

Université de Montréal

Rôles des gènes *Pitx* dans le développement des membres postérieurs :
régulation transcriptionnelle de *Tbx4*

Par

Emilie Dumontier

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade

de Maître ès sciences (M.Sc.)

en biologie moléculaire

Avril 2005

© Emilie Dumontier, 2005



QH
506
U54
2005
v.030

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Rôles des gènes *Pitx* dans le développement des membres postérieurs : régulation
transcriptionnelle de *Tbx4***

Présenté par :

Emilie Dumontier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : _____ Muriel Aubry _____

Membre du jury : _____ Jacques Michaud _____

Directeur de recherche : _____ Jacques Drouin _____

Mémoire accepté le : _____

Résumé

Pitx1 et *Pitx2* sont des facteurs de transcription à homéodomaine. *Pitx1* est exprimé de façon spécifique dans les membres postérieurs où il contrôle la spécification de leur identité. *Pitx2* est exprimé du côté gauche dans le mésenchyme de la lame latérale et participe à la spécification de l'asymétrie gauche-droite. À mon arrivée au laboratoire, les souris *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} avaient été générées. Contrairement à la simple inactivation du gène *Pitx1*, où tous les éléments squelettiques sont présents mais dont l'identité postérieure est transformée, l'inactivation de *Pitx1* et *Pitx2* entraîne la perte de plusieurs éléments squelettiques. Ceci démontre que les *Pitx* sont nécessaires à la croissance des membres postérieurs.

Les études sur les doubles-mutants sont difficiles à cause du nombre très limité d'embryons disponibles. Afin de discerner le(s) rôle(s) de *Pitx1* dans les membres, j'ai tout d'abord opté pour une approche globale d'immunoprécipitation de la chromatine pour identifier les gènes cibles. Les outils disponibles ne m'ont cependant pas permis de cloner de nouvelles cibles par cette technique. Plusieurs études ont par contre suggéré un rôle de *Tbx4*, en aval de *Pitx1*, dans le processus de spécification d'identité. J'ai donc procédé à une analyse systématique du locus de *Tbx4* dans le but d'identifier des éléments promoteurs. L'étude de ce locus m'a permis de mettre en évidence l'existence d'un nouveau site d'initiation. J'ai également identifié des régions conservées qui sont activables par *Pitx1* en transfection transitoire dans les cellules hétérologues. *Tbx4* pourrait ainsi devenir la première cible directe de *Pitx1* dans les membres postérieurs.

Mots clés : Spécification des membres, Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Abstract

Pitx1 and *Pitx2* are homeobox transcription factors. *Pitx1* is expressed specifically in the hindlimbs where it controls limb identity. *Pitx2* is expressed in the left lateral plate mesoderm and is part of the pathway that specifies left/right asymmetry. Hindlimbs of *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} embryos are much more severely affected than the simple knockouts for either *Pitx1* or *Pitx2* (*Pitx2* knockout embryos do not have any limb phenotype). There was an important loss of proximal and anterior skeletal elements in the *Pitx1/2* double-knockout mice. This clearly demonstrates that *Pitx1* and *Pitx2* genes are necessary on both sides of the embryos for proper hindlimb growth.

Studies on the *Pitx1/2* double-knockouts are difficult because of the very small number of embryos that can be obtained. To further delineate *Pitx1* role in hindlimb development, I used an unbiased approach, chromatin immunoprecipitation, to identify its target genes. Unfortunately, available tools weren't efficient enough to allow cloning and identification of immunoprecipitated DNA. It's been suggested that *Tbx4* might specify hindlimb identity, working downstream of *Pitx1*. Analysis of the *Tbx4* locus revealed a new transcription start site for the *Tbx4* gene. I also found conserved regions in the *Tbx4* locus that have potential binding sites for Pitx1 and that are activated by Pitx1. *Tbx4* seems to be the first known direct target of Pitx1 in hindlimbs.

Key words: limb identity, limb patterning, chromatin immunoprecipitation

Table des matières

Titre	I
Identification du jury	II
Résumé	III
Abstract.....	IV
Table des matières	V
Liste des figures.....	IX
Liste des sigles et abréviations	XI
Remerciements	XVIII

Chapitre 1. Introduction

1.1 Origine embryonnaire des membres	2
1.2 Positionnement des membres le long de l'axe A/P de l'embryon.....	2
1.3 Initiation de la croissance des membres	4
1.3.1 Rôles des FGFs.....	4
1.3.2 Rôles des Wnts	7
1.4 Les membres en trois-dimensions : l'importance des centres organisateurs pour la croissance et la spécification des membres	9
1.4.1 L'AER	11
1.4.2 La ZPA (zone d'activité polarisante)	16
1.4.3 L'ectoderme dorsal et ventral.....	21
1.4.4 Les gènes Meis et la spécification proximale.....	22
1.4.5 Liens entre centres organisationnels.....	23

1.5 Détermination de l'identité des membres	24
1.6 Rôles des <i>Pitx</i> au cours du développement embryonnaire	27
1.6.1 Famille des <i>Pitx</i>	27
1.6.2 <i>Pitx1</i>	29
1.6.3 <i>Pitx2</i>	35
1.6.4 <i>Pitx3</i>	41
1.7 Facteurs de transcription à boîte T (<i>Tbx</i>)	42
1.7.1 Généralités	42
1.7.2 <i>Tbx5</i>	43
1.7.3 <i>Tbx4</i>	45
1.8 Perspectives évolutives	47
1.9 Hypothèses de travail	49

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1 Souris	51
2.2 Whole-mount	51
2.3 Immunohistochimie	52
2.4 Génération des anticorps	52
2.5 Extraits nucléaires et immunoprécipitation	53
2.6 Western blot	54
2.7 Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	54
2.8 Clonage des ChIPs et hybridation des colonies	56
2.9 Plasmides et oligos	57
2.10 Culture cellulaire et transfections	58

2.11 Analyses bio-informatiques.....	59
2.12 Extraction d'ARN et RT-PCR.....	59

Chapitre 3. Résultats

3.1 Rôle des gènes <i>Pitx</i> au cours du développement des membres postérieurs	62
3.1.1 Retard spécifique de <i>Fgf8</i> dans l'AER des embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{+/-}	62
3.1.2 L'expression précoce de <i>Fgf10</i> dans le mésenchyme de la lame latérale (mll) ne semble pas affectée dans les embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{+/-}	64
3.1.3 Analyse de la prolifération et de l'apoptose dans les embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{+/-}	66
3.1.4 La signalisation antéro/postérieure (A/P) et dorso/ventrale (D/V) sont intactes dans les embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{+/-}	68
3.1.5 Retard important de croissance des membres postérieurs chez le seul embryon <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{-/-} obtenu	70
3.2 Recherche de gènes cibles.....	73
3.2.1 Spécificité des anticorps α - <i>Pitx1</i>	74
3.2.2 Les anticorps α - <i>Pitx1</i> immunoprécipitent spécifiquement <i>Pitx1</i>	76
3.2.3 Les anticorps α - <i>Pitx1</i> fonctionnent en ChIP.....	78
3.3 <i>Tbx4</i> , gène cible potentiel de <i>Pitx1</i>	83
3.3.1 Organisation génomique du gène <i>Tbx4</i>	83
3.3.2 Régions conservées du locus <i>Tbx4</i>	86
3.3.3 <i>Pitx1</i> active trois régions conservées du locus <i>Tbx4</i> en transfection.....	88
3.4 Conclusions	92

