

## Coup d'œil sur Pax-6

Serge Plaza  
Christine Dozier  
Patrick Martin  
Simon Saule

Le gène *Pax-6* est un facteur de transcription conservé au cours de l'évolution, fortement exprimé dans l'œil, et dont la fonction est requise pour la formation de cet organe. *Pax-6* code pour quatre protéines (p48, p46, p43 et p32/33) différant dans leurs domaines de liaison à l'ADN. Ce gène s'exprime grâce à deux promoteurs P0 et P1. Chronologiquement, P1 est le premier promoteur activé. P0 n'est induit qu'au moment de la différenciation neuronale et ce promoteur est sous le contrôle d'une séquence activatrice intragénique agissant spécifiquement dans la neurorétine. L'activité des deux promoteurs est, par ailleurs, stimulée par la protéine p46, ainsi que par le produit du proto-oncogène *c-myc* exprimé dans la neurorétine. Le rôle clé de *Pax-6* dans la formation de l'œil est sans doute directement lié à l'existence des multiples protéines codées par ce gène dont la fonction s'exerce à des étapes différentes de ce processus.

Le gène *Pax-6* a été isolé chez la souris [1], sur la base de son homologie avec le domaine *paired* identifié dans trois gènes de segmentation de la drosophile, dont le gène *paired*. A ce jour, neuf gènes portant une séquence *paired* ont été isolés chez les vertébrés [2, 3]; il s'agit des gènes *Pax* (pour *paired box*). Depuis son isolement chez les vertébrés, des analogues de *Pax-6* ont été identifiés dans des espèces aussi divergentes que le ver nématode *Caenorhabditis elegans* (*vab-3*, [4]), la mouche *Drosophila melanogaster* (*ey*, [5]) ou l'oursin *Paracentrotus lividus* [6]. Chez les vertébrés, *Pax-6* s'exprime dans le système nerveux central, dérivé du feuillet ectodermique, incluant le diverticule diencéphalique qu'est la neurorétine. Ce gène s'exprime aussi dans le pancréas endocrine d'origine endodermique [1, 7]. L'importance de *Pax-6* dans le développement de l'œil est établie par

deux observations: d'une part, des défauts de développement de l'œil sont observés chez les vertébrés ou les invertébrés, en réponse à des mutations de ce gène (*m/s* n°5, vol. 11, p. 776); d'autre part, l'expression de *Pax-6* dans les cellules de disque imaginal de drosophile conduit à la formation d'yeux ectopiques dans les tissus que ces cellules devaient normalement former [8, 9].

L'œil émerge d'une série d'événements embryologiques débutant par la formation de la cupule optique (figure 1A). Après invagination du neuroépithélium, la vésicule optique possède une double couche cellulaire. La fine couche postérieure se différencie en rétine pigmentaire, la couche antérieure multicellulaire formant la future neurorétine (figure 1B). La formation de cette vésicule rapproche le neuroépithélium diencéphalique de l'ectoderme de surface. Cet ectoderme donnera plus

### ADRESSES

S. Plaza: boursier post-doctoral de l'ARC. C. Dozier: chargé de recherche au Cnrs. P. Martin: chargé de recherche au Cnrs. S. Saule: directeur de recherche au Cnrs. Laboratoire de différenciation cellulaire et moléculaire Cnrs EP56, Institut Pasteur, 1, rue du Professeur-Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

## RÉFÉRENCES

1. Gruss P, Walther C. *Pax-6* a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 1991; 113: 1435-49.
2. Babinet C. Une famille de gènes du développement: les gènes *Pax*. *medecine/sciences* 1993; 9: 87-91.
3. Stachan T, Read A. *Pax* genes. *Curr Op Genet Dev* 1994; 4: 427-38.
4. Chisholm A, Horvitz R. Patterning of the *Caenorhabditis elegans* head region by the *Pax-6* family member *vab-3*. *Nature* 1995; 377: 52-5.
5. Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ. Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science* 1994; 265: 785-9.
6. Czerny T, Busslinger M. DNA-binding and transactivation properties of *Pax-6*: Three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (*Pax-5*). *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2858-71.
7. Turque N, Plaza S, Radvanyi F, Carrière C, Saule S. *Pax-QNR/Pax-6* a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 829-38.
8. Halder G, Callaerts P, Gehring W. New perspectives on eye evolution. *Curr Op Genet Dev* 1995; 4: 427-38.
9. Deutsch J, Le Guyader H. Le fond de l'œil; l'œil de la drosophile est-il homologue de celui de la souris? *medecine/sciences* 1995; 11: 1447-52.
10. Grindley J, Davidson D, Hill R. The role of *Pax-6* in eye and nasal development. *Development* 1995; 121: 1433-42.
11. Fujiwara M, Uchida T, Osumi-Yamashita N, Eto K. Uchida rat (*rSev*): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse *sev* mutant. *Differentiation* 1994; 57: 31-8.
12. Hanson I, Van Heyningen V. Pax-6: more than meets the eye. *Trends Genet* 1995; 11: 268-72.
13. Dozier C, Carrière C, Grévin D, et al. Structure and DNA-binding properties of *Pax-QNR*, a paired box- and homeobox-containing gene. *Cell Growth Differ* 1993; 4: 281-9.
14. Glaser T, Walton D, Cai J, Epstein J, Jepsal L, Maas R. Pax-6 gene mutations in *Aniridia*. In: Wiggs JR, ed. *Molecular genetics of ocular disease*. New York: Wiley-Liss Inc, 1995; 51-82.
15. Carrière C, Plaza S, Martin P, et al. Characterization of quail *Pax-6(Pax-QNR)* expressed in the neuroretina. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7257-66.

