

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR  
NADINE MAYOTTE

EXPRESSION ET LOCALISATION DU GÈNE HOMÉOTIQUE  
*PAX-6* AU COURS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE L'ENCÉPHALE  
DE POULET

MAI 1998

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

***«Celui qui a une raison de vivre peut affronter presque tout.»***

**Nietzsche**

## RÉSUMÉ

Originellement identifié dans un segment de la drosophile, le Paired box constitue une séquence d'ADN de 384 paires de bases. Cette séquence s'est grandement conservée au cours de l'évolution. Le Paired box code pour une protéine ayant dans sa partie aminoterminal un domaine de 128 acides aminés qui représenterait un nouveau modèle de structure protéique se liant à l'ADN. Jusqu'à maintenant, neuf gènes dans la famille des Paired box ont été isolés. L'étude présente porte plus particulièrement sur le gène *Pax-6* représentant la sixième classe de la famille des Paired box. Le gène *Pax-6* code pour une protéine composée d'un Paired domain et d'un homéodomaine. Des techniques de la biologie moléculaire ont permis soit de quantifier l'expression du gène au cours du développement de l'encéphale de poulet par le transfert de type Northern, ou encore de localiser l'expression du gène sur des coupes histologiques d'un cerveau de poulet âgé de 15 jours embryonnaires par la technique de l'hybridation *in situ*. En premier lieu, les résultats obtenus par la technique de Northern blot ont démontré la présence du gène *Pax-6* tout au long du développement de l'encéphale lui suggérant un rôle clef dans l'ontogenèse. En second lieu, les résultats obtenus par la technique de l'hybridation *in situ* ont permis l'identification des structures exprimant le gène *Pax-6* dans l'encéphale, notamment au niveau du télencéphale, diencéphale, mésencéphale et rhombencéphale. À l'aide de ces résultats, nous avons pu dans un premier temps, comparer l'expression du gène *Pax-6* avec ce qui déjà été publié chez la souris. Nous en concluons que pour la majorité des structures

encéphaliques, le gène *Pax-6* est effectivement conservé entre ces deux espèces. Dans un deuxième temps, nous avons constaté l'implication de certaines structures encéphaliques exprimant le gène *Pax-6* avec les voies de projections visuelles chez l'Oiseau.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer sincèrement toute ma reconnaissance envers mes codirecteurs de maîtrise, Madame Maria-Grazia Martinoli, Ph.D. et Monsieur Dom Miceli, Ph.D.. Je tiens à remercier le Professeur Maria-Grazia Martinoli pour son dévouement, ainsi que pour ses remarques et ses directives stimulantes. Je tiens également à remercier le Professeur Dom Miceli pour ses judicieux conseils et son expertise. Tout deux m'ont permis de développer les attitudes et les comportements nécessaires à l'élaboration de mon travail.

Je remercie également mes collègues de travail Sylvie Gélinas et Joël Rousseau pour les merveilleuses échanges que nous avons partagés ensemble. Enfin il est important pour moi de souligner l'appui et les encouragements de ma famille, de mon copain Rock, de tous mes amis et de mes colocataires de la rue Bourjoly.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
REMERCIEMENTS .....	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS (A).....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS (B).....	xiii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: LES GÈNES “PAIRED BOX”.....	3
1. Les gènes homéotiques.....	3
2. Rôles fonctionnels des membres de la famille des gènes <i>Pax</i> .....	4
2.1 Rôles principaux des gènes <i>Pax</i> durant le développement.....	9
2.1.1 Les gènes <i>Pax</i> dans l'organogenèse.....	9
2.1.2 Modèle animal: les souris mutantes .....	10
2.1.3 Pathologies liées à l'expression des gènes <i>Pax</i> chez l'être humain .....	10
2.2 Les gènes <i>Pax</i> dans la différenciation cellulaire.....	11
2.3 Les gènes <i>Pax</i> dans la prolifération cellulaire et l'oncogenèse.....	12
3. <i>PAX-6</i> : spécificité et structure.....	12
3.1 Le Paired domain.....	13
3.1.1 Le domaine N-terminal PAI.....	18

3.1.2 Le domaine C-terminal RED.....	19
3.2 L'homéodomaine .....	20
4. Comparaison de l'expression de <i>Pax-6</i> pour différentes espèces au cours de l'évolution .....	22
4.1 <i>Pax-6</i> dans l'évolution du système nerveux.....	24
4.2 <i>Pax-6</i> dans l'évolution de l'oeil.....	24
4.3 Conservation de la molécule dans la phylogenèse.....	27
5. Expression comparée de <i>Pax-6</i> au cours du développement embryonnaire précoce.....	28
5.1 Expression de <i>Pax-6</i> dans l'encéphale .....	29
5.1.1 Prosencéphale.....	30
5.1.2 Mésencéphale .....	31
5.1.3 Rhombencéphale .....	31
5.1.4 Moelle épinière.....	32
5.2 Régulation de l'expression de <i>Pax-6</i> dans le système nerveux central.....	34
5.3 L'oeil.....	34
5.3.1 Régulation de l'expression de <i>Pax-6</i> dans l'oeil .....	35
5.4 Hypothèse et objectif du projet de recherche.....	36
CHAPITRE 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....	37
2.1 Matériels .....	37
2.2 Embryons .....	38
2.2.1 Extraction de l'ARN.....	38
2.2.2 Préparation des coupes histologiques .....	39
2.3 Sonde <i>Pax-6</i> chez le poulet.....	39
2.3.1 Amplification et purification de la sonde.....	41



2.3.2 Synthèse et marquage des sondes ARN .....	41
2.4 Northern blot .....	42
2.5 Hybridation <i>in situ</i> .....	44
CHAPITRE 3: RÉSULTATS.....	46
3.1 Analyse du niveau de l'ARNm <i>Pax-6</i> par transfert de type Northern .....	46
3.2 Localisation de l'ARNm <i>Pax-6</i> par la technique de l'hybridation <i>in situ</i> .....	49
3.2.1 Télencéphale.....	49
3.2.2 Diencéphale.....	50
3.2.3 Tronc cérébral: mésencéphale.....	50
3.2.4 Tronc cérébral: pont .....	51
3.2.5 Cervelet.....	52
CHAPITRE 4: DISCUSSION.....	57
4.1 Fonctions possibles et déroulement dans le temps de l'expression du gène <i>Pax-6</i> .....	57
4.2 Description de l'expression du gène <i>Pax-6</i> à un stade tardif chez le poulet et comparaison de l'expression avec la souris.....	59
4.3 Parallèle entre les structures exprimant le gène <i>Pax-6</i> et le système visuel aviaire.....	65
CONCLUSION.....	68
BIBLIOGRAPHIE .....	69

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Exemples de facteurs de transcription.....	5
Figure 2. Représentation schématique et classification des six classes des gènes Paired Box.	8
Figure 3. Comparaison des séquences du Paired domain et de l'homéodomaine du gène <i>Pax-6</i> chez différentes espèces.....	14
Figure 4. Complexe Paired domaine-ADN et complexe homéodomaine dimère-ADN.....	17
Figure 5. Représentation schématique de l'expression du gène <i>Pax-6</i> chez la souris.....	33
Figure 6. Vecteur pGEM 4 .....	40
Figure 7. Résultat des Northern blot.....	48
Figure 8. Représentation schématique de l'expression du gène <i>Pax-6</i> à travers différentes régions antéro-postérieures de l'encéphale du poulet âgé de 15 jours embryonnaires.. ..	53
Figure 9. Expression du gène <i>Pax-6</i> au niveau de (a) tubercule olfactif; (b) diencéphale; (c) sous-divisions du système raphé dorsal.....	54
Figure 10. Expression du gène <i>Pax-6</i> au niveau mésencéphalique.....	55
Figure 11. Expression du gène <i>Pax-6</i> au niveau rhombencéphalique.....	56
Figure 12. Projections des voies visuelles chez l'Oiseau .....	67

LISTE DES ABRÉVIATIONS (A)

A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
BDNF	brain derived neurotrophic factor
C	cytosine
CSPD®	disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ] decan}-4-yl phenyl phosphate
DAB	diaminobenzidine
Dig	digoxigénine
EDTA	acide éthylène diaminotétraacétique
ey	eyeless
fig.	figure
G	guanine
g	accélération standard de la gravité (9,81 m/s <sup>2</sup> )
gsb	gooseberry
gsb-d	gooseberry-distal
gsb-p	gooseberry-proximal
gsbn	gooseberry neuro
h	heure

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide hydrochlorique
Hox	homéo-box
HRP	horse radish peroxydase
LB	milieu Lenox broth
M	mole par litre
μ	microlitre
mamm.	mammifère
μg	micro gramme
min.	minute
ml	millilitre
mM	millimole par litre
μm	micromètre
μn	undulated
MOPS	3-[N-morpholino] propanesulfonic acid
NaCl	Chlorure de sodium
NaOAc	Acétate de sodium
ng	nanogramme
NGF	nerves growth factor
NMR	nuclear magnetic resonance
NTE	NaCl- Tris-HCl- EDTA
<i>Pax</i>	Paired box
pb	paire de bases
prd	paired
SDS	sodium lauryl sulfate
Sey	Small eye
Shh	Sonic hedgehog

Sp	Splotch
SSC	NaCl- citrate de Na
T	thymine
TE	Tris-HCl- EDTA
TNT	Tris-HCl-NaCl-Tween®
toy	twin of eyeless
Tris	(tris[hydroxymethyl] aminomethane

LISTE DES ABRÉVIATIONS (B)NEUROANATOMIQUES

A	archistriatum
Anl	n. annularis
C	cervelet
CbI	n. cerebellaris internus
CbM	n. cerebellaris intermedius
CDL	aire corticoidea dorsolateralis
DBC	decussatio brachiorum conjunctivorum
DLL	n. dorsolateralis anterior thalami, pars lateralis
FLM	fasciculus longitudinalis medialis
FRL	formatio reticularis lateralis mesencephali
GLv	n. geniculatus lateralis, pars ventralis
HA	hyperstriatum accessorium
Hb	n. habenularis
HD	hyperstriatum dorsale
HIS	hyperstriatum intercalatus superior
Hp	hippocampe
HV	hyperstriatum ventrale
HY	hyperstriatum
ICT	n. intercalatus thalami
Imc	n. isthmi, pars magnocellularis

Ipc	n. isthmi, pars parvocellularis
L	lingula
La	n. laminaris
LC	n. linearis caudalis
LHy	n. lateralis hypothalami
LoC	locus ceruleus
LS	lemniscus spinalis
N	neostriatum
n.	nucleus
P	paleostriatum
PL	n. pontis lateralis
PM	n. pontis medialis
PPC	n. principalis precommissuralis
R	n. raphe
RP	réticulé pontique
Rpgc	n. reticularis gigantocellularis
RPO	n. reticularis pontis oralis
Rt	n. rotundus
Rv	n. raphé ventral
S	septum
SAC	stratum album centrale
SCI	stratum cellulare internum
SCv	n. subceruleus ventralis
SGC	stratum griseum centrale
SGF	stratum griseum et fibrosum superficiale
SOp	stratum opticum
TO	tubercule olfactif

TPc	n. tegmenti pedunculo-pontinus, pars compacta
TrO	tractus opticus
TTD	n. et tractus descendens nervi trigemini
V	ventriculus
VDL	n. vestibularis dorsolateralis
VeL	n. vestibularis lateralis
ZpFLM	zona péri FLM



## INTRODUCTION

Les mécanismes contrôlant le développement embryogénique d'espèces aussi divergentes que la drosophile, la souris, le nématode et l'humain sont grandement conservés au cours de l'évolution. Le développement des organismes multicellulaires est géré par un programme génétique très précis. De récentes recherches ont prouvé que les gènes codés par diverses familles multigéniques jouant un rôle de facteur de transcription (fig. 1), partagent des domaines très conservés dans l'évolution comme par exemple, l'homéodomaine (hélice-coude-hélice) (résumé dans Scott et *coll.*, 1989), le paired-domain (Bopp et *coll.*, 1986a, b; Dressler et *coll.*, 1988; résumé dans Kessel et Gruss, 1990; Deutsch et Gruss, 1991), le POU domain (Herr et *coll.*, 1988; résumé dans Rosenfeld, 1991), l'hélice-boucle-hélice (Murre et *coll.*, 1989), le domaine doigt de zinc (résumé dans Beato, 1989), l'agrafe de leucine (Landschulz et *coll.*, 1988) et le domaine fork head (Weigel and Jäkle, 1990). De plus, il a été démontré que plusieurs de ces gènes ont une fonction essentielle durant le développement des Vertébrés (Balling et *coll.*, 1988, 1989; Chisaka et Capecchi, 1991; Cho et *coll.*, 1991; Harvey et Melton, 1988; Kessel et *coll.*, 1990; McMahon et Bradley, 1990; Ruiz i Altaba et Melton, 1989; Wright et *coll.*, 1989). La conservation de la structure ainsi que la fonction de ces gènes suggèrent que l'ensemble des Vertébrés partage un programme génétique de développement commun, malgré les différentes sortes de migrations cellulaires typiques de la gastrulation et de la neurulation (Dressler et Gruss, 1988; Kimmel, 1989).

Le gène Paired box (*Pax*) fait partie de ces gènes qui se sont grandement conservés au cours de l'évolution (phylogénèse) et qui sont impliqués dans l'organisation du

développement embryonnaire (ontogenèse). Le travail qui suit, décrit l'expression du gène *Pax-6* au cours du développement de l'encéphale de poulet de même que son rôle dans l'organisation spatiale du cerveau jusqu'à un jour post-éclosion. De plus, un second volet porte sur la localisation encéphalique de l'expression du gène chez le poulet à un stade tardif, soit âgé de 15 jours embryonnaires. De plus, nous comparons entre les différentes structures de l'encéphale de poulet et de la souris l'expression du gène *Pax-6* pour un même stade donné. L'expression de *Pax-6* a déjà été étudié chez la souris (Walther & Gruss, 1991; Püschel et coll., 1992a; Stoykova & Gruss, 1994 et Grindley et coll., 1995). Des techniques de la génétique moléculaire sont les approches les plus appropriées nous permettant de décrire le plus précisément possible l'expression de l'homéogène *Pax-6* au cours du développement de l'encéphale embryonnaire du poulet.

Le prochain chapitre permet tout d'abord d'élaborer en détail certains concepts entourant les gènes homéotiques. Nous décrivons par la suite, les membres de la famille des gènes Paired box en énumérant notamment leurs rôles au cours de l'organogenèse, du développement, de la différenciation ainsi que la prolifération cellulaire. Cette étude présente toutefois plus en profondeur la compréhension et les connaissances actuelles de l'homéogène *Pax-6*.

## CHAPITRE 1

### LES GÈNES *PAIRED BOX*

#### 1. Les gènes homéotiques

Les gènes homéotiques (de «homeosis», signifiant: transformation d'un corps en un autre) jouent un rôle de tout premier plan dans la morphogénèse de la drosophile; les gènes les plus connus sont «antennapedia» et «ultrabithorax». Une mutation de ces gènes entraîne de graves malformations au niveau du corps de la drosophile. En effet, ces gènes gouvernent très minutieusement la façon dont les segments du corps de l'animal se développent et ces gènes sont de plus agencés les uns en relation avec les autres. Ces gènes homéotiques sont caractérisés par la présence d'une séquence appelée homéobox. Les homéobox sont des motifs très conservés de 180 nucléotides codant pour un domaine protéique de 61 acides aminés interagissant avec l'acide désoxyribonucléique (ADN) (motif hélice-tour-hélice). L'analyse de ces gènes chez d'autres espèces démontre que bon nombre d'entre eux sont réellement homologues aux gènes correspondant chez la drosophile.

Dans la présente étude, il sera question de la description détaillée d'un gène, nommé Paired box répondant à la définition de ce qu'est un gène homéobox. La spécificité de la structure du gène *Pax-6* sera décrite ultérieurement à la section 3 du chapitre 1.

## 2. Rôles fonctionnels des membres de la famille des gènes Pax

La famille des gènes Paired box code pour une séquence très conservée et découverte originellement dans un segment de la drosophile nommée: "*gene paired* " (*prd*). Ses homologues de séquences sont, *gooseberry-distal (gsb-d)* et *gooseberry-proximal (gsb-p)* (Bopp et *coll.*, 1986a, b ; Baumgartner et *coll.*, 1987). Le paired box a été grandement conservé au cours de l'évolution et il est présent chez plusieurs organismes très variés tels, le crustacé nommé: poisson zèbre (Krauss et *coll.*, 1991a, b; Püschel et *coll.*, 1992a, b), le poulet (Goulding et *coll.*, 1992), le nématode, la grenouille, la tortue et l'humain (Dressler et *coll.*, 1988; Burri et *coll.*, 1989). Le Paired box code pour une protéine ayant dans sa partie amino-terminale un domaine de 128 acides aminés qui représenterait un nouveau modèle de structure protéique se liant à l'ADN (Treisman et *coll.*, 1991; Chalepakis et *coll.*, 1991; Goulding et *coll.*, 1991) et fonctionnant comme un facteur de transcription. Les facteurs de transcription possèdent des sites de fixation sur l'ADN de nature variée (l'homéodomaine, le domaine doigt à zinc, le paired-domain, le POU domain, l'hélice-boucle-hélice, l'agrafe de leucine et le domaine fork head) (voir fig. 1) et influencent sa transcription.

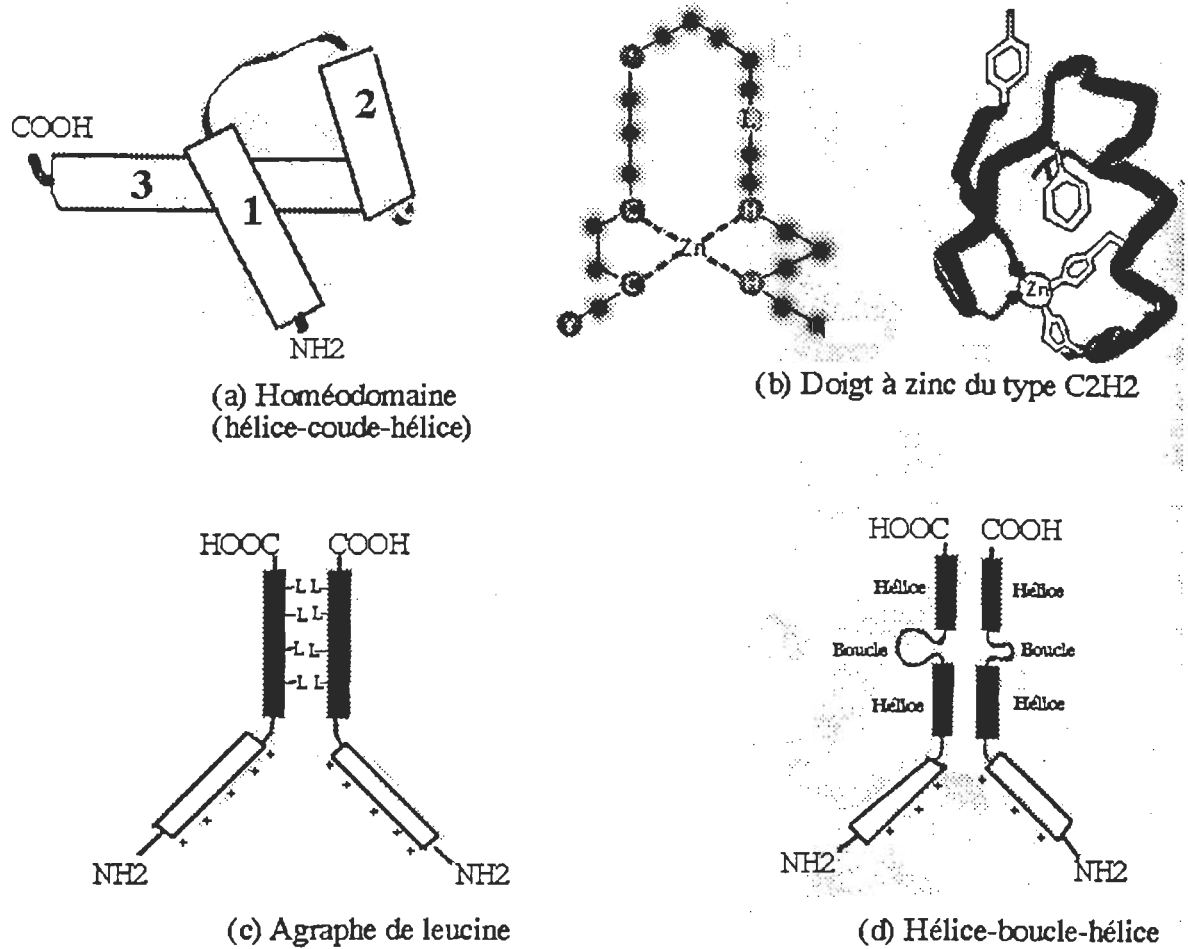


Figure 1. Exemples de facteurs de transcription. (A) L'homéodomaine est formé de trois hélices  $\alpha$ . L'hélice 3 est l'hélice de reconnaissance et établit les contacts avec l'ADN. (B) Doigt à zinc. Sur la partie gauche de figure, se trouve un doigt à zinc formé de deux cystéines (C) et deux histidines (H) coordonnées par un atome de zinc. Les autres acides aminés conservés dans cette structure sont indiqués:

(F: phénylalanine; L: leucine; Y: tyrosine). La figure de gauche représente la structure protéique. (C) Agraphe de leucine. Les protéines de l'agraphe de leucine agissent sous forme de dimère comprenant deux sous-unités. À l'extrémité C-terminale de la protéine se trouve une région contenant des leucines. Du côté amino-terminal des leucines, la région est riche en acides aminés chargés positivement et constituerait le site de liaison avec l'ADN. (D) L'hélice-boucle-hélice est formée de deux hélices associées par une boucle et une troisième hélice qui est riche en acides aminés chargés positivement est responsable de la fixation de la protéine à l'ADN. (modifié de: ADN Recombinant p. 164)

Basé sur l'homologie de la séquence de *gsb-d* du paired box de la drosophile, neuf membres de la famille multigénique de *Pax* ont été isolés jusqu'à maintenant chez la souris (*Pax-1* à *Pax-9*) et chez l'humain (*PAX-1* à *PAX-9*) (Walther et coll., 1991; Wallin et coll., 1993; Stapleton et coll., 1993). Les gènes Paired box sont de plus regroupés en six différentes classes (fig. 2) dépendent s'ils possèdent ou non, outre le paired domain obligatoire, soit l'homéodomaine complet ou en partie, soit l'octapeptide conservé, ou encore une classe spécifique d'acides aminés. Les classes regroupent également les gènes qui partagent ou non une structure similaire d'intron-exon (Walther et coll., 1991).