Chapitre 4. Discussion

4.1 Analyse des embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{+/-}	94
4.2 Recherche de gènes cibles.....	103
4.3 <i>Tbx4</i> , gène cible potentiel de <i>Pitx1</i>	108

Bibliographie	116
----------------------------	-----

Annexe I	XIX
-----------------------	-----

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

Figure 1.1 Initiation et croissance des bourgeons des membres	5
Figure 1.2 Spécification des bourgeons des membres dans les trois axes.....	10
Figure 1.3 La famille <i>Pitx</i>	28
Figure 1.4 <i>Pitx1</i>	30
Figure 1.5 <i>Pitx2</i>	36
Figure 1.6 Redondance entre <i>Pitx1</i> et <i>Pitx2</i> dans l'hypophyse	39

Chapitre 3. Résultats

Figure 3.1 Retard spécifique de l'expression de <i>Fgf8</i> au moment de l'initiation de l'AER dans les embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{+/-}	63
Figure 3.2 L'expression précoce de <i>Fgf10</i> ne semble pas affectée dans les embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{+/-}	65
Figure 3.3 Analyse de la prolifération et de l'apoptose dans les embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{+/-}	67
Figure 3.4 La signalisation antéro/postérieure (A/P) et dorso/ventrale (D/V) sont intactes dans les embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{+/-}	69
Figure 3.5 Retard important de croissance des membres postérieurs chez le seul embryon <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{-/-} obtenu	72
Figure 3.6 Spécificité des anticorps α - <i>Pitx1</i>	75
Figure 3.7 Les anticorps α - <i>Pitx1</i> immunoprécipitent spécifiquement <i>Pitx1</i>	77
Figure 3.8 Résultats de CHIP (Q-PCR).....	80

Figure 3.9 Détermination d'un nouveau site d'initiation pour le gène <i>Tbx4</i>	85
Figure 3.10 Régions conservées du locus <i>Tbx4</i>	87
Figure 3.11 Activité des régions clonées du locus <i>Tbx4</i> en transfection.....	90

Liste des sigles et abréviations

A	adénosine
ACTH	hormone adreno-corticotropique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AER	« apical ectodermal ridge »
Alx4	« aristaless-like homeobox protein 4 »
ANF	« atrial natriuretic factor »
A/P	antéro/postérieur
AP1	« activator protein 1 (jun/fos) »
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique transfert
Arp1	« All1 regulated protein 1 »
ASMD	« anterior segment mesenchymal dysgenesis »
BAC	« bacterial artificial chromosome »
β-gal	β-galatosidase
bHLH	« basic helix-loop-helix protein »
Bmp	« bone morphogenetic protein »
BmpR	« bone morphogenetic protein receptor »
BrDU	5'bromo 2'désoxy-uridine
BSA	« bovine serum albumine »

C	cytosine
Cd44	« cell differentiation antigen 44 »
ChIP	immunprécipitation de la chromatine
CMV	« cytomegalovirus promoter »
cpm	coups par minute
Cre	« Cre recombinase enzyme »
Cyp26b	Cytochrome P450, famille 26B
dHand (ou hand2)	« heart and neural crest derivative express 2 »
Dig	digoxygénine
DMEM	« Dubelcco's modified Eagle medium »
DMSO	diméthyl sulfoxyde
dNTP	nucléotides
DTT	dithiothréiotol
D/V	dorso-ventral
e	jour embryonnaire
ect.	ectoderme
EDTA	« ethylene diamine tetra acetic acid »
EEC	« ectrodactyly ectodermal dysplasia, facial cleft »
EGTA	« ethylene glycol diamine tetra acetic acid »
e.n.	extraits nucléaires
En1	« Engrailed 1 »
EST	« expressed sequence tags »

FBS	« fetal bovine serum »
Fgf	« fibroblast growth factor »
FgfR	« fibroblast growth factor receptor »
FSH	« follicle stimulating hormone »
G	guanine
Gdf11	« growth differentiating factor 11 »
GH	« growth hormone »
Gli	gene isolé dans glioblastomes
GnRHR	« gonadotropin releasing hormone receptor »
Gsk3	« glycogen synthase kinase 3 »
GST	glutathione-s-transférase
α -GSU	« α -gonadotropin sub-unit »
HOS	syndrome Holt-Oram
Hox	« homeobox »
HRP	« horseradish peroxidase »
Id	« limb deformity »
IgG	immunoglobuline G
kb	kilobases
ko	« knock-out »

LacZ	gène rapporteur codant pour la β -galactosidase
Lef	« lymphoid-enhancing factor »
LH β	« luteinizing hormone β »
Lhx3	« lim homeobox protein 3 »
Lmx1b	« lim homeobox 1b »
M	molaire
m.a.	membres antérieurs
MBP	« maltose binding protein »
Meis	« meiotic S gene »
més. som.	mésoderme somitique
mi	mésoderme intermédiaire
ml	millilitres
mll	mésoderme de la lame latérale
m.p.	membres postérieurs
Msx	« muscle segment homeobox »
NaDOC	sodium déoxycholate
NCBI	« National Center for Biotechnology Information »
néo	néomycine
NeuroD1	« neurogenic differentiation factor 1 »
Nkx2.5	« NK2 transcription factor related, locus 5 »
NP-40	Nonidet P-40

Otx	« orthodenticle homolog homeobox »
P	phosphorylation
p.	page
P1	« 1 day post-birth »
PAGE	« polyacrylamide gel electrophoresis »
Pan1	« pancreas protein 1 »
pb	paire de bases
PBS	« phosphate buffer solution »
Pbx	« pre-B-cell leukemia transcription factor »
PCR	« polymerase chain reaction »
P/D	proximo-distal
PFA	paraformaldéhyde
PH3	phospo-histone3
Pit1	« pituitary-specific positive transcription factor 1 »
Pitx	« pituitary homeobox »
PLOD1	« procollagen-lysine oxoglutarate dioxygenase 1 »
PMSF	« phenyl methyl sulfonyl fluoride »
POMC	proopiomélanocortine
P-Otx	« pituitary Otx related homeobox »
PRL	prolactine
Ptc1	« patched1 »
Ptx	« pituitary homeobox »

PVDF	« polyvinylidene fluoride »
PZ	« progress zone »
Q-PCR	« quantitative polymerase chain reaction »
5' RACE	« 5' rapid amplification of cDNA end »
Raldh2	« retinaldehyde dehydrogenase 2 »
RAR	récepteur de l'acide rétinoïque
Rieg	« Rieger syndrome related gene »
RLU	« relative lights units »
Rfng	« radical fringe »
RSV	« Rous sarcoma virus promoter »
RT-PCR	« reverse transcriptase polymerase chain reaction »
SAGE	« serial analysis of gene expression »
SDS	sodium dodécyl sulfate
SF1	« steroidogenic factor 1 »
SHFM	« split hand/split foot malformations »
Shh	« sonic hedgehog »
som.	somites
Smo	« smoothened »
SSC	sodium chloride/sodium citrate
T	tyrosine

TBP	« TATA box binding protein »
Tbx	protéine à boîte T
Tcf	« transcription factor 1 »
Tgf β	« transforming growth factor β »
TH	tyrosine hydroxylase
TPit (ouTbx19)	« Tbox pituitary »
TSH	« thyroid-stimulating hormone »
TUNEL	« TdT-mediated Dig-dUDP nick-end labeling »
UCSC	Université de Californie à Santa Cruz
UTP	uracil tri-phosphate
UV	rayons ultra-violets
V	volt
Vista	« visualizing tool for alignment »
vol.	volume
vs	versus
W	« wash »
Wnt	« wingless/int »
ZPA	zone d'activité polarisante

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon fiancé, David Guertin, pour son amour inconditionnel. Je remercie également ma famille, ma mère Claire, ma sœur Karine avec sa famille, Carl, Laurence, Alexandre et Sophie, ainsi que mon frère Hugues, pour leurs encouragements continuels.

