Alur, R.P., Gross, J.M., et al. (2009). Expression profiling during ocular development identifies 2 Nlz genes with a critical role in optic fissure closure. *PNAS* *106*, 1462–1467.
- Brown, K.E., Keller, P.J., Ramialison, M., Rembold, M., Stelzer, E.H.K., Loosli, F., and Wittbrodt, J. (2010). Nlcam modulates midline convergence during anterior neural plate morphogenesis. *Developmental Biology* *339*, 14–25.
- Brown, N.L., Patel, S., Brzezinski, J., and Glaser, T. (2001). Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation. *Development* *128*, 2497–2508.
- Brownell, I., Dirksen, M., and Jamrich, M. (2000). Forkhead Foxe3 maps to the dysgenetic lens locus and is critical in lens development and differentiation. *Genesis* *27*, 81–93.

- Bruel, A.-L., Masurel-Paulet, A., Rivière, J.-B., Duffourd, Y., Lehalle, D., Bensignor, C., Huet, F., Borgnon, J., Roucher, F., Kuentz, P., et al. (2017). Autosomal recessive truncating MAB21L1 mutation associated with a syndromic scrotal agenesis. *Clinical Genetics* *91*, 333–338.
- Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., Prochiantz, A., and Holt, C. (2005). The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* *438*, 94–98.
- Brzezinski, J.A., Lamba, D.A., and Reh, T.A. (2010). Blimp1 controls photoreceptor versus bipolar cell fate choice during retinal development. *Development* *137*, 619–629.
- Bumsted-O'Brien, K.M., Hendrickson, A., Haverkamp, S., Ashery-Padan, R., and Schulte, D. (2007). Expression of the homeodomain transcription factor Meis2 in the embryonic and postnatal retina. *Journal of Comparative Neurology* *505*, 58–72.
- Burmeister, M., Novak, J., Liang, M.-Y., Basu, S., Ploder, L., Hawes, N.L., Vidgen, D., Hoover, F., Goldman, D., Kalnins, V.I., et al. (1996). Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nat Genet* *12*, 376–384.
- Burrill, J.D., and Easter, S.S. (1995). The first retinal axons and their microenvironment in zebrafish: cryptic pioneers and the pretract. *J. Neurosci.* *15*, 2935–2947.
- Buttitta, L.A., and Edgar, B.A. (2007). Mechanisms controlling cell cycle exit upon terminal differentiation. *Current Opinion in Cell Biology* *19*, 697–704.
- Calzolari, S., Terriente, J., and Pujades, C. (2014). Cell segregation in the vertebrate hindbrain relies on actomyosin cables located at the interhombomeric boundaries. *The EMBO Journal* *33*, 686–701.
- Carnes, M.U., Liu, Y.P., Allingham, R.R., Whigham, B.T., Havens, S., Garrett, M.E., Qiao, C., Investigators, N.C., Katsanis, N., Wiggs, J.L., et al. (2014). Discovery and Functional Annotation of SIX6 Variants in Primary Open-Angle Glaucoma. *PLOS Genetics* *10*, e1004372.
- Carpenter, E.M., Goddard, J.M., Chisaka, O., Manley, N.R., and Capecchi, M.R. (1993). Loss of Hox-A1 (Hox-1.6) function results in the reorganization of the murine hindbrain. *Development* *118*, 1063–1075.
- Carreira-Barbosa, F., Concha, M.L., Takeuchi, M., Ueno, N., Wilson, S.W., and Tada, M. (2003). Prickle 1 regulates cell movements during gastrulation and neuronal migration in zebrafish. *Development* *130*, 4037–4046.
- Carroll, S.B. (1995). Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* *376*, 479–485.
- Casey, J., Kawaguchi, R., Morrissey, M., Sun, H., McGettigan, P., Nielsen, J.E., Conroy, J., Regan, R., Kenny, E., Cormican, P., et al. (2011). First implication of STRA6 mutations in isolated anophthalmia, microphthalmia, and coloboma: A new dimension to the STRA6 phenotype. *Human Mutation* *32*, 1417–1426.

- Cayouette, M., and Raff, M. (2003). The orientation of cell division influences cell-fate choice in the developing mammalian retina. *Development* 130, 2329–2339.
- Cayuso, J., Xu, Q., Addison, M., and Wilkinson, D.G. (2019). Actomyosin regulation by Eph receptor signaling couples boundary cell formation to border sharpness. *ELife* 8, e49696.
- Cepko, C. (2014). Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 615–627.
- Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M., and Ezzeddine, D. (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. *PNAS* 93, 589–595.
- Chan, J., Mably, J.D., Serluca, F.C., Chen, J.-N., Goldstein, N.B., Thomas, M.C., Cleary, J.A., Brennan, C., Fishman, M.C., and Roberts, T.M. (2001). Morphogenesis of Prechordal Plate and Notochord Requires Intact Eph/Ephrin B Signaling. *Developmental Biology* 234, 470–482.
- Chandrasekhar, A., Moens, C.B., Warren, J.T., Kimmel, C.B., and Kuwada, J.Y. (1997). Development of branchiomotor neurons in zebrafish. *Development* 124, 2633–2644.
- Chang, T., Mazotta, J., Dumstrei, K., Dumitrescu, A., and Hartenstein, V. (2001). Dpp and Hh signaling in the Drosophila embryonic eye field. *Development* 128, 4691–4704.
- Chassaing, N., Golzio, C., Odent, S., Lequeux, L., Vigouroux, A., Martinovic-Bouriel, J., Tiziano, F.D., Masini, L., Piro, F., Maragliano, G., et al. (2009). Phenotypic spectrum of STRA6 mutations: from Matthew-Wood syndrome to non-lethal anophthalmia. *Human Mutation* 30, E673–E681.
- Chassaing, N., Sorrentino, S., Davis, E.E., Martin-Coignard, D., Iacobelli, A., Paznekas, W., Webb, B.D., Faye-Petersen, O., Encha-Razavi, F., Lequeux, L., et al. (2012). OTX2 mutations contribute to the otocephaly-dysgnathia complex. *Journal of Medical Genetics* 49, 373–379.
- Chassaing, N., Causse, A., Vigouroux, A., Delahaye, A., Alessandri, J.-L., Boespflug-Tanguy, O., Boute-Bénéjean, O., Dollfus, H., Duban-Bedu, B., Gilbert-Dussardier, B., et al. (2014). Molecular findings and clinical data in a cohort of 150 patients with anophthalmia/microphthalmia. *Clinical Genetics* 86, 326–334.
- Chenn, A., and McConnell, S.K. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of notchl immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82, 631–641.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407–413.
- Chisaka, O., Musci, T.S., and Capecchi, M.R. (1992). Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene Hox-#150;1.6. *Nature* 355, 516–520.
- Chitayat, D., Sroka, H., Keating, S., Colby, R.S., Ryan, G., Toi, A., Blaser, S., Viero, S., Devisme, L., Boute-Bénéjean, O., et al. (2007). The PDAC syndrome (pulmonary hypoplasia/agenesis, diaphragmatic hernia/eventration, anophthalmia/microphthalmia, and cardiac defect) (Spear syndrome, Matthew-Wood syndrome): Report of eight cases including

a living child and further evidence for autosomal recessive inheritance. *American Journal of Medical Genetics Part A* *143A*, 1268–1281.

Choe, S.-K., Vlachakis, N., and Sagerström, C.G. (2002). Meis family proteins are required for hindbrain development in the zebrafish. *Development* *129*, 585–595.

Choe, S.-K., Lu, P., Nakamura, M., Lee, J., and Sagerström, C.G. (2009). Meis Cofactors Control HDAC and CBP Accessibility at Hox-Regulated Promoters during Zebrafish Embryogenesis. *Developmental Cell* *17*, 561–567.

Choe, S.-K., Ladam, F., and Sagerström, Charles.G. (2014). TALE Factors Poise Promoters for Activation by Hox Proteins. *Developmental Cell* *28*, 203–211.

Chomette, D., Frain, M., Cereghini, S., Charnay, P., and Ghislain, J. (2006). Krox20 hindbrain cis-regulatory landscape: interplay between multiple long-range initiation and autoregulatory elements. *Development* *133*, 1253–1262.

Chow, R.L., and Lang, R.A. (2001). Early Eye Development in Vertebrates. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *17*, 255–296.

Chow, K.L., Hall, D.H., and Emmons, S.W. (1995). The mab-21 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a novel protein required for choice of alternate cell fates. *12*.

Chow, R.W., Almeida, A.D., Randlett, O., Norden, C., and Harris, W.A. (2015). Inhibitory neuron migration and IPL formation in the developing zebrafish retina. *Development* *142*, 2665–2677.

Choy, S.W., Wong, Y.M., Ho, S.H., and Chow, K.L. (2007). *C. elegans* SIN-3 and its associated HDAC corepressor complex act as mediators of male sensory ray development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *358*, 802–807.

Chuang, J.C., and Raymond, P.A. (2001). Zebrafish Genes rx1 and rx2 Help Define the Region of Forebrain That Gives Rise to Retina. *Developmental Biology* *231*, 13–30.

Chuang, J.C., and Raymond, P.A. (2002). Embryonic origin of the eyes in teleost fish. *BioEssays* *24*, 519–529.

Cid, E., Santos-Ledo, A., Parrilla-Monge, M., Lillo, C., Arévalo, R., Lara, J.M., Aijón, J., and Velasco, A. (2010). Prox1 expression in rod precursors and Müller cells. *Experimental Eye Research* *90*, 267–276.

Cooke, J., Moens, C., Roth, L., Durbin, L., Shiomi, K., Brennan, C., Kimmel, C., Wilson, S., and Holder, N. (2001). Eph signalling functions downstream of Val to regulate cell sorting and boundary formation in the caudal hindbrain. *Development* *128*, 571–580.

Cooke, J.E., Kemp, H.A., and Moens, C.B. (2005). EphA4 Is Required for Cell Adhesion and Rhombomere-Boundary Formation in the Zebrafish. *Current Biology* *15*, 536–542.

Cooper, K.L., Leisenring, W.M., and Moens, C.B. (2003). Autonomous and nonautonomous functions for Hox/Pbx in branchiomotor neuron development. *Developmental Biology* *253*, 200–213.

- Corral, R.D. del, and Storey, K.G. (2004). Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *BioEssays* *26*, 857–869.
- Culverwell, J., and Karlstrom, R.O. (2002). Making the connection: retinal axon guidance in the zebrafish. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *13*, 497–506.
- Cunningham, J.J., Levine, E.M., Zindy, F., Goloubeva, O., Roussel, M.F., and Smeyne, R.J. (2002). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p19Ink4d and p27Kip1 Are Coexpressed in Select Retinal Cells and Act Cooperatively to Control Cell Cycle Exit. *Molecular and Cellular Neuroscience* *19*, 359–374.
- Dansault, A., David, G., Schwartz, C., Jaliffa, C., Vieira, V., de la Houssaye, G., Bigot, K., Catin, F., Tattu, L., Chopin, C., et al. (2007). Three new PAX6 mutations including one causing an unusual ophthalmic phenotype associated with neurodevelopmental abnormalities. *Mol Vis* *13*, 511–523.
- Das, B.C., Thapa, P., Karki, R., Das, S., Mahapatra, S., Liu, T.-C., Torregroza, I., Wallace, D.P., Kambhampati, S., Van Veldhuizen, P., et al. (2014). Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* *22*, 673–683.
- Davenne, M., Maconochie, M.K., Neun, R., Pattyn, A., Chambon, P., Krumlauf, R., and Rijli, F.M. (1999). Hoxa2 and Hoxb2 Control Dorsoventral Patterns of Neuronal Development in the Rostral Hindbrain. *Neuron* *22*, 677–691.
- Deans, M.R., Krol, A., Abraira, V.E., Copley, C.O., Tucker, A.F., and Goodrich, L.V. (2011). Control of Neuronal Morphology by the Atypical Cadherin Fat3. *Neuron* *71*, 820–832.
- Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., and Sretavan, D.W. (1997). Netrin-1 and DCC Mediate Axon Guidance Locally at the Optic Disc: Loss of Function Leads to Optic Nerve Hypoplasia. *Neuron* *19*, 575–589.
- Del Bene, F., and Wittbrodt, J. (2005). Cell cycle control by homeobox genes in development and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *16*, 449–460.
- Del Bene, F., Wehman, A.M., Link, B.A., and Baier, H. (2008). Regulation of Neurogenesis by Interkinetic Nuclear Migration through an Apical-Basal Notch Gradient. *Cell* *134*, 1055–1065.
- Dell, A.L., Fried-Cassorla, E., Xu, H., and Raper, J.A. (2013). cAMP-Induced Expression of Neuropilin1 Promotes Retinal Axon Crossing in the Zebrafish Optic Chiasm. *Journal of Neuroscience* *33*, 11076–11088.
- Deml, B., Kariminejad, A., Borujerdi, R.H.R., Muheisen, S., Reis, L.M., and Semina, E.V. (2015). Mutations in MAB21L2 Result in Ocular Coloboma, Microcornea and Cataracts. *PLOS Genetics* *11*, e1005002.
- Dibner, C., Elias, S., and Frank, D. (2001). XMeis3 protein activity is required for proper hindbrain patterning in *Xenopus laevis* embryos. *Development* *128*, 3415–3426.

- Dibner, C., Elias, S., Ofir, R., Souopgui, J., Kolm, P.J., Sive, H., Pieler, T., and Frank, D. (2004). The Meis3 protein and retinoid signaling interact to pattern the Xenopus hindbrain. *Developmental Biology* *271*, 75–86.
- Dickman, E.D., Thaller, C., and Smith, S.M. (1997). Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects. *Development* *124*, 3111–3121.
- Dobbs-McAuliffe, B., Zhao, Q., and Linney, E. (2004). Feedback mechanisms regulate retinoic acid production and degradation in the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development* *121*, 339–350.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* *29*, 15–21.
- Dollé, P., Lufkin, T., Krumlauf, R., Mark, M., Duboule, D., and Chambon, P. (1993). Local alterations of Krox-20 and Hox gene expression in the hindbrain suggest lack of rhombomeres 4 and 5 in homozygote null Hoxa-1 (Hox-1.6) mutant embryos. *PNAS* *90*, 7666–7670.
- Dorsky, R.I., Rapoport, D.H., and Harris, W.A. (1995). Xotch inhibits cell differentiation in the xenopus retina. *Neuron* *14*, 487–496.
- Duboule, D., and Dollé, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *The EMBO Journal* *8*, 1497–1505.
- Dudley, A.T., Lyons, K.M., and Robertson, E.J. (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev.* *9*, 2795–2807.
- Duester, G. (2009). Keeping an eye on retinoic acid signaling during eye development. *Chemico-Biological Interactions* *178*, 178–181.
- Dunn, N.R., Winnier, G.E., Hargett, L.K., Schrick, J.J., Fogo, A.B., and Hogan, B.L.M. (1997). Haploinsufficient Phenotypes in Bmp4Heterozygous Null Mice and Modification by Mutations in Gli3andAlx4. *Developmental Biology* *188*, 235–247.
- Dupé, V., and Lumsden, A. (2001). Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling. *Development* *128*, 2199–2208.
- Dupe, V., Davenne, M., Brocard, J., Dolle, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P., and Rijli, F.M. (1997). In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* *124*, 399–410.
- Dupe, V., Ghyselinck, N.B., Wendling, O., Chambon, P., and Mark, M. (1999). Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* *126*, 5051–5059.
- Dupé, V., Matt, N., Garnier, J.-M., Chambon, P., Mark, M., and Ghyselinck, N.B. (2003). A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *PNAS* *100*, 14036–14041.

