

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Laboratoire « Evolution et Développement des Vertébrés »

THÈSE présentée par : **Claire ROCANCOURT**

soutenue le : **9 Décembre 2010**

pour obtenir le grade de : Docteur de l'université d'Orléans

Discipline/ Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire



Caractérisation moléculaire de la rétine embryonnaire et larvaire de la lamproie *Petromyzon marinus*.

THÈSE dirigée par :

Madame Sylvie MAZAN

Directeur de Recherche, CNRS.

RAPPORTEURS :

Madame Muriel PERRON
Monsieur Simon SAULE

Directeur de Recherche, Université Paris Sud.
Directeur de Recherche, Institut Curie.

JURY :

Madame Sylvie MAZAN
Madame Muriel PERRON
Monsieur Simon SAULE
Monsieur François ERARD
Madame Marianne BERNARD

Directeur de Recherche, CNRS.
Directeur de Recherche, Université Paris Sud.
Directeur de Recherche, Institut Curie.
Professeur, Université d'Orléans - Président du jury.
Maître de Conférence, Université de Poitiers.

Laboratoires

Développement et Evolution des Vertébrés



Unité d'Immunologie et Embryologie Moléculaire (IEM) – UMR6218

**Institut de Transgenose – Campus CNRS
3B rue de la Férollerie
45071 Orléans
France**



Unité Mer et Santé – UMR7150

**Station Biologique de Roscoff
Place Georges Teissier
29 682 Roscoff
France**

Je tiens bien évidemment à remercier ma directrice de recherche, **Sylvie Mazan**, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ses conseils et son aide précieuse, surtout dans les derniers moments. J'ai énormément appris, que ce soit sur le plan scientifique, humain ou technique.

Je souhaite également remercier **Muriel Perron** et **Simon Saule** qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci également à **François Erard** et **Marianne Bernard** qui, en tant que membres du jury, ont accepté de juger mon travail. Merci à tous pour votre disponibilité, tout au long de ce périple, et vos précieux conseils !

Merci à **Valérie Quesniaux** pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR 6218 pendant ces trois années. Merci également à **Patrick Cormier** pour son accueil chaleureux au sein de l'unité 7150 et son soutien appréciable au cours de ces quelques mois bretons !

Je tiens également à rendre un chaleureusement hommage à toutes les personnes que j'ai rencontrées en passant dans l'équipe, qui m'ont toutes apportées leur « petit quelque chose en plus » faisant toute la différence ! Merci donc à :

Begoña Villar-Cheda pour m'avoir orienté dans mes premiers mois,
Delphine Nicolle pour ton encadrement exemplaire,
Marion Coolen pour nos discussions scientifiques (ou pas),
Verona Villar-Cerviño pour ce réel rayon de soleil en plein hiver,
Florence Savigny pour avoir su m'écouter pendant ces nombreux moments de doutes,
Aurélié Gombault pour ta joie de vivre et tes petites histoires rigolotes,
Suzanna Fereiro-Galve pour m'avoir fait découvrir Orléans et pour ton sourire,
Arnaud Menuet pour tes conseils,
Benoît Godard (Junior) pour les pauses billards et les nombreux délires,
Diane Schausi pour nos éclats de rires qui ont illuminés ces derniers mois !

Un gros petit merci aussi à nos petits étudiants préférés, passés et parfois repassés dans le labo pour leurs études ou pour leur plaisir (presque !) : **Virginie**, **Isis**, **Hélène**, **Martin**, **Aurélien**, **Jean-Pierre**, **Florie**, **Alexia** et **Fanny**.

Un immense merci également à **tous les étudiants, ITA** de l'unité que j'ai croisé au cours de ces 3 années à Orléans et qui, au détour d'une discussion de couloir, d'une pause café ou d'une séance de laser game, m'ont rendu la vie bien plus facile grâce à leur bonne humeur ! Merci particulièrement à :

Nath & Stan, pour votre bonne humeur perpétuelle et pour ce petit tube de sable qui me fera toujours penser à vous deux et à votre bonheur !
Pam & Rachel, pour nos discussions scientifiques (ou pas), pour vos petites attentions, pour ces nombreux petits instants de rire ensemble,
Emilie & Patricia, pour nos nombreuses discussions, pour votre sourire ne quittant jamais vos visages et pour m'avoir fait découvrir le scrap !!
Johan & Sebastien, pour votre disponibilité permanente et votre bonne humeur,
Nico, pour tes citations qui ont le don de me mettre sur le cul, pour l'invention de jeux dans les couloirs du labo (qui tirent parfois vers le vandalisme),
Virginie & Thomas, pour votre dynamisme, votre bonne humeur et votre savoir-vivre !
Marie-Clémence, pour toutes ces idées folles qui m'ont permis de m'évader quelques minutes dans ces périodes pas toujours très roses !

Un gros Merci aussi pour **Anne-Gaëlle, Arnaud D., Dieudonné, Isabelle M., Louis, Mathilde, Rodrigo, Sabine** et **tous les autres**, que je n'ai pas eu le temps de mieux connaître et qui, je suis sûre, sont des personnes formidables...

Merci également à **François, Bruno** et **Sylvia** pour s'être malgré tout intéressé à ce modèle qu'est la lamproie !

Ces remerciements s'adressent également à **Nadège Royer** et à **Bernadette Schuler** pour votre aide inestimable, même loin du labo, pour nos nombreuses discussions et votre soutien !

Merci aussi à **Sébastien Paturance** pour les structures lamproies qu'il nous a savamment concocté, pour tous ces conseils donnés et pour nos longues discussions (plus ou moins) ornithophiles !

Et vu que j'ai changé d'unité au cours de cette thèse, puisque le laboratoire c'est installé au bout du bout du monde, je voulais aussi remercier encore une fois toute l'unité Mer & Santé qui nous a accueilli le plus chaleureusement possible ! Merci à :

Azza, pour ta bonne humeur et ton calme permanent,
Bertrand, pour tes nombreux conseils et ton sourire,
Caro, pour ta bonne humeur, pour tes délires, pour Bagdad...
Hussam, pour ton courage, ta détermination et ton sourire malgré tout !
Julia, pour tes petites attentions et nos discussions (malheureusement trop rares)
Laurent, pour ta disponibilité, tes conseils, et pour m'avoir plumée au poker !
Max, pour ta bonne humeur et tout ce qui va avec,
Odile, pour ton aide et ton sourire,
Pauline, pour ton rire, tes délires et nos parties de billards,
Robert, pour toutes les discussions du déjeuner que je ne pourrai pas oublier !
Sandrine, pour ta disponibilité, tes conseils, ton écoute et ton soutien !
Sophie, pour ton sourire et ta disponibilité,
Sylvain, pour tes conseils éclairés, pour ton calme au milieu de la tempête,
Virginie, pour ta joie de vivre et ton sourire,
Vlad, pour ton écoute, ta bonne humeur et tes idées révolutionnaires !

Je n'oublie pas non plus **tous les étudiants de la Station** que je n'ai pas toujours bien connu, mais avec qui je reprendrai plaisir à papoter ! Mercis particuliers à **Natty** qui m'a fait découvrir que les danses bretonnes, ce n'est pas si facile que ça, et à **Florent**, entre autres pour m'avoir aidé à bichonner notre dernière lamproie ! Merci également à **Xavier**, mon savant fou préféré !!!

Pour finir, un Merci chaleureux également à **Sébastien Henry**, pour ton aide lors de l'installation du labo, tes conseils et nos nombreuses discussions autour des aquariums.

**Cela a vraiment été très agréable d'avoir pu vous rencontrer, rigoler
et accessoirement même travailler à vos cotés !**

MERCI A VOUS TOUS !!!

Enfin, ces remerciements seraient loin d'être complets si j'oubliais mes proches qui m'ont supporté, aidé, conseillé et papouillé au cours de cet épisode mémorable, malgré la distance ou le temps qui nous ont souvent séparés. J'ai énormément de chance de vous avoir tous à mes côtés ! Merci infiniment à :

Tous les **LDF** !!!

Sandrine, Sana, Audrey et Olivier, pour être venus à Orléans, à Chartres, à Paris et ailleurs, pour tous nos bons souvenirs et pour ceux qui vont arriver !!

Cécile, pour les quelques instants partagés au cours de ces dernières années.

Sabine, pour avoir trouvé « drôle » le tripotage de poisson, pour notre sortie bretonne, pour le bonnet péruvien,...

Aurélié, pour ta bonne humeur et nos petits délires, pour tes multiples attentions, pour m'avoir remis parfois sur le bon chemin sans forcément le vouloir, pour me donner l'occasion de visiter le Texas...

Asma, pour ta patience (si si) alors que je n'ai toujours pas fini ton book, pour avoir été ma keupine de labeur pendant quelques mois et pour la pauvre boîte de chocolats entre nous deux, pour avoir eu un joli ventre et une nouvelle vie !

Mon frère, mes parents et Pierre pour tous vos conseils, votre soutien sans faille, pour avoir su me changer les idées quand il le fallait, pour m'avoir fait partager vos expériences et vos doutes... Merci, sincèrement, pour tout !!!



INTRODUCTION

I. Le développement de l'œil chez les gnathostomes

A. Aspects morphologiques

1. L'œil et la rétine adultes 15
2. La morphogenèse précoce de la rétine 17

B. Les mécanismes de développement : du champ de l'œil à la cupule optique, différenciation de la rétine neurale

1. Du champ de l'œil à la cupule optique 19
2. La différenciation de la rétine neurale 21

II. Origine et diversification des organes photorécepteurs chez les métazoaires

A. La question de l'homologie des yeux : de l'organe à la cellule

1. Des conservations inattendues des mécanismes de développement 25
2. Une approche cellulaire de l'évolution de l'oeil 27

B. Des scénarios évolutifs encore controversés

1. Modèle 1. des organes ancestraux distincts comportant des photorécepteurs rhabdomériques ou ciliaires 29
2. Modèle 2. Un œil ancestral élaboré comportant à la fois des photorécepteurs rhabdomériques et ciliaires 31

III. Origine de la rétine chez les vertébrés : intérêt de la lamproie

A. Intérêt du modèle lamproie dans le domaine évolution-développement chez les vertébrés

1. Caractéristiques générales 33
2. Une espèce modèle en cours d'établissement : outils moléculaires et fonctionnels 35
3. Apport au domaine évolution-développement 37

B. Intérêt du modèle lamproie dans le domaine évolution-développement chez les vertébrés

1. La rétine adulte 41
2. Le développement de la rétine chez la lamproie 43

SOMMAIRE

CHAPITRE I : Les gènes Otx chez la lamproie *Petromyzon marinus* : expression dans l'œil embryonnaire et larvaire, implications évolutives.

I. La famille des gènes Otx chez les métazoaires

A. Caractéristiques structurales des gènes Otx	53
B. Origine chez les métazoaires	53
C. Le cas des vertébrés	55

II. Rôles des gènes Otx chez les métazoaires

A. Des rôles similaires entre drosophile et vertébrés	57
B. Le cas des organes visuels	
1. Chez la drosophile	59
2. Chez les vertébrés	61

III. Evolution fonctionnelle des gènes Otx chez les vertébrés : intérêt de la lamproie et du développement de l'œil

A. Etat du sujet	63
B. Résultats	65

CHAPITRE II : Etude de la rétine embryonnaire de la lamproie

I. Rôle des gènes Vax2, Six3, Prox1 et Pax6 dans le développement de l'œil

A. Vax2	85
B. Six3	87
C. Prox1	87
C. Pax6	89

II. Résultats : caractérisation de l'expression des gènes Vax2, Pax6, Six3 et Prox1 dans l'œil de lamproie aux stades embryonnaires et pro-larvaires

A. Obtention des sondes	91
B. Profils d'expression dans l'œil embryonnaire et prolarvaire chez la lamproie <i>Petromyzon marinus</i>	91
C. Mécanismes de signalisation impliqués dans la régionalisation proximo-distale de l'œil embryonnaire chez la lamproie : résultats préliminaires	95

CHAPITRE III : Caractérisation d'homologues de FoxG1 chez la lamproie *Petromyzon marinus* et la roussette *Scyliorhinus canicula*.

I. Origine du gène FoxG1 chez les métazoaires et évolution structurale chez les vertébrés

A. Origine des gènes de la classe FoxG	101
B. Composition de la famille FoxG chez les vertébrés, principales caractéristiques d'expression	103

II. Fonctions du gène FoxG1 chez les vertébrés

A. Télencéphale	105
B. Organes sensoriels	107

III. Caractérisation des gènes FoxG1 chez la lamproie *Petromyzon marinus* et la roussette : expression aux stades embryonnaires chez la lamproie.

A. Caractérisation d'un gène FoxG1 chez la lamproie et de deux paralogues chez la roussette	109
B. Analyse du profil d'expression de ScFoxG1	111
C. Analyse du profil d'expression de PmFoxG1	113
D. Etude de l'implication de la signalisation FGF dans le contrôle de l'expression de PmFoxG1	115
E. Conclusions	115

CONCLUSION GENERALE 119

Bibliographie 123

Annexes 139



INTRODUCTION GENERALE

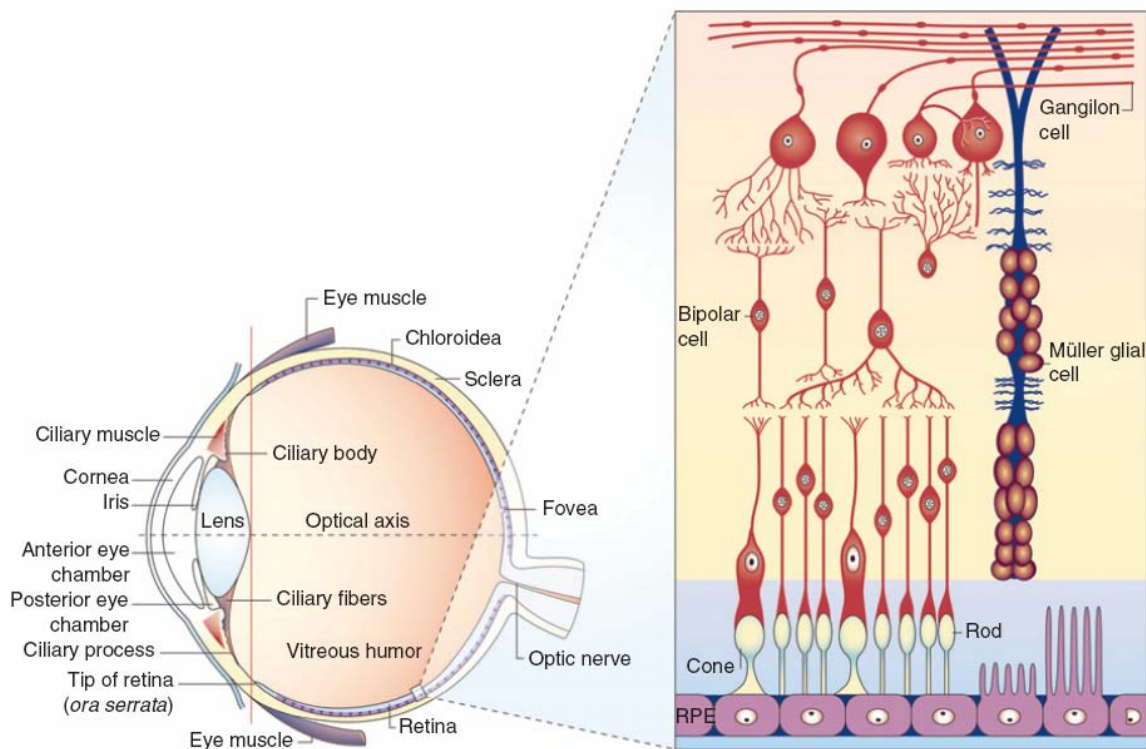


Figure 1. La rétine adulte. L'illustration de gauche représente un œil humain et les principaux tissus qui le composent. Le schéma à droite correspond à un agrandissement de la rétine. Celle-ci est composée de trois couches cellulaires : la couche nucléaire externe (ou ONL) est composée uniquement des corps cellulaires des photorécepteurs, la couche nucléaire interne (ou INL) contient les cellules amacrines, horizontales, et bipolaires ainsi que les cellules gliales de Müller et la couche des cellules ganglionnaires (ou GCL). La couche plexiforme externe (ou OPL, entre l'ONL et l'INL) et la couche plexiforme interne (entre l'INL et la GCL) sont les interfaces où les échanges synaptiques entre les différentes couches ont lieu. [Tiré de Graw et al., 2010]

La rétine et d'une façon plus générale l'œil des vertébrés sont des structures complexes, qui présentent un très grand nombre de caractéristiques spécifiques à ce taxon. Son origine est actuellement mal comprise. Cette thèse s'inscrit dans une démarche évolution-développement qui vise à reconstruire les grandes caractéristiques de son développement chez la lamproie, dont l'étude est essentielle pour préciser l'état ancestral dans le taxon. L'introduction ci-dessous vise à (1) décrire les grandes caractéristiques de l'œil et de son développement chez les gnathostomes, (2) préciser l'apport de la lamproie dans le domaine évolution-développement en général et (3) présenter les particularités du développement de l'œil chez cette espèce.

I. Le développement de l'œil chez les gnathostomes

Ce paragraphe ne vise pas à une description exhaustive des mécanismes de développement de l'œil mais est centré (1) sur des caractéristiques générales conservées chez les gnathostomes, mais qui présentent des différences notables avec la lamproie et (2) les processus de développement sur lesquels mon étude chez la lamproie a été centrée.

I. A. Aspects morphologiques

I. A. 1. L'œil et la rétine adultes

L'œil des gnathostomes est une structure complexe, dont les composants ont plusieurs origines embryonnaires distinctes : épiderme de surface pour la cornée et le cristallin, neuroectoderme pour la rétine, mésoderme ou cellules des crêtes neurales pour les différents muscles ciliaires ou oculaires. Sa structure générale, ainsi que sa composition et son organisation cellulaire est bien connue et conservée chez les gnathostomes (cf. Figure 1). Elle est composée d'une monocouche de cellules épithéliales pigmentées (rétine pigmentaire) et de la rétine neurale qui comprend des cellules gliales (cellules de Müller, astrocytes, cellules microgliales) et cinq grands types de neurones (cf. Figure 1) :

- les photorécepteurs qui convertissent le signal lumineux en signal électrique. Ces photorécepteurs peuvent être classés en deux types, présents chez tous les gnathostomes [Lamb, 2007] : les cônes et bâtonnets, respectivement responsables de la vision photopique (ou maculaire, qui permet la perception lumineuse) et de la vision scotopique (vision périphérique caractérisée par une sensibilité à la lumière élevée, adaptée aux faibles niveaux de lumière) ;
- les cellules bipolaires qui transmettent l'influx nerveux vers les cellules ganglionnaires ;
- les cellules ganglionnaires, qui le transmettent vers le cerveau via leurs axones regroupés dans le nerf optique ;

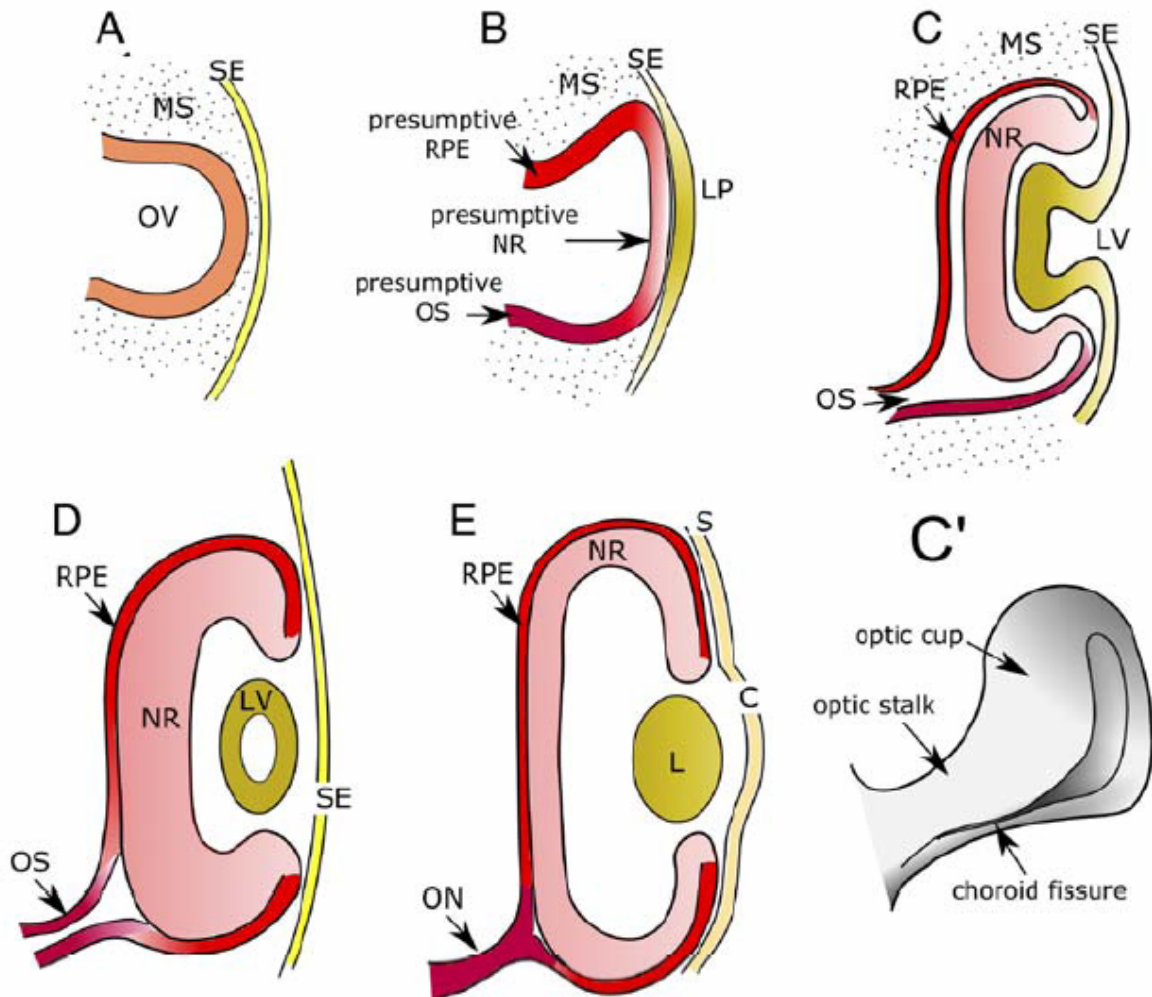


Figure 2. Développement de la rétine. A. Evagination du diencéphale pour former la vésicule optique. B. Contact de la vésicule optique et de l'ectoderme adjacent. La vésicule optique se subdivise en RPE, rétine neurale et pédoncule optique putatifs. C. Formation de la cupule optique et invagination de la placode cristalline. C'. L'invagination ventrale de la vésicule optique génère la fissure choroïde. D-E. Différenciation de la rétine précoce et mature, spécification du cristallin, formation de la cornée. C : cornée ; MS : mésenchyme ; NR : rétine neurale ; L : cristallin ; LP : Placode cristalline ; LV : vésicule cristalline ; ON : nerf optique ; OS : pédoncule optique ; OV : vésicule optique ; RPE : épithélium pigmenté ; SE : ectoderme de surface. [Tiré de Alder & Canto-Soler, 2007]

- les cellules horizontales et les cellules amacrines, interneurons qui modulent la transmission de l'influx nerveux, ont un mode de transmission souvent qualifié d'« horizontal », par rapport au mode de transmission dit « vertical » impliquant les photorécepteurs, cellules bipolaires et ganglionnaires.

Ces grands types cellulaires recouvrent en réalité une complexité beaucoup plus importante et les analyses plus détaillées des morphologies cellulaires et des caractéristiques biochimiques des neurones de la rétine mettent en évidence une diversité remarquable à l'intérieur de certaines classes, cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires notamment [Masland, 2001 ; Wassle 2004]. Ils présentent par ailleurs une organisation laminaire bien caractérisée et conservée chez tous les gnathostomes, comprenant trois couches nucléaires et deux couches plexiformes (cf. Figure 1).

I. A.2. La morphogenèse précoce de la rétine

Le développement précoce de l'œil implique une série continue de changements morphologiques, très conservés à l'échelle des gnathostomes (cf. Figure 2). En ce qui concerne la rétine, la première indication morphologique de sa spécification est l'apparition de deux fosses optiques au niveau d'un territoire antérieur de la plaque neurale appelé le champ optique. Lors de la fermeture du tube neural, elles apparaissent comme deux évaginations au niveau du diencéphale. Suit la formation d'une vésicule qui entre en contact avec l'ectoderme de surface.

Suite à une série d'inductions réciproques, l'ectoderme de surface adjacent à la vésicule optique s'épaissit pour former la placode cristalline et la vésicule optique change de conformation pour former par invagination la cupule optique. Cette invagination a lieu sur toute la longueur du pédoncule optique jusqu'au point de jonction avec le tube neural. La fissure optique (c'est-à-dire l'endroit où les deux extrémités ne se sont pas encore rejointes) se trouve alors du côté ventral de la rétine. Cette structure permet l'entrée de vaisseaux sanguins dans l'œil ainsi la formation d'un canal permettant le guidage physique des axones.

La rétine neurale et la rétine pigmentée présomptives se développent respectivement à partir des territoires interne et externe de la cupule optique et deviennent morphologiquement distinctes à ce stade. Les stades suivants sont marqués par la prolifération rapide, la sortie progressive du cycle cellulaire puis la différenciation de progéniteurs qui vont former la rétine neurale.

Dans sa partie la plus distale, la cupule optique contribue également à la formation de structures non neurales de la chambre antérieure comme l'iris et le corps ciliaire qui sécrète l'humeur aqueuse. Alors que l'iris est une synapomorphie des vertébrés, les processus ciliaires, qui sont les structures sécrétrices du corps ciliaire et apparaissent comme des replis épithéliaux caractéristiques, ne sont présents que chez les gnathostomes.

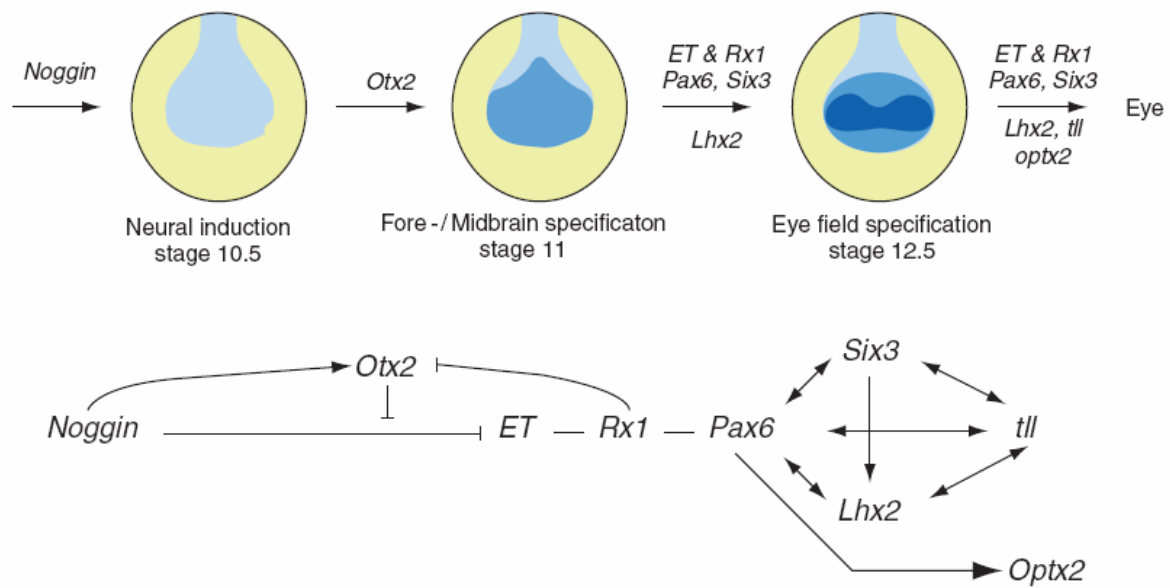


Figure 3. Facteurs génétiques intervenant dans la formation du territoire optique. Un modèle simplifié de l'induction du champ de l'œil au sein de la plaque neurale antérieure (en bleu clair) est présenté avec les principaux facteurs de transcription impliqués. En bleu et bleu foncé sont représentés l'expression d'Otx2 et le champ de l'œil, respectivement. [Tiré de Graw, 2010]

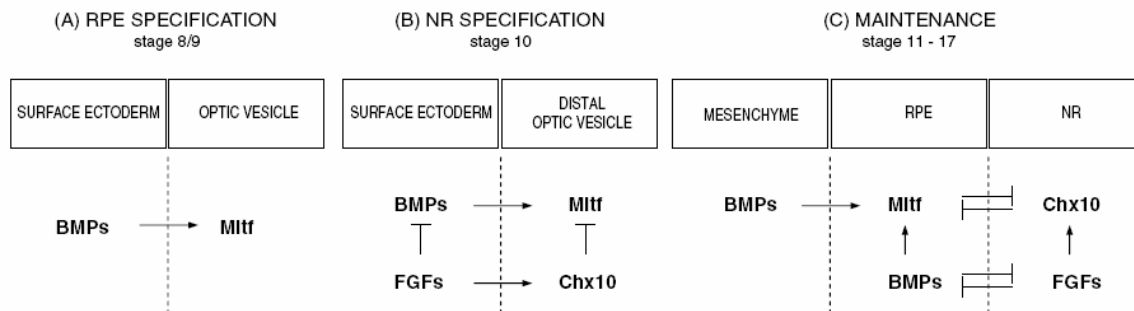


Figure 4. Régulation de la délimitation du RPE et de la rétine neurale. A. Les BMP exprimés dans l'ectoderme de surface induisent Mitf dans la vésicule optique. B. La spécification de la rétine neurale est initiée par des signaux FGF provenant de l'ectoderme de surface. Chx10 est induit dans la partie distale de la vésicule optique et permet d'inhiber Mitf et Otx2 dans cette région, subdivisant la vésicule optique en RPE et rétine neurale présumptifs. C. L'expression de Mitf est ensuite maintenue dans le RPE par la signalisation BMP alors que l'expression de Chx10 dans la rétine neurale est maintenue par les FGF. [Tiré de Muller et al., 2007]

I. B. Les mécanismes de développement : du champ de l'œil à la cupule optique, différenciation de la rétine neurale

De très nombreuses études conduites chez les quatre organismes modèles principaux des vertébrés (souris, poulet, xénope et poisson-zèbre) ont permis d'identifier des mécanismes de signalisation et les programmes génétiques qui jouent des rôles importants dans les différentes étapes du développement précoce de l'œil, jusqu'au stade cupule optique et dans la différenciation de la rétine neurale. Ce qui suit ne vise pas à une analyse exhaustive mais à dégager des données bien soutenues, qui fournissent des références dans les comparaisons effectuées avec la lamproie.

I. B. 1. Du champ de l'œil à la cupule optique

Formation du champ de l'œil. Le champ de l'œil dont dérive la cupule optique est spécifié dès le stade plaque neurale par la co-expression d'un ensemble de facteurs de transcription tels que *Six3*, *Lhx2*, *tll*, *Optx2*, *Pax6*, *Tbx3/ET* et *Rx1/2/3* [Zuber et al., 2003]. Le rôle de ces gènes dans ce processus a été démontré à la fois par des analyses de type gain de fonction, notamment chez le xénope et le médaka [Loosli et al 1999 ; Zuber et al., 2003], mais également par des analyses de pertes de fonction [Carl et al., 2002 ; Lagutin et al. 2003 ; Loosli et al, 2003 ; Philips et al, 2005 ; Stigloher et al, 2006]. Le contrôle génétique de leur expression fait intervenir des réseaux en partie élucidés, impliquant notamment les gènes *Otx2* et *Sox2* [Danno et al., 2008 ; cf. Figure 3] et des interactions entre les voies Wnt canonique et non canonique [Fuhrmann, 2008]. La séparation du champ de l'œil en deux primordia intervient également très précocement, sous l'influence de signaux sécrétés par la plaque préchordale sous-jacente, comme *Shh* et *Nodal* dont l'inactivation conduit à des phénotypes cyclopiques [Muller et al., 2000 ; Dick et al., 2000].

Formation de la cupule optique. La formation de la cupule optique et de ses différents territoires (marge ciliaire, rétine neurale, rétine pigmentée présomptive) fait intervenir une suite d'inductions réciproques bien décrites impliquant le neuroectoderme, l'ectoderme de surface et le mésenchyme adjacents (cf. Figure 4). Des rôles clefs dans la formation des différents composants de la cupule optique ont ainsi été identifiés pour les voies de signalisation suivantes :

- FGF : la transcription de *Fgf8* est induite au niveau de la partie distale de la vésicule optique quand celle-ci entre en contact avec l'ectoderme de surface et son expression ectopique conduit à une expression des marqueurs de rétine neurale dans la région proximale de la cupule optique. En accord avec un rôle essentiel de la voie FGF dans la spécification de ce tissu, les souris *Fgf8*^{-/-} présentent par ailleurs une expansion distale de l'épithélium pigmentaire rétinien [Vogel Hopker et al., 2000 ; Zhao et al, 2001].

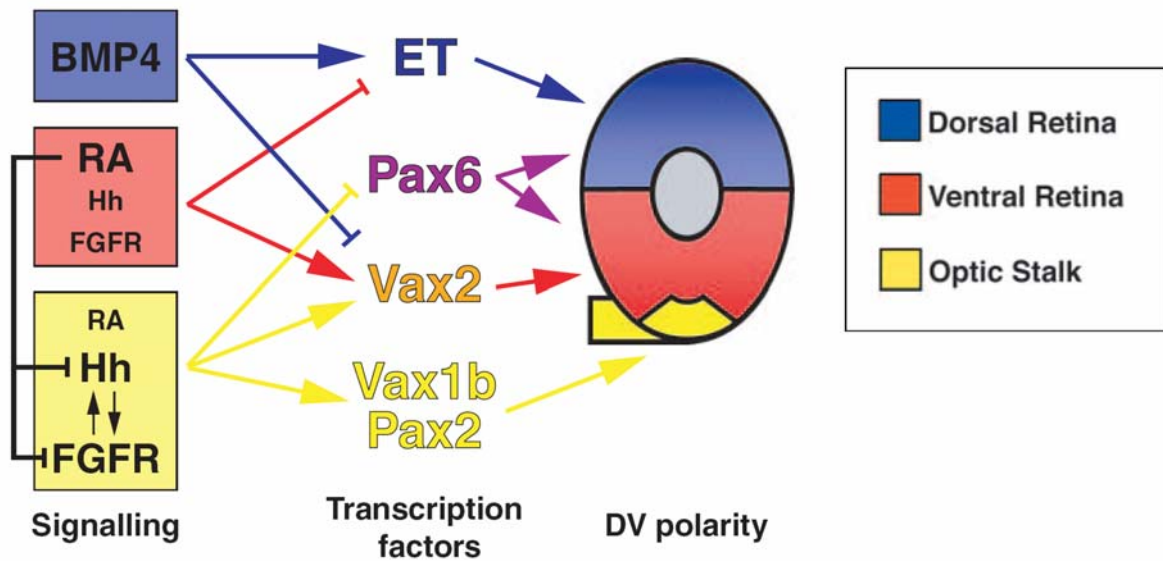


Figure 5. Modèle pour les événements de régulation intervenant dans la régionalisation dorso-ventrale de la vésicule optique. L'association d'une forte dose de Hh et de FGFR et d'une faible concentration en acide rétinoïque (AR) provoque la répression de Pax6 et induit l'expression de Vax1, Pax2 et Vax2, menant à la spécification du nerf optique. Une forte concentration en AR ainsi qu'une faible concentration en FGFR et en Hh réprime l'expression d'ET et induit l'expression de Pax6 et Vax2 en absence de Vax1 et Pax2, permettant la spécification de la rétine ventrale. Enfin, la signalization BMP inhibe Vax2 et induit la transcription de ET et Tbx5, menant à la spécification de la rétine dorsale. De plus, la signalization AR tend à inhiber les signalisation Hh et FGFR, alors que Hh et FGFR s'interactivent mutuellement. [Modifié de Lupo et al., 2005]

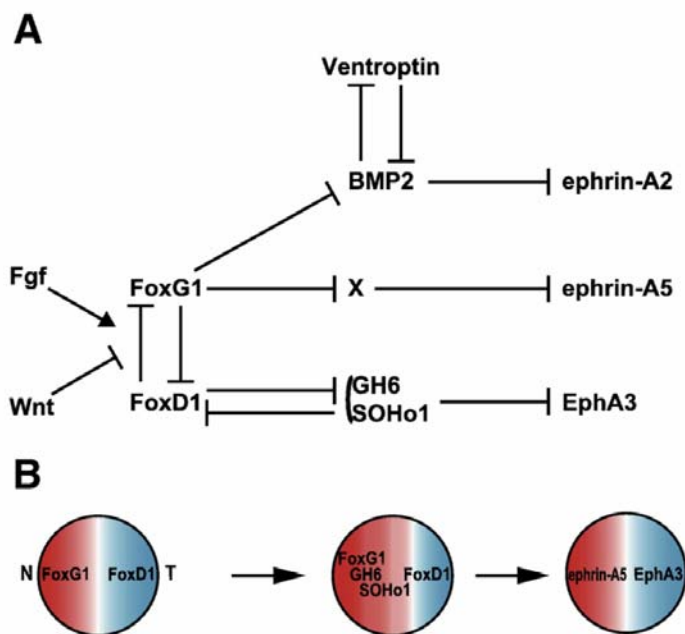


Figure 6. Expression régionalisée le long de l'axe naso-temporal de la rétine. A. Modélisation des régulations par les voies FGF8 et Wnt sur l'expression de FoxG1 et FoxD1, ainsi que sur les molécules impliquées dans le guidage axonal (SOHo1, GH6, éphrines). B. Représentation schématique de l'expression des différents facteurs sur l'axe naso-temporal. [Tiré de Takahashi et al., 2009]

- BMP : des signaux BMP, sécrétés par l'ectoderme de surface, sont essentiels à la spécification et au maintien du RPE [Müller et al 2007]. Cette voie est également essentielle à la formation des marges ciliaires [Zhao et al., 2002].
- Wnt : l'inactivation conditionnelle de la β -caténine dans le RPE conduit à un défaut de sa différenciation chez la souris [Westenkow et al, 2009]. La voie Wnt canonique est également nécessaire à la formation des dérivés de la marge (iris, corps ciliaire) et elle pourrait également être impliquée dans le maintien des progéniteurs de la marge ciliaire dans un état indifférencié [Führmann, 2008].

Ces voies de signalisation conduisent également à une régionalisation des différents composants de la cupule optique, qui adoptent des propriétés moléculaires et cellulaires différentes. La régionalisation dorso-ventrale permet la distinction entre le pédoncule optique et la vésicule optique (cf. Figure 5). Elle repose sur des activités de signalisation ayant des effets opposés dans les territoires dorsaux et ventraux de la cupule optique, comme la voie BMP d'une part et les voies Shh, FGF et de l'acide rétinoïque d'autre part [Adler and Canto-Soler, 2007 ; Lupo et al., 2005 ; Zhao et al ., 2010].

La régionalisation naso-temporale, qui joue un rôle crucial dans la détermination des patrons de projection de la rétine vers le cerveau (voir chapitre 3 ci-dessous), repose quant à elle sur des programmes génétiques antagonistes placés sous le contrôle de FGF8 dans la région nasale et de la voie Wnt dans la région temporale [Picker & Brand, 2005 ; Takahashi et al., 2009 : cf. Figure 6].

I. B. 2. La différenciation de la rétine neurale

Les modèles proposés pour expliquer la formation des différents types cellulaires de la rétine doivent rendre compte d'un ensemble relativement complexe d'observations telles que :

- La génération des différents types cellulaires de la rétine suit un ordre temporel conservé chez l'ensemble des vertébrés [cf. Figure 7]. Cette séquence pourrait être fixée de façon stricte à partir d'un progéniteur donné d'après une analyse récente de lignage cellulaire [Wong et Rapaport, 2009].
- Chez tous les vertébrés, la différenciation de la rétine suit un gradient du centre vers la périphérie : elle est ainsi initiée dans un territoire ventro-nasal à proximité du nerf optique chez le poisson-zèbre et se propage progressivement dans le reste de la rétine [Hu and Easter, 1999].
- Les progéniteurs sont multipotents et il n'existe pas de restriction progressive de leurs potentialités au cours du développement de la rétine [Livesey and Cepko, 2001].

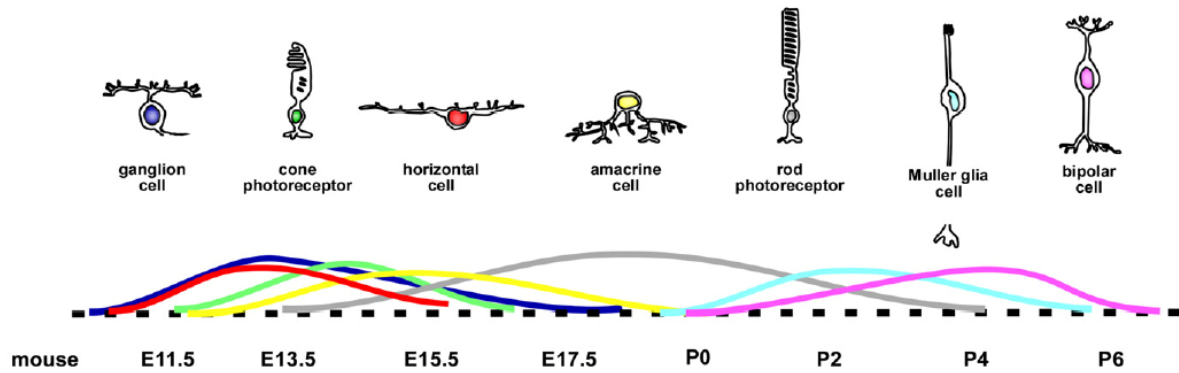


Figure 7. Différenciation des types cellulaire au cours du temps chez la souris. L'ordre de formation de chacun des types cellulaire est conservé au travers de l'évolution. [Tiré de Martins & Pearson, 2008].

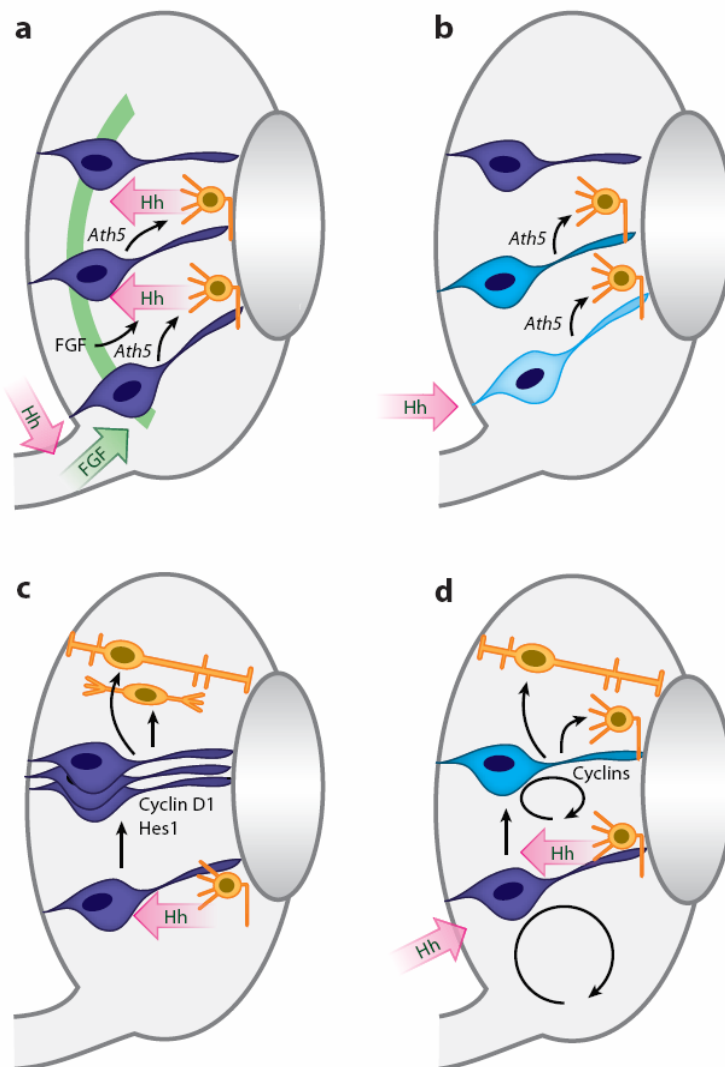


Figure 8. La différenciation des cellules rétinienne. **A.** La signalization FGF induit la différenciation des premières cellules ganglionnaires par l'activation d'Ath5. Ces cellules différenciées sécrètent Shh qui induit la différenciation des cellules voisines. **B.** Chez le poisson zebre, la signalization Hh induit la mise en place d'une horloge interne qui permet la différenciation des neuroblastes à un temps donné, indépendamment du contexte cellulaire. **C.** Chez la souris, le Shh sécrété par les cellules ganglionnaires induisent la différenciation des neuroblastes en cellules de Muller et bipolaires et réprime la formation de cellules ganglionnaires précoces. **D.** La signalization Shh stimule la prolifération cellulaire mais

aussi l'arrêt du cycle cellulaire. Un modèle serait alors de dire que Shh induit la transition de cycles cellulaires courts de neuroblastes immatures, permettant la production de cellules différenciées. Ces différents modèles ne sont pas exclusifs. [Tiré de Agathocleous & Harris, 2009]

- Ils sont capables de répondre à des signaux intrinsèques (programmes génétiques exprimés à un moment donné) et des signaux extrinsèques sécrétés dans leur environnement. De nombreux facteurs de transcription jouent ainsi des rôles essentiels dans la génération de certains types cellulaires [Ohsawa et Kageyama, 2008]. De la même façon, la mise en culture de progéniteurs prélevés à un stade donné en présence de progéniteurs plus précoces ou plus tardifs influence leur devenir, ce qui montre l'importance des signaux extrinsèques [Belliveau and Cepko, 1999 ; Livesey and Cepko, 2001].

Le modèle actuellement retenu pour rendre compte de ses observations propose que les progéniteurs passent par des états successifs de compétence (déterminés par les programmes génétiques qu'ils expriment à un moment donné), pendant lesquels ils sont capables de générer un nombre limité de type cellulaire, sous le contrôle de facteurs extrinsèques [Livesey & Cepko, 2001 ; Agathocleous & Harris, 2009]. Les analyses détaillées dont les mécanismes de prolifération et de différenciation de la rétine ont permis de caractériser un grand nombre d'acteurs impliqués dans ces processus. Elles laissent cependant ouvertes de très nombreuses questions. Ainsi, les voies FGF et Shh sont impliquées dans la différenciation des cellules ganglionnaires et des rôles clés de ces signaux dans l'initiation de la différenciation de la rétine puis sa propagation ont été proposés. Les mécanismes précis mis en jeu restent cependant mal connus et font actuellement l'objet de plusieurs modèles [Agathocleous & Harris, 2009 ; cf. Figure 8].

De la même façon, il est clair qu'un grand nombre de facteurs de transcription ou molécules de signalisation, tels que *Ath5*, *Chx10* ou *Shh* impliqués dans la différenciation de la rétine sont également impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Toutefois, les relations entre ces deux processus restent mal comprises.

Enfin plusieurs analyses mettent en évidence l'implication de modifications épigénétiques dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation dans la rétine. En effet, les remaniements chromatinien permettent ou empêchent la transcription de gènes impliqués dans ces processus. Cependant, ce champ reste encore très peu exploré.

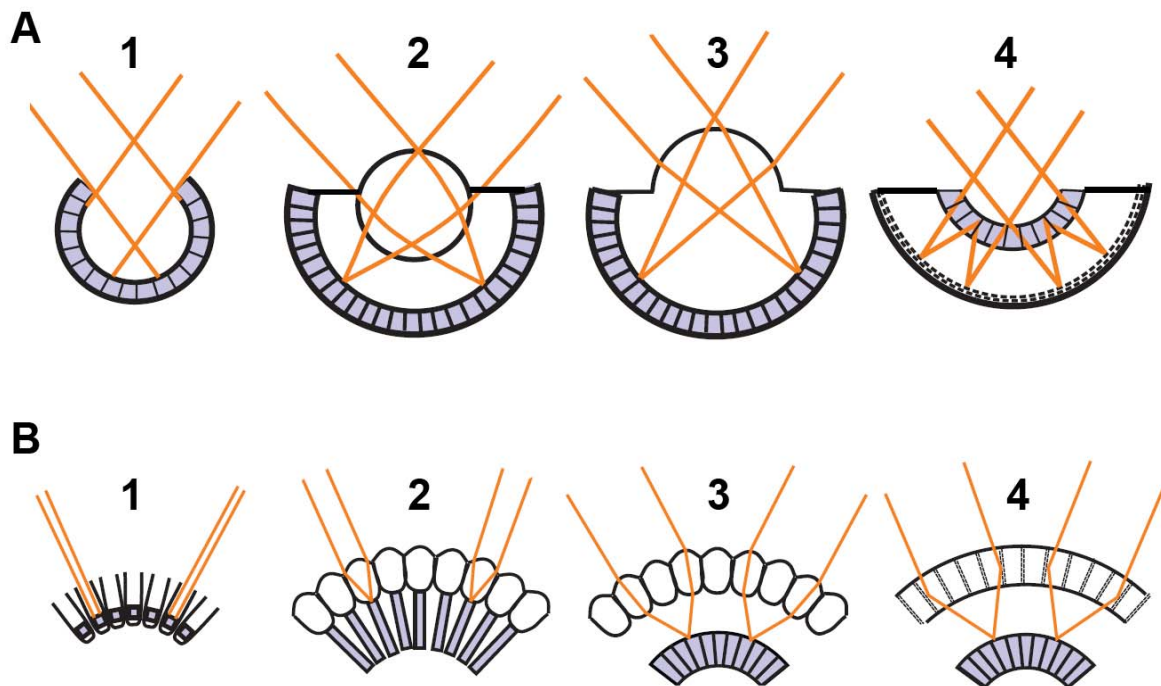


Figure 9. Les yeux simples et composés chez les métazoaires. **A.** Les structures visuelles possédant une chambre unique : (1) le bouton optique permettant de distinguer l'ombre ou la lumière (annélides et mollusques), (2) œil avec un cristallin sphérique (poissons, céphalopodes et mollusques), (3) œil avec une cornée (vertébrés terrestres et araignées) et (4) œil avec un miroir concave (crustacées). **B.** Les structures visuelles composées : (1) l'œil basique où les photorécepteurs sont entourés de cellules pigmentées (vers polychaète et étoiles de mer), (2) œil composé en apposition (insectes diurnes et crustacées), (3) œil en superposition réfractant (insectes nocturnes et crustacées) et (4) œil en superposition réfléchissante (homards et décapodes). La distribution de ces différentes architectures n'est pas monophylétique : dans un même embranchement, il est possible de trouver des architectures visuelles totalement différentes. [Modifié de Land, 2005]

II. Origine et diversification des organes photorécepteurs chez les métazoaires

La question de l'homologie de l'œil chez les métazoaires a fait l'objet d'innombrables débats. En effet, il a longtemps été supposé que l'œil avait évolué de façon indépendante dans les différents phylums. Avec les premières caractérisations des réseaux génétiques contrôlant le développement de l'œil, cette idée a cependant été remise en question par la mise en évidence de conservations inattendues entre des espèces aussi éloignées que la drosophile et la souris [Nilsson, 2004]. Les approches ciblées sur les caractérisations moléculaires détaillées de types cellulaires et prenant en compte des spectres d'espèces larges fournissent des outils puissants pour résoudre ce paradoxe. Elles conduisent aujourd'hui à des scénarios évolutifs testables quant à l'évolution des organes photorécepteurs chez les métazoaires et en particulier, quant à l'origine de la rétine complexe des vertébrés.

II. A. La question de l'homologie des yeux : de l'organe à la cellule

II. A. 1. Des conservations inattendues des mécanismes de développement

Selon les vues traditionnelles des zoologistes, l'évolution d'yeux complexes n'a pu s'effectuer que de façon indépendante entre les grands groupes de métazoaires, protistomiens et deutérostomiens par exemple [Treisman, 2004 ; Nilson, 2004, Land & Nilsson, 2002]. Ce point de vue est fondé sur la diversité des organes visuels observés chez les bilatériens et les variations observées de mêmes groupes d'espèces relativement proches [Arendt & Wittbrodt, 2001 ; Erlick et al., 2009 ; cf. Figure 9]. Il existe également des similitudes apparentes parfois très spectaculaires mais clairement liées à des convergences. Le cristallin en fournit un excellent exemple. Ainsi, les protéines qui le composent, les critallines, sont des enzymes métaboliques n'ayant aucun lien d'apparentement les uns avec les autres [Piatigorsky, 1998 ; Land, 2005]. Seule leur propriété à réfracter la lumière leur a permis d'être recrutées et accumulées dans cette structure spécialisée [Fernald, 2000].

Dans ce contexte, la démonstration que le développement de l'œil impliquant des programmes génétiques très conservés chez les bilatériens a constitué une énorme surprise. La première indication a été la comparaison de *Pax6* de la souris avec les gènes *ey* (*eyeless*) et *toy* (*twin of eyeless*) de la drosophile. Ces gènes sont clairement apparentés les uns aux autres par leur homéodomaine et leurs régulations en cis et en trans sont également identiques chez ces deux espèces [Quiring et al., 1994 ; Niimi et al., 1999 ; Kumar, 2009 ; Lynch & Wagner, 2010]. Ces facteurs sont exprimés dans les territoires optiques chez ces deux espèces, ainsi que chez de nombreux bilatériens [Callaerts et al., 1997 ; Ghardon et al., 1997, 1998 ; Gehring & Ikeo, 1999 ; Arendt & Wittbrodt, 2001] et leur absence provoque la perte des yeux [Gehring, 2005 ; Matsuo et al., 1993]. Ces similitudes s'étendent également aux réseaux

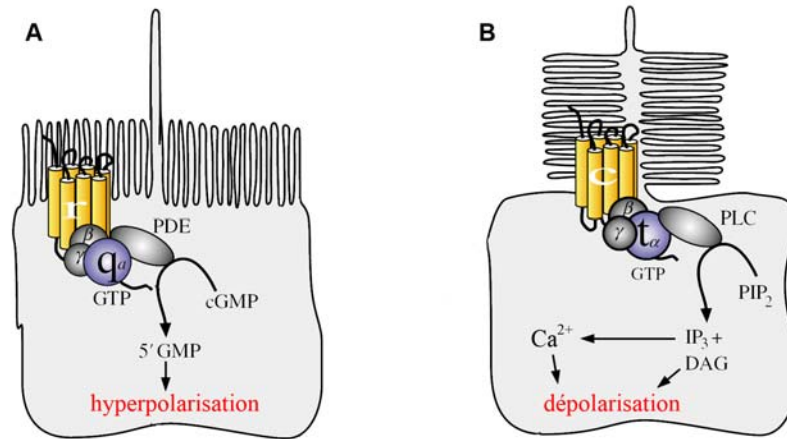


Figure 10. Constitution schématique des cellules photoréceptrices rhabdomériques et ciliaires. **A.** Les cellules rhabdomériques sont reconnaissables par leurs nombreux microvili apicaux. La transduction de l'information lumineuse est initiée par une opsine de type rhabdomérique, associée à une protéine Gq ; ceci mène à la dépolarisation de la membrane. **B.** Les cellules ciliaires étendent de nombreuses membranes à partir d'un cil modifié. La transduction du message lumineux dans ces cellules est véhiculé par une opsine de type ciliaire, associée à une protéine Gt, qui, lorsqu'elles sont activée, permettent la dépolarisation de la membrane. [modifié de Arendt et Wittbrodt, 2001].

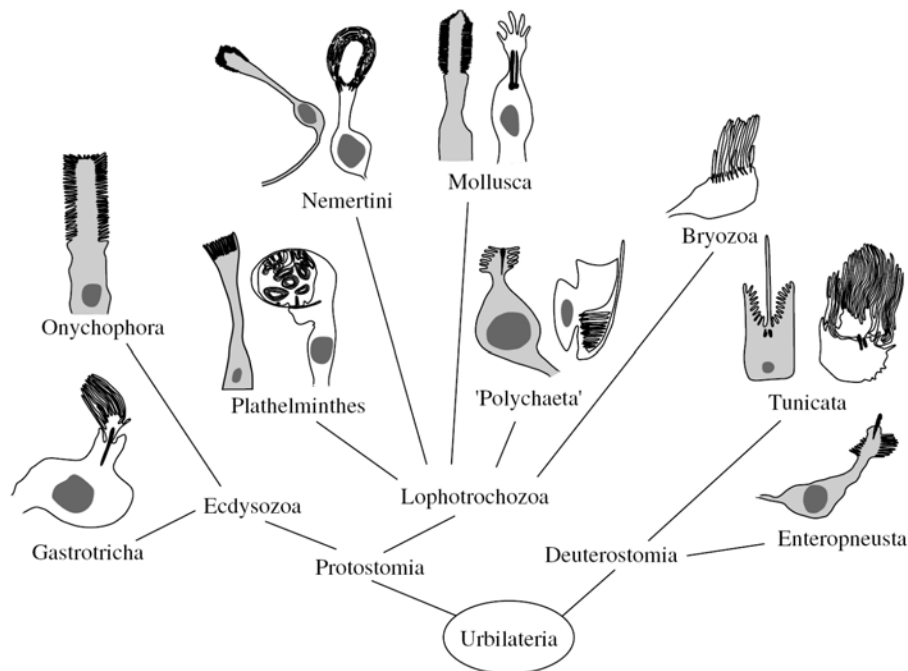


Figure 11. Distribution phylogénétique des photorécepteurs ciliés (en blanc) et rhabdomériques (en gris) chez les bilatériens. Les deux types cellulaires sont présents dans tous les grands embranchements, confirmant le fait qu'Urbilateria, l'ancêtre commun à tous ces taxons, possédait déjà les éléments nécessaires à l'obtention de ces deux types cellulaires. [modifié de Arendt & Wittbrodt, 2001]

génétiques entiers puisque les éléments du module Pax6/Eya/Six/Dac se retrouvent à la fois chez la drosophile et les gnathostomes [Ercllick et al., 2009 ; Vopalensky & Kozmik, 2009]. De la même façon, d'autres modules génétiques ont été conservés, tels que celui impliquant le morphogène HedgeHog (Hh) au cours de la vague de différenciation des précurseurs rétiniens dans le champ optique [Neumann & Nuesslein-Volhard, 2000 ; Donner & Maas, 2004]. En effet, que ce soit chez la drosophile ou chez les gnathostomes, les éléments et mécanismes impliqués lors de la progression de cette vague de différenciation neurale sont en partie conservés.

Ainsi, la grande conservation de ces modules chez deux taxons phylogénétiquement très éloignés suggère très fortement une homologie des réseaux et interactions génétiques impliqués dans le développement de l'œil à l'échelle des bilatériens. Toutefois, cela n'implique pas forcément une homologie à l'échelle des organes. Il est en effet clair que des modules génétiques entiers peuvent être recrutés de façon indépendante dans différents territoires sans que cela n'implique des homologies d'organes [Harris et al., 2002]. Dans le cas de l'œil, selon les hypothèses qui prévalent actuellement, les conservations observées de ces réseaux génétiques pourraient être liées à des rôles ancestraux très conservés, par exemple dans la différenciation cellulaire ou la détermination de phénotypes cellulaires particuliers, comme l'expression des opsines. Ces mécanismes anciens, permettant initialement la différenciation cellulaire, auraient été recrutés, de façon indépendante dans différents taxons, dans des processus de morphogenèse [Pichaud et Desplan, 2002 ; Pichaud et al., 2001 ; Vopalensky & Kozmik, 2009]. Ces conclusions conduisent aujourd'hui à cibler les comparaisons sur des recherches d'homologies entre types cellulaires et non plus à l'échelle de l'organe.

II.A. 2. Une approche cellulaire de l'évolution de l'œil

L'idée selon laquelle les conservations des mécanismes entre drosophile et souris reflètent des mécanismes anciens de différenciation cellulaire est actuellement généralement admise. La question de l'homologie des organes visuels fait donc place aujourd'hui à un champ d'investigation intense, visant à préciser la composition cellulaire des organes visuels (définis comme pouvant percevoir la lumière et sa direction) chez le dernier ancêtre commun des bilatériens, ou des métazoaires. Ces travaux reposent sur l'étude comparée des programmes génétiques contrôlant le développement des organes visuels chez un spectre large d'espèces, comprenant par exemple l'annélide *Plathynereis dumerilii*, dont l'étude s'est avérée particulièrement fructueuse [Arendt et al., 2004], mais également des cnidaires [Kozmik et al., 2008 ; Suga et al., 2008].

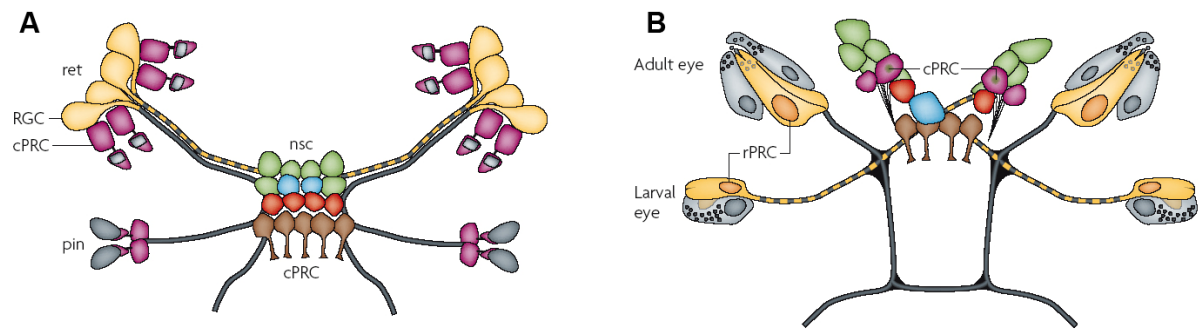


Figure 12. Répartition des types cellulaires dans les structures optiques : comparaison entre les gnathostomes (A) et les annelides (B). nsc : nucleus suprachiasmaticus ; pin : glande pinéale ; ret : rétine ; RGC : Retinal Ganglionnar Cells ; cPRC : ciliary PhotoReceptor Cells [Tiré de Arendt et al., 2008]

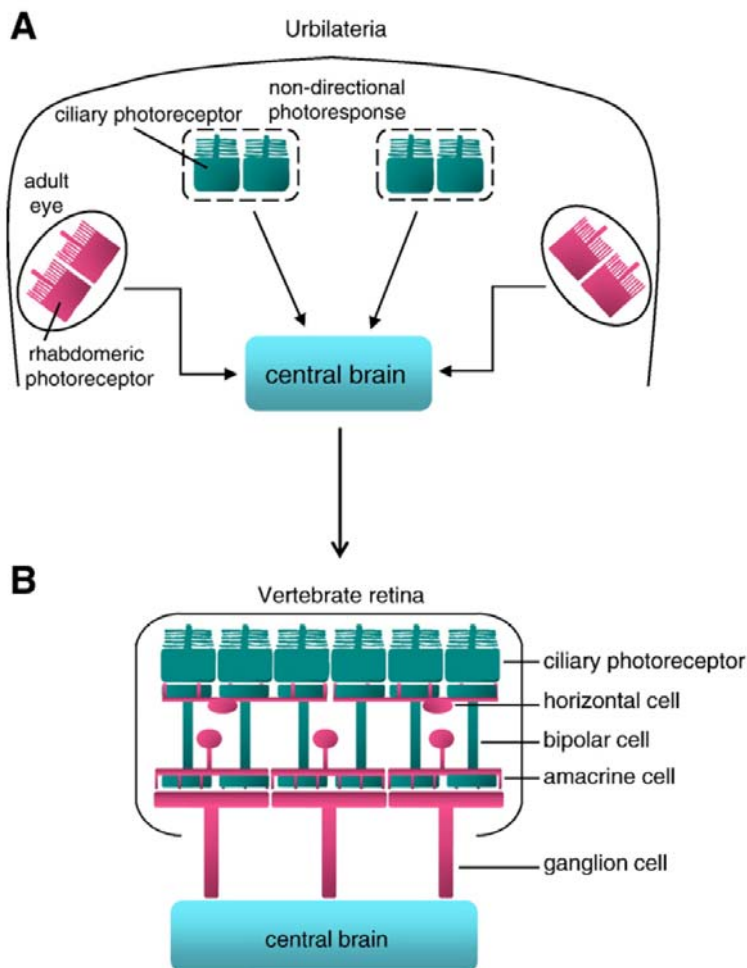


Figure 13. Origine des systèmes visuels des bilatériens - Modèle 1. A. Ce modèle met en jeu deux populations distinctes de photorécepteurs chez l'ancêtre commun des bilatériens : les cellules rhabdomériques (en rose) sont localisées dans les structures optiques alors que les photorécepteurs ciliaires (en vert) sont présentes dans le cerveau. La lignée des arthropodes aurait conservée cette configuration alors que l'œil des vertébrés aurait évolué à partir des cellules du cerveau. B. La rétine des vertébrés est une structure composite constituée à la fois de cellules ciliaires (photorécepteurs) et rhabdomériques (cellules ganglionnaires). Les cellules ganglionnaires, horizontales et

amacrines seraient d'origine rhabdomérique alors que les cellules bipolaires et les photorécepteurs seraient d'origine ciliaire. [Tiré de Erlik et al., 2009]

Deux notions émergent actuellement sur la base de ces travaux :

(1) la comparaison des organes visuels à l'échelle des bilatériens suggère que l'œil ancestral était vraisemblablement composé d'un très petit nombre de cellules, parmi lesquelles des cellules pigmentées et des cellules photoréceptrices (les premières jouant un rôle essentiel pour détecter la direction de la lumière). Deux types de photorécepteurs, rhabdomériques et ciliaires, différant par leur morphologie, leur mécanisme de transduction et les programmes génétiques contrôlant leur différenciation, existaient également chez l'ancêtre commun des bilatériens (cf. Figure 10 et 11). La séparation de ces deux types cellulaires pourrait même avoir précédé la séparation entre bilatériens et cnidaires [Suga et al., 2008]. Les cellules ciliaires sont situées au niveau du système nerveux chez les protostomiens alors que chez les gnathostomes, elles sont présentes dans les organes photorécepteurs (yeux et glande pinéale). Au contraire, les cellules rhabdomériques sont toujours retrouvées au niveau des structures optiques [Arendt, 2008 ; cf. Figure 12].

(2) l'évolution des cellules de l'œil s'est faite par spécialisation de différents types cellulaires à partir de d'un petit nombre de cellules ancestrales multifonctionnelles, capables de détecter la lumière et sa direction, mais également d'induire des déplacements phototactiques. Ces cellules ancestrales devaient donc déjà contenir les éléments de bases de la perception lumineuse : les opsines et la voie de transduction du message nerveux qui leur est associée, ainsi que les granules de pigments. Ce type de cellule photosensible existe chez la larve de l'éponge *Reneira* ou la larve planula de la cnidaire *Tripedalia cystophora* [Leys & Degnan, 2001 ; Nordstrom et al., 2003 ; Arendt et al., 2009]. De plus, les cils des cellules photoréceptrices pourraient être un vestige de cils locomoteurs présents sur la cellule ancestrale, comme c'est toujours actuellement le cas chez des eucaryotes unicellulaires ou les larves aquatiques d'invertébrés [Jekely, 2009 ; Arendt et al., 2009].

II. B. Des scénarios évolutifs encore controversés

La composition cellulaire précise de l'œil ancestral des métazoaires, les premières étapes de son évolution ainsi que les scénarios évolutifs ayant conduit à la diversité des organes observés dans les différents taxons sont loin d'être clairs. Deux modèles distincts, qui impliquent des origines assez différentes pour les différents types cellulaires de la rétine des vertébrés, dominent actuellement le champ thématique.