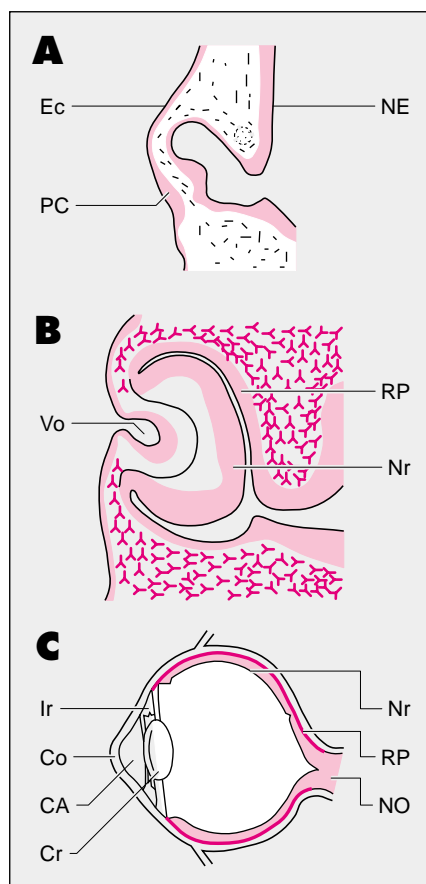


Figure 1. **Représentation schématique du développement précoce d'un œil de vertébré.** Les territoires d'expression de Pax-6 sont indiqués en rouge [10]. A: formation de la cupule optique. B: Stade vésicule optique. C: Schéma d'un œil.

NE: neuroépithélium; Ec: ectoderme; PC: placode cristalline; RP: rétine pigmentaire; Nr: neuro-rétine; VO: vésicule optique; NO: nerf optique; Ir: iris; Co: cornée; CA: chambre antérieure de l'œil; Cr: cristallin.

tard naissance au cristallin et à la cornée (figure 1C). Le rapprochement de ces tissus a pour première conséquence l'induction de la placode cristalline dans l'ectoderme (figure 1A). Le cristallin formé influence ensuite le développement de la rétine. Chez la souris, *Pax-6* s'exprime dans toutes les structures de la vésicule optique, ainsi que dans leurs futurs dérivés: rétine pigmentaire, neuro-rétine, cristallin et cornée. Les embryons de souris *sev/sev* dépourvus d'yeux (sou-

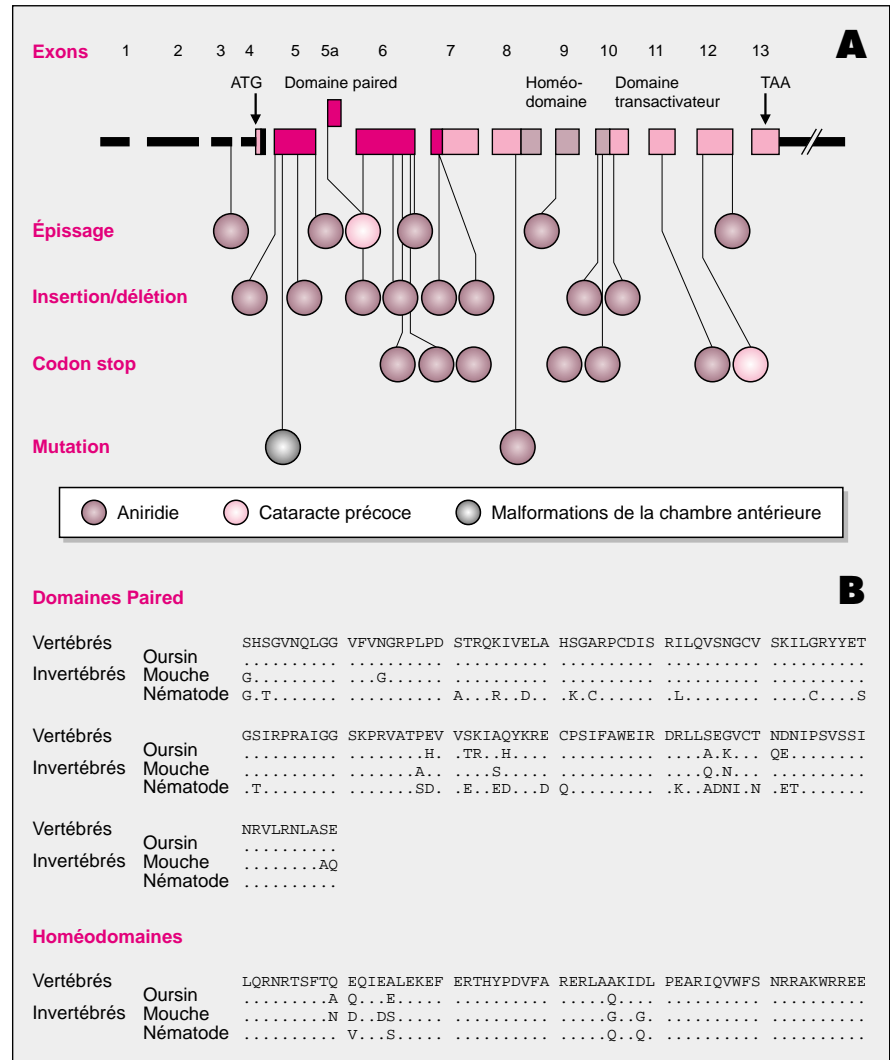
ris small eyes), sont homozygotes pour une mutation dans *Pax-6* qui aboutirait à la synthèse d'une protéine tronquée (*m/s n° 10, vol. 10, p. 1058*). L'étude de l'expression de *Pax-6* chez ces embryons montre que le premier défaut observé dans le développement de l'œil est l'absence de formation de la placode cristalline. Curieusement, alors que les ARN messagers *Pax-6* sont normalement présents dans la neuro-rétine, ils ne sont plus détectables dans l'ectoderme de surface qui dégénère en une condensation mésenchymateuse [10]. Le résultat d'expériences associant de l'ectoderme de surface de génotype *sev/sev* à des vésicules optiques de génotype normal, ainsi que les associations réciproques, montre que l'absence de placode cristalline dans les embryons de souris *sev/sev* n'est pas le résultat d'une induction tissulaire défailante [11]. Des cristallins normaux se développent en effet dans l'association ectoderme normal-vésicules *sev/sev*. Ainsi, la présence d'un produit Pax-6 fonctionnel dans l'ectoderme semble nécessaire à la fois pour le développement du cristallin et pour que l'expression de ce gène s'y maintienne [10].