Je voudrais également remercier tous les membres présents et passés du laboratoire Drouin, notamment le Dr Jacques Drouin, Alexandre Marcil, Dr Frédérique Souazé. J'aimerais particulièrement remercier tous les gens du « petit labo », ainsi que des collègues de travail qui, à force, sont devenus mes amis, notamment Jean-François Ouimette, Vincent Coulon et Aurore L'Honoré. Je vous remercie pour tous vos conseils, votre bonne (ou mauvaise) humeur presque contagieuse. Je veux spécialement remercier J.-F. pour l'aide qu'il m'a fournie lors de la rédaction de ce mémoire.

Chapitre 1

Introduction

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Origine embryonnaire des membres

Les membres des vertébrés sont induits à des endroits spécifiques le long de l'axe antéro/postérieur (A/P) de l'embryon. Ils sont formés de cellules du mésoderme de la lame latérale (mll) qui prolifèrent spécifiquement dans ces régions formant ainsi les bourgeons des membres. Ceux-ci sont donc composés de mésenchyme non-différencié recouvert d'un épithélium de surface. La croissance et la spécification des membres sont contrôlées par des interactions spécifiques entre le mésenchyme et l'épithélium de surface (Capdevila *et al.*, 2001;Dudley and Tabin, 2003;Niswander, 2003). Les cellules du mésenchyme vont éventuellement se différencier pour former la structure squelettique du membre mature (os, tendons), tandis que les muscles proviennent du mésoderme somitique: les myoblastes migrent à partir des somites jusque dans les bourgeons des membres où ils vont se différencier pour donner naissance aux différentes masses musculaires caractéristiques à chaque membre (Christ *et al.*, 1977;Jacob M *et al.*, 1979).

1.2 Positionnement des membres le long de l'axe A/P de l'embryon

La première étape du développement des membres est la détermination d'un groupe de cellules qui formeront le territoire présomptif des membres. Ces cellules du mll sont localisées à des positions bien spécifiques le long de l'axe rostro/caudal de l'embryon : les membres antérieurs se développant toujours à la jonction des vertèbres thoraciques et cervicales, et les membres postérieurs, à la jonction des vertèbres lombaires et sacrales (Burke *et al.*, 1995). Dans les embryons de souris, les membres antérieurs se situent toujours entre les somites 8 et 12, et les membres postérieurs entre

les somites 25 à 29 (Crossley *et al.*, 1996; Martin, 1998). Le code *Hox* serait impliqué dans le positionnement bien précis des membres : il existe une combinaison spécifique de gènes *Hox* qui sont exprimés à différents niveaux de l'embryon, ce qui confère une identité positionnelle selon l'axe rostro-caudal. Par exemple, la frontière d'expression de plusieurs gènes *Hox* dans le mll, dont *Hoxc6*, *Hoxc8* et *Hoxb5*, corrèle exactement avec l'emplacement des membres antérieurs; dépendamment des espèces, les membres antérieurs se situent à des niveaux différents, par rapport aux somites, qui corrèlent précisément avec l'expression de ces *Hox* (Oliver *et al.*, 1990; Rancourt *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1996; Cohn *et al.*, 1997; Cohn and Tickle, 1999; Gaunt, 2000). Aussi, dans les embryons *Hoxb5*^{-/-}, on note un déplacement antérieur de la jonction omoplate/humérus par rapport à l'axe du corps, ce qui suggère un rôle pour ce gène dans le positionnement des membres antérieurs (Rancourt *et al.*, 1995).

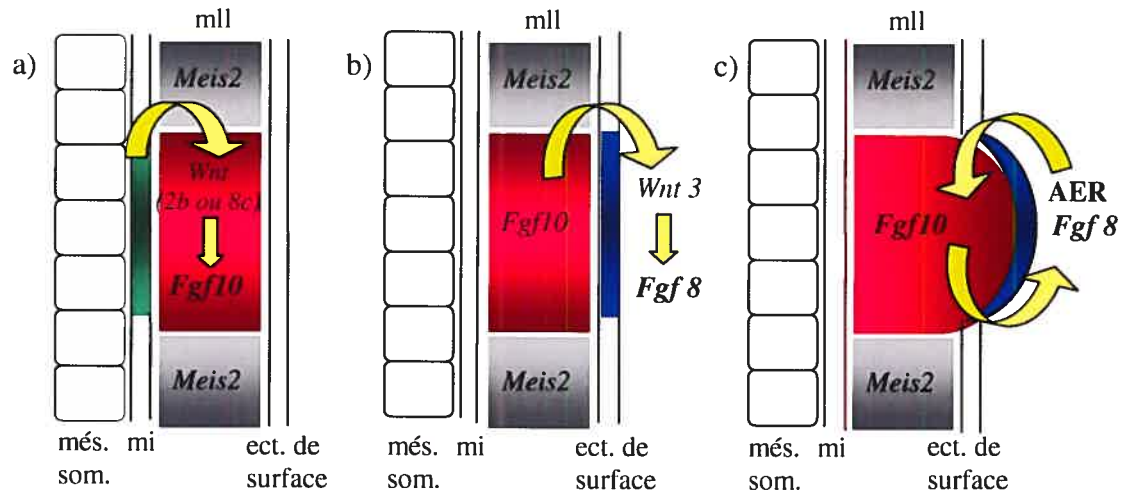
L'acide rétinoïque, certains facteurs de transcription (dont *Krox20*), et certaines molécules de signalisation comme les Fgfs et les Tgfβ semblent être en amont des gènes *Hox*. Par exemple, les embryons *Gdf11*^{-/-} (un membre de la famille des Tgfβ) montrent des transformations homéotiques avec un déplacement plus caudal des membres postérieurs. Ce déplacement serait dû à des altérations dans le patron d'expression de certains *Hox*, notamment *Hoxc10* et *Hoxc11* (McPherron *et al.*, 1999). Par ailleurs, il semblerait que *Tbx3*, *dHand* et *Gli3* agissent en aval des *Hox* dans le contrôle du positionnement des membres. D'une part, la surexpression de *Tbx3*, un facteur de transcription de la famille des protéines à boîte T, change la position axiale des membres antérieurs chez le poulet (Rallis C. and Logan M, 2004; Rallis C. *et al.*, 2005). D'autre part, les protéines dHand et Gli3, dont l'implication dans la spécification A/P des

bourgeons de membres sera discutée plus loin (section 1.4.2 La ZPA, p.16), semblent également avoir un rôle dans le positionnement des membres le long de l'axe rostro-caudal de l'embryon (Rallis C. *et al.*, 2004).