II. B. 1. Modèle 1 : des organes ancestraux distincts comportant des photorécepteurs rhabdomériques ou ciliaires

Le premier postule que les cellules ganglionnaires des vertébrés et les cellules photoréceptrices des insectes sont apparentées [Arendt et al., 2003, 2004]. Cette hypothèse s'appuie sur deux types d'arguments. Tout d'abord, les programmes génétiques qui

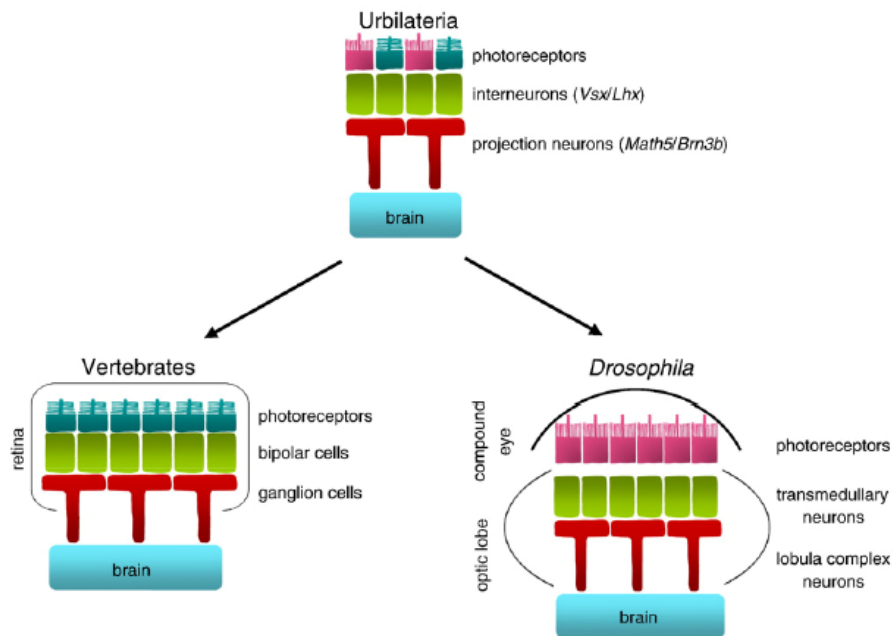


Figure 14. Origine des systèmes visuels des bilatériens - Modèle 2. Dans ce modèle, le système visuel ancestral contient à la fois des cellules ciliaires (en bleu) et rhabdomériques (en rose), connectées en amont de la première série d'interneurones (en vert) ; la deuxième série d'interneurones (en rouge) projette vers le système nerveux. Dans les lignages menant aux vertébrés et aux arthropodes, un seul type de photorécepteurs a été conservé dans les structures optiques. [Tiré de Erclik et al., 2009]

contrôlent la différenciation de ces deux types cellulaires présentent des similitudes. Ils impliquent ainsi l'activité de facteurs de transcription tels que Pax6/ey et Math5/Atonal au cours de leur formation et, dans les deux cas, ces cellules sont les premières à se différencier, lors d'une vague de différenciation initiée par Hh [Pichaud et al., 2001 ; Donner & Maas, 2004]. De plus, la voie de transduction du message lumineux, en aval de ces opsines, est la même [Isoldi et al., 2005].

Les cellules rhabdomériques et ciliaires sont présentes dans des organes distincts chez la plupart des métazoaires étudiés (amphioxus, ascidie, annélides ; cf. Figures 12 et 13) [Lamb, 2007]. Ce scénario pose donc la question de leur regroupement dans la rétine des vertébrés. Une possibilité serait que les cellules ciliaires pourraient avoir envoyé des projections synaptiques vers les cellules de type rhabdomérique. Chez la myxine, c'est effectivement ce que l'on observe : les photorécepteurs ciliaires sont en connexion directe avec des cellules ganglionnaires dans la rétine [Holmberg et al., 1977]. Ces cellules ciliaires et rhabdomériques se seraient ensuite diversifiées pour former les neurones intermédiaires, composant la rétine de la lamproie et des gnathostomes.

II. B. 2. Modèle 2 : un œil ancestral élaboré comportant à la fois des photorécepteurs rhabdomériques et ciliaires

Le second modèle a été proposé par l'équipe d'Erclik et est basé sur le fait que les premiers et deuxièmes interneurons des structures optiques de drosophile et des vertébrés sont apparentés (cf. Figure 18). En effet, les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires de vertébrés expriment les mêmes facteurs de transcription que le lobe transmédule et le complexe lobulaire, respectivement, de la drosophile [Erclik et al., 2008, 2009].

Selon ce modèle, l'ancêtre commun des bilatériens aurait possédé un organe possédant à la fois des cellules rhabdomériques et ciliaires, ainsi que des neurones intermédiaires spécialisés, permettant de relayer les informations nerveuses jusqu'au cerveau. Suivant cette hypothèse, les cellules ciliaires auraient disparu de l'organe visuel dans la lignée menant aux arthropodes et, dans la rétine des vertébrés, les cellules rhabdomériques se seraient incorporées aux intermédiaires neuronaux secondaires (tel que le mentionne le premier modèle) ou auraient été perdues. Cependant, il existe très peu d'espèces contenant dans leurs organes visuels à la fois des cellules ciliaires et des cellules rhabdomériques (hors cellules ganglionnaires) [Eakin & Brandenburger, 1980 ; Nilsson & Arendt, 2008].

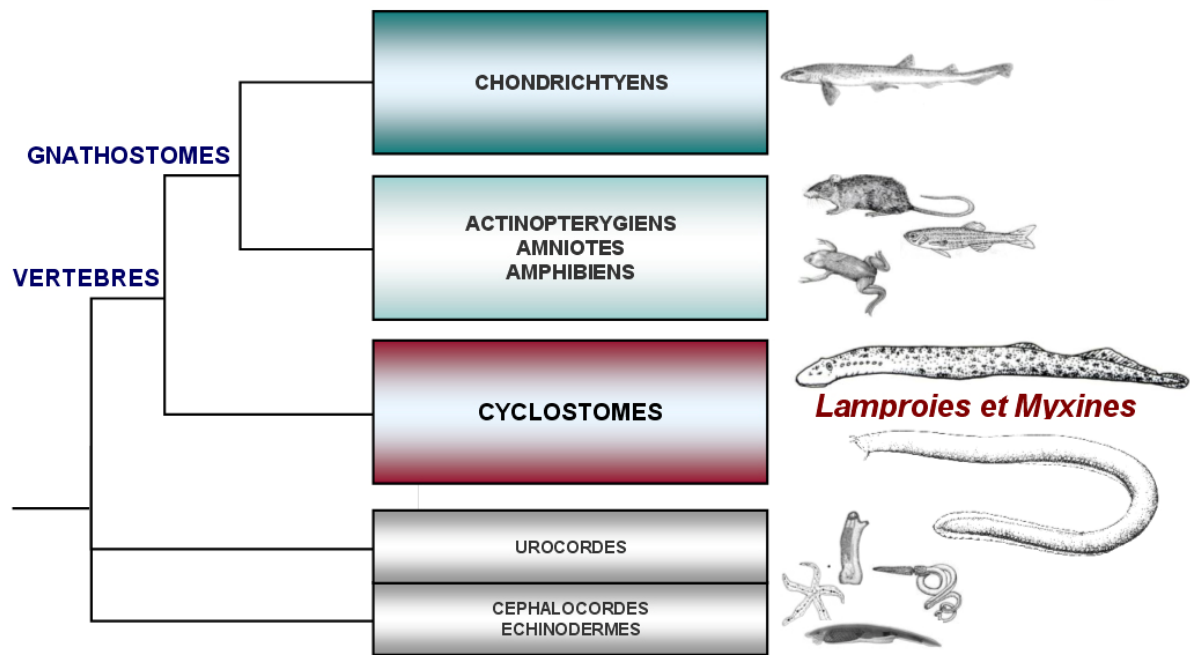


Figure 15. Phylogénie des deutérostomiens. L'embranchement des deutérostomiens est composé des vertébrés et des prochordés (urochordés, céphalochordés et échinodermes). Parmi les vertébrés, cet embranchement est divisé en deux : la lignée des cyclostomes (lamproie et myxine) et la lignée des gnathostomes. Ce dernier est lui-même composé de deux taxons : les chondrichthyens (requins, chimères et raies) et les ostéichthyens (parmi lesquels on trouve les actinoptérygiens, les amniotes et les amphibiens).

Ces deux modèles ne sont cependant pas exclusifs. En effet, dans les deux cas il est possible que les interneurones secondaires dérivent des cellules rhabdomériques et ciliaires. Ces neurones se seraient spécialisées dans l'analyse du signal lumineux et auraient perdu leur capacité à détecter la lumière [Erclik et al., 2008 ; Nilsson & Arendt, 2008]. Cependant, seule l'étude plus poussée sur les facteurs moléculaires impliqués et sur un nombre d'espèce plus important serait nécessaire pour clarifier ce débat.

III. Origine de la rétine chez les vertébrés : intérêts de la lamproie

Du fait de sa position phylogénétique et de ses caractéristiques morphologiques et physiologiques, la lamproie suscite actuellement un intérêt croissant pour comprendre l'origine des vertébrés. La structure de la rétine adulte et son développement présentent des différences notables entre cette espèce et les gnathostomes, ce qui conduit à se poser la question de l'état ancestral de l'organe avant la séparation entre cyclostomes et gnathostomes.

III. A. Intérêt du modèle lamproie dans le domaine évolution-développement chez les vertébrés

III. A. 1. Caractéristiques générales

Les lamproies appartiennent aux cyclostomes (ou agnathes), ainsi nommées de par leur bouche « ventouse », sans mâchoires, formée par des cercles concentriques de dents. Les cyclostomes comprennent deux groupes, séparés depuis plus de 500 millions d'années : les myxines et les lamproies (cf. Figure 15) et constituent le groupe frère des gnathostomes (ou vertébrés à mâchoires). Longtemps débattue, leur monophylie est aujourd'hui largement admise, étant soutenue par comparaison des séquences d'ARN ribosomal (18S et 28S), de séquences protéiques et d'ADNc [Stock & Whitt, 1992 ; Mallatt & Sullivan, 1998 ; Kuraku et al., 1999 ; Kuraku & Kuratani, 2006 ; Mallatt & Winchell, 2007]. Malgré une faible représentation numérique (moins de 100 espèces), ce groupe occupe une position phylogénétique clef et son étude est indispensable pour préciser les grandes caractéristiques du dernier ancêtre commun à l'ensemble des vertébrés.

Une limitation majeure pour l'étude du développement embryonnaire des myxines est la difficulté à obtenir des œufs. Seul le laboratoire de Shigeru Kuratani a réussi à résoudre ce problème dans un passé récent mais, même dans ce cas, la quantité d'œufs obtenus reste très faible (de l'ordre de quelques dizaines par an) [Ota & Kuratani, 2008].

La plupart des études de type évolution-développement conduites chez les cyclostomes portent donc sur les lamproies. Celles-ci comprennent environ 38 espèces, dont les grandes caractéristiques étaient déjà fixées au Cambrien inférieur comme en témoignent

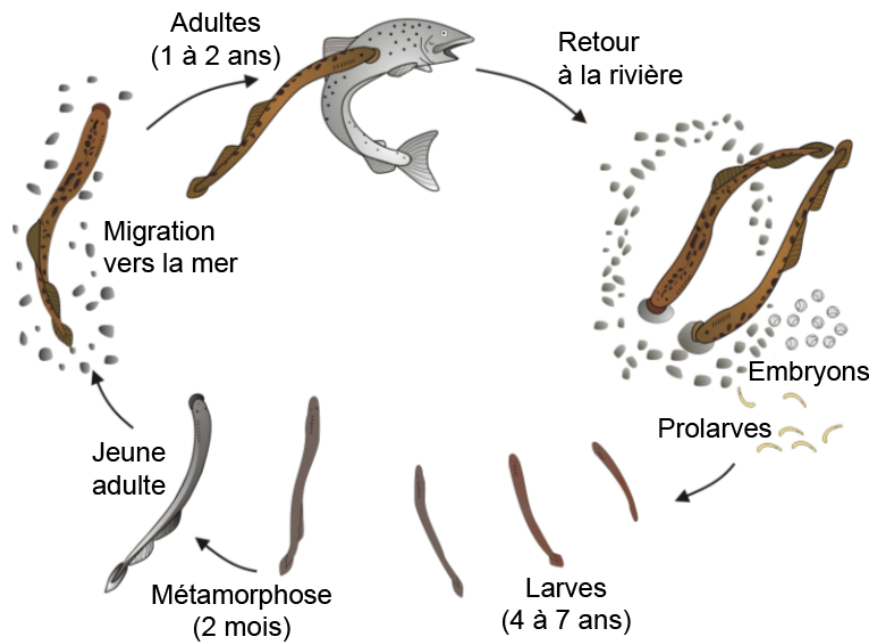


Figure 16. Cycle de vie de la lamproie *Petromyzon marinus*.

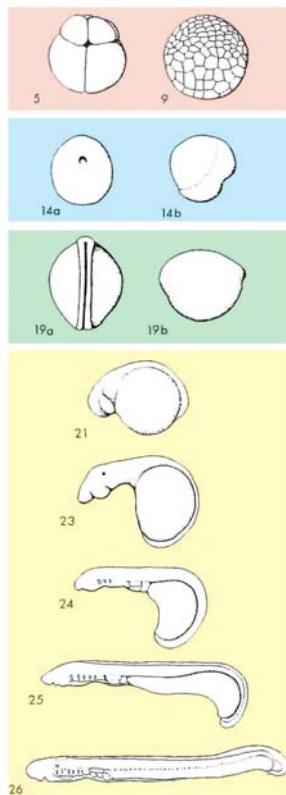


Figure 17. Développement embryonnaire de la lamproie *Petromyzon marinus*. En rouge, la période de segmentation représentée par les stades 5 et 9. En bleu, la gastrulation représentée par le stade 14 avec une vue du blastopore (a) et une vue latérale (b). En vert, la neurulation est représentée par le stade 19 avec une vue de la gouttière neurale (a) et une vue latérale (b). En jaune, les stades au cours desquels a lieu l'organogenèse : au stade 21, la tête protrude et le tube neural se ferme ; au stade 23, les somites se forment et la vésicule otique est visible ; au stade 24, la cavité cardiaque et les fentes branchiales apparaissent, c'est également le moment de l'éclosion ; au stade 25, le cœur bat et la nageoire dorsale se forme ; au stade 26, la prolarve peut nager et devient pigmentée. [Tables de Y. Tahara, 1988]

les données fossiles [Gess et al., 2006]. Elles forment un groupe monophylétique et sont regroupées en trois sous-familles : les geotriinés (à laquelle appartient *Geotria australis*, présente dans l'hémisphère Sud), les mordaciinés et les petromyzontidés (auxquels appartiennent les *Lampetra fluviatilis*, *Lethenteron japonicum*, ainsi que *Petromyzon marinus*). L'espèce *Petromyzon marinus* tend actuellement à s'imposer comme modèle de référence, du fait de son abondance, en Amérique du Nord comme en Europe, et de la relative facilité à obtenir des embryons en quantité importante.

La lamproie *P. marinus* est une lamproie de grande taille (jusqu'à 1m 20), qui possède un disque buccal pourvu de dents cornées, des yeux pairs apparents chez l'adulte (alors qu'ils restent enfouis sous une couche mésenchymateuse chez la myxine) et deux nageoires dorsales distinctes. Il s'agit d'une espèce migratrice, qui vit en mer mais se reproduit en eau douce, avec un cycle de vie de plusieurs années (cf. Figure 16). La fécondation de l'œuf est externe et les divisions de l'œuf sont totales. Le développement comprend plusieurs phases :

- une phase embryonnaire d'environ 2 semaines pendant laquelle l'organogenèse a lieu (cf. Figure 17) ;
- une phase prolarvaire d'environ 3 semaines, au cours de laquelle les réserves vitellines sont absorbées ;
- une phase partie larvaire d'environ 5 ans. La larve est alors enfouie à la surface des sédiments à proximité des sites de ponte et se nourrit par filtration. A l'issue de cette phase a lieu la métamorphose au cours de laquelle des changements majeurs comme l'apparition du disque buccal et la différenciation des structures olfactives et de l'œil ont lieu.

A l'issue de cette phase, la lamproie marine migre en mer, où elle grandit avec une activité de prédation active pendant un à deux ans. La reproduction se fait après une seconde migration en rivière jusqu'aux frayères.

III. A. 2. Une espèce modèle en cours d'établissement : outils moléculaires et fonctionnels

L'intérêt suscité par la lamproie et notamment *P. marinus* s'est concrétisé avec la mise en place de ressources moléculaires à haut débit. Un séquençage du génome avec une couverture d'un facteur 5,9 a été mis en oeuvre par le Joint Genome Institute, qui a également effectué un assemblage préliminaire, l'annotation ayant été réalisée par le consortium européen Ensembl (<http://pre.ensembl.org>). L'assemblage actuellement disponible consiste en une série de 310 000 contigs d'une taille moyenne de 2,6kb.

Ces données ont conduit à une première estimation en taille du génome, qui aurait une taille de 0,8 milliard de paires de bases. Ceci pourrait constituer une sous-estimation

assez large. En effet, le séquençage a été effectué à partir d'ADN de tissu somatique prélevé chez un adulte. Or, il a été récemment démontré que le génome de lamproie subit au cours du développement précoce des réarrangements majeurs, qui conduisent à l'élimination de séquences en quantité significative [Smith et al., 2009]. Les estimations sur la taille et le nombre de gènes chez la lamproie restent donc vraisemblablement entachées d'erreur. Sa disponibilité s'avère cependant d'ores et déjà un outil important pour la compréhension du génome ancestral des vertébrés et de ses innovations, comme par exemple l'apparition de nouvelles familles de micro-RNAs, de familles multigéniques ou de séquences non-codantes conservées étendues [Heimberg et al., 2008; McEwan et al., 2009 ; Libants et al., 2009 ; Kerner et al., 2009].

Les ressources moléculaires disponibles comprennent également une banque de BAC, construite par le CHORI (Children's Hospital Oakland Research Institute) à partir de cellules sanguines de lamproie *P. marinus* (<http://bacpac.chori.org>). Cette banque comprend plus de 250 000 clones d'une taille moyenne de 113 kb et la couverture du génome est de 13,9. Plus récemment, une deuxième banque de BACS a été construite, cette fois à partir de cellules germinales afin de fournir un accès au génome avant les réarrangements somatiques mentionnés plus haut [Smith et al., 2010]. Cette banque fournit une couverture du génome de 10, avec 170 000 clones d'une taille moyenne de 140kb.

Nous avons également construit dans le laboratoire des banques d'ADNc embryonnaire, larvaire (région céphalique) et adulte (cerveau), à partir desquelles 150 000 ESTs ont été séquencés par le Génoscope d'Evry. Les séquences correspondantes sont clonées et les collections de clones recombinants disponibles sur microplaques conservées à -80°C.

En ce qui concerne les ressources biologiques, plusieurs laboratoires obtiennent très régulièrement des pontes. Celles-ci sont saisonnières et elles s'étalent sur une période d'environ un mois en début d'été. L'embryon se développe en laboratoire jusqu'aux stades prolarvaires inclus et est donc accessible à l'expérimentation pendant ces stades.

Le développement des techniques expérimentales ou fonctionnelles, adaptées des techniques utilisées chez le xénope ou le poisson zèbre, a progressé rapidement au cours des dernières années. Le marquage cellulaire par injection de DiI, des expériences de pertes de fonctions par injection de d'oligonucléotides antisens de type morpholinos et des traitements pharmacologiques, ont ainsi été réalisés, principalement dans le laboratoire de M. Bronner-Fraser (Caltech) [McCauley et al., 2006 ; Sauka-Spengler et al., 2007].

III. A. 3. Apport au domaine évolution-développement

En tant que représentante du groupe frère des gnathostomes, la lamproie présente un intérêt majeur pour préciser les programmes génétiques contrôlant le développement du

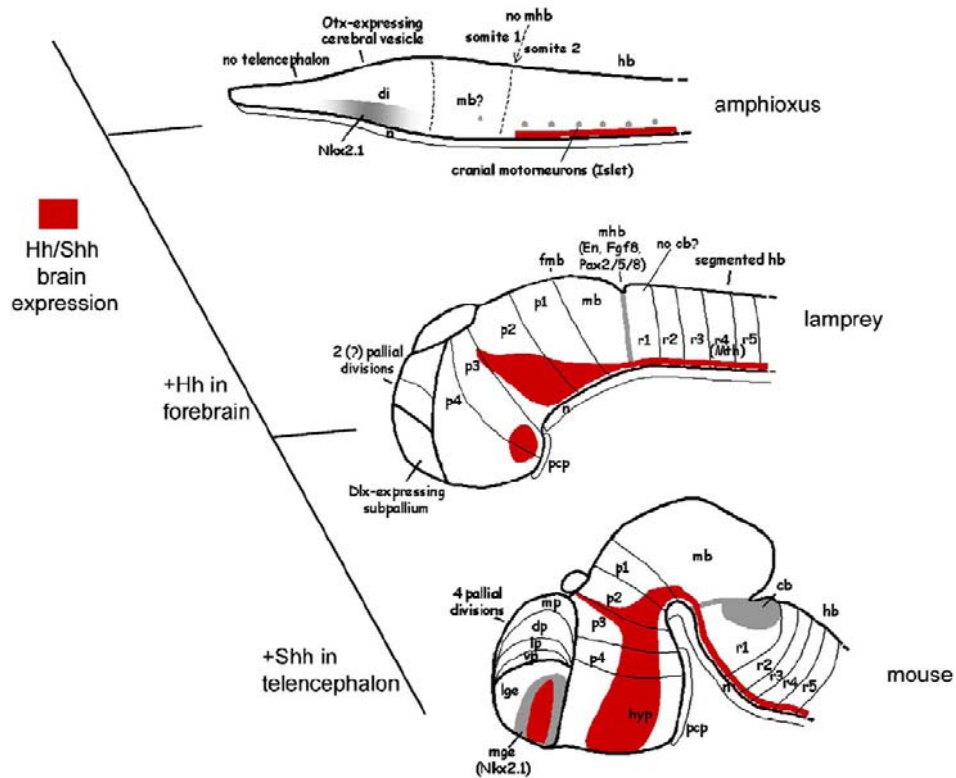


Figure 18. Evolution de la régionalisation du cerveau chez les chordés. Ce diagramme permet de visualiser les différentes acquisitions (en gris) qui ont eu lieu au cours de l'évolution des chordés, via l'organisation du cerveau et l'expression de Shh/Hh (en rouge) chez l'amphioxus, la lamproie et la souris. [tiré de Osorio et al., 2005]

dernier ancêtre commun à l'ensemble des vertébrés. Ces études s'inscrivent donc dans une démarche très générale de macroévolution, qui vise à reconstituer les grandes caractéristiques génomiques et moléculaires ancestrales, présentes à chaque grand nœud de l'arbre des métazoaires.

L'évaluation des conservations entre la lamproie et les organismes modèles des vertébrés a de ce fait été largement ciblée sur des processus correspondant à des synapomorphies des vertébrés, comme les différentes étapes de formation des crêtes neurales, la régionalisation du cerveau antérieur, la formation des différents compartiments cardiaques ou la spécification des appendices impaires (nageoires impaires) [Murakami et al., 2001 ; Freitas et al., 2006 ; Sauka-Spengler et al., 2007]. Ces études ont permis de mettre en évidence un ensemble d'interactions génétiques retrouvées chez les cyclostomes et les gnathostomes, et donc présentes chez le dernier ancêtre commun des vertébrés. Leurs bases génomiques sont actuellement un enjeu majeur de l'étude comparative des génomes.

Elles ont également permis de mettre en évidence des différences dans ces programmes entre cyclostomes et gnathostomes. Ainsi, aucune expression du gène *Shh* n'est détectable dans la partie ventrale du télencéphale chez la lamproie, alors que chez les gnathostomes, ce site d'expression est conservé [Osorio et al., 2005 ; cf. Figure 18]. Dans certains cas, ces différences fournissent une interprétation moléculaire de diversifications morphologiques majeures observées entre cyclostomes et gnathostomes. Les gènes de la famille *Dlx* présentent des différences entre ces deux groupes dans leurs caractéristiques d'expression, qui pourraient être liées à l'acquisition de la mâchoire [Neidert et al., 2000 ; Depew et al., 2002].

La même démarche dans le domaine de la physiologie a conduit à des avancées déterminantes dans la compréhension de l'origine de l'immunité adaptative chez les vertébrés. En effet, des cellules de type lymphocyte T (VLRA+) et lymphocyte B (VLRB+) ont été caractérisées chez la lamproie et pourraient présenter un intermédiaire évolutif de l'immunité adaptative [Guo et al., 2009].

Dans toutes ces études, il est à noter que considérer a priori la lamproie comme représentative de l'état primitif chez les vertébrés est une démarche gradiste et sans fondement. Dans certains cas cependant, la comparaison avec un groupe externe suggère la conservation chez la lamproie de caractères primitifs, perdus chez les gnathostomes (l'inverse étant également tout à fait concevable). Ainsi, l'étude du développement de la glande thyroïdienne chez la lamproie fournit de nouvelles hypothèses quant aux modalités de l'évolution de l'organe chez les vertébrés. En effet, la larve de lamproie présente un endostyle (structure du plancher pharyngien) qui rappelle un organe également présent chez les chordés non-vertébrés comme l'amphioxus. Au cours de la métamorphose de la

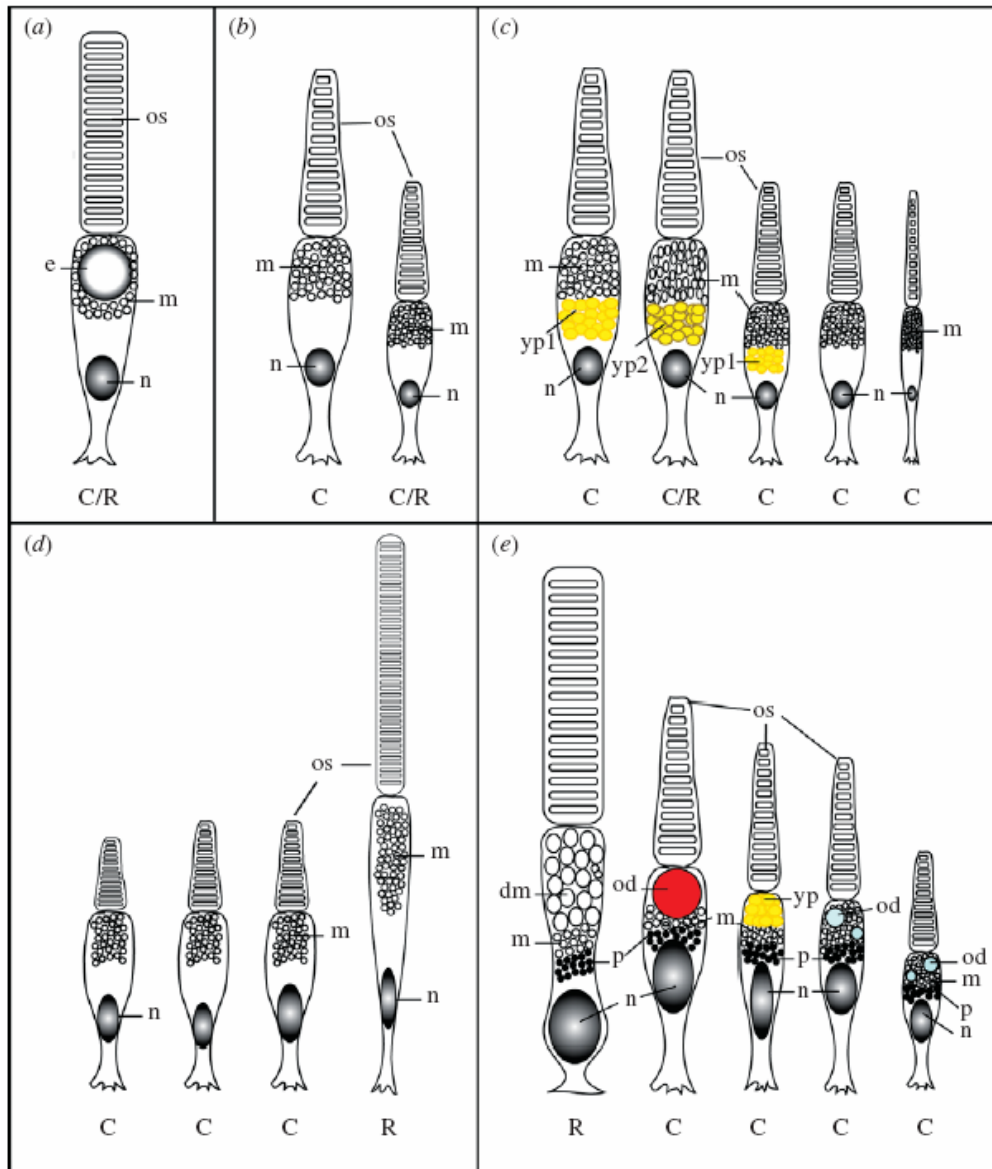


Figure 19. Représentation schématique des types de photorécepteurs chez les vertébrés. A. L'unique cellule photoréceptrice chez la lamproie *Mordacia mordax*. **B.** Les photorécepteurs long et court chez la lamproie de *Petromyzon marinus*. **C.** Les cinq types de photorécepteurs chez *Geotria australis*. Des pigments myoïdes (en jaune) sont présents dans trois de ces sous-classes. **D.** Les quatre photorécepteurs chez la raie géante *Rhinobatos typus* (chondrichtyen). **E.** Les cinq photorécepteurs présents chez le dipneuste *Neoceratodus forsteri* (osteichtyen). L'identité des récepteurs (cônes/bâtonnets) ont été déterminés sur la base de la morphologie cellulaire ainsi que sur les données moléculaires et spectrales. C : cône ; R : bâtonnet ; C/R : hybride entre les deux types de récepteurs ; dm : mitochondries distendues ; e : elliposome ; m mitochondrie du segment interne ; n : noyau ; od : gouttelette lipidique ; os : segment externe ; yp : pigments jaunes. [Collin et al., 2009]

lamproie, cette structure se transforme en glande thyroïdienne très semblable à celle des gnathostomes [Kluge et al., 2005]. Ces données soutiennent l'hypothèse d'une homologie entre l'endostyle observés chez les céphalocordés et la glande thyroïde des vertébrés.

III. B. L'œil et son développement chez la lamproie : intérêt dans le domaine évolution-développement

Comme développé dans la partie II, les comparaisons à très grande échelle évolutive ont conduit à de nouvelles hypothèses quant à l'origine des différents types cellulaires de la rétine des vertébrés ; cependant, l'origine de cet organe reste mal comprise. La reconstruction de l'état ancestral des vertébrés peut contribuer à cette compréhension. L'étude d'un cyclostome est indispensable dans une telle démarche.

III. B. 1. La rétine adulte

L'œil adulte de la lamproie est d'une façon générale très similaire à celui des gnathostomes. En effet, il est lui aussi constitué d'une rétine inversée, d'un iris, d'un cristallin et de muscles extra-oculaires [Lamb et al., 2007]. Comme celle des gnathostomes, la rétine présente une organisation laminaire avec 5 grands types de neurones : photorécepteurs, cellules ganglionnaires, cellules bipolaires, cellules horizontales et cellules amacrines [Robinson & Cain, 1989 ; Fritzsche & Collin, 1990].

Toutefois, des différences importantes peuvent être également notées. Tout d'abord, il existe deux types de photorécepteurs : des photorécepteurs longs et des photorécepteurs courts. L'appartenance de ces photorécepteurs à l'un des types cellulaires connus chez les gnathostomes (cônes ou bâtonnets) a été et reste encore controversée [Ohman, 1971 ; Dickson & Graves, 1979 ; Tonosaki et al., 1989 ; Collin et al., 1999 ; Collin & Trezise, 2004 ; Collin et al., 2009]. En effet, ces deux types de photorécepteurs ont une morphologie cellulaire qui rappelle à la fois celles des cônes et des bâtonnets des gnathostomes : une continuité des disques du segment externe avec la matrice extracellulaire (cônes), la présence d'inclusions membranaires avec le RPE et une membrane plasmique recouvrant la surface des disques du segment externe (bâtonnets) [Ohman, 1976 ; Dickson & Graves, 1979 ; Collin et al., 2009].

Au niveau moléculaire, ces photorécepteurs longs et courts expriment deux types de transducines : la protéine $G_{\alpha L}$, exprimée dans les photorécepteurs longs, et la protéine $G_{\alpha S}$, exprimée dans les photorécepteurs courts [Muradov et al., 2008]. Alors que la séquence de $G_{\alpha S}$ se groupe avec les transducines de types bâtonnets, la séquence de $G_{\alpha L}$ s'aligne aussi bien sur celles de transducines de type cône et bâtonnet. Enfin, plusieurs opsines différentes ont été caractérisées chez *Geotria australis* et chez *Petromyzon marinus* [Collin et al., 2003 ; Davies et al., 2007 ; Davies et al., 2009, Collin et al., 2009] mais leurs caractéristiques

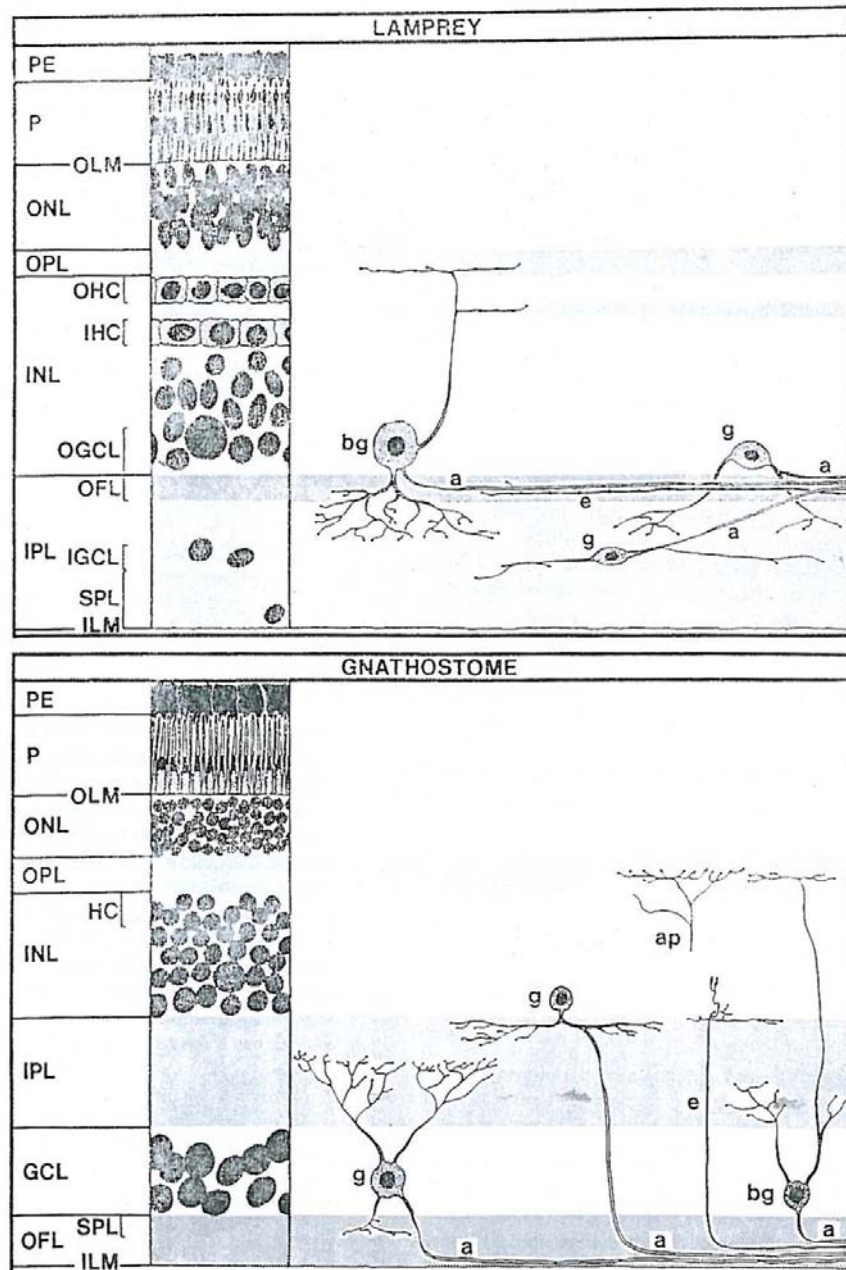


Figure 20. Représentation schématique des rétines de lamproies et de gnathostomes ; positionnement des cellules ganglionnaires et de leurs projections axonales. Chez la lamproie, 74% des cellules ganglionnaires sont de type CECG et 26% sont de type CICG. Chez les gnathostomes, seules 1% des cellules ganglionnaires sont localisées dans l'INL, les autres étant uniquement localisées dans la GCL. a : axone ; ap : projection ascendante d'origine inconnue ; bg : cellule ganglionnaire biphase ; e : projection efferente ; g : cellule ganglionnaire ; GCL : couche de cellules ganglionnaires ; HC : cellules horizontales ; IGCL : couche interne de cellules ganglionnaires ; IHC : cellules horizontales internes ; INL : couche nucléaire interne ; OFL : couche de fibres optiques ; OGCL : couche externe de cellules ganglionnaires ; OHC : cellules horizontales externes ; ONL : couche nucléaire externe ; OPL : couche plexiforme externe ; P : photorécepteurs ; PE : épithélium pigmenté ; SPL : couche plexiforme superficielle. [Tiré de Fritzsche & Collin, 1990].

biochimiques ne les apparentent pas clairement à des opsines de type bâtonnets ou cônes. Leur expression reste par ailleurs à étudier de façon détaillée dans la rétine.

Une autre différence notable concerne la lamination de la rétine adulte. Alors que chez les gnathostomes les cellules ganglionnaires sont restreintes à l'INL exclusivement, chez la lamproie, il est possible de discerner deux populations : les CECG (pour les Cellules Ganglionnaires de la Couche Externe), localisées classiquement dans l'INL et les CICG (pour Cellules Ganglionnaires de la Couche Interne), situées dans la couche plexiforme interne [Robinson & Cain, 1989 ; Vesselkin, 1989 ; de Miguel et al., 1989 ; cf. Figure 20]. De même ; chez la lamproie, il existe deux populations de cellules horizontales : externes (OHC) et internes (IHC), séparées physiquement par une couche plexiforme alors que chez les gnathostomes, toutes les cellules horizontales sont regroupées dans l'INL [Fritzsche & Collin, 1990].

Il est à noter qu'une structure très différente est observée dans le cas de la rétine de myxine. En effet, chez cette espèce, les cellules ganglionnaires et les photorécepteurs sont directement en contact les uns avec les autres : il n'existe pas de neurones intermédiaires [Lamb et al., 2007]. Chez la lamproie, ce type de connexion directe semblerait également exister, mais de façon très minoritaire [de Miguel et al., 1989 ; Rio et al., 1998]. Cette structure simple pourrait correspondre à un caractère primitif, un intermédiaire évolutif entre les structures optiques des chordés non vertébrés et des gnathostomes. Cependant, la présence des interneurones chez la lamproie et les gnathostomes, tend à prouver qu'ils existaient également chez le dernier ancêtre commun des vertébrés. Si on l'admet la monophylie des cyclostomes, il y a donc forcément eu perte secondaire des interneurones chez la myxine.

III. B. 2. Le développement de la rétine chez la lamproie

Compte tenu de la difficulté à obtenir des embryons chez la myxine, la lamproie est actuellement la seule espèce chez laquelle le développement de la rétine ait été abordé. Les mécanismes sous-jacents sont actuellement complètement inconnus mais des études principalement par immunohistochimie ont permis de dégager des caractéristiques très générales du développement de l'organe. Elles mettent en évidence un mode de développement qui présente des similitudes mais également des différences avec les gnathostomes.

La différence la plus évidente est que ce développement met en jeu deux phases successives bien distinctes : la première conduit à la formation d'une rétine de très petite taille dite « rétine centrale », du fait de sa localisation au voisinage immédiat du nerf optique. Cette rétine centrale contient des photorécepteurs qui se différencient précocement, dès la fin des stades prolarvaires. Elle croît en taille jusqu'à environ un an (larves de 5 cm, âge

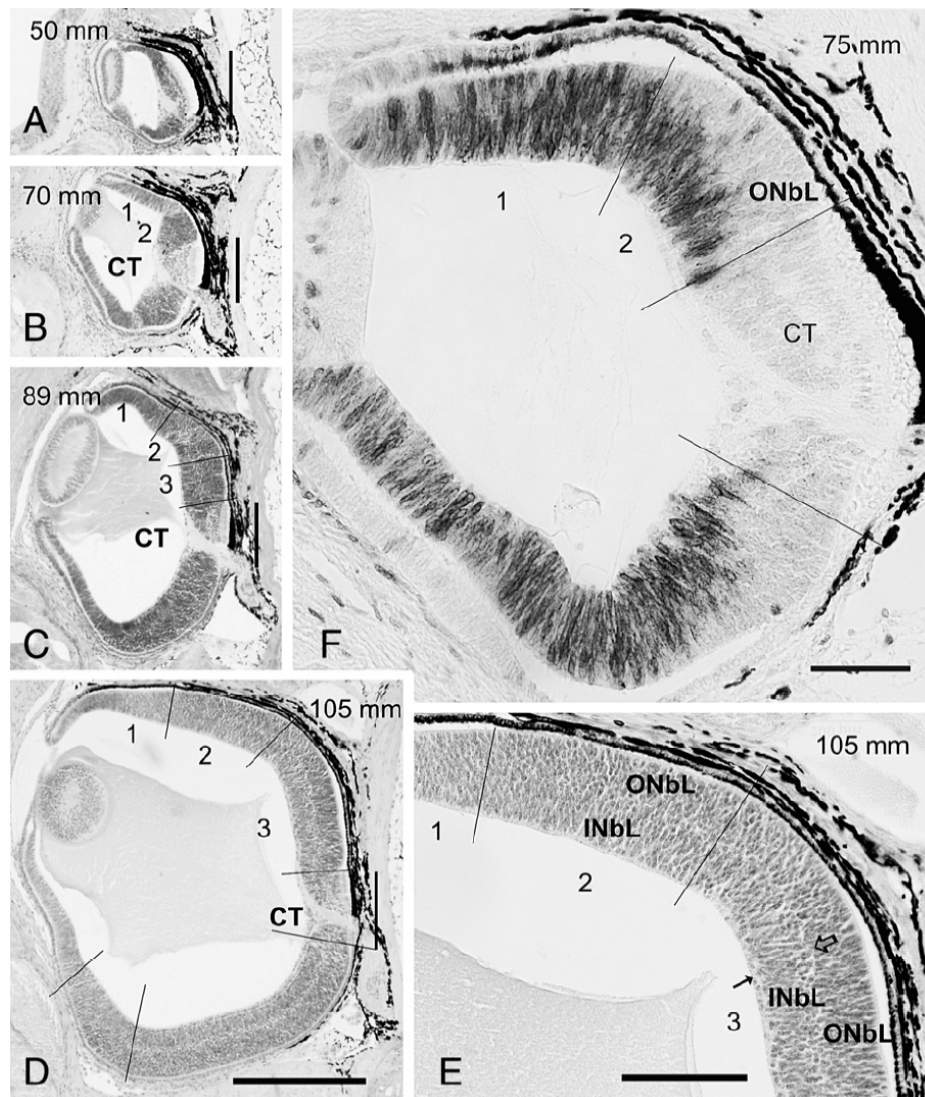


Figure 21. Coupes de l'œil de lamproie à différents stades larvaires. A-D : histologies montrant l'organisation de la rétine en développement avec les délimitations des zones 1/2/3 ainsi que de la rétine centrale (taille de l'animal : de 50 à 105mm). E : agrandissement de la rétine périphérique montrée en D, avec la visualisation des deux couches neuroblastiques interne (INbL) et externe (ONbL) ainsi que la couche plexiforme interne (flèche vide). F : profil d'expression de PCNA chez un individu de 75mm. [Tiré de Villar-Cheda et al., 2008]

estimé) [Villar-Cheda et al, 2008]. A partir de ce moment, dans une deuxième phase, la zone marginale de la rétine centrale devient clairement visible et bien distincte de la rétine centrale. Cette marge commence son expansion et conduit à la formation de la rétine dite « latérale » qui va constituer l'essentiel de la rétine adulte, dont les caractéristiques ont été décrites ci-dessus. Son développement se poursuit jusqu'à la métamorphose, au cours de laquelle intervient la différenciation des photorécepteurs. On peut par ailleurs noter que tout au long des stades larvaires, l'œil reste recouvert d'une couche de mésenchyme dont l'origine embryonnaire n'a pas été déterminée et qui disparaît lors de la métamorphose.

Formation de la rétine centrale. Les premières étapes de la formation de l'œil sont, d'un point de vue morphologique, assez comparables à la situation observée chez les gnathostomes. On observe ainsi la formation d'une évagination à partir du diencéphale ventral (stade 23), puis celle d'une vésicule (stade 24) et enfin de la cupule optique (26), dorsale par rapport au nerf optique. L'épaississement de l'ectoderme de surface caractéristique de la placode cristalline devient visible au stade 24. On observe au stade 26 l'invagination du cristallin et un épaississement de la rétine neurale qui devient bien distincte de l'épithélium pigmenté présomptif.

Aux stades prolarvaires précoces, la rétine est constituée uniquement de neuroblastes en prolifération, positifs pour l'antigène PCNA [Melendez-Ferro et al., 2002]. Cette masse neuroblastique va commencer à se différencier à des stades prolarvaires plus avancés (st 26-28), avec l'apparition d'un seul type de photorécepteurs (courts), caractérisés, morphologiquement et par l'immuno-détection d'opsines [Melendez-Ferro et al., 2002 ; Villar-Cheda et al., 2008]. A ces stades, l'expression du PCNA se restreint presque exclusivement au niveau des marges de la rétine mais des cellules positives isolées, intercalées au milieu des photorécepteurs, peuvent également être détectées en faible nombre [Melendez-Ferro et al., 2002]. La rétine ne présente pas de lamination claire mais l'expression des opsines est localisée dans la population cellulaire la plus externe, au contact de la rétine pigmentée et elle exclut les cellules les plus internes.

Au cours des stades larvaires, des cellules ganglionnaires et des cellules bipolaires ont également été identifiées par microscopie électronique et immuno-détection de neurotransmetteur (Glutamate et Glycine), indiquant l'activité de ces neurones [Dickson & Collard, 1978 ; de Miguel et al., 1989 ; Villar-Cerevino et al., 2006]. La présence de cellules horizontales a également été proposée sur la base de coloration de Golgi [Robinson and Cain 1989] mais à un stade larvaire mal précisé. Aucune indication claire de différenciation de ces dernières, ni de celle de cellules amacrines n'a été publiée à ce jour aux stades larvaires, l'œil étant généralement considéré jusqu'à la métamorphose comme une structure capable de percevoir la lumière mais pas de former une image.

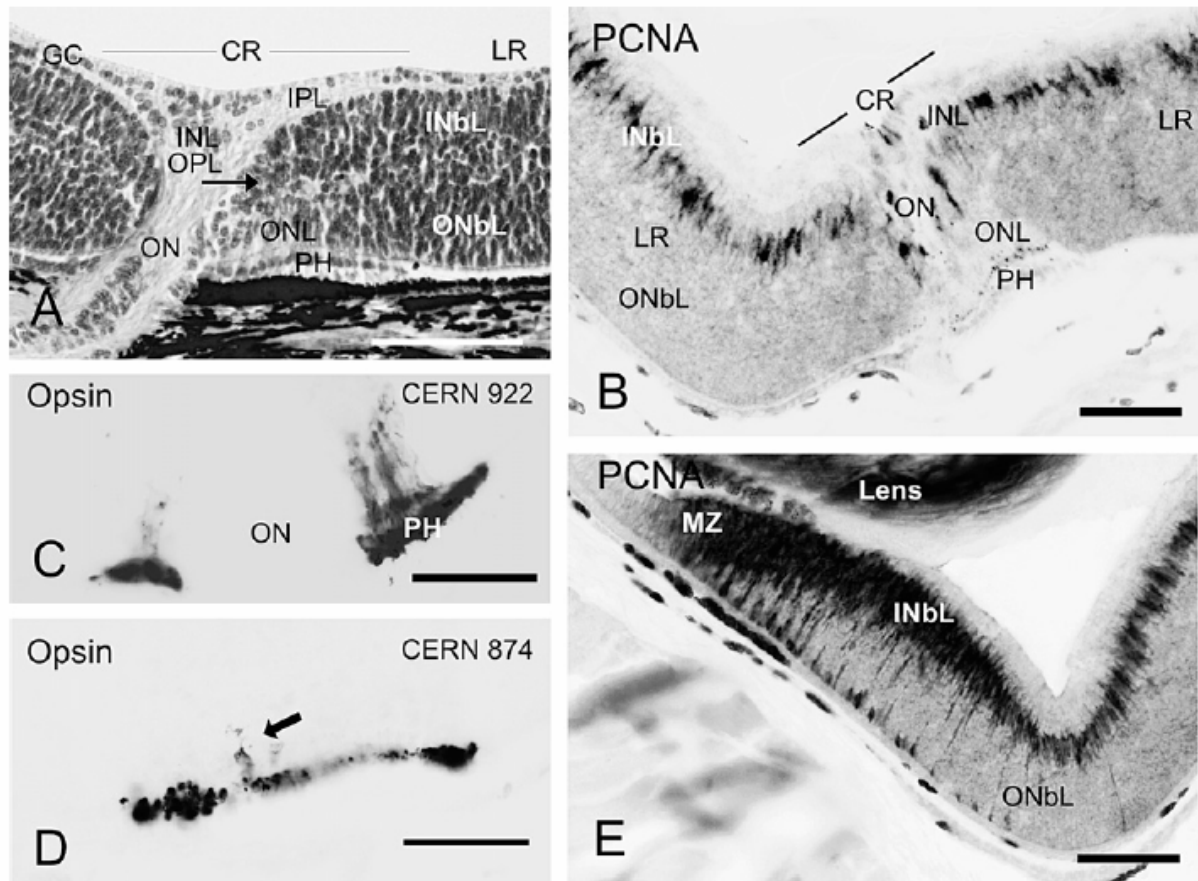


Figure 22. Coupes transverses de la rétine prémétamorphique de lamproie. **A.** Histologie avec une coloration éosine-hématoxyline sur une coupe montrant le nerf optique, la rétine centrale et la rétine périphérique adjacente. **B-D.** Détail d'une rétine centrale marquée après immunohistologie avec PCNA (**B**) ou les opsines (**C, D**). En **C**, on peut apercevoir des photorécepteurs immatures marqués par l'anticorps anti-opsine (la flèche en **D**). **E.** Détail d'une rétine périphérique marquée après immunohistologie avec PCNA. CR: rétine centrale ; LR: rétine périphérique ; INbL: couche neuroblastique interne ; INL: couche nucléaire interne ; MZ: marge ; ON: nerf optique ; ONbL: couche neuroblastique externe ; ONL: couche nucléaire externe ; PH: photorecepteurs. [Tiré de Villar Cheda et al., 2008]

Formation de la rétine latérale. Dès la fin des stades prolarvaires, la rétine centrale est bordée d'une population de cellules qui ne devient visible qu'au cours des stades larvaires (larves de plusieurs cm). Elle est clairement formée de deux couches cellulaires, l'une dans le prolongement de la rétine pigmentée, l'autre dans le prolongement de la rétine neurale centrale. Cette marge va s'étendre de façon importante jusqu'à la métamorphose, formant ainsi la rétine dite latérale dont dérive l'essentiel de la rétine adulte [Dickson & Collard, 1978].

L'analyse histologique permet de visualiser deux zones dans cette rétine latérale chez des larves de stades intermédiaires (7-10 cm) [Villar-Cheda et al., 2008 ; cf. Figure 21] :

- Une zone centrale (zone 2 en Fig.21), qui se situe au voisinage direct de la rétine centrale différenciée précocement. On y distingue deux couches de neuroblastes sur la base de la forme de leurs noyaux : une couche de neuroblastes internes (noyaux arrondis) qui exprime l'antigène PCNA et une couche de neuroblastes externes, négative pour ce marqueur (noyaux allongés, sauf pour des cellules situées dans la partie interne, identifiées comme des cellules ganglionnaires sur la base d'études de projections).
- Une zone périphérique (zone 1), plus mince, qui exprime le PCNA sur toute sa largeur et ne présente pas de distinction entre les neuroblastes internes ou externes sur une base histologique.

A des stades plus tardifs (larves de 11 cm jusqu'aux stades pré-métamorphiques), une troisième zone (zone 3) s'individualise au voisinage de la rétine centrale. Elle se caractérise par l'apparition d'une couche plexiforme interne et d'une population peu dense de cellules (cellules horizontales présomptives), située entre les couches interne et externe de neuroblastes. A ce stade, le marquage PCNA est observé principalement dans la couche interne de neuroblastes, avec un gradient clair du nombre de cellules marquées du centre vers la périphérie, seule la région marginale non laminée de la rétine latérale présentant un marquage dans toute sa largeur (cf. Figure 22). A ce stade, on note également un amincissement de la marge, qui s'amincit dans sa partie la plus distale, où l'iris va se développer (zone ciliaire, négative pour le PCNA).

La zone 3 prend une extension de plus en plus importante et aux stades pré-métamorphiques (larves de plus de 12 cm), elle occupe la quasi-totalité de la rétine latérale à l'exception d'une zone marginale restreinte ne présentant pas de lamination et positive pour le PCNA dans toute sa largeur (cf. Figure 22). Aucune expression des opsines n'est détectée à ce stade dans la rétine latérale. C'est seulement au cours de la métamorphose que la différenciation terminale des photorécepteurs a lieu sur la base de l'expression des opsines et de l'apparition des segments externes [Villar-Cerviño et al., 2006].

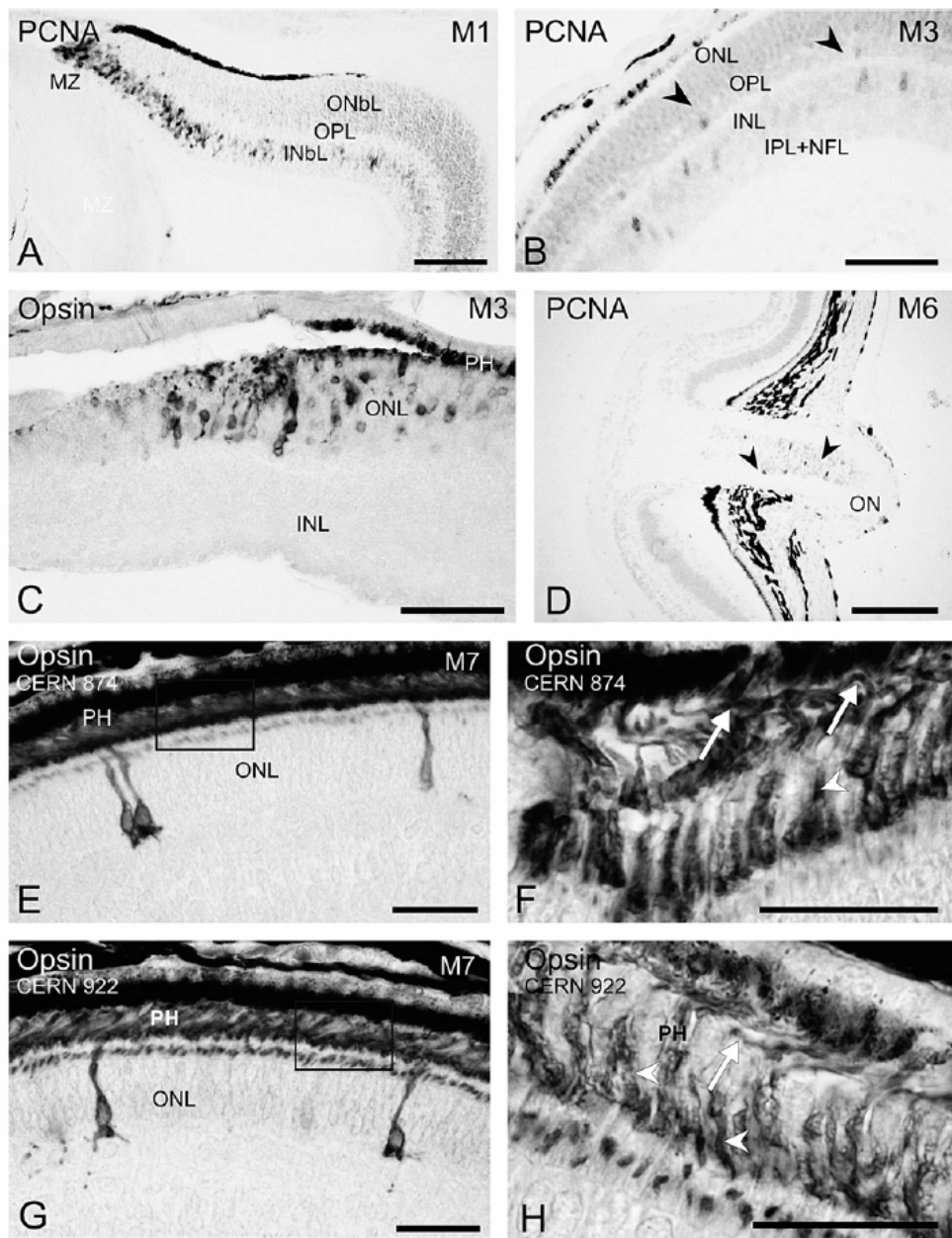


Figure 23. *Immunohistologie de la rétine métamorphique de lamproie.* A,B. Restriction du marquage PCNA dans la rétine périphérique ; la flèche indique des cellules migrant vers l'ONL. C. Expression d'opsine dans les photorécepteurs de la rétine périphérique. D. Nerf optique contenant des cellules en prolifération (flèches). E - H. Immunohistologie détectant les opsines, ainsi que des photorécepteurs immatures. Les photorécepteurs longs (flèches noires) et courts (flèches blanches) ne sont pas localisés au même endroit. IPL : couche plexiforme interne ; NFL : couche de fibres optiques ; OPL : couche plexiforme externe. [Tiré de Villar Cheda et al., 2008]

Bien que cette rétine périphérique occupe la majeure partie de la rétine adulte, seules les cellules ganglionnaires semblent être différenciées lors de la métamorphose de l'animal [Robinson & Cain, 1989]. Cette étude histologique est soutenue et complétée par une caractérisation immunologique indiquant la présence de calrétinine, de glutamate et de glycine dans les cellules ganglionnaires de la rétine périphérique [Villar Cervino et al., 2006].

Les autres types cellulaires sont reconnaissables morphologiquement mais sont dans un état « immature » [Robinson & Cain, 1989]. Les cellules amacrines et horizontales ne se distinguent neurochimiquement les unes aux autres qu'au début de la métamorphose de l'animal [Abalo et al., 2008]. De même, les parties externes et internes des photorécepteurs se distinguent à la fin de la métamorphose [De Miguel et al., 1989]. Ainsi, les différents types cellulaires se différencient dans un intervalle de temps très long (plusieurs années), permettant de ségréger facilement les mécanismes impliqués dans la différenciation neuronale [Robinson & Cain, 1989]. Ainsi, après la métamorphose de l'animal, la rétine périphérique est différenciée. Ceci est soutenu par la présence de nombreux neurotransmetteurs dans des populations de cellules ganglionnaires, amacrines, horizontales et bipolaires de la rétine à ce stade [Villar Cervino et al., 2006].

Enfin, contrairement à la croissance continue de la rétine du poisson zèbre ou des amphibiens, celle de la rétine de lamproie s'arrête lors de la métamorphose de l'animal [Villar-Cheda et al., 2008]. La taille de l'œil augmentant au cours du temps, plus l'animal vieillit, plus la rétine se retrouve étirée et amincie.

CHAPITRE I

Les gènes Otx chez la lamproie *Petromyzon marinus* : expression dans l'œil embryonnaire et larvaire, implications évolutives.

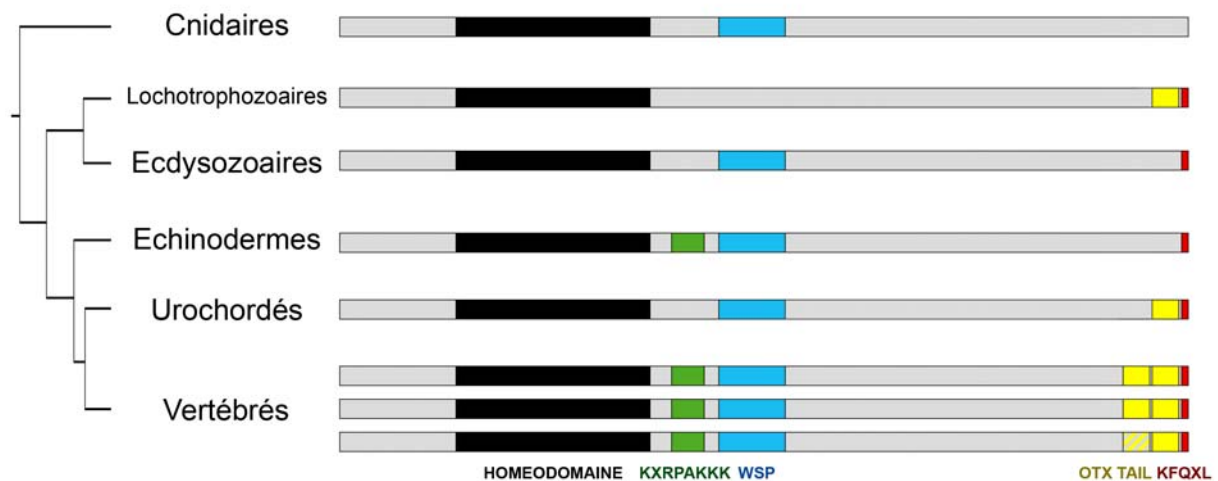


Figure 24. Schématisation des structures des gènes *Otx* chez les eumétazoaires. Le domaine homéotique (cadre noir) et le domaine WSP (cadre bleu) sont généralement retrouvés dans les gènes *Otx* des eumétazoaires. Les deux autres petits domaines : l'OTX tail (en jaune) et le domaine « KFQXL » (en rouge), situés sur l'extrémité C-terminale, sont communs à presque tous les bilatériens. L'OTX tail a été perdu chez les ecdysozoaires et doublé chez les vertébrés. Enfin, la région basique « KXRPAKKK » (en vert) est située directement en aval de l'homéodomaine et n'a été retrouvée que chez les deutérostomiens.

CHAPITRE I : Les gènes OTX chez la lamproie *Petromyzon marinus* : expression dans l'œil embryonnaire et larvaire, implications évolutives.

Les gènes à homéodomaine Otx fournissent un exemple de gènes à homéodomaine très conservés au cours de l'évolution et jouant également des rôles similaires entre des espèces aussi éloignées que la souris et la lamproie. Nous avons dans un premier temps centré la caractérisation moléculaire de la rétine embryonnaire de lamproie sur cette famille de gènes, leurs rôles au cours du développement de l'œil étant bien caractérisés chez les vertébrés modèles.

I. La famille des gènes Otx chez les métazoaires

I.A. Caractéristiques structurales des gènes Otx

Les gènes à homéodomaine de la famille OTX ont été initialement caractérisés sur la base de leur parenté avec le gène *Orthodenticle* (*Otd*), identifié à la suite d'un crible génétique chez la drosophile [Wieschaus et al., 1984]. Ces gènes ont depuis été retrouvés chez tous les grands groupes d'eumétazoaires, excepté chez les éponges [Larroux et al., 2008 ; Galliot et al., 2009]. Ils forment un groupe monophylétique, sur la base des caractéristiques structurales communes (cf. Figure 24) :

- Un homéodomaine de type paired très conservé, possédant une lysine en position 50 de l'hélice 3. Cet acide aminé joue un rôle essentiel dans la spécificité de la reconnaissance de la séquence cible consensus des protéines Otx, TAATC(C/T) [Hanes & Brent, 1989 ; Treisman et al., 1989 ; Chau et al., 2000 ; Klein & Li, 2002] ;
- une région basique « KXRPAKKK », située directement en aval de l'homéodomaine ;
- un motif WSP « SIWSPASESP », perdu chez la drosophile, mais retrouvé chez les cnidaires, les ecdysozoaires et les deutérostomiens [Muller et al., 1999 ; Mazza et al., 2007 ; Simmonet et al., 2006] ;
- une région C-terminale dite Otx « Tail » de 12 acides aminés, qui a subi une duplication à l'origine des vertébrés [Germot et al., 2001] ;
- un motif « KFQXL » à l'extrémité C-terminale, conservé dans cette grande famille génique [Bruce & Shankland, 1998].

I.B. Origine chez les métazoaires

Du fait du caractère spectaculaire et de la similitude des phénotypes mutants observés chez la souris et la drosophile (délétion de segments céphaliques, cf. ci-dessous), ces

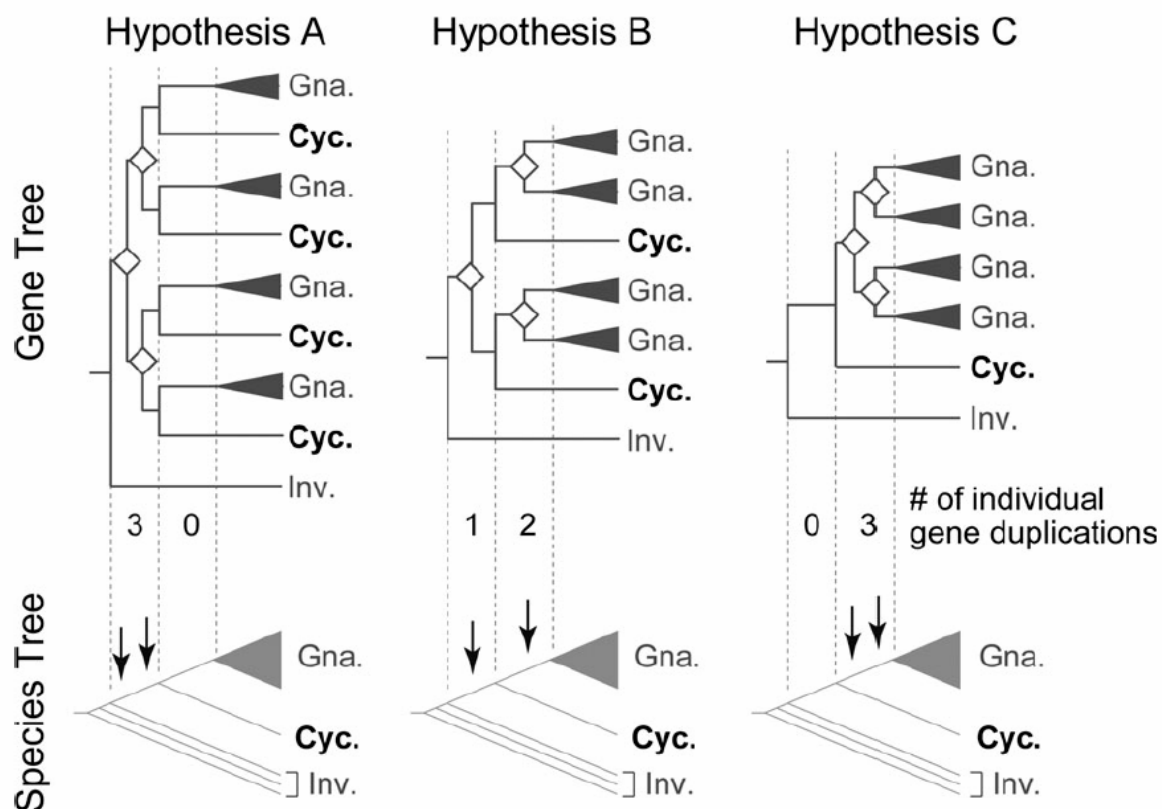


Figure 25. Trois scénarios possibles pour la chronologie des deux duplications du génome. Les phylogénies A, B et C sont illustrées via l'utilisation d'une famille génique fictive comprenant une copie chez les invertérés et 4 copies chez les gnathostomes ; l'état chez les cyclostomes n'aurait pas été modifié depuis leur émergence. Au vu des données actuellement disponibles dans la littérature, l'hypothèse A semble peu probable comparée à l'hypothèse B, soutenue par plusieurs publications. Les nombres de duplications géniques attendues avant ou après la séparation entre cyclostomes et gnathostomes est indiqué au milieu. Les duplications géniques sont symbolisées par des flèches pleines. [Tiré de Kuraku et al., 2009]

gènes ont suscité un intérêt large dans la communauté scientifique et ont été recherchés de façon systématique chez la plupart des grands taxons de métazoaires.

Ces analyses révèlent une origine ancienne au sein de cet embranchement. Aucun gène n'a pour l'instant été identifié chez les éponges, ni chez les cténophores [Galliot et al., 2009]. Des gènes *Otx* ont en revanche été identifiés sans ambiguïté chez plusieurs cnidaires, avec un gène unique chez la méduse *Podocoryne carnea* [Muller et al., 1999], deux chez *Acropora millepora* [de Jong et al., 2006] et trois gènes distincts chez *Nematostella vectensis* [Mazza et al., 2007]. Dans ce dernier cas, les trois gènes présentent une organisation en tandem et sont issus de duplications qui ont suivi la divergence entre cnidaires et bilatériens. Chez ces derniers, des gènes *Otx* ont été caractérisés chez un nombre relativement important de protostomiens : ecdysozoaires (*Drosophila melanogaster*, *Tegenaria saeva*, *Euscorpius flavicaudis*, *Ceanorhabditis elegans*,...) ou lochotrophozoaires (*Helobdella triserialis*, *Dugesia japonica*, *Pristina leidyi*,...).

Si une copie unique a été décrite chez la drosophile, le scorpion *Euscorpius flavicaudis*, l'annelide *Platynereis dumerilii*, la patelle *Patella vulgata* et la sangsue *Helobdella triserialis*, deux gènes ont été identifiés chez la planaire *Dugesia japonica* et chez l'annélide *Pristina leidyi* et trois sont présents chez le nématode *Ceanorhabditis elegans* [Finkelstein et al., 1990 ; Bruce & Shankeland, 1998 ; Umesono et al., 1998 ; Arendt et al., 2001 ; Bely & Wray, 2001 ; Nederbragt et al., 2002 ; Lanjuin et al., 2003 ; Simmonet et al., 2006]. Ces duplications semblent relativement récentes au vu des analyses phylogénétiques disponibles, mais leur chronologie reste à préciser par des études plus détaillées chez les groupes concernés.