## Les produits de Pax-6

*Pax-6* code pour un facteur de transcription possédant deux domaines de liaison à l'ADN: le domaine *paired* (128 acides aminés) présent dans sa portion aminoterminal et l'homéodomaine (60 acides aminés) présent en position centrale de la protéine (figure 2A). La portion carboxyterminale de Pax-6 porte le domaine transactivateur de la protéine. De nombreuses mutations induisant différentes anomalies oculaires chez l'homme affectent les différents domaines de la protéine (figure 2A) [12]. Trois sites de localisation nucléaire sont présents dans la protéine Pax-6: dans le domaine *paired*, ainsi que dans les portions amino- et carboxyterminales de l'homéodomaine. Le gène *Pax-6* a été cloné chez les vertébrés [13, 14], la drosophile [5] et *Caenorhabditis elegans* [4]. Le degré d'analogie des domaines de liaison à l'ADN des différentes protéines Pax-6 est élevé: 79% de résidus identiques entre les domaines *paired* de PAX-6

## RÉFÉRENCES

16. Zhang Y, Emmons S. Specification of sense-organ identity by *Cænorhabditis elegans* Pax-6 homologue. *Nature* 1995; 377: 55-9.
17. Xu WG, Rould MA, Jun S, Desplan C, Pabo CO. Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5 Å resolution reveals structural basis for Pax developmental mutations. *Cell* 1995; 80: 639-50.
18. Kissinger C, Liu B, Martin-Blanco E, Kornberg T, Pabo C. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 1990; 63: 579-90.
19. Epstein J, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton D, Maas R L. Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax-6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev* 1994; 8: 2022-34.
20. Plaza S, Dozier C, Turque N, Saule S. Quail Pax-6(Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 3344-53.
21. Plaza S, Turque N, Dozier C, Bailly M, Saule S. C-myb acts as transcriptional activator of the quail Pax-6(Pax-QNR) promoter through two different mechanisms. *Oncogene* 1995; 10: 329-40.
22. Mucenski M, McLain K, Kier A, et al. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hematopoiesis. *Cell* 1991; 65: 677-89.
23. Plaza S, Dozier C, Langlois MC, Saule S. Identification and characterization of a neuroretina-specific enhancer element in the quail Pax-6(Pax-QNR) gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 892-903.
24. Maulbecker C, Gruss P. The oncogenic potential of pax genes. *EMBO J* 1993; 12: 2361-7.
25. Grueneberg D, Simon K, Brennan K, Gilman M. Sequence-specific targeting of nuclear signal transduction pathways by homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 3318-26.
26. Chalepakis G, Wijnholds J, Giese P, Schachner M, Gruss P. Characterization of Pax-6 and Hoxa-1 binding to the promoter region of the neural cell adhesion molecule LI. *DNA Cell Biol* 1994; 13: 891-900.
27. Cvekl A, Sax C, Bresnick E, Piatigorsky J. A complex array of positive and negative elements regulates the chicken  $\alpha$ A-Crystallin gene: Involvement of Pax-6, USF, CREB and/or CREM, and AP-1 proteins. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 7363-76.
28. Wistow G. Lens crystallins: gene recruitment and evolutionary dynamism. *Trends Biochem Sci* 1993; 301-9.



**Figure 2. Localisation de différentes mutations caractérisées chez l'homme.** A, La structure exon-intron du gène humain, avec sa numérotation est indiquée [12]. B, Comparaison des séquences en acides aminés composant les domaines de liaison à l'ADN paired et homéo chez les vertébrés et les invertébrés. Vertébrés: les séquences protéiques de tous les vertébrés analysés sont identiques à l'exception de l'acide aminé n° 82 du domaine paired qui est un G et non un S chez le poisson zèbre *Brachydanio rerio* [13, 14]. Oursin, *Paracentrotus lividus* [6]; ver nématode, *Cænorhabditis elegans* [4]; mouche, *Drosophila melanogaster* [5]. Il faut noter que l'oursin et les vertébrés sont tous des deutérostomes, ensemble monophylétique selon les données tant zoologiques que moléculaires. Ainsi, la distance entre l'oursin et la mouche est la même que celle entre la mouche et les vertébrés. Seuls les acides aminés variants sont indiqués chez les invertébrés. A, alanine; C, cystéine; D, acide aspartique; E, acide glutamique; F, phénylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, méthionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, sérine; T, thréonine; V, valine; W, tryptophane; Y, tyrosine.