Contrairement à l'homéobox *Hox* contrôlant aussi le développement, les gènes *Pax* ne sont pas organisés en amas (Pilz et coll., 1993; Stapleton et coll., 1993). Chez la souris par exemple, les gènes *Pax* sont localisés sur cinq chromosomes différents; chacun sur un locus séparé (Walther et coll., 1991), de même que chez l'humain où chaque gène *PAX* sont entièrement localisés sur différents chromosomes. Or, le fait que les gènes *Pax* ne sont pas regroupés entre eux suggère inversement à l'homéobox qu'ils puissent être exprimés seuls et non obligatoirement ensemble.

### *Classes des gènes Pax*















	Paired domain	Octapeptide	Homéodomaine	souris	drosophile
Classe I				Pax-1, -9	<i>Pax meso</i>
Classe II				Pax-3, -7	<i>prd, gsb, gsb1</i>
Classe III				Pax-2, -5, -8	
Classe IV				Pax-4	
Classe V					<i>Pax neuro</i>
Classe VI				Pax-6	<i>ey, toy</i>

Figure 2. Représentation schématique et classification des six classes des gènes Paired box connues chez la souris et la drosophile. (Modifié de Callaerts et *coll.*, 1997)



## 2.1 Rôles principaux des gènes *Pax* durant le développement

Les gènes *Pax* jouent un rôle clé dans la formation et le développement de différents organes. Et, c'est par la création de souris mutantes que les scientifiques ont pu déterminer les véritables rôles de ces gènes dans le développement.

### 2.1.1 Les gènes *Pax* dans l'organogenèse

À l'exception de *Pax-1* et *Pax-9*, les gènes Paired box jouent un rôle clé dans le développement du système nerveux. La présence de transcrits des gènes *Pax* tôt dans le développement, justifie une fonction dans la formation de plusieurs organes. Par exemple, *Pax-1* est exprimé dans le thymus, *Pax-2* et *Pax-8* dans le foie, *Pax-8* dans la thyroïde, *Pax-6* dans le pancréas et les yeux, et *Pax-4* dans le pancréas (Dressler et coll., 1990; Plachov et coll., 1990; Turque et coll., 1994; Wallin et coll., 1996; B Sosa-Pineda, P Gruss, données non publiées). Une mutation du gène *Pax-1* chez la souris mutante *undulated* provoque une réduction de la grosseur du thymus et affecte la maturation des thymocytes (Wallin et coll., 1996). Dès lors, *Pax-1* semble être requis dans la différenciation de l'épithélium du thymus et influencerait ainsi la maturation des cellules T (Wallin et coll., 1996). Or, les protéines codées par *Pax* joueraient un rôle crucial dans la régulation de l'organogenèse du thymus, du foie, de la thyroïde, du pancréas et des yeux en plus du système nerveux .

### 2.1.2 Modèle animal; les souris mutantes

Le recours à des souris mutantes a été l'approche la plus directe pour mettre en évidence les principaux rôles des gènes *Pax* durant le développement. Il a été démontré qu'une mutation de *Pax-1* interfère dans le développement normal de la colonne vertébrale et du sternum (Grüneberg, 1950, 1954). En effet, le cartilage des disques intervertébraux ainsi que du sternum expriment normalement *Pax-1*, et chez la souris mutante "*undulated*" (*un*) tous ces tissus présentent des anomalies (Balling et coll., 1988). La souris nommée *Splotch* (*Sp*) quant à elle, possède une mutation spontanée de *Pax-3*, se définissant comme étant un défaut du site d'épissage de l'exon 4 (Russel, 1947; Epstein et coll., 1991a, b, 1993; Goulding et coll., 1993). L'étude du mutant *Splotch* souligne l'importance de la fonction de *Pax-3* durant le développement; les souris homozygotes présentent comme caractéristique une malformation prononcée du tube neural (spina bifida), ainsi qu'une déformation de la crête neural et de certains muscles squelettiques (Auerbach, 1954; Moase et Trasler, 1989; Franz, 1989, 1990; Bober et coll., 1994; Goulding et coll., 1994; Tremblay et coll., 1995). Par ailleurs, les souris mutantes homozygotes *Small eye* (*Sey*) sont caractérisées par une mutation du gène *Pax-6*. Chez ces souris, une absence complète des yeux et des cavités nasales est remarquée (Pritchard et Clayton, 1974).

### 2.1.3 Pathologies liées à l'expression des gènes *Pax* chez l'être humain

Les mutations des gènes *Pax* sont associées à trois désordres congénitaux chez l'humain. Une mutation de *PAX-2* provoque une anomalie rénale, un reflux vésico-urétéral, résultat de l'incompétence valvulaire, ainsi qu'une déficience visuelle chez l'enfant

(colobome au nerf optique) (Sanyanusin et *coll.*, 1995). Une mutation de *PAX-3* cause les syndromes de Waardenburg de type 1 ainsi que de Klein-Waardenburg (Baldwin et *coll.*, 1992; Hoth et *coll.*, 1993; Morrel et *coll.*, 1992; Tassabehji et *coll.*, 1992); les syndromes de Waardenburg sont caractérisés par une dépigmentation cutanée, par la proéminence de la racine nasale et de la partie médiane des sourcils, par une surdité congénitale et par une hétérochromie de l'iris. Finalement, une mutation de *PAX-6* est caractérisée par l'aplasie de l'iris (aniridie; Ton et *coll.*, 1991).

## 2.2 Les gènes Pax dans la différenciation cellulaire

Des études confirment la participation des gènes *Pax* durant la différenciation cellulaire dans plusieurs régions spécifiques. Par exemple, l'analyse de la souris mutante *undulated* démontre l'importance de *Pax-1* dans la condensation des sclérotomes et dans l'initiation de la chondrogen se (Wallin et *coll.*, 1994). L'effet de *Pax-1* sur la différenciation du sclérotome est régularisé par le notochorde via la sécrétion de la protéine Shh (Sonic hedgehog) (Ebensperger et *coll.*, 1995; Fan et *coll.*, 1995). De plus, il a été établi par l'inactivation des gènes cibles, que *Pax-5* est essentiel pour la différenciation des cellules à hâtives dans le pancréas (Urbanek et *coll.*, 1994). Chez la souris mutante *splotch*, les muscles des membres dont les pr cursseurs expriment *Pax-3*, sont anormaux (Franz et *coll.*, 1993) de même que la crête neurale, les cellules de Schwann et les mélanocytes sont affectés (Moase & Trasler 1990; Auerbach 1954). Des expériences "in vitro" démontrent que *Pax-3* est exprimé exclusivement lors de la différenciation des cellules de Schwann et non pendant la myélinisation (Kioussi & Gruss 1996). Or, *Pax-3* est impliqué dans la migration, la différenciation et possiblement la prolifération des cellules de la crête neurale ainsi que des

myoblastes. Quant à *Pax-7*, il serait aussi impliqué dans la spécification, la différenciation et/ou la prolifération de la crête neurale céphalique (Mansouri et coll., 1996).

### 2.3 Les gènes *Pax* dans la prolifération cellulaire et l'oncogenèse

Le fait que les gènes *Pax* soient impliqués dans le processus du développement d'organes, suggère qu'ils sont en partie responsables de la génération et la progression de cancers. Effectivement, l'une des fonctions des gènes Paired box concerne la régulation et la dérégulation de la croissance des cellules. En fait, plusieurs facteurs de transcription, dont *Pax* fait parti, ont été classifiés comme des proto-oncogènes. Un proto-oncogène se définit comme étant un gène cellulaire susceptible de devenir, suite à une modification qualitative ou quantitative, un gène transformant. Dès lors, une dérégulation de l'expression des gènes *Pax* peut induire la formation de tumeurs. Cette hypothèse est supportée par des observations antérieures certifiant qu'une surexpression des gènes *Pax* transforme des fibroblastes en foyer tumoral chez la souris (Maulbecker & Gruss 1993).

### 3. *Pax-6*: spécificité et structure

*Pax-6* représente la sixième classe de la famille des gènes Paired box. *Pax-6* code pour une protéine composée du paired domain et de l'homéodomaine tandis que l'octapeptide est absent (fig. 2). Dans cet ouvrage, les données les plus récentes seront présentées en ce qui concerne les caractéristiques structurales et fonctionnelles du gène *Pax-6* provenant de

différentes espèces. De plus, il sera question de l'implication de *Pax-6* dans l'évolution et le développement de l'encéphale et du système visuel.

### 3.1 Le Paired domain

Une brève compilation des séquences du paired domain de *Pax-6* pour différentes espèces est décrite à la figure (3 A) démontrant la grande conservation de la séquence entre certains Vertébrés et Invertébrés.

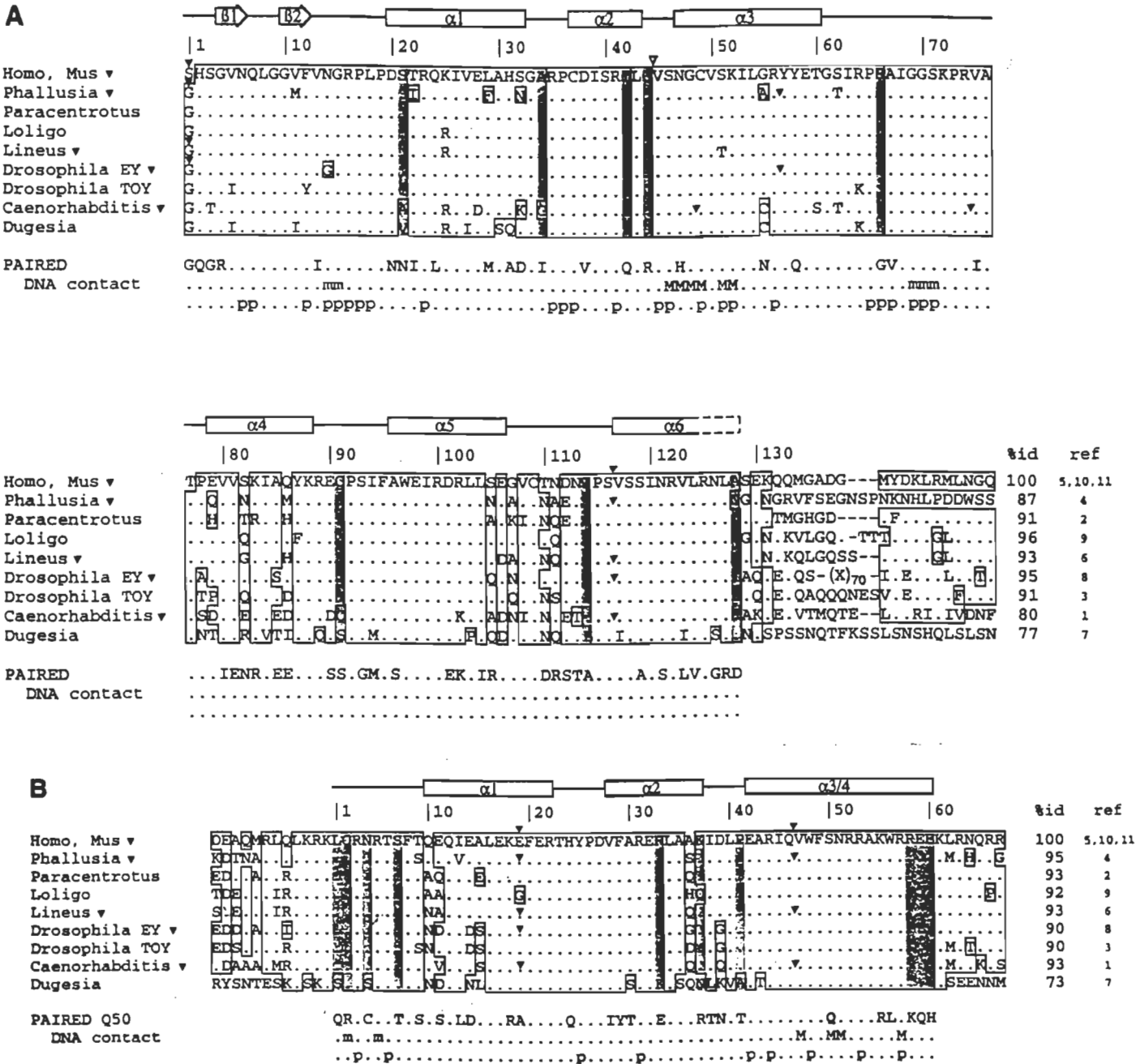


Figure 3. Comparaison des séquences du paired domain (A) et de l'homéodomaine (B) du gène *Pax-6* chez différentes espèces. Seulement les séquences de *Homo* et *Mus* sont représentées pour les Vertébrés puisque les séquences des autres Vertébrés

sont très similaires ou identiques. Les structures secondaires des domaines sont représentées par les figures du haut. Les petites têtes de flèches noires suivant le nom des espèces et dans les séquences indiquent une limite d'intron-exon des gènes *Pax-6* ainsi que sa localisation dans la séquence. La tête de flèche vide indique pour la séquence des Vertébrés (*Homo, Mus*), la localisation du site d'épissage où un fragment de 42-pb a été inséré à l'intérieur du paired box. Les parties ombragées indiquent les acides aminés spécifiques à *Pax-6* (Loosli, 1995). Le pourcentage représente l'homologie de séquence entre *Pax-6* de souris et des autres espèces. Références (1) Chisholm & Horvitz, 1995, (2) Czerny & Busslinger, 1995 (3) T. Czerny, G. Halder, P. Callaerts, W. J. Gehring & M. Busslinger, données non publiées, (4) S. Glardon, P. Baumgartner, P. Callaerts, G. Halder & W. J. Gehring, données non publiées, (5) Glaser et coll., 1992, (6) Loosli et coll., 1996, (7) M. Munoz, P. Callaerts, W. J. Gehring & E. Salo, données non publiées, (8) Quiring et coll., 1994, (9) S. Tomarez, P. Callaerts, R. Zinovieva, L. Kos, G. Halder, W. J. Gehring & J. Piatigorsky, données non publiées, (10) Ton et coll., 1991, (11) Walther & Gruss, 1991 (tiré de Callaerts et coll., 1997).

En comparant le paired domain des protéines de *Pax-6* avec les autres protéines des membres de la famille de *Pax*, huit acides aminés du paired domain sont spécifiques à *Pax-6*: sérine 21, alanine 34, isoleucine 42, glutamine 44, arginine 66, cystéine 91, isoleucine 114 et alanine 128 (Loosli 1995), correspondant aux régions ombragées de la figure (3 A). L'asparagine en position 47 correspond au facteur déterminant de liaison spécifique à l'ADN (Czerny et Busslinger 1995). Ces acides aminés sont conservés pour tout le paired domain de *Pax-6* à l'exception de l'ascidie, *Phallusia mammilata*, pour lequel, il y a une substitution d'un acide aminé de même que le nématode, *Caenorhabditis elegans*, et l'aelomate, *Dugesia tigrina*, lesquels possèdent quatre substitutions d'acides aminés dans le paired domain. Par ailleurs, les protéines *Pax-6* des Vertébrés partagent un paired domain identique à l'exception près du *Pax-6* du poisson zèbre dont un seul acide aminé est différent. En ce qui concerne la comparaison des protéines *Pax-6* entre les Invertébrés et les protéines *Pax-6* de souris, une homologie de séquence du paired domain d'environ 90% est observée (fig. 3 A). Cette affirmation est acceptable pour les gènes de la drosophile, du némerte, de l'oursin de mer, et du calmar.

Le modèle de structure de Czerny et coll., (1993) décrit une bipartie du paired domain se liant aux deux moitiés du site dans la grande gouttière adjacente à l'ADN. Ce modèle a été confirmé par la cristallographie aux rayons X (Xu et coll., 1995) d'un complexe contenant le paired domain ainsi qu'un duplex de 15 paires de bases (pb) d'ADN provenant de la drosophile. Le paired domain constitue un domaine globulaire N- et C-terminal nommé PAI et RED respectivement (Jun & Desplan 1996). Ces domaines sont séparés par un agent liant, et chaque domaine contient une région hélicoïdale semblable à l'homéodomaine (fig. 3 A et 4 A).



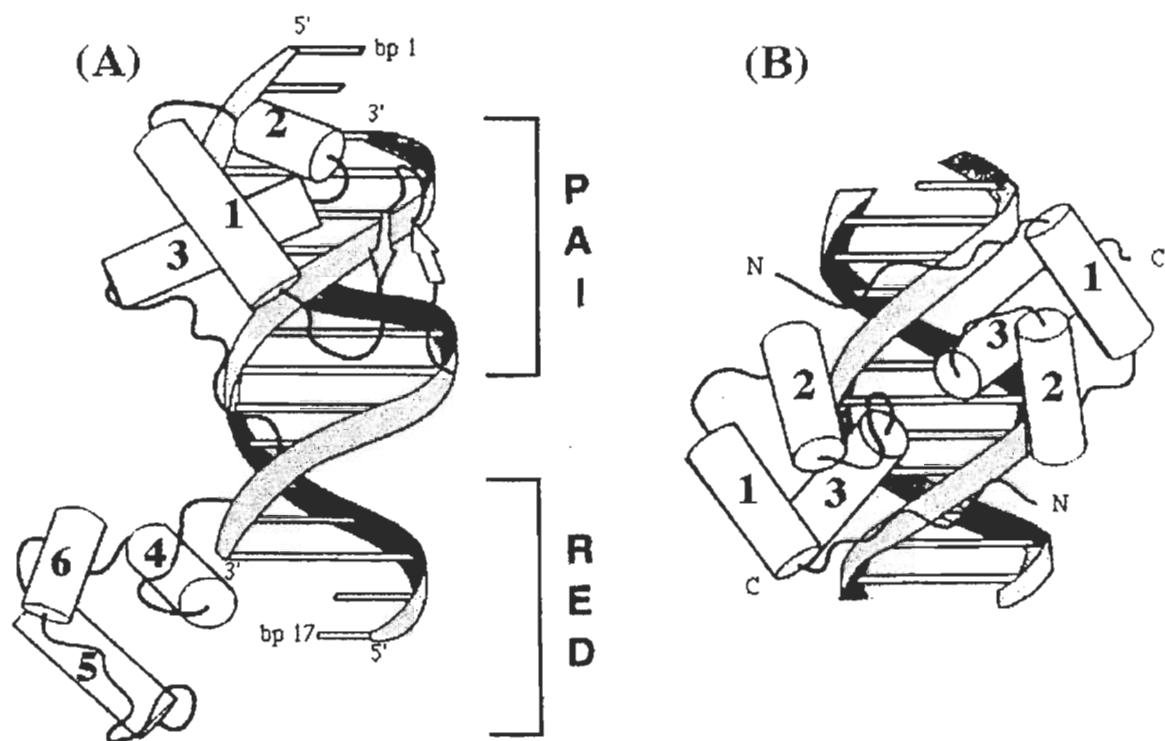


Figure 4. (A) Complexe Paired domaine-ADN et (B) complexe homéodomaine dimère-ADN.

Les cylindres représentent les hélices  $\alpha$  et les flèches les feuillets  $\beta$ . (modifié de Callaerts et *coll.*, 1997).

### 3.1.1 Le domaine N-terminal PAI

Le domaine N-terminal PAI contient une courte séquence d'un feuillet bêta antiparallèle, suivie par un coude bêta de type II, trois hélices  $\alpha$  avec un pli ressemblant à l'homéodomaine, et une queue C-terminale. Les feuillets  $\beta$  (acides aminés de 4-6 et 10-12) interagissent avec les sucres phosphatés de l'ADN. Le coude  $\beta$  (résidus 13-16) se situe directement à l'intérieur de la petite gouttière de l'ADN et constitue la base de contact (voir fig. 4 A). Cette interaction est stabilisée par les contacts protéine-protéine et protéine-ADN de cette région. Le domaine N-terminal de PAI contient trois hélices  $\alpha$  (résidus 20-32, 37-43 et 47-60), l'hélice 2 et 3 formant une unité hélice-coude-hélice. L'hélice 2 forme un contact phosphate extensible et l'hélice 3 se situe directement à l'intérieur de la grande gouttière. La queue terminale (résidus 65-72) du domaine N-terminal fait un contact avec la grande gouttière. Les résidus conservés à la fin de la troisième hélice attachent la chaîne de polypeptides. Les résidus 68-72 sont invariables pour tous les paired domain, et s'ajustent directement à l'intérieur de la petite gouttière, où ils entrent en contact avec la région adjacente à la région contactée par le coude  $\beta$ .

Les régions spécifiques de liaison à l'ADN pour le paired domain de *Pax-6* sont déterminées par les acides aminés suivants: isoleucine 42, glutamine 44 et asparagine 47 (Czerny & Busslinger 1995). L'analyse de la forme cristalline du paired domain a permis de constater en premier lieu que le résidu 42 est situé près de la région C-terminale et de l'hélice 2. Et en second lieu, que le résidu 44 est situé dans le motif hélice-coude-hélice et interagit avec la boucle entre les deux brins du feuillet  $\beta$ .

### 3.1.2 Le domaine C-terminal RED

Une courte région (résidus 73-78) lie les domaines PAI et RED (fig. 4 A). La partie C-terminale du domaine RED du paired domain contient trois hélices  $\alpha$  (résidus 79-88, 96-106 et 117-124) qui ne disposent d'aucun contact avec l'ADN (Cai et *coll.*, 1994; Chalepakis et *coll.*, 1991; Czerny et *coll.*, 1993; Treisman et *coll.*, 1991). La partie C-terminale RED joue toutefois un rôle important dans la reconnaissance de l'ADN par les autres paired domain. Il existe un variant de *Pax-6* (*Pax-6 5a*) contenant une insertion de 14 acides aminés dans le domaine PAI. Cette insertion résulte en une rupture de liaison de l'ADN ayant pour conséquence de posséder un domaine de liaison RED et se liant à un site différent de celui du consensus de PAI pour *Pax-6* (Epstein et *coll.*, 1994b).