Ces gènes ont également été caractérisés chez tous les grands groupes de deutérostomiens : l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*, l'hémichordé *Ptychodera flava*, le céphalochordé *Branchiostoma floridae*, plusieurs urochordés (*Ciona intestinalis*, *Halocynthia roretzi*) et les vertébrés [Gan et al., 1995 ; Wada et al., 1996 ; Williams & Holland, 1998 ; Harada et al., 2000]. Chez ces derniers, les gènes *Otx* forment une petite famille multigénique, comprenant 3 à 6 paralogues qui ont fait l'objet de caractérisations détaillées, écrites ci-après.

I.C. Le cas des vertébrés

Il est aujourd'hui acquis que deux événements de duplications de l'ensemble du génome par ploïdisation sont intervenus dans la lignée des vertébrés, après leur séparation avec les urochordés [Abi-Rached et al., 2002 ; Dehal & Boore, 2005]. La chronologie précise de ces duplications reste cependant indéterminée. S'il est clair qu'elles ont précédé la radiation des gnathostomes, leur chronologie par rapport à la séparation entre cyclostomes et gnathostomes reste controversée, avec plusieurs scénarios possibles [Kuraku & Kuratani, 2006 ; Kuraku et al., 2009 ; cf. Figure 25]. Ces incertitudes tiennent à la difficulté de résoudre

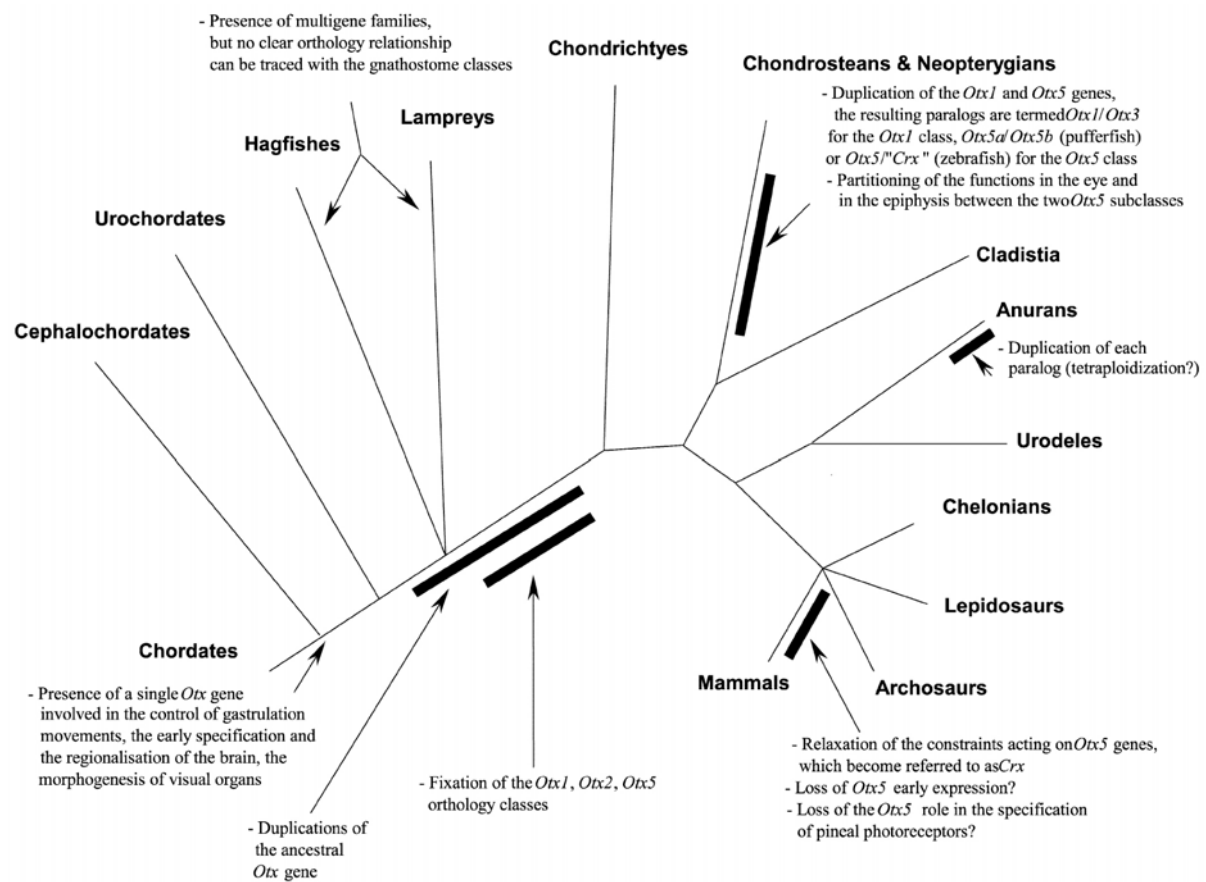


Figure 26. Evolution fonctionnelle des Otx chez les chordés. Au cours de l'histoire évolutive, il y a eu duplication génique, générant 3 copies d'Otx chez les vertébrés, puis fixation des classes établies chez les gnathostomes. La chronologie de ces évènements est mal connue. D'autres évènements de duplications géniques ont eut lieu dans l'embranchement des gnathostomes ; toutefois, ces duplications sont taxon-spécifiques. [Modifié de Plouhinec et al., 2003]

les phylogénies et à l'absence, chez les cyclostomes, de génome d'une continuité suffisante pour pouvoir utiliser des arguments de synténie.

La famille *Otx* illustre parfaitement cette situation. On retrouve chez tous les gnathostomes étudiés trois classes d'orthologie *Otx1*, *Otx2* et *Otx5/Crx*, les gènes *Crx* n'étant autres que des représentants, très divergents, de la classe *Otx5* chez les mammifères et les téléostéens [Plouhinec et al., 2003]. Les représentants de ces classes ont en outre subi des duplications supplémentaires chez les téléostéens, situation fréquemment observée et liée aux polyploïdisations supplémentaires intervenues au cours de l'évolution des actinoptérygiens (cf. Figure 29).

Trois gènes sont également présents chez la lamproie *Petromyzon marinus* ainsi que chez la myxine *Myxine glutinosa* : *OtxA*, *OtxB* et *OtxC* [Germot et al., 2001 ; Suda et al., 2009]. Aucun regroupement clair ne peut être proposé sur la base des phylogénies entre les paralogues de chacune de ces deux espèces. De la même façon, ces gènes ne présentent aucune relation particulière en séquence avec l'une ou l'autre des trois classes identifiées chez les gnathostomes, les phylogénies restant non résolues sur ce point. Le seul regroupement bien soutenu concerne la forme appelée *OtxA* chez la lamproie comme chez la myxine, qui semble donc avoir été fixée précocement chez les cyclostomes [Germot et al., 2001 ; Suda et al., 2009]. Au bilan, l'ensemble de ces données suggère que la présence de trois gènes *Otx* chez les gnathostomes résulte des polyploïdisations qui ont eu lieu avant leur radiation et indique une fixation des classes au sein du taxon. La chronologie et le mode de génération des gènes caractérisés chez les cyclostomes restent en revanche des questions ouvertes.

II. Rôles des gènes *Otx* chez les métazoaires

II .A. Des rôles similaires entre drosophile et vertébrés

La forte conservation des gènes *Otx* chez les eumétazoaires pose la question de leur rôle ancestral, au niveau moléculaire, cellulaire ou dans l'organisme. Aucune analyse fonctionnelle n'ayant été réalisée chez les cnidaires, il est difficile de répondre à cette question. On peut cependant noter les territoires d'expression variés dans lesquels une expression du gène a été décrite dans ce taxon (l'endoderme, le muscle strié, ectoderme) suggèrent des fonctions complexes, dont certaines très précoces [Müller et al., 1999 ; de Jong et al., 2006 ; Mazza et al., 2007].

Des hypothèses plus précises peuvent être avancées chez les bilatériens, les gènes *Otx* présentant des similitudes marquantes en terme d'expression, mais également de fonctions entre protostomiens et deutérostomiens. On retrouve ainsi chez la plupart des espèces étudiées (insectes, annélides, urochordés, céphalochordés) trois grands sites d'expression

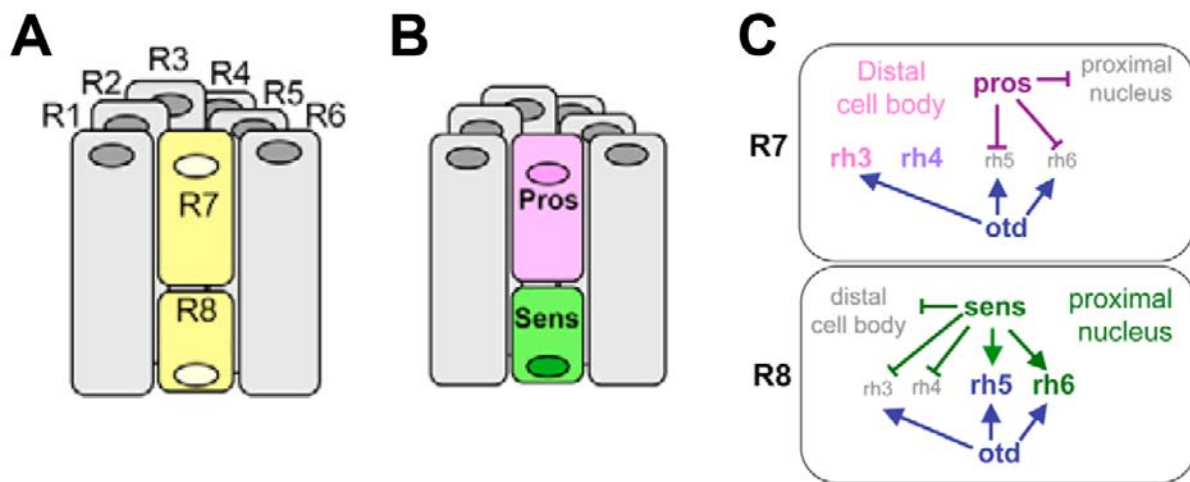


Figure 27. Implication d'Otd, de Pros et de Sens dans la spécification des photorécepteurs R7 et R8 chez la drosophile. **A.** La drosophile possède 8 cellules photoréceptrices : les cellules R1 à R6 sont positionnées à l'extérieur alors que les photorécepteurs R7 et R8 sont internes. Toutes ces cellules expriment le facteur Otd dès leur spécification. **B.** Le photorécepteur R7 exprime également le facteur Pros et l'opsine Rh3 alors que la cellule R8 exprime le facteur Sens et les opsines Rh5 et Rh6. **C.** L'activité des facteurs Pros et Sens va inhiber ou favoriser la transcription des opsines, permettant la ségrégation entre les cellules R7 et R8. [Modifié de Xie et al., 2007].

embryonnaire : les territoires présomptifs des régions antérieures en cours de gastrulation, les régions les plus antérieures du cerveau et les organes sensoriels.

En accord avec ces données, les analyses fonctionnelles conduites chez les organismes modèles ont mis en évidence des rôles essentiels de ces gènes dans la spécification précoce des régions céphaliques [Acampora et al., 1995 ; Matsuo et al., 1995], la régionalisation du cerveau [Millet et al., 1996 ; Suda et al., 1996, 1997] et la formation d'organes sensoriels variés, et cela chez plusieurs organismes modèles. Ainsi des rôles essentiels de ces gènes ont été démontrées dans la formation des soies sensorielles chez *D. melanogaster* [Finkelstein et al., 1990 ; Hirth et al., 1995], la spécification des neurones chémo- et thermo-récepteurs chez *C. elegans* [Lanjuin et al., 2003], la formation des structures de l'oreille interne [Simeone et al., 1993 ; Acampora et al., 1996 ; Mallamaci et al., 1996 ; Morsli et al., 1999] et, comme décrit de façon plus détaillée ci-après, la formation de l'œil chez la drosophile et les vertébrés.

II.B. Le cas des organes visuels

Les gènes de la famille *Otd/Otx* présentent une expression conservée dans les organes photorécepteurs chez un très large spectre de bilatériens [William & Holland, 1996 ; Lacalli, 2004]. Des études fonctionnelles détaillées ont été réalisées chez la drosophile et les vertébrés. Elles montrent des similitudes claires entre les fonctions de ces gènes dans le choix des destins cellulaires ainsi qu'entre les réseaux génétiques qu'ils contrôlent chez ces espèces éloignées.

II. B. 1. Chez la drosophile

Le gène *Otd* est impliqué dans le développement de toutes les structures visuelles, l'organe de Bolwig larvaire, les ocelles et les yeux composés. Ce dernier rôle a été initialement mis en évidence par l'étude d'un mutant hypomorphique, présentant une réduction significative de la taille de l'organe [Vandendries et al., 1996 ; Royet & Finkelstein, 1997]. Chez ces mutants, outre une absence de l'axe proximo-distal, les neurones photorécepteurs sont morphologiquement désorganisés et l'expression de différentes rhodopsines est perturbée.

Des analyses détaillées du rôle du gène dans le contrôle de l'expression de différentes rhodopsines, eux-mêmes exprimés dans différents photorécepteurs des ommatidies, ont permis de mettre en évidence des rôles complexes dans la différenciation des photorécepteurs. Ainsi, au cours de la pupation, *Otd* est impliqué, en coopération avec un autre gène à homéodomaine, *Pph13*, dans la formation des rhabdomères de tous les photorécepteurs [Vandedries et al, 1996 ; Mishra et al, 2010]. A des stades larvaires plus tardifs et chez l'adulte, le gène joue un rôle clé dans la sélection du type de photorécepteur différencié, en trans-activant directement les gènes *Rh3* et *Rh5*, sélectivement exprimés dans certains photorécepteurs internes, et en réprimant l'expression de *Rh6* dans les

photorécepteurs externes [Tahayato et al., 2003 ; Xie et al., 2007 ; Mishra et al., 2010 ; McDonald et al. 2010].

Les interactions moléculaires et réseaux génétiques impliquant *Otd* dans le contrôle de la différenciation des photorécepteurs ont également été précisés. Une étude transcriptomique fondée sur l'étude comparée de souches sauvage et mutante viable a permis de dénombrier une vingtaine de gènes régulés directement par *Otd*, dont des rhodopsines [Ranade et al., 2008]. Dans le cas de la régulation de la rhodopsine dans le photorécepteur R8, la protéine *Otd* s'associe avec le co-facteur *Sens* et se fixe au niveau des séquences promoteurs pour promouvoir la transcription [Tahayato et al., 2003 ; Baotong et al., 2007 ; cf. Figure 27]. L'expression d'*Otd* dans les structures optiques de la drosophile est par ailleurs régulée par les signalisations *Wingless* (*Wg*) et *Hh*. En effet, en absence de *Frizzled* ou de *SMO*, (deux effecteurs des voies *Wg* et *Hh*, respectivement), l'expression d'*Otd* est perdue [Blanco et al., 2009]. Au contraire, l'activation ectopique de la voie *Wg* permet l'expression d'*Otd* dans le primordium optique [Royet & Finkelstein, 1997]. De même, l'activation de la voie *Hh* dans le disque maginal optique permet l'activation d'*Otd* [Blanco et al., 2009]. L'ensemble de ces résultats indique donc que ces deux voies sont nécessaires pour l'activation d'*Otd* dans le disque imaginal de l'œil de drosophile.

II. B. 2. Chez les vertébrés

Des analyses fonctionnelles détaillées des gènes paralogues *Otx1*, *Otx2* et *Otx5/Crx* ont été réalisées chez plusieurs organismes modèles vertébrés, souris, xénope et poisson-zèbre. Elles suggèrent un ensemble de fonctions conservées dans le taxon et cela dans plusieurs aspects du développement de l'œil, la régionalisation de la cupule optique, la spécification de la rétine pigmentaire, la différenciation cellulaire dans la rétine et la formation de la marge ciliaire.

Dans la plupart des cas, ces fonctions impliquent sélectivement certaines classes d'orthologie. Ainsi, en accord avec leur expression localisée dans la partie dorsale de la vésicule optique puis dans le RPE présomptif, les gènes *Otx1* et *Otx2* de souris jouent des rôles précoces dans la régionalisation dorso-ventrale puis dans la spécification précoce du RPE. Les mutants doubles *Otx1*^{+/-} ; *Otx2*^{+/-} présentent ainsi une expansion des marqueurs ventraux tels *Pax2* ou *Six3* dans la vésicule optique et au stade cupule optique, une expression anormale de marqueurs de la rétine neurale dans le RPE présomptif. Par ailleurs, l'expression ectopique d'*Otx2* dans des cellules de rétine aviaire en culture est suffisante pour induire un phénotype pigmenté ; des arguments biochimiques suggèrent une interaction coopérative avec le facteur de transcription *Mitf* dans ce processus [Simeone et al., 1993 ; Bovolenta et al., 1997 ; Martinez-Morales et al., 2001].

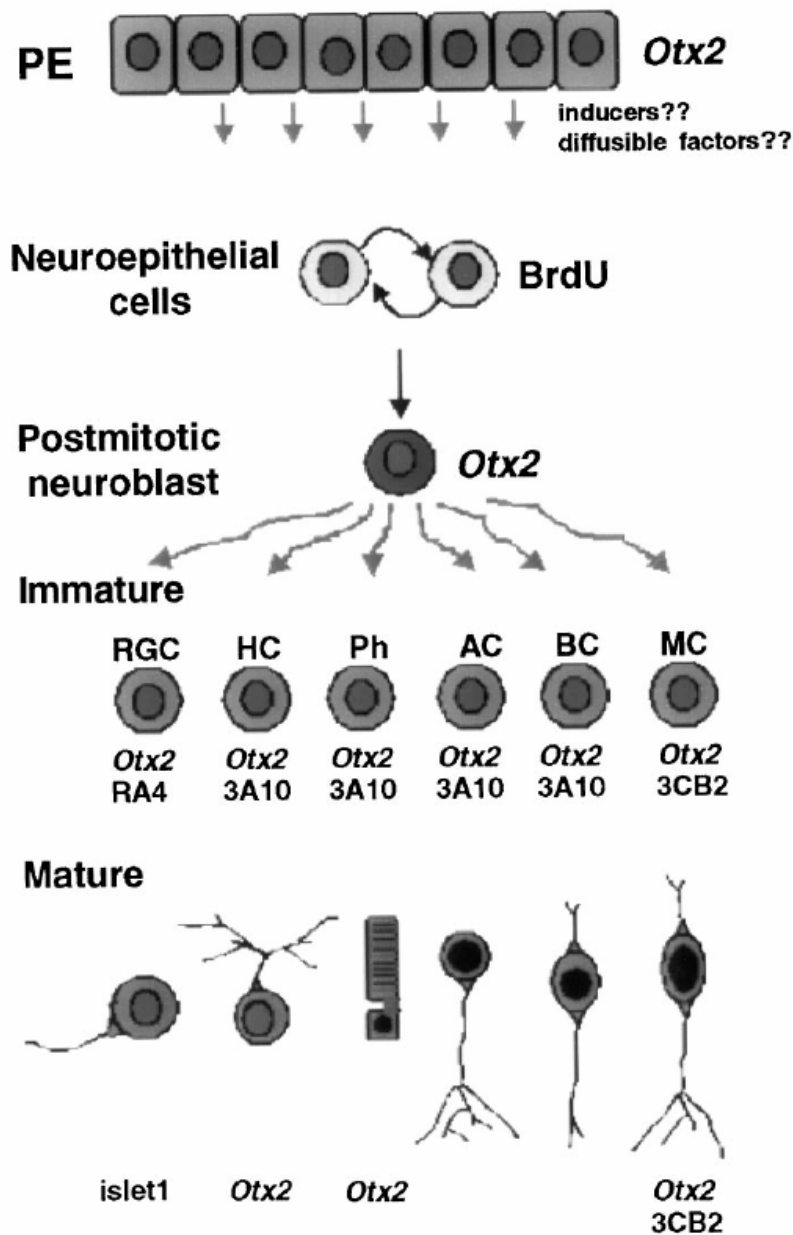


Figure 28. Schématisation de l'expression d'Otx2 au cours de la différenciation de la rétine. Pendant la neurogenèse rétinienne, le RPE génère des signaux essentiels pour la différenciation des cellules de la rétine neurale. Otx2 est exprimé, dans un premier temps, dans tous les neuroblastes rétiniens. Certains types cellulaires (cellules ganglionnaires et amacrines) perdent ensuite l'expression de ce gène, lors de leur maturation finale alors que d'autres (photorécepteurs, cellules de Müller), continuent de l'exprimer. [Tiré de Bovolenta et al., 1997]

Comme chez la drosophile, les gènes de la famille *Otx* sont impliqués dans le contrôle de la différenciation de la rétine neurale, et plus particulièrement celles des cellules bipolaires et des photorécepteurs (cf. Figure 28). Les acteurs majeurs de la famille sont dans ce cas les classes *Otx2* et *Otx5/Crx*. Les mutants murins pour le gène *Crx* présentent ainsi un défaut de différenciation terminale des cellules photoréceptrices, qui ne possèdent pas de segment externe et ne présentent aucune activité électrique [Gamse et al., 2003 ; Furukawa et al., 1999]. On observe par ailleurs des défauts plus marqués (dégénérescence accrue et répression plus importante des gènes spécifiques de ce type cellulaire) dans un fond génétique mutant *Otx2*^{-/-}, ce qui montre que ce facteur est également impliqué dans le maintien et la différenciation terminale des photorécepteurs [Koike et al., 2007].

Ce paralogue est également impliqué dans des étapes plus précoces de leur spécification ainsi que dans la différenciation des cellules bipolaires, comme le montre l'étude de mutants présentant des inactivations conditionnelles du gène [Nishida et al., 2003 ; Koike et al., 2007]. Les expériences par perte et gain de fonction d'*Otx2* et *Otx5/Crx* dans la rétine de xénope ou de poisson zèbre confirment l'implication de ces gènes dans la différenciation de la rétine et notamment la spécification des cellules bipolaires et des photorécepteurs [Vicizian et al., 2003 ; Shen and Raymond, 2004]. Elles montrent également que les différences de fonctions entre les deux gènes paralogues ne sont pas uniquement liées à des différences de profil d'expression mais qu'au moins chez le xénope, les protéines paralogues ne sont pas équivalentes.

Aucune indication fonctionnelle d'un rôle d'*Otx1* dans la différenciation de la rétine neurale n'a pour l'instant été publiée. Au cours de ce processus, l'expression du gène se restreint à la région marginale de la rétine, au niveau de laquelle elle est contrôlée par la voie Wnt canonique [Simeone et al., 1993 ; Li et al., 1994 ; Mori et al., 1994 ; Zhao et al., 2002 ; Tropepe et al., 2000 ; Plouhinec et al., 2005]. En accord avec cette expression, les souris déficientes pour le gène présentent une absence du corps ciliaire ainsi que des malformations au niveau de l'iris et des paupières [Acampora et al., 1996].

III. Evolution fonctionnelle des gènes *Otx* chez les vertébrés : intérêt de la lamproie et du développement de l'œil

III. A. Etat du sujet

Comme indiqué ci-dessus, l'étude fonctionnelle des gènes *Otx* dans le développement de l'œil chez les vertébrés modèles, et notamment chez la souris, met en évidence des fonctions complexes, à des étapes précoces de la formation de l'organe (régionalisation de la vésicule optique, spécification de l'épithélium pigmentaire) mais également dans la différenciation terminale de plusieurs types cellulaires. Les comparaisons entre drosophile et

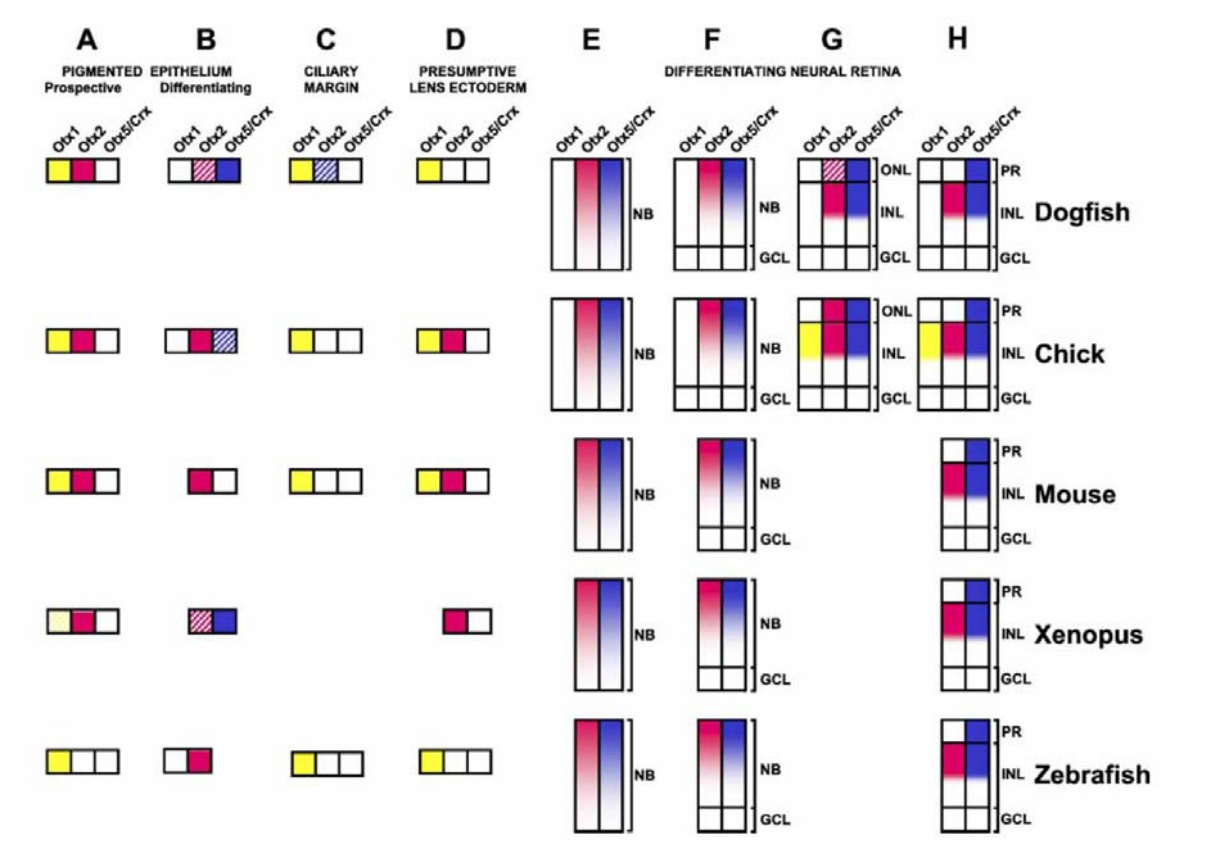


Figure 29. Sites d'expression des Otx de chaque classe, chez les gnathostomes. Les différents territoires sont présentés : le RPE aux stades vésicule optique (A) et cupule optique (B), la marge ciliaire (C), la placode cristalline présmtive (D), ainsi que la rétine neurale en prolifération (E), en cours de lamination (F, G) et différenciée (H). Dans ces derniers cas, les différentes couches cellulaires sont indiquées (NB : couche neuroblastique ; GCL : couche de cellules ganglionnaires ; ONL : couche nucléaire externe ; INL : couche nucléaire interne ; PR : photorécepteurs). Pour chaque espèce, l'expression d'un gène appartenant à une classe donnée est indiquée (jaune pour Otx1, rouge pour Otx2, bleu pour Otx5/Crx ; les hachures représentent un marquage léger ou transitoire). L'absence de carré signifie l'absence de données pour le gène et le territoire considéré. [tiré de Plouhinec et al., 2005]

souris suggèrent que le contrôle dans la différenciation des photorécepteurs pourrait correspondre à une fonction ancienne de ces gènes, leur rôle dans la formation de structures (cupule optique, marge ciliaire) ou la spécification de types cellulaires (cellules bipolaires) propres aux vertébrés correspondant à des recrutements récents. Ces différentes fonctions correspondant à des territoires bien spécifiques d'expression de ces gènes, nous avons cherché à retracer l'histoire évolutive de ces recrutements chez les vertébrés par des analyses comparatives systématiques de profils d'expression entre des espèces occupant des positions phylogénétiques clefs dans le taxon.

L'étude d'un modèle chondrichtyen, la petite roussette *Scyliorhinus canicula*, avait ainsi conduit à deux conclusions principales [Plouhinec et al., 2005 ; cf. Figure 29]:

1. tous les sites d'expression des gènes *Otx* décrits dans l'œil embryonnaire et la rétine en cours de différenciation chez les organismes modèles (qui appartiennent tous aux ostéichtyens) se retrouvent chez cette espèce
2. chaque classe présente des caractéristiques d'expression qui lui sont propres : co-expression d'*Otx1* et *Otx2* dans la partie dorsale de la vésicule optique, puis dans le RPE ; expression spécifique d'*Otx1* seul dans la marge ciliaire ; expressions dynamiques d'*Otx2* et *Otx5* dans l'ONL et/ou dans l'INL.

Ces données suggéraient donc une spécialisation fonctionnelle des trois classes d'orthologie dans différents aspects du développement de l'œil, cette spécialisation étant intervenue avant la radiation des gnathostomes.

III. B. Résultats

Section Résultats et Discussion d'un manuscrit en préparation pour soumission à BMC Evol. Biol. : **Expression of three *Otx* paralogues in the lamprey developing eye.** Rocancourt C., Villar V., Villar-Cheda B., Pombal M., Rodicio MC., Langeland J. and Mazan S

Broad expression characteristics of *OtxA*, *OtxB* and *OtxC* are conserved between *L. japonicum* and *P. marinus*

Similar broad expression characteristics have been reported for *L. japonicum* *LjOtxC* and its *P. marinus* orthologue (*PmOtx*, Tomsa and Langeland, 1999; Suda et al. 2009, referred to hereafter as *PmOtxC*), at embryonic and prolarval stages. In the absence of available data for the paralogous *P. marinus* genes *PmOtxA* and *PmOtxB*, we first assessed their respective

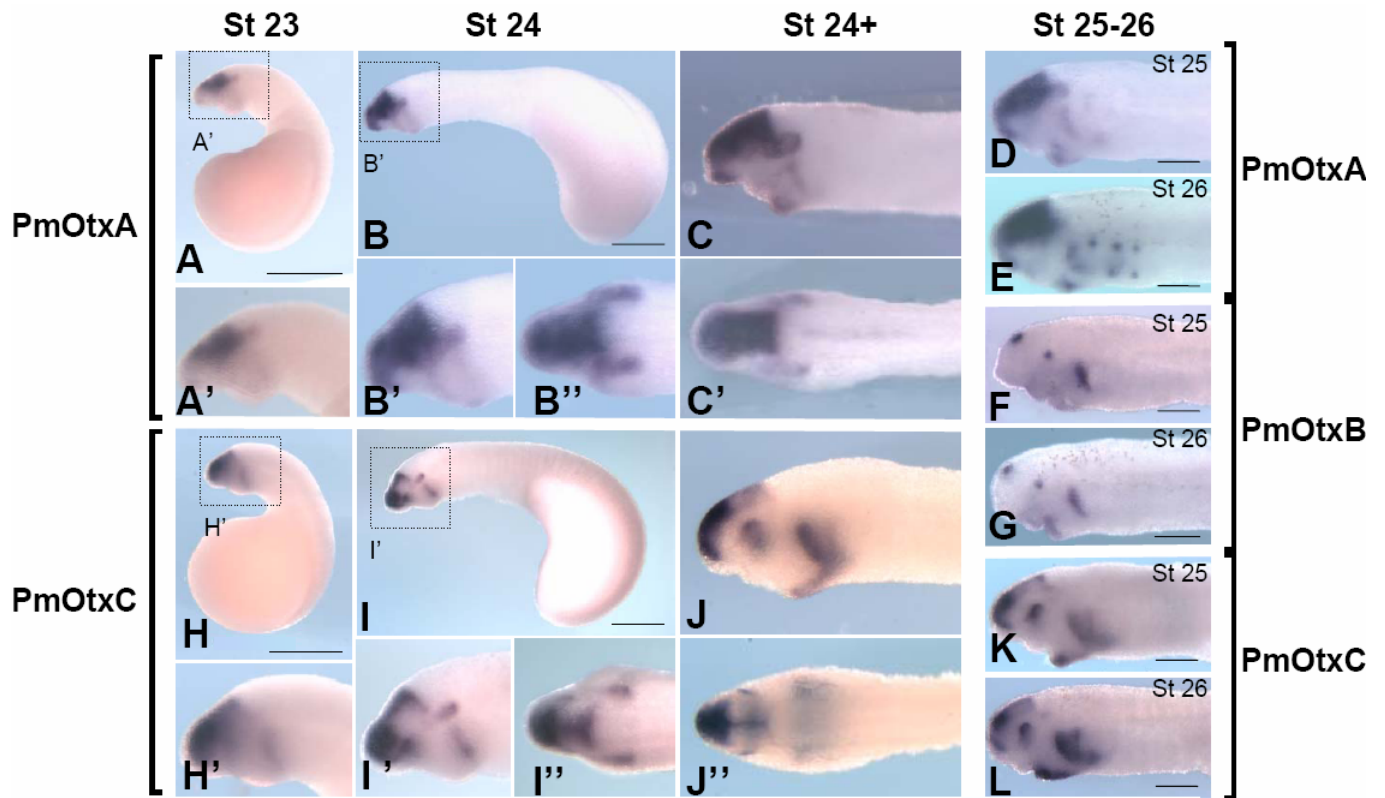


Figure 1 – In situ Hybridization in toto using PmOtxA (A-E), PmOtxB (F,G) and PmOtxC (H-L) probes. PmOtxA expression is detected in dorsal neural tube, olfactory epithelium, branchial arches and lower lip. No expression were detected for the PmOtxB probe before stage 25 ; its expression is restricted in pineal gland, eye, the first branchial arch and lower lip. PmOtxC is expressed in anterior neural tube, optic evagination and eye, the first and second branchial arch and endostyle at late stages. Scale bar : 0,5 mm for A, B, H, I ; 0,2 mm for D, E, F, G, K, L.

expression pattern conservation at embryonic stages between both lamprey species. This analysis was conducted by whole-mount hybridization of stage 23 to 26 *P. marinus* embryos, using probes located in the 3' part of the coding region, which extensively diverges between the three *Otx* paralogues. In all cases, the broad characteristics observed in *P. marinus* were essentially the same as in *L. japonicum* (Suda et al, 2009). Like its *L. japonicum* orthologue, *PmOtxA* expression territory spans a broad forebrain and midbrain territory with a sharp posterior boundary from stages 23 to 26, very similar to *Otx1* and *Otx2* expression pattern in jawed vertebrates (Fig. 1. A-E, A'-E'). As previously noted (Tomsa and Langeland, 1999) and observed in *L. japonicum* (Suda et al 2009), *PmOtxC* is also expressed in this territory (Fig. 1 H-L, H'-J'). However, unlike *PmOtxA*, it shows a signal restriction to the dorsal midline in the mesencephalon starting from stage 24 (Fig. 1. I'',J'', K-L). Similarly, as in *L. japonicum*, *PmOtxB* expression is first detected at a later stage than its paralogues (stage 25 in *P. marinus*) and its expression in the central nervous system is restricted to the developing epiphysis and eye, as observed for the third gnathostome paralogue (Plouhinec et al, 2005), *Otx5/Crx*. Altogether, these data support an overall strong conservation between the two lamprey species studied, in line with their relatively recent divergence time.

Embryonic and prolarval expression of *PmOtxA*, *PmOtxB* and *PmOtxC* in the developing eye

In order to address the expression specificities of each of the three lamprey *Otx* paralogues in the developing eye, we first conducted a detailed expression analysis of *PmOtxA*, *PmOtxB* and *PmOtxC* in this organ from embryonic to early prolarval stages (stage 23 to 26, Fig. 2). In *P. marinus*, the optic vesicle is clearly visible at stage 24 (Fig. 2A-A'). At this stage, only *PmOtxC* is expressed in this territory, with a dorsal restriction of the signal as in jawed

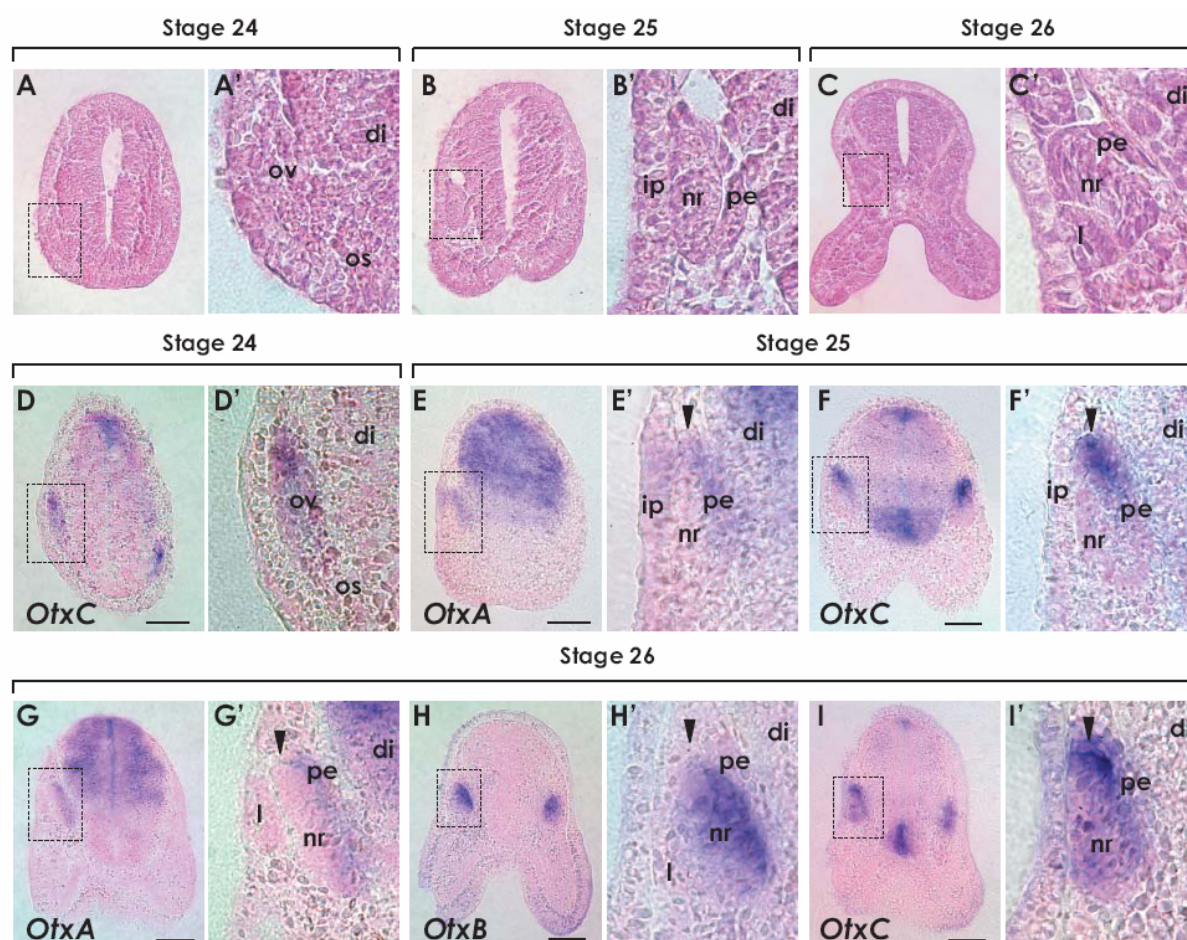


Figure 2 – Molecular characterization of the embryonic retina. A-C. Histology of the embryonic retina using eosine coloration, at stage 24 (A, A'), 25 (B, B') and 26 (C, C'). D-I. In situ Hybridization on slides using PmOtxA (E, G), PmOtxB (H) and PmOtxC (D, F, I) probes. di : diencephalon ; l : lens ; lp : lens placode ; nr : neural retina ; os : optic stalk ; ov : optic vesicle ; pe : pigmented epithelium. Scale bar : 0,1 mm.

vertebrates (Fig. 2D-D'). At stage 25, the lens placode forms and the neural retina and presumptive pigmented epithelium (PE) become morphologically distinct (Fig. 2B-B'). At this stage, a *PmOtxA* signal becomes detectable in the PE (Fig. 2E-E') and *PmOtxC* expression also regresses to this tissue, but with a dorsal restriction of the transcripts including the retina margin not observed for *PmOtxA* (compare Fig. 2E-E' and Fig. 2F-F'). This stage also marks the onset of a faint *PmOtxB* expression in the forming optic cup (data not shown). Following lens formation (stage 26, Fig. 2C-C'), expression of all three paralogues is maintained in the developing eye, each exhibiting distinct characteristics. *PmOtxA* expression persists in the presumptive pigmented epithelium, with a uniform signal intensity from dorsal to ventral (Fig. 2G-G') but is undetectable in the neural retina (Fig. 2G-G'). *PmOtxC* expression is maintained at the dorsal margin of the retina, and also now spans the whole neural retina, including outer and inner cell populations (Fig. 2I-I'). *PmOtxB* is also exclusively transcribed in the neural retina, but with a non-superimposable pattern, transcripts appearing preferentially located to the outer cell population and excluding the dorsal margin (Fig. 2H-H'; compare with Fig. 2I-I'). The major *Otx* expression sites described during early eye development in gnathostomes are thus conserved in the lamprey. *PmOtxA*, *PmOtxB* and *PmOtxC* expressions substantially differ starting from the earliest stages of eye formation, which makes it possible to compare the expression specificities of each paralogue between the two taxa. *PmOtxA* expression in the presumptive pigmented epithelium is reminiscent of the one observed for both *Otx1* and *Otx2* in jawed vertebrates and suggestive of a conserved role of *Otx* genes in its specification at optic cup stages (Martinez-Morales et al, 2001). The restriction of *PmOtxB* transcripts to the outer cell population of the neural retina and *PmOtxC* to its margin recall expression characteristics of *Otx5* and *Otx1* respectively.

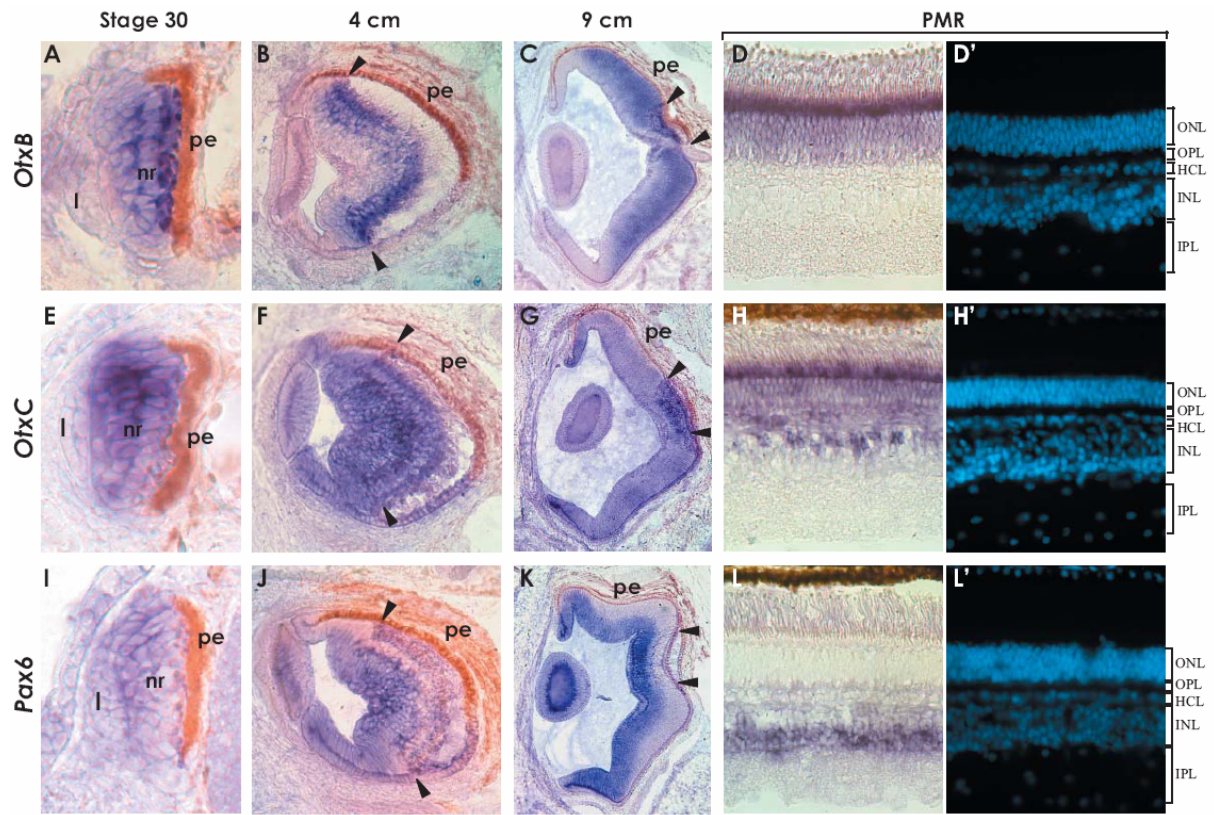


Figure 3 - Molecular characterization of the larval retina. In situ Hybridization on slides using PmOtxB (A-D), PmOtxC (E-H) and PmPax6 (I-L) probes, at stage 30 (A, E, I), 4cm (B, F, J), 9cm (C, G, K) and in postmetamorphic retina (D, H, L). Arrows delimits the central retina. l : lens ; nr : neural retina; pe : pigmented epithelium.

Expressions of *PmOtxB*, *PmOtxC* and *Pax6* in the differentiating retina

In order to extend the analysis to retina differentiation stages, we analyzed the transcript distribution of the three *P. marinus* *Otx* paralogues in the developing retina at late prolarval (stage 30) and larval stages (4 and 9 cm larvae), as well as in post-metamorphic juveniles. *Pax6* analysis was also included in this study, in order to assess the conservation of the relative transcript distribution of *Pax6* and *Otx* genes, known to largely exclude each other in the differentiating retina of gnathostomes.

***PmOtxA/B/C*.** No *PmOtxA* specific expression was observed in the developing eye at these stages (data not shown). In contrast, *PmOtxB* and *PmOtxC* both showed highly specific, non superimposable expression sites in the differentiating retina. At stage 30, the optic nerve stalk is connected to the ventral aspect of the optic cup, pigmentation is visible in the RPE but the two-layered margin from which the lateral retina later develops is not morphologically visible. At this stage, *PmOtxB* and *PmOtxC* expression territories in the developing eye are both restricted to the neural retina where they largely overlap, albeit with different intensity gradients (inner to outer for *PmOtxB* and ventral to dorsal for *PmOtxC*: compare Fig. 3A and Fig. 3E). They segregate in 4 cm larvae, characterized by the expansion of the ventral retina relative to the optic stalk, the appearance of the retina laminar organization and the formation of a morphologically distinct, two-layered ciliary margin (Fig. 3B; Fig. 3F). At this stage, *PmOtxB* transcripts become exclusively restricted to the outer photoreceptor layer (Fig. 3B). In contrast, *PmOtxC* expression spans the whole neural retina, the ciliary margins and ventral presumptive pigmented epithelium (but not its dorsal component where pigmentation is observed; Fig. 3F). In 9 cm larvae, the early differentiated retina persists as a distinct, central entity, surrounded by the expanding lateral retina from which the bulk of the adult retina derives. At this stage, the lateral retina consists of proliferating neuroblasts, as assessed by PCNA immunoreactivity and no indication of lamination can be observed yet. In these larvae,

PmOtxB expression persists in the photoreceptor layer of the central retina but is also observed in the growing lateral retina, with an intensity gradient from its inner to outer aspects, excluding marginal-most territories (Fig. 3C). At this stage, *PmOtxC* is expressed in the whole central retina, with the strongest signal intensity in the outer photoreceptor layer and outer part of the inner nuclear layer. It is also expressed in the whole expanding lateral retina excluding the dorsal outermost cell population, in the ciliary margins, and it persists in the ventral, but not dorsal, presumptive pigmented epithelium (Fig. 3G). In post-metamorphic juveniles, the neural retina is completely differentiated and exhibits its definitive laminar layer. At this stage, both paralogues are transcribed in the outer, photoreceptor layer (Fig. 3D-D' and 3H-H'). An additional *PmOtxC* positive cell population is observed in the HC L and the outer aspect of the INL (Fig. 3H-H').

***PmPax6*.** At stage 30, *PmPax6* transcripts are detected in the neural retina but not the pigmented epithelium (Fig. 3.I). In 4 cm larvae, expression in the neural retina is mainly restricted to the inner nuclear layer but also observed in the outer nuclear, photoreceptor containing, layer (Fig. 3.J). The latter labeled cell population does not completely overlap with, but is included within the broader *PmOtxB* expressing territory. In 9 cm larvae, expression prevails in the inner neuroblast layer but remains detectable within the outer, *PmOtxB* positive, cell population of the central retina (Fig. 3.K). After metamorphosis, transcripts become restricted to the inner part of the INL, known to contain ganglion cell bodies. These data highlight a number of conserved *Otx* and *Pax6* expression characteristics between lamprey and jawed vertebrates. For instance, as in jawed vertebrates, *Pax6* expression prevails in the inner neuroblast cell population of the differentiating lateral retina and it is later restricted to the ganglion cell layer. The broad expression of *PmOtxB* and *PmOtxC* later regressing to the photoreceptor layer (*PmOtxB*) or photoreceptor layer plus

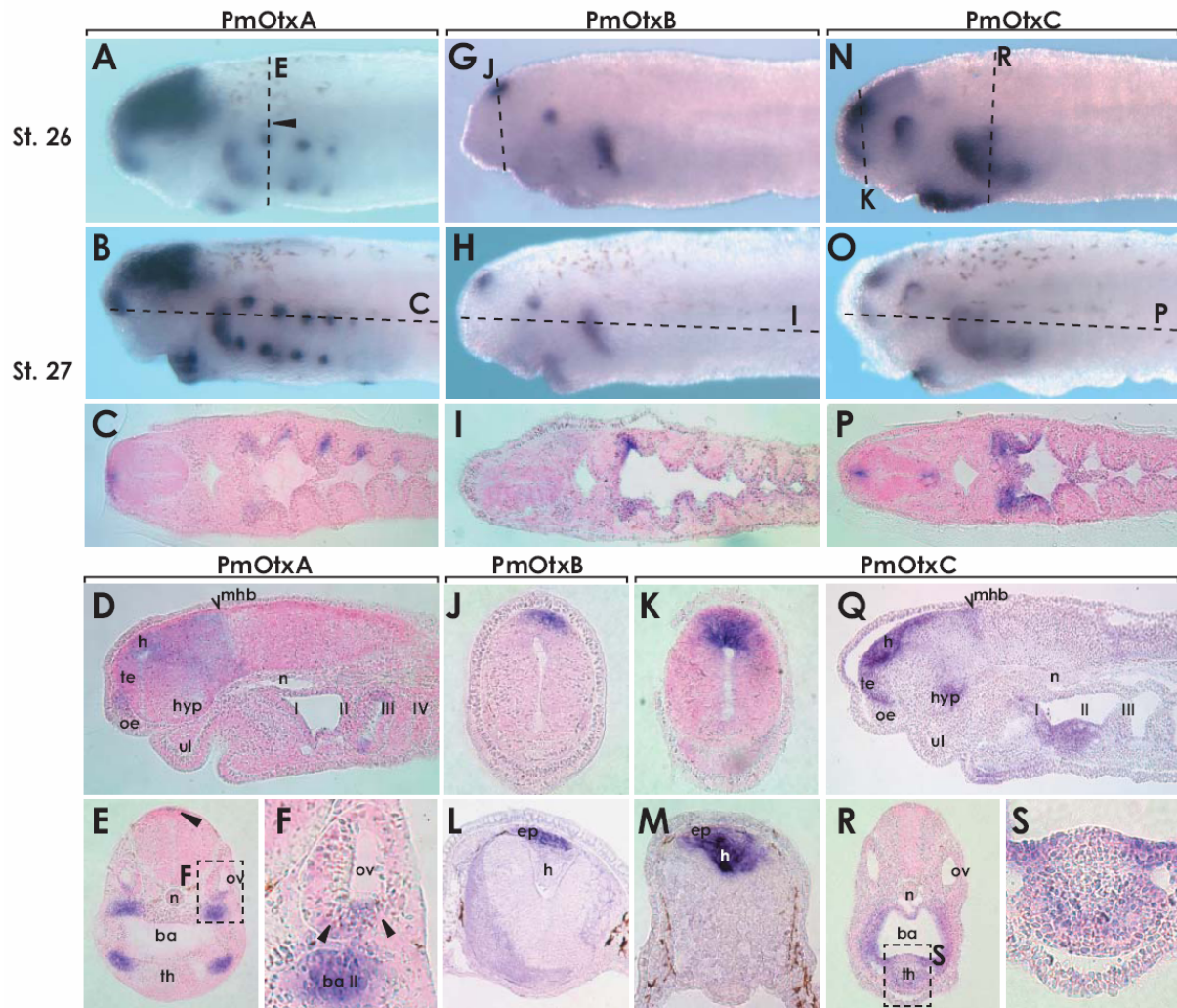


Figure 4 - Additional expression sites for Otx genes. A-F. In situ hybridization with PmOtxA probe at stage 26 (A) and 27 (B) with coronal (C), sagittal (D) and transversal (E,F) sections of these embryos. G-J,L. In situ hybridization with PmOtxB probe at stage 26 (G) and 27 (H) with coronal (I) and transversal (J, L) sections of these embryos. K, M-S. In situ hybridization with PmOtxC probe at stage 26 (N) and 27 (O) with coronal (P), sagittal (Q) and transversal (M, R, S) sections of these embryos. ba : branchial arches ; ep : epiphysis ; h : habenula ; hyp : hypothalamus ; mhb : midbrain hindbrain boundary ; n : notochord ; oe : olfactory epithelium ; ov ; otic vesicle ; te : telencephalon ; th : thymus ; ul : upper lip.

outer aspects of the inner cellular layer (*PmOtxC*) is also reminiscent of the one of *Otx5* and *Otx2* in jawed vertebrates. Finally, like *Otx1* in gnathostomes, one lamprey paralogue (*PmOtxC*) is expressed in the ciliary margin, where in the absence of ciliary process in the lamprey, it might play a conserved role in iris formation. Some differences can also be noted. For instance, *PmOtxC* persists in the inner aspect of the developing retina during an protracted period, from prolarval to advanced larval stages (9 cm), which is not observed in jawed vertebrates. The *Pax6* expression in the outer, photoreceptor containing layer of the lamprey central retina is also unexpected since *Pax6* expression is well documented in the rhabdomeric photoreceptors of protostomes but has thus far never been reported in the ciliary photoreceptors of vertebrates. It will be important to assess the presence of the protein and confirm the photoreceptor identity of these *Pax6* expressing cells by immunohistochemical analyses.

Other expression sites

PmOtxA, *PmOtxB* and *PmOtxC* exhibit several expression sites, which are also *Otx* territories in jawed vertebrates (Simeone et al., 1993, Acampora et al., 1995). All three paralogues share an expression in the first branchial arch, which expresses *Otx1* and *Otx2* but not *Otx5* in jawed vertebrates (Fig. 4.C.I.P.). Both *PmOtxB* and *PmOtxC* show regionalized territories in the dorsal part of the stage 26 diencephalon (superficial and ventricular cell populations respectively) and its stage 27 derivatives (pineal complex and habenulae respectively) (Fig. 4. J.K.L.M). The otic vesicle and olfactory epithelium are sites of *Otx1* and *Otx2* expression in jawed vertebrates and both also express *PmOtxA* in the lamprey, with a restriction to the ventral part of the otic vesicle (Fig. 4. D.E.F). Finally *PmOtxC* shows a strong expression in the anterior part of the endostyle (Fig. 4. Q.R.S.), which transforms into the thyroid gland during metamorphosis. Expressions of both *Otx1* and *Otx2* have been described in this organ

in gnathostomes and a regionalized, anterior *Otx* expression is present in the endostyle of the ascidian *O. dioica* (Canestro et al., 2008). Taken together, these data support the idea that the lamprey endostyle reflects a primitive state of the organ in chordates and that the development of the thyroid in this species somehow recapitulates its evolution (Kluge B et al 2005). Other sites of *Otx* expression in the lamprey have no clear equivalent in jawed vertebrates. For instance, all three paralogues are expressed in the ectoderm layer of the lower lip, a structure that is unique to lampreys. Similarly, *Otx* gene expressions have never been reported in the branchial arches posterior to the first one in gnathostomes. In contrast, in the lamprey, *PmOtxC* expression is also found in the endoderm layer of the second branchial arch (Fig. 4. Q.R.S) and *PmOtxA* shows discrete expression sites, successively appearing in a rostral to caudal progression as development proceeds, and restricted to the dorsal- and ventral-most parts of BA II to VI, in the endoderm layer (Fig. 4. B.C.E). The biological significance of these additional expression sites not found in gnathostomes remains unclear but they argue against gradistic views that tend to assimilate lampreys to simple, primitive vertebrates.

Conclusion.

No overt orthology relationship between the *Otx1/2/5* and *OtxA/B/C* classes found in jawed vertebrates and lampreys respectively can be inferred from phylogenetic analyses of protein structures, which has led to the conclusion that these classes have been fixed after the splitting between cyclostomes and gnathostomes (Germot et al., 2001). Similarly, while *Otx* expression territories appear collectively largely conserved between *P. marinus* and jawed vertebrates, their partitioning between classes is not strictly conserved. For instance, *Otx1* expression is restricted to the ciliary margin during retina differentiation stages and is not observed in the retina, while *PmOtxC* combines both sites of expression. Similarly, all three lamprey paralogues are transcribed in the first branchial arch, while *Otx5/Crx* is excluded from this

territory (Sauka-Spengler et al., 2001), where only *Otx1* and *Otx2* are expressed (Mazan et al, 2000). It is however striking to observe that as suggested by Suda et al, 2009 and further substantiated by this study, one paralogue (*PmOtxB* in the lamprey and *Otx5/Crx* in jawed vertebrates) has apparently specialized in photoreceptor organ formation, losing almost all other expression sites. Whether this reflects orthology relationships between these two classes or parallel losses in the two lineages remains an opened issue. Understanding how the mechanisms controlling *Otx* gene expression have evolved in vertebrates will be essential to answer this question.

Litterature cited.

- Tomsa JM, Langeland JA. Otx expression during lamprey embryogenesis provides insights into the evolution of the vertebrate head and jaw. *Dev Biol.* 1999 Mar 1;207(1):26-37.
- Suda Y, Kurokawa D, Takeuchi M, Kajikawa E, Kuratani S, Amemiya C, Aizawa S. Evolution of Otx paralogue usages in early patterning of the vertebrate head. *Dev Biol.* 2009 Jan 1;325(1):282-95.
- Plouhinec JL, Leconte L, Sauka-Spengler T, Bovolenta P, Mazan S, Saule S. Comparative analysis of gnathostome Otx gene expression patterns in the developing eye: implications for the functional evolution of the multigene family. *Dev Biol.* 2005 Feb 15;278(2):560-75.
- Martinez-Morales JR, Signore M, Acampora D, Simeone A, Bovolenta P. Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development.* 2001 Jun;128(11):2019-30.
- Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, D'Apice MR, Nigro V, Boncinelli E. A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* 1993 Jul;12(7):2735-47.
- Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A, Brûlet P. Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development.* 1995 Oct;121(10):3279-90.
- Cañestro C, Bassham S, Postlethwait JH. Evolution of the thyroid: anterior-posterior regionalization of the *Oikopleura* endostyle revealed by Otx, Pax2/5/8, and Hox1 expression. *Dev Dyn.* 2008 May;237(5):1490-9.
- Kluge B, Renault N, Rohr KB. Anatomical and molecular reinvestigation of lamprey endostyle development provides new insight into thyroid gland evolution. *Dev Genes Evol.* 2005 Jan;215(1):32-40.
- Germot A, Lecointre G, Plouhinec JL, Le Mentec C, Girardot F, Mazan S. Structural evolution of Otx genes in craniates. *Mol Biol Evol.* 2001 Sep;18(9):1668-78.
- Sauka-Spengler T, Baratte B, Shi L, Mazan S. Structure and expression of an Otx5-related gene in the dogfish *Scyliorhinus canicula*: evidence for a conserved role of Otx5 and Crx genes in the specification of photoreceptors. *Dev Genes Evol.* 2001 Dec;211(11):533-44.
- Mazan S, Jaillard D, Baratte B, Janvier P. Otx1 gene-controlled morphogenesis of the horizontal semicircular canal and the origin of the gnathostome characteristics. *Evol Dev.* 2000 Jul-Aug;2(4):186-93.

CHAPITRE II

Etude de la rétine embryonnaire de la lamproie

Afin d'étendre l'étude des mécanismes génétiques qui contrôlent le développement de l'œil et la différenciation de la rétine chez la lamproie, j'ai engagé une caractérisation moléculaire fondée sur l'étude de l'expression de gènes connus pour leur implication dans ces processus chez les organismes modèles. J'ai centré l'étude sur quatre gènes codant pour des facteurs de transcription connus pour leur implication dans la spécification de différents territoires de l'œil et/ou dans le contrôle de la prolifération et la différenciation de la rétine : *Vax2*, *Six3*, *Prox1* et *Pax6*.

Les descriptions moléculaires obtenues permettent de mettre en oeuvre chez la lamproie des analyses fonctionnelles des voies de signalisation connues pour leur rôle dans le développement de l'œil. Afin d'évaluer la conservation du rôle de la voie Fgf dans la formation du pédoncule optique, j'ai engagé une série de traitements pharmacologiques à l'aide de l'inhibiteur SU5402, dont les résultats préliminaires sont également présentés.

I. Rôle des gènes *Vax2*, *Six3*, *Prox1* et *Pax6* dans le développement de l'oeil

I.A. *Vax2*

Vax2 est un facteur de transcription à homéodomaine exprimé dans la partie ventrale du diencéphale et de l'évagination, puis de la vésicule optique. A des stades plus tardifs, son expression et celle de son paralogue *Vax1* se restreignent à la partie ventrale de la cupule optique et du pédoncule optique [Liu et al., 2001]. En accord avec ces caractéristiques, les deux gènes jouent des rôles essentiels dans la spécification du nerf optique, sous le contrôle de Shh [Take-uchi et al., 2003 ; Mui et al., 2005].

Les mécanismes moléculaires correspondants font intervenir (1) une répression de la transcription de *Pax6*, dont l'expression normalement restreinte à la rétine neurale s'étend au pédoncule optique chez des doubles mutants *Vax1*^{-/-} ; *Vax2*^{-/-} de souris [Mui et al. , 2005] et (2) une régulation de la localisation, nucléaire ou cytoplasmique, de la protéine *Vax2* dans la cellule, elle-même contrôlée par une phosphorylation dépendante de la voie Hh [Kim and Lemke, 2006]. L'expression de *Vax2* est également sous le contrôle de la voie FGF, comme le montrent des expériences par perte et gain de fonction chez le xénope [Lupo et al. 2005].

Des résultats plus récemment obtenus chez le xénope suggèrent un rôle plus tardif du gène dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Chez cette espèce, l'expression de *Vax2* est maintenue dans la partie ventrale de la rétine neurale, où les cellules continuent de proliférer tout au long de la vie de l'animal [Liu et al., 2001 ; Casarosa et al., 2005]. La surexpression du gène conduit à une réduction importante de la prolifération cellulaire, suggérant un rôle de ce facteur dans le contrôle de ce processus [Liu et al., 2008].

I.B. *Six3*

Le gène *Six3* code pour un facteur de transcription à homéodomaine possédant également un domaine six. Il présente au cours du développement de l'œil un profil d'expression dynamique et complexe, qui suggère une implication dans plusieurs processus [Oliver et al 1995 ; Bovolenta et al., 1998 ; Dyer et al., 2003 ; Wargelius et al, 2003]. Initialement localisée dans le territoire présomptif de l'œil dès stade plaque neurale, son expression est ensuite retrouvée dans la cupule optique, puis dans la couche nucléaire interne et la couche de cellules ganglionnaires de la rétine en cours de différenciation. Elle se maintient également dans la rétine différenciée (cellules amacrines, horizontales et ganglionnaires mais également photorécepteurs).

L'analyse de mutants conditionnels de souris montre que *Six3* est indispensable à la spécification de la neurorétine (mais pas de la rétine pigmentée présomptive) et que cette fonction fait intervenir une répression directe de la transcription de *Wnt8* [Liu et al, 2010]. Des expériences de surexpression dans des explants de rétine de souris en culture soutiennent également une implication du gène dans les choix de destins cellulaires dans la rétine, la co-expression ectopique avec les facteurs NeuroD ou Math3 conduisant à la différenciation de cellules amacrines et horizontales respectivement [Inoue et al., 2002]. Des expériences de transactivation dans des cellules en culture suggèrent enfin que le gène de la rhodopsine est une cible directe de *Six3*, qui pourrait donc jouer un rôle dans la différenciation des photorécepteurs [Manavathi et al. 2007].

I.C. *Prox1*

Le facteur *Prox1* est un autre facteur de transcription à homéodomaine dont le rôle dans le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaires dans la rétine a été bien démontré. Dans la rétine différenciée, son expression a été décrite dans les cellules horizontales, bipolaires, les cellules de Müller ainsi que dans certaines populations de cellules amacrines et de photorécepteurs [Dyer et al., 2003; Cid et al., 2010].

L'analyse de souris *Prox1*^{-/-} montre une absence des cellules horizontales chez le mutant et un nombre de progéniteurs neuraux anormalement élevé, lié à un défaut des mécanismes contrôlant la sortie du cycle cellulaire. Inversement, l'expression ectopique du gène par infection de rétine natale de rat à l'aide de vecteurs rétroviraux recombinants conduit les cellules infectées à une sortie prématurée du cycle cellulaire et favorise la formation de cellules horizontales, au détriment des types cellulaires dont le destin est déterminé tardivement comme les cellules bipolaires [Dyer et al., 2003].

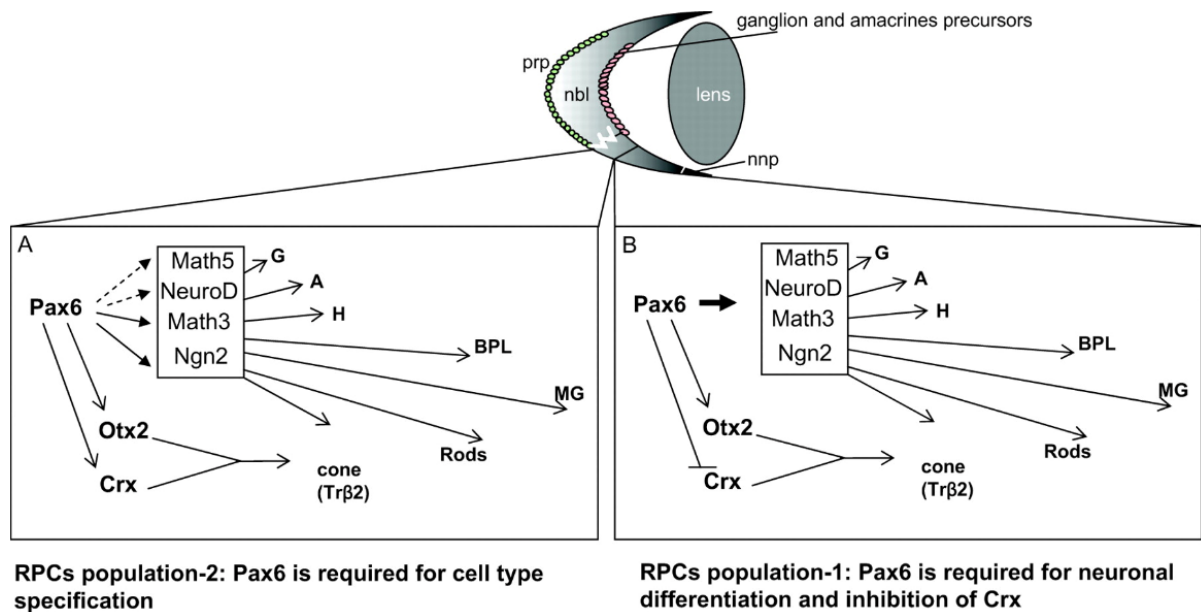


Figure 30. Fonctions de Pax6 dans les progéniteurs cellulaires chez la souris. **A.** Dans la rétine centrale, au voisinage de la vague de différenciation, Pax6 est requis pour l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation d'un lignage donné. **B.** Dans les cellules progénitrices situées dans la périphérie, Pax6 inhibe Crx et est essentiel à l'expression de gènes proneuraux. [Tiré de Oron-Karni et al., 2008]

I.D. *Pax6*

Le gène *Pax6* code pour un facteur de transcription possédant un domaine paired et un homéodomaine. Il joue au cours du développement de l'œil des rôles complexes, qui ont fait l'objet de très nombreuses études. Son expression est observée dès la formation du territoire optique dans la plaque neurale. Elle se restreint à l'extrémité dorso-distale de l'évagination optique puis de la cupule optique, sous l'action de la voie hedgehog [Zhao et al., 2010].