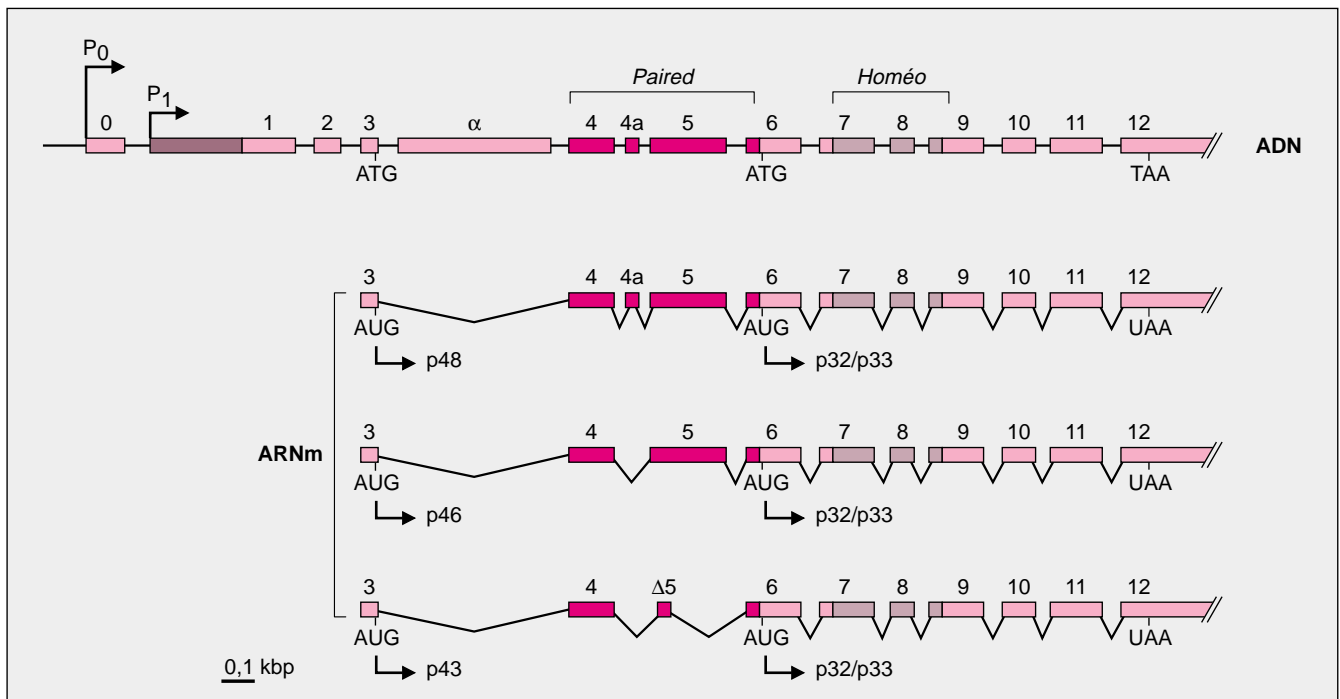


Figure 3. **Représentation des épissages alternatifs du gène Pax-6 de caille [15].** Les promoteurs de Pax-6 sont localisés: devant l'exon 0 pour P0 et l'exon 1 pour P1. Chez l'homme, l'exon 0 est numéroté 1. L'extrémité non codante des ARN messagers de Pax-6 n'est pas détaillée car celle-ci est elle-même soumise à un épissage alternatif. L'exon  $\alpha$  non codant [13], contient un enhancer spécifique des cellules de la neurorétine. ATG/AUG, codon initiateur de la méthionine; TAA/UAA, codon stop.

et *vab-3* (*C. elegans*); et 94% entre les domaines *paired* de *PAX-6* et *ey* (*Drosophila*); 93% de résidus identiques entre les homéodomaines de *PAX-6* et *vab-3* et 90% entre les homéodomaines de *PAX-6* et *ey* (figure 2B).

Les produits d'épissages alternatifs de *Pax-6* ont été essentiellement caractérisés chez la caille, figure 3 [15]. A l'exception de l'exon 10, où un épissage alternatif autorise ou non la présence de 6 acides aminés dans le domaine de régulation transcriptionnelle, tous les épissages alternatifs observés ont lieu dans le domaine *paired*. Une protéine, p32/p33, dépourvue de domaine *paired*, a également été observée dans la neurorétine aviaire. Cette protéine p32/p33 est probablement produite par un démarrage interne sur un codon AUG situé en aval du domaine *paired*. Cette observation n'est pas sans rappeler la situation existant chez *Caenorhabditis elegans* où, à côté de *vab-3* nécessaire au développement correct de la tête [4], une autre protéine Mab-18 requise pour la for-

mation d'organes des sens est produite grâce à un promoteur interne au locus *vab-3* et n'est autre que la protéine Vab-3 dépourvue du domaine *paired* [16].

Le domaine *paired* de la protéine *paired* de *Drosophila* complexé à sa séquence d'ADN cible a été récemment cristallisé [17]. Les résultats obtenus suggèrent que le domaine *paired* est structuré en deux sous-domaines (un sous-domaine aminoterminal et un sous-domaine carboxyterminal) organisés en hélices  $\alpha$ , selon le modèle précédemment décrit pour l'homéodomaine [18] (figure 4). Les deux sous-domaines codés par la boîte *paired* de *Pax-6* ont capables de reconnaître individuellement l'ADN sur des sites distincts [19]. Si nous supposons que le domaine *paired* de la protéine Pax-6 va adopter la même structure tri-dimensionnelle que celle du domaine *paired* de la protéine *paired* de *Drosophila*, la conséquence fonctionnelle des épissages alternatifs apparaît clairement: dans la protéine p48, un petit exon (4a, dénom-

mé 5a chez l'homme et la souris, et présent chez tous les vertébrés [14], voir figures 3 et 4) introduit 14 acides aminés entre les hélices 2 et 3 du sous-domaine aminoterminal, l'hélice 3 étant l'hélice de reconnaissance qui contacte l'ADN dans le grand sillon [17]. C'est cette hélice 3 qui stabilise le complexe protéine-ADN. L'insertion des 14 acides aminés de l'exon 4a entre les hélices 2 et 3 du domaine *paired*, dans la protéine p48, détruit l'agencement des 3 hélices et annule la capacité du sous-domaine aminoterminal de reconnaître l'ADN. Cela modifie ainsi la nature du site reconnu par le domaine *paired* de la protéine p48, qui ne pourra plus se lier à l'ADN que par son domaine carboxyterminal [19]. De même, dans la protéine p43, l'absence d'exon 5 supprime les hélices 3, 4 et 5 mais place les hélices 1 et 2 en continuité avec l'hélice 6 (hélice de reconnaissance du sous-domaine carboxyterminal). Cela suggère la création d'un nouveau domaine de liaison à l'ADN reconnaissant vraisemblablement une autre sé-