Xu et *coll.*, (1995) proposent un modèle de liaison de la protéine *Pax-6* basé sur la structure hélice-coude-hélice du domaine RED. Selon ces chercheurs, le liant compris entre les domaines N- et C-terminal fait un contact dans la petite gouttière. Quant à l'hélice de reconnaissance (l'hélice 6) du domaine RED, elle se lie dans la grande gouttière adjacente, où elle interagit avec les paires de bases 16-20. Les contraintes du modèle imposées par la longueur du liant ainsi que la position des paires de bases additionnelles ajoutées à *Pax-6* supportent aussi ce modèle.

### 3.2 L'homéodomaine

L'homéodomaine du gène *Pax-6* est grandement conservé entre les espèces (fig. 3 B). L'homéodomaine est un domaine de 61 acides aminés codés par l'homéobox. L'homéodomaine confère à certaines protéines du développement, codées chez les mammifères par des gènes HOX, la capacité de reconnaître et de se lier spécifiquement à certaines séquences de l'ADN.

En comparant les séquences des homéodomaines de *Pax-6* et des autres membres de la famille *Pax*, on remarque une différence de dix acides aminés spécifiques à *Pax-6* correspondant aux acides aminés suivants: leucine 1, glutamine 2, asparagine 4, sérine 7, arginine 33, lysine 37, proline 41, arginine 58 et acide glutamique aux positions 59 et 60 (Loosli 1995) (partie ombragée de la figure 3 B). Ces acides aminés sont conservés dans tous les homéodomaines *Pax-6* à l'exception de *Pax-6* du calmar et du ver plat dont respectivement neuf sur dix et cinq sur dix acides aminés sont conservés. Quant aux comparaisons entre homéodomaines chez les Vertébrés, elles sont identiques. Par ailleurs, chez les Invertébrés comparés à la souris, une homologie de séquence est retrouvée à plus de 90%. La seule exception concerne l'homéodomaine *Pax-6* du ver plat dont seulement 73% de la séquence est conservée, il demeure pas moins l'homéodomaine le plus semblable comparativement aux autres homéodomaines. Les plus grandes variations pour l'homéodomaine de *Pax-6* se retrouvent aux positions 10, 11 et 36 (fig. 3B); ces acides aminés sont localisés dans les deux premières hélices de l'homéodomaine. Les acides aminés de l'hélice de reconnaissance sont identiques pour tous les *Pax-6* homologues, à l'exception près de *Pax-6* pour le ver plat où une substitution de l'alanine est retrouvée en position 43 par une thréonine. Pour tous les homéodomaines des gènes *Pax*, une sérine est observée à la

position 50 (position 9 dans l'hélice de reconnaissance). Cet acide aminé est un constituant majeur pour le site de liaison spécifique à l'ADN de l'homéodomaine *in vitro* et *in vivo* (Capovilla et coll., 1994; Hanes & Brent 1989; Percival-Smith et coll., 1990, 1992; Schier & Gehring 1992; Treisman et coll., 1989).

D'autres similarités de séquence se retrouvent dans les régions N- et C-terminales touchant la séquence de l'homéodomaine du gène *Pax-6* (fig. 3B). En moyenne, huit acides aminés précédant immédiatement l'homéodomaine sont conservés dans une section de douze acides aminés. L'exception touche le ver plat dont seulement deux de ses acides aminés sont identiques. En outre, en ce qui concerne la région C-terminale de l'homéodomaine, six acides aminés sur sept sont conservés à l'exception près du *Pax-6* du ver plat dont un seul acide aminé est conservé.

La structure cristalline de l'homéodomaine a été déchiffrée (Wilson et coll., 1995) et est très similaire à d'autres homéodomains décrits par la méthode de la résonance magnétique nucléaire (Otting et coll., 1990; Quian et coll., 1989) ou de cristallographie par les rayons X (Hirsch & Aggarwal 1995; Kissinger et coll., 1990; Klemm et coll., 1994; Wolberger et coll., 1991). L'homéodomaine est donc formé par trois hélices  $\alpha$  pliées à l'intérieur d'un domaine globulaire serré (fig. 4 B). L'hélice 1 est précédée par un bras N-terminal flexible et séparée par une boucle provenant de l'hélice 2 laquelle forme un motif hélice-coude-hélice avec l'hélice 3. L'hélice de reconnaissance 3 et le bras N-terminal forment un contact spécifique dans la grande et petite gouttière respectivement. Le bras N-terminal ainsi que l'hélice 3 constituent les motifs principaux de liaison et sont composés de la séquence TAAT. L'acide aminé à la position 9 de l'hélice 3 (position 50 de l'homéodomaine) interagit avec les deux paires de bases situées à la position 3' de cette séquence. Les

chercheurs ont démontré que différents acides aminés à la position 9 peuvent accorder des sites de liaison spécifiques variables (Hannes & Brent 1989; Percival-Smith et *coll.*, 1990; Schier & Gehring 1992, Treisman et *coll.*, 1989).

La structure cristalline dimérique de l'homéodomaine révèle que chaque homéodomaine se compose de la façon suivante: un bras flexible N-terminal (résidus 1-9), l'hélice 1 (résidus 10-22), une boucle correspondant aux résidus 23-27, l'hélice 2 (résidus 28-37), un coude de trois résidus (38-41), l'hélice 3, étant l'hélice de reconnaissance s'étendant du résidu 42 jusqu'au C-terminal de l'homéodomaine (voir les figures 3B et 4B). Les hélices 1 et 2 sont antiparallèles entre elles, tandis que l'hélice 3 est perpendiculaire aux deux premières. Un motif hélice-coude-hélice est formé avec les hélices 2 et 3. L'hélice de reconnaissance est insérée à l'intérieur de la grande gouttière de l'ADN par les résidus valine 47 et asparagine en position 51 faisant un contact direct avec deux bases. La position 50 de l'homéodomaine est critique pour accorder différents sites de liaison spécifiques à l'homéodomaine. Le bras N-terminal du paired domain forme un contact étendu sur "le corps" de l'ADN et contribue en plus à la reconnaissance du coeur du motif TAAT.

#### 4. Comparaison de l'expression de *Pax-6* pour différentes espèces au cours de l'évolution

Chez les différents animaux étudiés, le gène *Pax-6* est exprimé dans le développement de certaines structures de l'encéphale et des yeux, lorsque les espèces en possèdent. En effet, l'expression de *Pax-6* est retrouvée lors de la formation de l'oeil chez la drosophile, le calmar ainsi que chez les mammifères. Par ailleurs, pour le cas des németes et du ver plat, le gène *Pax-6* est observé que dans le pigment primitif dans la cavité de l'oeil.

Chez toutes les espèces étudiées, l'homéogène *Pax-6* se manifeste d'abord dans une large région de la tête et subséquemment devient restreint au futur emplacement de l'oeil. En effet, l'expression de *Pax-6* précède généralement la différenciation de l'oeil suggérant qu'il joue un rôle clé dans la formation morphogénique, dans la prolifération primaire ainsi que dans l'initiation du développement de diverses structures de l'oeil.

L'expression de *Pax-6* dans le cerveau et dans le reste du système nerveux central; dans la moelle épinière chez la souris et dans le cordon du nerf ventral chez la drosophile, est limitée aux sous-domaines. Généralement lors de l'initiation du développement, l'expression du domaine dans le cerveau est étendue et par la suite devient de plus en plus restreinte jusqu'à un niveau cellulaire chez l'adulte. Ainsi le gène *Pax-6* peut être impliqué dans la spécification spatiale des domaines chez les cerveaux embryonnaires des Vertébrés (Puelles & Rubenstein, 1993) et chez d'autres espèces d'Invertébrés. Par ailleurs, d'autres parallèles dans la régionalisation du cerveau (Hirth et coll., 1995) entre les Vertébrés et la drosophile suggèrent des mécanismes similaires impliqués dans le développement de leur système nerveux. De plus, les transcrits de *Pax-6* sont toujours présents chez les cellules adultes suggérant au gène un rôle dans le maintien et le bon fonctionnement cellulaire.

En dépit des similitudes mentionnées, plusieurs divergences existent entre les espèces. L'exemple le plus éminent concerne les nématodes dont *Pax-6* est exprimé dans d'autres structures telles la queue des mâles et dans l'organe sensoriel. Ou encore, chez les Vertébrés, l'homéogène *Pax-6* est détecté dans les cellules endocrines du pancréas ainsi que dans l'adénohypophyse. Or, toutes ces exemples démontrent en premier lieu une

conservation possible dans le développement du cerveau et de l'oeil et en second lieu des divergences pour d'autres structures retrouvées chez différentes espèces.

#### 4.1 Pax-6 dans l'évolution du système nerveux

Chez les Vertébrés et les Invertébrés plusieurs homologues dans le système nerveux sont retrouvées au niveau des protéines membranaires comme par exemple, les canaux ioniques, les récepteurs membranaires et certains neurotransmetteurs. Cette vaste distribution phylogénétique implique qu'une partie de la diversité moléculaire retrouvée chez les différents systèmes nerveux antedate les divergences majeures des phylums (Arbas et coll., 1991).

Très tôt dans le développement, *Pax-6* se manifeste de façon étendue dans le système nerveux des mouches, ainsi que des différentes classes de Vertébrés. Ceci suggère que l'implication de *Pax-6* dans le développement du système nerveux de même que son engagement dans la régionalisation de l'encéphale sont conservés.

#### 4.2 Pax-6 dans l'évolution du système visuel et de l'oeil

Chez l'ensemble des Vertébrés examinés, la voie rétino-fugale se divise après décussation au niveau du chiasma en deux contingents principaux: le tractus optique marginal et le tractus optique basal. De plus, pour la totalité des espèces, les fibres rétiniennes se répartissent sur cinq niveaux distincts de l'encéphale: 1) l'hypothalamus (antérieur ventro-médian), 2) le toit optique mésencéphalique superficiel, 3) le thalamus latéral (dorso-ventral),



4) le prétectum (médián) et 5) le tegmentum mésencéphalique (latéro- median). L'universalité de ce plan suggère qu'il s'agit d'un événement historique très primitif chez les Vertébrés (Repérant, 1978). En effet, cette description observée chez une forme aussi archaïque que la Lamproie, témoigne que ce plan est phylogéniquement très ancien et devait être présent chez les Agnathes des différentes lignées de Vertébrés. Cette évidence infirme la notion d'une évolution linéaire, par palier, du système visuel primaire. La théorie évolutive classique postule que l'édification phylogénique du névraxe (axe cérébro-spinal) s'est effectuée en plusieurs étapes (théorie des paliers) correspondant à la superposition de trois principaux paliers: mésencéphalique, thalamique et télencéphalique. Cette théorie a souvent été avancée pour expliquer que chez les Mammifères la télencéphalisation des fonctions sensorielles était plus prononcée que chez les groupes de Vertébrés non-mammaliens.

Chez la mouche et les Vertébrés, l'expression de l'homéogène *Pax-6* dans le développement de l'oeil est saisissante même si le développement et les structures des yeux de ces espèces sont totalement différents. Par exemple, la composition de l'oeil, pour les arthropodes, est tellement différentes des autres Vertébrés qu'aucune homologie de structure ne peut être prétendue. En revanche, au niveau moléculaire, les pigments visuels responsables de la capture des photons sont très similaires.

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles des animaux de différents phylums identifiant des gènes *Pax-6* présentent des homologies. En effet, le gène code un facteur de transcription conservé agissant comme un régulateur dans le développement de l'oeil chez la mouche, les mammifères et possiblement chez d'autres Vertébrés. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer l'association du gène *Pax-6* avec le développement de l'oeil.

L'un des modèles suggère que le gène ancestral de *Pax-6* pourrait jouer un rôle dans l'arrangement des régions neurales antérieures (Chisholm & Horvitz, 1995, Hanson & van Heyningen, 1995, Nilsson, 1996). En effet, dans les lignées séparées, le gène va graduellement changer son rôle et inclure de nouveaux gènes cibles participant au développement de l'oeil. Ceci implique que la sélection aboutie dans le recrutement de *Pax-6* au cours de l'évolution et dans le développement des yeux après la séparation des lignées phylogénétiques. Dans ce modèle évolutif l'homéogène *Pax-6* est donc toujours impliqué dans le développement des yeux.

Un second modèle décrit *Pax-6* comme un gène ancestral pouvant s'associer avec un gène cible spécialisé dans, par exemple, la photodétection. À travers le temps, d'autres gènes auraient pu être incorporés dans la séquence de *Pax-6*. En effet, il a été suggéré que plusieurs gènes cibles de *Pax-6*, impliqués dans le développement du système visuel, ont été insérés dans la séquence (Scott, 1994). Or, le recrutement de ces gènes additionnels a pu modifier les structures du système visuel.

L'identification des facteurs de transcription: *sine oculis* chez la drosophile (Cheyette et coll., 1994; Serikaku & O'Tousa, 1994) et de son homologue chez la souris *Six3* (Oliver et coll., 1995) agissent très tôt dans le développement de l'oeil suggérant que le mécanisme du développement de l'oeil était bien en place avant la séparation des lignées phylogénétiques. Or, suivant ce modèle, même les espèces possédant des yeux avec des morphologies très dissemblables proviendraient d'une origine commune (Halder et coll., 1995b). D'où l'affirmation qu'un ancêtre collectif de *Pax-6* serait perpétuellement impliqué dans le développement primitif du système visuel.

#### 4.3 Conservation de la molécule dans la phylogénèse

Le gène homéotique *Pax-6* a été identifié chez des espèces aussi dissemblables que le ver et l'humain. La caractéristique saisissante concerne la molécule de ce gène, possédant un très haut degré de conservation dans la séquence des acides aminés du domaine liant l'ADN ainsi que pour plusieurs introns-exons. L'étude des acides aminés permutés, situés dans le domaine liant l'ADN, démontre que ces modifications se retrouvent dans des régions étant de moindre importance pour la liaison à l'ADN (voir fig. 3). Par ailleurs, en ce qui concerne les régions hors du domaine de liaison à l'ADN, le degré de conservation de séquence entre les espèces décroît.

Le domaine C-terminal PST-rich de *Pax-6* pour les Vertébrés, les échinodermes et les mollusques détient une région avec une similarité de séquence significative, suggérant que le dernier des ancêtres communs aux espèces mentionnées, possédant le gène ancestral *Pax-6*, contient cette même séquence dans le domaine C-terminal. D'un autre côté, l'urochordate *P. mammillata* dispose de différences significatives avec les Vertébrés pour le gène *Pax-6*. Il en est de même pour les nématodes où l'absence des yeux peut expliquer une différence de séquence dans le paired domain. Par ailleurs, un trait commun retrouvé seulement chez la souris, le poisson zèbre et l'humain s'applique sur un petit exon pouvant mener à un paired domain inséré dans le paired box suggérant une évolution dans la lignée des Vertébrés. Par ailleurs, ce qui concerne les acides aminés du paired domain, ils sont aussi largement conservés entre les espèces.

## 5. Expression comparée de *Pax-6* au cours du développement embryonnaire précoce

Chez les divers Vertébrés, le modèle d'expression du gène *Pax-6* est très similaire. C'est grâce à l'analyse de l'ARNm par la technique de Northern blot et à des techniques d'hybridation *in situ* pratiquées chez la souris (Grindley et *coll.*, 1995; Schubert et *coll.*, 1995; Stoykova & Gruss, 1994; Walther & Gruss, 1991), le rat (Matsuo et *coll.*, 1993), le poisson zèbre (Krauss et *coll.*, 1991a, b; Püschel et *coll.*, 1992a), le poulet (Li et *coll.*, 1994), la caille (Martin et *coll.*, 1992; Piazza et *coll.*, 1995b, Turque et *coll.*, 1994) et l'humain (Gérard et *coll.*, 1995; Ton et *coll.*, 1991) que des similitudes de l'expression de *Pax-6* ont pu être établies.

Au cours du développement embryonnaire, les transcrits de l'homéogène *Pax-6* sont observés dès le début de la formation du premier somite et lorsque les plis neuraux commencent à se diriger vers la région cervicale. En effet, chez la souris, l'expression débute au jour embryonnaire 8 (E8.0) (Grindley et *coll.*, 1995; Walther & Gruss, 1991), à 10h à 28,5°C chez le poisson zèbre (Krauss et *coll.*, 1991b; Püschel et *coll.*, 1992a), au stade 7+ (deux somites formés) chez le poulet (Li et *coll.*, 1994) et au stade 10 (jour 22-23) chez l'humain (Gérard et *coll.*, 1995).

médullaire et dans une vaste région de l'ectoderme couvrant le prosencéphale. Plus tardivement, les transcrits de *Pax-6* sont présents dans le télencéphale et le diencéphale, originaires du prosencéphale et dans le myélocéphale, une partie du rhombencéphale. À partir du jour E11,5, l'expression dans le mésencéphale est observée, à l'avant dans le tegmentum. La partie supérieure du mésencéphale (colliculus supérieur) est dépourvue de transcrits de *Pax-6*. En ce qui concerne la division métencéphalique du rhombencéphale, le gène *Pax-6* s'exprime seulement à partir du jour E15,5. Et en ce qui concerne le tube neural, l'expression se prolonge le long de l'axe antéro-postérieure à partir de l'isthme rhombencéphalique délimitant le mésencéphale du rhombencéphale et l'expression est observée principalement dans les cellules mitotiques actives de la zone ventriculaire ventrale. L'expression de *Pax-6* dans l'ectoderme superficiel devient limitée aux placodes qui formeront ultérieurement le cristallin, la cornée ainsi que l'épithélium olfactif. Le gène *Pax-6* demeure toujours présent dans ces structures tout au long du développement. Ultérieurement, les transcrits de *Pax-6* se retrouvent dans les vésicules optiques et le bulbe olfactif.

Puisque la majorité des travaux ont été effectués chez la souris, nous décrivons sommairement, dans les parties qui suivent, la localisation de l'expression du gène *Pax-6* dans le système nerveux central ainsi que dans le système visuel de cette espèce (voir références citées ci-haut).

### 5.1.1 Prosencéphale

L'expression du gène *Pax-6*, chez la souris, débute au jour E8.0 dans le neuroépithélium du prosencéphale de même que dans les futures vésicules optiques. L'expression dans le télencéphale (E10,5 à E18,5) est restreinte aux zones ventriculaires de l'épithélium neural latéral et dorsal. Le télencéphale basal est dépourvu de transcrit *Pax-6*. Une forte expression de *Pax-6* est retrouvée lors du développement du diencéphale s'étendant dans les zones ventrales du thalamus et de l'hypothalamus antérieur avec une limite au niveau de la zona limitans intrathalamica étant la borne entre le thalamus ventral et dorsal. Les transcrits de *Pax-6* dans le thalamus dorsal se situent au niveau de la couche germinale interne et sur une fine couche de cellules au-dessus de la zona limitans. Par ailleurs, le gène *Pax-6* est observé dans la zone ventriculaire de l'épithalamus et dans les zones pré commissurale et commissurale du préteetum. La commissure postérieure délimite la zone caudale de l'expression de *Pax-6* dans le diencéphale.

Dans le cerveau adulte, les transcrits de *Pax-6* sont retrouvés discrètement dans les régions du prosencéphale tels que le bulbe olfactif, les noyaux septal latéral et médian, l'aire de la bande diagonale de Broca, le noyau du complexe basolatéral des amygdales, ainsi que dans certaines cellules du pallidum ventral, du noyau entopédunculaire. De plus, l'expression s'observe dans les cellules de la zona incerta s'étendant jusqu'aux noyaux thalamiques réticulaires.

### 5.1.2 Mésencéphale

Dans le tegmentum du mésencéphale l'expression de *Pax-6* au jour E13 s'étend latéralement dans la région qui deviendra la substantia nigra. Une forte expression est retrouvée dans la région du raphé dorsal différencié. Chez les jeunes souris adultes d'environ quatre semaines, le gène *Pax-6* est observé dans la partie dorsolatérale de la substantia nigra reticularis, dans la partie rostrale gris central mésencéphalique, dans quelques cellules dispersées dans la région du tegmentum ventral et dans les noyaux profonds mésencéphaliques.

### 5.1.3 Rhombencéphale

L'expression dans le rhombencéphale débute discrètement au jour E8,0 dans le métencéphale (pont et cervelet) et le myélocéphale (bulbe rachidien). Au jour E13,5 lors du développement du cervelet, l'expression de *Pax-6* est restreinte à la zone ventriculaire et dans la couche germinale externe. Cette couche formera la couche cellulaire granulaire du cervelet, où *Pax-6* demeure toujours exprimé, même chez le cerveau mature. *Pax-6* est aussi détecté dans les noyaux pontiques et olivaires inférieurs. En ce qui concerne la jeune souris adulte, les transcrits de *Pax-6* se retrouvent dans les différents noyaux du pont et du bulbe rachidien (noyaux pontiques, corps trapézoïde, noyau réticulotegmental, noyau tegmental postéro-dorsal, noyaux cochléaires dorsaux, noyaux prepositus de l'hypoglosse) ainsi que dans les couches granulaires ventriculaires et externes du cervelet. Dans une culture cellulaire primaire de cervelet, l'expression de *Pax-6* est confinée aux neurones granulaires et aux astrocytes gliales (Kioussi & Gruss, 1994; Yamada et coll., 1994). Quant au myélocéphale,

l'expression de *Pax-6* est similaire à ce qui est décrit dans la moelle épinière (voir partie 5.1.4). Une représentation schématique à la figure 5 résume l'expression du gène *Pax-6* dans l'encéphale d'une souris âgée de 13 jours embryonnaires.