- Dvoriantchikova, G., Perea-Martinez, I., Pappas, S., Barry, A.F., Danek, D., Dvoriantchikova, X., Pelaez, D., and Ivanov, D. (2015). Molecular Characterization of Notch1 Positive Progenitor Cells in the Developing Retina. *PLOS ONE* *10*, e0131054.
- Dyer, M.A., and Cepko, C.L. (2000). p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Development* *127*, 3593–3605.
- Dyer, M.A., and Cepko, C.L. (2001). Regulating proliferation during retinal development. *Nat Rev Neurosci* *2*, 333–342.
- Dyer, M.A., Livesey, F.J., Cepko, C.L., and Oliver, G. (2003). Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat Genet* *34*, 53–58.
- Eccles, M.R., and Schimmenti, L.A. (1999). Renal-coloboma syndrome: a multi-system developmental disorder caused by PAX2 mutations. *Clinical Genetics* *56*, 1–9.
- van Eeden, F.J., Granato, M., Schach, U., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kane, D.A., et al. (1996). Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* *123*, 153–164.
- Ekker, S.C., and Larson, J.D. (2001). Morphant technology in model developmental systems. *Genesis* *30*, 89–93.
- El-Brolosy, M.A., Kontarakis, Z., Rossi, A., Kuenne, C., Günther, S., Fukuda, N., Kikhi, K., Boezio, G.L.M., Takacs, C., Lai, S.-L., et al. (2019). Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* *568*, 193–197.
- Elkouby, Y.M., Elias, S., Casey, E.S., Blythe, S.A., Tsabar, N., Klein, P.S., Root, H., Liu, K.J., and Frank, D. (2010). Mesodermal Wnt signaling organizes the neural plate via Meis3. *Development* *137*, 1531–1541.
- Emoto, Y., Wada, H., Okamoto, H., Kudo, A., and Imai, Y. (2005). Retinoic acid-metabolizing enzyme Cyp26a1 is essential for determining territories of hindbrain and spinal cord in zebrafish. *Developmental Biology* *278*, 415–427.
- Engelkamp, D., Rashbass, P., Seawright, A., and Heynen, V. van (1999). Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development* *126*, 3585–3596.
- England, S.J., Blanchard, G.B., Mahadevan, L., and Adams, R.J. (2006). A dynamic fate map of the forebrain shows how vertebrate eyes form and explains two causes of cyclopia. *Development* *133*, 4613–4617.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T.M., and Briscoe, J. (1997). Pax6 Controls Progenitor Cell Identity and Neuronal Fate in Response to Graded Shh Signaling. *Cell* *90*, 169–180.
- Erkman, L., Yates, P.A., McLaughlin, T., McEvilly, R.J., Whisenhunt, T., O'Connell, S.M., Krones, A.I., Kirby, M.A., Rapaport, D.H., Bermingham, J.R., et al. (2000). A POU Domain Transcription Factor–Dependent Program Regulates Axon Pathfinding in the Vertebrate Visual System. *Neuron* *28*, 779–792.

- Erskine, L., Williams, S.E., Brose, K., Kidd, T., Rachel, R.A., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Mason, C.A. (2000). Retinal Ganglion Cell Axon Guidance in the Mouse Optic Chiasm: Expression and Function of Robos and Slits. *J. Neurosci.* *20*, 4975–4982.
- Erskine, L., Reijntjes, S., Pratt, T., Denti, L., Schwarz, Q., Vieira, J.M., Alakakone, B., Shewan, D., and Ruhrberg, C. (2011). VEGF Signaling through Neuropilin 1 Guides Commissural Axon Crossing at the Optic Chiasm. *Neuron* *70*, 951–965.
- Erskine, L., François, U., Denti, L., Joyce, A., Tillo, M., Bruce, F., Vargesson, N., and Ruhrberg, C. (2017). VEGF-A and neuropilin 1 (NRP1) shape axon projections in the developing CNS via dual roles in neurons and blood vessels. *Development* *144*, 2504–2516.
- Erter, C.E., Wilm, T.P., Basler, N., Wright, C.V.E., and Solnica-Krezel, L. (2001). Wnt8 is required in lateral mesendodermal precursors for neural posteriorization in vivo. *Development* *128*, 3571–3583.
- Eve, A.M.J., Place, E.S., and Smith, J.C. (2017). Comparison of Zebrafish tmem88a mutant and morpholino knockdown phenotypes. *PLOS ONE* *12*, e0172227.
- Fantes, J., Ragge, N.K., Lynch, S.-A., McGill, N.I., Collin, J.R.O., Howard-Peebles, P.N., Hayward, C., Vivian, A.J., Williamson, K., Heyning, V. van, et al. (2003). Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat Genet* *33*, 462–463.
- Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I., and Dickson, C. (1995). Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev.* *9*, 2364–2372.
- Fares-Taie, L., Gerber, S., Chassaing, N., Clayton-Smith, J., Hanein, S., Silva, E., Serey, M., Serre, V., Gérard, X., Baumann, C., et al. (2013). ALDH1A3 Mutations Cause Recessive Anophthalmia and Microphthalmia. *The American Journal of Human Genetics* *92*, 265–270.
- Farhy, C., Elgart, M., Shapira, Z., Oron-Karni, V., Yaron, O., Menuchin, Y., Rechavi, G., and Ashery-Padan, R. (2013). Pax6 Is Required for Normal Cell-Cycle Exit and the Differentiation Kinetics of Retinal Progenitor Cells. *PLOS ONE* *8*, e76489.
- Ferda Percin, E., Ploder, L.A., Yu, J.J., Arici, K., Horsford, D.J., Rutherford, A., Bapat, B., Cox, D.W., Duncan, A.M.V., Kalnins, V.I., et al. (2000). Human microphthalmia associated with mutations in the retinal homeobox gene CHX10. *Nat Genet* *25*, 397–401.
- Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M.L., de Gouyon, B., She, W.-C., Luchak, J.M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P.J., et al. (2000). Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* *408*, 101–106.
- Ferretti, E., Marshall, H., Popperl, H., Maconochie, M., Krumlauf, R., and Blasi, F. (2000). Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development* *127*, 155–166.
- Ferretti, E., Cambronero, F., Tümpel, S., Longobardi, E., Wiedemann, L.M., Blasi, F., and Krumlauf, R. (2005). Hoxb1 Enhancer and Control of Rhombomere 4 Expression: Complex Interplay between PREP1-PBX1-HOXB1 Binding Sites. *Molecular and Cellular Biology* *25*, 8541–8552.

- Frasch, M., Chen, X., and Lufkin, T. (1995). Evolutionary-conserved enhancers direct region-specific expression of the murine Hoxa-1 and Hoxa-2 loci in both mice and Drosophila. *Development* *121*, 957–974.
- French, C.R., Stach, T.R., March, L.D., Lehmann, O.J., and Waskiewicz, A.J. (2013). Apoptotic and Proliferative Defects Characterize Ocular Development in a Microphthalmic BMP Model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *54*, 4636–4647.
- Fricke, C., Lee, J.-S., Geiger-Rudolph, S., Bonhoeffer, F., and Chien, C.-B. (2001). *astray*, a Zebrafish roundabout Homolog Required for Retinal Axon Guidance. *Science* *292*, 507–510.
- Frohman, M.A., and Martin, G.R. (1992). Isolation and analysis of embryonic expression of Hox-4.9, a member of the murine labial-like gene family. *Mechanisms of Development* *38*, 55–67.
- Frohman, M.A., Boyle, M., and Martin, G.R. (1990). Isolation of the mouse Hox-2.9 gene; analysis of embryonic expression suggests that positional information along the anterior-posterior axis is specified by mesoderm. *Development* *110*, 589–607.
- Fujii, H., Sato, T., Kaneko, S., Gotoh, O., Fujii-Kuriyama, Y., Osawa, K., Kato, S., and Hamada, H. (1997). Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *The EMBO Journal* *16*, 4163–4173.
- Fujitani, Y., Fujitani, S., Luo, H., Qiu, F., Burlison, J., Long, Q., Kawaguchi, Y., Edlund, H., MacDonald, R.J., Furukawa, T., et al. (2006). Ptfla determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development. *Development* *133*, 4439–4450.
- Furukawa, T., Kozak, C.A., and Cepko, C.L. (1997). *rax*, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *PNAS* *94*, 3088–3093.
- Furushima, K., Yamamoto, A., Nagano, T., Shibata, M., Miyachi, H., Abe, T., Ohshima, N., Kiyonari, H., and Aizawa, S. (2007). Mouse homologues of Shisa antagonistic to Wnt and Fgf signalings. *Developmental Biology* *306*, 480–492.
- Furuta, Y., and Hogan, B.L.M. (1998). BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev.* *12*, 3764–3775.
- Gallardo, M.E., Córdoba, S.R. de, Schneider, A.S., Dwyer, M.A., Ayuso, C., and Bovolenta, P. (2004). Analysis of the developmental SIX6 homeobox gene in patients with anophthalmia/microphthalmia. *American Journal of Medical Genetics Part A* *129A*, 92–94.
- Garel, S., Garcia-Dominguez, M., and Charnay, P. (2000). Control of the migratory pathway of facial branchiomotor neurones. *Development* *127*, 5297–5307.
- Gath, N., and Gross, J.M. (2019). Zebrafish mab21l2 mutants possess severe defects in optic cup morphogenesis, lens and cornea development. *Developmental Dynamics* *0*.
- Gaufo, G.O., Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (2003). Hox3 genes coordinate mechanisms of genetic suppression and activation in the generation of branchial and somatic motoneurons. *Development* *130*, 5191–5201.

- Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P., and Rijli, F.M. (1997). Role of Hoxa-2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* *124*, 3693–3702.
- Gavalas, A., Studer, M., Lumsden, A., Rijli, F.M., Krumlauf, R., and Chambon, P. (1998). Hoxa1 and Hoxb1 synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* *125*, 1123–1136.
- Geng, X., Speirs, C., Lagutin, O., Inbal, A., Liu, W., Solnica-Krezel, L., Jeong, Y., Epstein, D.J., and Oliver, G. (2008). Haploinsufficiency of Six3 Fails to Activate Sonic hedgehog Expression in the Ventral Forebrain and Causes Holoprosencephaly. *Developmental Cell* *15*, 236–247.
- Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Bronson, R.T., and Sicinski, P. (2001). Deletion of the p27Kip1 gene restores normal development in cyclin D1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 194–199.
- Gentsch, G.E., Spruce, T., Monteiro, R.S., Owens, N.D.L., Martin, S.R., and Smith, J.C. (2018). Innate Immune Response and Off-Target Mis-splicing Are Common Morpholino-Induced Side Effects in Xenopus. *Developmental Cell* *44*, 597–610.e10.
- Gerety, S.S., and Wilkinson, D.G. (2011). Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. *Developmental Biology* *350*, 279–289.
- Gerth-Kahlert, C., Williamson, K., Ansari, M., Rainger, J.K., Hingst, V., Zimmermann, T., Tech, S., Guthoff, R.F., Heynen, V. van, and FitzPatrick, D.R. (2013). Clinical and mutation analysis of 51 probands with anophthalmia and/or severe microphthalmia from a single center. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* *1*, 15–31.
- Gestri, G., Link, B.A., and Neuhauss, S.C.F. (2012). The visual system of zebrafish and its use to model human ocular Diseases. *Developmental Neurobiology* *72*, 302–327.
- Ghosh, P., and Sagerström, C.G. (2018). Developing roles for Hox proteins in hindbrain gene regulatory networks. *Int. J. Dev. Biol.* *62*, 767–774.
- Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P., and Evans, R.M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* *330*, 624–629.
- Gilardi, P., Schneider-Maunoury, S., and Charnay, P. (1991). Krox-20: A candidate gene for the regulation of pattern formation in the hindbrain. *Biochimie* *73*, 85–91.
- Gill, E., and Baker, R. (1993). Conservation of Neuroepithelial and Mesodermal Segments in the Embryonic Vertebrate Head. *Cells Tissues Organs* *148*, 110–123.
- Giudicelli, F., Taillebourg, E., Charnay, P., and Gilardi-Hebenstreit, P. (2001). Krox-20 patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. *Genes Dev.* *15*, 567–580.
- Goddard, J.M., Rossel, M., Manley, N.R., and Capecchi, M.R. (1996). Mice with targeted disruption of Hoxb-1 fail to form the motor nucleus of the VIIth nerve. *Development* *122*, 3217–3228.