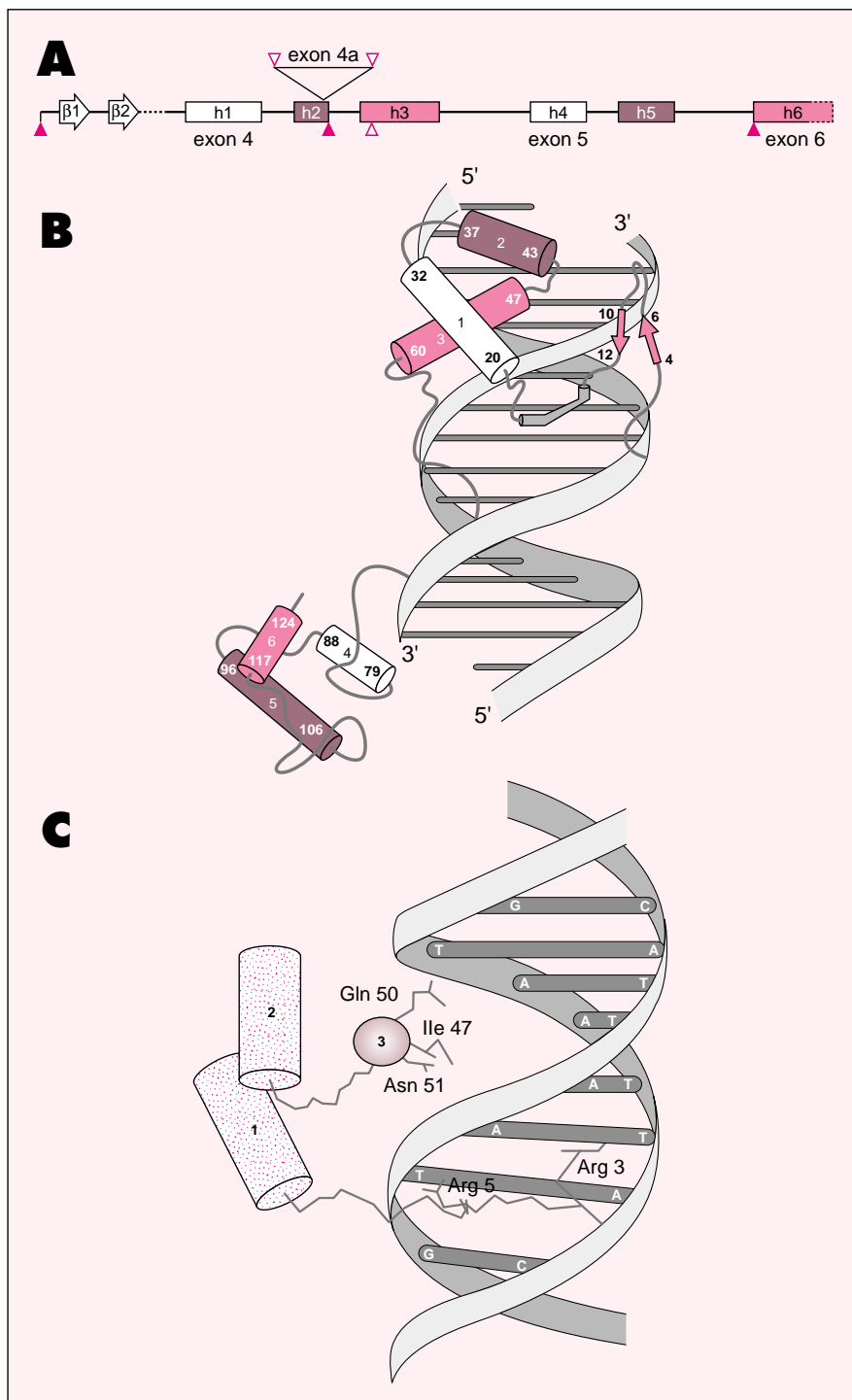


Figure 4. **Structure du domaine Paired du gène paired de drosophile et de l'homéodomaine du gène engrailed déterminée à partir de la diffraction des rayons X par des cristaux obtenus pour ces peptides avec leur ADN cible.** A, Les hélices  $\alpha$  (h1-6), définies par l'analyse cristallographique [17] sont replacées sur la séquence codante de PAX-6 (l'exon 5 code pour les hélices 1 et 2, l'exon 6 pour les hélices 3, 4 et 5, l'hélice 6 est codée par l'exon 7). Les limites des exons codant pour le domaine sont figurées par des triangles (pleins pour les exons codant pour la p46 et vides pour les exons alternatifs présentés dans la figure 3; la p43 perd ainsi les hélices 3, 4, et 5). B, Schématisation des domaines de liaison à l'ADN du domaine paired. C, Schématisation de l'homéodomaine de la protéine Engrailed [18]. Deux différences essentielles entre cet homéodomaine et celui de Pax-6: (1) la glutamine 50 est une sérine dans Pax-6 et cet acide aminé est essentiel dans la sélection de la séquence cible liée par l'homéodomaine; (2) l'homéodomaine de Pax-6 est capable de former des homodimères sur son ADN cible.

quence que celle reconnue par le domaine *paired* entier ou par chacun des sous-domaines (figure 4). Il est probable que les différentes protéines issues de *Pax-6* n'ont pas la même fonction. De fait, la différence d'activité de ces protéines issues de *Pax-6* est montrée par l'existence d'anomalies oculaires affectant un patient qui a

perdu la capacité de coder pour la protéine p46 à partir de l'un des allèles du gène ([12, 19], figure 2A). En revanche, la capacité de coder pour la protéine p48 est intacte, ce qui indique que les différentes protéines ne sont pas interchangeables. Cette observation montre clairement que les différentes protéines is-

sues de *Pax-6* contrôlent des gènes distincts.

### La régulation transcriptionnelle de Pax-6

Le fait que les cellules de la neuroretine d'embryon d'oiseau synthétisent

des quantités importantes de Pax-6, joint à la facilité d'étude de ce tissu *in vitro* nous a permis de montrer que Pax-6 est sous le contrôle de deux promoteurs, P0 et P1 [20] (figure 3). L'étude des différents mutants affectés dans PAX-6 indique qu'un effet de dose de ce gène est critique dans l'émergence des anomalies oculaires [12, 14]. Les régulateurs modulant l'activité des promoteurs de Pax-6 sont essentiels dans l'activité du gène. La question qui se pose alors est de savoir comment ces promoteurs sont mis en route, comment leur activité est entretenue, puis quels sont les mécanismes qui permettent d'assurer la spécificité tissulaire dans l'accumulation des messagers de ce gène. A côté des facteurs mettant en route l'expression doivent exister des facteurs d'entretien de cette expression et ces facteurs ne sont pas nécessairement identiques. Nous avons montré que les promoteurs P0 et P1 sont l'un et l'autre activés par le produit du proto-oncogène *c-myb* [21]. C-myb est un facteur de transcription dont la fonction est requise pour la mise en place de l'hématopoïèse définitive de l'embryon [22]. Le produit de ce gène, qui est exprimé dans la neurorétine, possède plus de 20 sites de fixation sur l'ADN entourant le promoteur P0 et