#### 5.1.4 Moelle épinière

L'initiation de l'expression de *Pax-6* dans la moelle épinière coïncide avec la fermeture du tube neural. Au jour E8,5, le gène *Pax-6* est observé dans une large bande de cellules mitotiques actives mi-latérale au tube neural. Ultérieurement, au jour E9,0, l'expression devient restreinte à la moitié ventrale du tube neural. Quant au côté dorsal, *Pax-6* se situe sur la plaque dorsale. Les transcrits de *Pax-6* se retrouvent principalement dans la zone ventriculaire et sont absents de la zone intermédiaire à l'exception près des cellules situées ventralement. Plus tard au cours du développement, au jour E15.5, lorsque les neurones sont formés et que la régression des ventricules est complétée, l'expression de l'homéogène *Pax-6* est restreinte aux cellules épendimaires autour d'une large partie du canal neural et faiblement dans les cellules postmitotiques localisées ventralement.



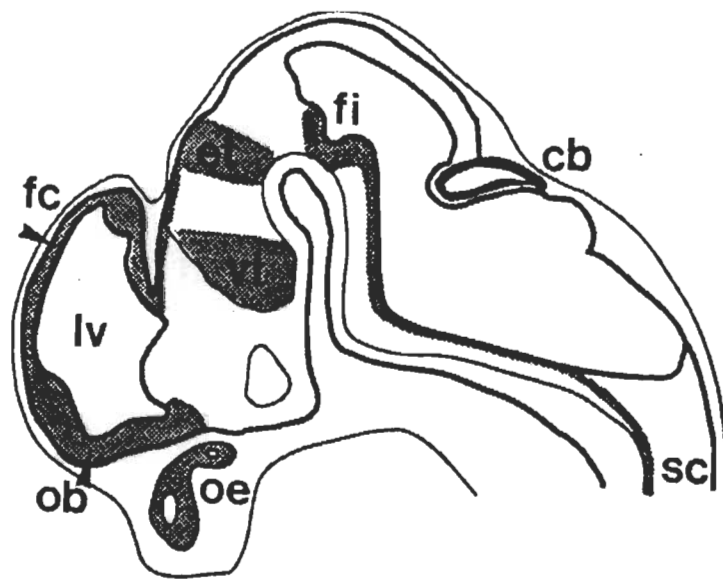


Figure 5. Représentation schématique de l'expression du gène *Pax-6* chez la souris âgée de 13 jours embryonnaires. Abréviations: cb, cerebellum; et, epithalamus; fc, frontal cortex; fi, fovea isthmi; lv, lateral ventricule; ob, olfactory bulb; oe, olfactory epithelium; sc, spinal cord; vt, ventral thalamus (modifié de Stoykova & Gruss, 1994).

## 5.2 Régulation de l'expression de *Pax-6* dans le système nerveux central

Les neurotrophines tels les facteurs de croissance des neurones (Nerve Growth Factor- NGF) et les facteurs neurotrophiques du cerveau (Brain-Derived Neurotrophic Factor-BDNF) jouent un rôle dans la différenciation cellulaire. L'ajout de NGF ainsi que de BDNF dans une culture primaire de cellules du cervelet résulte en une augmentation modérée de l'expression de *Pax-6*, suggérant que l'expression des gènes *Pax* est modulée par les neurotrophines (Kioussi & Gruss 1994).

## 5.3 L'oeil

Le sens de la vue à symétrie bilatérale et à extrémité céphalique distincte marquant la direction du mouvement fut l'un des premiers à se développer chez les Vertébrés. L'oeil des Vertébrés se développe en deux systèmes distincts avec l'ectoderme neural d'une part et l'ectoderme externe d'autre part. Chez les Vertébrés, l'expression de *Pax-6* dans l'oeil a été étudiée chez la souris (Ton et *coll.*, 1991, 1992; Walther & Gruss, 1991), le poisson zèbre (Krauss et *coll.*, 1991b; Püschel et *coll.*, 1992a), le poisson rouge (Hitchock et *coll.*, 1996), la caille (Martin et *coll.*, 1992), le poulet (Li et *coll.*, 1994), la salamandre (Del Rio-Tsonis et *coll.*, 1995) et le cochon d'Inde (Richardson et *coll.*, 1995). Le patron de distribution de l'expression du gène *Pax-6* chez toutes les espèces examinées est comparable. Les descriptions qui suivent sont toutes basées sur les observations faites chez la souris.

Au jour E8.0, *Pax-6* se manifeste dans une large région de l'ectoderme superficiel couvrant le prosencéphale et une région étendue de l'ectoderme neural, incluant la cavité optique. Le jour suivant, le gène *Pax-6* est observé dans la couche épithéliale du vésicule optique et dans la tige optique en développement. Par la suite, le niveau d'expression augmente autour de la cavité optique et par conséquent est plus faible en arrière, ainsi que dans les structures proximales comme la tige optique. Par ailleurs, les couches épithéliales (la neurorétine présomptive et l'épithélium pigmentaire rétinale) de la cavité optique expriment tous deux également *Pax-6*. À un stade plus tardif, la neurorétine continue d'exprimer fortement *Pax-6*, tandis que dans l'épithélium pigmentaire rétinale, l'expression est réduite exclusivement autour de la cavité optique. Chez l'adulte, l'expression au niveau de la neurorétine est restreinte à la couche cellulaire ganglionnaire, la couche nerveuse bipolaire ainsi qu'aux neurones amacriques tel que décrit pour la caille, le poisson zèbre et le poisson rouge (Hitchcock et coll., 1996; Krauss et coll., 1991b; Martin et coll., 1992; Püschel et coll., 1992).

L'expression, au niveau de l'ectoderme externe, se manifeste progressivement dans le cristallin, dans la cavité nasale et dans les tissus adjacents. Chez le poulet, l'expression au niveau de l'ectoderme superficiel précède l'expression dans le neuroépithélium contrairement aux autres Vertébrés (Li et coll., 1994).

### 5.3.1 Régulation de l'expression de *Pax-6* dans l'oeil

Chez la caille l'expression de *Pax-6* dans la neurorétine est contrôlée via deux promoteurs: P<sub>0</sub> et P<sub>1</sub> ainsi qu'avec un activateur spécifique à la neurorétine (Plazza et coll.,

1993, 1995a, b). La fonction de l'activateur est restreinte au promoteur P<sub>0</sub>. Les transcrits des deux promoteurs agissent différemment. En effet, les transcrits de P<sub>1</sub> apparaissent en premier lieu et diminuent tranquillement, tandis que les transcrits P<sub>0</sub> arrivent plus tardivement; augmentent, demeurent constants et diminuent suite à l'éclosion. Les transcrits des deux promoteurs sont détectés dans tous les tissus où *Pax-6* est exprimé à l'exception de l'épithélium pigmentaire de la rétine et du pancréas où seul les transcrits de P<sub>1</sub> sont retrouvés.

#### 5.4 Hypothèse et objectif du projet de recherche

Comme décrit précédemment, le gène *Pax-6* est impliqué dans l'évolution et le développement de l'encéphale et des yeux. Le but de cette étude a été de détecter la présence et de quantifier l'expression de l'homéogène *Pax-6* dans un échantillonnage de cerveaux d'embryons de poulets âgés de 3 à 20 jours ainsi que d'un poussin âgé d'un jour post-éclosion par la technique de Northern blot. De plus, une description précise de la localisation des transcrits du gène *Pax-6* a été effectuée dans l'encéphale du poulet chez un embryon âgé de 15 jours. Les techniques de la biologie moléculaire notamment l'hybridation *in situ* a été l'approche la plus précise permettant la localisation du gène dans l'encéphale. Dans un premier temps, les résultats obtenus de la localisation de l'expression du gène *Pax-6* dans l'encéphale du poulet ont été comparés avec le patron de distribution qui a été publié chez la souris à un même stade donné. Et dans un deuxième temps, un parallèle a été fait entre les structures exprimant le gène *Pax-6* et le système visuel aviaire.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIELS ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

#### 2.1 Matériels

Les oeufs de poulet fécondés provenaient de la ferme avicole Couvoir Ramsay (St-Félix-de-Valoix, Québec). La sonde de poulet *Pax-6* a été synthétisée par Simon Saule de L'Institut Pasteur de Lille et nous été fournie par Alvarado Mallart du laboratoire INSERM de M. C. Sotelo (Hôpital de la Salpêtrière). Le fragment de *Pax-6* nous est parvenu inséré dans le vecteur pGEM<sub>4</sub> (Promega Corporation). L'amplification et la purification du plasmide ont été accomplies à l'aide de la trousse Qiagen®. L'ARN total a été extrait du cerveau grâce au produit Tri Reagent® de la compagnie Sigma. Les enzymes de restrictions Hind III, EcoRI ainsi que les ARN polymérases Sp6 et T7 provenaient de New England BioLabs. Les riboprobes sens et antisens ont été marquées à la digoxigénine (Boehringer Mannheim). La chimiluminescence, CSPD® provenait de la compagnie Boehringer Mannheim également. L'ensemble de Tyramide Signal Amplification pour hybridation *in situ* nous provenait de Dupont NEN Products. Tous les autres produits et solutions étaient de qualité ARNase et ADNase non détectés.

## 2.2 Embryons

Les oeufs fécondés ont été incubés jusqu'aux jours désirés à une température de 37,8°C dans un incubateur rotatif contenant une humidité relative d'environ 60 à 90%. Les embryons ont été sacrifiés par décapitation et leur cerveau a été rapidement retiré de la boîte crânienne. D'une part, l'ARN total des cerveaux a été extrait pour un échantillonnage d'embryons âgés de 3 à 20 jours ainsi que d'un poussin âgé d'un jour post-éclosion, pour la technique de Northern blot. Et d'autre part, une seconde série formée de cerveaux d'embryons âgés de 15 jours ayant été fixés dans une solution de paraformaldéhyde (4%) a été utilisée pour la coupe au cryostat et ultérieurement pour la technique de l'hybridation *in situ*.

### 2.2.1 Extraction de l'ARN

Les cerveaux, fraîchement extraits, des embryons de poulets ont été immédiatement homogénéisés, en utilisant un homogénéisateur de verre, dans une solution de Tri Reagent (1 ml par 50-100 mg de tissus). Les homogénats ont été laissés 5 minutes à la température de la pièce pour assurer la complète dissociation. Au mélange, 0,2 ml de chloroforme a été ajouté par ml de Tri Reagent utilisé. Par la suite, une centrifugation (15 min. à 12 000 g à 4°C) a permis une séparation du mélange en trois phases: la couche inférieure, une phase organique, comprenant les protéines, l'interphase contenant l'ADN et la couche supérieure, la phase aqueuse contenant l'ARN. Cette dernière a été récoltée et mise dans un autre tube. L'ARN a été purifié par précipitation à l'isopropanol.

### 2.2.2 Préparation des coupes histologiques

Suite à la dissection, les cerveaux ont été fixés toute une nuit à 4°C par immersion dans une solution de paraformaldéhyde 4% fraîchement préparée. Le jour suivant, les cerveaux ont été transférés dans une solution de sucrose (30%) pour une nuit à 4°C. Par la suite, ils ont été congelés à -80°C avec le 2-méthylbutane.

Les cerveaux ont été coupés à une épaisseur de 14 µm et 50 µm à l'aide d'un cryostat (Leica, Jung CM 3000) et à une température de -20°C. Les sections ont été mises sur des lames chargées positivement (Fisher Scientific). Les coupes ont été conservées à -80°C ou utilisées immédiatement pour l'hybridation *in situ*.

### 2.3 Sonde Pax-6 chez le poulet

La séquence totale du gène *Pax-6* est formée de 1964 paires de bases. La sonde utilisée était un fragment de 312 pb. Nous avons reçu la sonde insérée à l'intérieur du vecteur pGEM4 (voir figure 6). Le vecteur pGEM4 contenait un promoteur pour SP6 et T7, ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline.

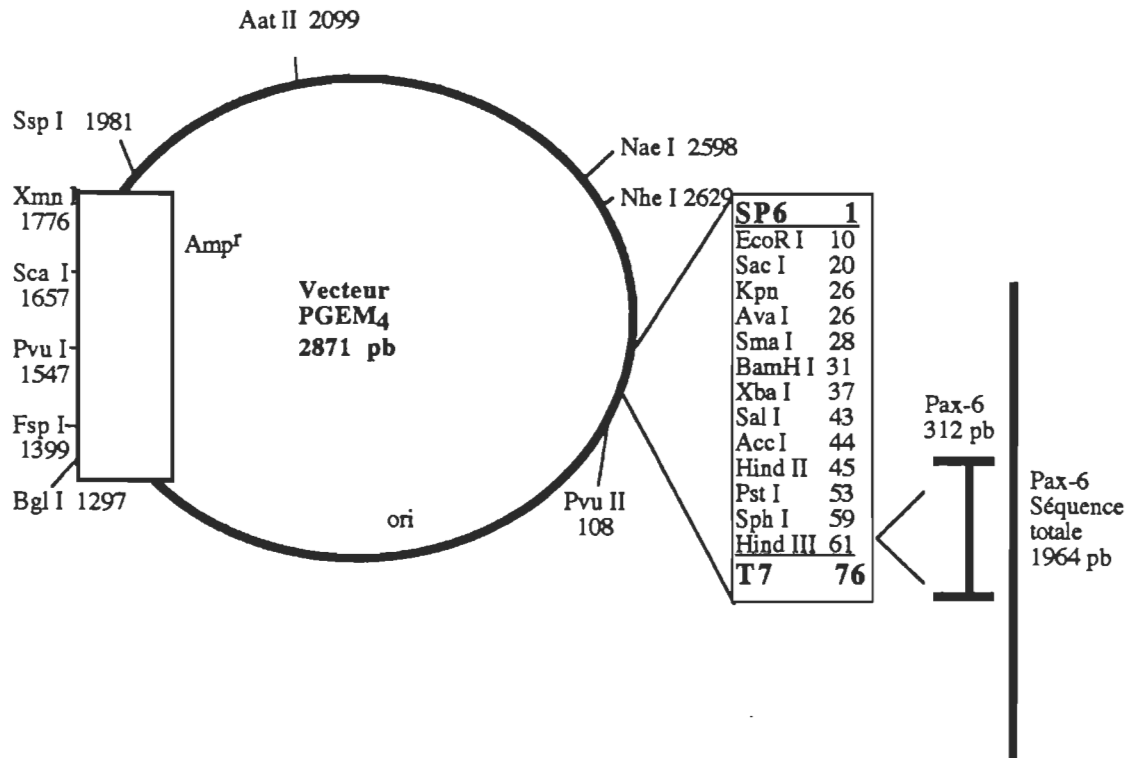


Figure 6. Schéma du vecteur pGEM4



### 2.3.1 Amplification et purification de la sonde

Pour amplifier un fragment ADN, l'insère doit préalablement être introduit dans un plasmide. Dans notre cas, le fragment de 312 pb de *Pax-6* nous est parvenu inséré dans le vecteur pGEM4. Le plasmide a tout d'abord été introduit dans les cellules rendues compétentes par le diméthyl sulfoxyde; 10 µl d'ADN (1 ng/µl) ont été ajoutés directement sur 100 µl de cellules compétentes (*Escherichia coli*, souche RR1). Le tube a d'abord été mis sur la glace 10 min. et transféré par la suite à 37°C pendant 5 min. produisant ainsi un choc thermique. Les plasmides se sont donc retrouvés à l'intérieur des cellules. L'amplification des cellules s'est effectuée grâce à un milieu riche en nutriments (milieu LB avec ampicilline) et à une température adéquate (37°C) sous agitation durant toute une nuit.

Le milieu de culture a ensuite été centrifugé (10 min. à 6 000 g) pour ainsi récolter le culot de bactéries. Le culot a été remis en solution dans un tampon ayant pour fonction de lyser les bactéries, l'ADN s'est donc retrouvé en solution. Une seconde centrifugation du mélange a permis de disposer des cellules mortes. Le surnageant a subséquemment été passé dans une colonne de résine ayant pour rôle de séparer les plasmides des contaminants. Finalement, l'ADN a été précipité par l'isopropanol, centrifugé, lavé à l'éthanol 70%, recentrifugé et puis le culot a été ressuspendu dans un volume approprié de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8).

### 2.3.2 Synthèse et marquage des sondes ARN

Les plasmides ont été linéarisés par l'enzyme de restriction Hind III et l'ARN polymérase T7 a été ajouté permettant la synthèse de la sonde antisens ; ou encore nous avons linéarisé le plasmide avec l'enzyme de restriction EcoRI et ajouté l'ARN polymérase SP6

pour synthétiser la sonde sens, tout deux ont été marquées de façon non radioactive à la digoxigénine. À environ 1 µg de plasmide d'ADN linéarisé, 2 µl du tampon (10x) NTP (10mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-11-UTP, pH 7,5) et 2 µl de tampon de transcription (10x) ont été ajoutés. Le volume a été complété à 18 µl total avec de l'eau stérile et sans ARNase. Les polymérases Sp6 et T7 ARN ont été utilisés (2 µl) pour les sondes sens et antisens respectivement. La réaction a été inhibée après 2 h avec de 2 µl d'EDTA (0,2 M à pH 8). Finalement, le volume a été complété à 100 µl avec de l'eau stérile pour ainsi obtenir une concentration approximative de 10 µg par 100 µl. Ces sondes étaient maintenant prêtes pour être utilisées pour les techniques de Northern blot et de l'hybridation *in situ*.

#### 2.4 Northern blot

Le procédé Northern fournit des données sur la présence, la taille et la quantité d'ARN messagers particuliers dans un échantillon. Approximativement 7-10 µg d'ARN total dénaturés provenant des cerveaux d'un échantillonnage d'embryons de poulets âgés de 3 à 20 jours ainsi que d'un poussin âgé d'un jour post-éclosion sont fractionnés selon la taille des molécules sur un gel d'agarose 1,2% composé de 2% formaldéhyde et 1 x MOPS (0,02 M MOPS, 5 mM NaOAc, 1 mM EDTA). L'ARN a été transféré par la suite sur une membrane de Nylon chargée positivement (Boehringer Mannheim) fixant les molécules d'ARN dénaturées sous forme déployées. La fixation des ARN messagers sur la membrane a été renforcée par la réticulation aux rayons ultra violets, 3 minutes de chaque côtés.

La membrane a été pré-hybridée 3 h à 65°C dans une solution composée de 50% formamide, 5 X SSC (provenant d'une solution de 20 X SSC: 3 M NaCl, 0,3 M acide citrique à pH 7,0), 2% de réactif de blocage, 0,1% N-lauryl sarcosine, 0,02% SDS et 50

$\mu\text{g/ml}$  d'ARN de levure. Par la suite, la sonde antisens marquée a été additionnée à la solution et l'hybridation s'est effectuée durant toute une nuit à une température de  $65^{\circ}\text{C}$ .

Le jour suivant, la membrane a été lavée avec deux concentrations différentes de tampon SSC dont 0,1% de SDS a été ajouté. Le premier lavage s'est effectué à une concentration de 2 X SSC à la température de la pièce et le second à 0,1 X à  $65^{\circ}\text{C}$ , tout deux sous agitation.

#### *Révélation par la chimiluminescence*

Suite aux lavages stringents, la membrane a été rincée avec le tampon de lavage (0,1 M acide maléique, 0,15 M NaCl à pH 7,5) et a été incubée 1 h à  $37^{\circ}\text{C}$  dans une solution de blocage (1%). L'incubation avec l'anticorps anti-digoxigénine-alkaline phosphatase (1:10000 dans la solution de blocage) a duré 20 min. à  $37^{\circ}\text{C}$ . La membrane a ensuite été relavée et a été équilibrée avec un tampon composé de 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl à pH 9,5 et subséquemment, elle a été trempée une solution de chimiluminescence (1:100); cette dernière détectait l'alkaline-phosphatase. La membrane a été par la suite scellée dans un sac et a été déposée dans un incubateur à  $37^{\circ}\text{C}$  pour environ 5 à 15 min. permettant ainsi d'augmenter la réaction de luminescence. La détection du signal s'est faite par un exposition de 15 à 30 min. sur un film autoradiographique (Kodak BIOMAX ML).

Les valeurs des résultats sont basés sur trois expériences répétées de façon identique. Et une fois les autoradiographies digitalisées, l'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel NIH Image version 1.61 où l'expression des différents stades ont été évaluées. De plus, en parallèle, deux contrôles ont été faits suivant les mêmes procédures l'un avec l'ARN total de cerveau de rat adulte et l'autre avec la sonde ARN sens. Dans chacun des deux cas, aucun signal n'a été détecté.

## 2.5 Hybridation *in situ*

La technique de l'hybridation *in situ* permet la détection d'un ARNm particulier sur une coupe histologique. Les sections ont été tout d'abord décongelées, par des passages allant de -80, -20, 4°C, à la température de la pièce. Pour conserver l'intégrité des coupes, elles ont été fixées 20 min. avec une solution de paraformaldéhyde 4% fraîchement préparée suivi de trois lavages de trois minutes chacun dans le tampon TE. Par la suite, les sections ont été traitées 10 minutes avec 200 mM HCl pour dénaturer les protéines, et 10 minutes avec 0,5% de solution d'acétique anhydride pour réduire le bruit de fond. Les peroxydases endogènes ont été inhibées sous l'action de 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30 minutes. Subséquemment, une solution contenant la protéinase K a été appliquée pendant 10 min. à une température de 37°C. La protéinase K favorise l'accessibilité de la sonde à sa cible par la digestion des protéines entourant les acides nucléiques ciblés et ce, à une concentration, 0,5 µg/ml pour les sections de 14 µm et 20 µg/ml pour les sections de 50 µm. Entre chaque traitement, trois lavages de 3 min. dans le tampon TE avaient lieu. Finalement, les coupes ont été déshydratées par une série de concentration croissante d'éthanol.

Durant la période de pré-hybridation, les coupes ont été réhydratées dans une chambre humide à 55°C pendant 30 minutes. Par la suite, la solution d'hybridation composée de 50% formamide, 2X SSC, 10% dextran sulfate, 0,02% SDS, 0,25 mg/ml d'ADN provenant de sperme de hareng dénaturé ainsi que la sonde antisens marquée à la digoxigénine sont ajoutés sur les lames. Pour augmenter le signal de l'hybride ARN/ARN, les coupes ont été chauffées sur une plaque thermique à 95°C pendant 4 minutes. L'hybridation s'est produite dans une chambre humide, évitant l'évaporation, et dans un incubateur à une température de 55°C pendant toute une nuit. La sonde sens a été appliquée à quelques coupes à titre de contrôle négatif.