1.3 Initiation de la croissance des membres

1.3.1 Rôle des Fgfs

L'induction des bourgeons des membres est sous le contrôle de molécules de la famille des *Fgfs* (Martin, 1998). Les *Fgfs* sont des facteurs de croissance (22 Fgfs), dont cinq sont exprimés dans les membres (*Fgf4/8/9/10/17*) (Gorivodsky and Lonai, 2003). Ces peptides sécrétés, qui peuvent lier avec haute affinité la matrice extracellulaire, participent à la signalisation intercellulaire via les *FgfRs*, des récepteurs à activité tyrosine kinase (Wilkie *et al.*, 2002). Des quatre membres de la famille des *FgfRs*, deux sont exprimés dans les membres chez la souris (*FgfR1/2*) (Peters *et al.*, 1992). Chaque récepteur code pour plusieurs isoformes qui ont des patrons d'expression et des affinités de liaison pour chaque *Fgf* différents (Partanen *et al.*, 1993; Martin, 1998; Xu *et al.*, 1998). Chez le poulet, un seul Fgf (soit *Fgf2/4/8* ou 10) est suffisant pour induire l'initiation et le développement complet d'un membre ectopique dans le flanc embryonnaire, qui est le mlI situé entre les membres antérieurs et postérieurs (Harrison, 1918). En principe, si le Fgf est appliqué avant la croissance normale des membres, tout le flanc est compétent à former un membre (Mahmood *et al.*, 1995; Cohn *et al.*, 1995; Ohuchi *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1996; Crossley *et al.*, 1996; Yonei-Tamura *et al.*, 1999).



Adapté de Capdevila and Belmonte, 2001

Spécification du territoire présumé des membres (entre 15 et 20 somites – e9)

Induction de *Fgf 8* et de l'AER via la voie Wnt (vers 27 somites)

Croissance via une boucle de régulation entre *Fgf10* et *Fgf 8* (à partir de 30 somites – e10)

Figure 1.1: Initiation et croissance des bourgeons des membres: L'induction du territoire présumé des membres se fait via des molécules qui proviennent du mésoderme intermédiaire (mi). Chez le poulet, ce sont des membres de la famille *Wnt* (*Wnt2b* dans les membres antérieurs et *Wnt8c* dans les membres postérieurs) qui permettent la restriction de l'expression de *Fgf10* spécifiquement dans le mésoderme de la lame latérale (mll) au niveau où les membres vont pousser (territoire présumé des membres). (a). *Fgf10* induit l'expression de *Fgf8* dans les cellules de l'ectoderme qui formeront l'AER. Cette induction implique également la voie Wnt/ β -caténine (via *Wnt3*) (b). La croissance des bourgeons des membres dépend d'une boucle de régulation positive entre *Fgf10* dans le mésenchyme et *Fgf8* dans l'AER (c).

L'induction très précoce du territoire présomptif des membres est un phénomène encore controversé. L'importance du mésoderme intermédiaire (mi), qui est la couche de mésoderme située entre le mll et le mésoderme somitique, reste incomprise. Chez le poulet, l'induction des membres est inhibée lorsqu'une barrière est placée entre le mll et le mi ou lorsque ce dernier est enlevé chirurgicalement, suggérant qu'il serait la source d'un facteur important pour l'induction des membres (Strecker and Stephens, 1983; Geduspan and Solursh, 1992a). *Fgf8* pourrait être ce facteur puisqu'il est exprimé de façon transitoire dans le mi avant et au cours de l'induction, et ceci, spécifiquement au niveau des membres antérieurs et postérieurs (Vogel *et al.*, 1996; Crossley *et al.*, 1996). Par contre, des expériences où on bloque la différenciation du mésonéphros, empêchant ainsi l'expression de *Fgf8* (FernandezTeran *et al.*, 1997) ou les expériences de perte de fonction par recombinaison homologe chez la souris (knock-out (ko)) de *Fgf8* spécifiquement dans le mi (ko conditionnel) (Boulet *et al.*, 2004) n'empêchent ni l'initiation ni la croissance des membres, ce qui démontre bien que l'expression de *Fgf8* dans le mi n'est pas essentielle pour l'induction des membres, où qu'il y a redondance avec un autre facteur.

Par ailleurs, *Fgf10* est initialement largement exprimé dans le mll, et son expression devient restreinte au territoire présomptif des membres juste avant l'apparition des bourgeons (tant antérieurs que postérieurs) (Ohuchi *et al.*, 1997) (voir **figure 1.1**, p.5). Cette expression est essentielle à l'initiation et à la croissance des membres puisque les embryons *Fgf10*^{-/-} n'ont pas de membres (Min *et al.*, 1998; Sekine *et al.*, 1999). *Fgf10* est nécessaire pour l'induction de l'expression d'une autre molécule de la famille des *Fgfs*, *Fgf8*, dans une région spécialisée de l'ectoderme de surface qui deviendra l'AER

(Ohuchi *et al.*, 1997;Min *et al.*, 1998;Sekine *et al.*, 1999). C'est le récepteur *FgfR2*, qui semble transmettre la signalisation de *Fgf10* dans les cellules épithéliales (Martin, 1998;Xu *et al.*, 1998). L'expression de *FgfR2* débute avant l'initiation des bourgeons des membres (Orrurtreger *et al.*, 1993). Les embryons *FgfR2*^{-/-} ont un phénotype identique à celui des embryons *Fgf10*^{-/-}, sans expression de *Fgf8* dans l'ectoderme. Le gène *FgfR2* code pour deux isoformes, *FgfR2IIIb* et *FgfR2IIIc* qui diffèrent dans leur expression et possiblement dans leur affinité pour les ligands. L'isoforme *IIIb* est exprimé principalement dans l'ectoderme, tandis que le *IIIc* est surtout dans le mésenchyme, donc *Fgf10* devrait signaler via l'isoforme *IIIb*. Par contre, le ko spécifique de *FgfR2IIIb* commence par exprimer *Fgf8* normalement, et cette expression s'éteint complètement par la suite (Revest *et al.*, 2001). Le phénotype n'est donc pas totalement identique au phénotype du ko total de *FgfR2* décrit précédemment (Xu *et al.*, 1998;Xu *et al.*, 1999). Suite à l'induction de *Fgf8* dans l'AER, une boucle de régulation s'installe entre *Fgf8* et *Fgf10*, chacun maintenant l'expression de l'autre respectivement dans le mésenchyme et dans l'AER. Cette boucle de régulation est essentielle à la croissance proximo-distale (P/D) des membres (voir plus loin la **section 1.4.1** sur **L'AER**, p.11).