- Godinho, L., Williams, P.R., Claassen, Y., Provost, E., Leach, S.D., Kamermans, M., and Wong, R.O.L. (2007). Nonapical Symmetric Divisions Underlie Horizontal Cell Layer Formation in the Developing Retina In Vivo. *Neuron* *56*, 597–603.
- Godsave, S., Dekker, E.-J., Holling, T., Pannese, M., Boncinelli, E., and Durston, A. (1994). Expression Patterns of Hoxb Genes in the Xenopus Embryo Suggest Roles in Anteroposterior Specification of the Hindbrain and in Dorsoventral Patterning of the Mesoderm. *Developmental Biology* *166*, 465–476.
- Gosse, N.J., and Baier, H. (2009). An essential role for Radar (Gdf6a) in inducing dorsal fate in the zebrafish retina. *PNAS* *106*, 2236–2241.
- Gould, A., Morrison, A., Sproat, G., White, R.A., and Krumlauf, R. (1997). Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping Hox expression patterns. *Genes Dev.* *11*, 900–913.
- Gould, A., Itasaki, N., and Krumlauf, R. (1998). Initiation of Rhombomeric Hoxb4 Expression Requires Induction by Somites and a Retinoid Pathway. *Neuron* *21*, 39–51.
- Green, E.S., Stubbs, J.L., and Levine, E.M. (2003). Genetic rescue of cell number in a mouse model of microphthalmia: interactions between Chx10 and G1-phase cell cycle regulators. *Development* *130*, 539–552.
- Gregory-Evans, C.Y., Williams, M.J., Halford, S., and Gregory-Evans, K. (2004). Ocular coloboma: a reassessment in the age of molecular neuroscience. *Journal of Medical Genetics* *41*, 881–891.
- Grinblat, Y., Gamse, J., Patel, M., and Sive, H. (1998). Determination of the zebrafish forebrain: induction and patterning. *Development* *125*, 4403–4416.
- 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.
- Guan, K.-L., and Rao, Y. (2003). Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* *4*, 941–956.
- Guthrie, S., and Lumsden, A. (1991). Formation and regeneration of rhombomere boundaries in the developing chick hindbrain. *Development* *112*, 221–229.
- Guthrie, S., Prince, V., and Lumsden, A. (1993). Selective dispersal of avian rhombomere cells in orthotopic and heterotopic grafts. *Development* *118*, 527–538.
- Gutkovich, Y.E., Ofir, R., Elkouby, Y.M., Dibner, C., Gefen, A., Elias, S., and Frank, D. (2010). Xenopus Meis3 protein lies at a nexus downstream to Zic1 and Pax3 proteins, regulating multiple cell-fates during early nervous system development. *Developmental Biology* *338*, 50–62.
- H. Lee, K.K., Tang, M.K., Yew, D.T.W., Chow, P.H., Yee, S.P., Schneider, C., and Brancolini, C. (1999). gas2Is a Multifunctional Gene Involved in the Regulation of Apoptosis and Chondrogenesis in the Developing Mouse Limb. *Developmental Biology* *207*, 14–25.

- 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.
- Hallonet, M., Hollemann, T., Pieler, T., and Gruss, P. (1999). Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes Dev.* *13*, 3106–3114.
- Hanel, M.L., and Hensey, C. (2006). Eye and neural defects associated with loss of GDF6. *BMC Developmental Biology* *13*.
- Hanneman, E., Trevarrow, B., Metcalfe, W.K., Kimmel, C.B., and Westerfield, M. (1988). Segmental pattern of development of the hindbrain and spinal cord of the zebrafish embryo. *Development* *103*, 49–58.
- Harris, W.A., and Hartenstein, V. (1991). Neuronal determination without cell division in *xenopus* embryos. *Neuron* *6*, 499–515.
- Hedge, T.A., and Mason, I. (2008). Expression of Shisa2, a modulator of both Wnt and Fgf signaling, in the chick embryo. *Int. J. Dev. Biol.* *52*, 81–85.
- Heine, P., Dohle, E., Bumsted-O'Brien, K., Engelkamp, D., and Schulte, D. (2008). Evidence for an evolutionary conserved role of homothorax/Meis1/2 during vertebrate retina development. *Development* *135*, 805–811.
- Henderson, R.A., Williamson, K., Cumming, S., Clarke, M.P., Lynch, S.A., Hanson, I.M., FitzPatrick, D.R., Sisodiya, S., and van Heyningen, V. (2007). Inherited PAX6, NF1 and OTX2 mutations in a child with microphthalmia and aniridia. *European Journal of Human Genetics* *15*, 898–901.
- Henderson, R.H., Williamson, K.A., Kennedy, J.S., Webster, A.R., Holder, G.E., Robson, A.G., FitzPatrick, D.R., van Heyningen, V., and Moore, A.T. (2009). A rare de novo nonsense mutation in OTX2 causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction. *Mol Vis* *15*, 2442–2447.
- Hernandez, R.E., Rikhof, H.A., Bachmann, R., and Moens, C.B. (2004). vhnf1 integrates global RA patterning and local FGF signals to direct posterior hindbrain development in zebrafish. *Development* *131*, 4511–4520.
- Hernandez, R.E., Putzke, A.P., Myers, J.P., Margaretha, L., and Moens, C.B. (2007). Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development. *Development* *134*, 177–187.
- van den Heuvel, S., and Dyson, N.J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *9*, 713–724.
- Higashijima, S., Hotta, Y., and Okamoto, H. (2000). Visualization of Cranial Motor Neurons in Live Transgenic Zebrafish Expressing Green Fluorescent Protein Under the Control of the *Islet-1* Promoter/Enhancer. *The Journal of Neuroscience* *20*, 206–218.
- Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B.L.M., Ton, C.C.T., Saunders, G.F., Hanson, I.M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N.D., and Heyningen, V. van (1991). Mouse Small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* *354*, 522–525.

- Hirate, Y., and Okamoto, H. (2006). Canopy1, a Novel Regulator of FGF Signaling around the Midbrain-Hindbrain Boundary in Zebrafish. *Current Biology* 16, 421–427.
- Hisat, T., Spence, S.E., Rachel, R.A., Fujita, M., Nakamura, T., Ward, J.M., Devor-Henneman, D.E., Saiki, Y., Kutsuna, H., Tessarollo, L., et al. (2004). Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *The EMBO Journal* 23, 450–459.
- Hodgson, C., Nimchuk, Z.L., and Kieber, J.J. (2017). indCAPS: A tool for designing screening primers for CRISPR/Cas9 mutagenesis events. *PLOS ONE* 12, e0188406.
- den Hollander, A.I., Biyanwila, J., Kovach, P., Bardakjian, T., Traboulsi, E.I., Ragge, N.K., Schneider, A., and Malicki, J. (2010). Genetic defects of GDF6 in the zebrafish out of sight mutant and in human eye developmental anomalies. *BMC Genetics* 11, 102.
- Holleman, T., Chen, Y., Grunz, H., and Pieler, T. (1998). Regionalized metabolic activity establishes boundaries of retinoic acid signalling. *The EMBO Journal* 17, 7361–7372.
- Hollyday, M., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1995). Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mechanisms of Development* 52, 9–25.
- Holmberg, J., Clarke, D.L., and Frisén, J. (2000). Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 408, 203–206.
- Holt, R., Ceroni, F., Bax, D.A., Broadgate, S., Diaz, D.G., Santos, C., Gerrelli, D., and Ragge, N.K. (2017). New variant and expression studies provide further insight into the genotype-phenotype correlation in YAP1 -related developmental eye disorders. *Sci Rep* 7, 1–7.
- Höpker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., and Holt, C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401, 69–73.
- Horan, G.S., Ramírez-Solis, R., Featherstone, M.S., Wolgemuth, D.J., Bradley, A., and Behringer, R.R. (1995). Compound mutants for the paralogous hoxa-4, hoxb-4, and hoxd-4 genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev.* 9, 1667–1677.
- Horn, D., Prescott, T., Houge, G., Brække, K., Rosendahl, K., Nishimura, G., FitzPatrick, D.R., and Spranger, J. (2015). A Novel Oculo-Skeletal syndrome with intellectual disability caused by a particular MAB21L2 mutation. *European Journal of Medical Genetics* 58, 387–391.
- Hornby, S.J., Ward, S.J., and Gilbert, C.E. (2003). Eye birth defects in humans may be caused by Published: 2003.11.03 a recessively-inherited genetic predisposition to the effects of maternal vitamin A deficiency during pregnancy. *Med Sci Monit* 5.
- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C.-P., Barth, K.A., Take-Uchi, M., and Wilson, S.W. (2002). Establishment of the Telencephalon during Gastrulation by Local Antagonism of Wnt Signaling. *Neuron* 35, 255–265.
- Hu, M., and Easter, S.S. (1999). Retinal Neurogenesis: The Formation of the Initial Central Patch of Postmitotic Cells. *Developmental Biology* 207, 309–321.

- Hume, C.R., and Dodd, J. (1993). Cwnt-8C: a novel Wnt gene with a potential role in primitive streak formation and hindbrain organization. *Development* 119, 1147–1160.
- Hurtado-Parrado, C. (2010). Neuronal mechanisms of learning in teleost fish. *Universitas Psychologica* 9, 663–678.
- Hutson, L.D., and Chien, C.-B. (2002). Pathfinding and Error Correction by Retinal Axons: The Role of astray/robo2. *Neuron* 33, 205–217.
- Icha, J., Schmied, C., Sidhaye, J., Tomancak, P., Preibisch, S., and Norden, C. (2016). Using Light Sheet Fluorescence Microscopy to Image Zebrafish Eye Development. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e53966.
- Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J.E., and Kageyama, R. (2002). Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* 129, 831–842.
- Iseri, S.U., Wyatt, A.W., Nürnberg, G., Kluck, C., Nürnberg, P., Holder, G.E., Blair, E., Salt, A., and Ragge, N.K. (2010). Use of genome-wide SNP homozygosity mapping in small pedigrees to identify new mutations in VSX2 causing recessive microphthalmia and a semidominant inner retinal dystrophy. *Hum Genet* 128, 51–60.
- Ivanovitch, K., Cavodeassi, F., and Wilson, S.W. (2013). Precocious Acquisition of Neuroepithelial Character in the Eye Field Underlies the Onset of Eye Morphogenesis. *Developmental Cell* 27, 293–305.
- Jensen, A.M., and Raff, M.C. (1997). Continuous Observation of Multipotential Retinal Progenitor Cells in Clonal Density Culture. *Developmental Biology* 188, 267–279.
- Jeong, Y., Leskow, F.C., El-Jaick, K., Roessler, E., Muenke, M., Yocom, A., Dubourg, C., Li, X., Geng, X., Oliver, G., et al. (2008). Regulation of a remote *Shh* forebrain enhancer by the Six3 homeoprotein. *Nature Genetics* 40, 1348–1353.
- Jessen, J.R., Topczewski, J., Bingham, S., Sepich, D.S., Marlow, F., Chandrasekhar, A., and Solnica-Krezel, L. (2002). Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements. *Nature Cell Biology* 4, 610–615.
- Jin, K. (2017). Transitional Progenitors during Vertebrate Retinogenesis. *Mol Neurobiol* 54, 3565–3576.
- Johns, P.R. (1977). Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. *Journal of Comparative Neurology* 176, 343–357.
- de Jong, M., Rauwerda, H., Bruning, O., Verkooijen, J., Spaink, H.P., and Breit, T.M. (2010). RNA isolation method for single embryo transcriptome analysis in zebrafish. *BMC Research Notes* 3, 73.
- Jordan, T., Hanson, I., Zaletayev, D., Hodgson, S., Prosser, J., Seawright, A., Hastie, N., and van Heyningen, V. (1992). The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genetics* 1, 328–332.
- Joris, M., Schloesser, M., Baurain, D., Hanikenne, M., Muller, M., and Motte, P. (2017). Number of inadvertent RNA targets for morpholino knockdown in *Danio rerio* is largely

underestimated: evidence from the study of Ser/Arg-rich splicing factors. *Nucleic Acids Res* *45*, 9547–9557.

Jungbluth, S., Bell, E., and Lumsden, A. (1999). Specification of distinct motor neuron identities by the singular activities of individual Hox genes. *Development* *126*, 2751–2758.

Kaewkhaw, R., Kaya, K.D., Brooks, M., Homma, K., Zou, J., Chaitankar, V., Rao, M., and Swaroop, A. (2015). Transcriptome Dynamics of Developing Photoreceptors in Three-Dimensional Retina Cultures Recapitulates Temporal Sequence of Human Cone and Rod Differentiation Revealing Cell Surface Markers and Gene Networks. *STEM CELLS* *33*, 3504–3518.

Kamachi, Y., Sockanathan, S., Liu, Q., Breitman, M., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. (1995). Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *The EMBO Journal* *14*, 3510–3519.

Kandel, E. (2000). *Principles of Neural Science*, Fourth Edition (McGraw-Hill Companies, Incorporated).

Karlstrom, R.O., Trowe, T., Klostermann, S., Baier, H., Brand, M., Crawford, A.D., Grunewald, B., Haffter, P., Hoffmann, H., Meyer, S.U., et al. (1996). Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *12*.

Kastner, P., Messaddeq, N., Mark, M., Wendling, O., Grondona, J.M., Ward, S., Ghyselinck, N., and Chambon, P. (1997). Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. *Development* *124*, 4749–4758.

Katoh, Y., and Katoh, M. (2005). Comparative genomics on Shisa orthologs. *International Journal of Molecular Medicine* *16*, 181–185.

Katoh, K., Omori, Y., Onishi, A., Sato, S., Kondo, M., and Furukawa, T. (2010). Blimp1 Suppresses Chx10 Expression in Differentiating Retinal Photoreceptor Precursors to Ensure Proper Photoreceptor Development. *J. Neurosci.* *30*, 6515–6526.

Kay, J.N., Finger-Baier, K.C., Roeser, T., Staub, W., and Baier, H. (2001). Retinal Ganglion Cell Genesis Requires lakritz, a Zebrafish atonal Homolog. *Neuron* *30*, 725–736.

Kay, J.N., Link, B.A., and Baier, H. (2005). Staggered cell-intrinsic timing of ath5 expression underlies the wave of ganglion cell neurogenesis in the zebrafish retina. *Development* *132*, 2573–2585.

Kayam, G., Kohl, A., Magen, Z., Peretz, Y., Weisinger, K., Bar, A., Novikov, O., Brodski, C., and Sela-Donenfeld, D. (2013). A novel role for Pax6 in the segmental organization of the hindbrain. *Development* *140*, 2190–2202.

Kelberman, D., Islam, L., Lakowski, J., Bacchelli, C., Chanudet, E., Lescai, F., Patel, A., Stupka, E., Buck, A., Wolf, S., et al. (2014). Mutation of SALL2 causes recessive ocular coloboma in humans and mice. *Hum Mol Genet* *23*, 2511–2526.

Kelly, G.M., Lai, C.-J., and Moon, R.T. (1993). Expression of Wnt10a in the Central Nervous System of Developing Zebrafish. *Developmental Biology* *158*, 113–121.