*Lavages, amplification et révélation*

Le lendemain, les lames ont été plongées tout d'abord dans le tampon 3 X SSC et par la suite dans le tampon NTE (500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) pendant 5 minutes. Pour éliminer les simples brins ARN non-hybridés, les lames ont été incubées 30 min. à 37°C en présence de 50 µg/ml ARNase A, suivit par trois lavages de cinq minutes dans le tampon NTE. Subséquemment, deux lavages stringents ont été faits l'un dans 2 X SSC 30 min. et l'autre dans 0,1 X SSC pendant 1 h à 57°C.

Les coupes ont ensuite été lavées trois fois pendant 5 min. dans le tampon TNT (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, Tween®20 0,05%) et, l'étape de blocage a eu lieu dans une solution 0,5% à 37°C pendant 30 minutes. Subséquemment, la détection de la sonde hybridée sur l'ARNm du tissu s'est faite grâce à l'anticorps anti-dig-peroxydase (Boehringer Mannheim) dilué 1:100 dans la solution de blocage 0,5%, l'incubation a durée 30 min. à 37°C dans une chambre humide suivie par trois lavages de 5 min. dans le tampon TNT avec agitation.

Une amplification du signal s'est faite par la suite par une incubation de 7 à 10 min. avec la tyramide biotinyll (1:50) suivie de trois lavages de 5 min. dans le tampon TNT avec agitation. L'amplification a été détectée par l'enzyme de conjugaison anti-streptavidine-HRP (horse radish peroxidase) (1:100), lequel a été incubé sur les coupes 30 min. à une température de 37°C et trois lavages de 5 min. ont suivi. Finalement, le substrat, le chromogène 3-3'-diaminobenzidine (DAB) (0,39 mM DAB, 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,3) a été ajouté formant un précipité visible par la microscopie optique.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

Les variations du degré d'expression de l'homéogène *Pax-6* durant le développement de l'encéphale embryonnaire de poulet ainsi que la détermination des régions d'expression du gène pour un stade tardif (15 jours) ont été évalués en utilisant deux techniques différentes de la biologie moléculaire. Le procédé de type Northern consistait en l'analyse de l'ARN messager (ARNm) *Pax-6* sur une membrane. Et la technique de l'hybridation *in situ* permettait la détection de l'expression de l'ARNm *Pax-6* directement sur des coupes histologiques.

#### 3.1 Analyse du niveau de l'ARNm *Pax-6* par transfert de type Northern

Afin de nous permettre de comparer le degré d'expression du gène *Pax-6* durant le développement encéphalique du poulet, nous avons extrait l'ARN total des cerveaux des embryons âgés de 3 à 20 jours, ainsi que d'un poussin âgé d'un jour post-éclosion et nous avons effectué un transfert de type Northern blot. Un message d'environ 1964 pb a été détecté correspondant effectivement au paired box 6 (un cas expérimental est représenté à la figure 7 A). L'analyse quantitative a été effectuée par la moyenne des résultats des autoradiographies obtenus de trois cas expérimentaux différents. Or, la moyenne de l'expression des transcrits du gène *Pax-6* révèle une augmentation entre les jours 3 et 7 et ultérieurement, l'expression tant à se stabiliser, mise à part aux jours 11 et 14 où une légère

augmentation se manifeste. Le tracé de la figure 7 B représente la moyenne des résultats obtenus pour l'expression du gène *Pax-6* au cours du développement.

(A)



(B)

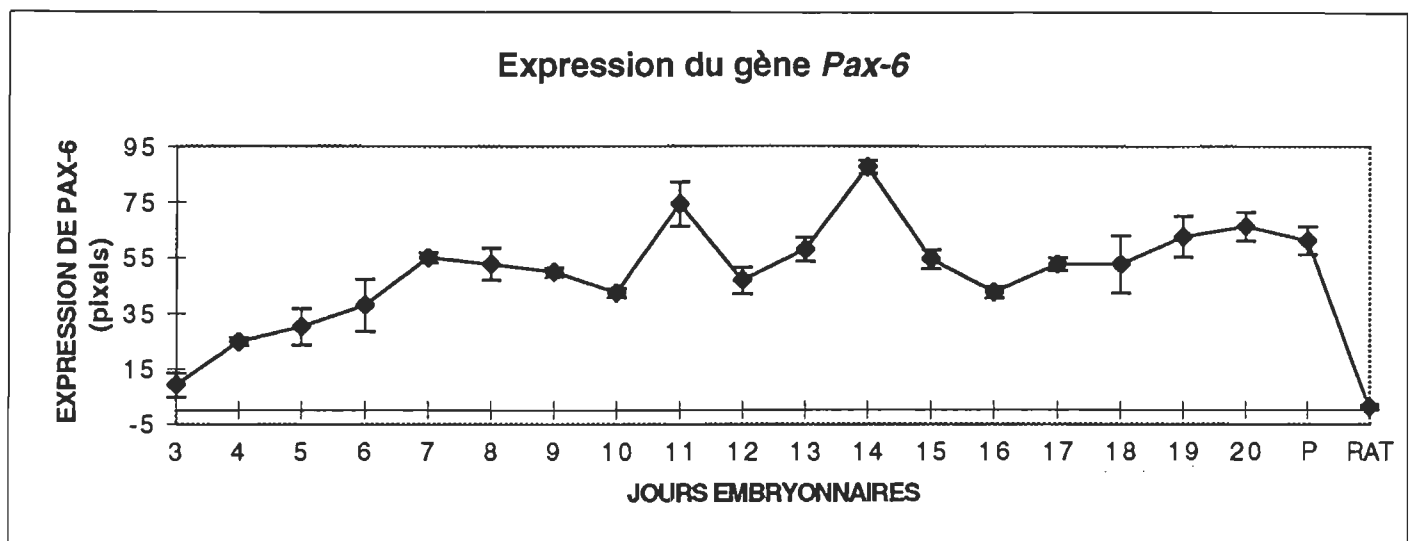


Figure 7. (A) Northern blot, d'un échantillonnage de 7  $\mu$ g ARN total de cerveaux de poulets âgés de 3 à 20 jours embryonnaires ainsi que d'un poussin (P) d'un jour post éclosion et d'un cerveau de rat (R). L'ARN messager a été hybridé avec la sonde antisens *Pax-6*. Un message d'approximativement 1964 pb a été détecté. Aucun signal n'est détecté concernant l'ARN total de rat.

(B) Représentation graphique résumant l'expression du gène *Pax-6* au cours du développement encéphalique basée sur trois expériences.



### 3.2 Localisation de l'ARNm *Pax-6* par la technique de l'hybridation *in situ*

Afin de localiser les régions exactes de l'expression de *Pax-6*, des coupes histologiques d'un cerveau de poulet âgé de 15 jours embryonnaires ont été hybridées avec la sonde ARN antisens de *Pax-6* marquée à la digoxigénine. Plusieurs niveaux de coupes ont été sélectionnés afin d'obtenir un échantillonnage détaillé de l'expression du gène dans l'encéphale de poulet. La figure 8 représente schématiquement la localisation des transcrits du gène *Pax-6* observés sur des coupes transversales à travers différentes régions antéro-postérieures encéphaliques.

#### 3.2.1 Téleencéphale

Au niveau du téleencéphale, l'expression du gène *Pax-6* est résumée sur le schéma de la figure 8 a. Une population de cellules marquées est observée au niveau du téleencéphale dorsal dans la zone la plus superficielle, au dessus du ventricule, correspondant chez l'adulte à l'hyperstriatum accessorium (HA). De plus, d'autres transcrits ont été détectés entre le ventricule et la ligne médiane du téleencéphale, correspondant dorsalement à l'hippocampe (Hp) et ventralement au septum. Plus latéralement, nous retrouvons deux groupes de cellules marquées. L'un dont les cellules sont plutôt dispersées à un niveau antérieur du neostriatum (N) latérale et le second où les cellules sont plutôt regroupées à un niveau postérieur correspondant à l'aire corticoidea dorsolateralis (CDL) (fig. 8 b). Les tubercules olfactifs (TO) (fig. 9 a), situés ventralement dans le téleencéphale, les bulbes olfactifs ainsi que les neurones de la bande diagonale de Broca, située juste au-dessus du TO, expriment le gène *Pax-6*. Au niveau du paleostriatum, quelques neurones dispersés ventralement sont également marqués.

### 3.2.2 Diencephale

Le schéma à la figure 8 b décrit la localisation de l'expression du gène *Pax-6* au niveau du diencephale. Les résultats de l'hybridation *in situ* révèlent une plus grande présence du gène *Pax-6* au niveau du thalamus ventral que dorsal (fig. 9 b). En effet, nous retrouvons ventralement, une forte expression dans les noyaux geniculatus lateralis, pars ventralis (GLv) et intercalatus thalami (ICT) ainsi que dans le decussatio supraoptica ventralis (DSV).

Au niveau du thalamus dorsal, l'expression est détectée plus faiblement dans l'aire latérale et dorsale du diencephale, principalement dans les noyaux dorolateralis anterior thalami, pars lateralis (DLL) et autours du n. rotundus (Rt) avec une préférence le long du flan latéral. Une population de cellules retrouvées dans la région du noyau habenularis (Hb), situé à la limite dorsale du diencephale, sont plus fortement marquées.

Localisé près de la ligne médiane du diencephale, nous observons dans l'hypothalamus quelques transcrits colorés à la diaminobenzidine dans notamment le n. lateralis hypothalami (LHy) et plus dorsalement dans quelques cellules du stratum cellulare internum (SCI). Parmi les différents noyaux du complexe prétectal, nous constatons la présence de marquage principalement dans le n. principalis precommissuralis (PPC).

### 3.2.3 Tronc cérébral: mésencéphale

Localisées dans le tegmentum mésencéphalique, les volumineuses cellules du noyau pars magnocellularis (Imc) sont fortement marquées comparativement aux cellules de plus petites tailles retrouvées dans le n. isthmiques pars parvocellularis (Ipc) (fig. 10 a). Une

autre population de cellules dispersées dans une région étendue de la formation réticulée mésencéphalique expriment aussi le gène *Pax-6*.

Au niveau du tectum optique (figs. 8 c et 10), plusieurs cellules en différenciation formant les strates du tectum expriment le gène. En effet, il s'agit des couches 2 à 7 selon la nomenclature de Cajal & Ramon y (1911). Au niveau des strates 2/3, les cellules marquées sont comprimées les unes sur les autres. Par ailleurs, les cellules localisées dans la vaste couche 5, sont plutôt étalées. Et de même que dans les strates 2/3, les cellules qui se retrouvent dans les strates 6/7, sont considérablement entassées. Nous savons que ces couches superficielles sont reconnues pour être le site cible des axones rétiniens. C'est toutefois dans les couches profondes que la présence des ARNm *Pax-6* est plus intensément observée notamment dans les cellules entassées et de gros diamètre retrouvées dans le stratum griseum centrale (SGC), correspondant à la couche 13. Au niveau du stratum album centrale (SAC) ou couche 14 ainsi qu'au niveau de la couche 8, les transcrits sont présents, mais de moindre intensité.

#### 3.2.4 Tronc cérébral: pont

Dans le tegmentum pontique rostral (figs. 8 c et 9 c), l'expression est présente dans le locus ceruleus (LoC) et médialement autour du fasciculus longitudinalis medialis (FLM), correspondant à la zone ZpFLM (zona péri FLM). De plus, le long de la ligne médiane, plusieurs cellules retrouvées dans les noyaux tegmentaux sont marquées, notamment dans le dans n. annularis (AnI) du système raphé dorsal et s'étendant en direction latéral; plus ventralement, dans la région du decussatio brachiorum conjunctivorum (DBC), de même que dans le n. linearis caudalis (LC) faisant parti du système raphé ventral et qui constitue d'une bande de cellules longitudinales située de part et d'autre de la ligne médiane.

Au niveau du tegmentum pontique latéral, nous avons pu identifier une expression très répandue, particulièrement dans les zones du n. reticularis pontis oralis (RPO) ainsi que du n. tegmenti pedunculo-pontinus, pars compacta (TPc).

Par ailleurs, nous avons observé la présence du marquage dans des régions du tegmentum pontique caudal (figs. 8 d et 11 b, c), spécialement dans le n. raphé ventral (Rv) et la réticulée pontique (RP) rostroventrale, incluant le n. reticularis gigantocellularis (Rgc) et dorsoventralement, dans le n. subceruleus ventralis (SCv). Les ARN messagers de *Pax-6* sont en outre observés dans certaines structures plus dorsales par rapport au SCv correspondant aux noyaux vestibulaires, notamment dans les noyaux latéral et dorsolatéral (VeL et VDL respectivement). L'expression est aussi visible dans l'ensemble des cellules retrouvées dans les noyaux pontis lateralis et medialis (PL et PM) (fig. 11 b) situés dans la partie la plus ventrale du tegmentum pontique.

### 3.2.5 Cervelet

Dans le cervelet moyen (fig. 8 d), les transcrits du gène *Pax-6* sont observés dans les noyaux profonds cerebellaris internus et intermedius (CbI et CbM) (fig. 11 a), retrouvés autour du ventricule. Par ailleurs, les cellules de la couche germinale externe des lobules cérébelleux forment une rangée homogène de cellules *Pax-6* positif. Cette couche correspond dans le cervelet adulte à la couche granulaire.

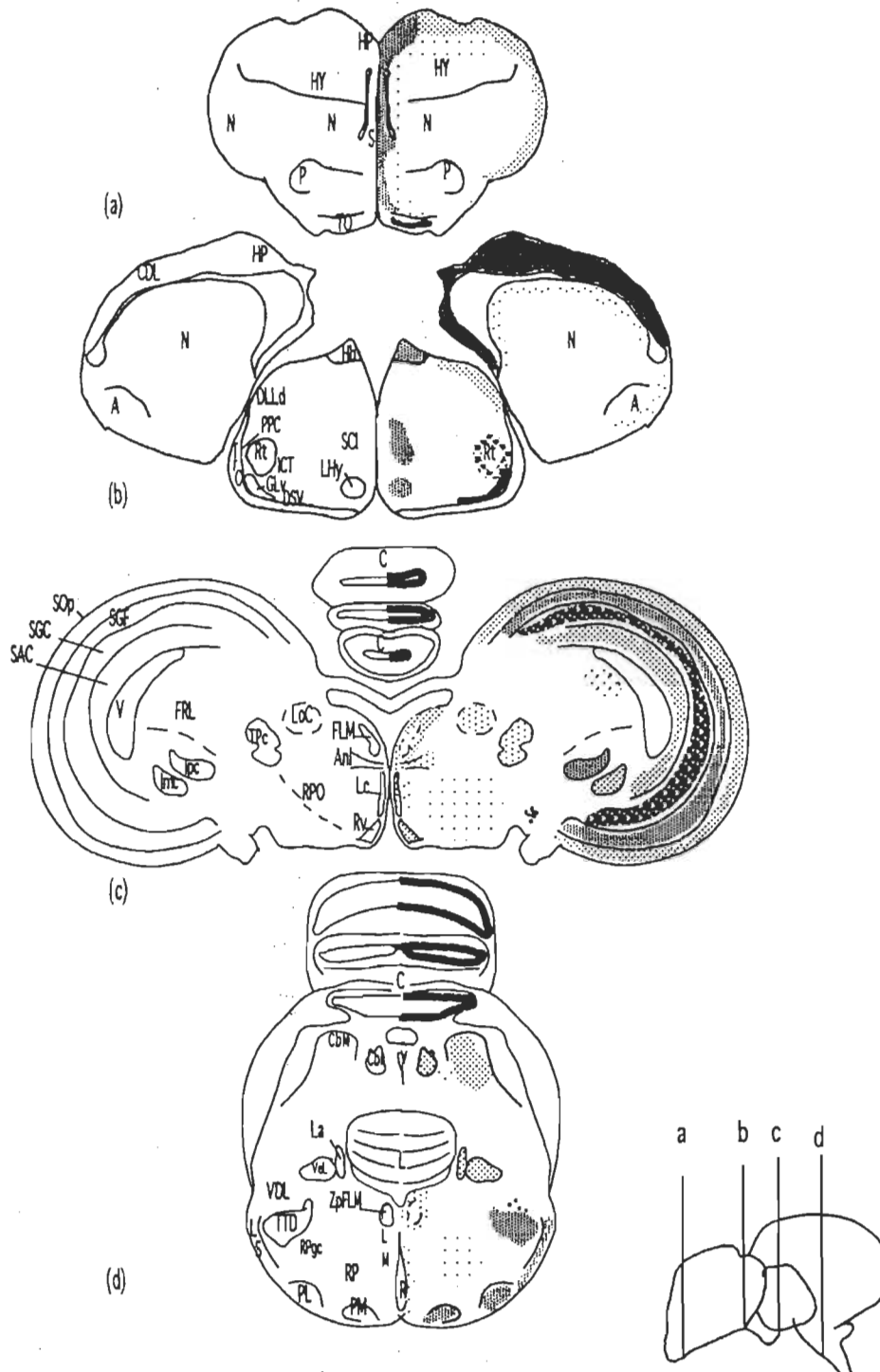


Figure 8. Représentation schématique de l'expression du gène *Pax-6* à travers différentes régions antéro-postérieures de l'encéphale du poulet âgé de 15 jours embryonnaires; (a) télencéphale; (b) diencéphale; (c) mésencéphale (d) rhombencéphale.

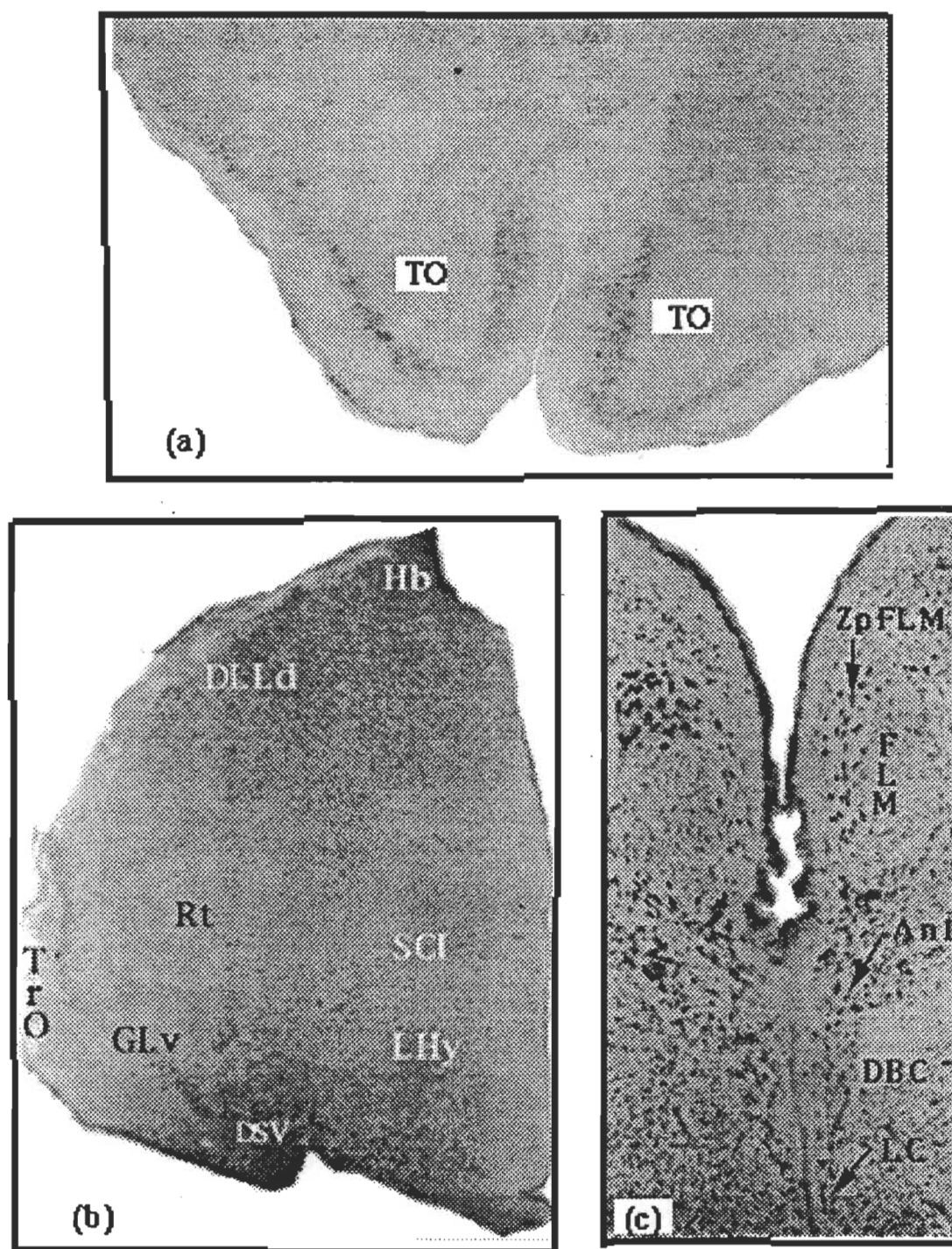
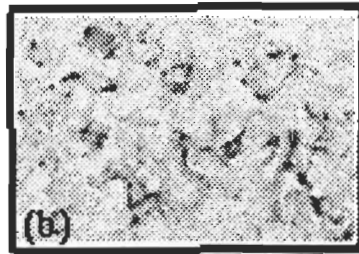
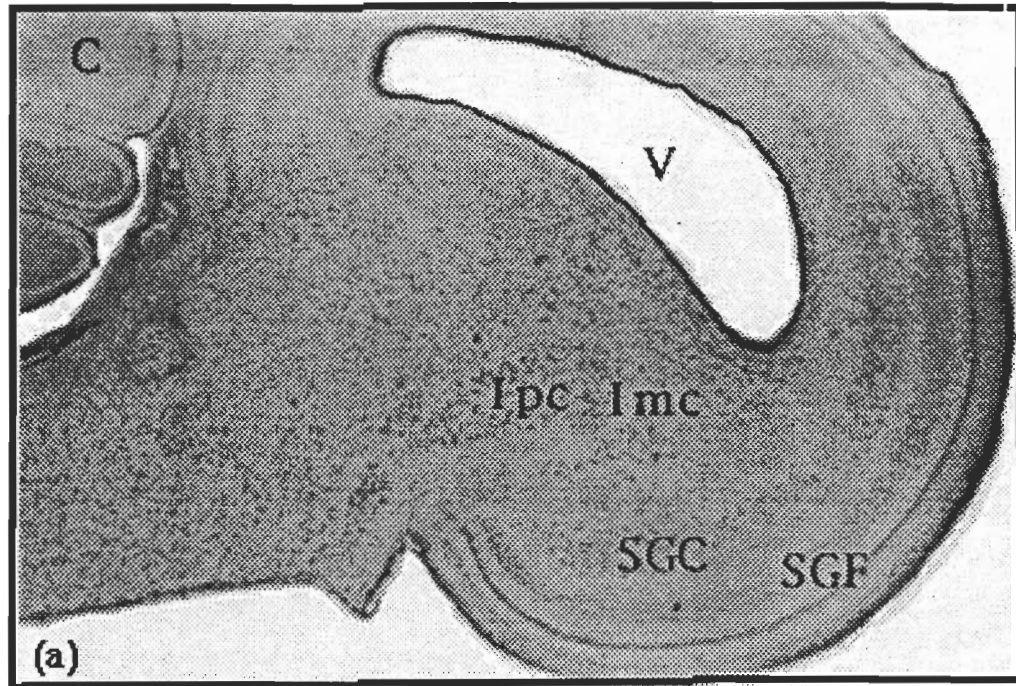
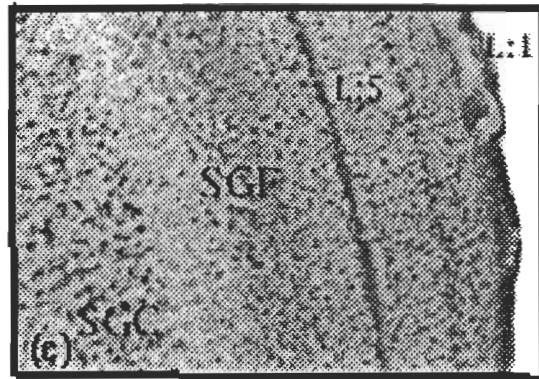


Figure 9. Expression du gène *Pax-6* au niveau de (a) tubercule olfactif (TO); (b) diencéphale; et (c) sous-divisions du système raphé dorsal.