1.3.2 Rôles des *Wnts*

Les *Wnts* forment une large famille de molécules de signalisation qui agissent par l'intermédiaire du récepteur Frizzled, un récepteur à sept domaines trans-membranaires (Dierick and Bejsovec, 1999;Huang and Klein, 2004). La signalisation Wnt peut s'effectuer par trois voies, dont deux sont présentes dans les membres. Tout d'abord, la voie classique de signalisation s'effectue via la β -caténine. En absence de ligand, la β -caténine se retrouve dans un complexe cytoplasmique comprenant plusieurs protéines, dont Gsk3, qui la phosphoryle entraînant sa dégradation; dans ce cas, les facteurs de

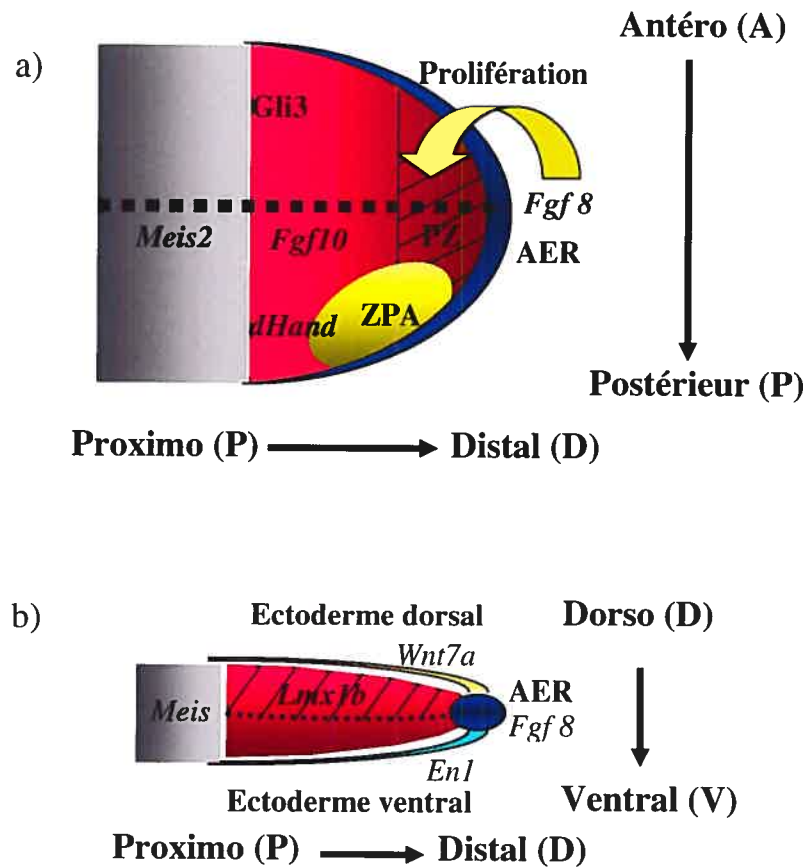
transcription de la famille Lef/Tcf du noyau sont associés à des co-répresseurs. Lorsque la voie Wnt est activée, la β -caténine est stabilisée et transférée au noyau où elle interagit avec les protéines Lef/Tcf permettant le remplacement des co-répresseurs par des co-activateurs (Wodarz and Nusse, 1998; Galceran *et al.*, 1999; Eastman and Grosschedl, 1999; McQueeney *et al.*, 2002; Logan and Nusse, 2004). C'est cette voie classique qui est impliquée dans l'initiation des bourgeons des membres. La deuxième voie de signalisation Wnt est dépendante du calcium et est plutôt impliquée dans la spécification de l'axe D/V avec Wnt7a (Kuhl, 2004) (voir **section 1.4.3 L'ectoderme dorsal et ventral**, p.21).

Comme pour les Fgfs, la surexpression des Wnts chez le poulet peut induire un membre ectopique dans le flanc embryonnaire (Kawakami et al., 2001). Chez le poulet, il existe des molécules Wnts exprimées très tôt : *Wnt2b* est exprimé dans le territoire présomptif des membres antérieurs, tandis que *Wnt8c* est exprimé dans celui des membres postérieurs (Kawakami et al., 2001). De plus, la voie classique Wnt/ β -caténine est nécessaire et suffisante pour l'induction des membres antérieurs et postérieurs via le contrôle de l'expression de *Fgf10* (Kawakami et al., 2001). Les Wnts sont donc en amont des Fgfs dans l'initiation des membres chez le poulet. Par contre, la situation est légèrement différente chez la souris. On ne retrouve pas de Wnts qui ont des patrons d'expression semblables à *Wnt2b* ou *Wnt8c* chez la souris. De plus, les embryons *Lef1*^{-/-}; *Tcf1*^{-/-}, les molécules qui médient la voie classique de signalisation Wnt, n'ont pas de membres, parce que l'expression de *Fgf8* et la formation de l'AER sont bloquées, mais l'expression précoce de *Fgf10* est intacte (Galceran et al., 1999). Donc, la boucle de régulation entre *Fgf10* et *Fgf8* implique également la voie Wnt (voir la **section 1.4.1** sur

L'AER, p.11). Le gène *Wnt3* chez la souris (*Wnt3a* chez le poulet) est exprimé dans l'ectoderme (Kengaku et al., 1997), et le ko de *Wnt3* montre un phénotype semblable (perte d'expression de *Fgf8* dans l'AER, même si *Fgf10* est bien exprimé dans le mésenchyme) (Barrow et al., 2003). Finalement, les embryons *β-caténine-/-*, spécifiquement dans l'AER, n'expriment pas *Fgf8* dans les membres postérieurs (McQueeney et al., 2002). Tous ces résultats démontrent bien l'importance de cette voie pour l'activation de l'expression de *Fgf8* dans l'AER.

1.4 Les membres en trois dimensions : l'importance des centres organisateurs pour la croissance et la spécification des membres

Les membres se développent dans les trois dimensions : ils s'allongent dans l'axe proximo-distal (P/D), deviennent asymétriques dans l'axe antéro-postérieur (A/P) et se différencient dans l'axe dorso-ventral (D/V). La différenciation des différents segments des membres se fait dans une séquence P/D, c'est-à-dire que les condensations squelettiques proximales du stylo-pode (fémur/humérus) apparaissent en premier, suivies de celles médiales du zeugopode (radius/cubitus; tibia/péroné) et finalement celles distales de l'autopode (mains; pieds; doigts) (Summerbell and Lewis, 1975; Tickle, 2003). L'axe A/P se caractérise surtout par une asymétrie au niveau de l'autopode dans la morphologie squelettique des différents doigts, tandis que l'axe D/V se caractérise par les jointures du côté dorsal, le positionnement des tendons et des muscles et aussi le type de peau qui recouvre le dos vs la paume de la main ou du pied. Il existe des centres organisateurs qui sont responsables de la croissance et de la spécification des membres dans ces trois axes (voir **figure 1.2**, p.10).



Adapté de Capdevila and Belmonte, 2001

Figure 1.2: Spécification des bourgeons de membres dans les trois axes :
 La spécification dans l'axe proximo/distal (P/D) se fait via un antagonisme entre des signaux proximaux, caractérisés par les protéines Meis, et des signaux distaux provenant de l'AER (*Fgfs*) et de la ZPA (*Shh*). La spécification antéro/postérieure (A/P) semble se faire très tôt, en même temps que l'initiation des membres. Elle implique un antagonisme entre *dHand* du côté postérieur et *Gli3* du côté antérieur (a). La spécification dorso/ventrale (D/V) est sous le contrôle de l'ectoderme dorsal et ventral. L'ectoderme dorsal exprime *Wnt7a*, qui induit l'expression de *Lmx1b* dans le mésenchyme dorsal sous-jacent, tandis que l'ectoderme ventral exprime *En1* qui réprime *Wnt7a*, ce qui permet la restriction de son expression dans l'ectoderme dorsal. L'AER se situe à la jonction entre l'ectoderme ventral et dorsal (b).