- Kennedy, B.N., Stearns, G.W., Smyth, V.A., Ramamurthy, V., van Eeden, F., Ankoudinova, I., Raible, D., Hurley, J.B., and Brockerhoff, S.E. (2004). Zebrafish rx3 and mab21l2 are required during eye morphogenesis. *Developmental Biology* 270, 336–349.
- Khan, K., Logan, C.V., McKibbin, M., Sheridan, E., Elçioglu, N.H., Yenice, O., Parry, D.A., Fernandez-Fuentes, N., Abdelhamed, Z.I.A., Al-Maskari, A., et al. (2012). Next generation sequencing identifies mutations in Atonal homolog 7 (ATOH7) in families with global eye developmental defects. *Hum Mol Genet* 21, 776–783.
- Kiecker, C., and Lumsden, A. (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 553–564.
- Kim, F.A., Sing, A., Kaneko, T., Bieman, M., Stallwood, N., Sadl, V.S., and Cordes, S.P. (2005). The vHNF1 homeodomain protein establishes early rhombomere identity by direct regulation of Kreisler expression. *Mechanisms of Development* 122, 1300–1309.
- Kim, N., Min, K.W., Kang, K.H., Lee, E.J., Kim, H.-T., Moon, K., Choi, J., Le, D., Lee, S.-H., and Kim, J.W. (2014). Regulation of retinal axon growth by secreted Vax1 homeodomain protein. *ELife* 3, e02671.
- Kobayashi, M., Toyama, R., Takeda, H., Dawid, I.B., and Kawakami, K. (1998). Overexpression of the forebrain-specific homeobox gene six3 induces rostral forebrain enlargement in zebrafish. *Development* 125, 2973–2982.
- Kolb, H. (1995). Simple Anatomy of the Retina. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center), p.
- Kolm, P.J., Apekin, V., and Sive, H. (1997). Xenopus Hindbrain Patterning Requires Retinoid Signaling. *Developmental Biology* 192, 1–16.
- Kolpak, A., Zhang, J., and Bao, Z.-Z. (2005). Sonic Hedgehog Has a Dual Effect on the Growth of Retinal Ganglion Axons Depending on Its Concentration. *J. Neurosci.* 25, 3432–3441.
- Kranzusch, P.J. (2019). cGAS and CD-NTase enzymes: structure, mechanism, and evolution. *Current Opinion in Structural Biology* 59, 178–187.
- Krol, A., Henle, S.J., and Goodrich, L.V. (2016). Fat3 and Ena/VASP proteins influence the emergence of asymmetric cell morphology in the developing retina. *Development* 143, 2172–2182.
- Kuchta, K., Knizewski, L., Wyrwicz, L.S., Rychlewski, L., and Ginalski, K. (2009). Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel families and their representatives in human. *Nucleic Acids Research* 37, 7701–7714.
- Kudoh, T., and Dawid, I.B. (2001). Zebrafish mab21l2 is specifically expressed in the presumptive eye and tectum from early somitogenesis onwards. *Mechanisms of Development* 109, 95–98.
- Kudoh, T., Wilson, S.W., and Dawid, I.B. (2002). Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development* 129, 4335–4346.

- Kumar, J.P. (2008). The sine oculis homeobox (SIX) family of transcription factors as regulators of development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* *66*, 565.
- Kuribayashi, H., Baba, Y., and Watanabe, S. (2014). BMP signaling participates in late phase differentiation of the retina, partly via upregulation of Hey2. *Developmental Neurobiology* *74*, 1172–1183.
- Kuwajima, T., Yoshida, Y., Takegahara, N., Petros, T.J., Kumanogoh, A., Jessell, T.M., Sakurai, T., and Mason, C. (2012). Optic Chiasm Presentation of Semaphorin6D in the Context of Plexin-A1 and Nr-CAM Promotes Retinal Axon Midline Crossing. *Neuron* *74*, 676–690.
- Lagutin, O.V., Zhu, C.C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puelles, L., Russell, H.R.C., McKinnon, P.J., Solnica-Krezel, L., and Oliver, G. (2003). Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev.* *17*, 368–379.
- Lampe, X., Samad, O.A., Guiguen, A., Matis, C., Remacle, S., Picard, J.J., Rijli, F.M., and Rezsohazy, R. (2008). An ultraconserved Hox–Pbx responsive element resides in the coding sequence of Hoxa2 and is active in rhombomere 4. *Nucleic Acids Res* *36*, 3214–3225.
- Langer, L., Taranova, O., Sulik, K., and Pevny, L. (2012). SOX2 hypomorphism disrupts development of the prechordal floor and optic cup. *Mechanisms of Development* *129*, 1–12.
- Langston, A.W., Thompson, J.R., and Gudas, L.J. (1997). Retinoic Acid-responsive Enhancers Located 3' of the Hox A and Hox B Homeobox Gene Clusters FUNCTIONAL ANALYSIS. *J. Biol. Chem.* *272*, 2167–2175.
- Larder, R., Kimura, I., Meadows, J., Clark, D.D., Mayo, S., and Mellon, P.L. (2013). Gene dosage of Otx2 is important for fertility in male mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* *377*, 16–22.
- Lau, G.T.C., Wong, O.G.W., Chan, P.M.Y., Kok, K.-H., Wong, R.L.Y., Chin, K.-T., Lin, M.C.M., Kung, H.-F., and Chow, K.L. (2001). Embryonic XMab21l2 Expression Is Required for Gastrulation and Subsequent Neural Development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *280*, 1378–1384.
- Leid, M., Kastner, P., and Chambon, P. (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends in Biochemical Sciences* *17*, 427–433.
- Lekven, A.C., Thorpe, C.J., Waxman, J.S., and Moon, R.T. (2001). Zebrafish wnt8 Encodes Two Wnt8 Proteins on a Bicistronic Transcript and Is Required for Mesoderm and Neurectoderm Patterning. *Developmental Cell* *1*, 103–114.
- Lekven, A.C., Buckles, G.R., Kostakis, N., and Moon, R.T. (2003). Wnt1 and wnt10b function redundantly at the zebrafish midbrain–hindbrain boundary. *Developmental Biology* *254*, 172–187.
- Leung, V., Iliescu, A., Jolicoeur, C., Gravel, M., Apuzzo, S., Torban, E., Cayouette, M., and Gros, P. (2016). The planar cell polarity protein Vangl2 is required for retinal axon guidance. *Developmental Neurobiology* *76*, 150–165.

- Li, Q., Shirabe, K., Thisse, C., Thisse, B., Okamoto, H., Masai, I., and Kuwada, J.Y. (2005). Chemokine Signaling Guides Axons within the Retina in Zebrafish. *J. Neurosci.* *25*, 1711–1717.
- Li, S., Mo, Z., Yang, X., Price, S.M., Shen, M.M., and Xiang, M. (2004). Foxn4 Controls the Genesis of Amacrine and Horizontal Cells by Retinal Progenitors. *Neuron* *43*, 795–807.
- Li, X., Perissi, V., Liu, F., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (2002). Tissue-Specific Regulation of Retinal and Pituitary Precursor Cell Proliferation. *Science* *297*, 1180–1183.
- Li, Z., Hu, M., Ochocinska, M.J., Joseph, N.M., and Easter, S.S. (2000). Modulation of cell proliferation in the embryonic retina of zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Dynamics* *219*, 391–401.
- Linville, A., Radtke, K., Waxman, J.S., Yelon, D., and Schilling, T.F. (2009). Combinatorial roles for zebrafish retinoic acid receptors in the hindbrain, limbs and pharyngeal arches. *Developmental Biology* *325*, 60–70.
- Liu, J., Wilson, S., and Reh, T. (2003). BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina. *Developmental Biology* *256*, 34–48.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R., and Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature Genetics* *22*, 361–365.
- Liu, W., Wang, J.-H., and Xiang, M. (2000). Specific expression of the LIM/Homeodomain protein Lim-1 in horizontal cells during retinogenesis. *Developmental Dynamics* *217*, 320–325.
- Liu, Z.-Z., Zhu, J., Wang, C.-L., Wang, X., Han, Y.-Y., Liu, L.-Y., and Xu, H.A. (2018). CRMP2 and CRMP4 Are Differentially Required for Axon Guidance and Growth in Zebrafish Retinal Neurons.
- Livesey, F.J., and Cepko, C.L. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: Lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* *2*, 109–118.
- Livne-bar, I., Pacal, M., Cheung, M.C., Hankin, M., Trogadis, J., Chen, D., Dorval, K.M., and Bremner, R. (2006). Chx10 is required to block photoreceptor differentiation but is dispensable for progenitor proliferation in the postnatal retina. *PNAS* *103*, 4988–4993.
- Lombardo, A., Isaacs, H.V., and Slack, J.M. (1998). Expression and functions of FGF-3 in Xenopus development. *Int. J. Dev. Biol.* *42*, 1101–1117.
- Loosli, F., Köster, R.W., Carl, M., Krone, A., and Wittbrodt, J. (1998). Six3, a medaka homologue of the *Drosophila* homeobox gene *sine oculis* is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye. *Mechanisms of Development* *74*, 159–164.
- Loosli, F., Winkler, S., and Wittbrodt, J. (1999). Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* *13*, 649–654.
- Loosli, F., Winkler, S., Burgdorf, C., Wurmbach, E., Ansorge, W., Henrich, T., Grabher, C., Arendt, D., Carl, M., Krone, A., et al. (2001). Medaka eyeless is the key factor linking retinal determination and eye growth. *Development* *128*, 4035–4044.

- Loosli, F., Staub, W., Finger-Baier, K.C., Ober, E.A., Verkade, H., Wittbrodt, J., and Baier, H. (2003). Loss of eyes in zebrafish caused by mutation of chokh/rx3. *EMBO Reports* *4*, 894–899.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.
- Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M., and Chambon, P. (1991). Disruption of the Hox-1.6 homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* *66*, 1105–1119.
- Lumsden, A., and Keynes, R. (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* *337*, 424–428.
- Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1996). Patterning the Vertebrate Neuraxis. *Science* *274*, 1109–1115.
- Lumsden, A., Sprawson, N., and Graham, A. (1991). Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* *113*, 1281–1291.
- Ma, Z., Zhu, P., Shi, H., Guo, L., Zhang, Q., Chen, Y., Chen, S., Zhang, Z., Peng, J., and Chen, J. (2019). PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components. *Nature* *568*, 259–263.
- Macdonald, R., and Wilson, S.W. (1997). Distribution of Pax6 protein during eye development suggests discrete roles in proliferative and differentiated visual cells. *Dev Gene Evol* *206*, 363–369.
- Macdonald, R., Xu, Q., Anukampa Barth, K., Mikkola, I., Holder, N., Fjose, A., Krauss, S., and Wilson, S.W. (1994). Regulatory gene expression boundaries demarcate sites of neuronal differentiation in the embryonic zebrafish forebrain. *Neuron* *13*, 1039–1053.
- 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.
- Macdonald, R., Scholes, J., Strahle, U., Brennan, C., Holder, N., Brand, M., and Wilson, S.W. (1997). The Pax protein Noi is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain. *Development* *124*, 2397–2408.
- Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., and Zile, M. (1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Current Biology* *6*, 417–426.
- Maeda, R., Mood, K., Jones, T.L., Aruga, J., Buchberg, A.M., and Daar, I.O. (2001). Xmeis1 , a protooncogene involved in specifying neural crest cell fate in Xenopus embryos. *Oncogene* *20*, 1329–1342.
- Maeda, R., Ishimura, A., Mood, K., Park, E.K., Buchberg, A.M., and Daar, I.O. (2002). Xpbx1b and Xmeis1b play a collaborative role in hindbrain and neural crest gene expression in Xenopus embryos. *PNAS* *99*, 5448–5453.

- Mahmood, R., Kiefer, P., Guthrie, S., Dickson, C., and Mason, I. (1995). Multiple roles for FGF-3 during cranial neural development in the chicken. *Development* *121*, 1399–1410.
- Mahmood, R., Mason, I.J., and Morriss-Kay, G.M. (1996). Expression of Fgf-3 in relation to hindbrain segmentation, otic pit position and pharyngeal arch morphology in normal and retinoic acid-exposed mouse embryos. *Anat Embryol* *194*, 13–22.
- Mahoney Rogers, A.A., Zhang, J., and Shim, K. (2011). Sprouty1 and Sprouty2 limit both the size of the otic placode and hindbrain Wnt8a by antagonizing FGF signaling. *Developmental Biology* *353*, 94–104.
- Manzanares, M., Bel-Vialar, S., Ariza-McNaughton, L., Ferretti, E., Marshall, H., Maconochie, M.M., Blasi, F., and Krumlauf, R. (2001). Independent regulation of initiation and maintenance phases of Hoxa3 expression in the vertebrate hindbrain involve auto- and cross-regulatory mechanisms. *Development* *128*, 3595–3607.
- Mapp, O.M., Walsh, G.S., Moens, C.B., Tada, M., and Prince, V.E. (2011). Zebrafish Prickle1b mediates facial branchiomotor neuron migration via a farnesylation-dependent nuclear activity. *Development* *138*, 2121–2132.
- Marcos, S., Nieto-Lopez, F., Sandonís, A., Cardozo, M.J., Marco, F.D., Esteve, P., and Bovolenta, P. (2015). Secreted Frizzled Related Proteins Modulate Pathfinding and Fasciculation of Mouse Retina Ganglion Cell Axons by Direct and Indirect Mechanisms. *J. Neurosci.* *35*, 4729–4740.
- Marcus, R.C., Shimamura, K., Sretavan, D., Lai, E., Rubenstein, J.L.R., and Mason, C.A. (1999). Domains of regulatory gene expression and the developing optic chiasm: Correspondence with retinal axon paths and candidate signaling cells. *Journal of Comparative Neurology* *403*, 346–358.
- Mariani, M., Baldessari, D., Francisconi, S., Viggiano, L., Rocchi, M., Zappavigna, V., Malgaretti, N., and Consalez, G.G. (1999). Two Murine and Human Homologs of Mab-21, a Cell Fate Determination Gene Involved in *Caenorhabditis Elegans* Neural Development. *Human Molecular Genetics* *8*, 2397–2406.
- Marin, F., and Charnay, P. (2000). Hindbrain patterning: FGFs regulate Krox20 and mafB/kr expression in the otic/preotic region. *Development* *127*, 4925–4935.
- Mark, M., Lufkin, T., Vonesch, J.L., Ruberte, E., Olivo, J.C., Dolle, P., Gorry, P., Lumsden, A., and Chambon, P. (1993). Two rhombomeres are altered in Hoxa-1 mutant mice. *Development* *119*, 319–338.
- Martínez-Fernández, M.L., Bermejo-Sánchez, E., Fernández, B., MacDonald, A., Fernández-Toral, J., and Martínez-Frías, M.L. (2014). Haploinsufficiency of BMP4 gene may be the underlying cause of Frías syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* *164*, 338–345.
- Martinez-Morales, J.-R., Del Bene, F., Nica, G., Hammerschmidt, M., Bovolenta, P., and Wittbrodt, J. (2005). Differentiation of the Vertebrate Retina Is Coordinated by an FGF Signaling Center. *Developmental Cell* *8*, 565–574.