En accord avec ces territoires d'expression, les mutants murins homozygotes pour la mutation *Small eye* du gène présentent un défaut de morphogenèse de la vésicule optique et une absence du cristallin, responsable plus tardivement de la perte de l'œil [Grindley et al., 1995 ; Ashery-Padan et al., 2000]. L'expression de *Pax6* est également maintenue au cours de la différenciation de la rétine neurale, avec une expression initialement présente dans tous les progéniteurs, et qui se restreint d'abord dans la couche nucléaire interne puis dans la rétine différenciée, aux cellules ganglionnaires, horizontales et amacrines [Belecky-Adams et al., 1997 ; Perron et al., 1998 ; Marquardt et al., 2001 ; de Melo et al., 2003].

Les analyses conduites notamment chez la souris mettent en évidence plusieurs rôles dans le choix des destins cellulaires au cours de la différenciation de la rétine. Leur compréhension doit tenir compte de données expérimentales difficiles à réconcilier à première vue. Ainsi, malgré une morphogenèse très anormale de la vésicule optique, les mutants murins *Pax6*^{-/-} expriment à ce niveau des marqueurs de neurogenèse (BetaIII-tubulin, Mash1), dont l'expression est beaucoup plus tardive chez des embryons sauvages [Philips et al., 2005]. Aucune différenciation terminale des différents types cellulaires de la rétine n'est cependant observée. En revanche, l'inactivation conditionnelle du gène à un stade plus tardif et uniquement dans les régions marginales de la rétine, conduit à une perte de l'état multipotent des progéniteurs rétiens, qui se différencient en cellules amacrines, seules [Marquardt et al., 2001]. Ces résultats suggèrent que le rôle du gène au cours de la différenciation de la rétine dépend de façon cruciale du contexte cellulaire précis.

En accord avec cette interprétation, des études détaillées de mutants conditionnels du gène dans différentes populations de progéniteurs mettent en évidence leur hétérogénéité et permettent d'identifier deux populations dans lesquels les rôles de *Pax6* diffèrent significativement [Oron-Karni et al., 2008]. Dans la région la plus périphérique de la rétine, le gène réprime l'activation du programme de différenciation des photorécepteurs et son inactivation conduit à une expression cellulaire autonome de *Crx*. Dans une zone intermédiaire, localisée entre la rétine centrale et la zone précédente, le gène maintient un état pluripotent et son inactivation conduit à la génération de cellules amacrines à l'exclusion de tout autre type cellulaire (cf. Figure 30).

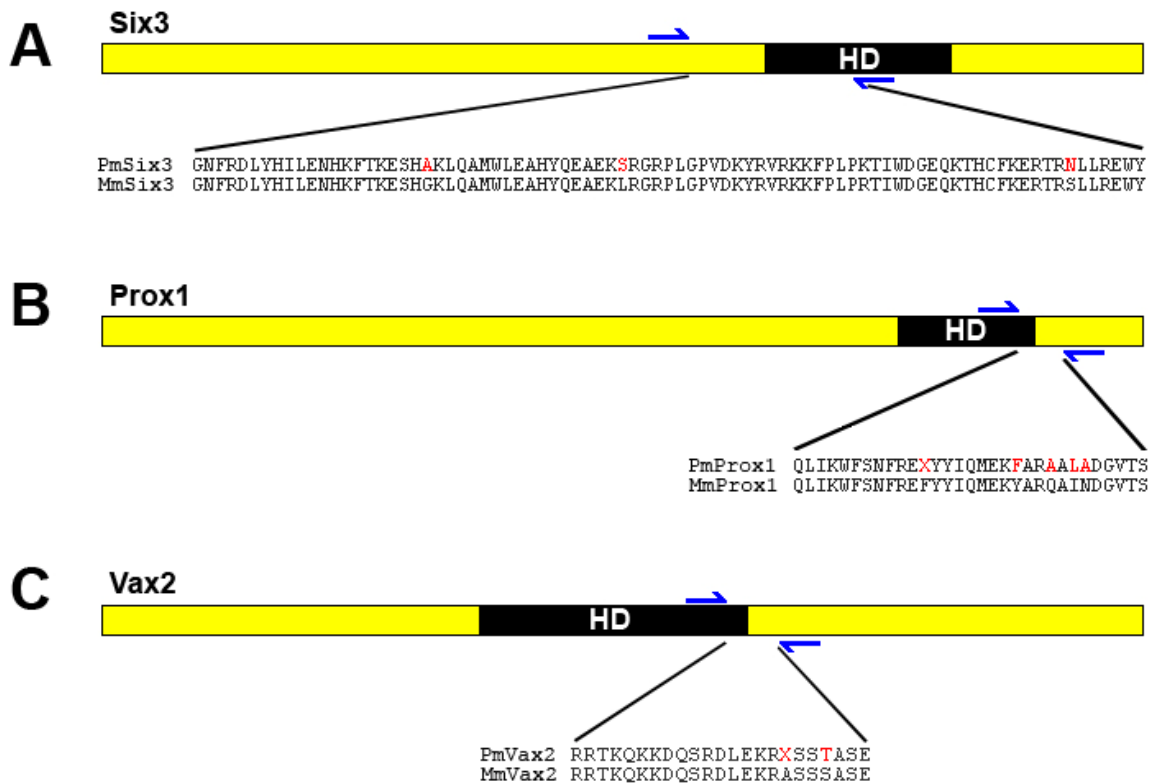


Figure 31. Identification des séquences de Six3 (A), Prox1 (B) et Vax2 (C) chez la lamproie. Les séquences de ces gènes sont schématisées en jaune et le cadre noir représente l'homéodomaine. Les amorces utilisées pour cloner ces gènes sont représentées en bleu. Les séquences de ces fragments sont alignées avec les séquences de souris (Six3 : NM_011381 ; Prox1 : NP_032963.1 ; Vax2 : Y17792.1).

II. Résultats : caractérisation de l'expression des gènes *Vax2*, *Pax6*, *Six3* et *Prox1* dans l'œil de lamproie aux stades embryonnaires et pro-larvaires

II.A. Obtention des sondes

Une sonde *Pax6* recouvrant l'ensemble de la région codante située entre l'homéodomaine et le domaine Paired avait été obtenue précédemment par PCR dégénérée et était disponible dans le laboratoire [Derobert et al., 2002].

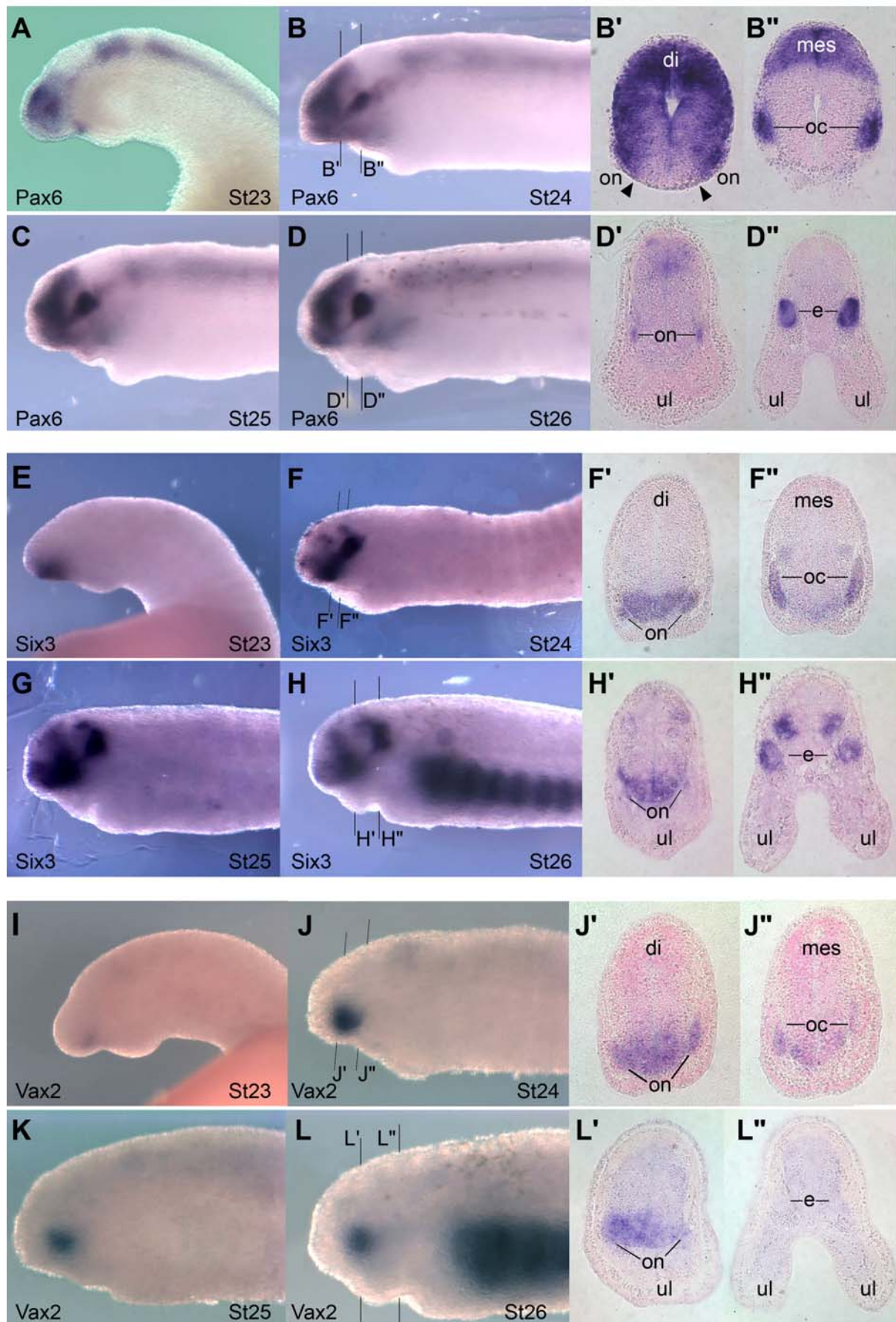
Les sondes *Prox1*, *Vax2* et *Six3* ont été amplifiées par PCR dégénérée à partir de cDNA d'embryons de lamproie aux stades embryonnaires (mélange de stades 24 à 26). Les séquences des amorces ont été choisies d'après les séquences génomiques de *P. marinus* obtenues (http://pre.ensembl.org/Petromyzon_marinus). Pour la sonde *PmSix3*, des amorces situées à environ 50 résidus avant l'homéodomaine et à 40 résidus après le début de l'homéodomaine ont été utilisées pour obtenir une sonde d'environ 300 nucléotides (cf. Figure 31. A). Pour la sonde *PmProx1*, les amorces utilisées sont localisées à 20 résidus avant la fin de l'homéodomaine et à 14 résidus après l'homéodomaine et permettent l'obtention d'une sonde d'environ 150 nucléotides (cf. Figure 31. B). Enfin, pour la sonde *PmVax2*, des amorces situées à 10 résidus avant la fin de l'homéodomaine et à 20 résidus en aval de celui-ci ont été utilisées pour obtenir une sonde d'environ 150 nucléotides (cf. Figure 31. C).

Chaque insert a ensuite été cloné dans le vecteur pT19R. Dans tous les cas, les sondes ont été obtenues par transcription in vitro de l'ARN antisens en présence de Digoxigénine-11-UTP.

II. B. Profils d'expression dans l'œil embryonnaire et prolarvaire chez la lamproie *P. marinus*.

Les hybridations in situ ont été effectuées en utilisant des protocoles standard soit sur embryons entiers (stades 22 à 26), soit sur coupes histologiques de la région de l'œil chez des prolarves de stade 30. L'étude de ces stades recouvrent les premières étapes du développement de l'œil : l'évagination optique (stade 23), la vésicule optique (stade 24), la cupule optique (stade 25 et 26) et la rétine différenciée (stade 30).

Comme publié précédemment [Derobert et al., 2002], l'expression du gène *PmPax6* est détectée à partir du stade 23 dans le système nerveux antérieur et dans l'évagination optique. Aux stades 24 et 25, le transcrit est détecté dans la totalité de la vésicule optique ainsi qu'au niveau du pédoncule optique (cf. Figure 32. B, B' et B''). A ces stades, *PmPax6* est également exprimé dans tout le diencephale, excepté dans sa partie la plus ventrale (cf. Figure 32. B' têtes de flèche). Au stade 26, l'expression de *PmPax6* commence à se régionaliser dans la cupule optique, localisée au niveau de la rétine neurale et plus spécifiquement au



niveau des marges (cf. Figure 32. D''). Une expression faible dans le pédoncule optique persiste à ce stade (cf. Figure 32. D'). Les transcrits sont également détectés au niveau du cristallin. Au stade 30, le signal *PmPax6* se restreint principalement aux marges dorsale et ventrale de la rétine et aux populations cellulaires internes mais il est exclu les cellules photoréceptrices, positives pour l'expression d'opsines [Melendez-Ferro et al., 2002 ; cf. Figure 33].

L'expression de *PmSix3* est détectée à partir du stade 23 (cf. Figure 32. E). A ce stade, l'expression est présente antérieurement, dans la partie ventrale du tube neural. A partir du stade 24, du signal est visualisé dans l'épithélium olfactif, dans la région ventrale du télencéphale ainsi que dans des zones du di- et du mes-encéphale (cf. Figure 32. F-H). Cette expression est maintenue au moins jusqu'au stade 27. Au niveau de l'œil, *PmSix3* est exprimé dans tout le pédoncule optique et la vésicule optique depuis le stade 24 et jusqu'au stade 26. Plus tardivement, au stade 30, les transcrits sont détectés dans les populations cellulaires internes de la rétine comme dans le cas de *PmPax6*. Cependant, contrairement à ce dernier, le signal exclut les régions les plus marginales (cf. Figure 40).

L'expression de *PmVax2* est détectée au niveau du diencéphale ventral dès le stade 23 et jusqu'au stade 26 (cf. Figure 32. I-L). Aux stades 24, le pédoncule optique et la cupule optique sont également marqués. Le marquage dans la cupule optique est régionalisé et se restreint à sa partie ventrale et nasale. Le signal dans l'œil devient indétectable à partir du stade 25, alors que le marquage dans le diencéphale ventral et la partie ventrale du pédoncule optique persiste.

Aucune expression du gène *PmProx1* n'est détectée aux stades embryonnaires stades 23 à 26). Un très faible signal est observé dans la région interne de la rétine au stade 30 (cf. Figure 330). La présence de ce signal doit cependant être confirmée, en utilisant une sonde plus longue et à des stades plus tardifs du développement de la rétine.

Figure 32. Profile d'expression de Pax6, Six2 et Vax2 dans les structures optiques de l'embryon de lamproie. A-D : Hybridation in situ sur embryons entiers aux stades 23 à 26, avec la sonde Pax6. B', B'', D' et D'' sont des coupes effectuées au niveau du nerf optique et de l'œil, sur les embryons présentés en B et en D, respectivement. E-H : Hybridation in situ sur embryons entiers aux stades 23 à 26, avec la sonde Six3. F', F'', H' et H'' sont des coupes effectuées au niveau du nerf optique et de l'œil, sur les embryons présentés en F et en H, respectivement. I-L : Hybridation in situ sur embryons entiers aux stades 23 à 26, avec la sonde Vax2. J', J'', L' et L'' sont des coupes effectuées au niveau du nerf optique et de l'œil, sur les embryons présentés en J et en L, respectivement. Di : diencéphale ; e : œil ; mes : mésencéphale ; oc : cupule optique ; on : nerf optic ; ul : lèvre supérieure.

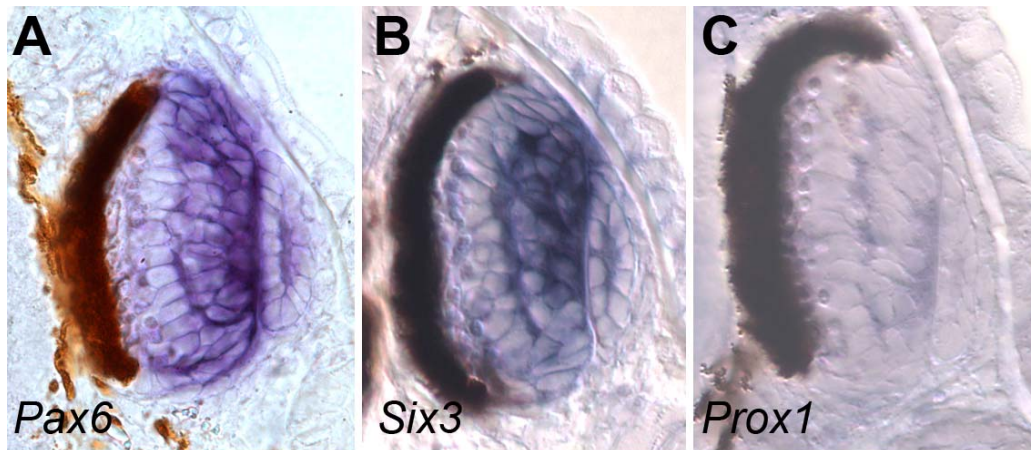


Figure 33. Profile d'expression de Pax6 (A), Six3 (B) et Prox1 (C) dans l'œil de la prolarve. Hybridation in situ sur coupe d'embryons de stade 30. Pax6 est exprimé principalement dans la couche nucléaire interne et dans le cristallin, mais on retrouve également des transcrits dans les photorécepteurs et le RPE ventral. Dans l'œil post métamorphique (OPM), Pax6 est détecté uniquement dans les cellules ganglionnaires et dans la marge. GCL : ganglionar cell layer ; INL : inner nuclear layer ; ONL : outer nuclear layer ; PR : photorecepteurs ; RPE : retinal pigmented epithelium.

Aux stades évagination et cupule optiques, il y a conservation des profils d'expression entre les gènes de lamproie et ceux des gnathostomes. En effet, *PmVax2* reste confiné à la partie du pédoncule optique alors que *PmSix3* et *PmPax6* sont exprimés dans la cupule optique. Ceci suggère donc une conservation dans les mécanismes de régulation de ces gènes.

La seule différence notable réside dans l'expression de *PmPax6* dans le nerf optique chez la lamproie. Chez les gnathostomes, la transcription de *Pax6* est réprimée dans cette région par la voie de signalisation Hh provenant du tube neural ventral, *Pax2* et *Vax1/2*. Or le morphogène Hh n'est pas présent chez la lamproie dans le télencéphale ventral chez la lamproie [Osorio et al., 2005] et *PmPax2* ne semble pas exprimé dans les tissus ventraux [McCauley & Bronner-Fraser, 2002]. Cependant, *PmVax2* est restreint à la partie ventrale du pédoncule optique où *PmPax6* est absent ; les profils d'expression de ces gènes semblent complémentaires, indiquant également une conservation par rapport aux gnathostomes.

Dans la rétine en cours de différenciation, l'expression de *PmProx1*, *PmSix3* et *PmPax6* dans les cellules de la couche interne est également conservée. Concernant les marges de la rétine embryonnaire, elles sont *Pax6*-positives, comme ce que l'on observe chez les osteichtyens. Comme pour les gènes *Otx*, il y a donc conservation de la dynamique d'expression de ces gènes par rapport aux gnathostomes, indiquant que les processus de différenciation de la rétine sont similaires entre ces deux taxons.

II.C. Mécanismes de signalisation impliqués dans la régionalisation proximo-distale de l'œil embryonnaire chez la lamproie : résultats préliminaires.

Les profils d'expression des gènes *PmPax6* et *PmVax2* suggérant une conservation des mécanismes de spécification du pédoncule optique, j'ai cherché à tester la conservation de l'implication de la voie FGF, bien décrite chez le xénope. Pour cela, j'ai effectué des traitements d'embryons au stade 24 à l'aide de l'inhibiteur de cette voie SU5402 (inhibiteur pharmacologique se fixant sur les récepteurs FGF, VEGF et PDGF tyrosine kinase). Les embryons ont été prélevés après trois jours de traitement soit au stade 25.

Des tests préliminaires de concentration montrent que le traitement conduit à de nombreuses anomalies de développement. En effet, dès 50µM, une petite quantité d'individus présentaient des anomalies de développement visibles à partir du stade 25 : cavité cardiaque fortement augmentée, réduction de la taille de la tête, courbure anormale de l'embryon, formation de vésicule/oedèmes dans le vitellus et la partie postérieure de l'embryon. Plus la concentration de SU5402 est importante, plus le nombre d'embryons présentant ce phénotype est grand. La majorité des embryons restent cependant viables aux

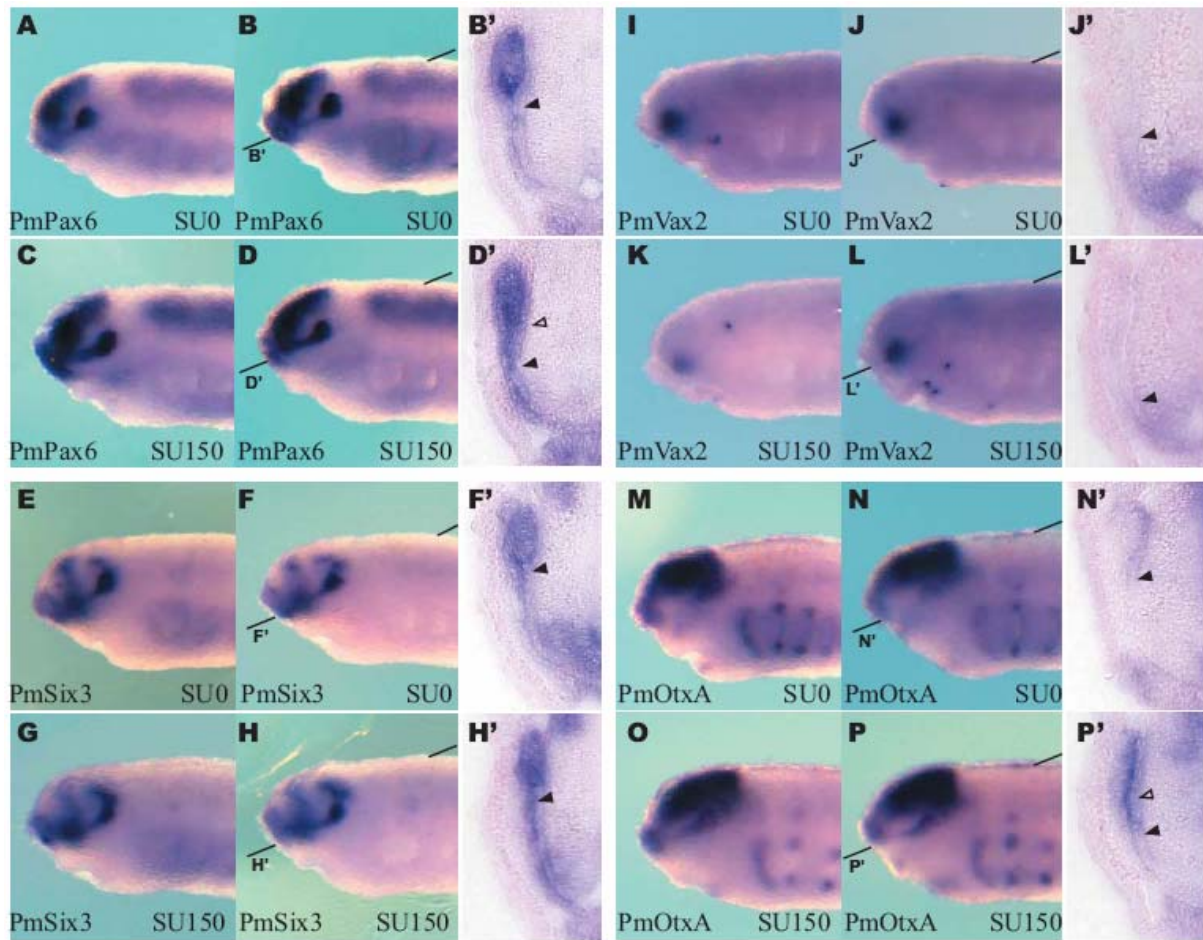


Figure 34. Traitement au SU5402. Des embryons de stade 24 ont été traités sur 3 jours au SU5402, puis fixés. Hybridation in situ sur embryons entiers avec les sondes PmPax6 (A-D), PmSix3 (E-H), PmVax2 (I-L) et PmOtxA (M-P). Pour chaque sonde, 2 embryons contrôles et 2 embryons traités sont présentés. Les coupes en B', D', F', H', J', L', N' et P' ont été effectuées sur les embryons présentés en B, D, F, H, J, L, N et P respectivement, suivant le plan du pédoncule optique.

concentrations les plus fortes testées : 150 μ M. C'est cette concentration que j'ai utilisée pour tester un effet éventuel sur la spécification du pédoncule optique.

Les hybridations ont été effectuées avec les sondes *PmPax6*, *PmVax2*, *PmOtxA* et *PmSix3*, sur des embryons contrôles et traités.

Lors de l'utilisation des sondes *PmPax6* et *PmSix3*, on note une intensification significative du signal dans le pédoncule optique par rapport à la cupule optique chez tous les embryons traités avec la sonde *PmPax6* (n=5) et pour 60% des embryons avec la sonde *PmSix3* (n=5), par rapport aux embryons contrôles (cf. Figure 34. A-D et E-H).

Pour la sonde *Vax2*, le signal est visible dans la partie ventrale du pédoncule optique chez les embryons sauvages (cf. Figure 34. J') et est présent dans un territoire un peu plus restreint chez l'embryon traité (cf. Figure 34. L'). Seuls 2 embryons de chaque conditions ont été coupés, il est donc nécessaire d'effectuer de nouvelles manipulations afin de confirmer ce résultat.

Concernant la sonde *PmOtxA*, le signal est intensifié et présente une expansion chez tous les embryons traités (n=5) alors qu'il est normalement restreint à la rétine pigmentée présomptive (cf. Figure 34. M-P).

Ces données soutiennent donc l'hypothèse d'une conservation du rôle de la signalisation FGF dans la spécification ventrale du pédoncule optique. Elles doivent cependant être confirmées par des séries supplémentaires indépendantes d'expériences. Une étude des relations entre l'effet observé et la dose d'inhibiteur utilisée devra également être engagée.

L'identification du ligand impliqué dans ce processus reste également à préciser. En effet, les morphogènes FGF3 et FGF8 sont exprimés au niveau du pédoncule optique chez les ostéichthyens [Martinez-Morales et al., 2005]. Chez la lamproie, un paralogue FGF8 a été décrit dans l'oreille interne [Hammond & Whithfield, 2006], mais aucune donnée n'a été publiée quant à une éventuelle expression dans les tissus neuraux.

CHAPITRE III

Caractérisation d'homologues de FoxG1 chez la lamproie *Petromyzon marinus* et la roussette *Scyliorhinus canicula*.

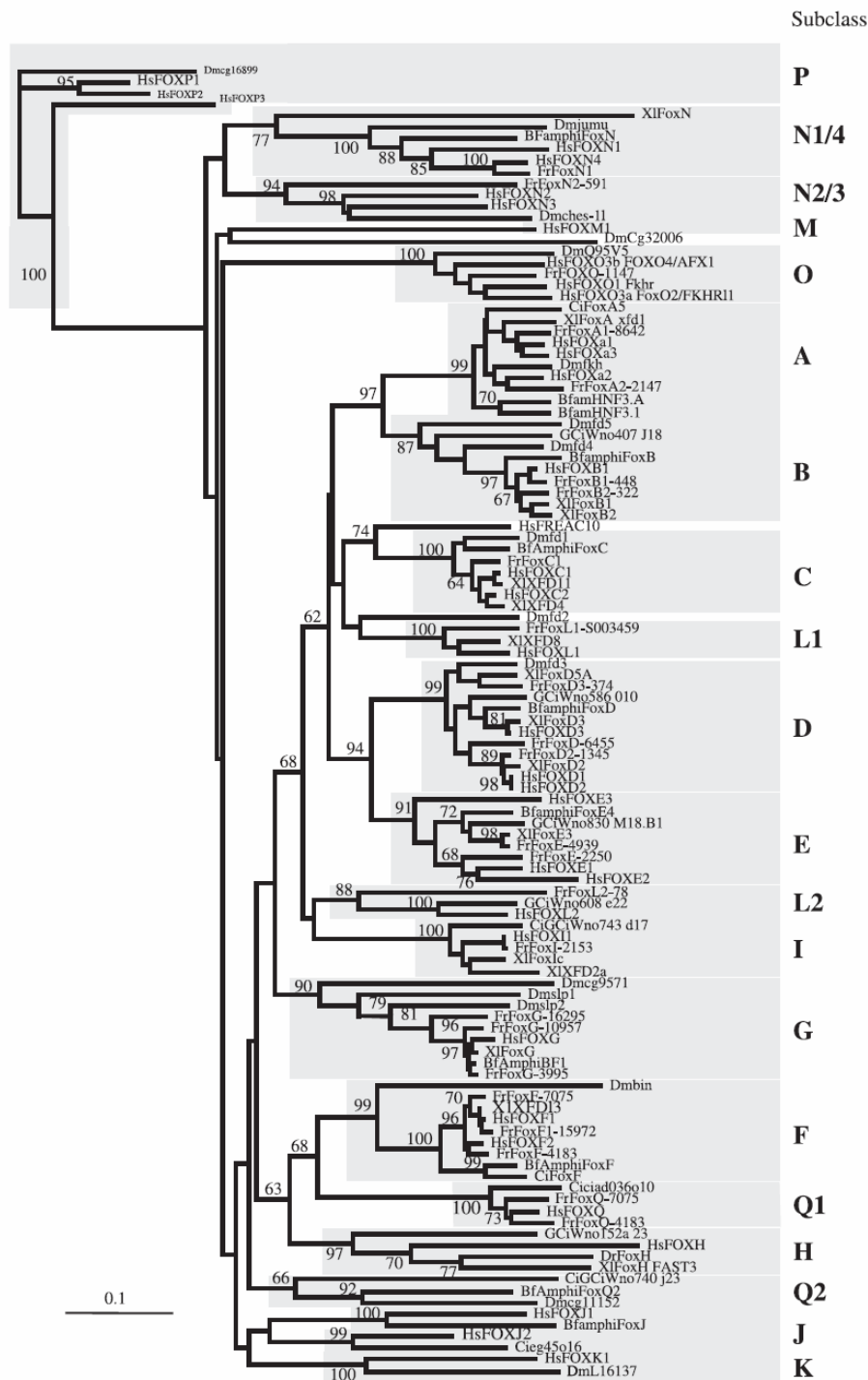


Figure 35. Arbre phylogénétique de la famille Fox par la méthode de Neighbor Joining. Les séquences utilisées pour cette arbre proviennent de l'amphioxus (*Branchiostoma floridae* ; amphi), de la cione (*Ciona intestinalis* ; Ci ou GCi), de la drosophile (*Drosophila melanogaster* ; Dm), du poisson zèbre (*Danio rerio* ; Dr), du fugu (*Fugu rubispes* ; Fr), de l'homme (*Homo sapiens* ; Hs) et du xénope (*Xenopus laevis* ; Xl). Les numéros représentent le pourcentage de bootstrap sont présentés à coté du nœud correspondant ; les valeur de bootstrap inférieure à 60 ne sont pas précisées. Les encadrements gris correspondent aux sousclasses. Il n'y a pas de racine à cet arbre, la soufamille FoxP a donc été utilisée comme racine pour une meilleure lisibilité. [tiré de Mazet et al., 2003]

CHAPITRE III : **Caractérisation d'un homologue de *FoxG1* chez la lamproie *Petromyzon marinus* et la roussette *Scyliorhinus canicula*.**

Nous nous sommes intéressés au gène FoxG1 de lamproie pour tester la conservation de son implication dans la régionalisation naso-temporale de la rétine à l'échelle des vertébrés. Son expression dans l'oeil de lamproie est cependant très restreinte. Les données montrent en revanche pour la première fois chez cette espèce une expression télencéphalique du gène, sous le contrôle d'une signalisation impliquant un récepteur aux FGF.

I. Origine du gène *FoxG1* chez les métazoaires et évolution structurale chez les vertébrés

I.A. Origine des gènes de la classe FoxG

La première caractérisation des gènes désignés aujourd'hui sous le nom de *FoxG* a été réalisée chez la drosophile, avec l'identification, par criblage génétique, de deux paralogues : *sloppy-paired 1* et 2 [Grossniklaus et al., 1992]. Ces deux gènes, situés sur un même locus et très clairement apparentés de par leur séquence protéique, profil d'expression et fonction, jouent des rôles redondants dans la spécification de segments céphaliques (mandibulaire, oculaire et antennal), ainsi que dans le contrôle de la segmentation du tronc. Tous deux possèdent un domaine de liaison à l'ADN de type « Winged Helix », apparenté à celui de la protéine forkhead et appartiennent donc à la famille des gènes Fox (pour Forkhead box). Cette dernière compte 23 classes chez les vertébrés, dont la grande majorité contient à la fois des gènes de protostomiens et de deutérostomiens, et ont donc été fixées avant la séparation entre ces groupes [Kaestner et al., 2000 ; Yamada & Martindale, 2002 ; Mazet et al. 2003 ; Magie et al., 2005 ; Yu et al. 2008 ; Hannerhali & Kaestner, 2009 ; Shimeld et al. 2010 ; cf. Figure 35]. Parmi celles-ci, plusieurs sont retrouvées chez des cténaires, des cnidaires et même des éponges, ce qui indique une origine ancienne chez les métazoaires [Larroux et al. 2008].

C'est notamment le cas de la classe FoxG. Des gènes dont le domaine forkhead est sans ambiguïté apparenté à celui de *sloppy paired* sont ainsi présents chez les protostomiens, avec des gènes identifiés chez l'araignée *Cupiennius salei*, le coléoptère *Tribolium castaneum* ou la planaire *Dugesia japonica* [Koinuma et al., 2003 ; Damen et al., 2005 ; Choe et al., 2006], chez tous les grands groupes de deutérostomiens : les vertébrés, l'hémichordé *Saccoglossus kowalevskii*, l'amphioxus *Branchiostoma floridae*, l'ascidie *Ciona intestinalis* [Toresson et al., 1998 ; Lowe et al., 2003], mais également chez l'anémone de mer *Nematostella vectensis*, un cténophore *Mnemiopsis leydyi* [Yamada & Martindale, 2002] et même l'éponge *Amphimedon queenslandica* [Larroux et al. 2008]. Ces gènes s'expriment de façon régionalisée chez tous les métazoaires étudiés, y-compris le cténophore *M. leydyi*, chez lequel les transcrits sont

restreints aux micromères de la partie aborale [Yamada & Martindale, 2002]. En ce qui concerne les bilatériens, ces gènes présentent dans tous les cas étudiés un territoire d'expression antérieur. Ces gènes sont ainsi exprimés dans les segments céphaliques chez les arthropodes et on retrouve une expression dans le système nerveux central antérieur de la planaire [Graussniklauss et al., 1992 ; Koinuma et al., 2003]. Des expressions localisées dans la partie antérieure de l'embryon ont également été observées chez les vertébrés (voir ci-dessous), l'hémicordé *S. kowalevski* (ectoderme antérieur) et l'amphioxus *B. floridae* (vésicule cérébrale) [Toresson et al., 1998 ; Lowe et al., 2003].

I.B. Composition de la famille FoxG chez les vertébrés, principales caractéristiques d'expression

Chez les vertébrés, seuls les gènes d'osteichthyens ont pour l'instant été caractérisés : un gène unique a ainsi été identifié chez le xénope, le poulet ainsi que tous les mammifères étudiés [Tao & Lai, 1992 ; Bourguignon et al., 1998 ; Chang et al., 1995]. En revanche, au moins trois gènes, appelés *Foxg1a*, *Foxg1b* et *Foxg1c* sont présents chez le poisson zèbre [Toresson et al., 1998 ; Zhao et al., 2009].

Les comparaisons de leurs caractéristiques d'expression mettent en évidence des territoires conservés chez l'ensemble des osteichthyens. A des stades précoces, l'expression est localisée dans la partie la plus antérieure de la plaque neurale puis dans l'ensemble du télencéphale, région dorso-médiane exclue [Tao & Lai, 1992 ; Papalopulu & Kintner, 1996 ; Dou et al., 1999 ; Toresson et al., 1998]. Une expression télencéphalique persiste ensuite durant toute l'embryogenèse, excepté dans la région dorso-médiane, mais elle se restreint ensuite au télencéphale ventral [Dou et al., 1999].

On retrouve également une expression dans les structures sensorielles comme la cupule optique et les placodes optique et olfactive [Toresson et al., 1998 ; Pauley et al., 2006 ; Duggan et al., 2008]. Dans l'œil, l'expression de *FoxG1* est visible dès la formation de l'évagination optique. Ce gène continue ensuite à être exprimé dans le pédoncule optique et dans les cellules ganglionnaires situées dans la région nasale de la cupule optique [Tao & Lai, 1992 ; Pratt et al., 2004]. Concernant le système auditif, *FoxG1* est d'abord exprimé au niveau des placodes otiques, puis dans l'oreille interne à la fois chez l'embryon et chez l'adulte [Tao & Lai, 1992 ; Hebert & McConnell, 2000 ; Toresson et al., 1998 ; Zhao et al., 2009 ; Urness et al., 2010]. Enfin, des transcrits pour *FoxG1* sont également retrouvés dans la placode olfactive puis dans les bulbes olfactifs cellulaires [Duggan et al., 2008 ; Kawauchi et al., 2009]. Chez le poisson zèbre qui possède trois gènes paralogues, la forme *Foxg1a* est exprimée dans l'ensemble de ces territoires. En revanche, l'expression des paralogues *Foxg1b* et *Foxg1c* se restreint à la rétine et l'oreille interne, respectivement, ce qui suggère une spécialisation fonctionnelle de ces gènes après duplication [Toresson et al., 1998 ; Zhao et al., 2009].

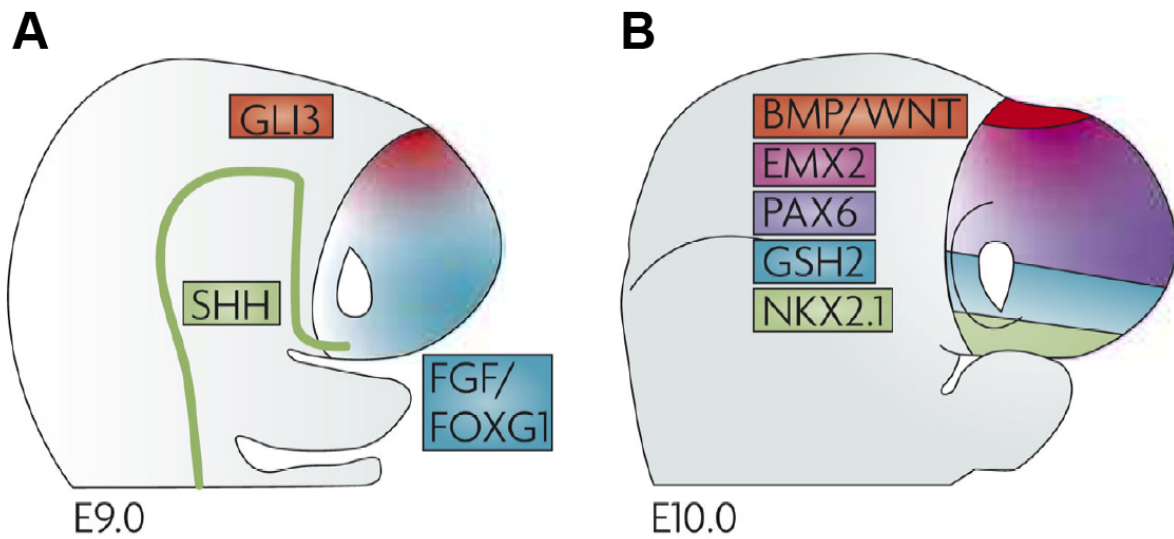


Figure 36. Régionalisation dorso-ventrale du télencéphale chez la souris. Au stade E9,0 (A), le télencéphale est subdivisé en 2 sous régions alors qu'au stade E10,0 (B), il est subdivisé en 4 régions. La région dorsale marquée par Gli3 au stade E9 est divisée en deux au stade E10 par l'expression de BMP et de WNT dans la partie la plus dorsale et par des gradients d'Emx et de Pax6 dans la partie médiane. La région ventrale marquée par FGF et FoxG1 au stade E9 est divisée en deux au stade E10 par l'expression de Nkx2.1 dans la partie la plus ventrale et par Gsh2 dans la partie médiane. [Tiré de Hébert & Fishell, 2008].

II. Fonctions du gène FoxG1 chez les vertébrés

Les analyses fonctionnelles de FoxG1 ont été principalement ciblées sur le cerveau embryonnaire et les organes des sens chez la souris, le poisson-zèbre et dans une moindre mesure le xénope et le poulet. Elles ont mis en évidence des rôles relativement complexes dans l'acquisition de l'identité régionale de grands domaines télencéphaliques, dans le contrôle de la neurogenèse et du guidage axonal.

II.A. Télencéphale

FoxG1 apparaît tout d'abord comme un acteur clef, jouant des rôles complexes, dans la régionalisation du télencéphale (cf. Figure 36). Une première fonction du gène, démontrée chez la souris et chez le poisson-zèbre, est la spécification du sous-pallium. En absence d'activité de FoxG1, on observe chez les deux espèces une forte réduction du domaine d'expression de gènes marqueurs de ce territoire, tels que *Nkx2.1* et *Dlx2* [Dou et al., 1999 ; Huh et al., 1999 ; Danesin et al., 2009]. Cette fonction du gène s'exerce en aval des signalisations Shh et Fgf8, [Danesin et al., 2009 ; Manuel et al., 2010]. Un autre rôle distinct de FoxG1 est la restriction de l'expansion ventrale du pallium et du territoire d'expression de ces marqueurs (*Emx2*, *Pax6*), via une répression directe de la transcription de *Wnt8* et de la signalisation Wnt canonique médiée par ce ligand dans la partie dorsale du télencéphale [Danesin et al., 2009].

Les autres rôles bien documentés du gène au niveau du télencéphale concernent le contrôle de la neurogenèse et de la prolifération cellulaire. Chez des souris présentant une mutation nulle de *FoxG1*, la différenciation neurale dans le télencéphale est plus précoce que chez le sauvage et le nombre de cellules à se différencier est plus important [Dou et al., 1999 ; Hanashima et al., 2007]. Inversement, la surexpression ou l'expression ectopique de FoxG1 chez le xénope entraîne un retard de différenciation et une prolifération cellulaire anormalement élevée [Bourguignon et al., 1998 ; Hardcastle & Papalopulu, 2000]. Les mécanismes moléculaires sous-jacents pourraient faire intervenir une fixation de FoxG1 aux protéines effectrices en aval de la signalisation des TGF- β (telles que FAST2 ou les Smads) et ainsi inactiver cette voie de signalisation, dont le rôle est d'inhiber la prolifération cellulaire [Dou et al., 2000 ; Seoane et al., 2004]. FoxG1 permet également de réprimer la transcription des facteurs p21 et p27^{XIC1}, deux inhibiteurs de kinase cycline-dépendante [Hardcastle & Papalopulu, 2000 ; Seoane et al., 2004 ; Siegenthaler et al., 2008]. Enfin, il a été démontré que FoxG1 et le facteur Bmi1 interagissent afin de maintenir l'état multipotent des cellules souches neurales, dans le cerveau antérieur [Fasano et al., 2009].

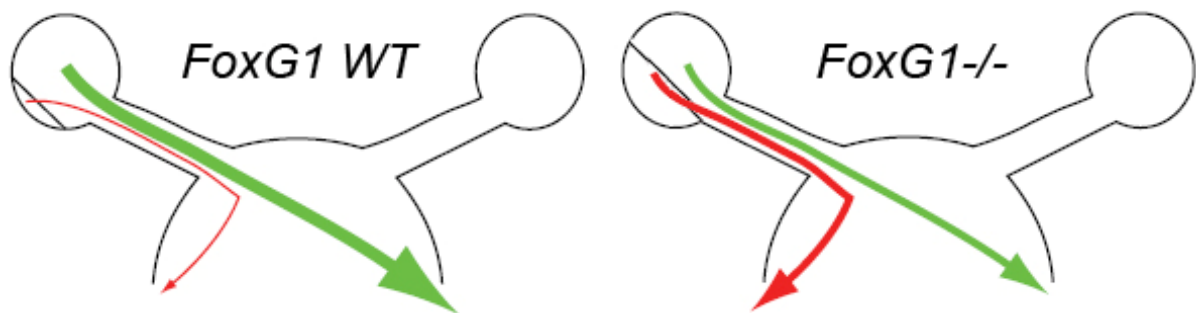


Figure 37. Schématisation des projections ipsi- et contra-latérales chez les embryons sauvages et mutés pour FoxG1. Chez les embryons sauvages, seules les cellules ganglionnaires situées dans la région temporale projettent ipsilatéralement. La présence de FoxG1 dans les axones facilite le passage du chiasme optique. Chez les embryons mutants pour FoxG1, les fibres axonales provenant de toute la rétine sont plus facilement répulsées lors du voisinage du chiasme optique ; elles rejoignent alors le trajet ipsilatéral. [Adapté de Pratt et al., 2004 et Petros et al., 2008]

Les mécanismes qui régulent l'expression de *FoxG1* dans le télencéphale ont fait l'objet d'analyses détaillées. Chez la souris, la signalisation FGF joue un rôle clef dans la formation précoce du télencéphale, qui est sous le contrôle d'un centre organisateur sécrétant plusieurs ligands FGF et localisé dans la partie la plus rostrale de la plaque neurale (Anterior Neural Ridge ou bourrelet neural antérieur). Cette signalisation est nécessaire à la transcription du gène dans le télencéphale, comme le montre l'analyse de triples mutants conditionnels pour les récepteurs *FgfR1*, *FgfR2* et *FgfR3* [Paek et al., 2009].

L'expression du gène est également régulée au niveau post-traductionnel. En effet, la protéine présente une localisation nucléaire dans les cellules progénitrices du télencéphale mais cytoplasmique dans les cellules en cours de différenciation. La combinaison d'analyses biochimiques, d'études *in vivo* chez le xénope et dans des cultures primaires de cortex embryonnaire de souris suggèrent que cette localisation est régulée par des phosphorylations au niveau de résidus bien identifiés de la protéine, qui conduisent soit à l'importation dans le noyau, soit à l'exportation du noyau, et cela sous le contrôle des voies CKI (caséine kinase I) et FGF-Akt kinase respectivement [Regad et al., 2007].

II.B. Organes sensoriels

En accord avec les profils d'expression observés, les embryons de souris mutants pour *FoxG1* présentent des anomalies au niveau de l'œil, de l'épithélium olfactif et de l'oreille interne [Hwang et al., 2009 ; Duggan et al., 2009 ; Kawauchi et al., 2009a]. L'analyse de l'épithélium olfactif des embryons *FoxG1*^{-/-} montre une réduction importante du nombre des progéniteurs neuronaux, qui est restauré dans le mutant double pour le gène *Gdf11*, membre de la super-famille des TGF- β [Kawauchi et al., 2009b]. Dans le cas de l'oreille interne et de l'œil, les analyses se sont principalement focalisées sur le rôle du gène dans le guidage axonal [Pratt et al., 2004].

Dans l'œil embryonnaire, l'expression de *FoxG1* est dépendante de la signalisation FGF et restreinte à la partie dorso-nasale de la rétine [Picker et al., 2009]. C'est du secteur opposé, ventro-temporal, que sont issues la plupart des projections ipsi-latérales des cellules ganglionnaires (les projections contra-latérales, qui traversent la ligne médiane au niveau du chiasme optique et qui représentent plus de 95% des projections chez la souris à la naissance, sont en revanche issues de l'ensemble de la rétine). Chez des embryons *FoxG1*^{-/-}, on observe une expansion du territoire de gènes dont l'expression est restreinte au secteur temporal à l'état sauvage (*Zic2*, *EphB1*, *Foxd1*). En accord avec les rôles décrits pour ces gènes dans le contrôle du type de projections issues de la rétine, on observe chez ce mutant une augmentation du nombre de projections ipsi-latérales [Pratt et al., 2004 ; Tian et al., 2008 ; cf. Figure 37].

HsFoxG1 MLDMGDRKE-VKMIIPKS---SFSINSLV-PEAVQN-DNHASHGHHNSHHQHNNHHHHHHHHPPPPAPQPPPPPPQPPPPPPPPAPQPPQTRGAPAAAD
 MmFoxG1 MLDMGDRKE-VKMIIPKS---SFSINSLV-PEAVQN-DNHASHGHHNSHHQHNNHHHHHHHHPPPPAPQPPPPPPQPPPPPPPPAPQPPQTRGAPAAAD
 XtFoxG1 ---MGDRKE-VKMIIPKS---SFSINSLV-PEAVQN-DN-----HPQHHHHHHHLLQLPQQSHHLLQPHHRLPQE-----EDLDLSLLEVK
 CmFoxG1A MLDMGDRKE-VKMIIPKS---SFSINSLV-PEAVQS-DN-----HHHRSAPDDEDDKLLPAVESK-----SENVPSKTDSSSG
 ScFoxG1A MLDMGDRKE-VKMIIPKS---SFSINSLV-PEAVQS-DN-----RHRSAPQEDDKNLLPTLESK-----SENTLSKSDNSSA
 DrFoxG1c ---MEDLKPPVFFHKS---SFSISLLLRHER-----ARSDAQEAPRSRSAPKPPAR-----CHQPADKPFVRERN
 DrFoxG1a MLDMGDRKE-VKMIIPKS---SFSINSLV-PEAVQS-DN-----HHHHHHQQQQHHHRTVHEEEKTPLPAAQVQEQK-----SENTCAKSDNSSH
 DrFoxG1b ---MVQKST---SFSIKSLLLPSK-----FSDADESAERGGSPAPVQD-----LDKPEPDAE
 ScFoxG1B MLDMGDRKE-VKMIIPKS---SFSIKSLLLPSK-----FSDADESAERGGSPAPVQD-----LDKPEPDAE
 CmFoxG1B MLDMGDRKE-VKMIIPKS---SFSIKSLLLPSK-----FSDADESAERGGSPAPVQD-----LDKPEPDAE
 PmFoxG1 MPDMADRVTDTRALPSSRASSSFSIARLL-PDAEASRPASRGSPDPDLSCEPTEPESPVITTTTATIVNNNNNNNRGSVNNHAANTTVSSSSS-GGGSSSEE

 HsFoxG1 DDGPGQQLLLPPPPPPPPAAALDGAADGLGGKGEPPGGSPGLAPVGPDEKEKGAGAGGEEKKGAGEGGKDGEKKEG-EKKNGKYEPKPPFSYNALIMMA
 MmFoxG1 DDGPGQQLLLPPPPPPPPAAALDGAADGLGGKGEPPGGSPGLAPVGPDEKEKGAGAGGEEKKGAGEGGKDGEKKEG-EKKNGKYEPKPPFSYNALIMMA
 XtFoxG1 TES-----LPP-----GKGDPE--AASELPE--GEDKEK-----SEDKKADGGGKDGENGKEGEGEKKNGKYEPKPPFSYNALIMMA
 CmFoxG1A EQBS-----LPP-----ABEKEK-----QEEKK-----ADGKEGDDGGKGE-EKKNGKYEPKPPFSYNALIMMA
 ScFoxG1A EPFC-----LPP-----ABEKEK-----QEEKK-----VDGKEGDAGKEG-EKKNGKYEPKPPFSYNALIMMA
 DrFoxG1c ELVVRT-----LPP-----BKKDG-----QEEKK-----VGEPPKCEGTDVPEKKK-RPDKPPFSYNALIMMA
 DrFoxG1a DSSS-----LPP-----BKKDG-----QEEKK-----DAKEGEGGKEG-EKKNGKYEPKPPFSYNALIMMA
 DrFoxG1b MDNAQR-----LPP-----DAEEP-----ELQTKKKKKFDPKPPFSYNALIMMA
 ScFoxG1B DNTES-----LPP-----QVSAE-----EDDAKKD-----DKKHGKYDPKPPFSYNALIMMA
 CmFoxG1B DNTES-----LPP-----QVSAE-----EDDAKKD-----DKKHGKYDPKPPFSYNALIMMA
 PmFoxG1 EKTDDAEAPAGC-----LPP-----ADDKEKGAGSRASDGGGES-----KED-GDGAKEGDPKPPFSYNALIMMA

 HsFoxG1 IRQSPKRLTLNGIYEFIMKNFPPYYRENKQGWQNSIRHNLNLNCKCFVKVPSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNVWMLDPSSDDVFIGGTTGKLRARS-TTSRA
 MmFoxG1 IRQSPKRLTLNGIYEFIMKNFPPYYRENKQGWQNSIRHNLNLNCKCFVKVPSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNVWMLDPSSDDVFIGGTTGKLRARS-TTSRA
 XtFoxG1 IRQSPKRLTLNGIYEFIMKNFPPYYRENKQGWQNSIRHNLNLNCKCFVKVPSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNVWMLDPSSDDVFIGGTTGKLRARS-TTSRA
 CmFoxG1A IRQSPKRLTLNGIYEFIMKNFPPYYRENKQGWQNSIRHNLNLNCKCFVKVPSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNVWMLDPSSDDVFIGGTTGKLRARS-TTSRA
 ScFoxG1A IRQSPKRLTLNGIYEFIMKNFPPYYRENKQGWQNSIRHNLNLNCKCFVKVPSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNVWMLDPSSDDVFIGGTTGKLRARS-TTSRA
 DrFoxG1c IRQSPKRLTLNGIYEFIMKNFPPYYRENKQGWQNSIRHNLNLNCKCFVKVPSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNVWMLDPSSDDVFIGGTTGKLRARS-TTSRA
 DrFoxG1a IRQSPKRLTLNGIYEFIMKNFPPYYRENKQGWQNSIRHNLNLNCKCFVKVPSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNVWMLDPSSDDVFIGGTTGKLRARS-TTSRA
 DrFoxG1b IRQSPKRLTLNGIYEFIMKNFPPYYRENKQGWQNSIRHNLNLNCKCFVKVPSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNVWMLDPSSDDVFIGGTTGKLRARS-ATSRG
 ScFoxG1B IRQSPKRLTLNGIYEFIMKNFPPYYRENKQGWQNSIRHNLNLNCKCFVKVPSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNVWMLDPSSDDVFIGGTTGKLRARS-ATSRG
 CmFoxG1B IRQSPKRLTLNGIYEFIMKNFPPYYRENKQGWQNSIRHNLNLNCKCFVKVPSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNVWMLDPSSDDVFIGGTTGKLRARS-ATSRG
 PmFoxG1 IRQSPKRLTLNGIYEFIMKNFPPYYRENKQGWQNSIRHNLNLNCKCFVKVPSLNKCFVKVPRHYDDPGKGNVWMLDPSSDDVFIGGTTGKLRARS-ATSRG

DOMAINE FORKHEAD
 HsFoxG1 KL-----AFKRGARLTSTGLTFMDR-AGSLYWMSPFLLSLHHPRASSTLSYNG-----TTSAYP~SHEM~PYSSVLT
 MmFoxG1 KL-----AFKRGARLTSTGLTFMDR-AGSLYWMSPFLLSLHHPRASSTLSYNG-----TTSAYP~SHEM~PYSSVLT
 XtFoxG1 KL-----AFKRGARLTSTGLTFMDR-AGSLYWMSPFLLSLHHPRASSTLSYNG-----TTSAYP~SHEM~PYSSVLT
 CmFoxG1A KL-----AFKRGARLTSTGLTFMDR-AGSLYWMSPFLLSLHHPRASSTLSYNG-----TTSAYP~SHEM~PYSSVLT
 ScFoxG1A KL-----AFKRGARLTSTGLTFMDR-AGSLYWMSPFLLSLHHPRASSTLSYNG-----TTSAYP~SHEM~PYSSVLT
 DrFoxG1c KL-----AFKRGARLTSTGLTFMDR-AGSLYWMSPFLLSLHHPRASSTLSYNG-----TTSAYP~SHEM~PYSSVLT
 DrFoxG1a KL-----AFKRGARLTSTGLTFMDR-AGSLYWMSPFLLSLHHPRASSTLSYNG-----TTSAYP~SHEM~PYSSVLT
 DrFoxG1b KL-----AFKRGARLTSTGLTFMDR-AGSLYWMSPFLLSLHHPRASSTLSYNG-----TTSAYP~SHEM~PYSSVLT
 ScFoxG1B KL-----AFKRGARLTSTGLTFMDR-AGSLYWMSPFLLSLHHPRASSTLSYNG-----TTSAYP~SHEM~PYSSVLT
 CmFoxG1B KL-----AFKRGARLTSTGLTFMDR-AGSLYWMSPFLLSLHHPRASSTLSYNG-----TTSAYP~SHEM~PYSSVLT
 PmFoxG1 KLQACRRNPYLA TAGLALRAPPRFSAHDALMDRAG-SLYWSVSEFLPLHSHFAGSMYGGAGSGGGGGG---AGGGGGGCGPYPAASHAGPYSPQLQL

amorce
 HsFoxG1 QNSLGNHNSFSTANGLSVDRLVNG---EIPYAT-----HHLT-AAALAAASVP-----CGLS~VPCSGTYSINPCSVNLLAGQTS
 MmFoxG1 QNSLGNHNSFSTANGLSVDRLVNG---EIPYAT-----HHLT-AAALAAASVP-----CGLS~VPCSGTYSINPCSVNLLAGQTS
 XtFoxG1 QNSLGNHNSFSTANGLSVDRLVNG---EIPYAT-----HHLT-AAALAAASVP-----CGLS~VPCSGTYSINPCSVNLLAGQTS
 CmFoxG1A QNSLGNHNSFSTANGLSVDRLVNG---EIPYAT-----HHLT-AAALAAASVP-----CGLS~VPCSGTYSINPCSVNLLAGQTS
 ScFoxG1A QNSLGNHNSFSTANGLSVDRLVNG---EIPYAT-----HHLT-AAALAAASVP-----CGLS~VPCSGTYSINPCSVNLLAGQTS
 DrFoxG1c QNSLGNHNSFSTANGLSVDRLVNG---EIPYAT-----HHLT-AAALAAASVP-----CGLS~VPCSGTYSINPCSVNLLAGQTS
 DrFoxG1a QNSLGNHNSFSTANGLSVDRLVNG---EIPYAT-----HHLT-AAALAAASVP-----CGLS~VPCSGTYSINPCSVNLLAGQTS
 DrFoxG1b QNSLGNHNSFSTANGLSVDRLVNG---EIPYAT-----HHLT-AAALAAASVP-----CGLS~VPCSGTYSINPCSVNLLAGQTS
 ScFoxG1B QNSLGNHNSFSTANGLSVDRLVNG---EIPYAT-----HHLT-AAALAAASVP-----CGLS~VPCSGTYSINPCSVNLLAGQTS
 CmFoxG1B QNSLGNHNSFSTANGLSVDRLVNG---EIPYAT-----HHLT-AAALAAASVP-----CGLS~VPCSGTYSINPCSVNLLAGQTS
 PmFoxG1 VQQSQCADAAGQFPNLASAAQGLCLGRLGGGHQELVEHLGLQSFMQQQQ---HHHGSAAAAAAAAAAAVAACSTEVVPCGGTPEGSS~CSLHST~GANG

 HsFoxG1 YFFPHVPHPSMTSQSSSTMS---ARAAASSTSS-PQAPSTLPCESLRPSLPSFTTGLSGGLSDYFTHQNQGSNNPLIH
 MmFoxG1 YFFPHVPHPSMTSQSSSTMS---ARAAASSTSS-PQAPSTLPCESLRPSLPSFTTGLSGGLSDYFTHQNQGSNNPLIH
 XtFoxG1 YFFPHVPHPSMTSQSSSTMS---ARAAASSTSS-PQAPSTLPCESLRPSLPSFTTGLSGGLSDYFTHQNQGSNNPLIH
 CmFoxG1A YFFPHVPHPSMTSQSSSTMS---ARAAASSTSS-PQAPSTLPCESLRPSLPSFTTGLSGGLSDYFTHQNQGSNNPLIH
 ScFoxG1A YFFPHVPHPSMTSQSSSTMS---ARAAASSTSS-PQAPSTLPCESLRPSLPSFTTGLSGGLSDYFTHQNQGSNNPLIH
 DrFoxG1c YFFPHVPHPSMTSQSSSTMS---ARAAASSTSS-PQAPSTLPCESLRPSLPSFTTGLSGGLSDYFTHQNQGSNNPLIH
 DrFoxG1a YFFPHVPHPSMTSQSSSTMS---ARAAASSTSS-PQAPSTLPCESLRPSLPSFTTGLSGGLSDYFTHQNQGSNNPLIH
 DrFoxG1b YFFPHVPHPSMTSQSSSTMS---ARAAASSTSS-PQAPSTLPCESLRPSLPSFTTGLSGGLSDYFTHQNQGSNNPLIH
 ScFoxG1B YFFPHVPHPSMTSQSSSTMS---ARAAASSTSS-PQAPSTLPCESLRPSLPSFTTGLSGGLSDYFTHQNQGSNNPLIH
 CmFoxG1B YFFPHVPHPSMTSQSSSTMS---ARAAASSTSS-PQAPSTLPCESLRPSLPSFTTGLSGGLSDYFTHQNQGSNNPLIH
 PmFoxG1 YFFPHVPHPSMTSQSSSTMS---ARAAASSTSS-PQAPSTLPCESLRPSLPSFTTGLSGGLSDYFTHQNQGSNNPLIH

Figure 38. Alignement des séquences protéiques de FoxG1 de vertébrés. La séquence FoxG1 de la lamproie a été alignée via ClustalW, avec celles de l'homme (HsFoxG1 : NP_005240.3), de la souris (MmFoxG1 : NP_001153584.1), du xénope (XtFoxG1 : AA159145.1), du poisson zèbre (DrFoxG1a : NP_571142.1 ; DrFoxG1b : NP_998079.1 ; DrFoxG1c : NP_001038680.1), de la chimère (CmFoxG1A : AAVX01154608.1 ; CmFoxG1B : AAVX01346574.1) et de rousette (ScFoxG1A et ScFoxG1B). Le domaine Forkhead est démarqué par l'encadrement noir ; les amorces utilisées afin de synthétiser la sonde ARN chez la lamproie sont signalées par l'encadrement jaune. Les acides aminés spécifiques des gènes FoxG1A et FoxG1B sont représentés en bleu et en rouge, respectivement.

III. Caractérisation des gènes FoxG1 chez la lamproie *Petromyzon marinus* et la roussette : expression aux stades embryonnaires chez la lamproie.

(C. Rocancourt, A. Menuet, données non publiées)

La plupart des subdivisions du télencéphale apparaissent bien conservées entre lamproie et les organismes modèles des ostéichthyens. Certaines différences ont cependant été notées. Ainsi, un territoire sous-pallial appelé MGE (pour Medial Ganglionic Eminence) exprime le facteur de transcription *Nkx2.1* sous le contrôle de la signalisation hedgehog [Murakami et al., 2005]. Ce territoire a été identifié chez tous les actinoptérygiens comme chez les tétrapodes étudiés jusqu'à présent mais il reste indétectable chez la lamproie [Osorio et al., 2005]. Par ailleurs, aucune indication d'expression des composants de la voie FGF n'a pour l'instant pu être détectée au cours des étapes précoces du développement télencéphalique chez cette espèce [Guérin et al., 2009].

Ces données posent donc la question de la conservation de l'ANR (Anterior Neural Ridge ou bourrelet antérieur neural), centre organisateur bien décrit chez les ostéichthyens et exprimant *Fgf8* dès le stade plaque neurale. Afin d'évaluer la conservation des mécanismes précoces contrôlant la formation du télencéphale, le laboratoire a amplifié par PCR des fragments de gènes FoxG1 à la fois chez la lamproie et la roussette. J'ai utilisé la sonde obtenue chez la lamproie pour étudier l'expression embryonnaire du gène et évaluer la conservation de la régionalisation naso-temporale de la cupule optique chez cette espèce.

III. A. Caractérisation d'un gène FoxG1 chez la lamproie et de deux paralogues chez la roussette.

La recherche de séquences codant pour FoxG1 a été effectuée en utilisant l'algorithme tblastn dans les séquences génomiques publiées en ligne pour la lamproie *P. marinus* (http://pre.ensembl.org/Petromyzon_marinus/Info/Index), à l'aide d'une séquence protéique de souris (NP_001153584.1). Cette recherche a conduit à l'identification d'un contig (Pm_Contig79929), portant la totalité de la région codante sur un seul exon. La séquence protéique déduite montre que le gène *PmFoxG1* de lamproie code pour une protéine de 438 acides aminés, possédant un domaine Winged helix très conservé avec celui des ostéichthyens (> 92% à 95% d'identité, voir Figure 38).

La recherche de séquences FoxG1 chez la roussette *Scyliorhinus canicula* a été effectuée de la même façon, à partir d'une base de données contenant 250 000 ESTs embryonnaires obtenues chez cette espèce par le laboratoire en collaboration avec le Génoscope. Celle-ci a conduit à l'identification de deux contigs, codant pour des protéines distinctes présentant l'une et l'autre un domaine forkhead de type FoxG1 (98 à 100% d'identité avec les ostéichthyens), indiquant la présence de deux gènes paralogues, appelées *ScFoxG1A* et *ScFoxG1B* chez cette espèce. Des séquences protéiques clairement apparentées à chacune de

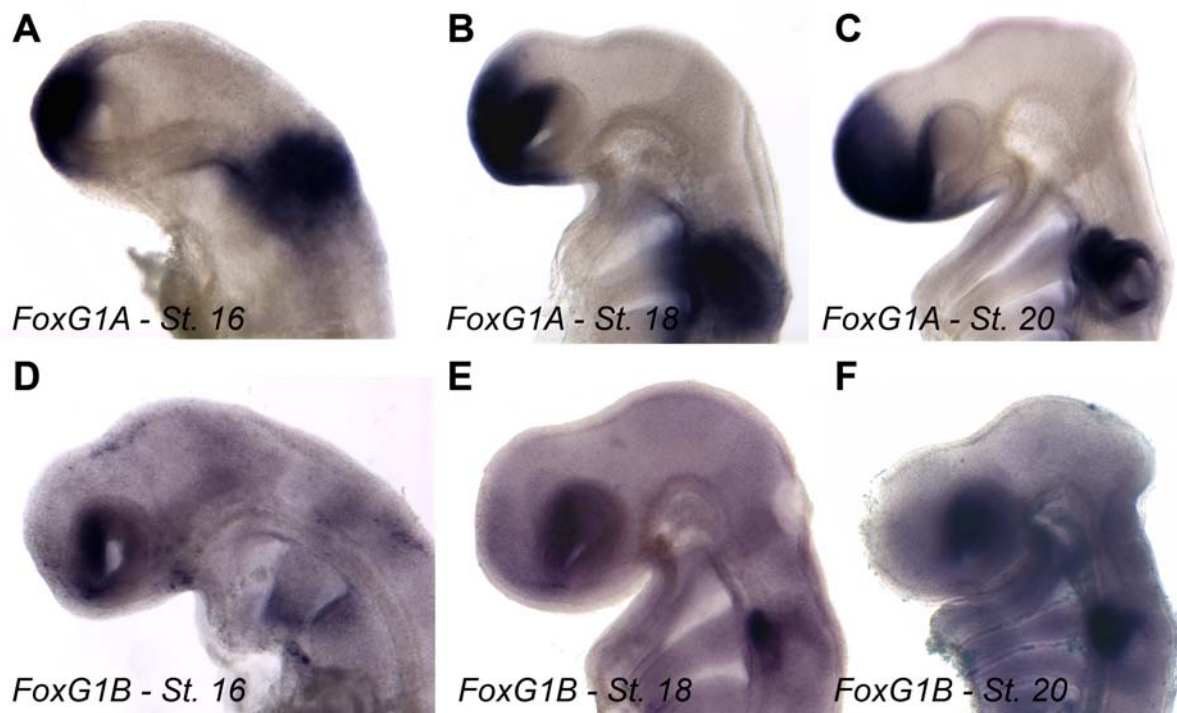


Figure 39. Profil d'expression de FoxG1A et FoxG1B chez la roussette. A-C. Hybridation in situ sur embryons entiers avec la sonde pour FoxG1A aux stades 16 (A), 18 (B) et 20 (C). Les transcrits pour ce gène sont visualisés dans le tube neural antérieur, la cupule optique, l'oreille interne et les arcs branchiaux. D-F. Hybridation in situ sur embryons entiers avec la sonde pour FoxG1B aux stades 16 (D), 18 (E) et 20 (F). Le gène est exprimé dans la cupule optique et l'oreille interne.

ces deux formes et appelées *CmFoxG1A* et *CmFoxG1B* peuvent être déduites de contigs identifiés dans le génome de la chimère *Callorhinchus milii*, ce qui montre que ces deux gènes étaient déjà présents chez le dernier ancêtre commun des chondrichthyens. La comparaison des séquences obtenues chez *S. canicula* et *C. milii* avec les séquences décrites chez les ostéichthyens montre que les formes *ScFoxG1A* et *ScFoxG1B* se rapprochent respectivement l'une des séquences *FoxG1* de tétrapodes et *FoxG1A* de poisson-zèbre, l'autre de la séquence *DrFoxG1b* de poisson-zèbre, au niveau d'un ensemble de résidus montrés en couleur dans la figure 38.