1.4.1 L'AER

L'AER ou crête apicale ectodermique, est une région spécialisée de l'ectoderme de surface composée de cellules ectodermiques qui ont une morphologie distincte. L'AER se situe au bout distal, à l'interface D/V du bourgeon de membre. Chez le poulet, on sait depuis longtemps que l'intégrité de l'AER est essentielle pour la croissance normale des membres dans l'axe P/D (Saunders, 1948; Todt and Fallon, 1984). Lorsqu'on enlève l'AER, il y a diminution de la prolifération des cellules du mésenchyme, ainsi que l'apparition d'une zone importante d'apoptose juste sous l'ectoderme. Le membre est ainsi tronqué, et dépendamment du stade de développement choisi pour l'ablation, le point de troncation sera plus loin dans l'axe P/D (Saunders, 1948; Summerbell *et al.*, 1973; Rowe *et al.*, 1982; Dudley *et al.*, 2002). De tous les facteurs exprimés dans l'AER, seuls Fgfs 2, 4 et 8 sont capables de remplacer fonctionnellement l'AER (sans en induire un nouvel) (Niswander *et al.*, 1993; Fallon *et al.*, 1994; Mahmood *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1996; Martin, 1998).

Les expériences de perte de fonction chez la souris ont montré que *Fgf8* est le principal Fgf responsable de la fonction de l'AER, puisque c'est le seul dont la perte de fonction produit un phénotype aux membres (les simples ko de *Fgf4/9* ou *17* dans l'AER n'ont pas de phénotype, probablement parce que chacun compense pour la perte de l'autre) (Lewandoski *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2000a; Moon and Capecchi, 2000b; Sun *et al.*, 2002; Boulet *et al.*, 2004). Le simple ko conditionnel de *Fgf8* dans l'AER n'est cependant pas une phénocopie de l'ablation de l'AER. Les embryons *Fgf8*^{-/-} présentent une absence ou une hypoplasie sérieuse du stylopoïde (segment proximal), tandis que les autres segments sont un peu plus petits, mais normaux

(Lewandoski *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2000b). Le double-ko conditionnel *Fgf4/Fgf8* dans l'AER est nécessaire pour arrêter totalement la croissance des membres (Sun *et al.*, 2002; Boulet *et al.*, 2004). Il existe donc une redondance fonctionnelle entre *Fgf8* et *Fgf4* dans l'AER. *Fgf4* n'étant exprimé que plus tard, le simple ko *Fgf8* met en évidence le rôle de ce dernier très tôt au cours du développement, lorsqu'il est le seul *Fgf* à être exprimé, *Fgf4* pouvant compenser pour la perte de *Fgf8* plus tard. Par contre, le simple ko conditionnel de *Fgf4* n'a aucun phénotype, *Fgf8* étant capable de compenser sa perte puisqu'il est exprimé tout au long de l'existence de l'AER ((Sun *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2000a).

L'induction de l'AER est intimement reliée à l'induction des bourgeons des membres. L'expression de *Fgf10* dans le mll induit l'expression de *Wnt3*, qui induit par la suite l'expression de *Fgf8* dans des cellules de l'ectoderme pré-AER (avant même qu'un bourgeon ne soit visible) (Min *et al.*, 1998; Kawakami *et al.*, 2001). Ces cellules vont par la suite migrer vers la frontière D/V pour former l'AER. L'expression de *Fgf10* dans le mésenchyme est donc responsable de la signalisation qui permettra à l'ectoderme sus-jacent d'initier le programme d'expression de gènes aboutissant à la formation de l'AER (Min *et al.*, 1998; Sekine *et al.*, 1999). *Fgf10* est un peptide sécrété qui diffuse jusqu'à l'ectoderme et se lie au récepteur *FgFR2*, exprimé dans l'ectoderme de surface. L'activation de ce récepteur est importante pour induire l'expression de *Fgf8* dans l'AER, par un processus qui implique la voie Wnt. On sait que *Wnt3a*, dont l'expression précède celle de *Fgf8*, est capable d'induire son expression dans l'AER via la voie β -caténine/Lef1/Tcf1. Donc, *Wnt3* médie l'induction de *Fgf8* par *Fgf10* (Kawakami *et al.*, 2001). Par la suite, il y aura l'établissement d'une boucle de régulation entre *Fgf8* et

Fgf10. Cette boucle est responsable du maintien de l'expression de *Fgf10* dans le mésenchyme des bourgeons des membres, ce qui semble requis pour le maintien de la prolifération des cellules de ce mésenchyme (Xu et al., 1998).

On connaît de plus en plus les mécanismes qui déterminent la localisation précise de l'AER. Des études de traçage cellulaire ont révélé que les cellules ectodermales qui recouvrent le mll avant l'induction des bourgeons des membres sont déjà engagées à devenir l'AER (cellules pré-AER), l'ectoderme dorsal ou l'ectoderme ventral (Geduspan and Solursh, 1992b; Michaud *et al.*, 1997; Altabef *et al.*, 1997). La polarité D/V semble venir du mésoderme somitique du tronc, ce qui résulte en l'expression de *Radical fringe* (*Rfng*) dans l'ectoderme dorsal et de *En1* dans l'ectoderme ventral. Plus tard, ces deux molécules seront exprimées dans l'AER, qui se formera juste à l'interface entre l'ectoderme dorsal (qui exprime *Rfng*) et l'ectoderme ventral (qui n'exprime pas *Rfng* puisque *En1* réprime son expression). Chez le poulet, c'est la limite d'expression de *Rfng* qui détermine l'emplacement de l'AER (Laufer *et al.*, 1997; RodriguezEsteban *et al.*, 1997). Par contre, le ko de *Rfng* chez la souris n'a pas de phénotype (possible redondance avec d'autres facteurs de la même famille) (Moran *et al.*, 1999; Zhang and Gridley, 1999; Zhang *et al.*, 2002).

Le rôle principal des *Fgfs* exprimés dans l'AER est de stimuler la prolifération cellulaire et, comme on le verra plus loin, d'induire et de maintenir l'expression de *Shh* dans la zone d'activité polarisante (ZPA) (Mahmood *et al.*, 1995; Crossley *et al.*, 1996) (voir section 1.4.2 La ZPA, p.16). D'autres rôles ont également été attribués aux *Fgfs*, comme par exemple comme agent chemo-attractant (Irving et al., 2002). Ils pourraient

donc réguler la migration des cellules du mésenchyme durant la croissance des membres (Sun et al., 2002). Par ailleurs, plusieurs molécules ont été impliquées dans la régulation de la fonction des Fgfs dans l'AER. Il existe un variant d'épissage de *CD44* qui a été impliqué dans la présentation des Fgfs de l'AER aux cellules du mésenchyme sous-jacent (Sherman et al., 1998). Aussi, une mutation dans le gène *p63* empêche la formation de l'AER. Des mutations de ce gène ont également été impliquées dans le syndrome SHFM (« split hand/split foot malformation ») et dans le syndrome EEC (« ectrodactyly, ectodermal dysplasia and facial cleft ») (Celli et al., 1999;Wessagowit et al., 2000;Ianakiev et al., 2000;van Bokhoven et al., 2001;Kosaki et al., 2001;South et al., 2002;Bongers et al., 2004).