- Martinez-Morales, J.R., Rembold, M., Greger, K., Simpson, J.C., Brown, K.E., Quiring, R., Pepperkok, R., Martin-Bermudo, M.D., Himmelbauer, H., and Wittbrodt, J. (2009). ojoplano-mediated basal constriction is essential for optic cup morphogenesis. *Development* *136*, 2165–2175.
- Masai, I., Lele, Z., Yamaguchi, M., Komori, A., Nakata, A., Nishiwaki, Y., Wada, H., Tanaka, H., Nojima, Y., Hammerschmidt, M., et al. (2003). N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development* *130*, 2479–2494.
- Mathers, P.H., Grinberg, A., Mahon, K.A., and Jamrich, M. (1997). The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* *387*, 603–607.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N., and Aizawa, S. (1995). Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev.* *9*, 2646–2658.
- Maves, L., Jackman, W., and Kimmel, C.B. (2002). FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development* *129*, 3825–3837.
- McCabe, K.L., Gunther, E.C., and Reh, T.A. (1999). The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: mechanisms that control differentiation. *Development* *126*, 5713–5724.
- McClintock, J.M., Kheirbek, M.A., and Prince, V.E. (2002). Knockdown of duplicated zebrafish hoxb1 genes reveals distinct roles in hindbrain patterning and a novel mechanism of duplicate gene retention. *Development* *129*, 2339–2354.
- McGrew, L.L., Otte, A.P., and Moon, R.T. (1992). Analysis of Xwnt-4 in embryos of *Xenopus laevis*: a Wnt family member expressed in the brain and floor plate. *Development* *115*, 463–473.
- McGrew, L.L., Lai, C.-J., and Moon, R.T. (1995). Specification of the Anteroposterior Neural Axis through Synergistic Interaction of the Wnt Signaling Cascade with noggin and follistatin. *Developmental Biology* *172*, 337–342.
- McGrew, L.L., Hoppler, S., and Moon, R.T. (1997). Wnt and FGF pathways cooperatively pattern anteroposterior neural ectoderm in *Xenopus*. *Mechanisms of Development* *69*, 105–114.
- McMahon, A.P., Joyner, A.L., Bradley, A., and McMahon, J.A. (1992). The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1–Wnt-1– mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* *69*, 581–595.
- McNulty, C.L., Peres, J.N., Bardine, N., Akker, W.M.R. van den, and Durston, A.J. (2005). Knockdown of the complete Hox paralogous group 1 leads to dramatic hindbrain and neural crest defects. *Development* *132*, 2861–2871.
- Mellitzer, G., Xu, Q., and Wilkinson, D.G. (1999). Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* *400*, 77–81.

- Miesfeld, J.B., Gestri, G., Clark, B.S., Flinn, M.A., Poole, R.J., Bader, J.R., Besharse, J.C., Wilson, S.W., and Link, B.A. (2015). Yap and Taz regulate retinal pigment epithelial cell fate. *Development* 142, 3021–3032.
- Mihelec, M., Abraham, P., Gibson, K., Krowka, R., Susman, R., Storen, R., Chen, Y., Donald, J., Tam, P.P., Grigg, J.R., et al. (2009). Novel SOX2 partner-factor domain mutation in a four-generation family. *European Journal of Human Genetics* 17, 1417–1422.
- Miles, A., and Tropepe, V. (2016). Coordinating progenitor cell cycle exit and differentiation in the developing vertebrate retina. *Neurogenesis* 3, e1161697.
- Miller, M.T., and Strömland, K. (1999). Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. *Teratology* 60, 306–321.
- Mishra, K., Gui, H., and Matise, M.P. (2008). Prox1 regulates a transitory state for interneuron neurogenesis in the spinal cord. *Developmental Dynamics* 237, 393–402.
- Mizeracka, K., DeMaso, C.R., and Cepko, C.L. (2013). Notch1 is required in newly postmitotic cells to inhibit the rod photoreceptor fate. *Development* 140, 3188–3197.
- Moens, C.B., and Prince, V.E. (2002). Constructing the hindbrain: Insights from the zebrafish. *Developmental Dynamics* 224, 1–17.
- Moens, C.B., Yan, Y.L., Appel, B., Force, A.G., and Kimmel, C.B. (1996). valentino: a zebrafish gene required for normal hindbrain segmentation. *Development* 122, 3981–3990.
- 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.
- Molotkov, A., Molotkova, N., and Duester, G. (2006). Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning. *Development* 133, 1901–1910.
- Molven, A., Njølstad, P.R., and Fjose, A. (1991). Genomic structure and restricted neural expression of the zebrafish wnt-1 (int-1) gene. *The EMBO Journal* 10, 799–807.
- Morcillo, J., Martínez-Morales, J.R., Trousse, F., Fermin, Y., Sowden, J.C., and Bovolenta, P. (2006). Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development* 133, 3179–3190.
- Morita, K., Chow, K.L., and Ueno, N. (1999). Regulation of body length and male tail ray pattern formation of *Caenorhabditis elegans* by a member of TGF-beta family. *Development* 126, 1337–1347.
- Morrison, D., FitzPatrick, D., Hanson, I., Williamson, K., Heynen, V. van, Fleck, B., Jones, I., Chalmers, J., and Campbell, H. (2002). National study of microphthalmia, anophthalmia, and coloboma (MAC) in Scotland: investigation of genetic aetiology. *Journal of Medical Genetics* 39, 16–22.
- Morrow, E.M., Furukawa, T., Lee, J.E., and Cepko, C.L. (1999a). NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* 126, 23–36.

- Morrow, M.J., Zinn, A.B., Tucker, T., and Leigh, R.J. (1999b). Maculopathy in spinocerebellar ataxia type 7. *Neurology* *53*, 244.
- Moss, J.B., Xavier-Neto, J., Shapiro, M.D., Nayeem, S.M., McCaffery, P., Dräger, U.C., and Rosenthal, N. (1998). Dynamic Patterns of Retinoic Acid Synthesis and Response in the Developing Mammalian Heart. *Developmental Biology* *199*, 55–71.
- Muhr, J., Graziano, E., Wilson, S., Jessell, T.M., and Edlund, T. (1999). Convergent Inductive Signals Specify Midbrain, Hindbrain, and Spinal Cord Identity in Gastrula Stage Chick Embryos. *Neuron* *23*, 689–702.
- Müller, F., Albert, S., Blader, P., Fischer, N., Hallonet, M., and Strahle, U. (2000). Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development* *127*, 3889–3897.
- Müller, M., Jabs, N., Lork, D.E., Fritzsch, B., and Sander, M. (2003). Nkx6.1 controls migration and axon pathfinding of cranial branchio-motoneurons. *Development* *130*, 5815–5826.
- Murphy, P., and Hill, R.E. (1991). Expression of the mouse labial-like homeobox-containing genes, Hox 2.9 and Hox 1.6, during segmentation of the hindbrain. *Development* *111*, 61–74.
- Murphy, P., Davidson, D.R., and Hill, R.E. (1989). Segment-specific expression of a homoeobox-containing gene in the mouse hindbrain. *Nature* *341*, 156–159.
- Nakano, Y., Kim, H.R., Kawakami, A., Roy, S., Schier, A.F., and Ingham, P.W. (2004). Inactivation of dispatched 1 by the chameleon mutation disrupts Hedgehog signalling in the zebrafish embryo. *Developmental Biology* *269*, 381–392.
- Nakhai, H., Sel, S., Favor, J., Mendoza-Torres, L., Paulsen, F., Duncker, G.I.W., and Schmid, R.M. (2007). Ptfla is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development* *134*, 1151–1160.
- Neumann, C.J. (2001). Pattern formation in the zebrafish retina. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *12*, 485–490.
- Neumann, C.J., and Nuesslein-Volhard, C. (2000). Patterning of the Zebrafish Retina by a Wave of Sonic Hedgehog Activity. *Science* *289*, 2137–2139.
- Nguyen, D., Yamada, R., Yoshimitsu, N., Oguri, A., Kojima, T., and Takahashi, N. (2017). Involvement of the Mab2111 gene in calvarial osteogenesis. *Differentiation* *98*, 70–78.
- Niclou, S.P., Jia, L., and Raper, J.A. (2000). Slit2 Is a Repellent for Retinal Ganglion Cell Axons. *J. Neurosci.* *20*, 4962–4974.
- Niederreither, K., McCaffery, P., Dräger, U.C., Chambon, P., and Dollé, P. (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mechanisms of Development* *62*, 67–78.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P., and Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genetics* *21*, 444–448.

- Niehrs, C., Kazanskaya, O., Wu, W., and Glinka, A. (2001). Dickkopf1 and the Spemann-Mangold head organizer. *Int. J. Dev. Biol.* *45*, 237–240.
- 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.
- Noli, L., Capalbo, A., Ogilvie, C., Khalaf, Y., and Ilic, D. (2015). Discordant Growth of Monozygotic Twins Starts at the Blastocyst Stage: A Case Study. *Stem Cell Reports* *5*, 946–953.
- Nolte, C., Amores, A., Nagy Kovács, E., Postlethwait, J., and Featherstone, M. (2003). The role of a retinoic acid response element in establishing the anterior neural expression border of Hoxd4 transgenes. *Mechanisms of Development* *120*, 325–335.
- Nordström, U., Jessell, T.M., and Edlund, T. (2002). Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nature Neuroscience* *5*, 525–532.
- Nordström, U., Maier, E., Jessell, T.M., and Edlund, T. (2006). An Early Role for Wnt Signaling in Specifying Neural Patterns of Cdx and Hox Gene Expression and Motor Neuron Subtype Identity. *PLOS Biology* *4*, e252.
- Ohsawa, R., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2005). Mash1 and Math3 are required for development of branchiomotor neurons and maintenance of neural progenitors. *J. Neurosci.* *25*, 5857–5865.
- Ohshima, T., Ogawa, M., Takeuchi, K., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., and Mikoshiba, K. (2002). Cyclin-Dependent Kinase 5/p35 Contributes Synergistically with Reelin/Dab1 to the Positioning of Facial Branchiomotor and Inferior Olive Neurons in the Developing Mouse Hindbrain. *J. Neurosci.* *22*, 4036–4044.
- Ohta, K., Tannahill, D., Yoshida, K., Johnson, A.R., Cook, G.M.W., and Keynes, R.J. (1999). Embryonic Lens Repels Retinal Ganglion Cell Axons. *Developmental Biology* *211*, 124–132.
- de Oliveira Mann, C.C., Kiefersauer, R., Witte, G., and Hopfner, K.-P. (2016). Structural and biochemical characterization of the cell fate determining nucleotidyltransferase fold protein MAB21L1. *Scientific Reports* *6*.
- Oron-Karni, V., Farhy, C., Elgart, M., Marquardt, T., Remizova, L., Yaron, O., Xie, Q., Cvekl, A., and Ashery-Padan, R. (2008). Dual requirement for Pax6 in retinal progenitor cells. *Development* *135*, 4037–4047.
- Orr, H.T. (2012). Cell biology of spinocerebellar ataxia. *J Cell Biol* *197*, 167–177.
- Oster, S.F., Bodeker, M.O., He, F., and Sretavan, D.W. (2003). Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development. *Development* *130*, 775–784.
- Osumi, N., Hirota, A., Ohuchi, H., Nakafuku, M., Iimura, T., Kuratani, S., Fujiwara, M., Noji, S., and Eto, K. (1997). Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development* *124*, 2961–2972.

- Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Bouillet, P., Sapin, V., Chambon, P., and Dollé, P. (1997). Meis2, a novel mouse Pbx-related homeobox gene induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Developmental Dynamics* *210*, 173–183.
- Oury, F., Murakami, Y., Renaud, J.-S., Pasqualetti, M., Charnay, P., Ren, S.-Y., and Rijli, F.M. (2006). Hoxa2- and Rhombomere-Dependent Development of the Mouse Facial Somatosensory Map. *Science* *313*, 1408–1413.
- Pak, W., Hindges, R., Lim, Y.-S., Pfaff, S.L., and O’Leary, D.D.M. (2004). Magnitude of Binocular Vision Controlled by Islet-2 Repression of a Genetic Program that Specifies Laterality of Retinal Axon Pathfinding. *Cell* *119*, 567–578.
- Panza, P., Sitko, A.A., Maischein, H.-M., Koch, I., Flötenmeyer, M., Wright, G.J., Mandai, K., Mason, C.A., and Söllner, C. (2015). The LRR receptor Islr2 is required for retinal axon routing at the vertebrate optic chiasm. *Neural Development* *10*, 23.
- Park, H.-C., Shin, J., and Appel, B. (2004). Spatial and temporal regulation of ventral spinal cord precursor specification by Hedgehog signaling. *Development* *131*, 5959–5969.
- Parsons, M.J., Pollard, S.M., Saúde, L., Feldman, B., Coutinho, P., Hirst, E.M.A., and Stemple, D.L. (2002). Zebrafish mutants identify an essential role for laminins in notochord formation. *Development* *129*, 3137–3146.
- Pasutto, F., Sticht, H., Hammersen, G., Gillessen-Kaesbach, G., FitzPatrick, D.R., Nürnberg, G., Brasch, F., Schirmer-Zimmermann, H., Tolmie, J.L., Chitayat, D., et al. (2007). Mutations in STRA6 Cause a Broad Spectrum of Malformations Including Anophthalmia, Congenital Heart Defects, Diaphragmatic Hernia, Alveolar Capillary Dysplasia, Lung Hypoplasia, and Mental Retardation. *The American Journal of Human Genetics* *80*, 550–560.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C., and Brunet, J.F. (1997). Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis. *Development* *124*, 4065–4075.
- Pattyn, A., Hirsch, M., Goridis, C., and Brunet, J.F. (2000). Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene Phox2b. *Development* *127*, 1349–1358.
- Pattyn, A., Vallstedt, A., Dias, J.M., Sander, M., and Ericson, J. (2003). Complementary roles for Nkx6 and Nkx2 class proteins in the establishment of motoneuron identity in the hindbrain. *Development* *130*, 4149–4159.
- Paulus, J.D., and Halloran, M.C. (2006). Zebrafish bashful/laminin- α 1 mutants exhibit multiple axon guidance defects. *Developmental Dynamics* *235*, 213–224.
- Pavlou, S., Astell, K., Kasioulis, I., Gakovic, M., Baldock, R., Heynen, V. van, and Coutinho, P. (2014). Pleiotropic Effects of Sox2 during the Development of the Zebrafish Epithalamus. *PLOS ONE* *9*, e87546.
- Perron, M., and Harris, W.A. (2000). Determination of vertebrate retinal progenitor cell fate by the Notch pathway and basic helix-loop-helixtranscription factors. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* *57*, 215–223.