pourrait ainsi contribuer à moduler l'expression de Pax-6 dans ce tissu (figure 5). De plus, Pax-6 est capable de s'autorégler (figure 5). Ainsi, une fois le gène induit, la protéine p46 est capable d'en maintenir l'activité (figure 5). Il faut noter qu'aucune des autres protéines codées par Pax-6 n'est capable de moduler l'expression des promoteurs P0 et P1. L'étude de l'expression de Pax-6 dans les embryons de souris *sey/sey* indique que la capacité de Pax-6 de s'autorégler est déterminante pour l'expression de ce gène dans l'ectoderme et pour la formation de la placode cristalline [10]. Ce phénomène d'auto-régulation ne serait, en revanche, pas critique pour l'expression de Pax-6 dans la neurorétine.

La capacité de la protéine p46 d'activer les promoteurs de Pax-6 peut être un élément de la restriction tissulaire dans le maintien de l'expression de ce gène, cette protéine n'étant, par définition, présente que dans les tissus dans lesquels le gène s'exprime. D'autres éléments interviennent dans cette restriction. Une séquence fonctionnant comme un *enhancer* spécifique du tissu est présente en aval du promoteur P1 [23]. Ce *enhancer* (que nous avons appelé  $\alpha$ ) (figure 3) permet spécifiquement d'accroître l'activité de P0 dans la neurorétine ce qui

expliquerait (au moins en partie) l'accumulation élevée des ARN messagers Pax-6 dans les cellules de la neurorétine (figure 5). Ce *enhancer* n'a qu'un effet marginal dans la neurorétine préparée à partir d'embryons de caille âgés de 5 jours (E5), mais est pleinement fonctionnel dans la neurorétine d'embryons préparés à E8. Cette observation suggère qu'une activité réglée au cours du développement est nécessaire pour que la séquence  $\alpha$  soit un *enhancer*. De fait, ce *enhancer*  $\alpha$  agit sur le promoteur P0, mais est sans effet sur le promoteur P1. Or, à E5 seuls les ARNm commençant à P1 sont détectables. Les ARN débutant à partir de P0 n'apparaissent que plus tardivement dans la neurorétine, au moment où la différenciation neuronale se met en place [20]. Ce résultat suggère qu'il existe dans les neurones rétiniens, au moment de leur différenciation, une plus grande quantité du facteur de transcription Pax-6 que dans les autres cellules. La protéine p46 est capable de se fixer sur toute une famille de séquences. L'affinité de la protéine pour une séquence donnée dépend de la nature de cette séquence. Ainsi, les gènes porteurs des séquences de fixation de forte affinité pourraient être activés en présence d'une faible quantité de protéine p46.

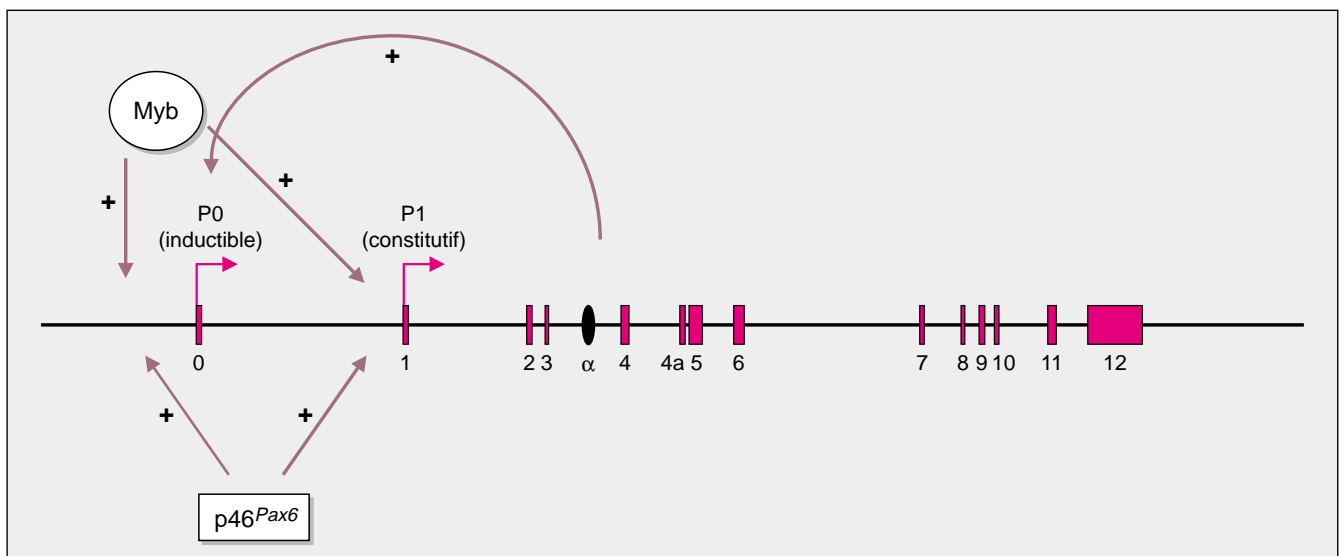


Figure 5. **Résumé des événements positifs de régulation affectant Pax-6 dans la neurorétine** [20, 21, 23]. Le produit du gène *c-myb* exprimé dans la neurorétine et  $p46^{Pax-6}$  sont capables d'activer les promoteurs P0 et P1. Une séquence ( $\alpha$ ) en aval du promoteur P1 fonctionne comme un *enhancer* spécifique du tissu neurorétinien, pleinement fonctionnel chez les embryons (de caille) de 8 jours. Il agit uniquement sur le promoteur P0. A 5 jours, seuls les ARN commençant à P1 sont détectables.

L'utilisation simultanée des deux promoteurs permettrait d'augmenter la quantité de protéine p46 dans les neurones; elle pourrait alors également activer des gènes porteurs de séquence de fixation de faible affinité, permettant ainsi de régler des gènes cibles différents en fonction de la quantité de protéine p46 disponible.