Le modèle classique de la zone de progrès (PZ) veut que l'AER envoie des signaux de croissance qui permettent le maintien des cellules sous-jacentes (cellules de la PZ) dans un état prolifératif, ce qui permet la croissance P/D du membre tout en permettant la spécification séquentielle dans cet axe (Summerbell et al., 1973). Dans ce modèle, l'AER sert d'horloge moléculaire en contrôlant le destin des cellules de la PZ en les maintenant dans un état prolifératif, de sorte que lorsqu'elles sortent rapidement de la zone de prolifération, elles adoptent un destin proximal et lorsqu'elles restent plus longtemps en prolifération, elles adoptent un destin plus distal. Ce modèle expliquait bien les résultats obtenus lors de l'ablation chirurgicale de l'AER, avec une perte de tous les segments du membre lorsqu'on enlève l'AER très tôt et une perte des éléments plus distaux lorsque l'ablation est plus tardive (Saunders, 1948;Summerbell et al., 1973). Par contre, des études récentes ont remis en question ce modèle classique. Deux groupes proposent plutôt que la spécification P/D des cellules n'est pas acquise dans une

séquence temporelle, mais que les cellules du stylopode, du zeugopode et de l'autopode sont plutôt déjà présentes dès le début du développement des membres (Sun *et al.*, 2002; Dudley *et al.*, 2002). L'AER serait alors responsable de l'expansion sélective des cellules de chacune de ces zones, le segment proximal proliférant avant le segment distal. C'est ce qu'on appelle le modèle de pré-spécification. Un des groupes a utilisé des techniques de traçage cellulaire pour montrer que les cellules sont destinées très tôt à devenir stylopode, zeugopode ou autopode, contrairement à ce que prédit le modèle classique. Par exemple, lorsqu'ils marquent les cellules du bout distal des bourgeons, ces cellules se retrouvent uniquement dans les éléments squelettiques distaux. Ils ont aussi montré que lorsqu'on enlève l'AER, il y a une mort cellulaire importante d'environ 200 μm de cellules du mésenchyme juste sous l'ectoderme (dans le bout distal), et que les tronctions observées provenaient de la mort des précurseurs de chaque zone : lorsque l'AER est enlevé tôt, l'expansion des cellules proximales n'a pas encore eu lieu et les trois zones sont tronquées parce que les précurseurs des trois zones se retrouvent dans la zone de mort cellulaire ; par contre, lorsque l'ablation est plus tardive, les cellules proximales ont déjà proliféré et ce sont les précurseurs des cellules distales qui sont dans la zone de mort cellulaire (Dudley *et al.*, 2002). Le double-ko conditionnel de *Fgf4* et *Fgf8* dans l'AER vient également appuyer ce modèle. La Cre utilisée pour faire ce ko (*Msx2_Cre*) permettait l'expression précoce de ces *Fgfs* uniquement dans les membres antérieurs pendant un court laps de temps. Dans les membres postérieurs, *Msx2_Cre* était exprimé assez tôt pour supprimer entièrement l'expression des *Fgfs*. De façon inattendue, l'exposition précoce à *Fgf4* et *Fgf8* (surtout *Fgf8* puisqu'il est exprimé plus tôt) dans les membres antérieurs permet l'apparition d'éléments du stylopode (l'humérus), mais également des éléments squelettiques des segments plus distaux, même si ces derniers

sont beaucoup plus petits (Sun et al., 2002). Les *Fgfs* semblent donc importants précocement pour établir un bourgeon de taille normale permettant l'apparition de progéniteurs des trois segments P/D, et ensuite pour permettre la survie et la prolifération de ces progéniteurs, produisant ainsi les trois segments des membres matures. Ces deux groupes proposent donc le nouveau modèle de pré-spécification où les précurseurs des différents segments de l'axe P/D (stylopode, zeugopode et autopode) sont spécifiés et co-existent très tôt lors de l'apparition des bourgeons des membres. Par la suite, les précurseurs de chaque segment proliféreraient dans une séquence temporelle P/D. Si ce modèle est vrai, on devrait être capable de trouver des gènes qui sont exprimés différemment dans ces différents précurseurs (Sun et al., 2002). Par contre, ces marqueurs n'ont pas encore été identifiés.

1.4.2 La ZPA (zone d'activité polarisante)

La ZPA est le centre organisateur qui permet la spécification des membres dans l'axe A/P (Saunders and Gasseling, 1968). Il existe des différences claires dans l'axe A/P, surtout au niveau de l'autopode où chaque doigt a une forme, une longueur et un nombre de phalanges caractéristiques. La ZPA se compose d'une portion de mésenchyme postérieur situé à l'extrémité distale du membre (Saunders *et al.*, 1968). Elle a le potentiel d'induire des doigts surnuméraires et de modifier l'identité des doigts lorsque transplantées dans la partie antérieure du membre (Saunders *et al.*, 1968). L'acide rétinoïque a été la première molécule identifiée à avoir une activité polarisante (Tickle et al., 1982), mais on sait maintenant que la molécule responsable de cette activité est Shh (Riddle et al., 1993).

Plusieurs molécules semblent participer à l'induction et à la localisation précise de la ZPA dans la partie postérieure du bourgeon. Très tôt, il existe un antagonisme transcriptionnel entre *Gli3* et le bHLH *dHand* qui divise le bourgeon en deux parties, une partie antérieure (*Gli3*) et une partie postérieure (*dHand*) (Welscher et al., 2002a). *DHand* contrôle directement l'expression de *Shh* : les embryons *dHand*^{-/-} meurent à e10.5 avec des petits bourgeons de membres qui n'expriment pas *Shh* (Fernandez-Teran et al., 2000; Charite et al., 2000). Dans la partie antérieure, l'expression de *Shh* est plutôt réprimée par plusieurs facteurs dont *Gli3* et *Alx4* (des mutants de ces deux gènes ont une expression ectopique de *Shh* dans la partie antérieure du bourgeon, ce qui résulte en la duplication de certains éléments squelettiques) (Masuya et al., 1997; Qu et al., 1997; Buscher and Ruther, 1998; Park et al., 2000). L'expression de *Shh* semble également dépendre des signaux de l'AER, qui permettraient sa restriction dans la portion distale du mésenchyme postérieur (Lewandoski et al., 2000; Moon et al., 2000b). Enfin, l'inhibition de la signalisation de l'acide rétinoïque (soit via ses récepteurs ou via l'inhibition de sa synthèse) prévient l'établissement de la ZPA, l'apparition de l'expression de *Shh* et la croissance des bourgeons des membres (Niederreither et al., 2002; Mic et al., 2004). À l'opposé, l'application d'acide rétinoïque du côté antérieur du bourgeon induit l'expression de *Shh* et une ZPA ectopique (Noji et al., 1991; Wanek et al., 1991). L'acide rétinoïque contrôle l'expression de gènes *Hox* qui semblent importants pour délimiter la région où *Shh* sera exprimé. *Hoxd12* et *Hoxd13* sont exprimés dans la partie postérieure du bourgeon, dans un domaine où *Shh* deviendra exprimé (Zakany et al., 2004). De plus, il y a perte d'asymétrie lorsqu'on perturbe l'expression précoce de *Hoxd11/12/13* (Zakany et al., 2004). Aussi, l'expression ectopique de certains gènes *Hox* induit une expression anormale de *Shh* (Knezevic et al., 1997). La restriction précoce des

gènes *Hox* dans la partie postérieure participe donc à la détermination de l'emplacement exact de la ZPA (Zakany et al., 2004).