- Petkovich, M., Brand, N.J., Krust, A., and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* *330*, 444–450.
- Philips, G.T., Stair, C.N., Young Lee, H., Wroblewski, E., Berberoglu, M.A., Brown, N.L., and Mastick, G.S. (2005). Precocious retinal neurons: Pax6 controls timing of differentiation and determination of cell type. *Developmental Biology* *279*, 308–321.
- Pillai-Kastoori, L., Wen, W., Wilson, S.G., Strachan, E., Lo-Castro, A., Fichera, M., Musumeci, S.A., Lehmann, O.J., and Morris, A.C. (2014). Sox11 Is Required to Maintain Proper Levels of Hedgehog Signaling during Vertebrate Ocular Morphogenesis. *PLOS Genetics* *10*, e1004491.
- Plachez, C., Andrews, W., Liapi, A., Knoell, B., Drescher, U., Mankoo, B., Zhe, L., Mambetisaeva, E., Annan, A., Bannister, L., et al. (2008). Robos are required for the correct targeting of retinal ganglion cell axons in the visual pathway of the brain. *Molecular and Cellular Neuroscience* *37*, 719–730.
- Plump, A.S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C.J., Goodman, C.S., Mason, C.A., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit1 and Slit2 Cooperate to Prevent Premature Midline Crossing of Retinal Axons in the Mouse Visual System. *Neuron* *33*, 219–232.
- Poché, R.A., Kwan, K.M., Raven, M.A., Furuta, Y., Reese, B.E., and Behringer, R.R. (2007). Lim1 Is Essential for the Correct Laminar Positioning of Retinal Horizontal Cells. *J. Neurosci.* *27*, 14099–14107.
- Poggi, L., Zolessi, F.R., and Harris, W.A. (2005). Time-lapse analysis of retinal differentiation. *Current Opinion in Cell Biology* *17*, 676–681.
- Pöpperl, H., and Featherstone, M.S. (1993). Identification of a retinoic acid response element upstream of the murine Hox-4.2 gene. *Molecular and Cellular Biology* *13*, 257–265.
- Pöpperl, H., Bienz, M., Studer, M., Chan, S.-K., Aparicio, S., Brenner, S., Mann, R.S., and Krumlauf, R. (1995). Segmental expression of Hoxb-1 is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon exd/pbx. *Cell* *81*, 1031–1042.
- Pöpperl, H., Rikhof, H., Cheng, H., Haffter, P., Kimmel, C.B., and Moens, C.B. (2000). lazarus Is a Novel pbx Gene that Globally Mediates hox Gene Function in Zebrafish. *Molecular Cell* *6*, 255–267.
- Pouilhe, M., Gilardi-Hebenstreit, P., Desmarquet-Trin Dinh, C., and Charnay, P. (2007). Direct regulation of vHnf1 by retinoic acid signaling and MAF-related factors in the neural tube. *Developmental Biology* *309*, 344–357.
- Powles, N., Marshall, H., Economou, A., Chiang, C., Murakami, A., Dickson, C., Krumlauf, R., and Maconochie, M. (2004). Regulatory analysis of the mouse Fgf3 gene: Control of embryonic expression patterns and dependence upon sonic hedgehog (Shh) signalling. *Developmental Dynamics* *230*, 44–56.
- Prada, C., Puelles, L., Genis-Gálvez, J.M., and Ramírez, G. (1987). Two modes of free migration of amacrine cell neuroblasts in the chick retina. *Anat Embryol* *175*, 281–287.

- Prince, V., and Lumsden, A. (1994). Hoxa-2 expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development* 120, 911–923.
- Prince, V.E., Moens, C.B., Kimmel, C.B., and Ho, R.K. (1998). Zebrafish hox genes: expression in the hindbrain region of wild-type and mutants of the segmentation gene, valentino. *Development* 125, 393–406.
- Prokudin, I., Simons, C., Grigg, J.R., Storen, R., Kumar, V., Phua, Z.Y., Smith, J., Flaherty, M., Davila, S., and Jamieson, R.V. (2014). Exome sequencing in developmental eye disease leads to identification of causal variants in *GJA8*, *CRYGC*, *PAX6* and *CYP1B1*. *European Journal of Human Genetics* 22, 907–915.
- Quina, L.A., Pak, W., Lanier, J., Banwait, P., Gratwick, K., Liu, Y., Velasquez, T., O’Leary, D.D.M., Goulding, M., and Turner, E.E. (2005). Brn3a-Expressing Retinal Ganglion Cells Project Specifically to Thalamocortical and Collicular Visual Pathways. *J. Neurosci.* 25, 11595–11604.
- Rad, A., Altunoglu, U., Miller, R., Maroofian, R., James, K.N., Çağlayan, A.O., Najafi, M., Stanley, V., Boustany, R.-M., Yeşil, G., et al. (2019). MAB21L1 loss of function causes a syndromic neurodevelopmental disorder with distinctive cerebellar, ocular, craniofacial and genital features (COFG syndrome). *Journal of Medical Genetics* 56, 332–339.
- Ragge, N.K., Brown, A.G., Poloschek, C.M., Lorenz, B., Henderson, R.A., Clarke, M.P., Russell-Eggett, I., Fielder, A., Gerrelli, D., Martinez-Barbera, J.P., et al. (2005). Heterozygous Mutations of OTX2 Cause Severe Ocular Malformations. *The American Journal of Human Genetics* 76, 1008–1022.
- Rainger, J., Pehlivan, D., Johansson, S., Bengani, H., Sanchez-Pulido, L., Williamson, K.A., Ture, M., Barker, H., Rosendahl, K., Spranger, J., et al. (2014). Monoallelic and Biallelic Mutations in MAB21L2 Cause a Spectrum of Major Eye Malformations. *The American Journal of Human Genetics* 94, 915–923.
- Rebagliati, M.R., Toyama, R., Haffter, P., and Dawid, I.B. (1998). cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling. *PNAS* 95, 9932–9937.
- Reijntjes, S., Blentic, A., Gale, E., and Maden, M. (2005). The control of morphogen signalling: Regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Developmental Biology* 285, 224–237.
- Reis, L., and Semina, E. (2011). Genetics of anterior segment dysgenesis disorders. *Current Opinion in Ophthalmology* 22, 314–324.
- Reis, L.M., Tyler, R.C., Schilter, K.F., Abdul-Rahman, O., Innis, J.W., Kozel, B.A., Schneider, A.S., Bardakjian, T.M., Lose, E.J., Martin, D.M., et al. (2011). BMP4 loss-of-function mutations in developmental eye disorders including SHORT syndrome. *Hum Genet* 130, 495–504.
- Rembold, M., Loosli, F., Adams, R.J., and Wittbrodt, J. (2006). Individual Cell Migration Serves as the Driving Force for Optic Vesicle Evagination. *Science* 313, 1130–1134.

- Ren, S.-Y., Angrand, P.-O., and Rijli, F.M. (2002). Targeted insertion results in a Rhombomere 2-specific Hoxa2 knockdown and ectopic activation of Hoxa1 expression. *Developmental Dynamics* 225, 305–315.
- Renninger, S.L., Schonthaler, H.B., Neuhauss, S.C.F., and Dahm, R. (2011). Investigating the genetics of visual processing, function and behaviour in zebrafish. *Neurogenetics* 12, 97–116.
- Rhinn, M., and Dollé, P. (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development* 139, 843–858.
- Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R.R., Meur, M.L., and Ang, S.L. (1998). Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* 125, 845–856.
- Riesenbergs, A.N., Le, T.T., Willardsen, M.I., Blackburn, D.C., Vetter, M.L., and Brown, N.L. (2009). Pax6 regulation of Math5 during mouse retinal neurogenesis. *Genesis* 47, 175–187.
- Riley, B.B., Chiang, M.-Y., Storch, E.M., Heck, R., Buckles, G.R., and Lekven, A.C. (2004). Rhombomere boundaries are Wnt signaling centers that regulate metamer specific patterning in the zebrafish hindbrain. *Dev. Dyn.* 231, 278–291.
- Ringstedt, T., Braisted, J.E., Brose, K., Kidd, T., Goodman, C., Tessier-Lavigne, M., and O’Leary, D.D.M. (2000). Slit Inhibition of Retinal Axon Growth and Its Role in Retinal Axon Pathfinding and Innervation Patterns in the Diencephalon. *J. Neurosci.* 20, 4983–4991.
- Robu, M.E., Larson, J.D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S.A., and Ekker, S.C. (2007). p53 Activation by Knockdown Technologies. *PLoS Genetics* 3, 15.
- Rodriguez, J., Esteve, P., Weinl, C., Ruiz, J.M., Fermin, Y., Trousse, F., Dwivedy, A., Holt, C., and Bovolenta, P. (2005). SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci* 8, 1301–1309.
- Roelink, H., and Nusse, R. (1991). Expression of two members of the Wnt family during mouse development--restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube. *Genes Dev.* 5, 381–388.
- Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S.W., Tsui, L.-C., and Muenke, M. (1996). Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14, 357–360.
- Rohani, N., Canty, L., Luu, O., Fagotto, F., and Winklbauer, R. (2011). EphrinB/EphB Signaling Controls Embryonic Germ Layer Separation by Contact-Induced Cell Detachment. *PLOS Biology* 9, e1000597.
- Rohr, K.B., Barth, K.A., Varga, Z.M., and Wilson, S.W. (2001). The Nodal Pathway Acts Upstream of Hedgehog Signaling to Specify Ventral Telencephalic Identity. *Neuron* 29, 341–351.
- Rossel, M., and Capecchi, M.R. (1999). Mice mutant for both Hoxa1 and Hoxb1 show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* 126, 5027–5040.

- Rossel, M., Loulier, K., Feuillet, C., Alonso, S., and Carroll, P. (2005). Reelin signaling is necessary for a specific step in the migration of hindbrain efferent neurons. *Development* *132*, 1175–1185.
- Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölder, S., Krüger, M., and Stainier, D.Y.R. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* *524*, 230–233.
- Saito, Y., Kojima, T., and Takahashi, N. (2012). Mab21l2 Is Essential for Embryonic Heart and Liver Development. *PLOS ONE* *7*, e32991.
- Sajgo, S., Ghinia, M.G., Brooks, M., Kretschmer, F., Chuang, K., Hiriyanna, S., Wu, Z., Popescu, O., and Badea, T.C. (2017). Molecular codes for cell type specification in Brn3 retinal ganglion cells. *PNAS* *114*, E3974–E3983.
- Sakai, J.A., and Halloran, M.C. (2006). Semaphorin 3d guides laterality of retinal ganglion cell projections in zebrafish. *Development* *133*, 1035–1044.
- Saleh, M., Rambaldi, I., Yang, X.-J., and Featherstone, M.S. (2000). Cell Signaling Switches HOX-PBX Complexes from Repressors to Activators of Transcription Mediated by Histone Deacetylases and Histone Acetyltransferases. *Molecular and Cellular Biology* *20*, 8623–8633.
- Salzberg, A., Elias, S., Nachaliel, N., Bonstein, L., Henig, C., and Frank, D. (1999). A Meis family protein caudalizes neural cell fates in Xenopus. *Mechanisms of Development* *80*, 3–13.
- Sampath, K., Rubinstein, A.L., Cheng, A.M.S., Liang, J.O., Fekany, K., Solnica-Krezel, L., Korzh, V., Halpern, M.E., and Wright, C.V.E. (1998). Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. *Nature* *395*, 185–189.
- Sánchez-Camacho, C., and Bovolenta, P. (2008). Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the *in vivo* growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* *135*, 3531–3541.
- Sapkota, D., Chintala, H., Wu, F., Fliesler, S.J., Hu, Z., and Mu, X. (2014). Onecut1 and Onecut2 redundantly regulate early retinal cell fates during development. *PNAS* *111*, E4086–E4095.
- Sato, S., Inoue, T., Terada, K., Matsuo, I., Aizawa, S., Tano, Y., Fujikado, T., and Furukawa, T. (2007). Dkk3-Cre BAC transgenic mouse line: a tool for highly efficient gene deletion in retinal progenitor cells. *Genesis* *45*, 502–507.
- Satow, T., Bae, S.-K., Inoue, T., Inoue, C., Miyoshi, G., Tomita, K., Bessho, Y., Hashimoto, N., and Kageyama, R. (2001). The Basic Helix-Loop-Helix Gene *hesr2* Promotes Gliogenesis in Mouse Retina. *J. Neurosci.* *21*, 1265–1273.
- Sauer, F.C. (1935). Mitosis in the neural tube. *Journal of Comparative Neurology* *62*, 377–405.
- Schauerte, H.E., Eeden, F.J. van, Fricke, C., Odenthal, J., Strahle, U., and Haffter, P. (1998). Sonic hedgehog is not required for the induction of medial floor plate cells in the zebrafish. *Development* *125*, 2983–2993.

- Schilling, T.F., and Kimmel, C.B. (1994). Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. *Development* *120*, 483–494.
- Schilter, K.F., Schneider, A., Bardakjian, T., Soucy, J.-F., Tyler, R.C., Reis, L.M., and Semina, E.V. (2011). OTX2 microphthalmia syndrome: four novel mutations and delineation of a phenotype. *Clinical Genetics* *79*, 158–168.
- Schimmenti, L.A., Cruz, J. de la, Lewis, R.A., Karkera, J.D., Manligas, G.S., Roessler, E., and Muenke, M. (2003). Novel mutation in sonic hedgehog in non-syndromic colobomatous microphthalmia. *American Journal of Medical Genetics Part A* *116A*, 215–221.
- Schneider, A., Bardakjian, T., Reis, L.M., Tyler, R.C., and Semina, E.V. (2009). Novel SOX2 mutations and genotype–phenotype correlation in anophthalmia and microphthalmia. *American Journal of Medical Genetics Part A* *149A*, 2706–2715.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitanidou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C., and Charnay, P. (1993). Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* *75*, 1199–1214.
- Schneider-Maunoury, S., Seitanidou, T., Charnay, P., and Lumsden, A. (1997). Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of Krox-20 mouse mutants. *Development* *124*, 1215–1226.
- Schwarz, Q., Gu, C., Fujisawa, H., Sabelko, K., Gertsenstein, M., Nagy, A., Taniguchi, M., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., Shima, D.T., et al. (2004). Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with Sema3A to pattern distinct compartments of the facial nerve. *Genes Dev.* *18*, 2822–2834.
- Seidel, K., Siswanto, S., Brunt, E.R.P., den Dunnen, W., Korf, H.-W., and Rüb, U. (2012). Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol* *124*, 1–21.
- Sekimizu, K., Nishioka, N., Sasaki, H., Takeda, H., Karlstrom, R.O., and Kawakami, A. (2004). The zebrafish iguana locus encodes Dzip1, a novel zinc-finger protein required for proper regulation of Hedgehog signaling. *Development* *131*, 2521–2532.
- Sela-Donenfeld, D., Kayam, G., and Wilkinson, D.G. (2009). Boundary cells regulate a switch in the expression of FGF3 in hindbrain rhombomeres. *BMC Developmental Biology* *9*, 16.
- Serpente, P., Tümpel, S., Ghyselinck, N.B., Niederreither, K., Wiedemann, L.M., Dollé, P., Chambon, P., Krumlauf, R., and Gould, A.P. (2005). Direct crossregulation between retinoic acid receptor β and Hox genes during hindbrain segmentation. *Development* *132*, 503–513.
- Sghari, S., and Gunhaga, L. (2018). Temporal Requirement of *Mab21l2* During Eye Development in Chick Reveals Stage-Dependent Functions for Retinogenesis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* *59*, 3869.
- Shah, A.N., Davey, C.F., Whitebirch, A.C., Miller, A.C., and Moens, C.B. (2015). Rapid reverse genetic screening using CRISPR in zebrafish. *Nature Methods* *12*, 535–540.