### Quelles fonctions remplissent les produits de Pax-6 ?

Nous avons vu que le gène *Pax-6* est capable de coder pour plusieurs protéines par épissage alternatif et démarrage interne. Ces protéines sont probablement toutes des facteurs de transcription ayant des gènes cible distincts. *Pax-6* s'exprime durant toutes les périodes couvrant la formation de la rétine, et persiste une fois celle-ci pleinement différenciée. Il est donc probable que les produits de ce gène interviendront pour remplir des fonctions distinctes selon l'âge de la neurorétine (figure 6). La formation de ce tissu peut être scindée schématiquement en deux grandes étapes: (1) une phase de multiplication cellulaire; (2) une phase de délamination et de formation des strates cellulaires suivie de différenciation. La sur-expression de *Pax-6* est capable de rendre des cellules tumorigènes [24] suggérant par là un rôle de Pax-6 dans la prolifération cellulaire. D'un point de vue physiologique, ce rôle pourrait être important lors de la multiplication des cellules de la future rétine (figure 6). Cette fonction pourrait être dépendante de l'homéodomaine. Il est frappant de constater que l'activité des protéines Pax est décrite comme uniquement dirigée par le domaine *paired*, alors que l'homéodomaine doit, selon toute probabilité, être également responsable d'une partie de l'activité de ces protéines. D'une façon générale, l'homéodomaine est capable de se lier à l'ADN, mais peut également interagir avec d'autres protéines par l'intermédiaire de sa portion aminoterminal. Une telle cible des homéodomaines de type *paired* est constituée par les protéines SRF (*serum responsive factor*) et TCF/Elk1 (*ternary complex factor*). L'homéodomaine, par l'intermédiaire de résidus exposés à la

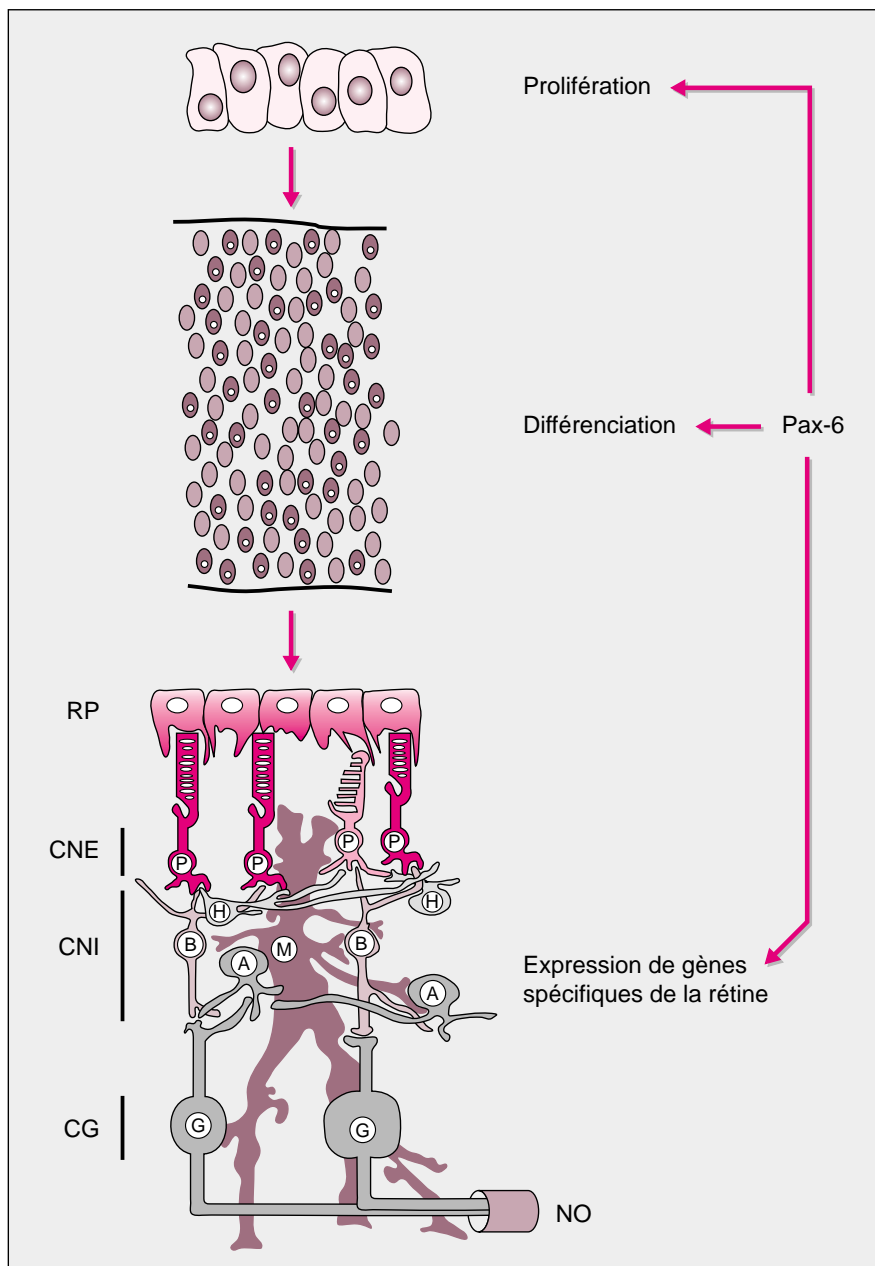


Figure 6. **Implication possible de Pax-6 selon les différentes étapes de la formation de la neurorétine.** Les cellules constituant la neurorétine différenciée sont: P: photorécepteurs; H: neurones horizontaux; B: neurones bipolaires; A: neurones amacrine; G: neurones ganglionnaires; M: cellule gliale de Müller; NO: nerf optique; RP: rétine pigmentaire; CNE: couche neuronale externe; CNI: couche neuronale interne; CG: couche ganglionnaire.