Cellules du tectum



Couches du tectum

Figure 10. Expression du gène *Pax-6* au niveau mésencéphalique (a) mésencéphale (tectum optique et tegmentum); (b) cellules marquées vues à fort grossissement (25x) dans la couche SGC; (c) couches du tectum optique (6.3x) du tectum optique.

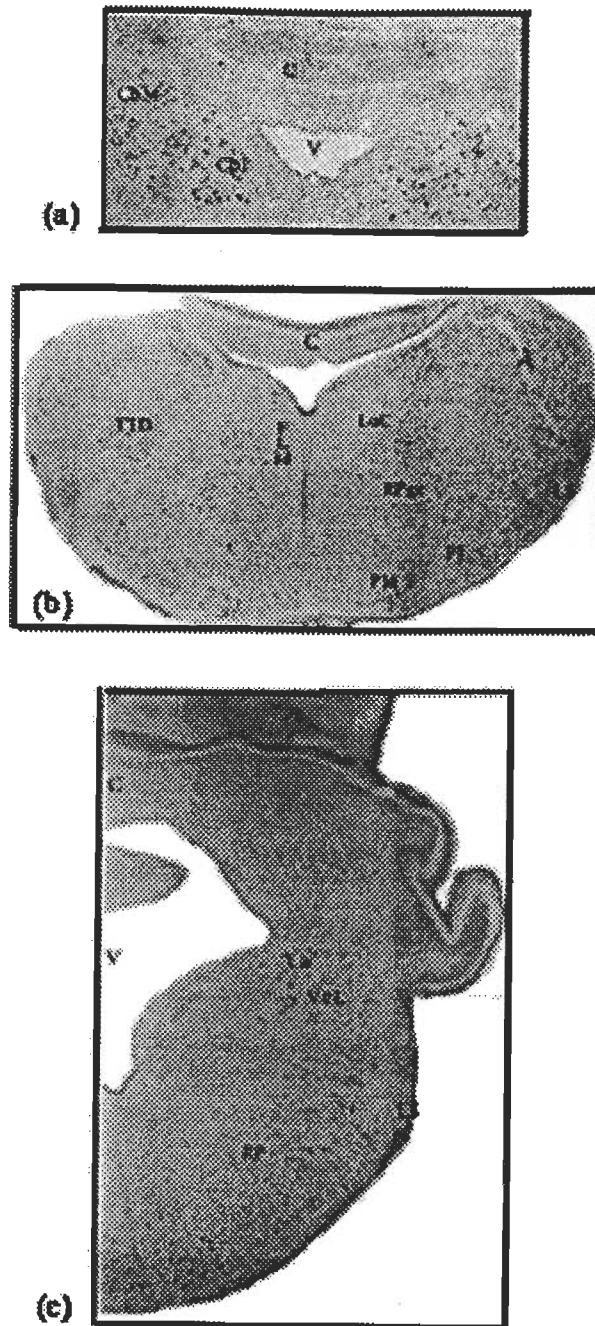


Figure 11. Expression du gène *Pax-6* au niveau rhombencéphalique; (a) cellules (10x) dans les noyaux profonds cérébelleux; deux niveaux du rhombencéphale (b) antérieur et (c) postérieur.



## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

#### 4.1 Fonctions possibles et déroulement dans le temps de l'expression du gène *Pax-6*

Nos résultats obtenus par Northern blot (voir fig. 7) nous indiquent que *Pax-6* est présent tout au long du développement de l'encéphale, suggérant son rôle important dans la formation du cerveau aux stades précoce et tardif. La présence du gène hâtivement indique un rôle clé du gène dans l'initiation du développement de diverses structures du système nerveux. Le développement général de l'encéphale débute par la formation de la plaque neurale qui origine de l'épaississement de l'ectoderme le long de l'axe médian postérieur de l'embryon. Li et coll. (1994) observent initialement l'expression de *Pax-6* dans une région antérieure de l'ectoderme de la plaque neurale. Le fait que nous retrouvons déjà à trois jours embryonnaires des transcrits de *Pax-6* confirme son action très tôt dans le processus du développement. On attribut aussi à *Pax-6* des fonctions importantes dans la formation morphogénique, dans la prolifération primaire, dans la régionalisation et dans la subdivision de l'encéphale. Donc la présence d'une augmentation du gène sur les Northern blot pourrait s'expliquer par la transformation de la vésicule la plus antérieure (prosencephale) en deux vésicules cérébrales secondaires (télencéphale et diencephale); la seconde vésicule de l'encéphale, le mésencéphale, se développera et formera le cerveau moyen; et la troisième

vésicule, le rhombencéphale, formera aussi deux vésicules secondaires: le métencéphale (pont et cervelet) et le myélencéphale (bulbe rachidien).

Nous pouvons observer une augmentation de l'expression sur les Northern blot, entre les jours 3 et 7, ce résultat nous laisse supposer que *Pax-6* a une fonction dans les mouvements morphogéniques, le rendant essentiel dans le développement. En effet, nous savons qu'à ce stade le mouvement cellulaire des parties est irréversible et qu'il engendre une succession de mouvements créant en conséquence une nouvelle forme à la structure en développement. Par exemple, si l'on prend le cas du prosencéphale, juste avant qu'il soit subdivisé en télencéphale et diencephale, une paire de protusions apparaît sur ses côtés latéraux. Ces protusions ou vésicules optiques seront l'ébauche des futurs yeux. Les vésicules optiques se feront comprimer par les "restes" du prosencéphale qui engendreront les différentes parties de l'oeil. La connexion entre les deux formera le nerf optique qui demeurera la jonction entre l'oeil et le cerveau (diencephale).

Par la suite, l'expression du gène *Pax-6* toujours présente jusqu'aux stades tardifs suppose une fonction dans les cellules des différentes parties qui deviendront histologiquement spécifiques, c'est-à-dire qu'elles acquerront les propriétés structurales et physico-chimiques pour lesquelles elles ont été programmées. Par exemple, le télencéphale forme entre autre les hémisphères cérébraux; le thalamus et l'hypothalamus se différencieront dans le diencephale, de même que plusieurs noyaux spécifiques retrouvés dans le pont et le cervelet. En résumé, à un stade tardif, le rôle du gène *Pax-6* laisse supposer qu'il agirait dans la différenciation de certaines cellules jusqu'à ce qu'elles soient aptes à remplir leurs fonctions physiologiques dans une région spécifique de l'encéphale. Or, nous pouvons donc soutenir que *Pax-6* est effectivement un gène du développement. De plus, sa présence dans l'encéphale de poulet d'un jour post-éclosion ainsi que chez l'adulte (Puelles & Rubenstein,

1993) lui suggèrent un rôle possible dans la différenciation, le maintien et le fonctionnement des cellules adultes.

#### 4.2 Description de l'expression du gène *Pax-6*, à un stade tardif chez le poulet et comparaison de l'expression avec la souris

*Pax-6* a été identifié comme un régulateur pouvant être impliqué dans le développement du système nerveux central à un stade tardif (Kawakami, A. et coll. 1997). Dans cette étude, nous avons premièrement démontré par le transfert de type Northern la présence de l'expression du gène *Pax-6* tout au long du développement de l'encéphale de poulet. Par la suite, nous avons décrit le patron de distribution de l'expression du gène dans l'encéphale à un stade embryonnaire tardif (15 jours). Le patron de distribution du marquage observé grâce à la technique d'hybridation *in situ* démontre que les différentes subdivisions du cerveau de poulet exprimant le gène est comparable pour de nombreuses structures aux résultats obtenus lors d'expériences similaires effectuées chez la souris (Walther & Gruss (1991), Püschel et coll. (1992), Stoykova & Gruss (1994), et Grindley et coll. (1995).

##### *Téleencéphale*

Dans la partie téléencéphalique du cerveau, les transcrits de l'homéogène *Pax-6* se retrouvent dans une division du Wulst l'hyperstriatum accessorium qui est le site d'arrivée des projections visuelles thalamiques, chez l'Oiseau. Chez la souris, l'expression entre les jours embryonnaires 10,5 et 18,5 est fortement détectée latéralement et dorsalement dans l'épithélium néocortical (Walther & Gruss, 1991).

Dans l'aire archipalliale du téleencéphale, nos résultats chez le poulet, nous permettent d'observer des ARNm du gène *Pax-6* dans la région hippocampique, comme il a été observé

chez la souris. D'un point de vue fonctionnel, à l'instar de son homologue mammalien, l'hippocampe aviaire jouerait un rôle important dans l'élaboration d'une carte spatiale, dans l'orientation spatio-temporelle (mamm.: O'keefe & Nadel, 1979; Olton et coll., 1979, pigeon: Bingman et coll., 1984) ainsi que dans la mémoire (mamm. Gaffan, 1972; Olton et coll., 1979; Winocur, 1979, pigeon Sahgal, 1984; Bingman et coll., 1985). De plus, nos résultats vont dans le même sens à ce qui a été retrouvé chez la souris en ce qui concerne la présence de transcrits dans les cellules de l'aire septale ainsi que dans la bande diagonale de Broca (souris: Stoykova & Gruss, 1994). Le n. septal est rattaché à des fonctions autonomes et à des réactions comportementales principalement impliquées dans la procréation de l'espèce (MacLean, 1973).

Dans les régions basales du télencéphale du poulet embryonnaire âgé de 15 jours, nous observons que les cellules du tubercule olfactif expriment fortement *Pax-6*. Néanmoins, chez la souris les auteurs Walther et Gruss (1991) ne décrivent aucun transcrit dans la région basale du télencéphale. Concernant les bulbes olfactifs retrouvés dans le télencéphale rostroventral les auteurs décrivent un haut degré de transcrits de *Pax-6* chez la souris (Walther & Gruss, 1991), et nous en avons de même observé chez le poulet. Il existe chez les Oiseaux une région possiblement d'origine palliale, l'aire corticoidea dorsolateralis, où une population de cellules expriment *Pax-6*, on ignore cependant jusqu'à maintenant son équivalence chez le système cortical mammalien.

Dans le corps principal du télencéphale, dans l'aire néostriatale incluant l'ectostriatum, nous retrouvons chez le poulet très peu de transcrits marqués à la diaminobenzidine. Le néostriatum reçoit des projections visuelles provenant du thalamus dorsal plus particulièrement du DLP (Gamelin & Cohen, 1982). L'ectostriatum pour sa part, reçoit des projections du noyau Rt (Karten & Hodos, 1970), faisant partie du système visuel tectofuge

aviaire. Par ailleurs, ces deux différentes voies de projections équivaleraient dans leur ensemble aux voies visuelles extragéniculées mammaliens (Miceli et coll., 1990).

### *Diencephale*

Le domaine d'expression s'étend du télencéphale jusque dans le diencephale à une limite caudale de la commissure postérieure, laquelle délimite la frontière entre le diencephale et le mésencéphale. Cette limite caudale persiste tout au long du développement. L'expression retrouvée dans le diencephale de poulet est observée en majorité dans le thalamus ventral, plus particulièrement dans les noyaux GLv, ICT et DSV. L'expression chez la souris autour du même stade étudié chez le poulet est aussi retrouvée en plus grande partie dans le thalamus ventral notamment dans des régions débutant leur différenciation soient la zona incerta ainsi que les noyaux réticulaire et entopédunculaire de même que les noyaux du complexe basolatéral amygdalien (Altman & Bayer, 1988). Une seconde limite à l'intérieur du diencephale correspondant chez la souris au sulcus diencephalicus medius (Niimi et coll., 1962) sépare le thalamus ventral du thalamus dorsal. L'expression de *Pax-6* dans le thalamus dorsal est cependant moins répandue chez les deux espèces. Par exemple, chez le poulet, nous avons retrouvé un léger marquage dans le n. DLL, qui constitue une région importante dans les projections des voies visuelles. Pour le cas de la souris, l'expression est restreinte dans une fine couche de cellules juxtaposées à la zona limitans (Stoykova & Gruss, 1994). Il existe aussi une structure diencephalique commune aux Oiseaux et aux Mammifères, le n. habenulae, où l'on retrouve également des ARNm de *Pax-6* (souris: Walther & Gruss, 1991). Localisés près de la ligne médiane dans le diencephale ventral, nous retrouvons chez le poulet dans la région de l'hypothalamus des transcrits d'ARNm du gène *Pax-6*, notamment pour les n. LHy et SCI et chez la souris, les auteurs décrivent l'expression dans la zone pré optique de l'hypothalamus (Walther & Gruss, 1991).

### *Mésencéphale*

À la limite diencephalique/mésencéphalique, nous retrouvons une expression dans une structure importante prétectale chez les Oiseaux, le n. principalis precommissuralis de même une expression similaire a été décrite dans une région précommissurale prétectale chez la souris (Stoykova & Gruss, 1994).

C'est au niveau du tectum optique que nous observons les plus grandes inégalités au niveau de l'expression du gène *Pax-6* entre le poulet et la souris. En effet, contrairement à la souris, chez le poulet, nous observons des transcrits de *Pax-6* distribués de façon homogène dans les couches superficielles du tectum, notamment les couches 2 à 7 et de façon plus intense dans les couches profondes 8, 13 et 14. Chez la souris, aucune étude ne décrit jusqu'à maintenant l'expression en employant la sonde *Pax-6* au niveau du colliculus supérieur (homologue du tectum optique). C'est au niveau des couches superficielles qu'arrivent les projections nerveuses provenant de la rétine de l'oeil contralatéral. Quant aux couches profondes, elles sont réputées d'être polysensorielles et impliquées notamment dans l'intégration sensori-motrice (Karten & Hodos, 1970) par leurs connections avec des structures visuomotrices du tronc cérébral. De plus, contrairement à la souris, nos résultats démontrent la présence de l'expression du gène *Pax-6* dans les noyaux isthmiques Imc et Ipc. Nous pouvons tenter d'expliquer ces différences par le fait que certains auteurs considèrent que les couches profondes aviaires de même que les noyaux isthmiques seraient d'origine tegmental plutôt que tectal (Karten, 1969). Stoykova et Gruss (1994) décrivent chez la souris une expression au niveau du tegmentum pour le gène *Pax-6*. Or dans ce cas, il n'existerait pas de différence à ce niveau entre les deux espèces étudiées. Une autre explication peut être proposée suggérant que malgré les ressemblances observées dans le développement du système nerveux central, il existe de grosses différences structurales au niveau de l'encéphale du poulet et de la souris. Par exemple, en ce qui concerne le système visuel chez les

Mammifères, l'ascension progressive des centres se serait traduite par le développement d'un important cortex visuel hautement stratifié aux dépens du colliculus supérieur qui quant à lui, aurait régressé dans sa taille relative et dans sa complexité d'organisation laminaire. Par ailleurs, concernant l'encéphale non-mammalien, le toit optique représenterait la structure visuelle la plus "élevée" et, par conséquent assumerait une gamme de fonctions, notamment celles attribuées généralement au système géniculo-strié mammalien (Güntürkün, 1991). Ce qui pourrait être une autre explication pour justifier les différences de l'expression du gène retrouvée au niveau du toit optique entre le poulet et la souris. Et finalement, en ce qui concerne les différences observées au niveau des couches superficielles, elles pourraient s'expliquer par une partie de séquence commune entre la sonde *Pax-6* que nous avons utilisée et la sonde *Pax-7*. En effet, certains auteurs décrivent, comme ce que nous avons observé, la présence d'une expression au niveau des couches superficielles et profondes du tectum optique, mais lorsqu'ils utilisent cependant la sonde *Pax-7* (Stoykova & Gruss, 1994).

### *Rhombencéphale*

Nos résultats d'hybridation *in situ*, nous permettent d'observer l'expression du gène *Pax-6* dans le tegmentum pontique ventrolatéral de l'embryon de poulet et notamment dans une population de cellules présumées d'être dopaminergiques (Medina & Reiner, 1994) situées dans le TPc. Les cellules dans cette région chez l'Oiseau se projettent ipsilatéralement au télencéphale notamment dans le septum et l'archistriatum (Kitt & Brauth 1980), le paléostriatum (Brauth et coll., 1978; Lewis et coll., 1981) et l'hyperstriatum (Kitt & Brauth 1980; Miceli et coll., 1983). Basées sur des observations neuroanatomiques et histochimiques, le n. TPc qui est une source majeure de projections striatales, correspondrait à la substance noire des Mammifères (Brauth et coll., 1978) et dont des transcrits de *Pax-6* sont également observés chez la souris (Stoykova & Gruss, 1994). La substance noire chez les mammifères contient aussi des neurones dopaminergiques (Lindvall & Björklund, 1983;

Kalsbeeck et coll., 1992). Bien qu'il soit difficile d'assigner le destin d'une cellule par sa voie d'expression, ce résultat suggère que le gène *Pax-6* pourrait être impliqué dans quelques aspects de la différenciation des neurones hydroxylase-immunoréactifs (Stoykova & Gruss, 1994).

Nous observons aussi d'autres groupes de cellules exprimant *Pax-6* retrouvés dans l'aire du raphé dorsal, notamment dans les noyaux AnI, DBC et dans la région du ZpFLM. On retrouverait une projection bilatérale sur le télencéphale provenant des noyaux AnI, LC et ZpFLM (Miceli & Repérant, 1985). Ces trois structures sont considérées comme étant le foyer sérotoninergique de l'encéphale (Ikeda & Gotoh, 1971; Dubé & Parent, 1981; Challet et coll., 1996). Nos résultats, démontrent aussi des transcrits de *Pax-6* dans LoC du poulet qui contient un groupe de cellules catécholaminergiques du tegmentum dorsolateral. Cette structure est comparée chez la souris au locus coeruleus (Ikeda & Gotoh, 1971; Tohyama et coll., 1974) contenant aussi des ARNm *Pax-6* (Stoykova & Gruss, 1994). Chez les Oiseaux, le LoC se projette bilatéralement sur des structures télencéphaliques, notamment HA, HIS, HD ainsi que vers l'ectostriatum, le paleostriatum augmentatum, le paleostriatum primitivum, le neostriatum (Miceli & Repérant, 1985) ainsi que l'aire parahippocampique (Casini et coll., 1986).

L'expression du gène *Pax-6* observée chez l'embryon de la souris par Stoykova et Gruss (1994) au niveau du pont et du bulbe rachidien se situe au niveau des noyaux pontiques cérébelleux profonds et olivaires, ainsi qu'au niveau des noyaux réticulotegmentum, vestibulaire et hypoglossal prepositus. Le patron de distribution que nous avons observé chez l'embryon de poulet correspond aussi à ces structures. De plus, nous observons que le gène *Pax-6* est exprimé autant chez le poulet que chez la souris (Stoykova et Gruss, 1994) dans la zone ventriculaire ainsi que dans la couche externe



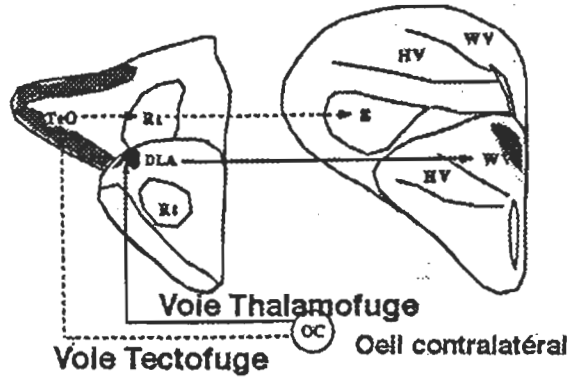
germinale du cervelet embryonnaire. La couche germinale formera ultérieurement chez l'adulte la couche granulaire du cervelet.