- Shanmugalingam, S., Houart, C., Picker, A., Reifers, F., Macdonald, R., Barth, A., Griffin, K., Brand, M., and Wilson, S.W. (2000). Ace/Fgf8 is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon. *Development* 127, 2549–2561.
- Shi, X., Luo, Y., Howley, S., Dzialo, A., Foley, S., Hyde, D.R., and Vihtelic, T.S. (2006). Zebrafish foxe3: Roles in ocular lens morphogenesis through interaction with pitx3. *Mechanisms of Development* 123, 761–782.
- Shimizu, T., Bae, Y.-K., Muraoka, O., and Hibi, M. (2005). Interaction of Wnt and caudal-related genes in zebrafish posterior body formation. *Developmental Biology* 279, 125–141.
- Shimizu, T., Bae, Y.-K., and Hibi, M. (2006). Cdx-Hox code controls competence for responding to Fgfs and retinoic acid in zebrafish neural tissue. *Development* 133, 4709–4719.
- Shin, J., Park, H.-C., Topczewska, J.M., Mawdsley, D.J., and Appel, B. (2003). Neural cell fate analysis in zebrafish using olig2 BAC transgenics. *Methods Cell Sci* 25, 7–14.
- 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. *The EMBO Journal* 12, 2735–2747.
- Sirbu, I.O., Gresh, L., Barra, J., and Duester, G. (2005). Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. *Development* 132, 2611–2622.
- Skalicky, S.E., White, A.J.R., Grigg, J.R., Martin, F., Smith, J., Jones, M., Donaldson, C., Smith, J.E.H., Flaherty, M., and Jamieson, R.V. (2013). Microphthalmia, Anophthalmia, and Coloboma and Associated Ocular and Systemic Features: Understanding the Spectrum. *JAMA Ophthalmol* 131, 1517–1524.
- Slavotinek, A.M., Chao, R., Vacik, T., Yahyavi, M., Abouzeid, H., Bardakjian, T., Schneider, A., Shaw, G., Sherr, E.H., Lemke, G., et al. (2012). VAX1 mutation associated with microphthalmia, corpus callosum agenesis, and orofacial clefting: The first description of a VAX1 phenotype in humans. *Human Mutation* 33, 364–368.
- Solanas, G., Cortina, C., Sevillano, M., and Batlle, E. (2011). Cleavage of E-cadherin by ADAM10 mediates epithelial cell sorting downstream of EphB signalling. *Nature Cell Biology* 13, 1100–1107.
- Solomon, B.D., Pineda-Alvarez, D.E., Balog, J.Z., Hadley, D., Gropman, A.L., Nandagopal, R., Han, J.C., Hahn, J.S., Blain, D., Brooks, B., et al. (2009). Compound heterozygosity for mutations in PAX6 in a patient with complex brain anomaly, neonatal diabetes mellitus, and microphthalmia. *American Journal of Medical Genetics Part A* 149A, 2543–2546.
- Sridharan, J., Haremake, T., Jin, Y., Teegala, S., and Weinstein, D.C. (2012). Xmab21l3 mediates dorsoventral patterning in *Xenopus laevis*. *Mechanisms of Development* 129, 136–146.
- Srour, M., Chitayat, D., Caron, V., Chassaing, N., Bitoun, P., Patry, L., Cordier, M.-P., Capo-Chichi, J.-M., Francannet, C., Calvas, P., et al. (2013). Recessive and Dominant Mutations in Retinoic Acid Receptor Beta in Cases with Microphthalmia and Diaphragmatic Hernia. *The American Journal of Human Genetics* 93, 765–772.

- Stainier, D.Y.R., Raz, E., Lawson, N.D., Ekker, S.C., Burdine, R.D., Eisen, J.S., Ingham, P.W., Schulte-Merker, S., Yelon, D., Weinstein, B.M., et al. (2017). Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLOS Genetics* *13*, e1007000.
- Stigloher, C., Ninkovic, J., Laplante, M., Geling, A., Tannhäuser, B., Topp, S., Kikuta, H., Becker, T.S., Houart, C., and Bally-Cuif, L. (2006). Segregation of telencephalic and eye-field identities inside the zebrafish forebrain territory is controlled by Rx3. *Development* *133*, 2925–2935.
- Stockinger, P., Maître, J.-L., and Heisenberg, C.-P. (2011). Defective neuroepithelial cell cohesion affects tangential branchiomotor neuron migration in the zebrafish neural tube. *Development* *138*, 4673–4683.
- Strömland, K., and Pinazo-Durán, M.D. (2002). OPHTHALMIC INVOLVEMENT IN THE FETAL ALCOHOL SYNDROME: CLINICAL AND ANIMAL MODEL STUDIES. *Alcohol Alcohol* *37*, 2–8.
- Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A., and Krumlauf, R. (1996). Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature* *384*, 630–634.
- Studer, M., Gavalas, A., Marshall, H., Ariza-McNaughton, L., Rijli, F.M., Chambon, P., and Krumlauf, R. (1998). Genetic interactions between Hoxa1 and Hoxb1 reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* *125*, 1025–1036.
- Sun, Z., and Hopkins, N. (2001). vhnf1, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes Dev.* *15*, 3217–3229.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science* *339*, 786–791.
- Sundin, O., Busse, H., Rogers, M., Gudas, L., and Eichele, G. (1990). Region-specific expression in early chick and mouse embryos of Ghox-lab and Hox 1.6, vertebrate homeobox-containing genes related to *Drosophila* labial. *Development (Cambridge, England)* *108*, 47–58.
- Suzuki, S.C., Bleckert, A., Williams, P.R., Takechi, M., Kawamura, S., and Wong, R.O.L. (2013). Cone photoreceptor types in zebrafish are generated by symmetric terminal divisions of dedicated precursors. *PNAS* *110*, 15109–15114.
- Suzuki, Y., Yandell, M.D., Roy, P.J., Krishna, S., Savage-Dunn, C., Ross, R.M., Padgett, R.W., and Wood, W.B. (1999). A BMP homolog acts as a dose-dependent regulator of body size and male tail patterning in *Caenorhabditis elegans*. *Development* *126*, 241–250.
- Swindell, E.C., Thaller, C., Sockanathan, S., Petkovich, M., Jessell, T.M., and Eichele, G. (1999). Complementary Domains of Retinoic Acid Production and Degradation in the Early Chick Embryo. *Developmental Biology* *216*, 282–296.
- Takahashi, C., Kusakabe, M., Suzuki, T., Miyatake, K., and Nishida, E. (2015). *mab21-l3* regulates cell fate specification of multiciliate cells and ionocytes. *Nature Communications* *6*, 6017.

- Takeuchi, M., Clarke, J.D.W., and Wilson, S.W. (2003). Hedgehog signalling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of Vax gene activity. *Development* 130, 955–968.
- Taranova, O.V., Magness, S.T., Fagan, B.M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S.R., and Pevny, L.H. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev.* 20, 1187–1202.
- Tassabehji, M., Fang, Z.M., Hilton, E.N., McGaughran, J., Zhao, Z., de Bock, C.E., Howard, E., Malass, M., Donnai, D., Diwan, A., et al. (2008). Mutations in GDF6 are associated with vertebral segmentation defects in Klippel-Feil syndrome. *Human Mutation* 29, 1017–1027.
- Tendeng, C., and Houart, C. (2006). Cloning and embryonic expression of five distinct sfrp genes in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene Expression Patterns* 6, 761–771.
- Thaler, J.P., Koo, S.J., Kania, A., Lettieri, K., Andrews, S., Cox, C., Jessell, T.M., and Pfaff, S.L. (2004). A Postmitotic Role for Isl-Class LIM Homeodomain Proteins in the Assignment of Visceral Spinal Motor Neuron Identity. *Neuron* 41, 337–350.
- Theil, T., Frain, M., Gilardi-Hebenstreit, P., Flenniken, A., Charnay, P., and Wilkinson, D.G. (1998). Segmental expression of the EphA4 (Sek-1) receptor tyrosine kinase in the hindbrain is under direct transcriptional control of Krox-20. *Development* 125, 443–452.
- Thierion, E., Men, J.L., Collombet, S., Hernandez, C., Couprier, F., Torbey, P., Thomas-Chollier, M., Noordermeer, D., Charnay, P., and Gilardi-Hebenstreit, P. (2017). Krox20 hindbrain regulation incorporates multiple modes of cooperation between cis-acting elements. *PLOS Genetics* 13, e1006903.
- Thisse, C., and Thisse, B. (2005). ZFIN Publication: Thisse et al., 2005.
- Thisse, B., Pflumio, S., Fürthauer, M., Loppin, B., Heyer, V., Degrave, A., Woehl, R., Steffan, T., and Thisse, C. (2001). ZFIN Publication: Thisse et al., 2001.
- Thompson, H., Camand, O., Barker, D., and Erskine, L. (2006). Slit Proteins Regulate Distinct Aspects of Retinal Ganglion Cell Axon Guidance within Dorsal and Ventral Retina. *J. Neurosci.* 26, 8082–8091.
- Thompson, H., Andrews, W., Parnavelas, J.G., and Erskine, L. (2009). Robo2 is required for Slit-mediated intraretinal axon guidance. *Developmental Biology* 335, 418–426.
- Thurtell, M.J., Bioussse, V., and Newman, N.J. (2011). Rod-Cone Dystrophy in Spinocerebellar Ataxia Type 1. *Arch Ophthalmol* 129, 956–958.
- Tillo, M., Erskine, L., Cariboni, A., Fantin, A., Joyce, A., Denti, L., and Ruhrberg, C. (2015). VEGF189 binds NRP1 and is sufficient for VEGF/NRP1-dependent neuronal patterning in the developing brain. *Development* 142, 314–319.
- Tomita, K., Moriyoshi, K., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2000). Mammalian achaete–scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *The EMBO Journal* 19, 5460–5472.

- Torres, M., Gomez-Pardo, E., and Gruss, P. (1996). Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development* 122, 3381–3391.
- Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N., Suto, F., Kamei, J., Aoki, K., Yabuki, M., Hori, M., Fujisawa, H., et al. (2004). Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev.* 18, 435–447.
- Trousse, F., Martí, E., Gruss, P., Torres, M., and Bovolenta, P. (2001). Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development* 128, 3927–3936.
- Tucker, P., Laemle, L., Munson, A., Kanekar, S., Oliver, E.R., Brown, N., Schlecht, H., Vetter, M., and Glaser, T. (2001). The eyeless mouse mutation (ey1) removes an alternative start codon from the Rx/rax homeobox gene. *Genesis* 31, 43–53.
- Turner, D.L., and Cepko, C.L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328, 131–136.
- Turner, D.L., Snyder, E.Y., and Cepko, C.L. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4, 833–845.
- Ueki, Y., Wilken, M.S., Cox, K.E., Chipman, L.B., Bermingham-McDonogh, O., and Reh, T.A. (2015). A transient wave of BMP signaling in the retina is necessary for Müller glial differentiation. *Development* 142, 533–543.
- Urness, L.D., Paxton, C.N., Wang, X., Schoenwolf, G.C., and Mansour, S.L. (2010). FGF signaling regulates otic placode induction and refinement by controlling both ectodermal target genes and hindbrain Wnt8a. *Developmental Biology* 340, 595–604.
- Valdivia, L.E., Lamb, D.B., Horner, W., Wierzbicki, C., Tafessu, A., Williams, A.M., Gestri, G., Krasnow, A.M., Vleeshouwer-Neumann, T.S., Givens, M., et al. (2016). Antagonism between Gdf6a and retinoic acid pathways controls timing of retinal neurogenesis and growth of the eye in zebrafish. *Development* 143, 1087–1098.
- Valleix, S., Niel, F., Nedelec, B., Algros, M.-P., Schwartz, C., Delbosc, B., Delpech, M., and Kantelip, B. (2006). Homozygous Nonsense Mutation in the FOXE3 Gene as a Cause of Congenital Primary Aphakia in Humans. *The American Journal of Human Genetics* 79, 358–364.
- Van der Wees, J., Schilthuis, J.G., Koster, C.H., Diesveld-Schipper, H., Folkers, G.E., Saag, P.T. van der, Dawson, M.I., Shudo, K., Burg, B. van der, and Durston, A.J. (1998). Inhibition of retinoic acid receptor-mediated signalling alters positional identity in the developing hindbrain. *Development* 125, 545–556.
- Varga, Z.M., Wegner, J., and Westerfield, M. (1999). Anterior movement of ventral diencephalic precursors separates the primordial eye field in the neural plate and requires cyclops. *Development* 126, 5533–5546.
- Vitobello, A., Ferretti, E., Lampe, X., Vilain, N., Ducret, S., Ori, M., Spetz, J.-F., Selleri, L., and Rijli, F.M. (2011). Hox and Pbx Factors Control Retinoic Acid Synthesis during Hindbrain Segmentation. *Developmental Cell* 20, 469–482.