surface des hélices 1 et 2, réalise les contacts interprotéiques conduisant à la constitution du complexe qui se fixe sur le site SRE (*serum responsive element*), localisé en amont du promoteur du gène *c-fos*. C-Fos est un membre du complexe activateur de la transcription AP-1 (*activator protein 1*), qui est induit d'une façon transitoire

et rapide à la suite d'un signal mitogène. Le fait qu'un homéodomaine de type *paired* intervienne dans la réalisation de ce complexe pourrait expliquer la façon dont Pax-6 induit la prolifération cellulaire [25]. *Pax-6* doit également jouer un rôle dans la différenciation cellulaire. De ce point de vue, il est intéressant de

noter que la p46 est capable de se fixer sur le promoteur du gène codant pour la protéine d'adhérence cellulaire L1 (CAM *cell adhesion molecule*) présente dans la neurorétine et impliquée dans les contacts intercellulaires [26]. Une variation quantitative de cette protéine d'adhérence à la surface des cellules peut conditionner la différenciation des cellules voisines. Enfin, une étude réalisée *in vivo* montre que *Pax-6* est requis pour l'expression du gène *Msx-1* [10] qui code pour un facteur à homéodomaine, répresseur de la différenciation cellulaire.

Enfin, bien que de tels gènes n'aient pas été encore identifiés dans la neurorétine, il est probable que *Pax-6* contribue à contrôler l'expression de gènes dont la fonction serait spécifique de la neurorétine une fois celle-ci complètement différenciée. Récemment, il a été montré que la protéine p46 pouvait régler le promoteur des gènes codant pour les cristallines [27]. Ces protéines s'accumulent en grande quantité dans le cristallin, sont responsables des propriétés optiques de celui-ci [28] et pourraient représenter les produits de tels gènes.

## Conclusion

La découverte de *Pax-6* a permis de mettre en évidence un certain nombre d'éléments inattendus.

1. Les bases génétiques de la formation de l'œil sont conservées entre les invertébrés et les vertébrés. Cela n'était pas évident dans la mesure où l'on supposait que la formation de l'œil dans ces différentes espèces était le résultat de convergences évolutives (*m/s n° 5, vol. 11, p. 776*) [8].

2. Un seul gène est capable de programmer la cascade de tous les événements conduisant à la formation d'un œil de drosophile. Il reste à montrer que cette capacité est conservée pour *Pax-6* chez les vertébrés. Le fait que, chez la drosophile, la p46 de souris soit capable à elle seule de remplir cette fonction alors que *Pax-6* code chez les vertébrés pour au moins quatre protéines, incite à être prudent sur cette possibilité.

Chez l'homme, une réduction de l'activité de *Pax-6* est impliquée dans l'aniridie (*m/s n° 2, vol. 8, p. 181*), et cette anomalie à transmission autosomique dominante est présente avec une incidence variant entre 1/64 000 et 1/96 000 dans différentes populations [14]. Environ deux cas sur trois sont d'origine familiale. Est-il possible de corriger ces défauts oculaires en augmentant le dosage génique dans les tissus lésés? Il faut d'abord définir la période critique d'action, la dose et celle des protéines *Pax-6* requise. La régulation extrêmement fine de l'expression de *Pax-6*, la multiplicité de ses produits et l'étendue de ses fonctions rendent extrêmement difficile l'utilisation de la thérapie génique pour corriger les défauts induits par un dysfonctionnement de ce gène. Toutefois, la grande spécificité tissulaire des séquences de régulation de *Pax-6* pourrait être mise à profit pour cibler vers l'œil l'expression d'un gène utile ■

## TIRÉS À PART

S. Saule.

## Summary

### An eye over *Pax-6*

*Pax-6* is a member of the *Pax* gene family encoding phylogenetically conserved transcription factors. Some of these genes, like *Pax-6*, bear two DNA-binding domains, namely the paired- and the homeodomains, the others bearing the paired domain only. In vertebrates, *Pax-6* is expressed in the central nervous system and the endocrine pancreas. *Pax-6* was recently shown to be a key regulator of eye development in both mammals and flies, and to act as the master gene of drosophila eye development. In vertebrates *Pax-6* encodes four different proteins with distinct DNA-binding domains. *Pax-6* is expressed through two promoters, P0 and P1. P1 is active first, P0 being activated at the onset of neuronal differentiation under the control of an intragenic sequence. Both promoters are activated by the *Pax-6* p46 product and the *c-myc* oncogene product expressed in the neuroretina. The multiplicity of the *Pax-6* products and their probable involvement in distinct steps of the eye morphogenesis may explain why this gene is a master gene of eye development.

## Remerciements

Ce travail a été rendu possible grâce au soutien du Cnrs, de l'Institut Pasteur de Lille, de l'ARC et de l'Association Retinitis pigmentosa.

## LE COMITÉ CONSULTATIF NATIONAL D'ÉTHIQUE POUR LES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

a été créé en 1983 par le président de la République et est désormais inscrit dans la loi. Il rassemble une quarantaine de membres venant d'horizons très variés, qui réfléchissent aux dangers que les avancées de la science peuvent susciter. Organisme purement consultatif, sa mission est de « donner des avis sur les problèmes éthiques soulevés par les progrès de la connaissance dans les domaines de la biologie, de la médecine et de la santé et de publier des recommandations sur ces sujets ».

- Le Comité souhaitant participer à l'information du public et de toutes les professions intéressées publie, chaque trimestre, « **Les Cahiers du Comité consultatif national d'éthique** ».
- Chaque numéro des « **Cahiers du Comité** » est centré sur un thème ayant fait l'objet d'un avis récent du Comité. Il diffuse le texte intégral de l'avis accompagné de son rapport. Il présente une bibliographie, une étude de la situation à l'étranger et de libres propos d'intervenants extérieurs au Comité. Cette présentation des travaux du Comité faisant place à des données internationales, à de libres opinions permet d'avoir une appréciation plus globale des problèmes abordés.

**L'abonnement aux « Cahiers du Comité consultatif national d'éthique » (4 numéros par an) est de 185 F.**

Pour tout renseignement, s'adresser à madame Anne Bernard au Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé, 71, rue Saint-Dominique, 75007 Paris. Tél. : 44.42.48.52/53 - Fax : 44.42.48.48.