#### 4.3 Parallèle entre les structures exprimant le gène *Pax-6* et le système visuel aviaire

Nous avons décrit précédemment qu'un ancêtre collectif du gène *Pax-6* serait impliqué dans le développement primitif du système visuel et jouerait un rôle dans l'arrangement spatial et l'organisation des régions neurales. Nous tenterons donc ici d'établir un parallèle entre les régions exprimant le gène *Pax-6* chez l'embryon de poulet et les structures impliquées dans les projections des voies visuelles chez l'Oiseau. La majorité des auteurs s'accordent aujourd'hui pour reconnaître chez les oiseaux et les reptiles l'existence de deux systèmes visuels télencéphalopètes. Ces systèmes sont présentés souvent comme étant, thalamofuge et tectofuge respectivement ou encore comme des voies visuelles néopalléales (Belakhova & Vesselkin, 1985; Miceli et coll., 1990; Repérant et coll., 1994; Bulter, 1994a, b). La voie rétino-thalamo-télencéphalique chez l'Oiseau serait l'analogue du système géniculostrié visuel des Mammifères (Karten et coll., 1973; Miceli et coll., 1979; Miceli & Repérant, 1982; Bagnoli & Burhalter, 1983; Güntürkün et coll., 1993). Brièvement, l'organisation de la voie visuelle thalamofuge aviaire se décrit comme suit: les cellules rétinales de l'oeil contralatéral se projettent dans le complexe du n. thalamus dorsolateral et subséquentement se dirigent vers une zone distincte du télencéphale appelée le Wulst visuel et plus spécifiquement, dans l'hyperstriatum accessorium (fig. 12) qui, dans notre cas, est pourvu de transcrits de *Pax-6*. Cette région du Wulst constitue le site de projections visuelles hyperstriatales de la voie thalamofuge selon les auteurs Perisic et coll. 1971; Wilson, 1980; Denton, 1981. Une seconde composante du thalamus dorsal reçoit aussi des projections rétinienne et se projette au complexe hippocampique (HP-AP) (Trottier et coll., 1995) où l'on observe de même des transcrits de *Pax-6*. En ce qui concerne la voie

tectofuge, les projections des cellules rétiniennes de l'oeil contralatéral sont directement transmises jusqu'aux couches superficielles du tectum optique (fig. 12) pour lesquelles nous retrouvons des transcrits de *Pax-6* (fig. 10). Subséquentement, les projections passent par le n. rotundus du thalamus et les fibres efférentes aboutissent jusqu'à l'ectostriatum ipsilatéral du télencéphale.

Il existe aussi des projections extratélencéphaliques du Wulst sur le mésencéphale et le diencéphale (fig. 12). Nous avons observé par la technique d'hybridation *in situ* que plusieurs de ces structures expriment le gène *Pax-6*, notamment au niveau du thalamus dorsal, le n. DLLd; au niveau du thalamus ventral, les noyaux ICT et GLv (fig. 9 b); au niveau de certains noyaux du prétectum dont le PPC; et finalement, le Wulst visuel se projette sur les couches superficielles (2 à 7) et profondes (12 et 13) du toit optique dans lesquelles nous observons des transcrits de *Pax-6* (fig. 10). Une représentation schématique à la figure 12 résume les régions marquées qui jouent aussi un rôle dans les projections visuelles chez l'Oiseau.



Projections extratélencéphaliques du Wulst

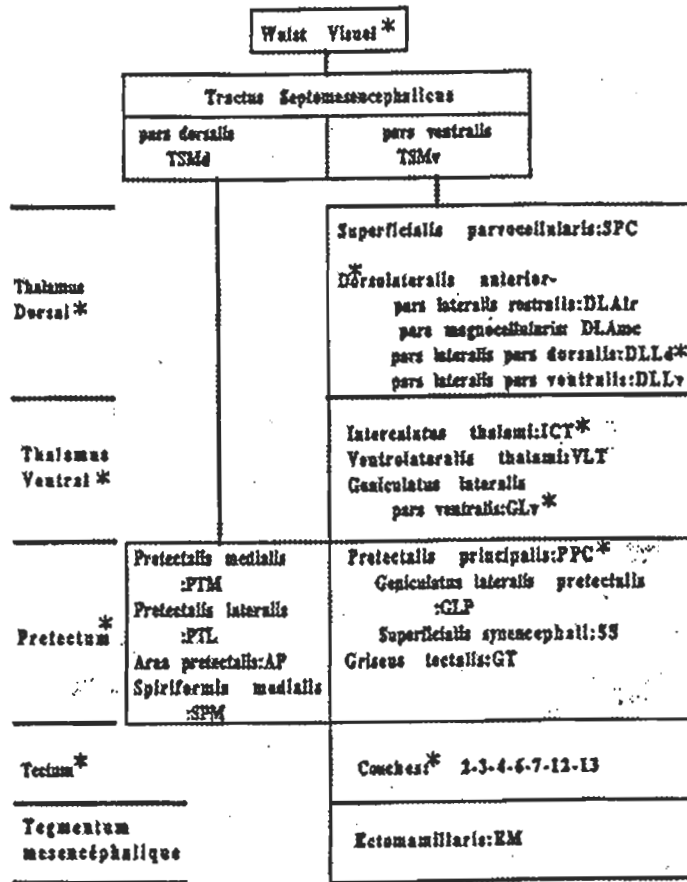


Figure 12. Projections des voies visuelles chez l'Oiseau. (Les régions ombragées ainsi que les \*, représentent les régions exprimant le gène *Pax-6*.)

## CONCLUSION

Le but poursuivi par cette étude était de déterminer et de localiser l'expression du gène homéotique *Pax-6* dans l'encéphale de l'embryon de poulet au cours du développement.

Les résultats obtenus par la technique de Northern blot, nous permettent d'établir que le gène s'exprime tout au long du développement de l'encéphale ce qui suggère que *Pax-6* joue un rôle dans la formation morphogénique, la régionalisation et la subdivision de l'encéphale et plus tardivement, dans la différenciation de cellules spécialisées.

Les résultats obtenus par la technique de l'hybridation *in situ*, nous permettent de localiser les régions exprimant le gène *Pax-6* dans l'encéphale de poulet âgé de 15 jours embryonnaires. Les données démontrent qu'il existe un patron d'expression semblable du gène *Pax-6* dans différentes structures au cours du développement de l'encéphale de poulet comparé à celui décrit chez la souris. Nous pouvons donc appuyer à la lumière de nos résultats que l'expression de l'homéogène *Pax-6* est conservée entre ces deux groupes de Vertébrés. Par ailleurs, d'après l'inventaire des structures exprimant le gène *Pax-6*, plusieurs sont impliquées dans les voies de projections visuelles chez l'Oiseau suggérant également un rôle important au gène dans le développement du système visuel.

## BIBLIOGRAPHIE

- Altman, J. & Bayer, S. A. (1988). Development of the rat thalamus. I. Mosaic organization of the thalamic neuroepithelium., *Journal of Comparative Neurology*, 275, 346-377.
- Arbas, E. A., Meinertzhagen, I. A. & Shaw, S. R. (1991). Evolution in nervous systems., *Annual Review of Neuroscience*, 14, 9-38.
- Auerbach, R. (1954). Analysis of the developmental effects of a lethal mutation in the house mouse., *Journal of Experimental Zoology*, 127, 305-329.
- Bagnoli, P. & Burkhalter, A. (1983). Organization of the afferent projections to the Wulst in the pigeon., *Journal of Comparative Neurology*, 214, 103-113.
- Baldwin, C. T., Hoth, C. F., Amos, J. A., da-Silva, E. O. & Milunsky, A. (1992). An exonic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg's syndrome., *Nature*, 355, 637-638.
- Balling, R., Deutsch, U. & Gruss, P. (1988). Undulated, a mutation affecting the development skeleton, has a point mutation in the paired box of Pax 1., *Cell*, 55, 531-535.
- Balling, R., Mutter, G., Gruss, P. & Kessel, M. (1989). Craniofacial abnormalities induced by ectopic expression of the homeobox gene Hox-1.1 in transgenic mouse., *Cell*, 58, 337-347.
- Bally-Cuif, L. *Les gènes du développement*. Nathan Université, Paris, 1995, 127 pages.
- Barnes, G. L., Hsu, C. W., Mariani, B. D. & Tuan, R. S. (1996). Chicken Pax-1 gene: structure and expression during embryonic somite development., *Differentiation*, 61, 13-23.
- Baumgartner, S., Bopp, D., Burri, M. & Noll, M. (1987). Structure of two genes at the gooseberry locus related to the paired gene and their spatial expression during embryogenesis., *Genes and Development*, 1, 1247-1267.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormone., *Cell*, 56, 335-344.
- Belakhova, M. G. & Vesselkin, N. P. (1985). Telencephalisation and transfer of function in the central nervous system of Vertebrates in light and current data., *Journal of Evolution Biochemical and Physiology (Leningrad)*, 21, 531-541.
- Bertuccioli, C., Fasano, L., Jun, S., Wang, S., Sheng, G. & Desplan, C. (1996). In vivo requirement for the paired domain and homeodomain of the paired segmentation gene product., *Development*, 122, 2673-2685.

- Bingman, V. P., Bagnoli, P., Ioalé, P. & Casini, G. (1984). Homing Behaviour of pigeons after telencephalic ablations., *Brain Behaviour Evolution*, 24, 94-108.
- Bingman, V. P., Ioalé, P., Casini, G. & Bagnoli, P. (1984). Dorsomedial forebrain ablations and home loft association behavior in homing pigeons., *Brain Behavior and Evolution*, 26, 1-9.
- Bober, E., Franz, T., Arnold, H. H., Gruss, P. & Tremblay, P. (1994). Pax3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells., *Development*, 120, 603-612.
- Bopp, D., Burri, M. & Baumgartner, S. (1986a). Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of drosophila., *Cell*, 47, 1033-1040.
- Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G. & Noll, M. (1986b). Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of Drosophila., *Cell*, 47, 1033-1040.
- Brauth, S. E., Ferguson, J. L. & Kitt, C. A. (1978). Prosencephalic pathways related to the paleostriatum of the pigeon *Columbia livia*., *Brain Research*, 147, 205-221.
- Bulter, A. B. (1994a). The evolution of the dorsal thalamus of jawed vertebrates, including mammals: cladistic analysis and a new hypothesis., *Brain Research Review*, 19, 29-65.
- Bulter, A. B. (1994b). The evolution of the dorsal pallium in the telencephalon of amniotes: cladistic analysis and a new hypothesis., *Brain Research Review*, 19, 66-101.
- Burri, M., Tromvoukis, Y., Bopp, D., Frigerio, G. & Noll, M. (1989). Conservation of the paired domain in the metazoans and its structure in three isolated human genes., *EMBO Journal*, 8, 1183-1190.
- Cai, J., Lan, Y., Appel, L. F. & Weir, M. (1994). Dissection of the Drosophila paired protein: functional requirements for conserved motifs., *Mechanisms of Development*, 47, 139-150.
- Cajal, S. & Ramon y (1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des Vertébrés*. Paris: Maloine.
- Callaerts, P., Halder, G. & Gehring, W.J. (1997). Pax-6 in development and evolution., *Annual Review of Neuroscience*, 20, 483-532.
- Capovilla, M., Brandt, M. & Botas, J. (1994). Direct regulation of decapentaplegic by Ultrabithirax and its role in Drosophila midgut morphogenesis., *Cell*, 76, 461-475.
- Casini, G., Bingman, V. P. & Bagnoli, P. (1986). Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and 3H proline., *Journal of Comparative Neurology*, 245, 454-470.
- Chalepakis, G., Fritsch, R., Fickenscher, H., Deutsch, U., Goulding, M. & Gruss, P. (1991). The molecular basis of the undulated/Pax-1 mutation., *Cell*, 66, 873-884.
- Chalepakis, G., Stoykova, A., Wijnholds, J. & Tremblay, P. (1993). Pax: Gene regulators in the developing nervous system., *Journal of Neurobiology*, 24, 1367-1384.

- Chalepakis, G., Wijnholds, J., Giese, P., Schachner, M. & Gruss, P. (1994). Characterization of Pax-6 and Hoxa-1 binding to the promoter region of the neural cell adhesion molecule L1., *DNA and Cell Biology*, 13, 891-900.
- Challet, E., Miceli, D., Pierre, J., Repérant, J., Masicotte, G., Herbin, M. & Vesselkin, N. P. (1996). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the brain of the pigeon (*Columba livia*)., *Anatomy and Embryology*, 193, 209-227.
- Cheyette, B. N. R., Green, P. J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V. & Zipursky, S. L. (1994). The *Drosophila sine oculis* locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system., *Neuron*, 12, 977-996.
- Chisaka, O. & Capecchi, M. R. (1991). Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*., *Nature*, 350, 473-479.
- Chisholm, A. D. & Horvitz, H. R. (1995). Patterning of the *Caenorhabditis elegans* head region by the Pax-6 family member *vab-3*., *Nature*, 377, 52-55.
- Cho, K., Morita, E. A., Wright, C. V. & DeRobertis, R. E. M. (1991). Overexpression of a homeodomain protein confers axis-forming activity to uncommitted *Xenopus* embryonic cells., *Cell*, 65, 55-64.
- Cvekl, A., Kashanchi, F., Sax, C. M., Brady, J. N. & Piatigorsky, J. (1995a). Transcriptional regulation of the mouse  $\alpha$ A-Crystallin gene: Activation dependent on a cyclic AMP-responsive element (DE1/CRE) and a Pax-6 binding site., *Molecular Cellular Biology*, 15, 653-660.
- Cvekl, A., Sax, C. M., Bresnick, E. H. & Piatigorsky, J. (1994). A complex array of positive and negative elements regulate the chicken  $\alpha$ A-Crystallin gene: involvement of Pax-6, USF, CREB and/or CREM and AP-1 proteins., *Molecular Cellular Biology*, 14, 7363-7376.
- Cvekl, A., Sax, C. M., Li, X., McDermott, J. B & Piatigorsky, J. (1995b). Pax-6 and lens-specific transcription of the chicken  $\delta$ 1-crystallin gene., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 4681-4685.
- Czerny, T. & Busslinger, M. (1995). DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: Three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5)., *Molecular cellular biology*, 15, 2858-2871.
- Czerny, T., Schaffer, G. & Busslinger, M. (1993). DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site., *Genes and Development*, 7, 2048-2061.
- Davis, J. A. & Reed, R. R. (1996). Role of Olf-1 and Pax-6 transcription factors in neurodevelopment., *The Journal of Neuroscience*, 16(16), 5082-5094.
- Del Rio-Tsonis, K., Washabaugh, C. H. & Tsonis, P. A. (1995). Expression of *pax-6* during urodele eye development and lens regeneration., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 5092-5096.
- Denton, C. J. (1981). Topography of the hyperstriatal visual projection area in the young domestic chicken., *Experimental Neurology*, 196, 695-708.
- Deutsch, U. & Gruss, P. (1991). Murine paired domain protein as regulatory factors of embryonic development., *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2, 413-424.

- Dressler, G. R. & Douglass, E. C. (1992). Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 1179-1183.
- Dressler, G. R. & Gruss, P. (1988). Do multigene families regulate vertebrate development?, *Trends Genetics*, 4, 214-219.
- Dressler, G. R., Deutsch, U., Balling, R., Simon, D., Guenet, J.-L. & Gruss, P. (1988). Murine genes with homology to Drosophila segmentation genes., *Development*, 104 (Supplement), 181-186.
- Dressler, G. R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H. O. & Gruss, P. (1990). Pax-2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system., *Development*, 109, 787-795.
- Dubé, L. & Parent, A. (1981). The monoamine-containing neurons in avian brain : A study of the brainstem of the chicken *Gallus domesticus* by means of fluorescence and acetylcholine-esterase histochemistry., *The Journal of Comparative Neurology*, 196, 695-708.
- Ebensperger, C., Wilting, J., Brand-Saberi, B., Mizutani, Y., Christ, B., Balling, R. & Koseki, H. (1995). Pax-1, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and floor plate signals in avian embryos., *Anatomy and Embryology*, 191, 297-310.
- Epstein, D. J., Malo, D., Vekemans, M. & Gros, P. (1991b). Molecular characterisation of a deletion encompassing the splotch (Sp) mutation on chromosome 1., *Genomics*, 10, 89-93.
- Epstein, D. J., Vekemans, M. & Gros, P. (1991a). Splotch (sp2h), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3., *Cell*, 67, 767-774.
- Epstein, D. J., Vogan, K. J., Trasler, D. G. & Gros, P. (1993). A mutation within intron 3 of the Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (sp) mouse mutant., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 532-536.
- Epstein, J. A., Cai, J., Glasser, T., Jepeal, L. & Maas, R. (1994a). Identification of a Pax-paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes., *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 8355-8361.
- Epstein, J. A., Glasser, T., Cai, J., Jepeal, L., Walton, D. & Maas, R. (1994b). Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax-6 paired domain are regulated by alternative splicing., *Genes and Development*, 8, 2022-2034.
- Fan, C. M., Porter, J. A., Chiang, C., Chang, D. T., Beachy, P. A. & Tessier-Lavigne, M. (1995). Long-range sclerotome development is induced by sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway., *Cell*, 81, 457-465.
- Franz, T. (1989). Persistent truncus arteriosus in the Splotch mutant mouse., *Anatomy and Embryology*, 180, 457-464.
- Franz, T. (1990). Defective ensheathment of mitotic nerves in the Splotch mutant mouse., *Acta Anatomica*, 138, 246-253.



- Franz, T., Kothary, R., Surani, M. A. H. & Grim, M. (1993). The Splotch mutation interferes with muscle development in the limbs., *Anatomy and Embryology*, 187, 153-160.
- Gaffan, D. (1972). Loss of recognition memory in rats with lesions of the fornix., *Neuropsychology*, 10, 327-341.
- Gamelin, P. D. R. & Cohen, D. H. (1982). A possible second ascending avian tectofugal pathway., *Society of Neuroscience Abstracts*, 8, 206.
- Gérard, M., Abitbol, M., Delozoide, A.-L., Duffier, J.-L., Mallet, M. & Vekemans, M. (1995). PAX-genes expression during human embryonic development, a preliminary report., *Comptes Rendues de l'Académie des Sciences*, Paris, 318, 57-66.
- Glaser, T., Walton, D. S. & Maas, R. L. (1992). Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene., *Nature Genetics*, 2, 232-239.
- Goulding, M. D., Chalepkis, G., Deutsch, U., Erselius, J. R. & Gruss, P. (1991). Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis., *EMBO Journal*, 10, 1135-1147.
- Goulding, M. D., Lumsden, A. & Gruss, P. (1992). Signal from the notochord and floor plate regulate the region specific expression of two Pax-genes in the developing spinal cord., *Development*, 117, 1001-1016.
- Goulding, M. D., Sterrer, S., Fleming, J., Balling, R., Nadeau, J., Moore, K., Brown, S. D. M., Steel, K. P. & Gruss, P. (1993). Analysis of the Pax-3 gene in the mouse mutant splotch., *Genomics*, 17, 355-363.
- Goulding, M., Lumsden, A. & Paquette, A. J. (1994). Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development., *Development*, 120, 957-971.
- Grainger, R. M. (1996). New perspectives on embryonic lens induction., *Cell & Developmental Biology*, 7, 149-155.
- Grindley, J. C., Davidson, D. R. & Hill, R. E. (1995). The role of Pax-6 in eye and nasal development., *Development*, 121, 1433-1442.
- Grüneberg, H. (1950). Genetical studies on the skeleton of the mouse. II. Undulated and its modifiers., *Journal of Genetics*, 50, 142-173.
- Grüneberg, H. (1954). Genetical studies on the skeleton of the mouse. XII. the development of undalated., *Journal of Genetics*, 52, 441-455.
- Gruss, P. & Walther, C. (1992). Pax in development., *Cell*, 69, 719-722.
- Güntürkün, O. (1991). *The functional organization of the avian visual system*. In Andrew, R. J. (Éd.), *Neural and behavioural plastic*. New York: University Press, 92-105.
- Güntürkün, O., Miceli, D. & Watanabe, M. (1993). Anatomy of the avian thalamofugal pathway. In Zeigler, H. P. Bischof, H. J. (Ed) *Vision, Brain and Behavior in Birds*. Cambridge: The MIT Press, 115-135.
- Halder, G., Callaerts, P. & Gehring, W. J. (1995a). Induction of ectopic eyes by targeted expression of eyeless gene in *Drosophila*., *Science*, 267, 1788-1792.

- Halder, G., Callaerts, P. & Gehring, W. J. (1995b). New perspectives on eye evolution., *Current Opinion in Genetics and Development*, 5, 602-609.
- Hanes, S. D. & Brent, R. (1989). DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9., *Cell*, 57, 1275-1283.
- Hanson, I. M. & van Heyningen, V. (1995). Pax6: more than meets the eye., *Trends Genetics*, 11, 268-272.
- Harvey, R. P. & Melton, D. A. (1988). Microinjection of synthetic Xhox-1a homeobox mRNA disrupts somite formation in developing *Xenopus* embryos., *Cell*, 53, 687-697.
- Herr, W., Strum, R. A., Clerc, R. G., Corcoran, L. M., Baltimore, D., Sharp, P. A., Ingraham, H. A., Rosenfeld, M. G., Finney, M., Ruvkin, G. & Horticz, H. R. (1988). The POU domain; a large conserved region in the mammalian Pit-1, Oct-1, Oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products., *Genes and Development*, 2, 1513-1516.
- 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. & van Heyningen, V. (1991). Mouse Small eye results from mutations in paired-like homeobox-containing gene., *Nature*, 354, 522-525.
- Hirsch, J. A. & Aggarwal, A. K. (1995). Structure of the even-skipped homeodomain complexed to AT-rich DNA: new perspectives on homeodomain specificity., *EMBO Journal*, 14, 6280-6291.
- Hirth, F., Therianos, S., Loop, T., Gehring, W.J., Reichert, H. & Furukubo-Tokunaga, K. (1995). Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes orthodenticle and empty spiracles in *Drosophila*., *Neuron*, 15, 769-778.
- Hitchcock, P. F., MacDonald, R. E., VanDeRyt, J. T. & Wilson, S.W. (1996). Antibodies against Pax6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in normal and regenerating retina of the goldfish., *Journal of Neurobiology*, 29, 399-413.
- Hoth, C., Milunsky, A., Lipsky, N., Sheffer, R., Clarren, S. K. & Baldwin, C. T. (1993). Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg Syndrome (WS-III) as well as Waardenburg Syndrome Type I (WS-I)., *American Journal of Human Genetics*, 52, 455-462.
- Ikeda, H. & Gotoh, J. (1971). Distribution of monoamine-containing cells in the central nervous system of the chicken., *Japanese Journal of Pharmacology*, 21, 763-784.
- Jun, S. & Desplan, C. (1996). Cooperative interaction between paired domain and homeodomain., *Development*, 122, 2639-2650.
- Kalsbeek, A., Voorn, P. & Buijs, R. (1992). *Development of dopamin-containing system in CSN*. In: Björklund, A., Hökfelt, T. & Toyama, A. (Éd.), *Handbook of chemical neuroanatomy* (Vol. 10). New York: Elsevier.
- Kaplan, J.-C. & Delpech, M. *Biologie moléculaire et médecine* (2e ed.). Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 1989.
- Karten, H. J. & Hodos, W. (1967). *A stereotaxis atlas of the brain of the pigeon (Columba livia)*. Baltimore, Maryland: John Hopkins Press.