- Vitorino, M., Jusuf, P.R., Maurus, D., Kimura, Y., Higashijima, S., and Harris, W.A. (2009). Vsx2 in the zebrafish retina: restricted lineages through derepression. *Neural Development* *4*, 14.
- Vlachakis, N., Choe, S.K., and Sagerstrom, C.G. (2001). Meis3 synergizes with Pbx4 and Hoxb1b in promoting hindbrain fates in the zebrafish. *Development* *128*, 1299–1312.
- Voiculescu, O., Taillebourg, E., Pujades, C., Kress, C., Buart, S., Charnay, P., and Schneider-Maunoury, S. (2001). Hindbrain patterning: Krox20 couples segmentation and specification of regional identity. *Development* *128*, 4967–4978.
- Voronina, V.A., Kozhemyakina, E.A., O'Kernick, C.M., Kahn, N.D., Wenger, S.L., Linberg, J.V., Schneider, A.S., and Mathers, P.H. (2004). Mutations in the human RAX homeobox gene in a patient with anophthalmia and sclerocornea. *Hum Mol Genet* *13*, 315–322.
- Wada, H., Iwasaki, M., Sato, T., Masai, I., Nishiwaki, Y., Tanaka, H., Sato, A., Nojima, Y., and Okamoto, H. (2005). Dual roles of zygotic and maternal Scribble1 in neural migration and convergent extension movements in zebrafish embryos. *Development* *132*, 2273–2285.
- Wada, H., Tanaka, H., Nakayama, S., Iwasaki, M., and Okamoto, H. (2006). Frizzled3a and Celsr2 function in the neuroepithelium to regulate migration of facial motor neurons in the developing zebrafish hindbrain. *Development* *133*, 4749–4759.
- Wallis, D.E., Roessler, E., Hehr, U., Nanni, L., Wiltshire, T., Richieri-Costa, A., Gillessen-Kaesbach, G., Zackai, E.H., Rommens, J., and Muenke, M. (1999). Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* *22*, 196–198.
- Walshe, J., Maroon, H., McGonnell, I.M., Dickson, C., and Mason, I. (2002). Establishment of Hindbrain Segmental Identity Requires Signaling by FGF3 and FGF8. *Current Biology* *12*, 1117–1123.
- Wang, L., He, F., Bu, J., Liu, X., Du, W., Dong, J., Cooney, J.D., Dubey, S.K., Shi, Y., Gong, B., et al. (2012). ABCB6 Mutations Cause Ocular Coloboma. *The American Journal of Human Genetics* *90*, 40–48.
- Wang, P., Liang, X., Yi, J., and Zhang, Q. (2008). Novel SOX2 Mutation Associated With Ocular Coloboma in a Chinese Family. *Arch Ophthalmol* *126*, 709–713.
- Wang, S., Sengel, C., Emerson, M.M., and Cepko, C.L. (2014). A Gene Regulatory Network Controls the Binary Fate Decision of Rod and Bipolar Cells in the Vertebrate Retina. *Developmental Cell* *30*, 513–527.
- Wang, S.W., Kim, B.S., Ding, K., Wang, H., Sun, D., Johnson, R.L., Klein, W.H., and Gan, L. (2001). Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells. *Genes Dev.* *15*, 24–29.
- Wanner, S.J., and Prince, V.E. (2013). Axon tracts guide zebrafish facial branchiomotor neuron migration through the hindbrain. *Development* *140*, 906–915.
- Waskiewicz, A.J., Rikhof, H.A., Hernandez, R.E., and Moens, C.B. (2001). Zebrafish Meis functions to stabilize Pbx proteins and regulate hindbrain patterning. *Development* *128*, 4139–4151.

- Waskiewicz, A.J., Rikhof, H.A., and Moens, C.B. (2002). Eliminating Zebrafish Pbx Proteins Reveals a Hindbrain Ground State. *Developmental Cell* 3, 723–733.
- Wässle, H., Dacey, D.M., Haun, T., Haverkamp, S., Grünert, U., and Boycott, B.B. (2000). The mosaic of horizontal cells in the macaque monkey retina: With a comment on biplexiform ganglion cells. *Visual Neuroscience* 17, 591–608.
- Weber, I.P., Ramos, A.P., Strzyz, P.J., Leung, L.C., Young, S., and Norden, C. (2014). Mitotic Position and Morphology of Committed Precursor Cells in the Zebrafish Retina Adapt to Architectural Changes upon Tissue Maturation. *Cell Reports* 7, 386–397.
- Weiner, J.A., Koo, S.J., Nicolas, S., Fraboulet, S., Pfaff, S.L., Pourquié, O., and Sanes, J.R. (2004). Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. *Molecular and Cellular Neuroscience* 27, 59–69.
- Weisinger, K., Wilkinson, D.G., and Sela-Donenfeld, D. (2008). Inhibition of BMPs by follistatin is required for FGF3 expression and segmental patterning of the hindbrain. *Developmental Biology* 324, 213–225.
- Wen, W., Pillai-Kastoori, L., Wilson, S.G., and Morris, A.C. (2015). Sox4 regulates choroid fissure closure by limiting Hedgehog signaling during ocular morphogenesis. *Developmental Biology* 399, 139–153.
- White, J.C., Highland, M., Kaiser, M., and Clagett-Dame, M. (2000). Vitamin A Deficiency Results in the Dose-Dependent Acquisition of Anterior Character and Shortening of the Caudal Hindbrain of the Rat Embryo. *Developmental Biology* 220, 263–284.
- White, R.J., Nie, Q., Lander, A.D., and Schilling, T.F. (2007). Complex Regulation of cyp26a1 Creates a Robust Retinoic Acid Gradient in the Zebrafish Embryo. *PLOS Biology* 5, e304.
- Wiellette, E.L., and Sive, H. (2003). vhnf1 and Fgf signals synergize to specify rhombomere identity in the zebrafish hindbrain. *Development* 130, 3821–3829.
- Wigle, J.T., Chowdhury, K., Gruss, P., and Oliver, G. (1999). Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat Genet* 21, 318–322.
- Wilkinson, D.G. (2014). Regulation of cell differentiation by Eph receptor and ephrin signaling. *Cell Adhesion & Migration* 8, 339–348.
- Wilkinson, D.G. (2018). Establishing sharp and homogeneous segments in the hindbrain. *F1000Research* 7, 1268.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Cook, M., Boncinelli, E., and Krumlauf, R. (1989a). Segmental expression of Hox-2 homoeobox-containing genes in the developing mouse hindbrain. *Nature* 341, 405–409.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Chavrier, P., Bravo, R., and Charnay, P. (1989b). Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* 337, 461–464.

- Williams, S.E., Grumet, M., Colman, D.R., Henkemeyer, M., Mason, C.A., and Sakurai, T. (2006). A Role for Nr-CAM in the Patterning of Binocular Visual Pathways. *Neuron* *50*, 535–547.
- Williamson, K.A., and FitzPatrick, D.R. (2014). The genetic architecture of microphthalmia, anophthalmia and coloboma. *European Journal of Medical Genetics* *57*, 369–380.
- Williamson, K.A., Rainger, J., Floyd, J.A.B., Ansari, M., Meynert, A., Aldridge, K.V., Rainger, J.K., Anderson, C.A., Moore, A.T., Hurles, M.E., et al. (2014). Heterozygous Loss-of-Function Mutations in YAP1 Cause Both Isolated and Syndromic Optic Fissure Closure Defects. *The American Journal of Human Genetics* *94*, 295–302.
- Wilson, S.W., and Houart, C. (2004). Early Steps in the Development of the Forebrain. *Developmental Cell* *6*, 167–181.
- Wolda, S.L., Moody, C.J., and Moon, R.T. (1993). Overlapping Expression of Xwnt-3A and Xwnt-1 in Neural Tissue of *Xenopus laevis* Embryos. *Developmental Biology* *155*, 46–57.
- Wolf, L.V., Yang, Y., Wang, J., Xie, Q., Braunger, B., Tamm, E.R., Zavadil, J., and Cvekl, A. (2009). Identification of Pax6-Dependent Gene Regulatory Networks in the Mouse Lens. *PLOS ONE* *4*, e4159.
- Wong, R.L.Y., and Chow, K.L. (2002a). Depletion of Mab21l1 and Mab21l2 messages in mouse embryo arrests axial turning, and impairs notochord and neural tube differentiation. *Teratology* *65*, 70–77.
- Wong, Y.-M., and Chow, K.L. (2002b). Expression of zebrafish mab21 genes marks the differentiating eye, midbrain and neural tube. *Mechanisms of Development* *113*, 149–152.
- Wong, E.Y.M., Wang, X.A., Mak, S.S., Sae-Pang, J.J., Ling, K.W., Fritzsch, B., and Sham, M.H. (2011). Hoxb3 negatively regulates Hoxb1 expression in mouse hindbrain patterning. *Developmental Biology* *352*, 382–392.
- Wong, G.K.W., Baudet, M.-L., Norden, C., Leung, L., and Harris, W.A. (2012). Slit1b-Robo3 Signaling and N-Cadherin Regulate Apical Process Retraction in Developing Retinal Ganglion Cells. *J. Neurosci.* *32*, 223–228.
- Wong, L., Weadick, C.J., Kuo, C., Chang, B.S., and Tropepe, V. (2010). Duplicate dmbx1 genes regulate progenitor cell cycle and differentiation during zebrafish midbrain and retinal development. *BMC Dev Biol* *10*, 1–24.
- Wong, L., Power, N., Miles, A., and Tropepe, V. (2015). Mutual antagonism of the paired-type homeobox genes, vsx2 and dmbx1, regulates retinal progenitor cell cycle exit upstream of ccnd1 expression. *Developmental Biology* *402*, 216–228.
- Wong, R.L.Y., Wong, H.T., and Chow, K.L. (1999a). Genomic cloning and chromosomal localization of the mouse *Mab21l2* locus. *Cytogenetic and Genome Research* *86*, 21–24.
- Wong, R.L.Y., Chan, K.K.L., and Chow, K.L. (1999b). Developmental expression of Mab21l2 during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development* *87*, 185–188.

- Woo, K., and Fraser, S.E. (1995). Order and coherence in the fate map of the zebrafish nervous system. *Development* 121, 2595–2609.
- Wu, F., Sapkota, D., Li, R., and Mu, X. (2012). Onecut 1 and Onecut 2 are potential regulators of mouse retinal development. *Journal of Comparative Neurology* 520, 952–969.
- Wurm, A., Sock, E., Fuchshofer, R., Wegner, M., and Tamm, E.R. (2008). Anterior segment dysgenesis in the eyes of mice deficient for the high-mobility-group transcription factor Sox11. *Experimental Eye Research* 86, 895–907.
- Wyatt, A., Bakrania, P., Bunyan, D.J., Osborne, R.J., Crolla, J.A., Salt, A., Ayuso, C., Newbury-Ecob, R., Abou-Rayyah, Y., Collin, J.R.O., et al. (2008). Novel heterozygous OTX2 mutations and whole gene deletions in anophthalmia, microphthalmia and coloboma. *Human Mutation* 29, E278–E283.
- Wyatt, A.W., Osborne, R.J., Stewart, H., and Ragge, N.K. (2010). Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) mutations are associated with variable ocular, brain, ear, palate, and skeletal anomalies. *Human Mutation* 31, 781–787.
- Xiao, X., Li, S., and Zhang, Q. (2012). Microphthalmia, late onset keratitis, and iris coloboma/aniridia in a family with a novel PAX6 mutation. *Ophthalmic Genetics* 33, 119–121.
- Xu, Q., and Wilkinson, D.G. (1997). Eph-related receptors and their ligands: mediators of contact dependent cell interactions. *Journal of Molecular Medicine* 75, 576–586.
- Xu, Q., Alldus, G., Holder, N., and Wilkinson, D.G. (1995). Expression of truncated Sek-1 receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the Xenopus and zebrafish hindbrain. *Development* 121, 4005–4016.
- Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V., and Wilkinson, D.G. (1999). In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature* 399, 267–271.
- Yahyavi, M., Abouzeid, H., Gawdat, G., de Preux, A.-S., Xiao, T., Bardakjian, T., Schneider, A., Choi, A., Jorgenson, E., Baier, H., et al. (2013). ALDH1A3 loss of function causes bilateral anophthalmia/microphthalmia and hypoplasia of the optic nerve and optic chiasm. *Hum Mol Genet* 22, 3250–3258.
- 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.
- Yamamoto, A., Nagano, T., Takehara, S., Hibi, M., and Aizawa, S. (2005). Shisa Promotes Head Formation through the Inhibition of Receptor Protein Maturation for the Caudalizing Factors, Wnt and FGF. *Cell* 120, 223–235.
- Yang, Z., Ding, K., Pan, L., Deng, M., and Gan, L. (2003). Math5 determines the competence state of retinal ganglion cell progenitors. *Developmental Biology* 264, 240–254.

- Zannino, D. (2009). MULTIPLE ROLES FOR OLIG2 IN THE HINDBRAIN: OLIGODENDROCYTE AND ABDUCENS MOTOR NEURON SPECIFICATION AND FACIAL MOTOR NEURON MIGRATION. *127*.
- Zerucha, T., and Prince, V.E. (2001). Cloning and developmental expression of a zebrafish meis2 homeobox gene. *Mechanisms of Development* *102*, 247–250.
- Zhang, L., Mathers, P.H., and Jamrich, M. (2000). Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genesis* *28*, 135–142.
- Zhang, T., Dayanandan, B., Rouiller, I., Lawrence, E.J., and Mandato, C.A. (2011). Growth-Arrest-Specific Protein 2 Inhibits Cell Division in Xenopus Embryos. *PLoS One* *6*.
- Zhang, X., Piano, I., Messina, A., D'Antongiovanni, V., Crò, F., Provenzano, G., Bozzi, Y., Gargini, C., and Casarosa, S. (2019). Retinal defects in mice lacking the autism-associated gene Engrailed-2. *Neuroscience* *408*, 177–190.
- Zhao, X., and Duester, G. (2009). Effect of retinoic acid signaling on Wnt/β-catenin and FGF signaling during body axis extension. *Gene Expression Patterns* *9*, 430–435.
- Zhao, L., Saitsu, H., Sun, X., Shiota, K., and Ishibashi, M. (2010). Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain. *Mechanisms of Development* *127*, 62–72.
- Zinyk, D.L., Mercer, E.H., Harris, E., Anderson, D.J., and Joyner, A.L. (1998). Fate mapping of the mouse midbrain–hindbrain constriction using a site-specific recombination system. *Current Biology* *8*, 665–672.
- Zolessi, F.R., Poggi, L., Wilkinson, C.J., Chien, C.-B., and Harris, W.A. (2006). Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo. *Neural Dev* *1*, 1–22.
- Zou, C., and Levine, E.M. (2012). Vsx2 Controls Eye Organogenesis and Retinal Progenitor Identity Via Homeodomain and Non-Homeodomain Residues Required for High Affinity DNA Binding. *PLOS Genetics* *8*, e1002924.
- Zuber, M.E., Perron, M., Philpott, A., Bang, A., and Harris, W.A. (1999). Giant Eyes in *Xenopus laevis* by Overexpression of XOptx2. *Cell* *98*, 341–352.
- 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.

Annexe

Article

BMP- And Neuropilin 1-mediated Motor Axon Navigation Relies on Spastin Alternative Translation

Nicolas Jardin¹, François Giudicelli², Daniel Ten Martín¹, Anaïs Vitrac¹, Stéphanie De Gois¹, Rachel Allison³, Corinne Houart⁴, Evan Reid³, Jamilé Hazan¹, Coralie Fassier¹

¹Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM, CNRS, Neuroscience Paris Seine, Institut de Biologie Paris-Seine (NPS-IBPS), 75005 Paris, France.

²Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, CNRS, INSERM, Biologie du Développement Paris Seine, Institut de Biologie Paris-Seine (LBD-IBPS), 75005 Paris, France.

³Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge CB2 OXY, UK.

⁴Medical Research Council Centre for Developmental Neurobiology, King's College London, London SE1 1UL, UK.