Les analyses phylogénétiques en cours dans le laboratoire confirment ces parentés (données non montrées, S. Mazan et M. Coolen com. personnelle) et montrent que les gènes *FoxG1A* et *FoxG1B* des chondrichthyens définissent deux classes d'orthologie distinctes fixées avant la radiation des gnathostomes. La présence de plusieurs paralogues chez le poisson-zèbre ne résulte donc pas uniquement de duplications intervenues dans la lignée des actinoptérygiens comme on le croyait jusqu'ici. De plus, ce travail indique que la forme *FoxG1B* ancestrale a été perdue par les tétrapodes.

III. B. Analyse du profil d'expression de *ScFoxG1*

Afin de déterminer le profil d'expression des gènes *ScFoxG1A* et *ScFoxG1B* chez la roussette, des sondes ARNs antisens marquées à la digoxygénine-11-UTP ont été synthétisées à partir d'un fragment de la séquence ADN. L'hybridation in situ a été effectuée sur des embryons entiers du stade 16 au stade 20.

ScFoxG1A est exprimé précocément dans le télencéphale, plus fortement dans la partie ventrale (cf. Figure 39. A-C). Les transcrits sont également détectés dans la région dorsale des arcs branchiaux, dans la placode otique au stade 16 puis dans l'oreille interne aux stades 18 et 20. Une zone à proximité de l'oreille interne présente également des transcrits pour ce gène ; ce site sera à identifier lors des coupes de ces embryons.

L'expression de *ScFoxG1B* est beaucoup moins forte et le profil d'expression est donc plus délicat à obtenir. Cependant, les transcrits ont été visualisés dans la région nasale de la cupule optique à partir du stade 16 (cf. Figure 39. D) ; ce signal semble moins intense aux stades 18 et 20. Autrement, un marquage est visible dans la partie antérieure de la vésicule optique dès le stade 18 (cf. Figure 39. E). Comme précédemment, des coupes sur ces embryons devraient permettre de localiser plus précisément le signal dans les tissus.

Chez le poisson zèbre, seul *FoxG1a* est exprimé dans le télencéphale [Toresson et al., 1998], ce qui est également le cas de *FoxG1A* de roussette. De même, les gènes *FoxG1b* et *FoxG1c* de poisson zèbre et le gène *FoxG1B* de roussette sont restreints à l'œil et à la vésicule optique [Zhao et al., 2009].

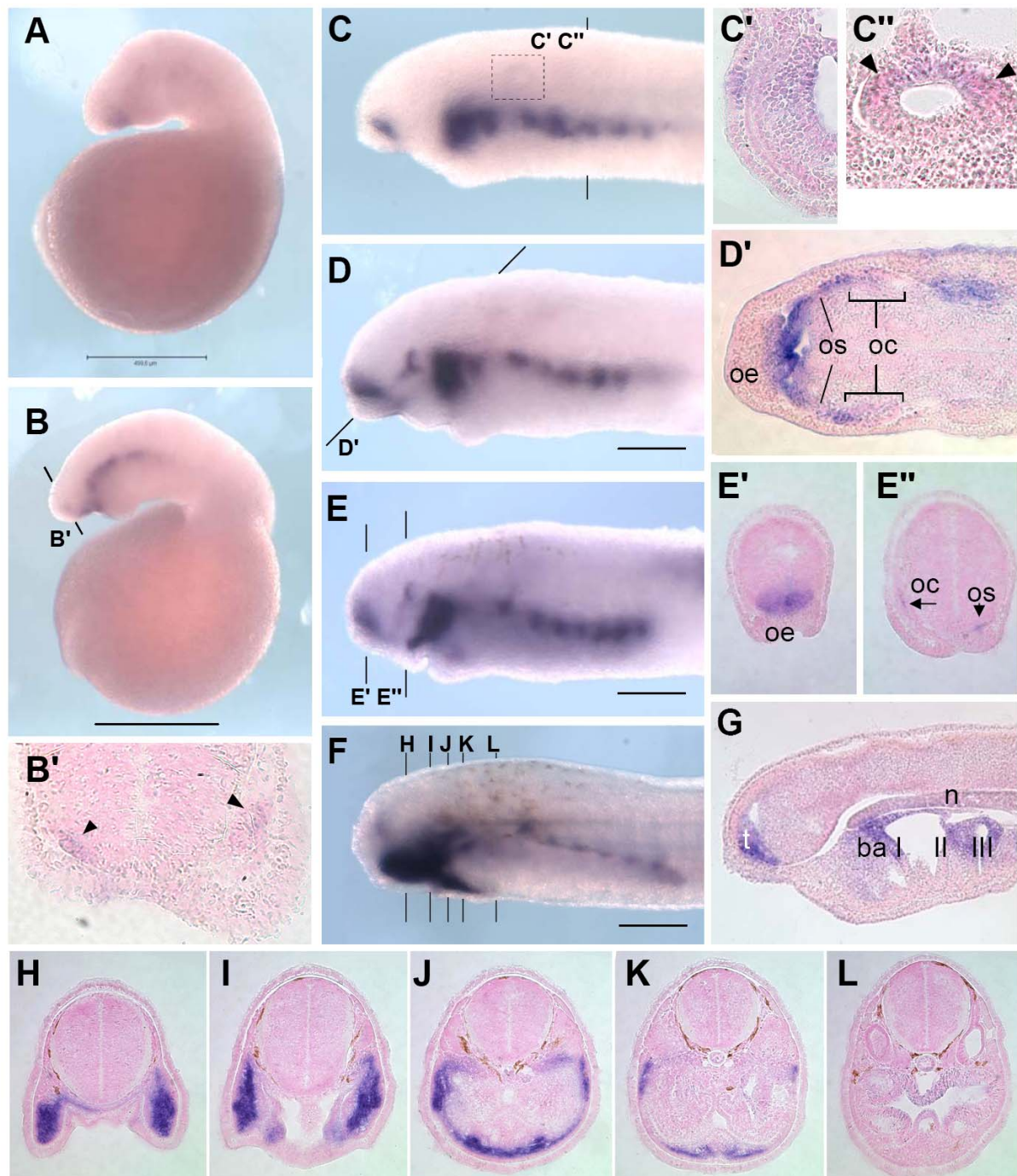


Figure 40. Profil d'expression de PmFoxG-1. Hybridation in situ sur embryons entiers (A-F) et coupes d'embryons post-hybridation (C', C'', D', E', E'', G-L). A. Stade 22 : début de l'expression de PmFoxG-1 dans la partie antérieure du tube neural. B, C. Stades 23 et 24, marquage du tube neural antérieur et des arcs branchiaux. C' : Coupe transversale d'un embryon de stade 24 au niveau des arcs branchiaux : le signal est présent dans la partie ectodermique. C'' : Coupe saggittale d'un embryon de stade 24 au niveau de l'oreille interne, les têtes de flèches montre les frontières du marquage. D, E. Stades 25 et 26, marquage du nerf optique, de la rétine nasale, de la partie ecto- et endo-dermique des arcs branchiaux et du mésenchyme mandibulaire. D'. Coupe semi-coronale, le long du nerf optique

III. C. Analyse du profil d'expression de *PmFoxG1*

La sonde *FoxG1* utilisée pour déterminer le profil d'expression de ce gène chez la lamproie a été synthétisée suivant la même méthode que pour la roussette. Les amorces utilisées sont indiquées sur la Figure 40. L'hybridation *in situ* a été effectuée sur des embryons entiers du stade embryonnaire 22 au stade prolarvaire précoce 26 (stades déterminés d'après la table de développement de Tahara, 1956 ; cf. Annexe C).

L'expression de *PmFoxG1* est détectée dès le stade 22, dans la région antérieure ventrale du tube neural (cf. Figure 47. A - F). Ce territoire dans le cerveau antérieur s'intensifie à partir du stade 24. Au stade 26, les transcrits sont présents dans la quasi-totalité du télencéphale, avec une intensité de signal maximale dans la partie ventrale et minimale dans la partie dorsale (cf. Figure 40. G). Ce signal est très semblable à celui décrit chez les ostéichthyens, qui exclut la région médiane dorsale du télencéphale.

Une expression de *PmFoxG1* est détectée dans l'évagination optique au stade 23 (cf. Figure 40. B'). Au stade 25, cette expression apparaît restreinte au pédoncule optique et à la région nasale de la rétine neurale (cf. Figure 40. D, D', E, E''). Le signal persiste dans la région nasale de la cupule optique jusqu'au stade 26, alors que l'expression dans le nerf optique a disparu. Le transcrit pour *PmFoxG1* est également détecté dans l'épithélium olfactif, à partir du stade 25 (cf. Figure 40. D, D', E). Il s'agit d'une expression localisée dans la partie ventrale postérieure de l'épithélium olfactif. Enfin, un marquage de faible intensité est détecté dans la partie dorsale de la vésicule optique chez les embryons de stade 24 à 25 (cf. Figure 40. C, C'').

Le transcrit de *PmFoxG1* est également présent au niveau des arcs branchiaux de l'embryon, dès le stade 23. Les régions dorsales de chaque arc branchial expriment ce gène dans les composants endodermiques et ectodermiques de tous les arcs branchiaux (cf. Figure 40. C', G). Au stade 26, le signal s'étend dans le mésenchyme céphalique jusqu'à la région

Suite de la légende de la figure X.

(os) et de la cupule optique (oc). E', E''. Coupes transversales d'un embryon de stade 26 au niveau du télencéphale et du nerf optique, respectivement. F. Stade 27 : marquage du télencéphale, du mésenchyme mandibulaire et des arcs branchiaux. G. Coupe sagittale d'un embryon de stade 25. Marquage du télencéphale et des arcs branchiaux. H-L. Coupes transversales d'un embryon de stade 27. Marquage au niveau du mésenchyme mandibulaire et de tissu pharyngien (tête de flèche).

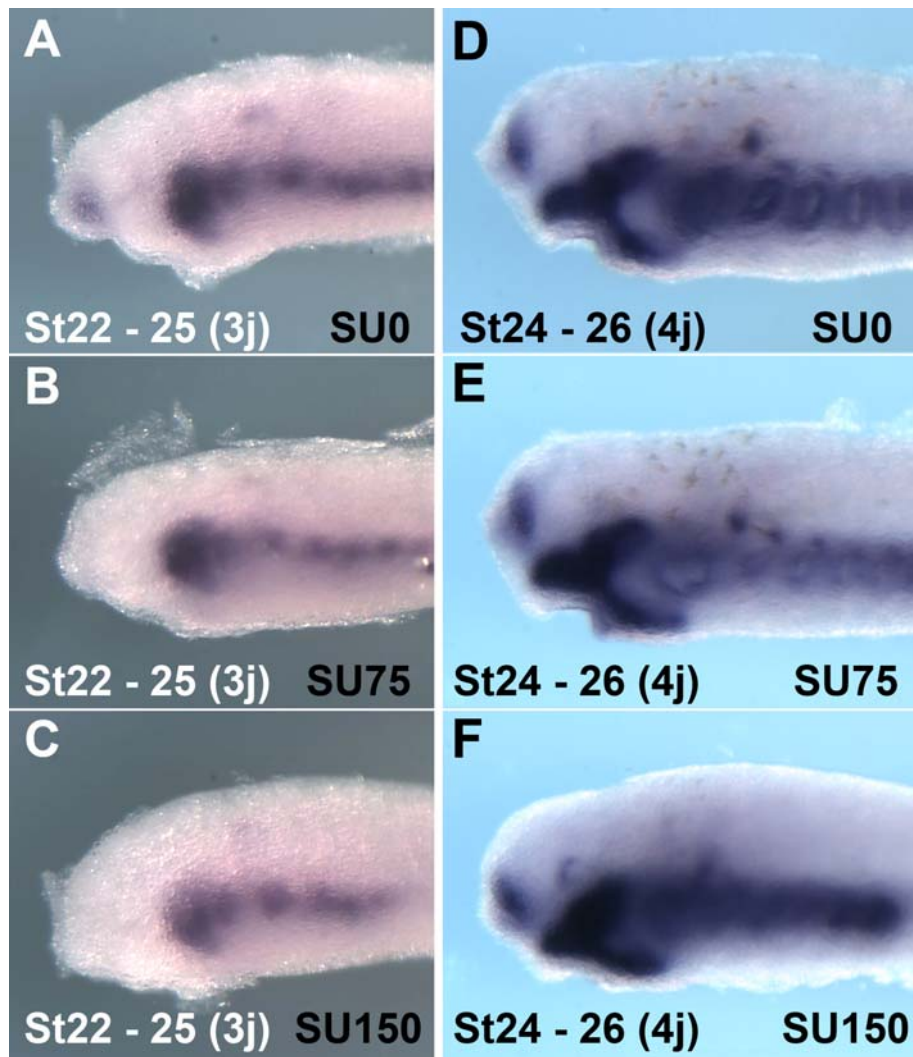


Figure 41. *Traitement d'embryons avec du SU5402 et hybridés avec la sonde FoxG1. A-C.* Embryons traités au stade 22, pendant 3 jours puis fixés au stade 25. Chez le sauvage (A), le signal est visible dans le télencéphale, le nerf optique, la rétine neurale nasale, les arcs branchiaux et le mésoderme mandibulaire. Chez les embryons traités (B, C), le signal dans le télencéphale est fortement réduit en fonction de la concentration de SU5402 et les structures optiques ne sont pas marquées. **D-F.** Embryons traités au stade 24, pendant 4 jours puis fixés au stade 26. Chez le sauvage (D) comme chez les embryons traités (E, F), l'expression de FoxG1 ne semble pas perturbée.

buccale (Fig. 40. E, E''). Au stade 27, il se restreint dans la région dorsale des arcs branchiaux mais devient majeur dans le mésenchyme localisé au niveau des lèvres supérieure et inférieure (cf. Figure 40. E, F, H-K).

III. D. Etude de l'implication de la signalisation FGF dans le contrôle de l'expression de *PmFoxG1*

Afin d'évaluer la conservation de la régulation de *PmFoxG1* par la signalisation FGF chez la lamproie, nous avons effectué des traitements des embryons à l'aide de l'agent pharmacologique SU5402, inhibiteur de l'activité des récepteurs au FGF et VEGF. Les traitements ont été effectués à deux concentrations, 75 et 150 μ M, pendant des durées de 3 ou 4 jours, périodes de temps nécessaires pour passer respectivement des stades 22 à 25 ou 24 à 26 (cf. Figure 41). Dans les premières conditions de traitement (stade 22 à 24), le signal télencéphalique diminue de façon drastique dès la concentration la plus faible (75 μ M) et cela dans 87,5% des embryons traités (n= 16). Il n'est en revanche pas affecté dans le cas de traitements effectués entre les stades 24 et 26 (n= 34).

Ces données suggèrent donc que l'initiation de l'expression télencéphalique de *PmFoxG1* est dépendante d'une activité de signalisation médiée par le récepteur au FGF. Son maintien en revanche ne nécessite pas cette activité. Ces résultats restent cependant à confirmer par une étude plus fine de la dépendance du phénotype à la dose utilisée, en utilisant une gamme plus étendue de concentrations inférieures à 75 μ M. Aucune conclusion ne peut en revanche être tirée en ce qui concerne l'expression dans l'œil embryonnaire, le signal relativement faible dans ce territoire n'ayant pas été observé de façon reproductible même chez les embryons contrôles. On note enfin que l'expression du gène dans les arcs branchiaux et dans le mésoderme mandibulaire n'est pas affectée par le traitement, quelles que soient les conditions utilisées.

III. E. Conclusions

Ces données mettent en évidence une forte conservation du patron d'expression de *FoxG1* chez les vertébrés. Elles suggèrent en particulier une conservation au moins partielle des mécanismes qui contrôlent la régionalisation de la rétine et l'établissement des patrons de projections, ipsi- ou contra-latérales, des cellules ganglionnaires. Elles soutiennent également l'hypothèse d'une conservation de la régulation du gène par la signalisation FGF dans le télencéphale, cette question restant ouverte dans le cas de la rétine.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion Générale

Ce travail constitue la première analyse des programmes génétiques contrôlant le développement de l'œil chez la lamproie. D'une façon générale, il met en évidence des caractéristiques d'expression conservées pour les gènes étudiés. Celles-ci suggèrent une conservation partielle de mécanismes bien décrits chez les ostéichthyens, comme la régionalisation de la cupule optique, la formation des dérivés non neuraux de la marge ciliaire ou la différenciation de la rétine. Ainsi, la cupule optique chez la lamproie présente un patron moléculaire qui rappelle clairement celui qui a été décrit chez les vertébrés modèles, avec des expressions de *PmPax6* dans la rétine neurale présomptive et d'*PmOtxA* dans l'épithélium pigmentaire, ainsi qu'une expression ventrale de *PmVax2* au niveau du pédoncule optique.

Le résultat des traitements pharmacologiques en utilisant un antagoniste de l'activité du récepteur au FGF est également compatible avec l'hypothèse d'une conservation de l'implication de cette voie dans la spécification des régions ventrales de la cupule optique. Une régionalisation naso-temporale mettant en jeu au moins un acteur conservé (*FoxG1*) est également présente dès les stades prolarvaires du développement de l'œil chez la lamproie et il sera intéressant d'évaluer la conservation des patrons de projections des fibres efférentes, ipsi- ou contra-latérales.

De la même façon, nous observons l'expression conservée d'un gène *Otx* (*PmOtxC*) au niveau de la région distale de la marge ciliaire, qui contribue à l'iris chez la lamproie comme chez les gnathostomes. Ces données suggèrent une conservation du rôle d'*Otx1* mis en évidence chez la souris dans la formation de cette structure (ainsi que dans celle des processus ciliaires adjacents, absents chez la lamproie). Enfin, les dynamiques d'expression globalement conservées des gènes *Pax6*, *OtxB* et *OtxC* dans la rétine en cours de différenciation suggèrent une conservation partielle au moins des mécanismes contrôlant ce processus. Il est par ailleurs intéressant de constater que cette conservation concerne aussi bien la rétine périphérique que la rétine centrale, qui aux stades prolarvaires, présente une composition cellulaire simplifiée, assez différente de la rétine adulte.

Cette analyse ne constitue cependant qu'une première caractérisation qui doit être considérablement étendue dans le but d'interpréter d'un point de vue moléculaire les différences entre la lamproie et les gnathostomes. C'est en effet cet aspect qui à terme devrait être le plus intéressant à la fois d'un point de vue évolutif (il s'agit là de caractériser l'évolvabilité des programmes génétiques du développement) et mécanistiques (la rétine centrale constituant un modèle de rétine simplifié). Pour cela, il devient maintenant nécessaire (1) d'étendre considérablement la caractérisation moléculaire engagée et (2) d'évaluer la possibilité de mettre en œuvre des approches fonctionnelles.

La différenciation de la rétine périphérique s'étalant sur une période de temps considérable, elle pourrait permettre une ségrégation temporelle intéressante des programmes génétiques mis en œuvre au cours de cette période. Toutefois, ce processus semble assez proche de celui observé chez les ostéichthyens, avec une progression de la différenciation conservée du centre vers la périphérie.

Par ailleurs, les approches fonctionnelles risquent d'être difficile à mettre en œuvre du fait de la durée des processus, du manque d'accessibilité de l'organe (enfoui sous le mésenchyme aux stades larvaires) et de la difficulté relative à obtenir des larves (qui doivent être prélevées en milieu naturel). La rétine centrale prolarvaire semble un modèle plus accessible (les prolarves étant obtenues sans difficultés en très grande quantité dans le laboratoire) et particulièrement intéressant du fait de son caractère unique chez les vertébrés. Les analyses sur ce système doivent maintenant inclure :

- des analyses à beaucoup plus grande échelle des facteurs de transcription et molécules de signalisation susceptibles d'être impliquées dans sa différenciation ;
- des analyses systématiques de l'activité des grandes voies de signalisation, par immunohistochimie ou analyse de leurs cibles ;
- une analyse parallèle, à la cellule près, des patrons de prolifération et différenciation par immunohistochimie en vue d'établir des corrélations avec les données moléculaires précédentes ;
- en fonction des résultats obtenus, des analyses fonctionnelles par traitement pharmacologique, injection ou lipofection d'oligonucléotides antisens modifiés.

Pour ce dernier aspect, il sera important de lever des verrous méthodologiques en adaptant les techniques couramment utilisées chez les organismes modèles traditionnels des vertébrés, mais également en s'affranchissant de la reproduction saisonnière. Ces deux aspects nécessitent un investissement relativement important mais ils pourraient apporter des éléments importants pour comprendre l'origine et l'évolution de l'œil chez les vertébrés, et mettre en évidence des diversifications des programmes génétiques qui contrôlent son développement.

BIBLIOGRAPHIE

- Abalo XM, Villar-Cerevino V, Villar-Cheda B, Anadon R & Rodicio MC.** 2008. Neurochemical differentiation of horizontal and amacrine cells during transformation of the sea lamprey retina. *J. Chem. Neuroanat.* **35** : 225-32.
- Abi-Rached L, Gilles A, Shiina T, Pontarotti P & Inoko H.** 2002. Evidence of en bloc duplication in vertebrate genomes. *Nat Genet.* **31**(1) : 100-5.
- Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantsaggiato V, Maury M, Simeone A & Brûlet P.** 1995. Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2-/- mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development.* **121**(10) : 3279-90.
- Acampora D, Mazan S, Avantsaggiato V, Barone P, Tuorto F, Lallemand Y, Brûlet P & Simeone A.** 1996. Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the Otx1 gene. *Nat Genet.* **14**(2) : 218-22.
- Agathocleous M & Harris WA.** 2009. From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **25** : 45-69.
- Ahmad I, Tang L & Pham H.** 2000. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun.* **270**(2) : 517-21.
- Alder R & Belecky-Adams TL.** 2002. The role of bone morphogenetic proteins in the differentiation of the ventral optic cup. *Development.* **129** : 3161-71.
- Alder R & Canto-Soler MV.** 2007. Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies. *Dev Biol.* **305**(1) : 1-13.
- Arendt D. & Wittbrodt J.** 2001. Reconstructing the eyes of Urbilateria. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **356** : 1545-63.
- Arendt D.** 2003. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int. J. Dev. Biol.* **47**(7-8) : 563-71.
- Arendt D., Tessmar-Raible K, Snyman H, Dorresteijn AW & Wittbrodt J.** 2004. Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. *Science.* **306**(5697) : 869-71.
- Arendt D.** 2008. The evolution of cell types in animals : emerging principles from molecular studies. *Nat. Rev. Genet.* **9**(11): 868-82.
- Arendt D, Hausen H & Purschke G.** 2009. The 'division of labour' model of eye evolution. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **364** : 2809-17.
- Arresta E, Bernardini S, Bernardini E, Filoni S & Cannata SM.** 2005. Pigmented epithelium to retinal transdifferentiation and Pax6 expression in larval *Xenopus laevis*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* **303**(11) : 958-67.
- Ashery-Padan R, Marquardt T, Zhou X & Gruss P.** 2000. Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev.* **14** : 2701-2711.
- Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kida Y, Ogura T, Torii M, Shimamura K, Nakafuku M.** 2005. Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the Pax6 transcriptional factor. *Hum Mol Genet.* **14**(8) : 1059-68.
- Barbieri AM, Lupo G, Bulfone A, Andreazzoli M, Mariani M, Fougerousse F, Consalez GG, Borsani G, Beckmann JS, Barsacchi G, Ballabio A & Banfi S.** 1999. A homeobox gene, *vax2*, controls the patterning of the eye dorsoventral axis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(19) : 10729-34.
- Bäumer N, Marquardt T, Stoykova A, Ashery-Padan R, Chowdhury K & Gruss P.** 2002. Pax6 is required for establishing naso-temporal and dorsal characteristics of the optic vesicle. *Development.* **129**(19) : 4535-45.

- Belecky-Adams T, Tomarev S, Li HS, Ploder L, McInnes RR, Sundin O & Alder R.** 1997. Pax6, Prox1 and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **38**(7) : 1293-303.
- Belecky-Adams T & Alder R.** 2001. Developmental expression patterns of bone morphogenetic proteins, receptors, and binding proteins in the chick retina. *J Comp Neurol.* **430**(4) : 562-72.
- Belliveau MJ & Cepko CL.** 1999. Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. *Development.* **126**(3) : 555-66.
- Bely AE & Wray GA.** 2001. Evolution of regeneration and fission in annelids : insights from engrailed-and orthodenticle-class gene expression. *Development.* **128**(14) : 2781-91.
- Bernier G, Panitz F, Zhou X, Hollemann T, Gruss P & Pieler T.** 2000. Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of Six6 (Optx2) in Xenopus embryos. *Mech Dev.* **93**(1-2):59-69.
- Blanco J, Seimiya M, Pauli T, Reichert H & Gehring WJ.** 2009. Wingless and Hedgehog signaling pathways regulate orthodenticle and eyes absent during ocelli development in Drosophila. *Dev Biol.* **329**(1) : 104-15.
- Blanquet PR & Jonet L.** 1996. Signal-regulated proteins and fibroblast growth factor receptors : comparative immunolocalization in rat retina. *Neurosci Lett.* **214**(2-3) : 135-8.
- Bovolenta P, Mallamaci A, Briata P, Corte G & Boncinelli E.** 1997. Implication of OTX2 in pigment epithelium determination and neural retina differentiation. *J Neurosci.* **17**(11) : 4243-52.
- Bovolenta P, Mallamaci A, Puellas L & Boncinelli E.** 1998. Expression pattern of cSix3, a member of the Six/sine oculis family of transcription factors. *Mech Dev.* **70**(1-2) : 201-3.
- Bourguignon C, Li J & Papalopulu N.** 1998. XBF-1, a winged helix transcription factor with dual activity, has a role in positioning neurogenesis in Xenopus competent ectoderm. *Development.* **125**(24) : 4889-900.
- Bronner-Fraiser M.** 2002. Molecular analysis of neural crest formation. *J Physiol Paris.* **96**(1-2) : 3-8.
- Bruce AE & Shankland M.** 1998. Expression of the head gene Lox22-Otx in the leech Helobdella and the origin of the bilaterian body plan. *Dev Biol.* **201**(1) : 101-12.
- Burmeister M, Novak J, Liang MY, Basu S, Ploder L, Hawes NL, Vidgen D, Hoover F, Goldman D, Kalnins VI, Roderick TH, Taylor BA, Hankin MH & McInnes RR.** 1996. Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nat Genet.* **12**(4):376-84.
- Callaerts P, Halder G & Gehring J.** 1997. Pax-6 in development and evolution. *Annu. Rev. Neurosci.* **20** : 483-532.
- Carl M, Loosli F & Wittbrodt J.** 2002. Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye. *Development.* **129**(17) : 4057-63.
- Casarosa S, Leone P, Cannata S, Santini F, Pinchera A, Barsacchi G & Andreazzoli M.** 2005. Genetic analysis of metamorphic and premetamorphic Xenopus ciliary marginal zone. *Dev Dyn.* **233**(2) : 646-51.
- Cayouette M, Poggi L & Harris WA.** 2006. Lineage in the vertebrate retina. *Trends Neurosci.* **29**(10):563-70.
- Chandler MJ, Smith PJ, Samuelson DA & MacKay EO.** 1999. Photoreceptor density of the domestic pig retina. *Vet Ophthalmol.* **2**(3):179-184.
- Chan CM, Huang JH, Chiang HS, Wu WB, Lin HH, Hong JY & Hung CF.** 2010. Effects of (-)-epigallocatechin gallate on RPE cell migration and adhesion. *Mol Vis.* **16** : 586-95.
- Chang BS, Crandall KA, Carulli JP & Hartl DL.** 1995. Opsin phylogeny and evolution: a model for blue shifts in wavelength regulation. *Mol Phylogenet Evol.* **4**(1) : 31-43.
- Chau KY, Chen S, Zack DJ & Ono SJ.** 2000. Functional domains of the cone-rod homeobox (CRX) transcription factor. *J Biol Chem.* **275**(47) : 37264-70.

- Chen S, Wang QL, Nie Z, Sun H, Lennon G, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA & Zack DJ.** 1997. Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron*. **19**(5):1017-30.
- Choe KM, Prakash S, Bright A & Clandinin TR.** 2006. Liprin-alpha is required for photoreceptor target selection in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(31) : 11601-6.
- Chow RL, Altmann CR, Lang RA & Hemmati-Brivanlou A.** 1999. Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development*. **126**(19):4213-22.
- Chow RL & Lang RA.** 2001. Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **17**:255-96.
- Cid E, Santos-Ledo A, Parrilla-Monge M, Lillo C, Arevalo R, Lara JM, Aijon J & Velasco A.** 2010. Prox1 expression in rod precusore and Müller cells. *Exp Eye Res*. **90**(2) : 267-76.
- Collin SP, Potter IC & Braekevelt CR.** 1999. The ocular morphology of the southern hemisphere lamprey *geotria australis* gray, with special reference to optical specializations and the characterization and phylogeny of photoreceptor types. *Brain Behav. Evol.* **54**(2) : 96-118.
- Collin SP, Hart NS, Shand J & Potter IC.** 2003. Morphology and spectral absorption characteristics of retinal photoreceptors in the southern hemisphere lamprey (*Geotria australis*). *Vis Neurosci*. **20**(2) : 119-30.
- Collin SP & Trezise AE.** 2004. The origins of colour vision in vertebrates. *Clin. Exp. Optom*. **87**(4-5) : 217-23.
- Collin SP, Davies WL, Hart NS & Hunt DM.** 2009. The evolution of early vertebrate photoreceptors. *Phil. Trans. R. Soc. B*. **364** : 2925-40.
- Ma DM, Zhu HP & Gui JF.** 2008. Ectopic Six3 expression in the dragon eye goldfish. *Comp. Biochem. Physiol. Part. B*. **149** : 303-13.
- Damen WG, Janssen R & Prpic NM.** 2005. Pair rule gene orthologs in spider segmentation. *Evol Dev*. **7**(6) : 618-28.
- Danesin C, Peres JN, Johansson M, Snowden V, Cording A, Papalopulu N & Houart C.** 2009. Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by Foxg1. *Dev Cell*. **16**(4) : 576-87.
- Danno H, Michiue T, Hitachi K, Yukita A, Ishiura S, Asashima M.** 2008. Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate Rax expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**(14) : 5408-13.
- Davies WL, Cowing JA, Carvalho LS, Potter IC, Trezise AE, Hunt DM & Collin SP.** 2007. Functional characterization, tuning, and regulation of visual pigment gene expression in an anadromous lamprey. *FASEB J*. **21**(11) : 2713-24.
- Davies WL, Collin SP, Hunt DM.** 2009. Adaptive gene loss reflects differences in the visual ecology of basal vertebrates. *Mol Biol Evol*. **26**(8) : 1803-9.
- Dehal P & Boore JL.** 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PloS Biol*. **3**(10) : e314.
- de Jong DM, Hislop NR, Hayward DC, Reece-Hoyes JS, Pontynen PC, Ball EE & Miller DJ.** 2006. Components of both major axial patterning systems of the Bilateria are differentially expressed along the primary axis of a 'radiate' animal, the anthozoan cnidarian *Acropora millepora*. *Dev. Biol*. **298** : 632-43.
- de Melo J, Qiu X, Du G, Cristante L & Eisenstat DD.** 2003. Dlx1, Dlx2, Pax6, Brn3b, and Chx10 homeobox gene expression defines the retinal ganglion and inner nuclear layers of the developing and adult mouse retina. *J Comp Neurol*. **461**(2) : 187-204.
- De Miguel E, Rodicio MC & Anadón R.** 1989. Ganglion cells and retinopetal fibers of the larval lamprey retina : an HRP ultrastructural study. *Neurosci Lett*. **106**(1-2) : 1-6.

- Denayer T, Locker M, Borday C, Deroo T, Janssens S, Hecht A, van Roy F, Perron M & Vleminckx K.** 2008. Canonical Wnt signaling controls proliferation of retinal stem/progenitor cells in postembryonic *Xenopus* eyes. *Stem Cells*. **26**(8):2063-74.
- Depew MJ, Lufkin T & Rubenstein JL.** 2002. Specification of jaw subdivisions by *Dlx* genes. *Science*. **298**(5592) : 381-5.
- Derobert Y, Baratte B, Lepage M & Mazan S.** 2002. *Pax6* expression patterns in *Lampetra fluviatilis* and *Scyliorhinus canicula* embryos suggest highly conserved roles in the early regionalization of the vertebrate brain. *Brain Res. Bull.* **57**(3-4) : 277-280.
- Dick A, Mayr T, Bauer H, Meier A & Hammerschmidt M.** 2000. Cloning and characterization of zebrafish *smad2*, *smad3* and *smad4*. *Gene*. **246**(1-2):69-80.
- Dickson DH & Collard TR.** 1979. Retinal development in the lamprey (*Petromyzon marinus* L.) : premetamorphic ammocoete eye. *Am. J. Anat.* **154**(3) : 321-36.
- Dickson DH & Graves DA.** 1979. Fine structure of the lamprey photoreceptors and retinal pigment epithelium (*Petromyzon marinus* L.). *Exp. Eye. Res.* **29**(1) : 45-60.
- Donner AL & Maas RL.** 2004. Conservation and non-conservation of genetic pathways in eye specification. *Int. J. Dev. Biol.* **48** : 743-53.
- Dorsky RI, Rapaport DH & Harris WA.** 1995. Xotch inhibits cell differentiation in the *Xenopus* retina. *Neuron*. **14**(3):487-96.
- Dou CL, Li S & Lai E.** 1999. Dual role of brain factor-1 in regulating growth and patterning of the cerebral hemispheres. *Cereb Cortex*. **9**(6) : 543-50.
- Dou C, Lee J, Liu B, Liu F, Massague J, Xuan S & Lai E.** 2000. BF-1 interferes with transforming growth factor beta signaling by associating with Smad partners. *Mol Cell Biol.* **20**(17) : 6201-11.
- Dräger UC, Li H, Wagner E & McCaffery P.** 2001. Retinoic acid synthesis and breakdown in the developing mouse retina. *Prog Brain Res.* **131** : 579-87.
- Duggan CD, DeMaria S, Baudhin A, Stafford D & Ngai J.** 2008. FoxG1 is required for development of the vertebrate olfactory system. *J. of Neurosci.* **28**(20) : 5229 -5239.
- Dyer MA.** 2003. Regulation of proliferation, cell fate specification and differentiation by the homeodomain proteins *Prox1*, *Six3*, and *Chx10* in the developing retina. *Cell Cycle*. **2**(4) : 350-7.
- Eakin RM & Brandenburger JL.** 1981. Unique eye of probable evolutionary significance. *Science*. **211** : 1189-90.
- Ekker SC, Ungar AR, Greenstein P, von Kessler DP, Porter JA, Moon RT & Beachy PA.** 1995. Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr Biol.* **5**(8) : 944-55.
- Erclik T, Hartenstein V, Lipshitz HD & McInnes RR.** 2008. Conserved role of the *Vsx* genes supports a monophyletic origin for bilaterian visual systems. *Curr. Biol.* **18** : 1278-87.
- Erclik T, Hartenstein V, McInnes RR & Lipshitz HD.** 2009. Eye evolution at high resolution : the neuron as a unit of homology. *Dev. Biol.* **332** : 70-79.
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM & Briscoe J.** 1997. *Pax6* controls progenitor cell identity and neural fate in response to graded *Shh* signaling. *Cell*. **90**(1) : 169-80.
- Esteve P & Bovolenta P.** 2006. Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens. *Curr Opin Neurobiol.* **16**(1):13-9.
- Fernald RD.** 2000. Evolution of eyes. *Curr. Op. Neurobiol.* **10** : 444-50.

- Finkelstein R, Smouse D, Capaci TM, Spradling AC & Perrimon N.** 1990. The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the *Drosophila* nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* **4**(9) : 1516-27.
- Fischer AJ & Reh TA.** 2000. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol.* **220**(2):197-210.
- Fritzsch B & Collin SP.** 1990. Dendritic distribution of two populations of ganglion cells and the retinopetal fibers in the retina of the silver lamprey (*Ichthyomyzon unicuspis*). *Vis Neurosci.* **4**(6) : 533-45.
- Fujitani Y, Fujitani S, Luo H, Qiu F, Burlison J, Long Q, Kawaguchi Y, Edlund H, MacDonald RJ, Furukawa T, Fujikado T, Magnuson MA, Xiang M & Wright CV.** 2006. Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development. *Development.* **133**(22):4439-50.
- Furhmann S.** 2008. Wnt signaling in eye organogenesis. *Organogenesis.* **4**(2):60-7.
- Furukawa T, Morrow EM & Cepko CL.** 1997. Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell.* **91**(4):531-41.
- Furukawa T, Morrow EM, Li T, Davis FC & Cepko CL.** 1999. Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice. *Nat Genet.* **23**(4) : 466-70.
- Galliot B, Quiguand M, Ghila L, de Rosa R, Miljkovic-Licina M, Chera S.** 2009. Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Dev Biol.* **332**(1):2-24.
- Gamse JT, Shen YC, Thisse C, Thisse B, Raymond PA, Halpern ME & Liang JO.** 2002. Otx5 regulates genes that show circadian expression in the zebrafish pineal complex. *Nat Genet.* **30**(1) : 117-21.
- Gan L, Mao CA, Wikramanayake A, Angerer LM, Angerer RC & Klein WH.** 1995. An orthodenticle-related protein from *Strongylocentrus purpuratus*. *Dev Biol.* **167**(2):517-28.
- Gehring W & Ikeo K.** 1999. Pax6 mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* **15**(9) : 371-7.
- Gehring WJ.** 2005. New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *J. Hered.* **96**(3) : 171-84.
- Germot A, Lecointre G, Plouhinec JL, Le Mentec C, Girardot F & Mazan S.** 2001. Structural evolution of Otx genes in craniates. *Mol Biol Evol.* **18**(9):1668-78.
- Gess RW, Coates MI & Rubidge BS.** 2006. A lamprey from the Devonian period of South Africa. *Nature.* **443**(7114) : 981-4.
- Glardon S, Callaerts P, Halder G & Gehring WJ.** 1997. Conservation of Pax6 in a lower chordate, the ascidian *Phallusia mammillata*. *Development.* **124** : 817-25.
- Glardon S, Holland LZ, Gehring WJ & Holland ND.** 1998. Isolation and developmental expression of the amphioxus Pax6 gene (AmphiPax6) : insights into eye and photoreceptor evolution. *Development.* **125** : 2701-10.
- Graw J.** 2010. Eye development. *Curr Top Dev Biol.* **90** : 343-86.
- Grindley JC, Davidson DR, Hill RE.** 1995. The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development.* **121**(5):1433-42.
- Grossniklaus U, Pearson RK & Gehring WJ.** 1992. The *Drosophila* sloppy paired locus encodes two proteins involved in segmentation that show homology to mammalian transcription factors. *Genes Dev.* **6**(6) : 1030-51.
- Guérin A, d'Aubenton-Carafa Y, Marrakchi E, Da Silva C, Wincker P, Mazan S & Rétaux S.** 2009. Neurodevelopment genes in lampreys reveal trends for forebrain evolution in craniates. *PLoS One.* **4**(4) : e5374.
- Guo P, Hirano M, Herrin BR, Li J, Yu C, Sadlonova A & Cooper MD.** 2009. Dual nature of the adaptive immune system in lampreys. *Nature.* **459**(7248) : 796-801.

- Hallonet M, Hollemann T, Pieler T & Gruss P.** 1999. Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes Dev.* **13**(23) : 3106-14.
- Hanashima C, Fernandes M, Hebert JM & Fishell G.** 2007. The role of Foxg1 and dorsal midline signaling in the generation of Cajal-Retzius subtypes. *J Neurosci.* **27**(41) : 11103-11.
- Hanes SD & Brent R.** 1989. DNA specificity of bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. *Cell.* **57**(7) : 1275-83.
- Hannenhalli S & Kaestner KH.** 2009. The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nat Rev Genet.* **10**(4) : 233-40.
- Harada Y, Okai N, Taguchi S, Tagawa K, Humphreys T & Satoh N.** 2000. Developmental expression of the hemichordate otx ortholog. *Mech Dev.* **91**(1-2) : 337-9.
- Harada T, Harada C, Parada LF.** 2007. Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes Dev.* **21**(4):367-78.
- Hardcastle Z & Papalopulu N.** 2000. Distinct effects of XBF-1 in regulating the cell cycle inhibitor p27(XIC1) and imparting a neural fate. *Development.* **127**(6) : 1303-14.
- Hatakeyama J, Tomita K, Inoue T, Kageyama R.** 2001. Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development.* **128**(8):1313-22.
- Hébert JM & Fishell G.** 2008. The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat Rev Neurosci.* **9**(9) : 678-85.
- Hebert JM & McConnell SK.** 2000. Targeting of cre to the foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev Biol.* **222**(2) : 296-306.
- Heimberg AM, Sempere LF, Moy VN, Donoghue PC & Peterson KJ.** 2008. MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(8) : 2946-50.
- Henrique D, Hirsinger E, Adam J, Le Roux I, Pourquié O, Ish-Horowicz D, Lewis J.** 1997. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol.* **7**(9):661-70.
- Herrera E, Marcus R, Li S, Williams SE, Erskine L, Lai E & Mason C.** 2004. Foxd1 is required for proper formation of the optic chiasm. *Development.* **131**, 5727-5739.
- Hirth F, Therianos S, Loop T, Gehring WJ, 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**(4) : 769-78.
- Holmberg K & Ohman P.** 1976. Fine structure of retinal synaptic organelles in lamprey and hagfish photoreceptors. *Vision Res.* **16**(3) : 237-9.
- Holt CE, Bertsch TW, Ellis HM & Harris WA.** 1988. Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron.* **1**(1):15-26.
- Hu M & Easter SS.** 1999. Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev Biol.* **207**(2) : 309-21.
- Hufnagel RB, Riesenberger AN, Saul SM & Brown NL.** 2007. Conserved regulation of Math5 and Math1 revealed by Math5-GFP transgenes. *Mol Cell Neurosci.* **36**(4):435-48.
- Huh S, Hatini V, Marcus RC, Li SC & Lai E.** 1999. Dorsal-ventral patterning defects in the eye of BF-1-deficient mice associated with a restricted loss of shh expression. *Dev Biol.* **211**(1) : 53-63.
- Inatani M.** 2005. Molecular mechanisms of optic axon guidance. *Naturwissenschaften.* **92**(12):549-61.
- Inoue T, Hojo M, Bessho Y, Tano Y, Lee JE & Kageyama R.** 2002. Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development.* **129**(4) : 831-42.
- Isoldi MC, Rollag MD, de Lauro Castrucci AN & Provencio I.** 2005. Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**(4) : 1217-21.

- Jékely G.** 2009. Evolution of phototaxis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **364**(1531) : 2795-808.
- Johns PR.** 1977. Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. *J Comp Neurol.* **176**(3):343-57.
- Kaestner KH, Knochel W & Martinez DE.** 2000. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* **14** : 142-46.
- Kaestner KH, Hiemisch H, Luckow B & Schütz G.** 1994. The HNF-3 gene family of transcription factors in mice: gene structure, cDNA sequence, and mRNA distribution. *Genomics.* **20**(3) : 377-85.
- Kawauchi S, Santos R, Kim J, Hollenbeck PL, Murray RC & Calof AL.** 2009a. The role of foxg1 in the development of neural stem cell of the olfactory epithelium. *Ann N Y Acad Sci.* **1170** : 21-7.
- Kawauchi S, Kim J, Santos R, Wu HH, Lander AD & Calof AL.** 2009b. Foxg1 promotes olfactory neurogenesis by antagonizing Gdf11. *Development.* **136**(9) : 1453-64.
- Kay JN, Link BA & Baier H.** 2005. Staggered cell-intrinsic timing of ath5 expression underlies the wave of ganglion cell neurogenesis in the zebrafish retina. *Development.* **132**(11):2573-85.
- Kerner P, Ikmi A, Coen D & Vervoort M.** 2009. Evolutionary history of the iroquois/Irx genes in metazoans. *BMC Evol Biol.* **9** : 74.
- Kim SH, Shin J, Park HC, Yeo SY, Hong SK, Han S, Rhee M, Kim CH, Chitnis AB & Huh TL.** 2002. Specification of an anterior neuroectoderm patterning by Frizzled8a-mediated Wnt8b signalling during late gastrulation in zebrafish. *Development.* **129**(19):4443-55.
- Kim JW & Lemke G.** 2006. Hedgehog-regulated localization of Vax2 controls eye development. *Genes Dev.* **20**: 2833-2847.
- Kinkl N, Sahel J & Hicks D.** 2001. Alternat FGF2-ERK1/2 signaling pathway in retina photoreceptor and glial cells in vitro. *J Biol Chem.* **276**(47) : 43871-8.
- Klein WH & Li X.** 2002. Function and Evolution of Otx Proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **258** : 229-33.
- Kluge B, Renault N & Rohr KB.** 2005. Anatomical and molecular reinvestigation of lamprey endostyle development provides new insight into thyroid gland evolution. *Dev. Genes Evol.* **215**(1) : 32-40.
- Kobayashi D, Kobayashi M, Matsumoto K, Ogura T, Nakafuku M & Shimamura K.** 2002. Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Development.* **129**(1) : 83-93.
- Koike C, Nishida A, Ueno S, Saito H, Sanuki R, Sato S, Furukawa A, Aizawa S, Matsuo I, Suzuki N, Kondo M & Furukawa T.** 2007. Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. *Mol Cell Biol.* **27**(23) : 8318-29.
- Koinuma S, Umesono Y, Watanabe K & Agata K.** 2003. The expression of planarian brain factor homologs, DjFoxG and DjFoxD. *Gene Expr Patterns.* **3**(1):21-7.
- Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK, Matsumoto K, Momose T, Uno K, Hoepker V, Ogura K, Takahashi N, Nakamura H, Yasuda K & Ogura T.** 2000. Tbx5 and the retinotectum projection. *Science.* **287**(5450) : 134-7.
- Kozmik Z, Swamynathan SK, Ruzickova J, Jonasova K, Paces V, Vicek C & Piatigorsky J.** 2008. Cubozoan crystallins : evidence for convergent evolution of pax regulatory sequences. *Evol. Dev.* **10**(1) : 52-61.
- Kubo F, Takeichi M, Nakagawa S.** 2003. Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development.* **130**(3):587-98.
- Kumar JP.** 2009. The sine oculis homeobox (SIX) family of transcription factor as regulators of development and disease. *Cell Mol. Life Sci.* **66**(4) : 565-83.

- Kuraku S, Hoshiyama D, Katoh K, Suga H & Miyata T.** 1999. Monophyly of lampreys and hagfishes supported by nuclear DNA-coded genes. *J Mol Evol.* **49**(6) : 729-35.
- Kuraku S & Kuratani S.** 2006. Time scale for cyclostome evolution inferred with a phylogenetic diagnosis of hagfish and lamprey cDNA sequences. *Zoolog Sci.* **23**(12) : 1053-64.
- Kuraku S.** 2008. Insights into cyclostome phylogenomics: pre-2R or post-2R. *Zoolog Sci.* **25**(10) : 960-8.
- Kuraku S & Meyer A.** 2009. The evolution and maintenance of Hox gene clusters in vertebrates and the teleost-specific genome duplication. *Int J Dev Biol.* **53**(5-6) : 765-73.
- Lacalli TC.** 2004. Sensory systems in amphioxus: a window on the ancestral chordate condition. *Brain Behav Evol.* **64**(3) : 148-62.
- Lagutin OV, Zhu CC, Kobayashi D, Topczewski J, Shimamura K, Puelles L, Russell HR, McKinnon PJ, Solnica-Krezel L, Oliver G.** 2003. Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev.* **17**(3):368-79.
- Lamb T, Collin SP & Pugh EN Jr.** 2007. Evolution of the vertebrate eye : opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**(12) : 960-76.
- Land MF.** 2005. The optical structures of animal eyes. *Curr. Biol.* **15**(9) : R319-23. *Review.*
- Lanjuin A, VanHoven MK, Bargmann CI, Thompson JK & Sengupta P.** 2003. Otx/Otd homeobox genes specify distinct sensory neuron identities in *C. elegans*. *Dev Cell.* **5**(4) : 621-33.
- Larroux C, Luke GN, Koopman P, Rokhsar DS, Shimeld SM, Degnan BM.** 2008. Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol Biol Evol.* **25**(5):980-96.
- Leys SP & Degnan BM.** 2001. Cytological basis of Photoresponsive Behavior in a sponge Larva. *Biol. Bull.* **201** : 323-38.
- Li H, Tierney C, Wen L, Wu JY & Rao Y.** 1997. A single morphogenetic field gives rise to two retina primordial under the influence of the prechordal plate. *Development.* **124**(3):603-15.
- Li X, Perissi V, Liu F, Rose DW, Rosenfeld MG.** 2002. Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science.* **297**(5584):1180-3.
- Li S, Mo Z, Yang X, Price SM, Shen MM, Xiang M.** 2004. FoxN4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors. *Neuron.* **43**(6):795-807.
- Libants S, Carr K, Wu H, Teeter JH, Chung-Davidson YW, Zhang Z, Wilkerson C & Li W.** 2009. The sea lamprey *Petromyzon marinus* genome reveals the early origin of several chemosensory receptor families in the vertebrate lineage. *BMC Evol Biol.* **9** : 180.
- Li HS, Yang JM, Jacobson RD, Pasko D & Sundin O.** 1994. Pax-6 is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: implications for stepwise determination of the lens. *Dev Biol.* **162**(1) : 181-94.
- Liu Y, Lupo G, Marchitelli A, Gestri G, He RQ, Banfi S & Barsacchi G.** 2001. Expression of the Xvax2 gene demarcates presumptive ventral telencephalon and specific visual structures in *Xenopus laevis*. *Mech Dev.* **100**(1) : 115-8.
- Liu M, Liu Y, Liu Y, Lupo G, Lan L, Barsacchi G & He R.** 2008. A role for Xvax2 in controlling proliferation of *Xenopus* ventral eye and brain progenitors. *Dev Dyn.* **237**(11) : 3387-93.
- Liu W, Lagutin O, Swindell E, Jamrich M, Oliver G.** 2010. Neuroretina specification in mouse embryos requires Six3-mediated suppression of Wnt8b in the anterior neural plate. *J Clin Invest.* **120**(10):3568-77.
- Livesey FJ & Cepko CL.** 2001. Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci.* **2**(2):109-18.

- Loosli F, Winkler S, Wittbrodt J.** 1999. Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* **13**(6):649-54.
- Loosli F, Staub W, Finger-Baier KC, Ober EA, Verkade H, Wittbrodt J & Baier H.** 2003. Loss of eyes in zebrafish caused by mutation of *chokh/rx3*. *EMBO Rep.* **4**(9) : 894-9.
- Lowe CJ, Issel-Tarver L & Wray GA.** 2002. Gene expression and larval evolution : changing roles of *distal-less* and *orthodenticle* in echinoderm larvae. *Evol Dev.* **4**(2) : 111-23.
- Lupo G, Harris WA, Barsacchi G & Vignali R.** 2002. Induction and patterning of the telencephalon in *Xenopus laevis*. *Development.* **129**(23) : 5421-36.
- Lupo G, Liu Y, Qiu R, Chandraratna RA, Barsacchi G, He RQ & Harris WA.** 2005. Dorsoventral patterning of the *Xenopus* eye : a collaboration of Retinoid, Hedgehog and FGF receptor signaling. *Development.* **132**(7) : 1737-48.
- Lynch VJ & Wagner GP.** 2010. Revisiting a classic example of transcription factor functional equivalence : are *Eyeless* and *Pax6* functionally equivalent or divergent ? *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* Online 17 sep 2010.
- Macdonald R, Barth KA, Xu Q, Holder N, Mikkola I & Wilson SW.** 1995. Midline signalling is required for *Pax* gene regulation and patterning of the eyes. *Development.* **121**(10) : 3267-78.
- Magie CR, Pang K & Martindale MQ.** 2005. Genomic inventory and expression of *Sox* and *Fox* genes in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev Genes Evol.* **215**(12) : 618-30.
- Mallamaci A, Di Blas E, Briata P, Boncinelli E & Corte G.** 1996. *OTX2* homeoprotein in the developing central nervous system and migratory cells of the olfactory area. *Mech Dev.* **58**(1-2) : 165-78.
- Mallatt J & Sullivan J.** 1998. 28S and 18S rDNA sequences support the monophyly of lampreys and hagfishes. *Mol Biol Evol.* **15**(12) : 1706-18.
- Mallatt J & Winchell CJ.** 2007. Ribosomal RNA genes and deuterostome phylogeny revisited : more cyclostomes, elasmobranchs, reptiles, and a brittle star. *Mol Phylogenet Evol.* **43**(3) : 1005-22.
- Manavathi B, Peng S, Rayala SK, Talukder AH, Wang MH, Wang RA, Balasenthil S, Agarwal N, Frishman LJ & Kumar R.** 2007. Repression of *Six3* by a corepressor regulates rhodopsin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(32):13128-33.
- Manuel M, Martynoga B, Yu T, West JD, Mason JO & Pride DJ.** 2010. The transcription factor *FoxG1* regulates the competence of telencephalic cells to adopt subpallial fates in mice. *Development* **137** : 487-97.
- Marklund M, Sjödal M, Beehler BC, Jessell TM, Edlund T & Gunhaga L.** 2004. Retinoic acid signaling specifies intermediate character in the developing telencephalon. *Development.* **131**(17):4323-32.
- Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F & Gruss P.** 2001. *Pax6* is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell.* **105**(1) : 43-55.
- Marsh-Armstrong N, McCaffery P, Gilbert W, Dowling JE & Dräger UC.** 1994. Retinoic acid is necessary for development of the ventral retina in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(15) : 7286-90.
- Martinez-Morales JR, Signore M, Acampora D, Simeone A & Bovolenta P.** 2001. *Otx* genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development.* **128**(11) : 2019-30.
- Martinez-Morales JR, Del Bene F, Nica G, Hammerschmidt M, Bovolenta P, Wittbrodt J.** 2005. Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center. *Dev Cell.* **8**(4) : 565-74.
- Martins RA & Pearson RA.** 2008. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res.* **1192** : 37-60.
- Masland RH.** 2001. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol.* **11**(4):431-6.

- Mathers PH, Grinberg A, Mahon KA, Jamrich M.** 1997. The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature*. **387**(6633) : 603-7.
- Matsuo T, Osumi-Yamashita N, Noji S, Ohuchi H, Koyama E, Myokai F, Matsuo N, Taniguchi S, Doi H, Iseki S, Ninomiya Y, Fujiwara M, Watanabe T & Eko, K.** 1993. A mutation in the Pax6 gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells. *Nat. Genet.* **3**(4) : 299-304.
- Matsuo I, Kuratani S, Kimura C, Takeda N & Aizawa S.** 1995. Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev.* **9**(21) : 2646-58.
- Maurus D, Héligon C, Bürger-Schwärzler A, Brändli AW, Kühl M.** 2005. Noncanonical Wnt-4 signaling and EAF2 are required for eye development in *Xenopus laevis*. *EMBO J.* **24**(6) : 1181-91.
- Mazet F, Hutt JA, Millard J & Shimeld SM.** 2003. Pax gene expression in the developing central nervous system of *Ciona intestinalis*. *Gene Expr Patterns.* **3**(6) : 743-5.
- Mazet F, Yu JK, Liberles DA, Holland LZ & Shimeld SM.** 2003. Phylogenetic relationships of the Fox (Forkhead) gene family in the Bilateria. *Gene.* **316** : 79-89.
- Mazza ME, Pang K, Martindale MQ & Finnerty JR.** 2007. Genomic organization, gene structure, and developmental expression of tree clustered otx genes in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* **308**(4) : 494-506.
- McCauley DW & Bronner-Fraiser M.** 2002. Conservation of Pax gene expression in ectodermal placodes of the lamprey. *Gene.* **287**(1-2) : 129-39.
- McDonald EC, Xie B, Workman M, Charlton-Perkins M, Terrell DA, Reischl J, Wimmer EA, Gebelein BA & Cook TA.** 2010. Separable transcriptional regulatory domains within Otd control photoreceptor terminal differentiation events. *Dev Biol.* **347**(1) : 122-32.
- McLaughlin T, Hindges R, O'Leary DD.** 2003. Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain. *Curr Opin Neurobiol.* **13**(1) : 57-69.
- Médina M, Repérant J, Ward R, Jay B, Miceli D & Kenigfest N.** 2009. Preoptic FMRF-amide-like immunoreactive projections to the retina in the lamprey (*Lampetra fluviatilis*). *Brain Res.* **1273** : 58-65.
- Meléndez-Ferro M, Villar-Cheda B, Abalo XM, Pérez-Costas E, Rodríguez-Muñoz R, Degrip WJ, Yáñez J, Rodicio MC & Anadón R.** 2002. Early development of the retina and pineal complex in the sea lamprey: comparative immunocytochemical study. *J Comp Neurol.* **442**(3) : 250-65.
- Millet S, Bloch-Gallego E, Simeone A, Alvarado-Mallart RM.** 1996. The caudal limit of Otx2 gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary : a study using in situ hybridization and chick/quail homotopic grafts. *Development.* **122**(12) : 3785-97.
- Mishra M, Oke A, Lebel C, McDonald EC, Plummer Z, Cook TA, Zehhof AC.** 2010. Pph13 and orthodenticle define a dual regulatory pathway for photoreceptor cell morphogenesis and function. *Development.* **137**(17) : 2895-904.
- Mori H, Miyazaki Y, Morita T, Nitta H & Mishina M.** 1994. Different spatio-temporal expressions of three otx homeoprotein transcripts during zebrafish embryogenesis. *Brain Res Mol Brain Res.* **27**(2) : 221-31.
- Morsli H, Tuorto F, Choo D, Postiglione MP, Simeone A & Wu DK.** 1999. Otx1 and Otx2 activities are required for the normal development of the mouse inner ear. *Development.* **126**(11) : 2335-43.
- Mu X, Fu X, Sun H, Beremand PD, Thomas TL & Klein WH.** 2005. A gene network downstream of transcription factor Math5 regulates retinal progenitor cell competence and ganglion cell fate. *Dev Biol.* **280**(2) : 467-81.
- Mui SH, Kim JW, Lemke G & Bertuzzi S.** 2005. Vax genes ventralize the embryonic eye. *Genes Dev.* **19**(10) : 1249-59.
- Müller P, Yanze N, Schmid V & Spring J.** 1999. The homeobox gene Otx of the jellyfish *Podocoryne carnea*: role of a head gene in striated muscle and evolution. *Dev Biol.* **216**(2) : 582-94.

- Müller F, Albert S, Blader P, Fischer N, Hallonet M & Strähle U.** 2000. Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development*. **127**(18) : 3889-97.
- Müller F, Rohrer H & Vogel-Höpkner A.** 2007. Bone morphogenetic proteins specify the retinal pigment epithelium in the chick embryo. *Development*. **134**(19) : 3483-93.
- Muradov H, Kerov V, Boyd KK & Artemyev NO.** 2008. Unique transducins expressed in long and short photoreceptors of lamprey *Petromyzon marinus*. *Vision Res.* **48**(21) : 2302-8.
- Murakami Y, Uchida K, Rijli FM, Kuratani S.** 2005. Evolution of the brain developmental plan: Insights from agnathans. *Dev Biol.* **280**(2) : 249-59.
- Nederbragt AJ, te Welscher P, van den Driesche S, van Loon AE, Dictus WJ.** 2002. Novel and conserved roles for orthodenticle/ otx and orthopedia/ otp orthologs in the gastropod mollusc *Patella vulgata*. *Dev Genes Evol.* **212**(7) : 330-7.
- Neumann CJ & Nüsslein-Volhard C.** 2000. Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science*. **289** : 2137-39.
- Niimi T, Seimiya M, Kloter U, Flister S & Gehring WJ.** 1999. Direct regulatory interaction of the eyeless protein with an eye-specific enhancer in the sine oculis gene during eye induction in *Drosophila*. *Development*. **126** : 2253-60.
- Nilson DE.** 2004. Eye evolution : a question of genetic promiscuity. *Curr. Op. Neurobiol.* **14** : 407-14.
- Nilsson DE & Arendt D.** 2008. Eye evolution : the blurry beginning. *Curr. Biol.* **18**(23) : R1096-8.
- Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, Furukawa T.** 2003. Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci.* **6**(12):1255-63.
- Nordstrom K, Wallen R, Seymour J & Nilsson D.** 2003. A simple visual system without neurons in jellyfish larvae. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **270** : 2349-2354.
- Ochi H, Ogino H, Kageyama Y, Yasuda K.** 2003. The stability of the lens-specific Maf protein is regulated by fibroblast growth factor (FGF)/ERK signaling in lens fiber differentiation. *J Biol Chem.* **278**(1):537-44.
- Ohman P.** 1976. Fine structure of photoreceptors and associated neurons in the retina of *Lampetra fluviatilis* (cyclostomi). *Vision Res.* **16** : 659-62.
- Ohsawa R & Kageyama R.** 2008. Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res.* **1192**:90-8.
- Oliver G, Mailhos A, Wehr R, Copeland NG, Jenkins NA, 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**(12):4045-55.
- Oron-Karni V, Farhy C, Elgart M, Marquardt T, Remizova L, Yaron O, Xie Q, Cvekl A, Ashery-Padan R.** 2008. Dual requirement for Pax6 in retinal progenitor cells. *Development*. **135**(24):4037-47.
- Osorio J, Mazan S & Rétaux S.** 2005. Organisation of the lamprey (*Lampetra fluviatilis*) embryonic brain : insights from LIM-homeodomain, Pax and hedgehog genes. *Dev. Biol.* **288**(1) : 100-12.
- Ota KG & Kuratani S.** 2008. Developmental biology of hagfishes, with a report on newly obtained embryos of the Japanese inshore hagfish, *Eptatretus burgeri*. *Zoolog Sci.* **25**(10) : 999-1011.
- Paek H, Gutin G, Hébert JM.** 2009. FGF signaling is strictly required to maintain early telencephalic precursor cell survival. *Development*. **136**(14):2457-65.
- Papalopulu N & Kintner C.** 1996. A posteriorising factor, retinoic acid, reveals that anteroposterior patterning controls the timing of neuronal differentiation in *Xenopus* neuroectoderm. *Development*. **122**(11):3409-18.

- Patten I & Placzek M.** 2000. The role of Sonic Hedgehog in neural tube patterning. *Cell Mol Life Sci.* **57**(12):1695-708.
- Pauley S, Lai E, Fritzscht B.** 2006. FoxG1 is required for morphogenesis and histogenesis of the mammalian inner ear. *Dev Dyn.* **235**(9):2470-82.
- Perron M, Kanekar S, Vetter ML, Harris WA.** 1998. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol.* **199**(2):185-200.
- Petros TJ, Rebsam A, Mason CA.** 2008. Retinal axon growth at the optic chiasm: to cross or not to cross. *Annu Rev Neurosci.* **31**:295-315.
- Philips GT, Stair CN, Young Lee H, Wroblewski E, Berberoglu MA, Brown NL, Mastick GS.** 2005. Precocious retinal neurons: Pax6 controls timing of differentiation and determination of cell type. *Dev Biol.* **279**(2):308-21.
- Piatigorsky J.** 1998. Gene sharing in lens and cornea : facts and implications. *Prog. Ret. Eye Res.* **17**(2) : 145-75.
- Pichaud F, Treisman J & Desplan C.** 2001. Reinventing a common strategy for patterning the eye. *Cell.* **105** : 9-12.
- Picker A & Brand M.** 2005. FGF signals from a novel signaling center determine axial patterning of the prospective neural retina. *Development.* **132**(22):4951-62.
- Picker A, Cavodeassi F, Machate A, Bernauer S, Hans S, Abe G, Kawakami K, Wilson SW, Brand M.** 2009. Dynamic coupling of pattern formation and morphogenesis in the developing vertebrate retina. *PLoS Biol.* **7**(10):e1000214.
- Plouhinec JL, Sauka-Spengler T, Germot A, Le Mentec C, Cabana T, Harrison G, Pieau C, Sire JY, Véron G, Mazan S.** 2003. The mammalian Crx genes are highly divergent representatives of the Otx5 gene family, a gnathostome orthology class of orthodenticle-related homeogenes involved in the differentiation of retinal photoreceptors and circadian entrainment. *Mol Biol Evol.* **20**(4):513-21.
- Plouhinec JL, Leconte L, Sauka-Spengler T, Bovolenta P, Mazan S, Saule S.** 2005. Comparative analysis of gnathostome Otx gene expression patterns in the developing eye: implications for the functional evolution of the multigene family. *Dev Biol.* **278**(2):560-75.
- Pombal MA, Abalo XM, Rodicio MC, Anadón R & González A.** 2003. Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in the retina of adult and developing lampreys. *Brain Res.* **993**(1-2):154-63.
- Pratt T, Tian NM, Simpson TL, Mason JO, Price DJ.** 2004. The winged helix transcription factor Foxg1 facilitates retinal ganglion cell axon crossing of the ventral midline in the mouse. *Development.* **131**(15):3773-84.
- Quiring R, Walldorf U, Kloter U & Gehring WJ.** 1994. Homology of the eyeless gene of drosophila to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science.* **265** : 785-89.
- Ranade SS, Yang-Zhou D, Kong SW, McDonald EC, Cook TA, Pignoni F.** 2008. Analysis of the Otd-dependant transcriptome supports the evolutionary conservation of CRX/OTX/OTD functions in flies and vertebrates. *Dev Biol.* **315**(2):521-34.
- Rebagliati MR, Toyama R, Haffter P, Dawid IB.** 1998. cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(17):9932-7.
- Regad T, Roth M, Bredenkamp N, Illing N, Papalopulu N.** 2007. The neural progenitor-specifying activity of FoxG1 is antagonistically regulated by CKI and FGF. *Nat Cell Biol.* **9**(5):531-40.
- Reh TA & Fischer AJ.** 2001. Stem cells in the vertebrate retina. *Brain Behav Evol.* **58**(5):296-305.
- Roesch K, Jadhav AP, Trimarchi JM, Stadler MB, Roska B, Sun BB, Cepko CL.** 2008. The transcriptome of retinal Müller glial cells. *J Comp Neurol.* **509**(2):225-38.
- Rowan S, Chen CM, Young TL, Fisher DE, Cepko CL.** 2004. Transdifferentiation of the retina into pigmented cells in ocular retardation mice defines a new function of the homeodomain gene Chx10. *Development.* **131**(20):5139-52.

- Royet J & Finkelstein R.** 1997. Establishing primordia in the drosophila eye-antennal imaginal disc : the roles of decapentaplegic, wingless and hedgehog. *Development*. **124**(23):4793-800.
- Rubinson K & Cain H.** 1989. Neural differentiation in the retina of the larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Vis Neurosci*. **3**(3) : 241-8.
- Schwarz M, Cecconi F, Bernier G, Andrejewski N, Kammandel B, Wagner M, Gruss P.** 2000. Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development*. **127**(20):4325-34.
- Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massagué J.** 2004. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*. **117**(2):211-23.
- Shen YC & Raymond PA.** 2004. Zebrafish cone-rod (*crx*) homeobox gene promotes retinogenesis. *Dev Biol*. **269**(1):237-51.
- Shimeld SM, Boyle MJ, Brunet T, Luke GN, Seaver EC.** 2010. Clustered Fox genes in lophotrochozoans and the evolution of the bilaterian Fox gene cluster. *Dev Biol*. **340**(2):234-48.
- Shinya M, Koshida S, Sawada A, Kuroiwa A, Takeda H.** 2001. Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos. *Development*. **128**(21):4153-64.
- Shkumatava A & Neumann CJ.** 2005. Shh directs cell-cycle exit by activating p57Kip2 in the zebrafish retina. *EMBO Rep*. **6**(6):563-9.
- Siegenthaler JA & Miller MW.** 2008. Generation of Cajal-Retzius neurons in mouse forebrain is regulated by transforming growth factor beta-Fox signaling pathways. *Dev Biol*. **313**(1):35-46.
- Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, D'Apice MR, Nigro V, Boncinelli E.** 1993. A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J*. **12**(7):2735-47.
- Simonnet F, Célérier ML & Quéinnec E.** 2006. Orthodenticle and empty spiracles genes are expressed in a segmental pattern in chelicerates. *Dev Genes Evol*. **216**(7-8):467-80.
- Smith JJ, Antonacci F, Eichler EE & Amemiya CT.** 2009. Programmed loss of millions of base pairs from a vertebrate genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**(27) : 11212-7.
- Smith JJ, Stuart AB, Sauka-Spengler T, Clifton SW & Amemiya CT.** 2010. Development and analysis of a germline BAC resource for the sea lamprey, a vertebrate that undergoes substantial chromatin diminution. *Chromosoma*. **119**(4) : 381-9.
- Stigloher C, Ninkovic J, Laplante M, Geling A, Tannhäuser B, Topp S, Kikuta H, Becker TS, Houart C & Bally-Cuif L.** 2006. Segregation of telencephalic and eye-field identities inside the zebrafish forebrain territory is controlled by Rx3. *Development*. **133**(15) : 2925-35.
- Stock DW & Whitt GS.** 1992. Evidence from 18S ribosomal RNA sequences that lampreys and hagfishes form a natural group. *Science*. **257**(5071) : 787-9.
- Suda Y, Matsuo I, Kuratani S & Aizawa S.** 1996. Otx1 function overlaps with Otx2 in development of mouse forebrain and midbrain. *Genes Cells*. **1**(11):1031-44.
- Suda Y, Matsuo I & Aizawa S.** 1997. Cooperation between Otx1 and Otx2 genes in developmental patterning of rostral brain. *Mech Dev*. **69**(1-2):125-41.
- Suda Y, Kurokawa D, Takeuchi M, Kajikawa E, Kuratani S, Amemiya C & Aizawa S.** 2009. Evolution of Otx paralogue usages in early patterning of the vertebrate head. *Dev Biol*. **325**(1):282-95.
- Suga H, Schmid V & Gehring WJ.** 2008. Evolution and functional diversity of jellyfish opsins. *Curr. Biol*. **18** : 51-55.