- Karten, H. J. & Hodos, W. (1970). Telencephalic projections of the nucleus rotundus in the pigeon (*Columba livia*)., *Journal of Comparative Neurology*, 140, 35-52.
- Karten, H. J., Hodos, W., Nauta, W. J. H. & Revzin, A. M. (1973). Neural connections of the "visual wulst" of the avian telencephalon. Experimental studies in the pigeon *Columba livia* and owl *Speotyto canicularia*., *Journal of Comparative Neurology*, 150, 253-276.
- Karten, H.J. (1969). The organisation of the avian telencephalon and some speculation on the phylogeny of the amniote telencephalon., *Annual New York Academy of Science*, 167, 164-179.
- Kawakami, A., Kimura-Kawakami, M., Nomura, T. & Fujisawa, H. (1997) Distribution of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development., *Mechanisms of Development*, 66, 119-130.
- Kessel, M. & Gruss, P. (1990). Murine developmental control genes., *Science*, 249, 374-379.
- Kessel, M., Balling, R. & Gruss, P. (1990). Variation of cervical vertebrae after expression of a Hox-1.1 transgene in mice., *cell*, 61, 301-308.
- Kimmel, C. B. (1989). Genetics and early development of zebrafish., *Trends Genetics*., 5, 283-288.
- Kioussi, C. & Gruss, P. (1994). Differential induction of Pax genes by NGF and BDNF in cerebellar primary cultures., *Journal Cell Biology*, 125, 417-425.
- Kioussi, C. & Gruss, P. (1996). Making of a Schwann. *Trends in Genetics*, 12, 84-86.
- Kissinger, C. R., Liu, B., Martin-Blanco, E., Kornberg, T. B. & Pabo, C. O. (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions., *Cell*, 63, 579-590.
- Kitt, C. A. & Brauth, S. E. (1980). Telencephalic projections from catecholamine cell groups in the pigeon., *Society for Neuroscience Abstracts*, 6, 630.
- Klemm, J. D., Rould, M. A., Aurora, R., Herr, W. & Pabo, C. O. (1994). Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules., *Cell*, 77, 21-32.
- Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V. & Fjose, A. (1991a). Expression of the zebrafish paired box gene pax [zb-b] during early embryogenesis., *Development*, 113, 1193-1206.
- Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V. & Fjose, A. (1991c). Expression pattern of zebrafish pax genes suggests a role in early brain regionalization., *Nature*, 353, 267-270.
- Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V., Moens, U., Ericson, J. U. & Fjose, A. (1991b). Zebrafish pax [zf-a] a paired box-containing gene expresses in the neural tube., *EMBO Journal*, 10, 3609-3619.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F. & McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins., *Science*, 245, 635-367.
- Lewis, J. W., Ryan, S. M., Arnold, A. P. & Butcher, L. L. (1981). Evidence for a catecholaminergic projection to area X in the zebra finch., *Journal of Comparative Neurology*, 196, 347-354.

- Li, H.-S., Yang, J.-M., Jacobson, R. D., Pasko, D. & Sundin, O. (1994). Pax-6 is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: Implication for stepwise determination of the lens., *Development*, 162, 181-194.
- Lindvall, A. & Björklund, A. (1983). Dopamine- and norepinephrine-containing neuron system: their anatomy in the brain. In: Emson, P. C. (Éd.), *Chemical neuroanatomy*, New York: Raven, 229-256.
- Loosli, F. (1995). *Cloning Lineus sanguineus homologous to Pax-6*. PhD thesis. Biozentrum Basel University.
- Loosli, F., Kmita-Cunisse, M. & Gehring, W. J. (1996). Isolation of Pax-6 homolog from the ribbonworm *Lineus sanguineus*., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 2658-2663.
- MacLean, P. D. (1973). *A triune concept of the brain and behaviour*. Hincks memorial lectures (Boag, T., Campbell, D. eds). Toronto: University of Toronto.
- Mansouri, A., Hallonet, M. & Gruss, P. (1996). Pax genes and their roles in cell differentiation and development., *Current Opinion in Cell Biology*, 8, 851-857.
- Mansouri, A., Stoykova, A., Torres, M. & Gruss, P. (1996). Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7-I- mutant mice., *Development*, 122, 831-838.
- Mansouri, A., Stykova, A. & Gruss, P. (1994). Pax genes in development., *Journal of Cell Science*, 18 (supplement), 35-42.
- Martin, P., Carrière, C., Dozier, C., Quatannens, B. & Mirabel, M. A. (1992). Characterization of a paired box- and homeobox-containing quail gene (Pax-QNR) expressed in the neuroretina., *Oncogene*, 7, 1721-1728.
- Matsuo, T., Osumi-Yamshita, N., Noji, S., Ohuchi, H., Koyama, E., Myokai, F. & Matuso, N. (1993). A mutation in the Pax-6 gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells., *Nature Genetics*, 3, 299-304.
- Maulbecker, C. C. & Gruss, P. (1993). The oncogenic potentiel of Pax genes., *EMBO Journal*, 12, 2361-2367.
- Maulbecker, K. & Gruss, P. (1993). The oncogenic potentiel of Pax genes., *EMBO Journal*, 12, 2361-2367.
- McMahon, A. P. & Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain., *Cell*, 62, 1073-1085.
- Medina, L. & Reiner, A. (1994). Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain., *Journal of Comparative Neurology*, 342, 497-537.
- Miceli, D. & Répenrant, J. (1985). Telencephalic afferent projections from the diencephalon and brainstem in the pigeon. A retrograde multiple-label fluorescent study., *Experimental Biology*, 44, 71-99.
- Miceli, D. & Repérant, J. (1982). Thalamo-hyperstriatal projections in the pigeon (*Columba livia*) as demonstrated by retrograde double-labeling with fluorescent tracers., *Brain Research*, 245, 365-371.

- Miceli, D., Gioanni, H., Repérant, J. & Peyrichoux, J. (1979). The avian visual wulst: I. An anatomical study of afferent and efferent pathways. II. An electrophysiological study of the functional properties of single neurons. In: Granada, A. M. & Maxwell, J. H. (Ed.), *Neural mechanisms of behavior in the pigeon* (13). New York: Plenum, 223-254.
- Miceli, D., Marchand, L., Repérant, J. & Rio, J. P. (1990). Projections of the dorsolateral anterior complex and adjacent thalamic nuclei upon the visual Wulst in the pigeon., *Brain Research*, 518, 317-323.
- Miceli, D., Repérant, J., Pito, M. & Weidner, C. (1983). Les structures à projection télencéphalique chez le pigeon. Identification par marquage à la peroxydase du Raifort., *Journal für Hirnforsch*, 24, 437-446.
- Moase, C. E. & Trasler, D. G. (1989). Spinal ganglia reduction in the Splotch-delayed mouse neural tube defect mutant., *Teratology*, 40, 67-75.
- Moase, C. E. & Trasler, D. G. (1990). Delayed neural crest emigration from Sp and Spd mouse neural tube explants., *Teratology*, 42, 171-182.
- Morrel, R., Friedman, T., Moeljopawiro, S., Hortono, Soewito & Asher, J. (1992). A frameshift mutation in the HuP2 paired domain of the probable human homolog of the murine Pax3 is responsible for Waardenburg syndrome type I in an Indonesian family., *Human Molecular Genetics*, 1, 243-247.
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Candy, M., Jan, L. Y., Yan, Y. N. & Cabrera, D. (1989). Interaction between heterologous helix-loop-helix proteins generated complexes that bind specifically to a common DNA sequence., *Cell*, 58, 537-544.
- Nauta, H. J. W. & Karten, H. J. (1970). *A general profile of the vertebrate brain with sidelights on the ancestry of cerebral cortex*. SCHMITT, F.O.S., Neurosciences, 2nd Study Program. Rockefeller University Press, New York, 7-26.
- Niimi, K., Harada, I., Kusaka, Y. & Kishi, S. (1962). The ontogenetic development of the diencephalon of the mouse., *Tokushima Journal exp. Mes.*, 8, 203-238.
- Nilsson, D.-E. (1996). Eye ancestry: old genes for new eyes., *Current Biology*, 6, 39-425.
- Noll, M. (1993). Evolution and role of Pax genes., *Current Opinion in Genetics and Development*, 3, 595-605.
- O'keefe, J. & Nadel, L. (1979). The hippocampus as a cognitive map., *Behavioral and Brain Sciences*, 2, 487-533.
- Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Gruss, P. (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development., *Development*, 121, 4045-4055.
- Olton, D. S., Becker, J. & Handelmann, G. (1979). Hippocampus, space and memory., *Behavioral and Brain Sciences*, 2, 313-365.
- Otting, G., Qian, Y. Q., Billeter, M., Müller, M., Affolter, M., Gehring, W. J. & Wuthrich, K. (1990). Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution., *EMBO Journal*, 9, 3085-3092.

- Percival-Smith, A., Müller, M., Affolter, M. & Gehring, W. J. (1990). The interaction with DNA of wild-type and mutant fushi tarazu homeodomains., *EMBO Journal*, 9, 3967-3974.
- Percival-Smith, A., Müller, M., Affolter, M. & Gehring, W. J. (1992). Corrigendum., *EMBO Journal*, 11, 382.
- Perisic, M., Mihailovic, J. & Cuénod, M. (1971). Electrophysiology of contralateral and ipsilateral visual projections to the wulst in pigeon (*Columba livia*)., *International Journal of Neuroscience*, 2, 7-14.
- Pilz, A. J., Povey, S., Gruss, P. & Abbott, C. M. (1993). Mapping of the human homologs of the murine paired-box containing genes., *Mammalian Genome*, 4, 78-82.
- Plachov, D., Chowdhury, K., Walther, C., Simon, D., Guénet, J.-L. & Gruss, P. (1990). Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland., *Development*, 110, 643-651.
- Plaza, S., Dozier, C. & Saule, S. (1993). Quail PAX-6 (PAX-QNR) encodes a transcription factor able to bind and Trans-activate its own Promoter., *Cell growth & differentiation*, 4, 1041-1050.
- Plaza, S., Dozier, C., Langlois, M.-C. & Saule, S. (1995a). Identification and characterization of neuroretina-specific enhancer element in the Quail Pax-6 (Pax -QNR) gene., *Molecular and cellular Biology*, 15, 892-903.
- Plaza, S., Dozier, C., Turque, N. & Saule, S. (1995b). Quail Pax-6 (Pax -QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation., *Molecular and cellular Biology*, 15, 3344-3353.
- Plaza, S., Turques, N., Dozier, C., Baily, M. & Saule, S. (1995c). C-Myb acts as transcriptional activator of the quail PAX6 (PAX-QNR) promoter through two different mechanisms., *Oncogene*, 10, 329-340.
- Poleev, A., Fickenscher, H., Mundlos, S., Winterpacht, A., Zabel, B., Filder, A., Gruss, P. & Plachov, D. (1992). Pax8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumor., *Development*, 116, 611-623.
- Pritchard, D. J. & Clayton, R. M. (1974). Abnormal lens capsule carbohydrate associated with the dominant gene small eye in the mouse., *Experimental Eye Research*, 19, 335-340.
- Puelles, L. & Rubenstein, J. L. R. (1993). Expression pattern of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization., *Trends in Neurosciences*, 16, 472-479.
- Puelles, L., Amat, J. A. & Martinez-de-la-Torre, M. (1987). Segment-related, mosaic neurogenetic pattern in the forebrain and mesencephalon of early chick embryos: I Topography of AChE-positive Neuroblasts up to stage HH18., *The Journal of Comparative Neurology*, 266, 247-268.
- Püschel, A. W., Gruss, P. & Westerfield, M. (1992a). Sequence and expression pattern of pax-6 are highly conserved between zebrafish and mice., *Development*, 114, 643-651.
- Püschel, A. W., Westerfield, M. & Dressler, G. R. (1992b). Comparative analysis of Pax-2 protein in distribution during neurulation of mice and zebrafish., *Mechanisms of Development*, 38, 197-208.

- Qian, Y. Q., Billeter, M., Otting, G., Müller, M., Gehring, W. J. & Wüthrich, K. (1989). The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors., *Cell*, 59, 573-580.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. & Gehring, W. (1994). Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and aniridia in human., *Science*, 265, 785-789.
- Rapin, M. *Le Grand Dictionnaire Encyclopédique Médical*. Paris: Médecine-Science, Flammarion, 1986.
- Repérant, J. (1978). *Organisation anatomique du système visuel des Vertébrés. Approche évolutive*. Thèse de Doctorat d'État, Université de Paris.
- Repérant, J., Ward, R., Hergueta, S. & Miceli, D. (1994). A short history of the history of the brain., I: Fedida, P. & Widlöcher, D., *Les Évolutions, Phylogénèse de l'Individuation*. Colloque de la Revue Internationale Psychopathologie, Paris, 111-128.
- Richardson, J., Cvekl, A. & Wistow, G. (1995). Pax-6 is essential for a lens-specific expression of z-crystallin., *Proclamation National*, 92, 4676-4670.
- Romer, A. S. (1964). *The vertebrate body* (3rd ed.). Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Rosenfeld, M. G. (1991). POU-domain transcription factors: POU-er-ful developmental regulators., *Genes and Development*, 5, 897-907.
- Ruiz i Altaba, A. & Melton, D. A. (1989). Involvement of the *Xenopus* homeobox gene *Xhox-3* in pattern formation along the anterior-posterior axis., *Cell*, 57, 317-326.
- Russell, W. L. (1947). *Spotch*, a new mutation in the house mouse *Mus musculus*., *Genetics*, 32, 107.
- Sahgal, A. (1984). Hippocampal lesions disrupt recognition memory in pigeons., *Behavioral and Brain Sciences*, 11, 47-58.
- Sanyanusin, P., Schimmenti, L. A., McNoe, L. A., Ward, T. A., Pierpont, M. E. M., Sullivan, M. J., Dobyns, W. R. & Eccles, M. R. (1995). Mutation of the PAX2 gene in family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux., *Nature Genetics*, 9, 358-363.
- Schier, A. F., & Gehring, W. J. (1992). Direct homeodomain-DNA interaction in the autoregulation of the *fushi tarazu* gene., *Nature*, 356, 804-807.
- Schubert, F.R., Fainsod, A., Gruenbaum, Y. & Gruss, P. (1995). Expression of the novel murine homeobox gene *Sax-1* in the developing nervous system., *Mechanisms of Development*, 51, 99-114.
- Scott, M. P. (1994). Intimations of a creature., *Cell*, 79, 1121-24.
- Scott, M. P., Tamkun, J. W. & Hartzell, G. W. (1989). The structure and function of the homeodomain., *Biochimica et Biophysica Acta*, 989, 25-48.
- Serikaku, M. A. & O'Tousa, J. E. (1994). *Sine oculis* is a homeobox gene required for *Drosophila* visual system development., *Genetics*, 138, 1137-1150.

- Stapleton, P., Weith, A., Uranek, P., Kozmik, Z. & Busslinger, M. (1993). Chromosomal localization of 7 pax genes and cloning of a novel family member., Pax-9., *Nature Genetics*, 3, 292-298.
- Stapleton, P., Weith, A., Urbanek, P., Kozmik, Z. & Busslinger, M. (1993). Chromosomal localisation of seven Pax genes and cloning of a novel family member, Pax-9., *Nature Genetics*, 3, 292-298.
- Stoykova, A. & Gruss, P. (1994). Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression pattern., *The Journal of Neuroscience*, 14, 1395-1412.
- Stoykova, A., Fritsch, R., Walther, C., & Gruss, P. (1996). Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice., *Development*, 122, 3453-3465.
- Strachan, T. & Read, A. P. (1994). PAX genes., *Current Opinion in Genetics and Development*, 4, 427-438.
- Stuart, E. T., Kiousi, C. & Gruss, P. (1993). Mammalian pax genes., *Annual Review of Genetics*, 27, 219-236.
- Tassabehji, M., Read, A. P., Newton, V. E., Harris, R., Balling, R., Gruss, P. & Strach, T. (1992). Waardenburg syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene., *Nature*, 355, 635-636.
- Tohyama, M., Maeda, T., Hashimoto, T., Shnestha, G. R., Tamura, O. & Shimizu, N. (1974). Comparative anatomy of locus cereleus. I. Organization and ascending projection of the catecholamine containing neurons in the pontine region of the bird, *Melopsittacus undulatus*., *Journal für Hirnsforsch*, 15, 319-330.
- Ton, C. C., Hirvonen, H., Miwa, H., Well, M. M., Monaghan, P., Jordan, T., van Heyningen, V., Hastle, N. D., Meijers-Heijboer, J., Drechsler, M., Royer-Pokora, B., Collins, F., Swaroop, A., Strong, L. C. & Saunders, G. F. (1991). Positional cloning and characterization of paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region., *Cell*, 67, 1059-1074.
- Ton, C. C., Miwa, H. & Saunders, G. F. (1992). Small eye (Sey): cloning and characterization of the murine homolog of the human Aniridia gene., *Genomics*, 13, 251-256.
- Treisman, J., Gönczy, P., Vashishtha, M., Harris, E. & Desplan, C. (1989). A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins., *Cell*, 59, 553-562.
- Treisman, J., Harris, E. & Desplan, C. (1991). The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeodomain protein., *Genes and Development*, 5, 594-604.
- Tremblay, P., Kessel, M. & Gruss, P. (1995). A transgenic neuroanatomical marker identifies cranial neural crest deficiencies associated with the Pax3 mutant Splotch., *Developmental Biology*, 171, 317-329.
- Tremblay, P., Pituello, F. & Gruss, P. (1996). Inhibition of floor plate differentiation by Pax3: evidence from ectopic expression in transgenic mice., *Development*, 122, 2555-2567.
- Trottier, C., Repérant, J. & Miceli, D. (1995). Anatomical evidence of a retino-thalamo-hippocampal pathway in the pigeon., *Journal of Brain Research*, 36, 489-500.



- Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carrière, C. & Saule, S. (1994). Pax-QNR/Pax-6, a paired box and homeodomain-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells., *Molecular Endocrinology*, 8, 929-939.
- Urbanek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F. & Busslinger, M. (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking pax5/BSAP., *Cell*, 79, 901-912.
- Wallin, J., Mizutani, Y., Imai, K., Miyashita, N., Moriwaki, K., Taniguchi, M., Koseki, H. & Balling, R. (1993). A new pax gene, pax-9, maps to mouse chromosome-12., *Mammalian Genome*, 4, 354-358.
- Wallin, J., Eibel, H., Neubüser, A., Wilting, J., Koseki, H. & Balling, R. (1996). Pax1 is expressed during development of the thymus epithelium and is required for normal T-cell maturation., *Development*, 122, 23-30.
- Wallin, J., Wilting, J., Koseki, H., Fritsch, R., Christ, B. & Balling, R. (1994). The role of Pax-1 in axial skeleton development., *Development*, 120, 1109-1121.
- Walther, C. & Gruss, P. (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS., *Development*, 113, 1435-1449.
- Walther, C., Guénet, J. L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M. D., Plachov, D., Balling, R., & Gruss, P. (1991). Pax - a murine multigene family of paired box-containing genes., *Genomics*, 11, 424-434.
- Wehr, R. & Gruss, P. (1996). Pax and vertebrate development., *International Journal of Developmental Biology*, 40, 369-377.
- Weigel, D. & Jäkle, H. C. (1990). The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors?, *Cell*, 63, 455-456.
- Wilson, D. S., Guenther, B., Desplan, C. & Kuriyan, J. (1995). High resolution crystal structure of paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA., *Cell*, 82, 709-719.
- Wilson, D., Sheng, G., Lecuit, T., Dostatni, N., Desplan, C. (1993). Cooperative dimerization of Paired class homeo domains on DNA., *Genes and Development*, 7, 2120-2134.
- Wilson, P. (1980). The organisation of the visual hyperstriatum in the domestic chick. I. Topology and topography of the visual projection., *Brain Research*, 188, 319-331.
- Winocur, G. (1979). Effects of interference on discrimination learning and recall by rats with hippocampal lesions., *Physiology Behavior*, 22, 339-345.
- Wolberger, C., Vershon, A. K., Liu, B., Johnson, A. D. & Pabo, C. O. (1991). Crystal structure of a MATA2 homeodomain operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions., *Cell*, 67, 517-528.
- Wright, C. V., Cho, K. W., Hardwicke, J., Collins, R. H. & De Robertis, R. E. M. (1989). Interference with function of a homeobox gene in *Xenopus* embryos produces malformations of the anterior spinal cord., *Cell*, 59, 81-93.
- Xu, W., Rould, M. A., Jun, S., Desplan, C. & Pabo, C. O. (1995). Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5 Å resolution reveals structure basis for Pax developmental mutation., *Cell*, 80, 639-650.

- Yamada, T., Kioussi, C., Schubert, F. R., Eto, Y., Chowdhury, K., Pituello, F. & Gruss, P. (1994). Regulated expression of Brachyury(T), NKX1.1 and Pax genes in embryoid bodies., *Biochemistry and Biophysical Research Communications*, 199, 552-563.
- Zhang, Y. & Emmons, S. (1995). Specification of sense-organ identity by a *Caenorhabditis elegans* Pax-6 homologue., *Nature*, 377, 55-59.