- Tahayato A, Sonnevile R, Pichaud F, Wernet MF, Papatsenko D, Beaufils P, Cook T & Desplan C.** 2003. Otd/Crx, a dual regulator for the specification of ommatidia subtypes in the *Drosophila* retina. *Dev Cell*. **5**(3):391-402.
- Takahashi H, Shintani T, Sakuta H & Noda M.** 2003. CBF1 controls the retinotectal topographical map along the anteroposterior axis through multiple mechanisms. *Development*. **130**(21):5203-15.
- Takahashi H, Sakuta H, Shintani T & Noda M.** 2009. Functional mode of FoxD1/CBF2 for the establishment of temporal retinal specificity in the developing chick retina. *Dev Biol*. **331**(2):300-10.
- Take-uchi M, Clarke JD, Wilson SW.** 2003. Hedgehog signalling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of Vax gene activity. *Development*. **130**(5):955-68.
- Tao W & Lai E.** 1992. Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain. *Neuron*. **8**(5):957-66.
- Teraoka ME, Paschaki M, Muta Y, Ladher RK.** 2009. Rostral paraxial mesoderm regulates refinement of the eye field through the bone morphogenetic protein (BMP) pathway. *Dev Biol*. **330**(2):389-98.
- Tian NM, Pratt T & Price DJ.** 2008. Foxg1 regulates retinal axon pathfinding by repressing an ipsilateral program in nasal retina and by causing optic chiasm cells to exert a net axonal growth-promoting activity. *Development*. **135**(24):4081-9.
- Tomita K, Nakanishi S, Guillemot F & Kageyama R.** 1996. Mash1 promotes neuronal differentiation in the retina. *Genes Cells*. **1**(8):765-74.
- Tomita K, Moriyoshi K, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R.** 2000. Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *EMBO J* **19**(20):5460-72.
- Tonosaki A, Washioka H, Hara M, Ishikawa M & Watanabe H.** 1989. Photoreceptor disk membranes of *Lampetra japonica*. *Neurosci Res*. **6**(4) : 340-9.
- Toresson H, Martinez-Barbera JP, Bardsley A, Caubit X, Krauss S.** 1998. Conservation of BF-1 expression in amphioxus and zebrafish suggests evolutionary ancestry of anterior cell types that contribute to the vertebrate telencephalon. *Dev Genes Evol*. **208**(8):431-9.
- Torres M, Gómez-Pardo E, Gruss P.** 1996. Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development*. **122**(11):3381-91.
- 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**(3):553-62.
- Treisman J.** 2004. How to make an eye. *Development*. **131** : 3823-27.
- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D.** 2000. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*. **287**(5460):2032-6.
- Turner DL & Cepko CL.** 1987. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature*. **328**(6126):131-6.
- Umesono Y, Watanabe K & Agata K.** 1998. A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev Growth Differ*. **39**(6):723-7.
- Urness LD, Paxton CN, Wang X, Schoenwolf GC, Mansour SL.** 2010. FGF signaling regulates otic placode induction and refinement by controlling both ectodermal target genes and hindbrain Wnt8a. *Dev Biol*. **340**(2):595-604.
- Vandendries ER, Johnson D, Reinke R.** 1996. orthodenticle is required for photoreceptor cell development in the *Drosophila* eye. *Dev Biol*. **173**(1):243-55.

- Van Raay TJ, Moore KB, Iordanova I, Steele M, Jamrich M, Harris WA, Vetter ML.** 2005. Frizzled 5 signaling governs the neural potential of progenitors in the developing *Xenopus* retina. *Neuron*. **46**(1):23-36.
- Vesselkin NP, Repérant J, Kenigfest NB, Rio JP, Miceli D & Shupliakov OV.** 1989. Centrifugal innervation of the lamprey retina. Light- and electron microscopic and electrophysiological investigations. *Brain Res.* **493**(1) : 51-65.
- Viczian AS, Vignali R, Zuber ME, Barsacchi G, Harris WA.** 2003. XOt5b and XOt2 regulate photoreceptor and bipolar fates in the *Xenopus* retina. *Development*. **130**(7):1281-94.
- Villar-Cerviño V, Abalo XM, Villar-Cheda B, Meléndez-Ferro M, Pérez-Costas E, Holstein GR, Martinelli GP, Rodicio MC & Anadón R.** 2006. Presence of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in the retina of the larval sea lamprey: comparative immunohistochemical study of classical neurotransmitters in larval and postmetamorphic retinas. *J Comp Neurol.* **499**(5) : 810-27.
- Villar-Cheda B, Abalo XM, Villar-Cerviño V, Barreiro-Iglesias A, Anadón R & Rodicio MC.** 2008. Late proliferation and photoreceptor differentiation in the transforming lamprey retina. *Brain Res.* **1201** : 60-7.
- Vogel-Höpkner A, Momose T, Rohrer H, Yasuda K, Ishihara L & Rapaport DH.** 2000. Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development. *Mech Dev.* **94**(1-2) : 25-36.
- Vopalensky P & Kozmik Z.** 2009. Eye evolution : common use and independent recruitment of genetic components. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **364** : 2819-32.
- Wada S, Katsuyama Y, Sato Y, Itoh C, Saiga H.** 1996. Hroth an orthodenticle-related homeobox gene of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: its expression and putative roles in the axis formation during embryogenesis. *Mech Dev.* **60**(1):59-71.
- Walshe J & Mason I.** 2003. Unique and combinatorial functions of Fgf3 and Fgf8 during zebrafish forebrain development. *Development*. **130**(18):4337-49.
- Wargelius A, Seo HC, Austbø L, Fjose A.** 2003. Retinal expression of zebrafish six3.1 and its regulation by Pax6. *Biochem Biophys Res Commun.* **309**(2):475-81.
- Wassle H.** 2004. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci.* **5**(10):747-57.
- Wässle H, Puller C, Müller F, Haverkamp S.** 2009. Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *J Neurosci.* **29**(1) : 106-17.
- Watanabe T & Raff MC.** 1990. Rod photoreceptor development in vitro: intrinsic properties of proliferating neuroepithelial cells change as development proceeds in the rat retina. *Neuron*. **4**(3) : 461-7.
- Westenskow P, Piccolo S, Fuhrmann S.** 2009. Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating Mitf and Otx2 expression. *Development*. **136**(15) : 2505-10.
- Wetts R & Fraser SE.** 1988. Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science*. **239**(4844) : 1142-5.
- Wieschaus E, Nusslein-Volhard C & Kluding H.** 1984. Krüppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation. *Dev Biol.* **104**(1) : 172-86.
- Willardsen MI, Suli A, Pan Y, Marsh-Armstrong N, Chien CB, El-Hodiri H, Brown NL, Moore KB, Vetter ML.** 2008. Temporal regulation of *Ath5* gene expression during eye development. *Dev Biol.* **326**(2) : 471-81.
- William NA & Holland PW.** 1996. Gene and domain duplication in the chordate Otx gene family: insights from amphioxus Otx. *Mol Biol Evol.* **15**(5):600-7.
- William NA & Holland PW.** 1998. Molecular evolution of the brain of chordates. *Brain Behav Evol.* **52**(4-5):177-85.
- Wong LL & Rapaport DH.** 2009. Defining retinal progenitor cell competence in *xenopus laevis* by clonal analysis. *Development*. **136** : 1707-15.

- Xie B, Charlton-Perkins M, McDonald E, Gebelein B & Cook T.** 2007. Senseless functions as a molecular switch for color photoreceptor differentiation in drosophila. *Development*. **134** : 4243-53.
- Yamada A & Martindale MQ.** 2002. Expression of the ctenophore Brain Factor 1 forkhead gene ortholog (ctenoBF-1) mRNA is restricted to the presumptive mouth and feeding apparatus: implications for axial organization in the Metazoa. *Dev Genes Evol*. **212**(7):338-48.
- Yamagata M, Mai A, Pollerberg GE, Noda M.** 1999. Regulatory interrelations among topographic molecules CBF1, CBF2 and EphA3 in the developing chick retina. *Dev Growth Differ*. **41**(5):575-87.
- Yang HJ, Silva AO, Koyano-Nakagawa N, McLoon SC.** 2009. Progenitor cell maturation in the developing vertebrate retina. *Dev Dyn*. **238**(11):2823-36.
- Yu JK, Mazet F, Chen YT, Huang SW, Jung KC, Shimeld SM.** 2008. The Fox genes of Branchiostoma floridae. *Dev Genes Evol*. **218**(11-12):629-38.
- Zhang XM & YangXJ.** 2001. Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development*. **128** : 943-57.
- Zhang CL, Zou Y, Yu RT, Gage FH & Evans RM.** 2006. Nuclear receptor TLX prevents retinal dystrophy and recruits the corepressor atrophin1. *Genes Dev*. **20**(10):1308-20.
- Zhao S, Chen Q, Hung FC & Overbeek PA.** 2002. BMP signaling is required for development of the ciliary body. *Development*. **129**(19):4435-42.
- Zhao XF, Suh CS, Prat CR, Ellingsen S & Fjose A.** 2009. Distinct expression of two foxg1 paralogues in zebrafish. *Gene Expr Patterns*. **9**(5):266-72.
- Zhao L, Saitsu H, Sun X, Shiota K & Ishibashi M.** 2010. Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain. *Mech Dev*. **127**(1-2):62-72.
- Zhu CC, Dyer MA, Uchikawa M, Kondoh H, Lagutin OV & Oliver G.** 2002. Six3-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development*. **129**(12):2835-49.
- Zuber ME, Gestri G, Viczian AS, Barsacchi G & Harris WA.** 1997. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development*. **130**(21):5155-67.
- Zuber ME, Gestri G, Viczian AS, Barsacchi G & Harris WA.** 2003. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development*. **130**(21) : 5155-67.

ANNEXES

Annexe A : **Le transporteur du glutamate dans le système nerveux de la lamproie *Petromyzon marinus*.**

Travail en collaboration avec Verona Villar-Cervino et l'équipe de Maria-Celina Rodicio et Ramon Anadon (Université de Saint Jacques de Compostelle, Espagne).

Annexe B : **La spermatogenèse chez la roussette *Scyliorhinus canicula*.**

Travail en collaboration avec Emma Redon et l'équipe de Pascal Sourdain (Université de Caen, France).

Annexe C : **Tables de développement – Tahara, 1956.**

Annexe A : Le transporteur du glutamate dans le système nerveux de la lamproie *Petromyzon marinus*.

Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur, prédominant dans le système nerveux, intervenant également dans le développement neural, chez les vertébrés. Il existe trois récepteurs associés à cette molécule chez les mammifères : VGluT1/2/3. Leurs profils d'expression sont complémentaires et sont exprimés principalement dans la corde spinale et le rhombencéphale, mais également dans de nombreux territoires discrets au cours de l'embryogenèse.

L'intérêt de l'étude de ce neurotransmetteur lors de la neurogenèse de la lamproie provient du fait que cette espèce présente à la fois des caractéristiques primitives telles que la présence d'un cerveau de type laminé (en référence à la lamina périventriculaire, où les corps neuronaux sont localisés) et l'absence de myéline, mais aussi des caractéristiques partagées avec les gnathostomes, telles que l'organisation du système nerveux et la présence des crêtes neurales et des placodes céphaliques. La comparaison des données obtenues chez les gnathostomes avec celles disponibles chez la lamproie, permet ainsi d'étudier les caractéristiques ancestrales à l'échelle des vertébrés.

Mon rôle au cours de ce projet a été de conseiller techniquement Verónica Villar Cereviño dans ses recherches, lors de son séjour dans notre laboratoire, pour identifier le gène VGluT chez la lamproie. Ceci comprend les analyses *in silico* qui ont été effectuées dans les bases de données du laboratoire ainsi que l'analyse de la séquence VGluT de lamproie et les comparaisons avec les séquences des gnathostomes. De plus, j'ai pu transmettre mon expérience concernant l'obtention de sondes ARN chez la lamproie ainsi que sur la technique d'hybridations *in situ* sur embryons entiers, afin d'établir le profil d'expression de ce gène.

Ce projet a donc permis la caractérisation d'un seul transporteur VGluT chez la lamproie *Petromyzon marinus*. Le profil d'expression de ce gène chez cette espèce est fortement conservé par rapport à ceux déterminés chez les gnathostomes, suggérant des conservations importantes dans la formation du système nerveux.

A vesicular glutamate transporter in lampreys: cDNA cloning and early expression in
the nervous system

Verona Villar-Cerviño¹, Claire Rocancourt², Arnaud Menuet², Corinne Da Silva³,
Patrick Wincker³, Ramón Anadón¹, Sylvie Mazan², Maria Celina Rodicio^{1*}

*1 Departamento de Biología Celular y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de
Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Spain*

*2 Développement et Evolution des vertébrés, UMR7150 CNRS and Université Paris 6,
Station Biologique, 29680 Roscoff France*

3 Genoscope (CEA), UMR8030, CNRS and Université d'Evry 91057 Evry, France

Corresponding author: María Celina Rodicio

Address: Departamento de Biología Celular, Edificio CIBUS

Campus Sur Universitario, Universidad de Santiago de Compostela

CP. 15782, Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

Phone: +34 981 563100 ext. 16946

Fax: +34 981 528006

E-mail: mcelina.rodicio@usc.es

Abstract

Vesicular glutamate transporters (VGLUTs) accumulate glutamate into synaptic vesicles of glutamatergic neurons, and thus are considered to define the phenotype of these neurons. Glutamate also appears to play a role in the development of the nervous system of vertebrates. Here we report the characterization of a vesicular glutamate transporter of lamprey (IVGluT), a novel member of the VGLuT gene family. Phylogenetic analysis indicates that IVGLUT cannot be assigned to any of the three VGLUT isoforms characterized in teleosts and mammals, suggesting that these classes may have been fixed after the splitting between cyclostomes and gnathostomes. Expression pattern analysis during lamprey embryogenesis and prolarval stages shows that IVGluT expression is restricted to the nervous system. The first structure to express IVGluT was the olfactory epithelium of late embryos. In the brain of early prolarvae, IVGluT was expressed in most of the neuronal populations that generate the early axonal scaffold. IVGluT expression was also observed in neuronal populations of the rhombencephalon and spinal cord and in ganglia of the branchiomeric, octaval and posterior lateral line nerves. In the rhombencephalon, IVGluT expression appears to be spatially restricted in dorsal and ventral longitudinal domains. Comparison of the early expression of VGLuT genes between the lamprey and some anamniotan gnathostomes (frog, zebrafish) reveals a conserved expression pattern, likely to reflect ancestral vertebrate characteristics.

Key words: Glutamate transporter gene; VGLUT, in situ hybridization; brain; cranial nerve ganglia; early development; *Petromyzon marinus* L.

Introduction

Glutamate is a ubiquitous free amino acid present in all cells with general roles in protein synthesis and intermediary metabolism. In addition, glutamate is the predominant excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) and glutamatergic neurons have evolved specialized mechanisms for its regulated secretion at their synapses. Like many other neurotransmitters, glutamate is stored in synaptic vesicles at presynaptic level and released to the synaptic cleft upon neuronal stimulation. The glutamate transporters can be divided in two superfamilies that consist of plasma membrane-bound (excitatory amino acid transporters; EAATs) and vesicle-bound (vesicular glutamate transporters; VGLUTs) proteins, respectively. Three distinct vesicular glutamate transporter genes, encoding closely related proteins referred to as VGluT1, VGluT2, and VGluT3, have been identified to date in mammals. These three forms exhibit differential expressions in the nervous system. VGluT1 was localized at synapses with low release probability that are known to exhibit long-term potentiation, while VGluT2 was localized at synapses with high release probability, which exhibit long-term depression (Fremeau et al., 2001). These expression patterns appear largely complementary and excluding each other (Fremeau et al., 2001; Kaneko and Fujiyama, 2002), except for a limited overlap reported in some thalamic nuclei, the lateral habenula, the septum, and the subiculum (Herzog et al., 2001); and in primary sensory neurons (Li et al., 2003; Oliveira et al., 2003) of the rat. In this case, the neurons expressing VGluT1 and VGLUT2 exhibit secretory vesicles positive for both isoforms as well as for each single one (Fremeau et al., 2004a). Finally, VGluT3 expression is restricted to small numbers of neurons, including some central neurons traditionally considered non-glutamatergic (Boulland et al., 2004; Gras et al., 2002; Schäfer et al., 2002).

Glutamate also plays roles in neural development. In embryos, glutamate stimulates neurogenesis, cell migration, and synaptogenesis (McDonald and Johnston, 1990; LaMantia, 1995). A changing spatiotemporal pattern of expression of the VGluTs has been reported in some developing neuronal populations of mammals (Miyazaki et al., 2003; Boulland et al., 2004; Fremeau et al., 2004b; Nakamura et al., 2005), but there is no comprehensive study of the expression changes of VGluTs in the mammalian brain during early embryogenesis. Four VGluT genes have been cloned in zebrafish (VGluT1, VGluT2.1, VGluT2.2, VGluT3; Higashijima et al., 2004; Obholzer et al., 2008) and one in *Xenopus* (xVGluT1; Gleason et al., 2003). Expression pattern

characteristics of VGluTs during development have also been studied by in situ hybridization in the zebrafish, focusing on the spinal cord and rhombencephalon (VGluT1 and VGluT2; Higashijima et al., 2004) and in *Xenopus* (VGluT1, Gleason et al., 2003). This study highlighted a number of highly specific, discrete embryonic expression sites in the developing brain, spinal cord and cranial nerves, suggestive of a role for glutamate in the developing central nervous system. The frog is currently the only vertebrate in which an exhaustive embryonic expression pattern has been reported, which makes it difficult to understand the origin of these expression characteristics in vertebrates.

Sea lampreys are an essential reference to address this issue. They belong to an ancient lineage of craniates that flourished before the appearance of the gnathostomes and therefore occupy a key phylogenetic position at the transition between invertebrate chordates and jawed vertebrates. They have a complex life cycle that starts with egg laying in the river. The short (12-13 days) embryonic period is followed by a non-feeding prolarval phase (about 20-23 days) and a long (4 to 7 years) larval period. The larvae are blind, filter-feeding and live buried in sediments in the river where they were born. Through complex metamorphosis, larval sea lampreys transform into young adults that descend to the sea and feed as parasites on fishes for two years. The large (75-100 cm) prespawning adults migrate back to rivers to breed and die (Hardisty and Potter, 1971). The lamprey nervous system exhibits primitive features, such as the presence of a laminar-type brain (term referring to the periventricular lamina where most neuronal somata remain) and the lack of myelin. However, they have typical vertebrate brain subdivisions, neural crest and its derivatives and cephalic placodes. Their brain organization and basic circuitry also follows the basic vertebrate plan.

Lampreys represent important model organisms for studies on neural circuitry, development and the early vertebrate evolution (reviewed in Osório and Rétaux, 2008). In addition, the cloning and phylogenetic analysis of lamprey genes has been used as a critical reference point for determining the timing of gene duplication events in vertebrates (reviewed in Shifman et al., 2007). Here, we report the identification of a lamprey VGluT gene and its expression pattern during lamprey embryogenesis. This analysis allows the characterization of the earliest populations of glutamatergic neurons in lampreys and suggests certain conservation across vertebrates.

Material and methods

Embryos and prolarvae

Late embryos (stages 22 and 23, n = 10), hatchlings (stage 24, n = 10) and early prolarvae (stages 25 and 26; n = 20) of sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) were used. Adult male and female lampreys were collected in the streams of the River Gironde, France, during the breeding season. Fertilization was conducted in the laboratory and embryos kept in fresh oxygenated water at 15°C, until the desired stages were obtained. Embryos were staged according to the table established by Tahara (1988) for *Lampetra reissneri* [see Barreiro-Iglesias et al. (2008b) for a table of equivalences with the stages of Piavis (1971) for *Petromyzon marinus*]. Embryos and prolarvae were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline during 12-36 hours at 4°C, dehydrated in methanol and stored in 100% methanol at -20°C before use. All experiments were conformed to the European Community guidelines on animal care and experimentation.

Probes for in situ hybridization

Database searches. Searches for VGluT-related sequences were conducted using the TBLASTN algorithm and mouse VGluT sequences as queries (mouse VGluT1, VGluT2, and VGluT3, accession numbers NM 182993.1, NM 080853.3 and Q8BFU8, respectively) from an embryonic and larval lamprey EST database currently developed in SM's laboratory (to be described elsewhere) and the Pre-Ensembl version of the sea lamprey genome (http://pre.ensembl.org/Petromyzon_marinus). Briefly, the EST database was obtained starting from three cDNA libraries (*Lampetra fluviatilis* adult eye and brain and embryonic stages 19-26; *Petromyzon marinus* larval heads). The cDNA libraries were robotically arrayed and bacterial clones were submitted for systematic 5' end sequencing performed by Genoscope using an ABI370xl sequencer and following standard protocols.

Probe synthesis. Plasmid DNA was purified from the selected clones and the corresponding inserted fragments excised as control. Templates for in vitro transcription were prepared by PCR amplification from plasmid DNA as follows. A 584 base pairs (bp) 5' probe, spanning 381 bp of 5' UTR and 203 bp of 5' coding region was obtained from clone NY0AAA51YH17RM1 (Fig. 1B) using 5'-TTACTGCCGCTGCCAAATC-3' and the T7 promoter containing sequence 5'-AAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGGTAACGCTTGGGCATTCCG-3' as forward and reverse primers respectively. Similarly, a second 3' 483 bp probe, spanning

the region coding for transmembrane domains 9 to 12, was synthesized using 5'-TGCCCATCGGAGGACAAC-3' and 5'-AAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGGCTCGTCCTCGTTGATGAAG-3' as forward and reverse primers. Digoxigenin labelled riboprobes were synthesized using the amplified fragments as templates following standard protocols.

Phylogenetic analysis

For this analysis, putative VGLUT protein sequences of the sea squirt, *Ciona intestinalis*, the amphioxus, *Branchiostoma floridae*; the fruit fly, *Drosophila melanogaster*; the roundworm *Caenorhabditis elegans*, and the pond snail, *Lymnaea stagnalis* were aligned with the VGLUT sequences of lamprey, mouse, human, chick, the frog *Xenopus* and zebrafish. Sequences were aligned with CLUSTALW. A phylogenetic tree was constructed with the minimum evolution method and bootstrap analysis (1000 replications), using MEGA version 4 software (Tamura et al., 2007).

Whole mount in situ hybridization and sectioning

Whole-mount in situ hybridizations were conducted using standard protocols, with the following adaptations. A proteinase K treatment (10 µg/ml) was performed for 30 minutes at room temperature following embryo rehydration and an RNase A treatment (100 µg/ml, 37°C during 30 minutes) was added to the post-hybridization washings. Staining was conducted in BM Purple (Roche) at 37°C until the signal was clearly visible. After photography, lamprey embryos and prolarvae were cryoprotected with 30% sucrose in PBS, embedded in gelatin, frozen and sectioned (14 µm thick). The sections were dehydrated, mounted and photographed with a color digital camera in an Olympus photomicroscope.

Results

Characterization of a full-length coding sequence of a lamprey VGluT

In order to identify lamprey VGluT-related genes, we first conducted similarity searches in a lamprey *Lampetra fluviatilis* and *Petromyzon marinus* EST database currently developed in SM's laboratory, using mouse VGluT1, VGluT2 and VGluT3 sequences as queries. These searches led to the identification of 6 cDNA clones all retrieved from the *Lampetra fluviatilis* adult brain and eye cDNA library. These clones encode VGluT-related sequences as assessed by reverse-blast analysis. The corresponding sequences could be assembled in a single contig (Fig. 1C). Further sequencing of one of the clones used to assemble this contig (NY0AAA29YB03) made

it possible to extend its sequence and cover the complete coding region, thus completing its characterization. This VGluT gene will be termed hereafter IVGluT. In order to assess the presence of additional VGluT-related genes in the lamprey, a similarity search was conducted in the Pre-Ensembl version of the sea lamprey *P. marinus*. This analysis led to the identification of five contigs (number 24482, 41696, 69853, 9412 and 3164: Fig. 1D) encoding VGluT-related sequences. Contigs 9412-3164 respectively overlap over 180 bp with an almost perfect sequence identity (<1 %). While it is difficult to completely exclude the possibility that these contigs may belong to different genes, this low level of divergence is suggestive of polymorphisms between the two sequenced alleles.

The deduced *L. fluviatilis* amino acid sequence (Fig. 2 and supplementary Fig. 6) predicts a 597 amino acid protein, with twelve transmembrane domains, which can be readily aligned with mouse VGLUT1-3 protein sequences over their whole length, with a high average level of similarity (more than 70% identity, Table 1). Comparisons with *P. marinus* deduced amino acid sequences when available also revealed a perfect identity, suggestive of an orthology relationship (data not shown). The lamprey sequence also shows very similar levels of identity with each of the three VGLUT classes characterized in human, *Xenopus* and zebrafish (Table 1). A particular high level of conservation across vertebrates is observed at the level of the transmembrane domains, which display extended stretches of 100% identity. In order to further assess its assignment to anyone of these classes, we conducted a phylogenetic analysis. Representative osteichthyan VGLUT protein sequences, as well as unambiguous VGLUT sequences from the ascidian *Ciona intestinalis*, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* and gastropod (*Lymnaea*), which can be readily aligned with the former, were included in this analysis (Figs. 2 and 3). All vertebrate VGLUT sequences, including the lamprey one, were found clustered in the resulting tree (BP = 100), with the ascidian sequence as sister group. This analysis also confirmed the monophyly of each of the osteichthyan VGLUT1, VGLUT2 and VGLUT3 classes, each containing at least one representative of tetrapods and teleosts, with strong statistical supports (bootstrap, BP=100). Two zebrafish VGLUT2-related copies, possibly generated by the whole genome duplication event known to have taken place in the actinopterygian lineage, were also found clustered, albeit with a low statistical support (BP=65). Finally, the lamprey sequence was found to emerge as outgroup to all gnathostome sequences, but with a very low bootstrap value (BP<50).

Expression pattern of VGluT during early development of the sea lamprey

The analysis of IVGluT expression was conducted by whole-mount in situ hybridization of *P. marinus* embryos and prolarvae. Two distinct cDNA fragments were amplified from ESTs as described in Materials and methods (Fig. 1) and used as templates for antisense probe synthesis. As expected from the almost perfect sequence identity observed between *P. marinus* and *L. fluviatilis* VGluT nucleotide sequences, these probes yielded highly specific expression patterns, suggesting an extensive cross-hybridization even in the high stringency conditions used for hybridization. Both also led to strictly superimposable patterns at each stage studied. We identified the anatomical regions of the brain and the cranial ganglia of the sea lamprey using the nomenclature of previous studies on the development of the first tracts (Barreiro-Iglesias et al., 2008a) and cranial ganglia (Barreiro-Iglesias et al., 2008b).

In prehatching embryos, the neural tube exhibits a very immature appearance in which the primordial brain vesicles are hardly appreciable. The prosencephalic and mesencephalic regions consist of a thick ventricular zone formed by neuroepithelial cells and a primordial marginal zone formed by processes of these neuroepithelial cells. The rhombencephalon and spinal cord are more or less cylindrical with little variation in diameter, exhibiting only a ventricular zone on both sides of a vertical slit-shaped cavity. In these embryos, two transverse ventricular sulci, the anterior and posterior intraencephalic sulci separate the diencephalic/mesencephalic primordium from the primordia of the telencephalon and rhombencephalon, respectively. The first neuronal populations (Villar-Cheda et al., 2006; Barreiro-Iglesias et al., 2008a) and cranial nerve ganglia (Barreiro-Iglesias et al., 2008b) become recognizable during late embryonic periods.

In situ hybridization of embryos and prolarvae of sea lamprey with the two probes for IVGluT revealed that expression of this gene was restricted to neural structures. IVGluT expression was first detectable in the olfactory epithelium (placode) of prehatching embryos (stage 23, Fig. 4B). At this stage, no expression of IVGluT mRNA was observed in the embryonic brain/spinal cord. At hatching (stage 24), IVGluT mRNA expression was first observed in cells of two regions of the brain, which correspond to the presumptive nucleus of the tract of the postoptic commissure and the nucleus of the medial longitudinal fascicle and in the spinal cord. At this developmental stage, IVGluT expression was also present in ganglia of several cranial nerves: the deep

ophthalmic (V1) and maxillomandibular (V2) trigeminal ganglia, and the facial, glossopharyngeal and posterior lateral line nerve ganglia (Fig. 4C).

In the brain of early prolarvae (stage 25), expression of IVGluT transcripts became visible in other cell populations, including the olfactory bulb/pallium primordium, the presumptive nucleus of the supraoptic tract, the dorsal isthmus and caudal rhombencephalon. At this developmental stage, IVGluT labeling also appeared in the pineal organ (Fig. 4D). At stage 26, IVGluT transcripts became detectable in the first and the second epibranchial ganglia of the vagal nerve (Fig. 4E). The expression of IVGluT in the rhombencephalon was located in spatially restricted cellular domains, as clearly shown in dorsal views (Fig. 4F).

Study of transverse sections of the whole-mount processed prolarvae confirmed the tissue distribution of the transcripts (Fig. 5) and also revealed the presence of IVGluT expression in the caudal region of the rhombencephalic basal plate since the stage 25 prolarvae (Fig. 5K). In transverse sections of stage 26 prolarvae, IVGluT labeling was observed for the first time in cells of the hypothalamus (Fig. 5F, G) and of the nucleus of the tract of the posterior commissure (Fig. 5F). At this stage, the signal intensity appeared significantly lower in the newly expressing cell populations than in the earliest ones.

Discussion

Relationships between cyclostomes and gnathostomes VGLUT genes

The data presented here indicates that the lamprey sequence was found to emerge as outgroup to all gnathostome sequences, although the very low bootstrap value leaves its position unresolved. Difficulties are often encountered to resolve orthology relationships between cyclostome and gnathostome genes belonging to the same gene family (Germot et al. 2001). In this case, our tree topology is consistent with the possibility that the presence of the three VGLUT forms characterized in osteichthyans may be related to the whole genome duplication events known to have occurred in the vertebrate lineage, prior to the gnathostome radiation. The precise timing of these genetic events relative to the splitting between cyclostomes and gnathostomes remains an open question (Kuraku et al., 2009), which makes difficult further hypotheses on the dynamic of evolution of the VGLUT family in cyclostomes. Synteny arguments, requiring a higher quality lamprey genome assembly, together with

additional VGLUT characterizations in hagfish or chondrichthyans, may be necessary to resolve this issue.

Comparative analysis of the early expression patterns

In situ hybridization of lamprey embryos and prolarvae with IVGluT probes reveals that this gene is only expressed in structures from both the central and peripheral nervous systems. This is consistent with the neuronal expression of VGLUTs reported in other vertebrates. Our results indicate that the onset of expression of IVGluT in the various putatively glutamatergic neuronal populations in lamprey is not isochronal but occurs along a defined temporal sequence. The first structure to express IVGluT was the olfactory epithelium of late embryos, and shortly after it was expressed in most of the neuronal populations that generate the early axonal scaffold. Later, IVGluT expression was also observed in neuronal populations of the rhombencephalon and spinal cord and in ganglia of the branchiomeric, octaval and posterior lateral line nerves. In the rhombencephalon, IVGluT expression appears to be spatially restricted in dorsal and ventral longitudinal domains. Interestingly, the intensity of the VGluT signal appeared clearly lower in the newly IVGluT-expressing cell populations than in the earliest ones, suggesting a correlation between signal intensity and the maturation stage of glutamatergic neurons.

In the lamprey (this study) as in fishes (Higashijima et al., 2004) and amphibians (Gleason et al., 2003), the earliest VGluT expression is detected during embryogenesis. Comparison of our results in lamprey with observations of development of VGluT expression in the frog reveals conserved expression sites between agnathans and gnathostomes, which likely correspond to ancestral vertebrate characteristics. Thus, in *Xenopus* embryos, VVGluT is expressed in the olfactory epithelium, in several cranial nerve ganglia and in the forebrain, the pineal organ and spinal cord (Gleason et al., 2003), which is reminiscent of the pattern observed in prolarval lampreys. However, the specific brain regions expressing VGluT1 were not further characterized in *Xenopus*, making more accurate comparisons difficult. For instance, in early lamprey prolarvae the patterns of VGluT expression in the rhombencephalon exhibited a columnar organization not reported in *Xenopus*, with two longitudinal bands of expression (alar and basal) and two rostrocaudal domains (isthmic/trigeminal, and caudal). A similar columnar longitudinal pattern of VGluT (VGluT 2.1 & 2.2) expression was reported in the spinal cord and rhombencephalon of embryonic and larval zebrafish (Higashijima et

al., 2004), while expression of the forebrain and peripheral nervous system has not been reported in this species. The presence of a longitudinal pattern of organization is a characteristic shared by the developing rhombencephalic populations of GABAergic (urodeles: Naujoks-Manteuffel et al., 1994; mouse: Katarova et al., 2000; sea lamprey: Meléndez-Ferro et al., 2003; zebrafish: Higashijima et al., 2004) and glycinergic neurons (zebrafish: Higashijima et al., 2004; sea lamprey: Villar-Cerviño et al., 2009), which appears to be due to the basic dorsoventral positional instructions acting during the differentiation of early neuronal populations. The organization of early glutamatergic neuronal populations has not been studied in detail in the brain of mammals, precluding comparison with lamprey, zebrafish and *Xenopus*, although there are some studies of changes in expression of VGluTs during rodent development. In rat and mouse, VGluT2 is expressed at high levels shortly after birth but declines with age in multiple regions, while VGluT1 expression increases gradually after birth and eventually predominates in telencephalic regions (Boulland et al., 2004; Nakamura et al., 2005). Early expression of VGluT2 was also reported in the rat pineal gland, but its expression is down-regulated after birth while that of VGLUT1 increases (Yoshida et al., 2008). In contrast, an up-regulation of VGluT2 expression was observed in five days old zebrafish spinal cord (Higashijima et al., 2004).

Functional considerations

The role of glutamate at early neural developmental stages is not clear. Expression of VGluT transcripts in sea lamprey brain begins at about the same time as the first appearance of cells containing detectable GABA (Meléndez-Ferro et al., 2002, 2003), glycine (Villar-Cerviño et al., 2009) and serotonin (Abalo et al., 2007), and precedes that of dopamine (Abalo et al., 2005). The early onset of expression of this glutamatergic marker is in agreement with the idea that glutamate may play a neural-specific role during development (reviews in Cameron et al., 1998; Nguyen et al., 2001). In addition, our results show that most of the brain populations that originate the early scaffold of axonal tracts (Barreiro-Iglesias et al., 2008a) also contain neurons that early express lVGluT; therefore glutamate could play a role linking early-maturing neuronal systems to the development of late-maturing neuronal populations. Furthermore, as for the development of other neurochemically characterized systems, the expression of vesicular glutamate transporter appears temporally coordinated with the beginning of functional differentiation of locomotor systems (indicated by the

accumulation of neurotransmitter in vesicles and transmitter release). In line with this idea, the increase in VGLUT2-positive spinal neurons and descending interneurons has been related to the development of swimming movements in zebrafish. Similarly, in lamprey, swimming movements are first observed in the late pigmentation period (Piavis, 1971), which roughly corresponds to the stage 26 prolarvae investigated here. Interestingly, glutamate is the major excitatory neurotransmitter involved in spinal rhythm generation and descending activation of the spinal cord network for locomotion in lampreys (reviews in Brodin et al., 1988; Grillner, 2003; Dubuc et al., 2008; Grillner et al., 2008).

Conclusions

This study provides the first identification of a vesicular glutamate transporter in lamprey, and the first characterization of the early glutamatergic system during development. The lamprey gene characterized here is very similar to, but shows no stronger relationship to anyone of the three gnathostome VGluT forms than the others, indicating that whatever the accurate chronology of the duplications that generated them, the VGluT1, VGluT2 and VGluT3 forms have been fixed after the splitting between agnathans and gnathostomes. The probes of this glutamate transporter will provide useful tools for more specific characterization of glutamatergic neurons in larvae and adults of lampreys, which until now was solely dependent of antibodies raised against glutamate conjugates. Although the comparative analysis of the VGluT expression patterns in the brain of the few vertebrates investigated to date suggests an overall strong conservation, analysis of a broader representative sample of vertebrates will be necessary to better understand the evolution of the glutamatergic system development in the taxon.

Acknowledgments

This work was financially supported by Spanish Ministry of Science and Technology (Grant number: BFU2007-61056/BFI), Région Centre, CNRS, Université d'Orléans and Université Paris 6 to SM, a predoctoral fellowship from Xunta de Galicia to V.V.-C and a Région Centre doctoral fellowship to C. R. We thank MM Feydieu and Durand for providing adults of *P. marinus* and the Genoscope staff for taking in charge EST sequencing.

References

- Abalo, X.M., Villar-Cheda, B., Anadón, R., Rodicio, M.C., 2005. Development of the dopamine-immunoreactive system in the central nervous system of the sea lamprey. *Brain Res. Bull.* 66, 560-564.
- Abalo, X.M., Villar-Cheda, B., Meléndez-Ferro, M., Pérez-Costas, E., Anadón, R., Rodicio, M.C., 2007. Development of the serotonergic system in the central nervous system of the sea lamprey. *J. Chem. Neuroanat.* 34, 29-46.
- Barreiro-Iglesias, A., Villar-Cheda, B., Abalo, X.M., Anadón, R., Rodicio, M.C., 2008a. The early scaffold of axon tracts in the brain of a primitive vertebrate, the sea lamprey. *Brain Res. Bull.* 75, 42-52.
- Barreiro-Iglesias, A., Gómez-López, M.P., Anadón, R., Rodicio, M.C., 2008b. Early development of the cranial nerves in a primitive vertebrate, the sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Open Zool. J.* 1, 37-43.
- Boulland, J.L., Qureshi, T., Seal, R.P., Rafiki, A., Gundersen, V., Bergersen, L.H., Fremeau, R.T. Jr., Edwards, R.H., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F.A., 2004. Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J. Comp. Neurol.* 480, 264-280.
- Brodin, L., Grillner, S., Dubuc, R., Ohta, Y., Kasicki, S., Hökfelt, T., 1988. Reticulospinal neurons in lamprey: transmitters, synaptic interactions and their role during locomotion. *Arch. Ital. Biol.* 126, 317-345.
- Cameron, H.A., Hazel, T.G., McKay, R.D., 1998. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J. Neurobiol.* 36, 287-306.
- Dubuc, R., Brocard, F., Antri, M., Fénelon, K., Gariépy, J.F., Smetana, R., Ménard, A., Le Ray, D., Viana Di Prisco, G., Pearlstein, E., Sirota, M.G., Derjean, D., St-Pierre, M., Zielinski, B., Auclair, F., Veilleux, D., 2008. Initiation of locomotion in lampreys. *Brain Res. Rev.* 57, 172-182.
- Fremeau, R.T. Jr., Troyer, M.D., Pahner, I., Nygaard, G.O., Tran, C.H., Reimer, R.J., Bellocchio, E.E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., Edwards, R.H., 2001. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31, 247-260.

- Freneau, R.T. Jr., Voglmaier, S., Seal, R.P., Edwards, R.H., 2004a. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.* 27, 98-103.
- Freneau, R.T. Jr., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A., Edwards, R.H., 2004b. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* 304, 1815-1819.
- Germot, A., Lecointre, G., Plouhinec, J.L., Le Mentec, C., Girardot, F., Mazan, S., 2001. Structural evolution of Otx genes in craniates. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1668-1678.
- Gleason, K.K., Dondeti, V.R., Hsia, H.L., Cochran, E.R., Gumulak-Smith, J., Saha, M.S., 2003. The vesicular glutamate transporter 1 (xVGLut1) is expressed in discrete regions of the developing *Xenopus laevis* nervous system. *Gene Expr. Patterns* 3, 503-507.
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G.C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., El Mestikawy, S., 2002. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J. Neurosci.* 22, 5442-5451.
- Grillner, S., 2003. The motor infrastructure: from ion channels to neuronal network. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 573-586.
- Grillner, S., Wallén, P., Saitoh, K., Kozlov, A., Robertson, B., 2008. Neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates-an overview. *Brain Res. Rev.* 57, 2-12.
- Hardisty, M.W., Potter, I.C., 1971. The general biology of adult lampreys. In: Hardisty, M.W., Potter, I.C. (Eds.), *The biology of lampreys*, Vol. 1. Academic Press, London, pp. 127–206.
- Herzog, E., Bellenchi, G.C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B., El Mestikawy, S., 2001. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J. Neurosci.* 21, RC181.
- Higashijima, S., Mandel, G., Fetcho, J.R., 2004. Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and GABAergic neurons in embryonic and larval zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 480, 1-18.

- Kaneko, T., Fujiyama, F., 2002. Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci. Res.* 42, 243-250.
- Katarova, Z., Sekerková, G., Prodan, S., Mugnaini, E., Szabó, G., 2000. Domain restricted expression of two glutamic acid decarboxylase genes in midgestation mouse embryos. *J. Comp. Neurol.* 424, 607-627.
- Kuraku, S., Meyer, A., Kuratani, S., 2009. Timing of genome duplications relative to the origin of the vertebrates: did cyclostomes diverge before or after? *Mol. Biol. Evol.* 26, 47-59.
- LaMantia, A.S., 1995. The usual suspects: GABA and glutamate may regulate proliferation in the neocortex. *Neuron* 15, 1223-1225.
- Li, J.L., Xiong, K.H., Dong, Y.L., Fujiyama, F., Kaneko, T., Mizuno, N., 2003. Vesicular glutamate transporters, VGluT1 and VGluT2, in the trigeminal ganglion neurons of the rat, with special reference to coexpression. *J Comp Neurol.* 463, 212-220.
- McDonald, J.W., Johnston, M.V., 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15, 41-70.
- Meléndez-Ferro, M., Pérez-Costas, E., Villar-Cheda, B., Abalo, X.M., Rodríguez-Muñoz, R., Rodicio, M.C., Anadón, R., 2002. Ontogeny of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neuronal populations in the forebrain and midbrain of the sea lamprey. *J. Comp. Neurol.* 446, 360-376.
- Meléndez-Ferro, M., Pérez-Costas, E., Villar-Cheda, B., Rodríguez-Muñoz, R., Anadón, R., Rodicio, M.C., 2003. Ontogeny of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the rhombencephalon and spinal cord of the sea lamprey. *J. Comp. Neurol.* 464, 17-35.
- Miyazaki, T., Fukaya, M., Shimizu, H., Watanabe, M., 2003. Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2563-2572.
- Nakamura, K., Hioki, H., Fujiyama, F., Kaneko, T., 2005. Postnatal changes of vesicular glutamate transporter (VGluT)1 and VGluT2 immunoreactivities and their colocalization in the mouse forebrain. *J. Comp. Neurol.* 492, 263-288.
- Naujoks-Manteuffel, C., Himstedt, W., Gläsener-Cipollone, G., 1994. Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the brain of adult and developing salamanders (*Pleurodeles waltli*, *Triturus alpestris*). *Cell Tissue Res.* 276, 485-501.

- Nguyen, L., Rigo, J.M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P., Moonen, G., 2001. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.* 305, 187-202.
- Obholzer, N., Wolfson, S., Trapani, J.G., Mo, W., Nechiporuk, A., Busch-Nentwich, E., Seiler, C., Sidi, S., Söllner, C., Duncan, R.N., Boehland, A., Nicolson, T., 2008. Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells. *J. Neurosci.* 28, 2110-2118.
- Oliveira, A.L., Hydling, F., Olsson, E., Shi, T., Edwards, R.H., Fujiyama, F., Kaneko, T., Hökfelt, T., Cullheim, S., Meister, B., 2003. Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Synapse.* 50, 117-129.
- Osório, J., Rétaux, S., 2008. The lamprey in evolutionary studies. *Dev. Genes Evol.* 218, 221-235.
- Piavis, G.W., 1971. Embryology. In: Hardisty, M.W., Potter, I.C. (Eds.), *The biology of lampreys*, Vol. 1. Academic Press, London, pp. 361-400.
- Schäfer, M.K., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E., Erickson, J.D., 2002. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 50734-50748.
- Shifman, M.I., Jin, L.-Q., Selzer, M.E., 2007, Regeneration in the lamprey spinal cord. In: Becker, C.G., Becker, T., (Eds.) *Model organisms in spinal cord regeneration*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 229-262.
- Tahara, Y., 1988. Normal stages of development in the lamprey, *Lampetra reissneri* (Dybowski). *Zool. Sci.* 5, 109-118.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Villar-Cheda, B., Pérez-Costas, E., Meléndez-Ferro, M., Abalo, X.M., Rodríguez-Muñoz, R., Anadón, R., Rodicio, M.C., 2006. Cell proliferation in the forebrain and midbrain of the sea lamprey. *J. Comp. Neurol.* 494, 986-1006.
- Villar-Cerviño, V., Barreiro-Iglesias, A., Anadón, R., Rodicio, M.C., 2009. Development of glycine immunoreactivity in the brain of the sea lamprey: comparison with gamma-aminobutyric acid immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 512, 747-767.

Yoshida, S., Ina, A., Konno, J., Wu, T., Shutoh, F., Nogami, H., Hisano, S., 2008. The ontogenic expressions of multiple vesicular glutamate transporters during postnatal development of rat pineal gland. *Neuroscience* 152, 407-416.

Tables

Table 1: Percentage of homology between the deduced amino acid sequence of the VGLUT of lamprey and the sequences of different VGLUTs of *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis* and *Danio rerio*.

Figure legends:

Figure 1: General strategy of lamprey VGLUT characterization.

A: General structure of the vertebrate VGLUT gene. The coding sequence is shown shaded, with the twelve transmembrane domains in black. B: location of the 5' and 3' probes used in this study (thick black lines). The 3' probe (483 bp) is contained within the coding region while the 5' one (584 bp) spans the 5' UTR. C: Sequencing strategy. The lamprey VGLUT sequence was first characterized from ESTs obtained in a high throughput approach (clone numbers indicated: NY0AAA-51YH17, -9YN16, -9YE21, -26YG22, -37YF09, -29YB03; extent of each EST shown as a red box). These reads were automatically assembled in a single contig (CL_1001, dark red rectangle in the upper line in C). The coding sequence was completed for clone NY0AAA-29YB03 to cover the whole coding region (additional sequence shown in light red). D: Contigs retrieved from the pre-Ensembl version of *Petromyzon marinus* whole genome sequence.

Figure 2: Alignment of the lamprey VGLUT deduced amino acid sequence with osteichthyan VGLUTs representative sequences: VGLUT1 from human (h, accession number: NP_064705.1), mouse (m, accession number: NP_892038.2), *Xenopus* (x, accession number: NP_001083104.1) and zebrafish (z, accession number: ENSDART00000104481); VGLUT2: human (accession number: NP_065079.1), mouse (accession number: NP_543129.3), *Xenopus* (accession number: NP_001085081.1) and zebrafish (accession numbers: NP_001122293.1 , NP_001009982.1); VGLUT3: human (accession number: NP_065079.1), mouse (accession number: NP_543129.3), *Xenopus* (accession number: NP_001085081.1) and zebrafish (accession numbers: NP_001122293.1 NP_001009982.1); and VGLUT: *Caenorhabditis* (ca, accession number: AF095787.1), *Ciona* (ci, accession number: NM_001128885.1), *Drosophila*

(d, accession number: NM_134837.2) and *Lymnaea* (ly, accession number: AB469850.1). The transmembrane domains are shown shaded in grey.

Fig. 3: Phylogenetic tree of the VGLUT amino acid sequences. Bootstrap values are indicated as percentages at the nodes. The tree indicates robust support (bootstrap value 1,000/1,000) for grouping lamprey VGLUT independently of gnathostome VGLUT 1, VGLUT 2, and VGLUT 3 paralogous groups. Accession numbers and code names are as in Fig. 2.

Figure 4: Analysis of the spatio-temporal expression pattern of the lamprey VGLUT throughout early development using whole-mount in situ hybridization. The stages are indicated in the top right corner of figures. A-E: Lateral views of sea lamprey embryos (A-B) and prolarvae (C-E) showing VGLUT expression, with anterior to the right. F: Dorsal view of the brain of a prolarvae with anterior to the bottom. Abbreviations: cRho ap: caudal rhombencephalic alar plate; dIs: dorsal isthmus; gEX1: first epibranchial vagal ganglion; gEX2: second epibranchial vagal ganglion; gIX: glossopharyngeal nerve ganglion; gPLLN: posterior lateral line nerve ganglion; gV1: deep ophthalmic (V1) trigeminal ganglion; gV2: maxillomandibular (V2) trigeminal ganglion; gVII, facial nerve ganglion; nMLF: nucleus of the medial longitudinal fascicle; nSOT: nucleus of the supraoptic tract; nTPOC: nucleus of the tract of the postoptic commissure; OB/PP: olfactory bulb/pallium primordium; OE: olfactory epithelium; P: pineal organ; Sc: spinal cord. Scale bars = 250 μ m.

Figure 5: Schematic drawing of a lateral view of the brain and rostral spinal cord of two lamprey prolarvae with anterior to the right, showing the pattern of VGLUT expression (A,B). The stage is indicated in the top right corner. The broken lines indicate the levels of sections of Figures C-L. C-L: Transversal sections through the brain (C-K) and rostral spinal cord (L) of lamprey prolarvae showing the pattern of VGLUT expression. The stage is indicated in the top left corner. Abbreviations: nHP: Hypothalamic nucleus; nTPC: nucleus of the tract of the posterior commissure; cRho bp: caudal rhombencephalic basal plate. Other abbreviations are as in Figure 4. Scale bars = 20 μ m.

Supplementary Figure 6:

Lampetra fluviatilis VGLUT cDNA sequence and deduced amino acid sequence: the coding sequence is boxed, with initiation and stop codons in black. The twelve transmembrane domains are shown shaded in light blue.

Table 1

	VGluT1	VGluT2	VGluT3
Homo sapiens	78% NP_064705.1	74% NP_065079.1	71% NP_647480.1
Mus musculus	78% NP_892038.2	74% NP_543129.3	75% NP_892004.1
Xenopus laevis	72% NP_001083104.1	72% NP_001085081.1	
Danio rerio	71% ENSDART00000104481	VGluT2.1 75% NP_001122293.1	70% NP_001076304.1
		VGluT2.2 75% NP_001009982.1	

Figure 1

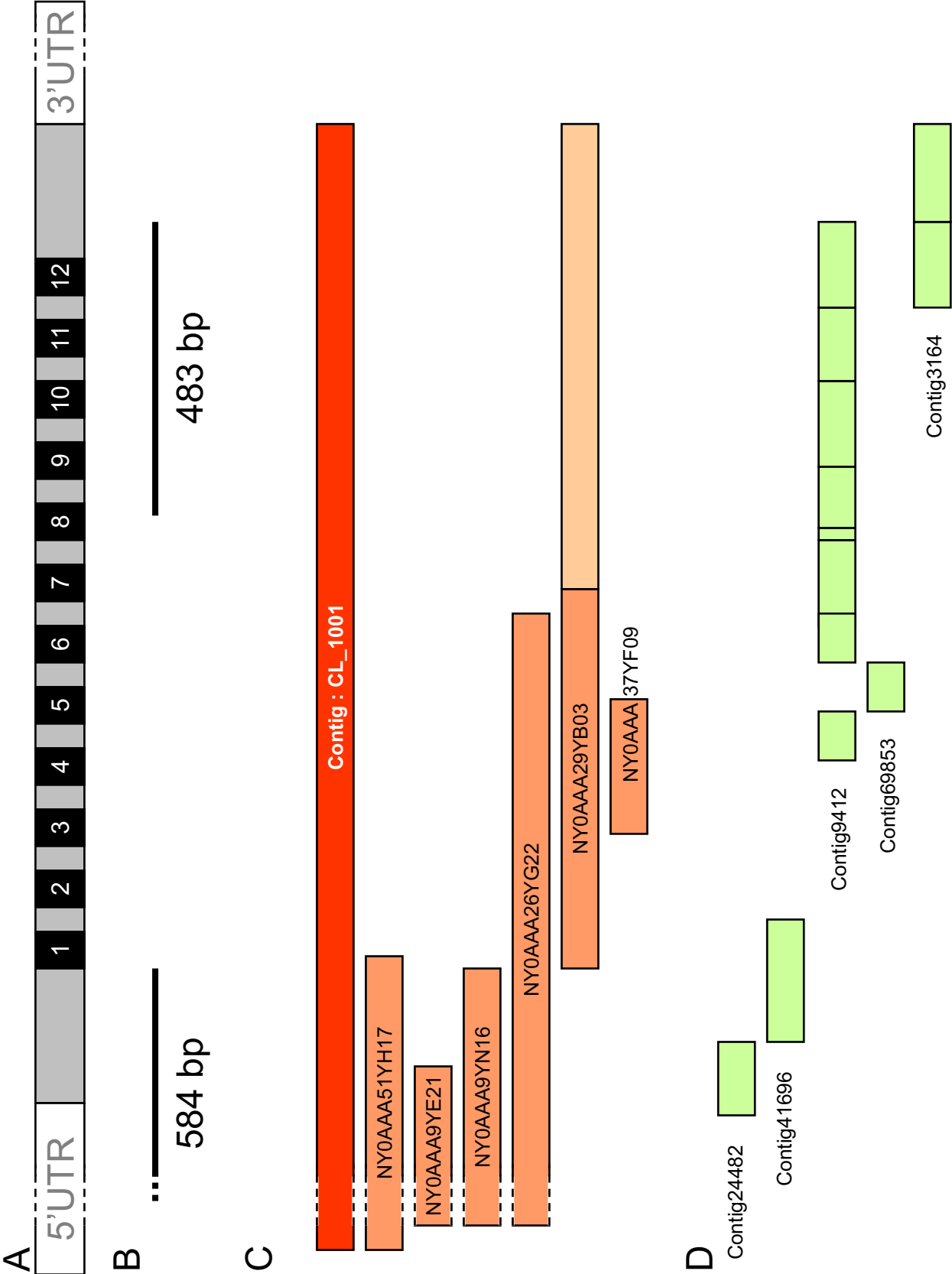


Figure 2

		10	20	30	40	50	60	70
1VGLUT	-----M	EAFKERVFPV	GKEKLKEAAG	KSLRL-LHRR	MS-----KQ	E--GE-IELT	EDGRPVQVK-	
zVGLUT1		-----MEI	RPDRFKAQAG	KTLGK-IHRL	LE-----KR	QQNGETIELS	AEGRPPELVE-	
xVGLUT1		-----MEF	RKDEFKKLAG	NTLGR-LHRI	LE-----KR	QTNGETIELT	EEGQPVVKE-	
mVGLUT1		-----MEF	RQEERFKLAG	RALGR-LHRL	LE-----KR	QEGAETLELS	ADGRPVTTH-	
hVGLUT1		-----MEF	RQEERFKLAG	RALGK-LHRI	LE-----KR	QEGAETLELS	ADGRPVTTO-	
zVGLUT2.2	-----M	DTVKERVLP	GKEKMKNLAG	KTLGH-MHRV	ME-----RK	QKTGEVIELT	EDGRPMHMP-	
zVGLUT2.1	-----M	ETPRE-PAGF	SKEGLKQLAG	KTLGH-VYRV	IE-----KR	QKPGENIELT	EDGRPAQIN-	
mVGLUT2	-----M	ESVKQRILAP	GKEGIKNFAG	KSLGQ-IYRV	LE-----KK	QDNRETIELT	EDGKPLEVVP-	
xVGLUT2		-----MEF	RQEERFKLAG	NTLGH-LHRI	LE-----KR	QKNGETIELT	EEDGRPVVKE-	
hVGLUT2	-----M	ESVKQRILAP	GKEGLKNFAG	KSLGQ-IYRV	LE-----KK	QDTGETIELT	EDGKPLEVVP-	
zVGLUT3	----MPLGGF	AGLKEKLN-P	GKEELKNNVG	DSLGN-LQKK	IDG-----SN	VTEEDNIELT	EDGRPVAAP-	
mVGLUT3	----MPFKAF	DTFEKIKLP	GKEGVKNNAV	DSLGI-LQRK	IDG-----TN	E-EEDAIELN	EEGRPVQTS-	
hVGLUT3	----MPFKAF	DTFEKIKLP	GKEGVKNNAV	DSLGI-LQRK	IDG-----TT	E-EEDNIELN	EEGRPVQTS-	
ciVGLUT	-----MSN	NKADVGFATA	SHDLLRTIQN	GFRSV-LYRF	TGIGNPPYQE	QTLDRNSTLN	EISRNSQEHG	
caVGLUT		-----MVGE	PLAKMTAAAA	SATGAAPPQQ	MQ-----TG	-----EENG	ENPNQMHSN-	
dVGLUT	MKGLTAFKEK	ATGVFGGLPK	NMEKFELSQS	YHGHHGGYEE	MEGGDREGRG	PGGGHAYDDD	EDRDPSPAS-	
LyVGLUT	----MPFGAF	TNLKDRVLP	SKDAAQKLA	KSIHL-VTRQ	TDEKSLVKYD	ELDEAYTEAD	ELPTKSEKSF	
		80	90	100	110	120	130	140
1VGLUT	---PPKEPL	CE-----CR	CFGMPK----	-----R	YVIAVMISGLG	FCISFGIRCN	LGVAVVDMVN	
zVGLUT1	---EKELPI	VD-----CT	CFGLPR----	-----R	YIIAISLSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVSMVN	
xVGLUT1	---EKRQPV	VD-----CT	CFGLPR----	-----R	YIIAIMSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVSMVN	
mVGLUT1	---TRDPPV	VD-----CT	CFGLPR----	-----R	YIIAIMSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVSMVN	
hVGLUT1	---TRDPPV	VD-----CT	CFGLPR----	-----R	YIIAIMSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVSMVN	
zVGLUT2.2	---EKKAPL	VD-----CT	CFGLPR----	-----R	YIIAIMSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVDMVN	
zVGLUT2.1	---ERKAPL	CD-----CT	CFGLPR----	-----R	YIIAIMSGLG	FCISFGIRCN	LGVAI-----	
mVGLUT2	---EKKAPL	CD-----CT	CFGLPR----	-----R	YIIAIMSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVDMVN	
xVGLUT2	---EKHQPV	VD-----CT	CFGLPR----	-----R	YIIAIMSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVSMVN	
hVGLUT2	---ERKAPL	CD-----CT	CFGLPR----	-----R	YIIAIMSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVDMVN	
zVGLUT3	---KRSPPL	LD-----CG	CFGLPK----	-----R	YIIAIMLSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVEMVN	
mVGLUT3	---RAHRPV	CD-----CS	CCGIPKRYIC	DCSCCGIPKR	YIIAVMSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVEMVN	
hVGLUT3	---RPSPLL	CD-----CH	CCGLPK----	-----R	YIIAIMSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVEMVN	
ciVGLUT	EDHFEEDVPQ	TNNKMMWYAM	CLWLPK----	-----R	YIMAFLSGFG	FCITFGMRNC	LGVAMVEMAN	
caVGLUT	---DD-KVLQV	ME-----QT	WIWKCR----	-----KR	YLMLAILANMG	FMIISFGIRCN	FGAAKTHMYK	
dVGLUT	-FEEIERPPL	RKIDKYCKAE	CPCMPA----	-----R	YTIATMACVG	FMIAFGMRCN	MSAAKLKGHE	
LyVGLUT	IPS-KSYIPK	SCP-----CL	RCNVAK----	-----R	YQIALLSSVG	FLLSFGIRCN	MGVAVLDMTK	
		150	160	170	180	190	200	210
1VGLUT	NSSYHSGDK-	LI-----MQK	AEFNWDSGTV	GMIHGSFFWG	YIVTQIPGGF	ISNKFAANRV	FGLAIVLTST	
zVGLUT1	DHTVYSGKK-	PV-----IVA	AQFTWDPETV	GMIHGSFFWG	YIVTQIPGGF	ICQKFAANRV	FGFAIVATST	
xVGLUT1	NNTVYGGIS-	LL-----SSK	RSSSWDPETV	GMIHGSFLWG	YIVTQIPGGF	ICQKFAANRV	FGFAIVATST	
mVGLUT1	NSTTHRGGH-	VV-----VQK	AQFNWDPETV	GLIHGSFFWG	YIVTQIPGGF	ICQKFAANRV	FGFAIVATST	
hVGLUT1	NSTTHRGGH-	VV-----VQK	AQFSWDPETV	GLIHGSFFWG	YIVTQIPGGF	ICQKFAANRV	FGFAIVATST	
zVGLUT2.2	NSTIHKGSKI	II-----KEK	AKFNWDPETV	GMIHGSFFWG	YIVTQIPGGY	ISSRLAANRV	FGAAILLTST	
zVGLUT2.1		-----K	AKFNWDPETV	GLIHGSFFWG	YIVTQIPGGY	ISSRLAANRV	FGAAILLTST	
mVGLUT2	NSTIHRGGK-	VI-----KEK	AKFNWDPETV	GMIHGSFFWG	YIITQIPGGY	IASRLAANRV	FGAAILLTST	
zVGLUT2	NNTVYKGNK-	LV-----IEQ	AQFNWDPETV	GMIHGSFFWG	YIVTQIPGGY	ICQKFAANRV	FGFAIVATST	
hVGLUT2	NSTIHRGGK-	VI-----KEK	AKFNWDPETV	GMIHGSFFWG	YIITQIPGGY	IASRLAANRV	FGAAILLTST	
zVGLUT3	NNTVYINGT-	AV-----MQP	AQFNWDPETV	GLIHGSFFWG	YIVTQIPGGF	ISNKLAANRV	FGAAIFLTST	
mVGLUT3	NSTVYVDGK-	PE-----IQT	AQFNWDPETV	GLIHGSFFWG	YIVTQIPGGF	ISNKFAASRV	FGAAIFLTST	
hVGLUT3	NSTVYVDGK-	PE-----IQT	AQFNWDPETV	GLIHGSFFWG	YIMTQIPGGF	ISNKFAANRV	FGAAIFLTST	
ciVGLUT	NYTETLENGT	KV-----IMP	PDLWSWSEKQ	GFIHGSFFWG	YIITQVPGGY	IASRLRANRV	FGVAILCTCL	
caVGLUT	NYTDPYGVK-	-----HM	HEFNWTIDEL	SVMESSYFYG	YLVTTQIPAGF	LAAKFPFNKL	FGFGIGVGAF	
dVGLUT	NGTVF----	-----	---MNVTVDEL	SHVDSFFWG	YLVTTQIPGGF	IASKFPAKNI	FGLSIVSSAT	
LyVGLUT	NSTRDLGDGD	VISLNDSIQE	PEFNWTPETV	GVVDSFFWG	YIVTQIPGGY	IASRISATRL	FGMAIGISAC	

							
	220	230	240	250	260	270	280
1VGLUT	LNMFPTAAR	VHYG-LVIFV	RILQGLVEGV	TYPACHGIWA	KWAPPLERSR	LATTAFCGSY	AGAVVAMPLA
zVGLUT1	LNMLIPSAAR	VHYG-CVIMV	RVCQGLVEGV	SYPACHGIWA	KWAPPLERSR	LATTAFCGSY	AGAVVAMPLA
xVGLUT1	LNMLIPSAAR	VHFT-CVIFV	RILQGLVEGV	TYPACHGIWS	KWAPPLERRE	LATTAFCGSY	AGAVVAMPLA
mVGLUT1	LNMLIPSAAR	VHYG-CVIFV	RILQGLVEGV	TYPACHGIWS	KWAPPLERSR	LATTAFCGSY	AGAVVAMPLA
hVGLUT1	LNMLIPSAAR	VHYG-CVIFV	RILQGLVEGV	TYPACHGIWS	KWAPPLERSR	LATTAFCGSY	AGAVVAMPLA
zVGLUT2.2	LNMFIPSAAR	VHYG-CVMFV	RILQGLVEGV	TYPACHGIWS	KWAPPLERSR	LATTSFCGSY	AGAVVAMPLA
zVGLUT2.1	LNMFIPSAAR	GHYG-CVIFV	RILQGLVEGV	TYPACHGIWS	KWAPPLERSR	LATTSFCGSY	AGAVIAMPLA
mVGLUT2	LNMLIPSAAR	VHYG-CVIFV	RILQGLVEGV	TYPACHGIWS	KWAPPLERSR	LATTSFCGSY	AGAVIAMPLA
xVGLUT2	LNMLIPSAAR	VHFA-CVICV	RILQGLVEGV	TYPACHGIWS	KWAPPLERSR	LATTAFCGSY	AGAVVAMPLA
hVGLUT2	LNMLIPSAAR	VHYG-CVIFV	RILQGLVEGV	TYPACHGIWS	KWAPPLERSR	LATTSFCGSY	AGAVIAMPLA
zVGLUT3	LNMFIPSAAR	VHYG-CVMFV	RILQGLVEGV	TYPACHGMWS	KWAPPLERSR	LATTSFCGSY	AGAVIAMPLA
mVGLUT3	LNMFIPSAAR	VHYG-CVMGV	RILQGLVEGV	TYPACHGMWS	KWAPPLERSR	LATTSFCGSY	AGAVVAMPLA
hVGLUT3	LNMFIPSAAR	VHYG-CVMCV	RILQGLVEGV	TYPACHGMWS	KWAPPLERSR	LATTSFCGSY	AGAVVAMPLA
ciVGLUT	LNMFIPAAAK	AHWV-VFVIV	RVMQGLAEGV	LYPSCHGIWS	KWAPPLERSR	LATISFSGSY	AGAVIGMPIG
caVGLUT	LNILLPYGFK	VKSDYLVAFI	QITQGLVQGV	CYPAMHGVWR	YWAPPMERSK	LATTAFTGSY	AGAVLGLPLS
dVGLUT	LHLFVPFAMT	LMHGHVVICV	RVLQGLFEGV	TYPACHGIWR	FWAPPMERSR	LATLAFSGSY	AGVVVGLPLS
LyVGLUT	MNLLPGAAE	VHYG-LVISV	RILQGLVEGV	TYPACHGIWR	HWAPPLERSM	LATISFCGSY	AGAVLGMPLS

							
	290	300	310	320	330	340	350
1VGLUT	GILVQYAGWS	SVFYVYGSFG	LFWYIFWLICI	AYESPAKHPT	ISDEEKTYIE	ESIGES----	-YGILGSTQK
zVGLUT1	GVLVQYTGWS	SVFYVYGSVG	IFWYLFWILV	SYESPAAHPT	ITPEERKYIE	DAIGES----	-AGLVNPLQK
xVGLUT1	GVLVQYSGWS	SVFYVYGSFG	LMWYMFWMWL	SYESPAEHPS	ISEEERKYIE	ESIGES----	-TGLMNPLTK
mVGLUT1	GVLVQYSGWS	SVFYVYGSFG	IFWYLFWLLV	SYESPALHPS	ISEEERKYIE	DAIGES----	-AKLMNPVTK
hVGLUT1	GVLVQYSGWS	SVFYVYGSFG	IFWYLFWLLV	SYESPALHPS	ISEEERKYIE	DAIGES----	-AKLMNPVTK
zVGLUT2.2	GILVQYSGWS	SVFYIYGSFG	IVWYMFWILV	SYESPADHPT	ITDEERTYIE	ESIGES----	-AKLLGAMEK
zVGLUT2.1	GILVQYTGWS	SVFYVYGCFC	IFWYMFWILV	SYESPAEHPT	ITAEERCYIE	ESIGES----	-AKLLGSPAD-
mVGLUT2	GILVQYTGWS	SVFYVYGSFG	MVWYMFWLLV	SYESPAKHPT	ITDEERRYIE	ESIGES----	-ANLLGAMEK
hVGLUT2	GVLVQYSGWS	SVFYVYGSFG	ITWYMFWILV	SYESPAQHPT	ISEEERKYIE	ESIGES----	-TGFMNPMK
hVGLUT2	GILVQYTGWS	SVFYVYGSFG	MVWYMFWLLV	SYESPAKHPT	ITDEERRYIE	ESIGES----	-ANLLGAMEK
zVGLUT3	GILVQYVWGP	SVFYIYGVFG	IIWYIFWILL	AYNSPAVHPT	ISEEERNYIE	TSIGEG----	-ANLMSSTEK
mVGLUT3	GVLVQYIGWA	SVFYIYGMFG	IIWYMFWLLQ	AYECPAAHPT	ISNAERTYIE	TSIGEG----	-ANLAS-LSK
hVGLUT3	GVLVQYIGWS	SVFYIYGMFG	IIWYMFWLLQ	AYECPAAHPT	ISNEEKTYIE	TSIGEG----	-ANVVS-LSK
ciVGLUT	GMLVEYAGWP	SVFYVFGSCG	IAWFFLWFTT	SYDSPASHPH	IRRSEIRYIE	ESIGKSDCAT	IPMVRTLFTNT
caVGLUT	AFVLSYVSWA	APFYLYGVCG	VIWAILWFVC	TFEKPAFHPT	ISQEEKIFIE	DAIGHVS----	----NTHPTI
dVGLUT	GLLADAVGYQ	APFYAYGVFG	IIWYMFWIWL	CFENPRKHPA	ISIPELKYIE	KSLGES----	--AHPTMPSL
LyVGLUT	GILTRYLGWQ	SGFYVFGVLG	AIWSVAWWFL	SYDRPSNHPT	ISEEERVYIE	TSIGET----	---TMNTSKN

							
	360	370	380	390	400	410	420
1VGLUT	FKTPWKNFFT	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFEISKV	GIISALPHLV	MTIVVPIGGQ
zVGLUT1	FKTPWRHFFT	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFEISKV	GMVSALPHLV	MTIIVPIGGQ
xVGLUT1	FKAPWRKFFT	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFEISKV	GLISALPHLV	MTIIVPIGGQ
mVGLUT1	FNTPWRRFFT	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFEISKV	GLVSALPHLV	MTIIVPIGGQ
hVGLUT1	FSTPWRRFFT	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFEISKV	GLVSALPHLV	MTIIVPIGGQ
zVGLUT2.2	YKTPWRKFFT	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFEISKV	GMVSALPHLV	MTIIVPIGGQ
zVGLUT2.1	-----	-----	-----	-----	-----V	GMLSALPHLV	MTIIVPIGGQ
mVGLUT2	FKTPWRKFFT	SMPVYAIIVA	NF-----	-----	-----	-----	-----
xVGLUT2	FKAPWRKFFT	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFAISKV	GLLSALPHLV	MTIIVPIGGQ
hVGLUT2	FKTPWRKFFT	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFEISKV	GMLSAPVHLV	MTIIVPIGGQ
zVGLUT3	FKTPWREFFT	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFPISKV	GILSAVPHMV	MTIIVPIGGQ
mVGLUT3	FNTPWRRFFT	SLPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFAISKV	GLLSAVPHMV	MTIVVPIGGQ
hVGLUT3	FSTPWKRFFT	SLPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFAISKV	GLLSAVPHMV	MTIVVPIGGQ
ciVGLUT	LGTWPKKFLT	SLPVWAIIVA	NFCRSWTFYL	LIISQPAYFE	QVLKYDISQL	GFLAAVPHLV	MTIIVPFGGV
caVGLUT	RSIPWKAIVT	SKPVWAIIVA	NFARSWTFYL	LLQNQLTYMK	EALGMKIADS	GLLAAIPHVL	MGCVVLMGGQ
dVGLUT	KTTPWREMMR	SMPVYAIIVA	NFCRSWNFYL	LVLQSSFLK	HKFGFKVEEA	GFVGSPLHLI	MTTIVPFGGM
LyVGLUT	ISTPWVAFFT	SMPVWAIMVA	NFCRSWTFYL	LIISQPAYFE	EVFGFKIDES	GTLALPHLV	MAIIVPIGGQ

							
	430	440	450	460	470	480	490
1VGLUT	LADFFRSKKI	MSTTTVRKMM	NCGGFGMEAT	LLLTVGFSHG	KGIAITFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
zVGLUT1	LADYLRTHNL	MTTNNVRKLM	NCGGFGMEAT	LLLTVGFSHT	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
xVGLUT1	IADFLRTKRI	MSTTNVRKMM	NCGGFGMEAT	LLLTVGYSHS	RGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
mVGLUT1	IADFLRSRHI	MSTTNVRKLM	NCGGFGMEAT	LLLTVGYSHS	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
hVGLUT1	IADFLRSRRI	MSTTNVRKLM	NCGGFGMEAT	LLLTVGYSHS	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
zVGLUT2.2	LADYLRSKNI	LTTTTVRKIM	NCGGFGMEAT	LLLTVGFSHS	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
zVGLUT2.1	LADHLRSKNI	LSTTTVRKIM	NCGGFGMEAT	LLLTVGYSHS	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
mVGLUT2	-----	-----	-----	--LVVGYSH	RGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
xVGLUT2	IADFLRTKRI	MSTTNVRKMM	NCGGFGMEAT	LLLTVGYSHS	RGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
hVGLUT2	IADFLRSKQI	LSTTTVRKIM	NCGGFGMEAT	LLLTVGYSH	RGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
zVGLUT3	LADFLRSRKI	LSTTTVRKIM	NCGGFGMEAT	LLLTVGFSHT	RAVAISFLIL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
mVGLUT3	LADYLRSRKI	LTTTAVRKIM	NCGGFGMEAT	LLLTVGFSHT	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
hVGLUT3	LADYLRSRQI	LTTTAVRKIM	NCGGFGMEAT	LLLTVGFSHT	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
ciVGLUT	LADFLRKKEI	LSTTNVRKVM	NCGGFGMEAL	FLLILACSHG	HTASVVCLVF	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA
caVGLUT	LADYLRSKNI	LSTTAVRKIF	NCGGFGGEEA	FMLIVAYTTS	DTAIMALIA	AVGMSGFAIS	GENVNHLDIA
dVGLUT	LADHLRKNGI	LSTTNVRKLF	NCGGFGMEGL	FLLFVAHSST	ATGAMFALTC	GVAFSGFAIS	GYNVNHLDIA
LyVGLUT	IADFLR-RR	LTTTAVRKIF	NCGGFGMEAI	FLLGVSFTRD	TAPAVACLTL	AVGFSGFAIS	GENVNHLDIA

							
	500	510	520	530	540	550	560
1VGLUT	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPLIVGAMT	K-----GKT	REEWQNVFLI	AALVHYGGVI	FYGLFASGEK
zVGLUT1	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPLIVGAMT	K-----HKT	REEWQYVFLI	AALVHYGGVI	FYGLFASGEK
xVGLUT1	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPLIVGAMT	K-----HKT	REEWQYVFLI	ASLVHYGGVL	FYGFIFASGEK
mVGLUT1	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPIIVGAMT	K-----HKT	REEWQYVFLI	ASLVHYGGVI	FYGVFASGEK
hVGLUT1	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPIIVGAMT	K-----HKT	REEWQYVFLI	ASLVHYGGVI	FYGVFASGEK
zVGLUT2.2	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPLIVGAMT	K-----NKT	REEWQNVFLI	ASLVHYGGVI	FYGFIFASGEK
zVGLUT2.1	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPLIVGAMT	K-----HKT	REEWQYVFLI	ASLVHYGGVI	FYGFIFASGEK
mVGLUT2	PRYASILMGI	SDGVGTLSGM	VCPIIVGAMT	K-----NKS	REEWQYVFLI	AALVHYGGVI	FYALFASGEK
hVGLUT2	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPLIVGAMT	K-----HKT	REEWQYVFLI	ASLVHYGGV	FYGFIFASGEK
zVGLUT3	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPIIVGAMT	K-----NKS	REEWQYVFLI	AALVHYGGVI	FYAFIFASGEK
mVGLUT3	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPLIVGALT	K-----HKT	RLEWQHVFVI	ASMVHYTGVI	FYAFIFASGEK
hVGLUT3	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPLIVGAMT	K-----HKT	REEWQNVFLI	AALVHYSGVI	FYGVFASGEK
ciVGLUT	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPLIVGAMT	K-----HKT	REEWQNVFLI	AALVHYSGVI	FYGVFASGEK
caVGLUT	PRYASILMGL	SNGAGTSLGM	ICPLIVSYIT	R-----TKT	EEDWKVVFVI	ASCIHFSGVI	FYAFFASGER
dVGLUT	PRYASILMGL	SNGIGTLAGL	TCPFVTEAFT	A-----HS	KHGWTSVFLL	ASLIHFTGVT	FYAVYASGEL
LyVGLUT	PRYASILMGL	SNSVGTLAGM	LCPIVVQAIT	Q-----ANP	TGCWTTVFTL	AACVHLVGCT	FYGFIFASGEL
				KDARRNVEKA	KSEWQYVFLI	ASMIHFAGVI	FYGFIFASGEK

							
	570	580	590	600	610	620	630
1VGLUT	QPWADPEETS	DEKCG----F	INEDELAGD-	---DFAEGEA	DTALGDGGVA	GAGGGGLAGA	SGGKSYGATA
zVGLUT1	QPWADAENTS	EEKCG----I	LGEDELA---	-----NETE	ELYRTGGQYG	-----	-AINNPHVGG
xVGLUT1	QPWAEPEETS	EEKCG----F	IHEDELA---	-----DESE	EQTQAFGGYG	-----	-SYGATQTTS
mVGLUT1	QPWAEQEEMS	EEKCG----F	VGHQDLA---	-----GSDE	SEMEDEAEP-	-----	--PGAPPAPP
hVGLUT1	QPWAEPEEMS	EEKCG----F	VGHQDLA---	-----GSDD	SEMEDEAEP-	-----	--PGAPPAPP
zVGLUT2.2	QPWADPEETS	DEKCG----F	IDEDELA---	-----EETG	DITLSHAPFG	----AQGALG	APAKTYGATT
zVGLUT2.1	QPWADPELTS	DEKCG----F	IDEDELA---	-----EETG	DITQSYG--	-----ALG	APAKSYGATT
mVGLUT2	QPWADPEETS	EEKCG----F	IHEDELD---	-----EETG	DITQNYIN--	-----Y	GTTKSYGATS
xVGLUT2	QPWAEPEETS	DEKCG----F	IHEDELA---	-----DESE	EQTQAHGGYG	-----	-SYGATQTTS
hVGLUT2	QPWADPEETS	EEKCG----F	IHEDELD---	-----EETG	DITQNYIN--	-----Y	GTTKSYGATT
zVGLUT3	QDWADPENTS	DEKCG----I	IGEDELA---	-----DETE	PSSDSGLATR	-----	-QKT-YG-TT
mVGLUT3	QDWADPENLS	EDKCG----I	IDQDELA---	-----EETE	LNHETFVSPR	-----	-KKMSYGATT
hVGLUT3	QEWADPENLS	EEKCG----I	IDQDELA---	-----EETE	LNHESFASPK	-----	-KKMSYGATS
ciVGLUT	QPWADP---P	QEEVG----I	LDGENFAASP	SMTSFRRRSG	MSRGSSSSDS	MFEGEPDDL	Y
caVGLUT	QEWAEPEEEE	EWSNKE---L	VNKTGINGTG	-----YGAA	ETTFTQLPAG	-----	-VDSSYQAQA
dVGLUT	QPWAEPPAEE	QKVWAPPPGA	ITNTDPSQAG	MLGDYMKETS	FGAPEYTEQS	-----QMQQ	STAIISYGATG
LyVGLUT	QPWADPPGED	NWRPEH---T	LRPNDES---	-----WKFS	NHKQPPLPGG	-----	-RQHQLRRHR

								
	640	650	660	670	680	690	700	
lVGLUT	QSKG-----	SWPNGYQSKD	APGQGGDREN	--YVYADPGE	RDSS-----	-----	-----	
zVGLUT1	PNGGGAGAGA	GWVSDWDKTE	EYVQPVGTNS	YLYGGEGERE	LT-----	-----	-----	
xVGLUT1	QQNG-----	GWPAEWEKKE	EFIQDQGKDP	YLYGTVAERD	LS-----	-----	-----	
mVGLUT1	PSYG-----	-----ATH	STVQPPRPPP	-----PVRD	Y-----	-----	-----	
hVGLUT1	PSYG-----	-----ATH	STFQPPRPPP	-----PVRD	Y-----	-----	-----	
zVGLUT2.2	QLNG-----	GWAKGWEKTE	EFIQEDAER-	----TYTGDG	YS-----	-----	-----	
zVGLUT2.1	QLNG-----	GWAEGWDKRE	EYVQDGVVEG	G-YGYRQGGN	YS-----	-----	-----	
mVGLUT2	QENG-----	GWPNGWEKKE	EFVQEGAQDA	--YTYKDRDD	YS-----	-----	-----	
xVGLUT2	QQNG-----	GWATDWEKKD	EFIQDQGKDP	YLYGTVAERD	LS-----	-----	-----	
hVGLUT2	QANG-----	GWPSGWEKKE	EFVQGEVQDS	--HSYKDRVD	YS-----	-----	-----	
zVGLUT3	DNSS-----	GRKQGWKKKR	GVTMQAEDDH	ESNHYENGEY	QTQYQ-----	-----	-----	
mVGLUT3	QNCE-----	VQKTEWRQQR	ESAFDGEE-P	LSYQAEG-DF	SETS-----	-----	-----	
hVGLUT3	QNCE-----	VQKKEWKQQR	GATLDEEE-L	TSYQNEERNF	STIS-----	-----	-----	
ciVGLUT	PSFEGGPRSK	RFSTAGEEED	QQMTEAQMKR	TMYVTSKLTS	DGPPYDVVTE	TVQQPAVDEL	FQGVREDEKY	
caVGLUT	APAP-----	-----GTN	PFASAWDEHG	SSGVVENPHY	QQW-----	-----	-----	
dVGLUT	HVANNPFAMA	SGAPPIAEED	APPTYGDVTN	PGQYGYTQGQ	MPSYDPQGYQ	QQ-----	-----	
LyVGLUT	QRLR-RLRPH	PVQSGVRDEI	NLCPEARQGE	VLQRRERQGL	LRGPTKLAR-	-----	-----	

...

lVGLUT	---
zVGLUT1	---
xVGLUT1	---
mVGLUT1	---
hVGLUT1	---
zVGLUT2.2	---
zVGLUT2.1	---
mVGLUT2	---
xVGLUT2	---
hVGLUT2	---
zVGLUT3	---
mVGLUT3	---
hVGLUT3	---
ciVGLUT	YKH
caVGLUT	---
dVGLUT	---
LyVGLUT	---

Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

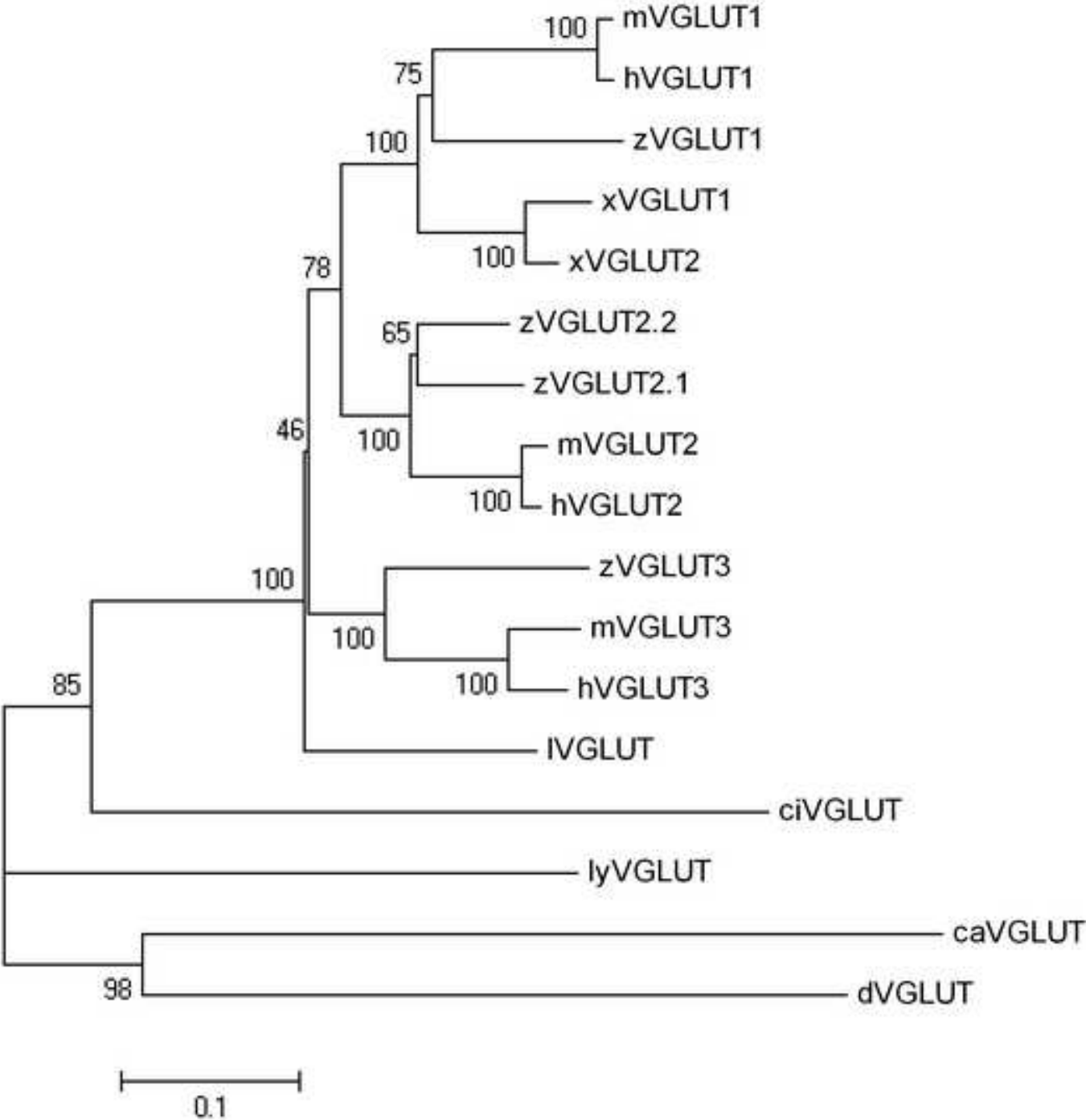


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

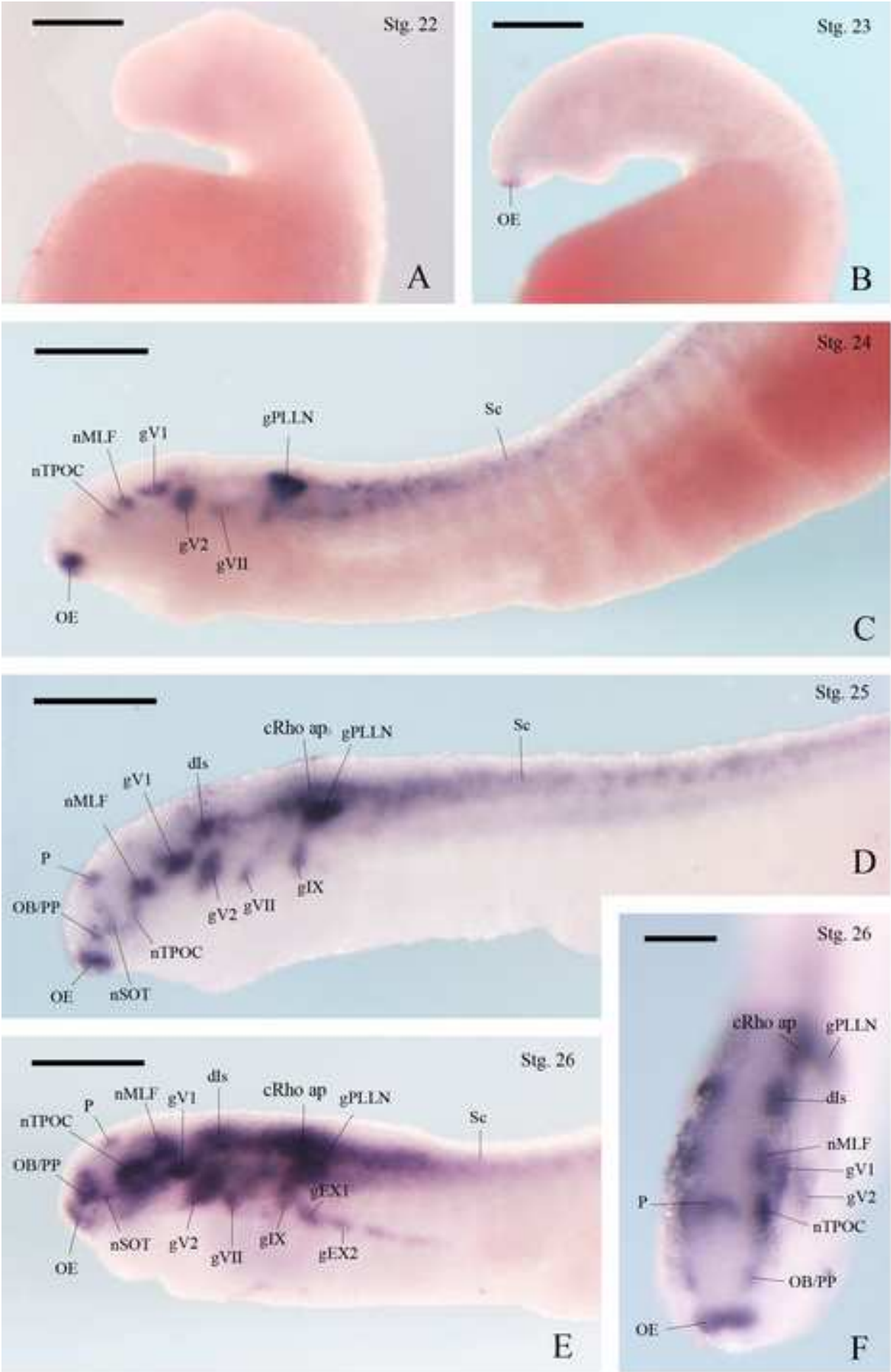
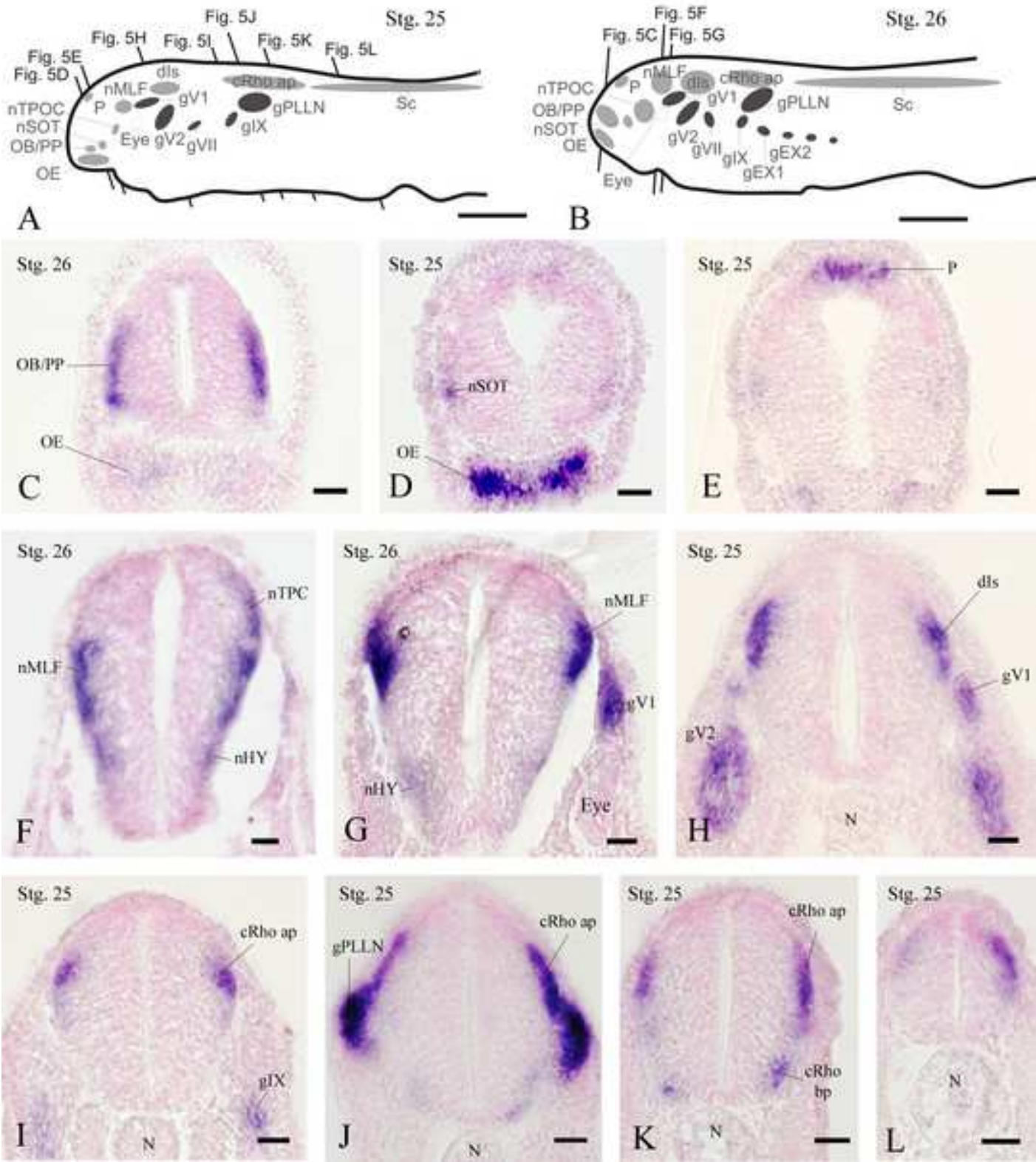


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)



Supplementary figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

1 TCGACCCACGCGTTCGCGTGAATTTAGAGACGAGCTCAGGCGAGTGCCTATGCGCAATGCGCGAGTCTTTAGACTCAAGTG 80

81 GGGAACCCCTGGCTTTTCGCTTTAAAGACAACACACACACATAGCAGAAAAAGCGGCGAGTGACTCTATCTCTTTTGT 160

161 TTAATTTTTTTTTGTAAAGGAAAGAGTAGACTTTTGTGGTGGTTCCTCCCCCGACCCCTCCATTAATTACTGCGCTGC 240

241 CAAATCCATTCGAGGAATGTCCACCGACATTAAGACGCGAGAGCAATTTAGGGTGAATACCCCCACGCGCACAGAC 320

321 ACCCATACCGGTGGAACGGTTGCACCTTCGCATTGAGACGAGCTTCCTGGGGTGGCGGCTGGGGTGTGTGTCA 400

401 TTTCTGCGGACGGAATAGACGGACAGACATAGAGAGGGAGAGAGAGTAATTGAGATTAATGCGGCTACAAGTTTGGG 480

481 ACGATCTGTGTCACTGCGAGACAATGTTCGGCTCTTTTGTAGGGTTGCGCGAGCTCTTGGTGAATGAATCATCC 560

561 TCCAAAGCTTCGAGCGGGTTCTCGAGCTAGCGCGGCACTCCATCGACGATGCAAGGTTCAAGGAGCGCTGTTGTT 640

641 P G K E K L K E A A G K E L R L L H R R M S K Q E G
TCCCGCAAGGAGAGCTCAAGGAAGCGCGGGGAAATGCTTCCTCTCCACAGCGGATGTCGAAGCAGAGGGTG 720

721 E I E L T E D G R P V Q V K P P K E P L C E C R C F G
AGATCGAAGTGAACGAGGATGGCGGCGCTGCAAGTGAAGCTCCCAAGGAGCGCTCTGCGAGTGGCGCTGTTTCGGA 800

801 M P K R Y V V I A V N S G L G F C I E F G I H C N L G V
ATGCCCAAGGTTAAGTCATCGCGCTGATGAGCGGCGTGGGCTCTGCATCTCTTTGGATCGGTGCAACTTGGGCT 880

881 A V V D H V N N S S Y H E G D K L I M O K A E F N M
GGCGCTGTGGACATGTCACCAACAGCTCGTACCCTCGGGAGATAGCTCATCATCGAAGAAAGGAAATGAACTGGG 960

961 D S G T V G M I N G S F F M G Y I V T Q I F G G F I S
ACTCTGGGACTGTGGGATGATOCACGGATGCTTCTCTGGGCTACATCGTCACACAAATCCACAGGAGTTTCATCTCC 1040

1041 N K F A A N R V F O L A I V L T E T L N H F I P T A A
AACAATTCGCTGCCAATGAGTATTTGGCTTGGCATGCTCTAAGCTCCACACTGAACATGTCATCGGACAGCGGT 1120

1121 R V H Y G L V I F V R I L O G L V E G V T Y P A C H
GGGGTGGACTATGGCTCGTTATCTCTGCGTGAZCTTGCAGGGACTGTTGAGGGGGTCAAGTACCGGCTTGGCAGG 1200

1201 G I M A K M A P P L E R S R L A T T A F C G S Y A G A
GAATCTGGGCAAGTGGGCGCGCGCTTAGAAAGCACTGAGTGGCACACGGGCTTCTGTGTTCTATGCGAGAGCC 1280

1281 V V A M P L A G I L V Q Y A G M S S V F Y V Y G S F G
GTGGTGGCAATGCCCTTGGCGGGATATTGTCAGTATGCAGGATGTCCTCAGTGTTTTATGTGACGGATGTTTGG 1360

1361 L F M Y I F M L C I A Y E S P A K H P T I S D E E K
CCTTTCTGTCATATTTCTGGTTGTGCACTTGCCTACGAGAGCGCGGCAACATCCACCATCTCGGACGAGAGAAGA 1440

1441 T Y I S E S I G E S Y G I L G S T G K F K T P M K N F
CCTACATCGAGGAGCATCGCGGAATCATACGGGATTTGGGATCGACGCAAAATTCAGACTCCTCGAGAAATTC 1520

1521 F T S M P V Y A I I V A N F C R S M T F Y L L L I S Q
TTCACTTCATGGCGTCTAGCGCATCATGTCGCAACTCTGCGGAGCTGGAATCTCACTGCTTCTCATCTGCA 1600

1601 P A Y F K E V F G F E I S K V G I I S A L P H L V M
GGCGGCTACTTCGAGGAGGTGTTTGGCTTGAGATCAGCAAGTGGCATCATCTGGCTCTTCTCATCTGTCATGA 1680

1681 T I V V P I G G O L A D F F R E K K I M S T T T V N K
CGATGTCGTGCCATCGGAGGACAACTGGCGACTTCTCCGAGCAAGAGATCATGTCCACACCACTGGTGGGAG 1760

1761 M M N S G G G F G M E A T L L L V G F S H G K G I A I
ATGAGAAATGCGAGGCTTCGGCGGAAGCACTCTGCTGCTGTGGTGGCTTCTCGGAGCGGAGGCACTCCGAT 1840

1841 T F L V L A V G F S G F A I S G F H V N H L D I A P
CACTGCTCTGCTCTCGCGCTGGCTTCAAGGCTTCAAGCTCAACCTCAACCTTGGACATGGCGCTC 1920

1921 R Y A S T I L N G I S N G V T L S G M V C D I I V G A
GCTATGCAATATTCTCATGGCATCTCCAAAGGCGTGGGAGCCTGTGCGGAATGGTGTGCTCTCATCGTGGGCG 2000

2001 N T K G K K T H E K M O N V F L I A L V H Y G G V I F
ATGACAAAGGCAAGCTCGGAGGAGTGGCAGAACGCTTCTCATCGCGGCTGGTGCATACGGGCGGTCATCT 2080

2081 Y G L F A S G E K Q D P A D F E E T S D E K C G F I
CTACGGCTTGTTCGCTTCCGCGAGAAAGCAGCGCTGGGCGAACCOCGAGGAGACGAGGAGACGAGAAATCGGCTCATCA 2160

2161 N E D E L G G D D F A E G E A T A L G D G G V A G A
ACGAGGACGAGCTGGCGGGGACTACTTGGGAGGGGAGGCGAGACGGCGCTGGGCGAGGTTGGGTCGGCGGCTG 2240

2241 G G G G L A G A S G G K S Y G A T A Q S K G S E P N G
GGCGGGCGGCTTGGCGGGGCTGGCGGGGAGTGTACGGGCGAGGGGCGAAAGCAAGGAGGAGCTGGCGCAACG 2320

2321 Y Q S K D A P G G G G D R E N Y V Y A D F G E R D S
CTATCAGAGGAAGATGGCGGGGCAAGGGGAGACAGGGAAGTACGTGACCGGATCTCGGCGAGAGGAGCTCT 2400

2401 S *
CGTGAAGGCTGGCGCTCTTACATTTCTGCTGCTGCTATTCGCGTGGCGCTGGCTCGCGACCGCGCGCGCGA 2480

2481 CCG 2483

La spermatogenèse est un processus complexe qui permet, à partir de cellules souches, d'obtenir des cellules reproductrices matures. Ce processus implique des étapes de prolifération par divisions cellulaires (méiotiques, mitotiques et renouvellement des cellules souches) et de différenciation. La balance entre ces trois mécanismes est particulièrement importante et est donc finement régulée. L'étude de ce processus chez la petite roussette *Scyliorhinus canicula* présente deux avantages majeurs. En effet, la position phylogénétique de cette espèce, en tant que groupe frère des osteichthyens, offre la possibilité de caractériser les mécanismes ancestraux des gnathostomes. De plus, le testicule de la roussette possède une organisation particulière : il est polarisé et le développement des cellules est synchrone. Ceci permet donc d'avoir, sur un même tissu, des cellules à tous les stades de la spermatogenèse.

Quatre zones ont ainsi pu être mises en évidence : la zone A dans laquelle se trouvent les cellules germinatives et les cellules issues des proliférations mitotiques, la zone B correspondent aux cellules aux stades méiotiques (spermatocytes primaires et secondaires), la zone C où les spermatides entre en phase d'élongation et la zone D, correspondant aux dernières étapes, où la spermatation est complète. A chacune de ces zones est associée un ensemble de protéines, impliquées dans les différentes étapes de la spermatogenèse. L'identification, par comparaison avec les organismes modèles, et la localisation de ces protéines au sein du testicule de roussette permet alors d'établir des bases moléculaires, aidant à la compréhension de ce système.

Ma participation dans ce projet a été, dans un premier temps, de rechercher des motifs protéiques dans les banques de données de roussette. En second lieu, j'ai pu transmettre mon expérience dans les techniques d'hybridation *in situ* sur lame, afin de déterminer l'expression de ces nombreuses sondes dans les tissus de roussette.

Ce travail a permis, au final, la caractérisation de différents éléments moléculaires impliqués dans le processus de spermatogenèse chez la roussette *Scyliorhinus canicula*. A l'échelle des gnathostomes, ce projet s'intègre dans la compréhension de l'évolution de ce processus au cours de l'évolution.

Stage-specific genes expression during dogfish *Scyliorhinus canicula* spermatogenesis.

Emma Redon^a, Adrien Bosseboeuf^a, Claire Rocancourt^b, Corinne Da Silva^c, Patrick Wincker^c, Sylvie Mazan^b, Pascal Sourdain^{a*}

^a *UMR M100 Ifremer, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, IFR 146 ICORE, Université de Caen Basse-Normandie, 14032 Caen, France*

^b *Développement et Evolution des Vertébrés, UMR6218 Immunologie et Embryologie Moléculaires, CNRS and Université d'Orléans, 45071 Orléans, France*

^c *Genoscope (CEA), CNRS UMR8030 and Université d'Evry, 91057 Evry, France*

Footnote:

* Corresponding author: Tel: +33 2 31 56 56 87

Fax: +33 2 31 56 53 46

pascal.sourdain@unicaen.fr

ABSTRACT

In dogfish, the cystic arrangement and the polarization of testis allow the observation of all the stages of spermatogenesis on a transverse section. Using suppressive subtractive libraries construction, real-time PCR and *in situ* hybridization, 32 cDNA were characterized as differentially expressed during spermatogenesis. Among them, putative homologues of genes previously identified in testis of other vertebrates were found expressed in pre-meiotic and/or meiotic zones (such as ribosomal protein S8, high-mobility group box 3, ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3, 20beta-hydroxysteroid dehydrogenase or cyclophilin B) and in post-meiotic zone (such as speriolin, Soggy, zinc finger protein 474, calreticulin or phospholipase c-zeta). Testis-specific expressions patterns for novel candidate genes, such as A-kinase anchor protein 5, ring finger protein 152 or F-box only protein 7 were also reported. Finally, cDNA displaying similarity with hypothetical proteins or no sequence similarity were also evidenced. This study provides a first molecular characterization of spermatogenesis in a chondrichthyan to gain insight into the evolution of spermatogenesis in gnathostomes.

Keywords:

Spermatogenesis

Testis

Sertoli cells

Spermatid

Dogfish

1. Introduction

Spermatogenesis is a complex processes in which spermatogonial stem cells undergo differentiation and mitotic proliferation to form primary spermatocytes and following two meiotic divisions, secondary spermatocytes and round spermatids. These spermatids
 5 subsequently enter spermiogenesis and undergo radical changes to give mature spermatozoa. Spermatogenesis involves at least three levels of regulation corresponding to cell intrinsic genetic programs, interactions between germ and somatic cells, as well as extrinsic influences by peptides and steroids hormones (Eddy, 2002). The integration of these different control levels relies on complex genetic interactions and regulatory networks, which remain largely unknown.
 10 Deciphering these programs is crucial to understand the genetic bases of men infertility, and to establish conditions allowing the expansion of germ cells in culture.

Analyses of the genetic control of spermatogenesis have been conducted in various model organisms, including vertebrates such as the mouse (Schultz et al., 2003; Shima et al., 2004; Xiao et al., 2008), rat (Schlecht et al., 2004), zebrafish (Sreenivasan et al., 2008) or rainbow trout
 15 (Mazurais et al., 2005) and invertebrates, particularly *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. These studies have shown that the continuity of spermatogenesis is ensured by the balance between self-renewal, differentiation and proliferation of spermatogonial stem cells (Spradling et al., 2001; Dadoune, 2007; Oatley and Brinster, 2008). This balance appears tightly linked to the micro-environment of the germ stem cell, referred to as the niche, a
 20 notion first defined in *Drosophila* taking advantage not only of the powerful genetic tools available in this model, but also of the testis polarization observed in this species (Yamashita et al., 2005). Different molecular markers have also be defined in germ stem cells (Ebata et al., 2008) such as *Gfra* (He et al., 2007), *Oct3/4* (Pan et al., 2002) or *Plzf* (Buaas et al., 2004).

However, our knowledge of the regulation of the initiation of spermatogenesis is far from
25 exhaustive and many actors in differentiation and proliferation remain unknown. Similarly, the
last phase of spermatogenesis i.e. spermiogenesis has been widely described at morphological
and cellular levels. The molecular mechanism driving chromatin compaction through the
replacement of histones by protamines has also been extensively documented (Dadoune, 2003;
Tanaka and Baba, 2005; Balhorn, 2007) and analyses mainly conducted in the mouse have led to
30 the identification of a number of genes specifically expressed at post-meiotic stages (Schultz et
al., 2003; Tanaka and Baba, 2005). However, many genes involved in these later steps of
spermatogenesis probably also remain to be identified, as it was estimated that 4 % of the mouse
genome might be involved in this process (Schultz et al., 2003).

Suppressive subtractive hybridization technique is a powerful tool to identify new genes
35 involved in specific mechanisms, tissues or cell types, through the comparison of two cDNA
populations and isolation of genes specifically expressed in each of them. Contrary to microarray
techniques, this approach does not require prior extensive cDNA sequence characterization, a
major advantage when dealing with non-traditional model organisms. This approach has also
been shown to allow the identification of rare cDNAs (Diatchenko et al., 1996).

40 The dogfish *Scyliorhinus canicula* belongs to the class of chondrichthyans, which occupy a
key phylogenetic position in jawed vertebrates as the sister group of osteichthyans. This outgroup
position makes the dogfish an excellent reference in comparisons with all traditional vertebrate
model organisms, including mammals, as previously reported at molecular (Robinson-Rechavi et
al., 2004) and mechanistic (Coolen et al., 2007) levels. Such comparisons are important to
45 identify ancestral characteristics or mechanisms and thus gain insight into the evolution of
physiological processes, such as spermatogenesis, in gnathostomes. The dogfish also presents a
testis organization that makes it a particularly relevant model for the analysis of this process. In

this species as in other elasmobranchs, the testis is polarized and spermatogenesis progresses within spermatocysts (cysts) in which germ cell development is synchronous (Stanley, 1966).

50 Cysts are composed of spermatoblasts (480-500 per cyst) in which one Sertoli cell is associated to one spermatogonium, initially, and up to 64 spermatids in post-meiotic stages. Cysts are generated in the germinative area at the ventro-lateral length of the testis and progressively move during maturation towards the opposite face where spermiation occurs. The resulting zonation of the dogfish testis thus allows the observation of all the stages of spermatogenesis on a transverse
55 section (Sourdaine and Jégou, 1989). Furthermore, spermatogenesis has been finely described in dogfish and a stage classification ranging from I to XVIII, initially proposed on morphological criteria by Stanley (1966) and later refined by Loir et al. (1995), is available. Four zones can be distinguished in the organ: i) the zone A (stages I to VI) includes cysts with spermatogonia from the germinative zone to the last mitotic proliferation step, ii) the zone B (stages VII to X)
60 corresponds to the meiotic stages in which primary and secondary spermatocytes are found, iii) the zone C (stages XI and XII) groups cysts with round spermatids and spermatids in the first steps of elongation and iv) in the zone D (stages XIII to XVIII) the last steps of spermiogenesis and the spermiation occur.

This testis zonation makes the dogfish a unique model for the molecular characterization of
65 the different stages of spermatogenesis. Here, we have taken advantage of this characteristic to identify cDNA specifically expressed in different zones of the dogfish testes using suppressive subtractive libraries construction. In a second step, the expression specificity of the candidate genes thus identified has been further assessed in different tissues by real-time PCR and during spermatogenesis by real-time PCR and *in situ* hybridization. Based on these expression patterns,
70 we discuss their possible involvement in the differentiation and proliferation of spermatogonia

and in spermiogenesis in regard of the functions of their homologues, as reported in other model organisms.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Mature male dogfish *Scyliorhinus canicula* (686 ± 131 g, 59.5 ± 3.1 cm) were captured off Cherbourg (Manche, France), using the facilities of the Lycée Maritime et Aquacole de Cherbourg and were stored in large natural seawater tanks at the Centre de Recherches en Environnement Côtier (Luc sur Mer, France). The animals were euthanized by sectioning the spinal cord and pithed (except when brain was to be collected). Testes, brain, kidneys, spleen, epididymis and pieces of liver, muscle and epigonal tissue were removed and stored in ice-cold Gautron buffer (Loir and Sourdain, 1994). Testicular sections were further dissected into zones A, B, C and D under a stereomicroscope as previously described (Loir and Sourdain, 1994). All organs and tissue zones were then snap-frozen and stored at -80°C . For *in situ* hybridization experiments, pieces of testes were directly collected in ice-cold 4% para-formaldehyde (W/V in 1X PBS).

2.2. RNA extraction and mRNA purification

For library construction, total RNA extracts were prepared from 2 g of zones A and C of testes collected from six animals, according to Chomscynski and Sacchi (1987). Poly(A) RNA were prepared from 500 μg of total RNA using Dynabeads mRNA purification kit as

95 recommended (Invitrogen, Eragny sur Oise, France). For real-time PCR, total RNA extractions were performed independently for three animals. Total RNA was extracted from 1 g of the four zones of testes as described by Chomscynski and Sacchi (1987). For the other tissues, RNA was extracted from 100 mg of tissue using TriReagent (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and purified with the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according the
100 manufacturer instructions.

2.3. *Suppressive subtractive hybridization (SSH)*

A- and C-libraries were constructed from mRNA isolated from zone A (cysts with
105 spermatogonia) and zone C (cysts with round and elongating spermatids) of dogfish testes. Suppressive subtractive hybridization (SSH) was carried out using the PCR-select cDNA subtraction kit (Clontech, Saint Germain en Laye, France) according to the manufacturer instructions. Forward subtraction (A cDNA as a tester and C cDNA as a driver) was run to isolate genes whose expression was higher in the spermatogonia zone. To disclose genes preferentially
110 expressed in spermatids, the reverse subtraction was performed. To test the ligation efficiency, primers specific for *S. canicula* elongation factor were used (supplementary Table S1) instead of the G3PDH primers provided by the manufacturer. After two rounds of PCR amplification to enrich for differentially expressed genes, forward and reverse subtracted cDNA were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega, Charbonnières, France), cloned
115 into the T/A cloning pCR II TOPO vector (Invitrogen) according to the manufacturer instructions and introduced into TOP10 *Escherichia coli* cells to constitute A-specific and C-specific libraries respectively. Colonies were grown on LB-Agar plates containing 50 µg/ml ampicillin and complemented with X-Gal and IPTG.

For each library, 96 clones were randomly picked and grown overnight at 37°C and 250 rpm on 96-well culture plates in 100 µl of LB^{Amp⁺} medium. Clones were named after their position on 96-well plates during these initial cultures. To amplify cDNA sequences, nested PCR were performed on 1 µl of each clone culture using Nested primer 1 and 2R provided by the manufacturer (Clontech) and Go Taq DNA polymerase (Promega). The following parameters were used: 1min at 95°C and 23 cycles at 95°C for 30 s, 68°C for 1 min and 71°C for 2 min. After control on agarose gels, each PCR was denaturated in 0.3N NaOH and spotted on duplicate on charged nylon membranes (GE Healthcare, Orsay, France). Dots were baked for 2 h at 80°C. Four dots were spotted with the 96 clones from A-specific library and four additional dots displayed the 96 clones from C-specific library.

Probes were prepared from native and subtracted cDNA from zones A and C. Digoxigenin labeling was performed according to the instructions of the DIG DNA labeling kit (Roche, Meylan, France) and probes were purified with Microspin G25 columns (GE Healthcare) as recommended by the manufacturer. After denaturation, 100 ng of each probe (subtracted or unsubtracted A- or C- cDNA) was hybridized on dots displaying A- or C- specific clones. Hybridization was carried out at 68°C overnight in 5 ml of the following buffer: 6X SSC, 5X Denhardt's, 10% SDS W/V, 100 µg/ml Torula RNA and 0.6 µM of Nested primer 1 and 2R to avoid non-specific hybridization. After three stringent washes at 68°C with 2X SSC-0.5% SDS and 2X SSC-0.2% SDS solutions, an immunological detection was fulfilled using an anti-DIG antibody coupled to the alkaline phosphatase according to the manufacturer protocol (DIG Nucleic acid detection kit, Roche). Membranes were then rinsed and images were captured with a transilluminator apparatus (GelDoc2000, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). A-specific clones displaying a strong signal with subtracted A cDNA probe, and possibly unsubtracted A cDNA

probe, but not with subtracted and unsubtracted C cDNA probes were selected. C-specific clones were inversely screened. Glycerol stocks of positive clones were conserved at -20°C .

The selected positive clones were sequenced using the service of Cogenics Genome Express (Meylan, France) with the universal forward and reverse primers. Data were edited with VectorNTI (Invitrogen) to resolve sequencing ambiguities and remove vector and primer sequences. After elimination of redundancy, the sequences of cDNA identified in this work were deposited in the database of Expressed Sequence Tags (dbEST, NCBI) and their accession numbers are listed in Table 1. The edited sequences were annotated by comparisons to the Genbank database (<http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>), the elephant shark genomic database (<http://blast.fugu-sg.org/>) as well as an annotated database of embryonic and juvenile cDNAs generated through systematic high-throughout sequencing (Coolen et al., 2007). All comparisons were conducted using the BlastX algorithm.

2.4. Reverse transcription (RT) and real-time PCR (qPCR)

Before reverse transcription, any genomic DNA was eliminated from total RNA by DNase I (Promega) treatment during 30 min at 37°C with $2\text{ U}/\mu\text{g}_{\text{RNA}}$. Total RNA was denatured 10 min at 70°C in the presence of random hexamers ($500\text{ ng}/\mu\text{g}_{\text{RNA}}$, Promega) then reverse transcription (RT) was carried out for 1 h at 37°C with M-MLV reverse transcriptase ($300\text{ U}/\mu\text{g}_{\text{RNA}}$, Promega), RNAsin ($50\text{ U}/\mu\text{l}$, Promega) and 500 nM dNTPs (Promega). RT was stopped by incubation at 70°C for 15 min. cDNA were prepared from $3\text{ }\mu\text{g}$ of testis RNA extracts (zones A, B, C and D) and from 4 to $6\text{ }\mu\text{g}$ of the other tissues RNA extracts.

Real-time PCR was performed on an iCycler apparatus (Biorad) in 96-well plates. qPCR experiments were performed in triplicate on serial cDNA dilutions and repeated using cDNA

from three different animals. qPCR reactions consisted of 5 μ l of diluted cDNA, 12.5 μ l of Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein mix (AB Gene, Courtaboeuf, France) or MESA Green qPCR MasterMix (Eurogentec, Angers, France) and 100 nM specific forward and reverse primers in a final volume of 25 μ l. Thermal cycling conditions were as follow: denaturation and enzyme
170 activation at 95°C for 13 min, 45 repeats of 15 s at 95°C and 45 s at 60°C. Accurate amplifications of the target amplicons were checked by performing melting curves at the end of PCR program (repeats with a 0.5°C decreasing temperature between 55 and 95°C). Efficiencies of PCR were assessed with serial dilutions of cDNA. The threshold cycle values (C_T) were determined with a baseline set manually at 160 relative fluorescence units. To adjust for variation
175 in input cDNA, results were normalized against 5S RNA using the ΔC_T method (Schefe et al., 2006). The use of this reference gene was further validated by repeating the normalization with the housekeeping gene actin, which gave similar results (data not shown). Expression variations were calculated with the $\Delta\Delta C_T$ method (Schefe et al., 2006), relative to the normalized expression in zone A for the testes expression study and relative to zone A or zones C+D for the tissue
180 expression study.

Primers for qPCR, specific to SSH clones, were designed to fulfill the following criteria: length of 20-22 bp, GC content over 50%, T_m close to 60°C and generation of a 75-150 bp amplicon. These primers, listed in supplementary Table S1, were designed using the Primer3 web interface (<http://frodo.wi.mit.edu/>) and purchased from Eurogentec.

2.5. *In situ hybridization*

Probes were synthesized from SSH clones C-A2, C-A3, C-A4, C-A6, C-A9, C-D12, C-F3, C-G9.1, and CH11. cDNA were amplified from 1 µl of overnight LB-Amp cultures of SSH clones by PCR reactions carried out in standard conditions with the universal primers M13 Fwd31 and Rev33 (supplementary Table S1) and Go Taq DNA polymerase (Promega). Amplified cDNA were purified with the Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega) following manufacturer instructions. Sense and antisense digoxigenin-labeled RNA probes were synthesized by transcription of cDNA with SP6 and T7 RNA polymerases (Promega) performed for 3 h at 37°C with 3 µl of purified PCR, 25 U of RNA polymerase, 25 U of RNasin (Promega), 1 mM of ATP, CTP, GTP, 0.35 mM of UTP and 0.65 mM of DIG-UTP (Roche). After DNase treatment for 30 min at 37°C with 2U of DNase I (Promega), probes were purified with Probequant G50 columns (GE Healthcare) as recommended. To check labeling and quantify probes, serial dilutions were prepared from 1:1 to 1:10,000 in 6X SSC-20% V/V formaldehyde 37% and spotted on positively charged nylon membranes (GE Healthcare). After baking (30 min, 120°C), anti-DIG immunodetection was conducted as described below. Spot intensities were compared to results obtained for the labeled control RNA (Roche).

Testicular sections of dogfish were fixed at 4°C in 4% paraformaldehyde (W/V in 1X PBS) for 24 h. Sections were then dehydrated in 100 % methanol and conserved for several months at -80°C. Before mounting, testis sections were rehydrated in PBS, cryoprotected for 12 h at 4°C in 30 % sucrose (W/V in 1X PBS). Testis sections were embedded in OCT compound (VWR, Fontenay sous Bois, France) and snap-frozen in isopentane pre-cooled in liquid nitrogen. Tissue blocks were stored at -80°C for several weeks. Cryosections of 12 µm were cut at -20°C and collected on Superfrost Plus slides (VWR - 2 cuts/slide) and submitted to in situ hybridization as follows.

Hybridizations with sense and antisense RNA probes were performed on two slides in parallel. Sections were rinsed in 1X PBS for 2 min, post-fixed in 4% PFA (W/V) for 15 min and rinsed thoroughly in 1X PBS (2x5 min) and 150 mM NaCl (5 min). Hybridization frames (ThermoScientific, Courtaboeuf, France) were fixed on the slides and prehybridization was performed with hybridization solution (50 % V/V deionized formamide, 2X SSC, 5 mM EDTA pH8, 0.1 % V/V Tween20, 1X Denhardt's, 0.1 mg/ml heparin, 0.1 % W/V CHAPS, 0.5 mg/ml tRNA) for 1 h at 70°C in a humid chamber. Two µl of probe was denatured 5 min at 80°C. Slides were hybridized overnight with 150 µl hybridization solution containing denatured probes at 70°C in a humid chamber. Slides were washed in 1X SSC (2x10 min, 70°C), 0.2X SSC (2x10 min, 70°C) and 2X SSC (2x20 min, 37°C). After RNase A treatment (0.2 mg/ml, Roche) for 30 min at 37°C, washes were performed in 2X SSC (10 min, RT) and 0.2X SSC (2x25 min, 55°C).

Slides were incubated 2x15 min in 1X MABT (0.1 M maleic acid, 0.3 M NaCl, 0.5% V/V Tween20) and then blocked for 3 h with blocking solution (2X Blocking reagent, Roche - 20 % V/V fetal bovine serum, Sigma - 1X MABT). Anti-DIG antibody coupled with alkaline phosphatase (Roche, 1:5,000) was added to the slides and incubated overnight at 4°C. Unbound antibodies were removed by washing 2x5 min and 5x20 min in 1X MABT. Sections were equilibrated 2x15 min in NTMT buffer (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH9.5, 50 mM MgCl₂, 0.1% V/V Tween20) and incubated with alkaline phosphatase substrate i.e. BM-purple solution (Roche), until purple staining was satisfactory (from 3 to 21 h). Slides were observed and images were acquired through Nikon Eclipse 80i microscope connected to Nikon NIS Elements D software (Nikon, Champigny-sur-Marne, France).

3. Results

3.1. *Identification of transcripts preferentially expressed in zones A (spermatogonia) and C (spermatids)*

Taking advantage of the dogfish testes organization, we used suppressive subtractive hybridization between zones A and C cDNA populations to construct two cDNA libraries, respectively enriched in transcripts selectively expressed in zone A (spermatogonia zone: A-library) and zone C (round and young elongating spermatids zone: C-library). These two libraries were plated and 96 clones were randomly picked from each of them for an initial screening. Respectively 39 and 82 % of A- and C- clones were found to contain an inserted fragment following PCR amplification of the insert. Dot-blot hybridization confirmed that 28 and 70 of these clones are preferentially expressed in zone A and C respectively. These 98 clones were sequenced and produced 81 satisfactory sequences: 15 for A-library clones and 66 for C-library clones ranging from 141 to 1030 bp. After editing and elimination of redundancy, 12 and 20 independent clones were finally identified as preferentially expressed in spermatogonia (A) and round and young elongating spermatids (C) zones respectively (Table1).

3.2. *Identification of vertebrate homologues of the differentially expressed sequences*

The 32 cDNA sequences characterized were submitted to systematic searches for sequence homology in two parallel steps. In the first one, searches were conducted *versus* Genbank with the 32 clones sequences obtained as described above as queries. In the second one, currently available databases of chondrichthyan sequences were also queried to extend the dogfish sequences or identify elephant shark homologues whenever possible. When significant hits were

obtained (>95% identity), these sequences were in turn used as queries in a second independent search *versus* Genbank. Highly coherent results were obtained by these two strategies (Table 1) excepted for A-C7 and A-D2 which shown homologies with different, but related, proteins (86% identity between laminin receptor 1 and 40S ribosomal protein Sa and 68% identity between 20beta-hydroxysteroid dehydrogenase and carbonyl reductase 1). Five sequences corresponded to previously known *S. canicula* sequences, respectively encoding three protamines (C-A3, C-B7 and C-G8), one transition protein (C-A7) and fructose-biphosphate aldolase C (C-F11). Notably, the protamine S4 cDNA was highly represented in the substracted cDNA fractions of the C library, since 35 clones out of the 96 initially picked contained this sequence. Two additional sequences were identified in other chondrichthyans databases and showed high identity level to type I procollagen alpha 1 chain of *Raja kenojei* (A-G10) and to fructose bisphosphate aldolase B of *Cephaloscyllium umbratile* (C-E1). The remaining sequences gave no significant hit in the elephant shark genome and were not previously sequenced in *S. canicula* or in another chondrichthyan. Among them, 6 (A-C4, A-C7, A-D2, A-E4, A-H2, A-H10) gave significant hits (>75% identity) and 16 (A-A2, A-B4, A-G11, A-H1, A-H3, C-A2, C-A4, C-A5, C-A6, C-B10, C-C5, C-C11, C-D11, C-D12, C-F3, C-G9) led to the detection of weaker homologies. Among these clones, C-A6 and C-C5 displayed similarity with hypothetical proteins of unknown function. No sequence similarity was found for clones C-A9, C-G12 and C-H11.

3.3. Stage specific expressions of the selected cDNAs during spermatogenesis

To validate the zone specificity suggested by SSH results and have a more detailed picture of the dynamic of gene expression throughout spermatogenesis, we measured the relative expression levels of the selected sequences in the four zones of the testis, using real-time PCR.

Primers were designed for each of the 32 SSH clones except those encoding protamines for which a single clone (C-A3 encoding protamine S4) was retained as a control. Expression was studied in three different animals and 5S RNA was used as a reference. According to the $\Delta\Delta C_t$ method, the relative expression to zone A was represented on Fig. 1. Concerning the clones retrieved from the A-library, clones A-A2, -E4, -G10, -G11 and -H1 showed higher expression levels (relative expression inferior to 1) in the spermatogonia zone (A) than in zones B, C and D (Student test, $p < 0.05$), in line with the SSH results. Clones A-C4, -D2, -H2 and -H10 did not display significant expression variation between zones A and B but expression in zones C and D was significantly lower ($p < 0.05$), revealing a larger specificity to spermatogonia and spermatocytes zones. Incongruencies to the SSH results were only observed for clones A-B4, -C7 and -H3, for which expression was higher in zones B and/or C (relative expression superior to 1). These 3 clones were not further analyzed. For all C-clones tested, expression was significantly higher ($p < 0.05$) in zone C than in zone A (relative expression superior to 1) thus confirming SSH results. Student tests performed on the expression in the four zones highlighted three distinct expression profiles for C-clones: i) the highest expression in zone C (C-A2, -A5, -A7, -B10, -C5, -C11, -E1, -F3 and -F11), ii) higher expression in zones D (C-A3 and -A9) and iii) higher expressions in zones C and D (C-A4, -A6, -D11, -D12, -G9, -G12 and -H11). Noticeably, expression variations displayed by C-clones were stronger (ratios C/A between 2.4 and 95.0) than those observed for A-clones (ratios A/C from 1.5 to 11.6).

3.4. *Tissue specificity of the selected clones*

In order to assess the tissue specificity of the selected transcripts, we then measured their level of expression in 7 tissues in addition to the testis: spleen, liver, muscle, epigonal tissue,

brain, kidney and epididymis (Fig. 2, see summary in Table 2). As above, this analysis was conducted using real-time PCR. Applying the $\Delta\Delta C_t$ formalism, results were expressed as relative expression compared to expression in testis in zones A and C for A- and C-clones respectively (Fig. 2). With the exception of A-H10 predominantly expressed in testis compared to other tissues (factor 54 to 3400), expression for A-clones was not found markedly higher in testis as relative expression varied from 5.10^{-2} to 22; the corresponding transcripts were therefore considered as ubiquitously expressed. Four main patterns of tissue expression were observed for C-clones. For eight of them, expression appeared specific to the testis as their relative transcript expression was lower than 10^{-4} in all the tissues (C-A3, -A4, -A7, -A9, -B10, -D12, -F3 and -G9). Among these clones, C-B10 displayed marked tissue specificity as its expression was not detected either in liver, muscle, kidney, brain or epididymis. For six clones, the relative expression level ranged between $7.2.10^{-2}$ and $1.5.10^{-3}$ in the seven tissues, indicating that the transcripts are predominantly expressed in testis (C-A2, -A5, -A6, -D11, -G12 and -H11). Finally, for clones C-C5, -C11 and -E1 expression appeared ubiquitous while the results were more ambiguous for clone C-F11 with a predominant expression in testis and brain.

3.5. Cell type specificity of the genes identified by SSH: *in situ* analysis

To define precisely in which stages of spermatogenesis clones were expressed and to identify if they were expressed by germ or Sertoli cells, *in situ* hybridizations on testicular sections were undertaken for 9 C-clones, shown by q-PCR as specific for zones C and/or D and specifically or predominantly expressed in testis (Fig. 3). For clones C-A2, -A3, -A4, -A6, -A9, -D12, -F3, -G9 and -H11, sense and antisense probes were synthesized from SSH clones and hybridized on transversal testicular sections showing germinative to spermiation zones.

Hybridization with sense probes did not result in specific labeling despite weak unspecific background was observed for clone C-H11 (data not shown). For the 9 clones tested, a purple labeling was easily discernable at cysts level in zones C and/or D (Fig. 3A). Signals were particularly intense for clones C-A2, -A3 and -A9 while labeling was punctual for clones C-A6 and -G9. After precise observation of labeled cysts (Fig. 3B), the range of expression could have been established for each clone. Expression could be detected between stage XIa (round spermatids, just after meiosis) and stage XVII (just before spermiation) and windows of expression are displayed for each clone on Fig. 4. Only 2 clones were expressed until the late stages of spermiogenesis (C-A4 and -F3). Two mains patterns of expression could be distinguished: clones C-A2, -A6 and -A9 were predominantly expressed in round spermatids stages (XIa, XIb or XII) while clones C-A3, -A4, -D12, -F3, -G9 and -H11 displayed a later maximum of expression in elongated spermatids stages when bundles are forming (stages XIV or XV). Finer observations permitted to precise in which cellular type the clones were expressed (Fig. 3C). Particularly, stage XIV analysis was really informative as, in this stage Sertoli cells nuclei are easily distinguishable at the basal of cysts while spermatids heads stand orthogonally. Eight clones were shown to be expressed by germ cell (C-A2, -A3, -A6, -D12, -F3, -G9 and -H11) while only clone C-A4 seemed expressed by Sertoli cells. The cellular type expressing clone C-A9 could not be ascertained: expression seemed to occur in Sertoli cells when stages XI and XII were observed but a germ labeling was noticed in stages XIV and XV.

4. Discussion

Through the construction of subtracted libraries, this study has allowed identifying genes specifically expressed in dogfish at different steps of spermatogenesis i.e. in the proliferative stage in cysts with spermatogonia or in post-meiotic stages in cysts with spermatids. This approach allowed the retrieval of genes previously known to be specifically expressed in testis, such as protamines, as well as the identification of novel candidates, showing characteristics of expression suggestive of an involvement in spermatogenesis. These results validate both the experimental approach used here, as well as the dogfish as a relevant model organism to study this process. Among the genes identified through this study, 9 turned out to be specifically transcribed during mitotic and/or meiotic stages, respectively observed in zones A and B of dogfish testis, while expression of 20 was restricted to the post-meiotic phase in the zones of round (zone C) and/or elongated (zone D) spermatid stages. In line with this result, transcriptomic analyses conducted in mice previously highlighted a more specific transcriptional response of spermatocytes and spermatids stages *versus* spermatogonia stages (Schultz et al., 2003; Shima et al., 2004). Similarly, the limited amplitude of expression variations for A-clones and the fact that 8 clones out of 9 were found ubiquitously suggests that A-clones, although preferentially expressed in the spermatogonia zone, keep a basal expression level throughout the spermatogenesis, suggestive of housekeeping functions. In contrast, C-clones which exhibit a marked increase in expression starting from round spermatid stages may be specifically involved in post-meiotic steps, particularly in spermiogenesis. This hypothesis is further supported by our analysis of tissue specificity which shows that 15 C-clones out of 20 (75%) are specifically or predominantly expressed in the testis. This high proportion of testis-specific genes in post-meiotic cDNA was previously reported in mice by several investigators (Schultz et al., 2003; Hong et al., 2005) but to a lesser extent (from 11 to 20%). The enrichment of testis-specific clones in our study might result from the SSH technique used which leads to the preferential

375 isolation of stage-specific cDNAs and counterselects genes involved in general aspects of spermatogenesis. More generally, expression profiles defined by qPCR revealed an important correlation between zones A and B on the one hand, and between zones C and D, on the other hand. Such observations were previously also reported (Schlecht et al., 2005) and taken together, these data suggest that an important expression reprogramming occurs between pre- and post-
 380 meiosis phases in the dogfish as in osteichthyans.

Five cDNAs identified in the dogfish testis as specific to germinative and spermatogonia zone were found to encode the ribosomal protein S8 (RPS8, A-E4), the adenine phosphoribosyl transferase (APRT, A-G11), a putative untranslated region of HMGB3 (A-H1), the alpha 1 chain of procollagen (COL1A1, A-G10) and a polyprotein (A-A2). Expression of *Rps8* mRNA was
 385 previously observed in mouse in spermatogonia A and in pre-meiotic stages (Chan et al., 2006) but its role during the first steps of spermatogenesis remains to be assessed. The high temporal and spatial specificity of expression observed in the dogfish supports the hypothesis of an extraribosomal function in the spermatogonia zone, as previously suggested (Wool, 1996; Naora, 1999). *APRT* expression was hardly explored before during spermatogenesis. Singer-Sam et al.
 390 (1990) highlighted a maximum of messenger expression in mouse pachytene spermatocytes while in the dogfish, expression appeared restricted to the spermatogonia zone. *APRT* is usually considered as ubiquitous but its involvement in purine salvage pathway might account for a higher expression in spermatogonia stages in which proliferative activity is intense. Clone A-H1 was identified as *HMGB3*, based on a strong similarity to the 3' untranslated region of the gene,
 395 known to be highly conserved between mouse, human and chicken (Wilke et al., 1997). The HMG box subfamily is thought to play a fundamental role in DNA replication, nucleosome assembly and transcription (Wilke et al., 1997) and requirement of HMGB2 for normal spermatogenesis and fertility was demonstrated in mouse (Ronfani et al., 2001). The high

expression of *HMGB3* mRNA in the proliferative steps of spermatogenesis (zone A) observed
 400 here is consistent with the conservation of this role in the dogfish. More precisely, a role has been
 suggested for *HMGB3* in the regulation between self-renewal and differentiation of
 hematopoietic stem cells in mouse (Nemeth et al., 2006). Whether this role of *HMGB3* in the
 regulation of dogfish testicular stem cell exists, it will have to be further addressed by the
 exploration of the germinative zone (Loppion et al., 2008). Previous studies have shown that
 405 *Col1A1* gene, encoding the $\alpha 1$ chain of procollagen I, was expressed at a higher level in
 immature mouse seminiferous tubules than in adult testes and that the protein was detected by
 immunostaining in spermatogonia A and B and preleptotene spermatocytes but not in Sertoli
 cells (He et al., 2005). These data have led to the proposal that *COL1A1* may play a major role in
 the regulation of the fixation of germ cell to the basal membrane and therefore in their
 410 differentiation (He et al., 2005). The high expression observed for the clone A-G10, a putative
 homologue of *COL1A1*, in the dogfish testicular zone A which corresponds to the stages of cysts
 genesis and of spermatogonial differentiation and proliferation, is consistent with these
 observations and hypotheses. Finally, this approach has also evidenced the pre-meiotic
 expression of the clone A-A2, similar to the *Danio rerio* polyprotein for which little information
 415 is available on expression and function. So, its involvement in the first steps of spermatogenesis
 could be further investigated.

Four additional clones displayed specificity for mitotic and meiotic zones: A-C4, -D2, -H2
 and -H10, putatively encoding ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (*UCH-L3*), 20beta-
 hydroxysteroid dehydrogenase (20 β -HSD), minichromosome maintenance complex component 6
 420 (*MCM6*) and cyclophilin B (*PPIB*) respectively. *UCHL3* displays a de-ubiquitinating activity
 ensuring the removal of ubiquitin residues from peptides or proteins addressed to the proteasome

for degradation. The expression of UCHL3 in the spermatogonia zone observed here is consistent with conservation in the dogfish of the proteasome in the differentiation of stem cells (Naujokat and Saric, 2007, Szutorisz et al., 2006). UCHL3 was also proposed to be involved in the regulation of apoptosis during spermatogenesis (Kwon et al., 2004a) and in the meiotic differentiation of spermatocytes (Kwon et al., 2004b), in agreement with the specific expression at spermatogonia (zone A) and spermatocytes (zone B) stages detected here. In the mouse, 4 UCH isoforms were identified, L1 and L3 being the prevailing forms. *Uchl1* expression is specific to reproductive and neuronal systems and is limited in testis to the spermatogonia while *Uchl3* is expressed in nearly all tissue and in spermatocytes and spermatids (Kwon et al., 2004b). In dogfish, *UCHL3* seems to encompass the pattern of expression of both mouse isoforms, which suggests that in *S. canicula*, a single isoform, possibly a remnant of the ancestral state, may fulfill the different functions of the UCHL1 and L3 in the mouse (Kwon, 2007). An exhaustive characterization of the different UCH isoforms in the dogfish will be essential to test this possibility. In fish, 20 β -HSD is a major steroidogenic enzymes involved in the synthesis of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) which is a major progestin related to the meiosis resumption of oocytes (Nagahama and Yamashita, 2008) and sperm maturation (Miura et al., 1991). In accordance, DHP concentrations were previously found the highest in isolated cysts with late spermatids in *S. canicula* (Sourdaine and Garnier, 1993). However, in our present study, 20 β -HSD cDNA was expressed in spermatogonia and spermatocytes zones what is also consistent with a 20 β -HSD activity at an early stage of spermatogenesis in rainbow trout testis (Vizziano et al., 1996) and a role of DHP in initiation of meiosis in the Japanese eel (Miura et al., 2006). MCM6 belongs to the highly conserved mini chromosome maintenance complex involved in the initiation of replication (Costa and Onesti, 2008; Maiorano et al., 2006) and MCM proteins

445 were previously used as markers for proliferative zones during zebrafish embryogenesis (Ryu and Driever, 2006). In the testis, a specific expression in spermatogonia was also described for *Mcm2* cDNA in mouse (Wu et al., 2004) and MCM7 protein was detected in spermatogonia and primary spermatocytes in adult rat (Com et al., 2006). Similarly, here, the expression of a dogfish putative *MCM6* messenger prevails in the spermatogonia zone of the testis, known as a zone of
 450 high proliferative activity. The persistence of expression observed in the spermatocytes zone confirmed that MCM6, and more generally the MCM complex, is also involved in the premeiotic DNA replication cycle as previously evidenced in yeast (Lindner et al., 2002). Finally, clone A-H10, putatively encoding cyclophilin B, was found specifically expressed in testis at pre-meiotic and meiotic stages. This is the first evidence of a tissue- and stage-specific expression for *PPIB*,
 455 since cyclophilins are generally considered as ubiquitous (Wang and Heitman, 2005). Cyclophilins are the host cell receptors for the immunosuppressive drug cyclosporine A (Bukrinsky, 2002) but a chaperone function was also suggested (Barik, 2006). More largely, cyclophilins belong to the immunophilins family for which roles in nervous system regeneration (Avramut and Achim, 2003) and in meiosis during male gametogenesis in mouse, rat and chicken
 460 (Sananes et al., 1998; Crackower et al., 2003) were proposed. The testis and stage specificity observed for the clone A-H10 suggests that *PPIB* may be similarly involved in the differentiation of spermatogonia and/or the meiosis steps.

Among the 20 clones identified as specific to spermiogenesis stages, 3 clones were found to encode protamines S4 (C-A3), Z1 (C-B7) and Z2 (C-G8) and 1 a transition (or spermatid-specific
 465 S2) protein (C-A7) previously identified in *S. canicula* (Gusse et al., 1983; Chauviere et al., 1989). Transition proteins and protamines are involved in chromatin compaction during spermiogenesis as these nucleoproteins replace in turn histones from the post-meiosis stages (Dadoune, 2003; Balhorn, 2007). Of note is the fact that these clones represented 45 % of the C-

clones tested, with a high predominance of protamine S4 as 35 clones (Table 1), a very high
 470 relative abundance consistent with their roles during spermiogenesis (Dadoune, 2003; Schultz et
 al., 2003; Shima et al., 2004; Wu et al., 2004). More precisely, ISH experiments revealed that
 protamine S4 mRNA is expressed from the round to the young elongating spermatids (stages XIb
 to XIV, Fig. 4) in agreement with dogfish germ cell chromatin compaction (Mellinger, 1965).

Five additional clones identified in this study, putatively encoding Soggy (C-A2), a
 475 spermatogenesis and centriole associated protein (C-B10), the calreticulin (CALR, C-D11), the
 zinc finger protein 474 (ZFP474, C-F3) and the phospholipase C zeta (PLCZ1, C-G9), were also
 previously described as expressed during spermatogenesis. The spermatogenesis and centriole
 associated protein, also named speriolin, was shown to be testis-specific and mainly expressed in
 spermatids in the mouse (Goto and Eddy, 2004), in agreement with our results. A role in the
 480 control of meiosis was suggested in mouse (Goto and Eddy, 2004) but the spermatid specificity
 observed in our study and the putative association to the centriole are rather suggestive of an
 involvement in the formation of the flagella. *Soggy* mRNA was previously described as testis-
 specific and restricted to the developing acrosome in mouse (Kohn et al., 2005). This is
 consistent with the specific expression of *SOGGY* messenger in zone C and at the rear of
 485 spermatid heads from stages XI to XV, the stages of acrosome formation in the dogfish (Loir et
 al., 1995). *SOGGY* was recently proposed to regulate spermatocyte apoptosis and testosterone
 production (Dakhova et al., 2009) probably through the Wnt/beta-catenin signaling pathway as
SOGGY encode a Wnt antagonist (Niehrs, 2006). PLCZ1 is a sperm-specific protein, that
 triggers calcium oscillation and egg activation in mammals (Swann et al., 2006), a tissue
 490 specificity found to be conserved by its dogfish homologue. In chicken, expression was detected
 from secondary spermatocytes to sperm (Rengaraj et al., 2008). In the dogfish, mRNA expression
 appeared limited to spermatids, especially between stages XIb and XV, although a protein

expression in late spermatogenesis stages and sperm cannot be excluded. Calreticulin fulfills many cellular functions including chaperone activity and regulation of Ca^{2+} homeostasis (Michalak et al., 1999). While calreticulin is considered ubiquitous in mammals (Michalak et al., 1999), we find here a predominant expression in testis with a significant but reduced expression in kidney, brain and epigonal tissue. In the dogfish testis, expression was found restricted to the spermatids while in the rat, mRNA was found expressed in pre- and post-meiotic spermatogenic cells (Nakamura et al., 1993) and protein was located in the developing acrosome of rat spermatids (Nakamura et al., 1992). The tissue and stage specificity of calreticulin expression in the dogfish is suggestive of a function, potentially related to spermatozoon mobility and/or egg activation. ZFP474 belongs to the super-family of zinc finger transcription factors. Its role remains unknown but in the mouse, this gene was described as specifically expressed in the testis and ovary (Zhou et al., 2005). Similarly, we find that a testis specific expression of its homologue in the dogfish. We further show for the first time that the mRNA is transcribed at germinal level during a relatively narrow time window, from stage XIb (round spermatids) to stage XVI (elongated and compacted spermatids). *Zfp474* was also shown to be expressed in mouse cilia cells (McClintock et al., 2008). Since cilia and flagella are structurally similar, ZFP474 may play a regulatory role in flagella formation or more largely mobility function, a hypothesis consistent with the predominant expression observed by ISH at stage XV, characterized by the formation of the head posterior periflagellum (Mellinger, 1965).

Two clones encoding fructose bi-phosphate aldolases B (ALDOB, C-E1) and C (ALDOC, C-F11) were also identified as specific of zone C during dogfish spermatogenesis. Expression of glycolytic enzymes transcripts was largely documented in the mouse and rat, revealing spermatogenic cell-specific isozymes (Eddy, 2002; Schultz et al., 2003; Wu et al., 2004). Recently, spermatid-specific aldolase A isozymes were identified in mouse despite the ubiquitous

expression of *Aldoa* (Vemuganti et al., 2007). In our study, we found ubiquitous expression for *Aldob* and a testis and brain specific expression for *Aldoc*, without investigating therefore the cell-specific expression or the presence of isozymes. However, the expression of aldolase transcripts in the late stages of spermatogenesis in the dogfish is consistent with their involvement in the glycolytic activity of sperm, which is required for sperm mobility and successful fertilization in rodents (Eddy, 2002).

In addition, 3 clones potentially involved in regulatory functions and never described during spermatogenesis were identified. Annotations suggest that these clones respectively encode the ring finger protein 152 (RNF152, C-A4), the F-box only protein 7 (FBXO7, C-C11) and the A-kinase anchor binding protein 5 (AKAP5, C-D12). However, the identification of clone C-D12 as an *AKAP5* encoding cDNA should be taken cautiously since it relies on a relatively low identity level over a short sequence. *AKAP5*, also named *AKAP79/150* coordinate the subcellular localization of second-messenger-regulated enzymes such as protein kinase A, protein kinase C and calcineurin-protein phosphatase 2B (Dodge and Scott, 2000; Beene and Scott, 2007; Hoshi et al., 2005). Its physiological importance is illustrated, for example, in the control of uterine contraction via PKA-mediated phospholipase C inhibition in the rat (Dodge and Scott, 2000) or in the modulation of the Ca^{2+} channel function in *Xenopus* oocytes (Plata et al., 2004). While expression of *AKAP5* was never described during spermatogenesis, the messenger identified in this study appeared testis-specific with an expression in germinal cells restricted to spermatids zone from stages XI to XVI. *AKAP4* and *AKAP110* proteins were previously identified as testis- and spermatid-specific (Vijayaraghavan et al., 1999; Schultz et al., 2003; Schlecht et al. 2004) and involved in sperm quality by regulating motility and flagellum functions (Miki et al., 2002; Hu et al., 2009). Our results suggest that *AKAP5* may be a new spermatid-specific *AKAP* involved in spermatids or in sperm quality and highlight the

conservation of key roles of AKAP in the regulation of spermatogenesis. RNF152 belongs to the large family of RING finger proteins that possess simultaneously a zinc finger domain and an ubiquitin ligase activity. RNF152 mRNA or protein expression was never described in testis before this study, which points to sertolien expression throughout spermiogenesis (stages XIa to XVII). This gene might therefore be a new actor in regulating spermiogenesis. Finally, a putative FBXO7 encoding clone was identified as expressed in the testis in round spermatids but also in other tissues. This is the first report of an expression of an F-box protein encoding gene during spermatogenesis. F-box proteins are part of the SCF (Skp1-Cul1-Fbox) complexes, a large class of E3 ubiquitin ligases involved in phosphorylation-directed proteolysis and in many different processes including cell cycle, proliferation and signal transduction (Craig and Tyers, 1999). FBXO7 was shown to interact with a human inhibitor of apoptosis cIAP1 and trigger its degradation through ubiquitination (Chang et al., 2006). This raises the possibility that FBXO7 may play a role in the control of apoptosis during spermatogenesis. The identification of *FBXO7* in spermatids zone also provides the first evidence for a specific involvement of ubiquitination mediated by SCF complexes. More generally, the identification of the two clones, C-A4 and C-C11, putatively encoding proteins linked to E3 ubiquitin ligase activity stress the importance of protein degradation by the 26S proteasome during spermiogenesis (Sutovsky, 2003) and suggests finely tuned regulatory mechanisms, involving at least two distinct classes of ubiquitin ligases.

One clone putatively encoding a sulfonylurea receptor (C-A5) was also identified. The expression level of this gene, found predominantly transcribed in testis and round spermatids, was high as 7 copies were isolated by SSH. *S. canicula*, like other Elasmobranchs, accumulates important amounts of urea in its organism (Smith, 1936), and this gene fulfill taxon-specific functions in the regulation of osmolarity during spermiogenesis.

At last, no clear annotation or function could be proposed for five transcripts (C-A6, -A9, -
565 C5, -G12 and -H11). Four of them were found specifically or predominantly expressed in testis
and their range of expression was precisely defined by qPCR and ISH experiments. Although no
function could be proposed, the tissue- and stage-specificities suggested that these genes may
play a role in spermatogenesis and more particularly in spermiogenesis. Clones C-A6, A9 and
G12 display a maximum of expression in round spermatids and might therefore be involved in
570 the first steps of differentiation while clone C-H11 predominantly expressed in stage XIV might
rather intervene in the formation of periflagellar structure. Further exploration, such as RACE-
PCR to reach full-length cDNA sequences, might be undertaken to characterize more deeply
these clones and get a greater insight in their functions during spermatogenesis.

In conclusion, this study provides the first molecular characterization of spermatogenesis in
575 a chondrichthyan with a special focus on pre-meiotic stages and spermiogenesis. Some of the
actors identified, for instance those coding for protamines, UCHL3, PLCZ1 or SOGGY
correspond to genes previously known to play key roles in spermatogenesis in other vertebrates,
which validates our SSH-based experimental strategy. In other cases, our work helps to refine the
expression pattern during spermatogenesis of genes previously known to be involved in this
580 process, such as APRT, CALR or ZFP474, thus raising novel hypotheses on their respective
roles. Finally, this analysis leads to the identification of novel candidate genes involved in
spermatogenesis. We show for the first time testis specific expressions patterns for a number of
genes, such as MCM6, AKAP5, RNF152 or FBXO7, known to play important molecular and
cellular functions in other vertebrates, but whose involvement in spermatogenesis had never been
585 previously reported. Combined analyses of their functional characterization in model organisms
and of their expression patterns in the dogfish testis, also allow us to propose novel putative roles

during spermatogenesis, which now provide accurate working hypotheses for further functional approaches.

Finally, it is noteworthy that two dogfish characteristics were definite advantages in this study. The first one is related to the polarized organization of its testis, which allows precise definition of stage-specific expression patterns of genes during spermatogenesis. The second one is related to its phylogenetic position, which, through comparisons with all traditional vertebrate model organisms, makes it possible to identify conserved mechanisms, which are likely to be ancestral in jawed vertebrates. The combination of these two characteristics and the increasing accessibility of large-scale transcriptomic tools should renew the interest of this thus far largely neglected model to gain insight into the evolution of spermatogenesis in gnathostomes.

Acknowledgements

ER is supported by a FCE-Pôle Mer Bretagne grant. The dogfish EST sequencing project was taken in charge by the Genoscope and supported by a grant from the Région Centre to SM. CR was recipient of a Région Centre PhD fellowship. The authors are grateful to Mr. Sechet and Mr. Rousseville of the Lycée Maritime et Aquacole de Cherbourg for their cooperation in collecting dogfish and to the staff, particularly Dr. Gimazane, Mr. Bucaille and Mr. Guyon, of the Centre de Recherches en Environnement Côtier (Luc sur Mer) for the care given to animals.

References

- Avramut, M., Achim, C.L., 2003. Immunophilins in nervous system degeneration and regeneration. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 1376-1382.
- Balhorn, R., 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8, 227.
- Barik, S., 2006. Immunophilins: for the love of proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2889-2900.
- 610 Beene, D.L., Scott, J.D., 2007. A-kinase anchoring proteins take shape. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 192-198.
- Buaas, F.W., Kirsh, A.L., Sharma, M., McLean, D.J., Morris, J.L., Griswold, M.D., de Rooij, D.G., Braun, R.E., 2004. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* 36, 647-652.
- 615 Bukrinsky, M.I., 2002. Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications. *Trends Immunol.* 23, 323-325.
- Chan, W.Y., Lee, T.L., Wu, S.M., Ruszczyk, L., Alba, D., Baxendale, V., Rennert, O.M., 2006. Transcriptome analyses of male germ cells with serial analysis of gene expression (SAGE). *Mol. Cell. Endocrinol.* 250, 8-19.
- 620 Chang, Y.F., Cheng, C.M., Chang, L.K., Jong, Y.J., You, C.Y., 2006. The F-box protein Fbxo7 interacts with human inhibitor of apoptosis protein cIAP1 and promotes cIAP1 ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1022-1026.
- Chauviere, M., Martinage, A., Briand, G., Sautiere, P., Chevaillier, P., 1989. Nuclear basic protein transition during sperm differentiation. Primary structure of the spermatid-specific protein S2 from the dogfish *Scylliorhinus caniculus*. *Eur. J. Biochem.* 180, 329-335.
- 625 Chomscynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Com, E., Rolland, A.D., Guerrois, M., Aubry, F., Jégou, B., Vallet-Erdtmann, V., Pineau, C., 2006. Identification, molecular cloning, and cellular distribution of the rat homolog of minichromosome maintenance protein 7 (MCM7) in the rat testis. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 866-877.
- 630 Coolen, M., Sauka-Spengler, T., Nicolle, D., Le-Mentec, C., Lallemand, Y., Da Silva, C., Plouhinec, J.L., Robert, B., Wincker, P., Shi, D.L., Mazan, S., 2007. Evolution of axis specification mechanisms in jawed vertebrates: insights from a chondrichthyan. *PLoS ONE* 2, e374.
- 635 Costa, A., Onesti, S., 2008. The MCM complex: (just) a replicative helicase? *Biochem. Soc. Trans.* 36, 136-140.
- Crackower, M.A., Kolas, N.K., Noguchi, J., Sarao, R., Kikuchi, K., Kaneko, H., Kobayashi, E., Kawai, Y., Kozieradzki, I., Landers, R., Mo, R., Hui, C.C., Nieves, E., Cohen, P.E., Osborne, L.R., Wada, T., Kunieda, T., Moens, P.B., Penninger, J.M., 2003. Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science* 300, 1291-1295.
- 640 Craig, K.L., Tyers, M., 1999. The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72, 299-328.
- 645 Dadoune, J.P., 2003. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc. Res. Tech.* 61, 56-75.

- Dadoune, J.P., 2007. New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem. Cytobiol.* 45, 141-147.
- 650 Dakhova, O., O'Day, D., Kinet, N., Yucer, N., Wiese, M., Shetty, G., Ducey, P., 2009. Dickkopf-like1 regulates postpubertal spermatocyte apoptosis and testosterone production. *Endocrinology* 150, 404-412.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D., 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6025-6030.
- 655 Dodge, K., Scott, J.D., 2000. AKAP79 and the evolution of the AKAP model. *FEBS Lett.* 476, 58-61.
- Ebata, K.T., Yeh, J.R., Zhang, X., Nagano, M.C., 2008. The application of biomarkers of spermatogonial stem cells for restoring male fertility. *Dis. Markers* 24, 267-276.
- 660 Eddy, E.M., 2002. Male germ cell gene expression. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 103-128.
- Goto, M., Eddy, E.M., 2004. Speriolin is a novel spermatogenic cell-specific centrosomal protein associated with the seventh WD motif of Cdc20. *J. Biol. Chem.* 279, 42128-42138.
- Gusse, M., Sautiere, P., Chauviere, M., Chevallier, P., 1983. Extraction, purification and characterization of the sperm protamines of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*.
- 665 Biochim. Biophys. Acta 748, 93-98.
- He, Z., Feng, L., Zhang, X., Geng, Y., Parodi, D.A., Suarez-Quian, C., Dym, M., 2005. Expression of Colla1, Colla2 and procollagen I in germ cells of immature and adult mouse testis. *Reproduction* 130, 333-341.
- He, Z., Jiang, J., Hofmann, M.C., Dym, M., 2007. Gfra1 silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. *Biol. Reprod.* 77, 723-733.
- 670 Hong, S., Choi, I., Woo, J.M., Oh, J., Kim, T., Choi, E., Kim, T.W., Jung, Y.K., Kim, D.H., Sun, C.H., Yi, G.S., Eddy, E.M., Cho, C., 2005. Identification and integrative analysis of 28 novel genes specifically expressed and developmentally regulated in murine spermatogenic cells. *J. Biol. Chem.* 280, 7685-7693.
- 675 Hoshi, N., Langeberg, L.K., Scott, J.D., 2005. Distinct enzyme combinations in AKAP signalling complexes permit functional diversity. *Nat. Cell Biol.* 7, 1066-1073.
- Hu, Y., Yu, H., Pask, A.J., O'Brien, D.A., Shaw, G., Renfree, M.B., 2009. A-kinase anchoring protein 4 has a conserved role in mammalian spermatogenesis. *Reproduction* 137, 645-653.
- 680 Kohn, M.J., Kaneko, K.J., DePamphilis, M.L., 2005. DkkL1 (Soggy), a Dickkopf family member, localizes to the acrosome during mammalian spermatogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 516-522.
- Kwon, J., 2007. The new function of two ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes as reciprocal modulators of germ cell apoptosis. *Exp. Anim.* 56, 71-77.
- 685 Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y., Wada, K., 2004a. Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testis. *Am. J. Pathol.* 165, 1367-1374.
- 690 Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sakurai, M., Sato, Y., Lee, W.W., Ishii, Y., Kyuwa, S., Noda, M., Wada, K., Yoshikawa, Y., 2004b. Developmental regulation of ubiquitin C-terminal hydrolase isozyme expression during spermatogenesis in mice. *Biol. Reprod.* 71, 515-521.

- 695 Lindner, K., Gregan, J., Montgomery, S., Kearsey, S.E., 2002. Essential role of MCM proteins in premeiotic DNA replication. *Mol. Biol. Cell.* 13, 435-444.
- Loir, M., Sourdaïne, P., 1994. Testes cell: isolation and culture. In: Mommsen, T.P., Hochachka P (eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes: analytical techniques*. Elsevier, New York, pp. 219-272.
- 700 Loir, M., Sourdaïne, P., Mendis-Handagama, S.M., Jégou, B., 1995. Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc. Res. Tech.* 32, 533-552.
- Loppion, G., Crespel, A., Martinez, A.S., Auvray, P., Sourdaïne, P., 2008. Study of the potential spermatogonial stem cell compartment in dogfish testis, *Scyliorhinus canicula* L. *Cell Tissue Res.* 332, 533-542.
- 705 Maïorano, D., Lutzmann, M., Mechali, M., 2006. MCM proteins and DNA replication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 130-136.
- Mazurais, D., Montfort, J., Delalande, C., Le Gac F., 2005. Transcriptional analysis of testis maturation using trout cDNA macroarrays. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 143-154.
- McClintock, T.S., Glasser, C.E., Bose, S.C., Bergman, D.A., 2008. Tissue expression patterns identify mouse cilia genes. *Physiol. Genomics* 32, 198-206.
- 710 Mellinger, J., 1965. Stades de la spermatogénèse chez *Scyliorhinus caniculus* (L): description, données histochimiques, variations normales et expérimentales. *Zeitschrift für Zellforschung* 67, 653-673.
- Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaeli, N., Nakamura, K., Opas, M., 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* 344, 281-292.
- 715 Miki, K., Willis, W.D., Brown, P.R., Goulding, E.H., Fulcher, K.D., Eddy, E.M., 2002. Targeted disruption of the *Akap4* gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev. Biol.* 248, 331-342.
- Miura, T., Higuchi, M., Ozaki, Y., Ohta, T., Miura, C., 2006. Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenetic cells of the eel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7333-7338.
- 720 Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Involvement of steroid hormones in gonadotropin-induced testicular maturation in male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Biochem. Res.* 12, 241-248.
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev. Growth Differ. Suppl* 1, s195-219.
- 725 Nakamura, M., Moriya, M., Baba, T., Michikawa, Y., Yamanobe, T., Arai, K., Okinaga, S., Kobayashi, T., 1993. An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into the acrosome of rat sperm. *Exp. Cell Res.* 205, 101-110.
- Nakamura, M., Michikawa, Y., Baba, T., Okinaga, S., Arai, K., 1992. Calreticulin is present in the acrosome of spermatids of rat testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 668-673.
- 730 Naora, H., 1999. Involvement of ribosomal proteins in regulating cell growth and apoptosis: translational modulation or recruitment for extraribosomal activity? *Immunol. Cell Biol.* 77, 197-205.
- Naujokat, C., Saric, T., 2007. Concise review: role and function of the ubiquitin-proteasome system in mammalian stem and progenitor cells. *Stem Cells* 25, 2408-2418.
- 735 Nemeth, M.J., Kirby, M.R., Bodine, D.M., 2006. Hmgb3 regulates the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 13783-13788.
- Niehrs, C., 2006. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25, 7469-7481.
- 740

- Oatley, J.M., Brinster, R.L., 2008. Regulation of Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal in Mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 263-286.
- Pan, G.J., Chang, Z.Y., Scholer, H.R., Pei, D., 2002. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* 12, 321-329.
- 745 Plata, C., Escamilla, J., Carrillo, E., Galindo, J.M., Gamba, G., García, M.C., Sánchez, J.A., 2004. AKAP79 increases the functional expression of skeletal muscle Ca²⁺ channels in *Xenopus* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 189-194.
- Rengaraj, D., Kim, D.K., Zheng, Y.H., Lee, S.I., Kim, H., Han, J.Y., 2008. Testis-specific novel transcripts in chicken: *in situ* localization and expression pattern profiling during sexual
- 750 development. *Biol. Reprod.* 79, 413-420.
- Robinson-Rechavi, M., Boussau, B., Laudet, V., 2004. Phylogenetic dating and characterization of gene duplications in vertebrates: the cartilaginous fish reference. *Mol. Biol. Evol.* 21, 580-586.
- Ronfani, L., Ferraguti, M., Croci, L., Ovitt, C.E., Scholer, H.R., Consalez, G.G., Bianchi, M.E.,
- 755 2001. Reduced fertility and spermatogenesis defects in mice lacking chromosomal protein Hmgb2. *Development* 128, 1265-1273.
- Ryu, S., Driever, W., 2006. Minichromosome maintenance proteins as markers for proliferation zones during embryogenesis. *Cell Cycle* 5, 1140-1142.
- Sananes, N., Baulieu, E.E., Le Goascogne, C., 1998. Stage-specific expression of the immunophilin FKBP59 messenger ribonucleic acid and protein during differentiation of
- 760 male germ cells in rabbits and rats. *Biol. Reprod.* 58, 353-360.
- Scheffe, J.H., Lehmann, K.E., Buschmann, I.R., Unger, T., Funke-Kaiser, H., 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J. Mol. Med.* 84, 901-910.
- 765 Schlecht, U., Demougin, P., Koch, R., Hermida, L., Wiederkehr, C., Descombes, P., Pineau, C., Jégou, B., Primig, M., 2004. Expression profiling of mammalian male meiosis and gametogenesis identifies novel candidate genes for roles in the regulation of fertility. *Mol. Biol. Cell* 15, 1031-1043.
- Schultz, N., Hamra, F.K., Garbers, D.L., 2003. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12201-12206.
- 770 Shima, J.E., McLean, D.J., McCarrey, J.R., Griswold, M.D., 2004. The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 71, 319-330.
- 775 Singer-Sam, J., Robinson, M.O., Bellve, A.R., Simon, M.I., Riggs, A.D., 1990. Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase, and Zfy gene transcripts during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Res.* 18, 1255-1259.
- Smith, H.W., 1936. The retention and physiological role of urea in the elasmobranch. *Biol. Rev.* 11, 49-73.
- 780 Sourdain, P., Jégou, B., 1989. Dissociation and identification of intact seminiferous lobules from the testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Cell Tissue Res.* 255, 199-207.
- Sourdain, P., Garnier, D.H., 1993. Stage-dependent modulation of Sertoli cell steroid production in dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *J. Reprod. Fertil.* 97, 133-142.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., Kai, T., 2001. Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-
- 785 104.

- Sreenivasan, R., Cai, M., Bartfai, R., Wang, X., Christoffels, A., Orban, L., 2008. Transcriptomic analyses reveal novel genes with sexually dimorphic expression in the zebrafish gonad and brain. *PLoS ONE* 3, e1791.
- 790 Stanley, H.P., 1966. The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). *Zeitschrift für Zellforschung* 75, 453-468.
- Sutovsky, P., 2003. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microsc. Res. Tech.* 61, 88-102.
- 795 Swann, K., Saunders, C.M., Rogers, N.T., Lai, F.A., 2006. PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, 264-273.
- Szutorisz, H., Georgiou, A., Tora, L., Dillon, N., 2006. The proteasome restricts permissive transcription at tissue-specific gene loci in embryonic stem cells. *Cell* 127, 1375-1388.
- 800 Tanaka, H., Baba, T., 2005. Gene expression in spermiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 344-354.
- Vemuganti, S.A., Bell, T.A., Scarlett, C.O., Parker, C.E., de Villena, F.P., O'Brien, D.A., 2007. Three male germline-specific aldolase A isozymes are generated by alternative splicing and retrotransposition. *Dev. Biol.* 309, 18-31.
- 805 Vijayaraghavan, S., Liberty, G.A., Mohan, J., Winfrey, V.P., Olson, G.E., Carr, D.W., 1999. Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein. *Mol. Endocrinol.* 13, 705-717.
- Vizziano, D., Fostier, A., Le Gac, F., Loir, M., 1996. 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in nonflagellated germ cells of rainbow trout testis. *Biol. Reprod.* 54, 1-7.
- Wang, P., Heitman, J., 2005. The cyclophilins. *Genome Biol.* 6, 226.
- 810 Wilke, K., Wiemann, S., Gaul, R., Gong, W., Poustka, A., 1997. Isolation of human and mouse HMG2a cDNAs: evidence for an HMG2a-specific 3' untranslated region. *Gene* 198, 269-274.
- Wool, I.G., 1996. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 21, 164-165.
- 815 Wu, S.M., Baxendale, V., Chen, Y., Pang, A.L., Stitely, T., Munson, P.J., Leung, M.Y., Ravindranath, N., Dym, M., Rennert, O.M., Chan, W.Y., 2004. Analysis of mouse germ-cell transcriptome at different stages of spermatogenesis by SAGE: biological significance. *Genomics* 84, 971-981.
- 820 Xiao, P., Tang, A., Yu, Z., Gui, Y., Cai, Z., 2008. Gene expression profile of 2058 spermatogenesis-related genes in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 201-206.
- Yamashita, Y.M., Fuller, M.T., Jones, D.L., 2005. Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. *J. Cell Sci.* 118, 665-672.
- 825 Zhou, C., Li, L.Y., Lu, G.X., 2005. Molecular cloning and character analysis of the mouse zinc finger protein gene Zfp474 exclusively expressed in testis and ovary. *Yi Chuan Xue Bao* 32, 155-162.

Figure legends

Fig. 1. Ratios of expression (determined by qPCR and normalized by 5S RNA) between zones B (spermatocytes, □), C (round spermatids, ■) or D (elongated spermatids, ■) and zone A (spermatogonia) of dogfish testis, for clones identified in SSH libraries.

Fig. 2. Ratios of expression (determined by qPCR and normalized by 5S RNA) between spleen (□), liver (□), muscle (■), epigonal tissue (■), brain (■), kidney (■) or epididymis (□) and testis in dogfish, for clones identified in SSH libraries.

Fig. 3. Micrographs of dogfish testis after ISH with antisense RNA probes directed against cDNA identified on SSH clones. (A) Cysts with round and/or elongated spermatids were stained in purple on transversal sections from zones A to D. (B) Cysts were labeled (orange legend) or unlabeled (green legend) between stages XIa and XVI (roman numerals) defined by Loir et al. (1995), (C) Germinal (G) or Sertolian (S) staining were observed on fine views of labeled spermatocysts.

Fig. 4. Representation of the range of expression of SSH clones during spermatogenesis between stages XIa and XVIII (Loir et al., 1995) defined following ISH with antisense RNA probes. Thin lines indicate expression and thick lines represent strongest expression.

Tables

Table S1

Primers used for PCR and real-time PCR.

Name	Sequence	Name	Sequence	Target
Egf2		Egf2A		Egf
M13 Fwd31	CAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG	M13 Rev33	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC	Vector
Sc_polyP_1q	TTACCATTTGCGACTTGCTTG	Sc_polyP_1Aq	TTGGCGACACTTTTCTCACAC	A-A2
Sc_PDCD2_1q	TGAGTTGGTGATGGAGCTTG	Sc_PDCD2_1Aq	TCTGCTGCTGACATGGATTC	A-B4
Sc_SSHA2C4_1q	TGCAGCGTGATCCTGATGAAT	Sc_SSHA2C4_1Aq	CCTTCCAATGTGACGCCCTCT	A-C4
Sc_RPSA_1q	CCCGTGCCATTGTCTCTATC	Sc_RPSA_1Aq	GTGAATCTTCCGGCAATAGG	A-C7
Sc_SSHA2D2_1q	CAGGGGTGGGCATCCAGTGC	Sc_SSHA2D2_1Aq	TCCCGTCTGCAAGCCTCTCC	A-D2
Sc_RPS8_1q	GAACAATTCCAGCAGGGAAA	Sc_RPS8_1Aq	TTCCAGCTCCTTTCTCTCAA	A-E4
Sc_SSHA1G10_1q	GCGTTTCCGAGGATGGTTGCAC	Sc_SSHA1G10_1Aq	TCAGCGCCACCAACGTCCAT	A-G10
Sc_SSHA1G11_1q	GACTTCCCCATCCAGGGCATCC	Sc_SSHA1G11_1Aq	CCACGGGCATCTAACCCGACAA	A-G11
Sc_SSHA2H1_2q	CGGGCAATATGCTTTTGACT	Sc_SSHA2H1_2Aq	TGGTTTCCTCCTTTTCAATCC	A-H1
Sc_MCM6_1q	TGATTGAACTGAAGCAGACTGG	Sc_MCM6_1Aq	ACAAGGAAGGGATCCTGCTC	A-H2
Sc_SSHA2H3_1q	CTCCGTTCCAAGTCCACAAT	Sc_SSHA2H3_1Aq	GAGCAACGGTCAGTATGCAA	A-H3
Sc_cyclophB_1q	GGAAGACTGTTCCGAAGACG	Sc_cyclophB_1Aq	CCCCTCCCTGGATCATAAAT	A-H10
Sc_SSHCA2_1q	TGGAAGCCAGACCGAGGTGCAT	Sc_SSHCA2_1Aq	GCATCATTTCTGTTGGCCTCTCG	C-A2
Sc_protS4_1q	AGCACGAAACGTCCAAAGT	Sc_protS4_1Aq	ATTTCTTTTGGCGACCTTG	C-A3
Sc_SSHCA4_1q	GGAAGGGGTAAAGACCTCCA	Sc_SSHCA4_1Aq	ATTTTCAGCCACAGGAAATGG	C-A4
Sc_SSHCA5_1q	GGGGCCTTCCAACAAGCACAGG	Sc_SSHCA5_1Aq	GTCTTGGCACGGCGAGGCTTAC	C-A5
Sc_SSHCA6_1q	TGTCCTCGAAGCGGAACCCCTTG	Sc_SSHCA6_1Aq	GAGCTCCCCCAGACCCACAA	C-A6
Sc_SSHCA7_1q	CAGCCAAAGATTATGAAGCTGAAG	Sc_SSHCA7_1Aq	TGTTTCTCAAGGATAGTCGGTTC	C-A7
Sc_SSHCA9_1q	CGGCCTTGTGCACATTTCTGCT	Sc_SSHCA9_1Aq	CGCAGAAGAGCTGCAAGACGTT	C-A9
Sc_SSHCB10_1q	CGTTGCACCGTGTCTTGGAGAAA	Sc_SSHCB10_1Aq	CCCACATGCCCCTCCAACCTCT	C-B10
Sc_SSHCC5_1q	TTCAATTGAGCTTGACAGACG	Sc_SSHCC5_1Aq	CAATTCTTTCTCCGGTCA	C-C5
Sc_SSHCC11_1q	ATGGGAAATGTGGGACAGAG	Sc_SSHCC11_1Aq	AAGCCCACTGTCTCCTTCA	C-C11
Sc_SSHCD11_1q	GGGAATGACTGAGGCTGGGGAGAG	Sc_SSHCD11_1Aq	TCCCCGTCCTCATGTTTTTCCAC	C-D11
Sc_SSHCD12_1q	GGGCCAATAGTTGAAGGTGA	Sc_SSHCD12_1Aq	CAGAGGGAGAGATGGAGCTG	C-D12
Sc_SSHCE1_1q	TCACCGAGAAGGCACCTCTGAC	Sc_SSHCE1_1Aq	CTCCACGATGGGCACCAGACCT	C-E1
Sc_SSHCF3_1q	GCTATCTTTGTGGCCGAGAG	Sc_SSHCF3_1Aq	TTCAGGTTTCTGGGTTTCTAG	C-F3
Sc_SSHCF11_1q	TCGGAGGCGTCATCTTCTTCCA	Sc_SSHCF11_1Aq	TCTCCATTGGTTCCGGCCAAAG	C-F11
Sc_SSHCG9.1_1q	GCAGGTGCCAGAAGAACTT	Sc_SSHCG9.1_1Aq	CCCAAACCAGGAACCTCATA	C-G9
Sc_SSHCG12_1q	GTCTTGGCACGGCGAGGCTTAC	Sc_SSHCG12_1Aq	GGGGCCTTCCAACAAGCACAGG	C-G12
Sc_SSHCH11_1q	GCCAACCAAGGAGCAGGACCAG	Sc_SSHCH11_1Aq	GGCAGGTTCCATCCGGAGAGGT	C-H11

Table 1

Dogfish cDNA identified by SSH and preferentially expressed in spermatogonia (A) or round and young elongating spermatids (C): homologies identified in Genbank database and on dogfish embryo cDNA library.

Clone	Length (bp)	Nb of identical clones	dbEST accession no.	Homology Putative ID	Matching sequence	% identity	Homology in embryonic library	Homology / Putative ID of embryonic cDNA	Matching sequence	% identity
A-A2	781	1		Predicted similar to polyprotein (<i>Danio rerio</i>)	XP_001332599.2	41	clone	PREDICTED: similar to polyprotein (<i>Danio rerio</i>)	XP_001333892.2	41
A-B4	974	2		programmed cell death 2 (<i>Gallus gallus</i>)	NP_001026235.1	53	clone	programmed cell death 2 transcript a3PDCD2 (<i>Gallus gallus</i>)	ABL09365.1	65
A-C4	355	2		ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase) (<i>Danio rerio</i>)	NP_001019576.1	82	contig	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3 (<i>Salmo salar</i>)	NP_001140074.1	78
A-C7	359	1		laminin receptor 1 (ribosomal protein SA, 67 kDa) (<i>Xenopus laevis</i>)	NP_001080730.1	90	contig	40S ribosomal protein Sa (<i>Ictalurus punctatus</i>)	AF402808_1	82
A-D2	627	2		carbonyl reductase-like 20beta-hydroxysteroid dehydrogenase (<i>Oreochromis niloticus</i>)	AF439713_1	75	contig	carbonyl reductase 1 (<i>Homo sapiens</i>)	NP_001748.1	71
A-E4	297	1		similar to ribosomal protein S8 (<i>Equus caballus</i>)	XP_001496811.2	92	contig	ribosomal protein S8 (<i>Homo sapiens</i>)	NP_001003.1	94
A-G10	629	1		type I procollagen alpha 1 chain (<i>Raja kenoei</i>)	BAD98524.1	96	contig	type I procollagen alpha 1 chain (<i>Raja kenoei</i>)	BAD98524.1	93
A-G11	555	1		adenine phosphoribosyltransferase (<i>Danio rerio</i>)	NP_956962.1	67	contig	Adenine phosphoribosyltransferase (<i>Osmerus mordax</i>)	ACO09049.1	64
A-H1	529	1		putative 3' UTR of HMGB3	-	-	contig	high-mobility group box 3, isoform CRA_b (<i>Homo sapiens</i>)	EAW99398.1	70
A-H2	497	1		minichromosome maintenance complex component 6 (<i>Bos taurus</i>)	NP_001039699.1	70	contig	minichromosome maintenance complex component 6 (<i>Gallus gallus</i>)	NP_001006527.1	83
A-H3	470	1		putative 3' UTR of cyclinI	-	-	contig	cyclin I (<i>Gallus gallus</i>)	XP_420590.1	64

A-H10	533	1	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B) (<i>Homo sapiens</i>)	CAG33110.1	88	contig	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B) (<i>Homo sapiens</i>)	CAG33110.1	89
C-A2	476	1	putative 5' UTR of soggy	-	-	contig	Dickkopf-like 1 (soggy) (<i>Bos taurus</i>)	NP_001039934.1	43
C-A3	237	35	-	-	-	-	Full=Protamine S4 (<i>Scyliorhinus canicula</i>)*	P30259.1	100
C-A4	426	1	similar to ring finger protein 152 (<i>Equus caballus</i>)	XP_001489983.1	58	-	-	-	-
C-A5	405	7	Sulfonylurea receptor 1 variant (<i>Homo sapiens</i>)	BAD92321.1	46	-	-	-	-
C-A6	327	1	hypothetical protein (<i>Canis familiaris</i>)	XP_854628.1	56	-	-	-	-
C-A7	262	3	Full=Spermatid-specific protein S2 (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	P11020.1	100	-	-	-	-
C-A9	141	2	-	-	-	-	-	-	-
C-B7	231	2	-	-	-	-	Full=Protamine Z2 (<i>Scyliorhinus canicula</i>)*	P06841.1	100
C-B10	576	1	similar to spermatogenesis and centriole associated 1 (<i>Homo sapiens</i>)	XP_001720789.1	57	-	-	-	-
C-C5	866	1	similar to hCG2042943 (<i>Monodelphis domestica</i>)	XP_001374498.1	48	-	-	-	-
C-C11	700	1	-	-	-	contig	F-box only protein 7 isoform 1 (predicted) (<i>Callithrix jacchus</i>)	ABZ10471.1	49
C-D11	329	1	calreticulin (<i>Eptatretus burgeri</i>)	BAA88476.1	60	-	-	-	-
C-D12	342	1	-	-	-	-	PREDICTED: similar to A-kinase anchor protein 5 isoform 3 (<i>Macaca mulatta</i>)	XP_001108118.1	64
C-E1	1030	1	fructose-bisphosphate aldolase B (<i>Cephaloscyllium umbratile</i>)	BAD17932.1	97	contig	fructose-bisphosphate aldolase B (<i>Cephaloscyllium umbratile</i>)	BAD17932.1	99
C-F3	999	1	zinc finger protein 474 (<i>Bos taurus</i>)	NP_001098482.1	53-64	-	-	-	-

C-F11	241	1	fructose-bisphosphate aldolase C (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	AAM93485.1	100	contig	fructose-bisphosphate aldolase C (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	AAM93485.1	100
C-G8	446	3	Full=Protamine-Z1 (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	P08433.2	93	-	-	-	-
C-G9	336	1	phospholipase c-zeta (<i>Coturnix japonica</i>)	BAF94336.1	52	-	-	-	-
C-G12	400	1	-	-	-	-	-	-	-
C-H11	345	1	-	-	-	-	-	-	-

*: homology was identified with BlastP queried with putative ORF protein sequence.

Table 2

Zone- and tissue- specificities identified by qPCR for cDNA isolated by SSH in dogfish testis.

Clone	Zone specificity	Tissue specificity
A-A2	A	Ubiquitous
A-B4	invalidated	Ubiquitous
A-C4	A-B	Ubiquitous
A-C7	invalidated	Ubiquitous
A-D2	A-B	Ubiquitous
A-E4	A	Ubiquitous
A-G10	A	Ubiquitous
A-G11	A	Ubiquitous
A-H1	A	Ubiquitous
A-H2	A-B	Ubiquitous
A-H3	invalidated	not tested
A-H10	A-B	Testis predominant
C-A2	C	Testis predominant
C-A3	D	Testis specific
C-A4	C-D	Testis specific
C-A5	C	Testis predominant
C-A6	C-D	Testis predominant
C-A7	C	Testis specific
C-A9	D	Testis specific
C-B7	not tested	not tested
C-B10	C	Testis specific
C-C5	C	Ubiquitous
C-C11	C	Ubiquitous
C-D11	C-D	Testis predominant
C-D12	C-D	Testis specific
C-E1	C	Ubiquitous
C-F3	C	Testis specific
C-F11	C	Testis-Brain
C-G8	not tested	not tested
C-G9	C-D	Testis specific
C-G12	C-D	Testis predominant
C-H11	C-D	Testis predominant

Figures

Fig. 1

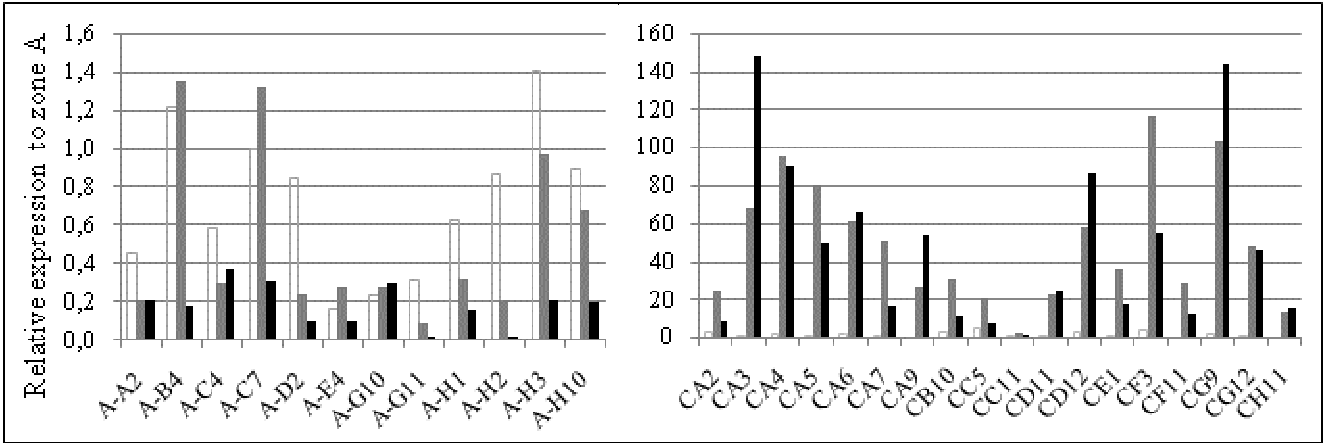


Fig.2

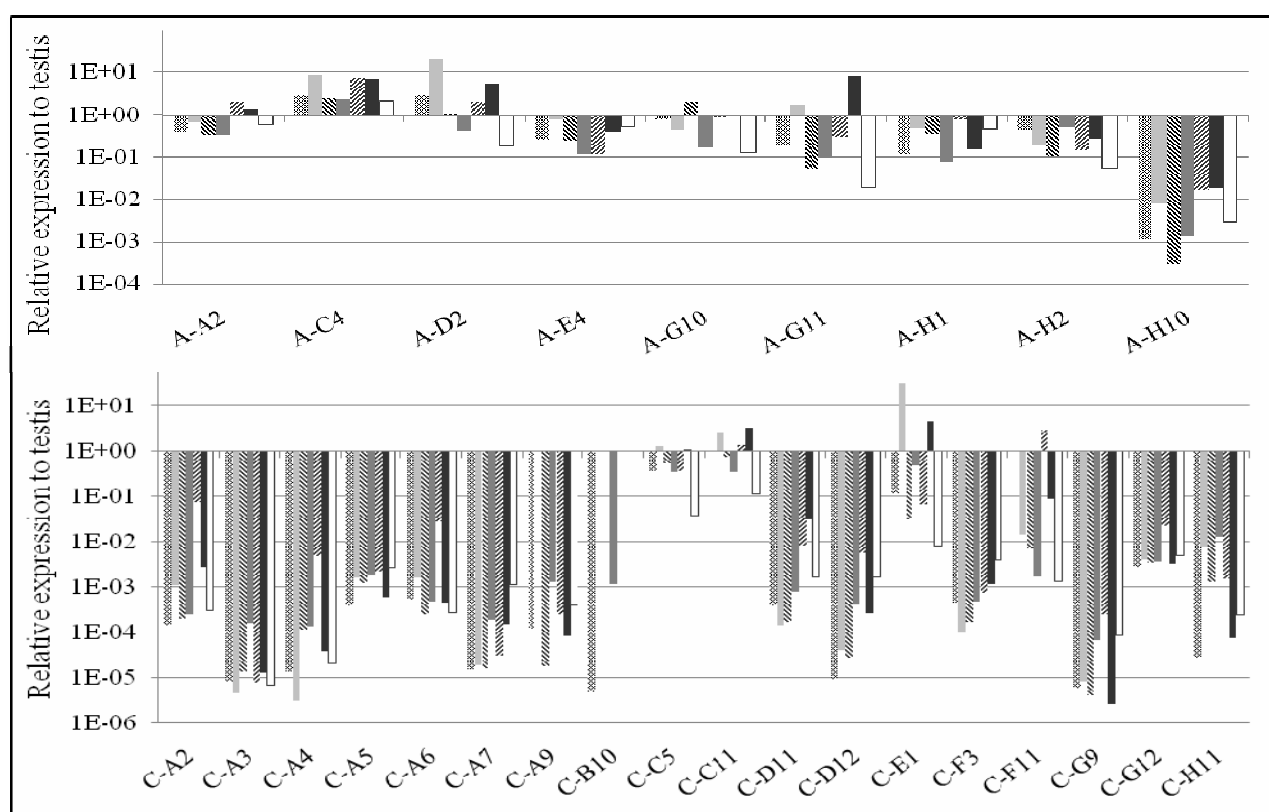
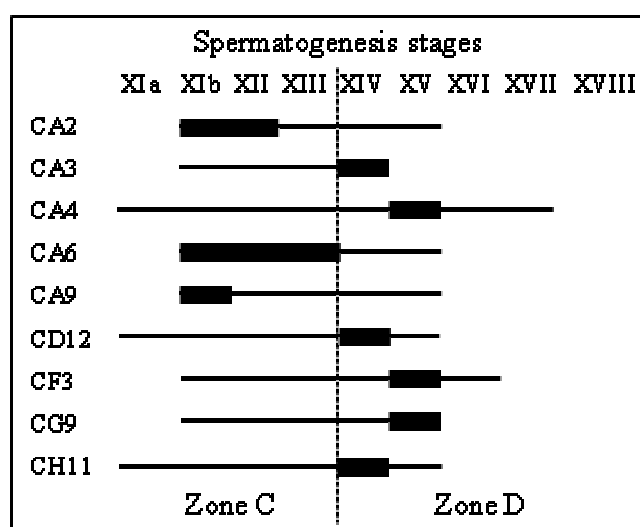
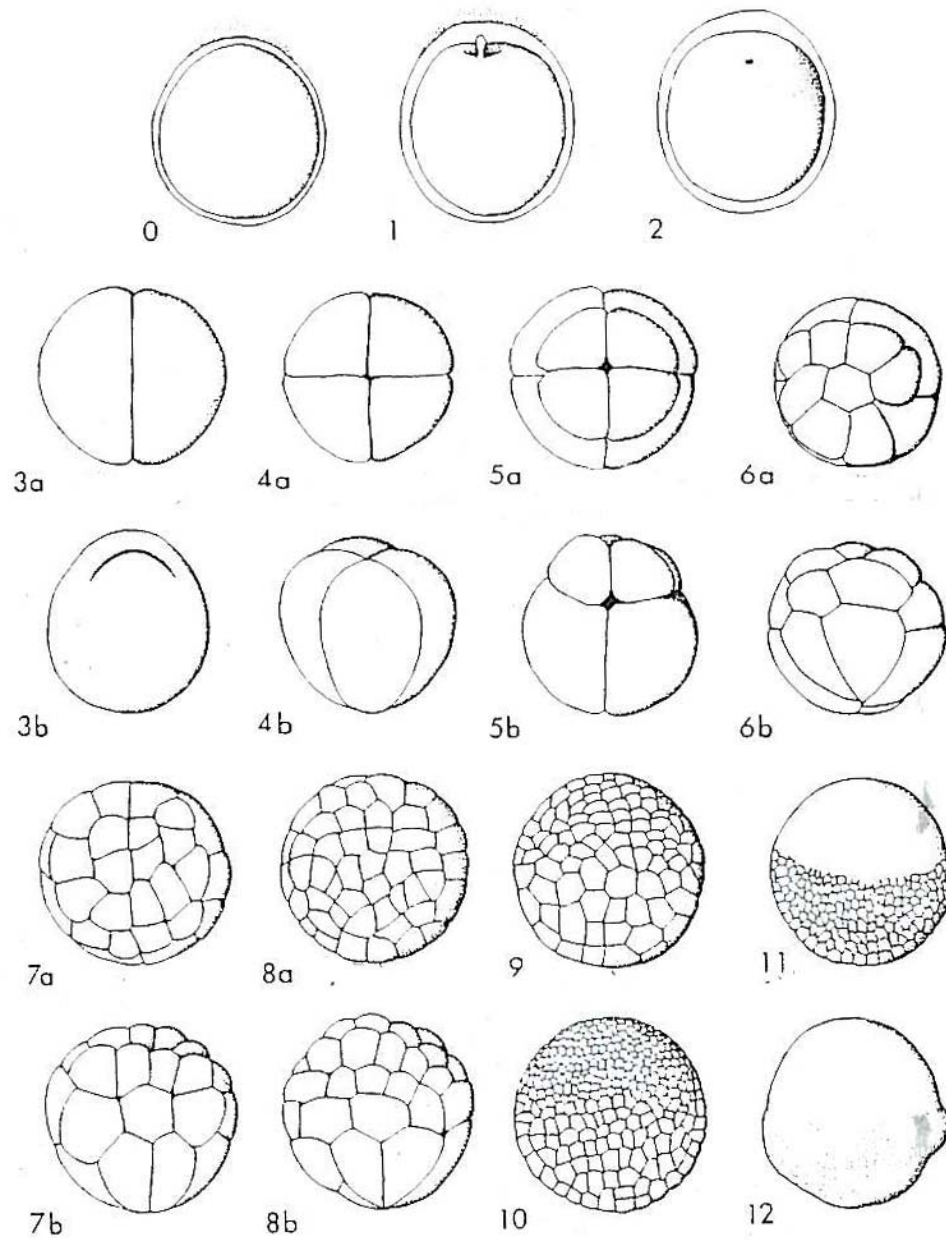


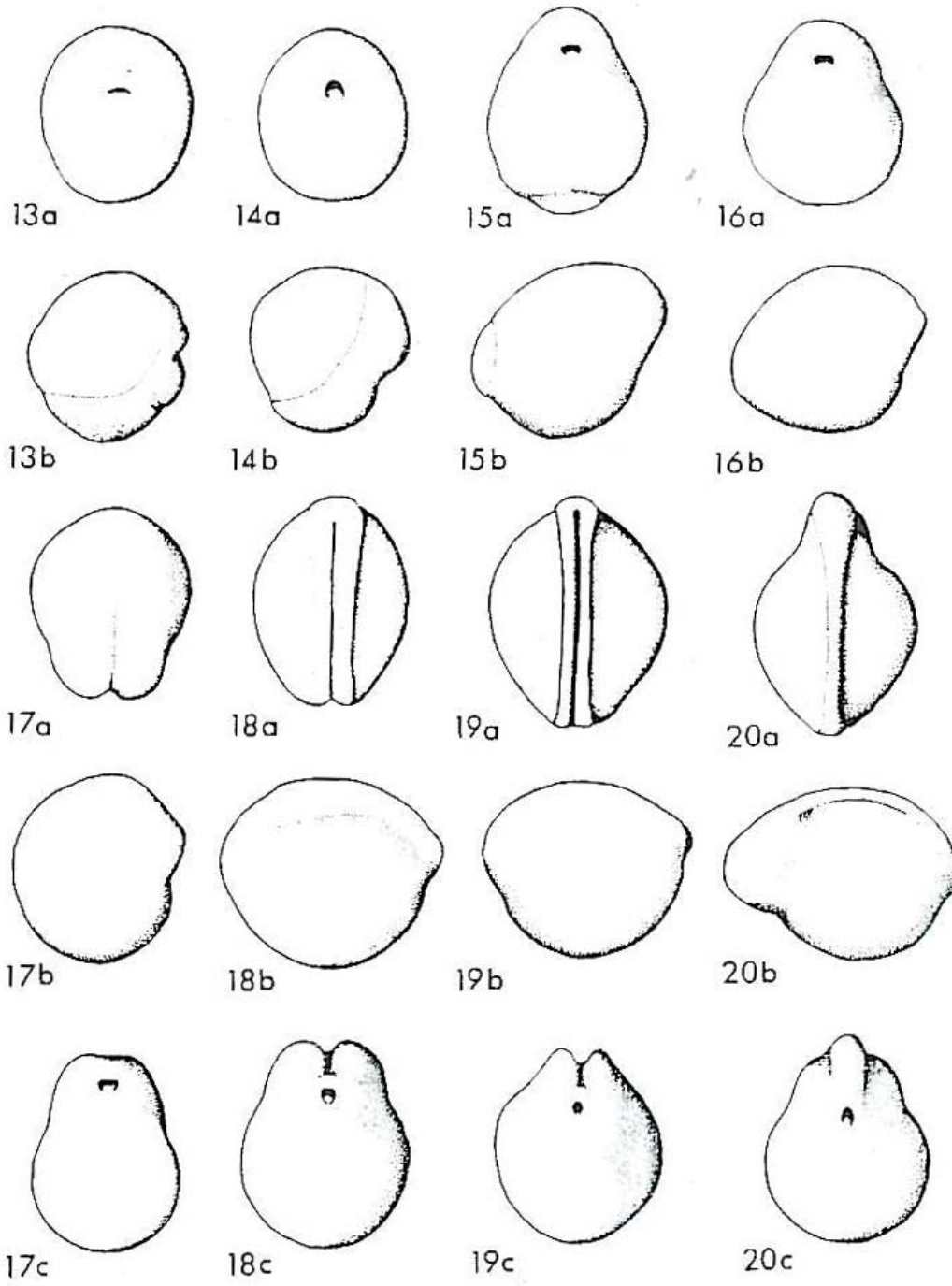
Fig. 4

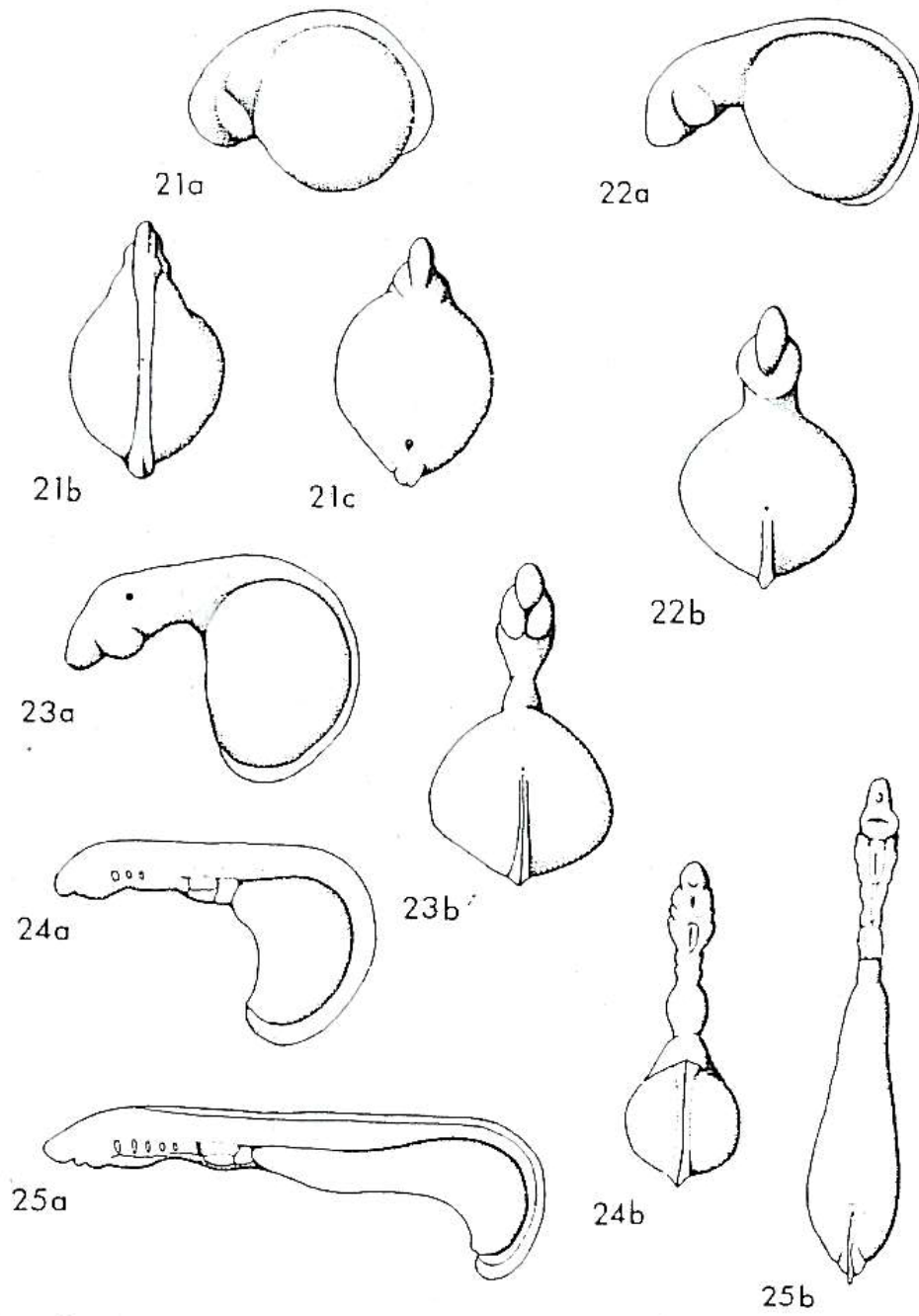


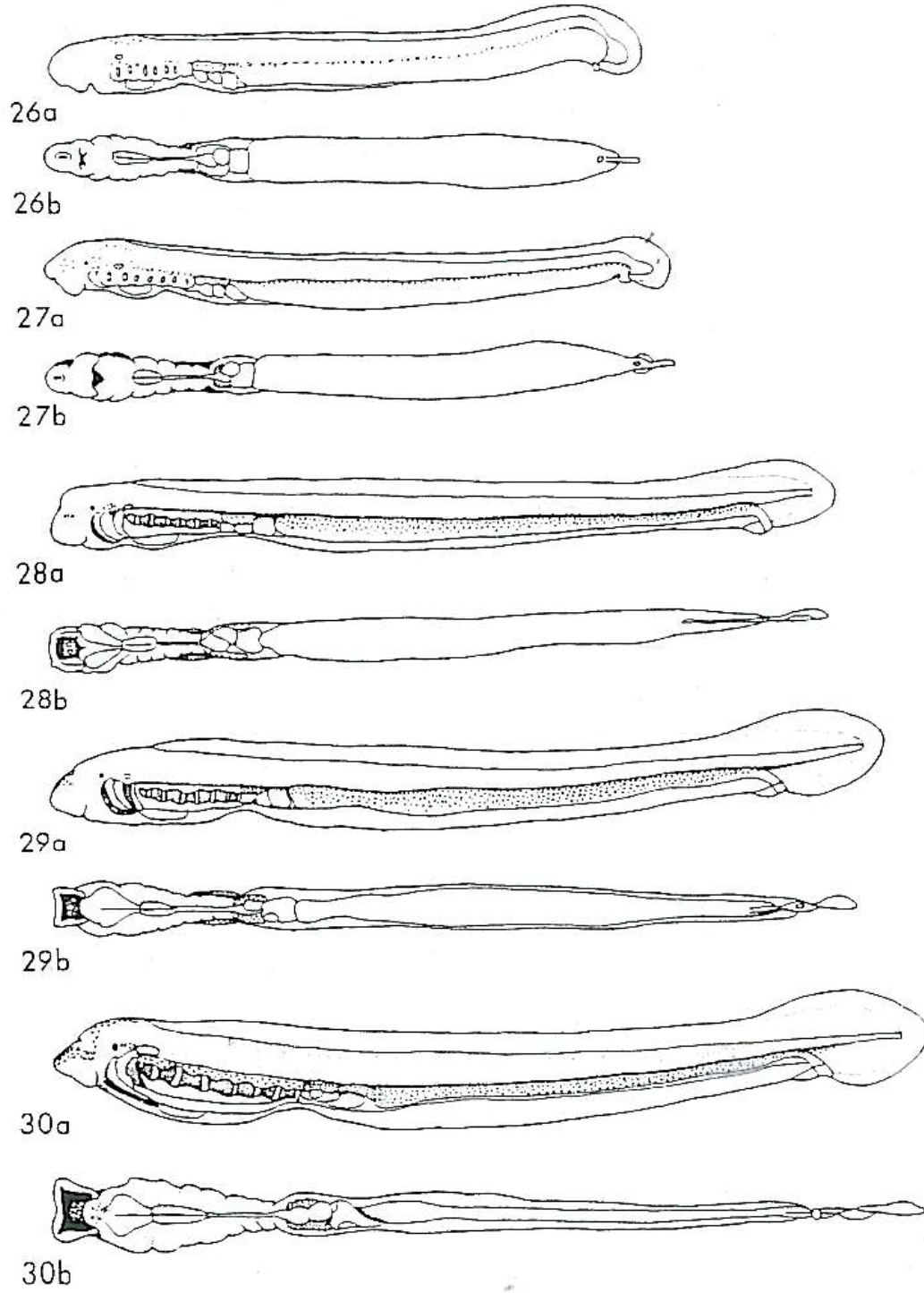
Developmental Stages of Lamprey

113









Claire ROCANCOURT
Caractérisation moléculaire du développement de l'œil chez
la lamproie *Petromyzon marinus*.

La lamproie présente un mode de développement de la rétine très particulier parmi les vertébrés. Elle implique deux processus distincts. Le premier conduit à la formation précoce d'une rétine centrale, qui présente des indications de différenciation dès les stades prolarvaires et ne contient que trois types cellulaires différenciés (photorécepteurs, cellules bipolaires et cellules ganglionnaires). Dans un deuxième temps, au cours des stades larvaires, une rétine périphérique, dont dérive l'essentiel de la rétine adulte, se développe à la marge de la rétine centrale. Elle croît de façon importante jusqu'à la métamorphose, au cours de laquelle la différenciation des différents types cellulaires s'effectue. J'ai engagé une analyse des programmes génétiques qui contrôlent ces processus en étudiant les profils d'expression de trois paralogues de la famille *Otx* (*PmOtxA/B/C*), ainsi que des gènes *PmFoxG1*, *PmPax6*, *PmVax2* et *PmSix3* au cours du développement précoce de l'œil, aux stades prolarvaires. L'analyse de l'expression des gènes *PmPax6*, *PmOtxB* et *PmOtxC* a également été étudiée au cours des stades larvaires et dans la rétine différenciée post-métamorphique. Enfin des traitements pharmacologiques visant à inhiber l'activité du récepteur au FGF ont été effectués, en vue d'évaluer le rôle des signalisations médiées par ce récepteur aux stades prolarvaires. Les résultats mettent en évidence un patron de régionalisation de la cupule optique très semblable entre la lamproie et les gnathostomes. Les traitements pharmacologiques suggèrent également des mécanismes de spécification du pédoncule optique conservés à l'échelle des vertébrés. Au cours de la différenciation de la rétine centrale et de la formation de la rétine périphérique, les gènes *PmPax6* et *PmOtxB/C* présentent également une dynamique d'expression globalement conservée, avec quelques différences. Ces analyses fournissent la première caractérisation des programmes génétiques contrôlant la formation de l'œil chez la lamproie. A la suite de ces analyses, la formation de la rétine centrale apparaît comme un processus accessible aux caractérisations moléculaires et aux analyses fonctionnelles et d'un intérêt majeur à la fois pour des aspects évolutifs et mécanistiques.

Mots clef : **Retine, Lamproie, Otx, FoxG1, Pax6, Six3, Vax2, Evolution, Développement.**

Molecular characterization in the developing eye
of the lamprey *Petromyzon marinus*.

The lamprey presents a very particular way of development of the retina among the vertebrates. It implies two distinct processes. The first lead to the early formation of a central retina, which presents indications of differentiation in prolarval stages and contains only three differentiated cellular types (bipolar cells, photoreceptors and ganglionar cells). Secondly, during larval stages, a peripheral retina, of which the main part of the adult retina derives, develops within the margin of the central retina. It grows in an important way until the metamorphosis, during which the differentiation of the various cellular types is carried out. I engaged an analysis of the genetic programs which control these processes by studying the expression profiles of three paralogues of the *Otx* family (*PmOtxA/B/C*), as well as *PmFoxG1*, *PmPax6*, *PmVax2* and *PmSix3* genes during the early development of the eye, at the stages prolarvaires. The expression analysis of *PmPax6*, *PmOtxB* and *PmOtxC* genes was also studied during larval stages and in the post-metamorphic differentiated retina. Finally pharmacological treatments aiming at inhibiting the activity of the FGF receptor were carried out, in order to evaluate the role of the indications mediated by this receptor at the prolarval stages. The results highlight a very similar regionalization pattern of the optical cup between the lamprey and the gnathostomes. The pharmacological treatments also suggest specification mechanisms of the optical stalk preserved at the level of vertebrate. During the differentiation of the central retina and formation of the peripheral retina, the *PmPax6* genes and *PmOtxB/C* also present a conserved dynamic expression, with some differences. These analyzes provide the first characterization of the genetic programs controlling the formation of the eye in the lamprey. Following these analyzes, the formation of the central retina seems to be an accessible process to molecular characterizations and to functional analyzes and it is a major interest for both evolutionary and mechanistic aspects.

Key words : **Retina, Lamprey, Otx, FoxG1, Pax6, Six3, Vax2, Evolution, Development.**



Laboratoire Développement et Evolution des Vertébrés
Institut de Transgenèse – IEM UMR 6218
3B rue de la Férollerie – 45071 ORLEANS CEDEX