Ce sont des expériences chirurgicales chez le poulet qui ont démontré que la ZPA était responsable de la polarité A/P des membres. Lorsque ce mésenchyme est placé du côté antérieur, il y a duplication en image miroir des doigts (Saunders *et al.*, 1968). Shh est une molécule sécrétée qui agit comme un morphogène (Lewis *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2001) en formant un gradient avec une concentration plus importante du côté postérieur. Ce gradient est essentiel pour spécifier le nombre de doigts et l'identité de chacun de ces doigts : une grande concentration de Shh semble nécessaire pour les doigts postérieurs et une faible concentration pour les doigts antérieurs (Yang *et al.*, 1997; Lewis *et al.*, 2001; Litington *et al.*, 2002; Welscher *et al.*, 2002b).

La signalisation Shh est étroitement régulée par une série complexe d'interactions protéiques. En absence de Shh, le récepteur Patched (Ptc1) réprime la protéine Smoothed (Smo), une protéine à sept domaines transmembranaires, et le facteur de transcription Gli est clivé (de façon constitutive) pour générer une forme courte qui agit comme un répresseur transcriptionnel (Niswander, 2003). La liaison de Shh à Ptc1 enlève la répression sur Smo, ce qui inhibe le clivage protéolytique de Gli et génère l'apparition d'une forme longue capable d'activer la transcription (Methot and Basler, 2001). Chez les vertébrés, il existe trois *Gli* (1/2/3) (Ruppert *et al.*, 1988; Kinzler *et al.*, 1988; Hui *et al.*, 1994; Marigo *et al.*, 1996). Le patron d'expression de *Gli1* chevauche celui de *Shh*, tandis que *Gli2* et *Gli3* sont exprimés dans des domaines complémentaires (Buscher et al., 1997; Buscher *et al.*, 1998). Des mutations dans *Gli1* et *Gli2*, seules ou combinées,

n'affectent pas vraiment le développement des membres, les mutants pour *Gli2* ayant seulement un délai dans l'ossification des doigts (Mo et al., 1997). Par contre, une mutation dans *Gli3* provoque un phénotype important caractérisé par la présence de plusieurs doigts supplémentaires (polydactylie) dont l'identité n'est pas spécifiée (Schimmang et al., 1992; Hui and Joyner, 1993; Buscher et al., 1997; Welscher et al., 2002b). À l'inverse, les embryons *Shh*^{-/-} expriment la forme répressive de la protéine Gli3 à travers tout le bourgeon, et ont des membres qui, au niveau de l'autopode, n'ont qu'un seul rudiment d'os ressemblant à un doigt et dont le zeugopode est tronqué et fusionné (Chiang et al., 2001; Lewis et al., 2001; Kraus et al., 2001). Les embryons *Shh*^{-/-}/*Gli3*^{-/-} souffrent de polydactylie, de façon identique aux embryons *Gli3*^{-/-} (Litingtung et al., 2002; Welscher et al., 2002b). Ceci démontre bien que le principal rôle de *Shh* est de permettre la formation d'un gradient de Gli3 avec une concentration plus importante de forme répressive (Gli3 court clivé) du côté antérieur et une concentration plus importante de forme activatrice (Gli3 long) du côté postérieur (Wang et al., 2000), et que c'est le ratio Gli3-activateur vs Gli3-répresseur qui est important pour donner l'identité particulière à chaque doigt (Litingtung et al., 2002; Welscher et al., 2002b). Gli3-répresseur réprime la transcription de gènes *Hox* (Wang et al., 2000; Litingtung et al., 2002; Welscher et al., 2002b), donc *Shh*, via le contrôle de l'activité de Gli3, régule l'expression tardive des gènes du complexe *Hoxd* (Zakany et al., 2004).

Shh n'est pas impliqué dans l'induction de l'AER, mais il est impliqué dans sa maintenance. L'expression de *Shh* étant également dépendante de l'intégrité de l'AER, il existe donc une boucle entre *Shh* et les Fgfs (notamment *Fgf4*) (Laufer et al., 1994; Niswander et al., 1994b). Dans le ko *Shh*, il y a perte éventuelle de l'expression de

Fgf4 et de *Fgf8* dans l'AER (Chiang *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2001; Kraus *et al.*, 2001). Le ko conditionnel de *Fgf4* dans l'AER n'a pas de phénotype au niveau des membres (Sun *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2000a). Par contre, le ko conditionnel de *Fgf8* dans l'AER montre que celui-ci est nécessaire pour le maintien de l'expression de *Shh* dans la ZPA (Lewandoski *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2000b). Certains gènes codants pour des antagonistes des BMPs, comme *formin* et/ou *gremlin* (Hsu *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 1999), semblent requis pour l'établissement de la boucle de régulation entre *Shh-Fgfs*. Le gène *formin* est muté dans le mutant *limb deformity* (*ld*) (Vogt *et al.*, 1993), dont l'AER désorganisé n'exprime que *Fgf8*, pas *Fgf4*, et où l'expression de *Shh* est également diminuée (Zuniga and Zeller, 1999). Aussi, sans *gremlin*, l'AER devient rapidement désorganisé et l'expression de *Fgf8* n'est pas maintenue (Khokha *et al.*, 2003). Le gène *Gremlin* est aussi requis pour le maintien de l'expression de *Fgf4* dans l'AER (partie postérieure), et on pense que ces molécules permettent la survie de l'AER en contrecarrant l'effet répressif des BMPs sur l'AER (Zuniga *et al.*, 1999; Pizette and Niswander, 1999).

Il est important de noter que *Shh* n'est requis ni pour l'initiation du développement des bourgeons des membres, ni pour l'établissement initial de la polarité A/P parce qu'en absence de *Shh*, les embryons ont des membres et il y a quand même une certaine polarité A/P (Welscher *et al.*, 2002a). *Shh* n'est pas non plus impliqué dans la spécification des structures proximales puisque celles-ci sont totalement intactes en son absence (Chiang *et al.*, 2001; Kraus *et al.*, 2001). Par contre, *Shh* est absolument requis pour le maintien de la croissance et de la spécification des structures

intermédiaires (zeugopode) et distales (autopode) (Chiang *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2001; Kraus *et al.*, 2001; Ros *et al.*, 2003).

1.4.3 L'ectoderme dorsal et ventral

L'asymétrie D/V est évidente chez l'humain, le dos et la paume de la main représentant le côté dorsal et ventral respectivement. Les muscles, les tendons et les autres structures sont également orientés dans l'axe D/V. Grâce à des manipulations chirurgicales chez le poulet, on sait maintenant que la polarité D/V est sous le contrôle de molécules exprimées dans l'ectoderme de surface non-AER (dorsal et ventral) (Maccabe *et al.*, 1974; Pautou, 1977; Geduspan and Maccabe, 1989): lorsqu'on inverse les ectodermes, il y a inversion de l'axe (Maccabe *et al.*, 1974) ; si on remplace l'ectoderme ventral par l'ectoderme dorsal, on obtient une main double-dorsale et inversement, double-ventrale. La spécification D/V est séquentiellement contrôlée par des signaux provenant des somites, de la somatopleure et de l'ectoderme non-AER.

Wnt7a est exprimé spécifiquement dans l'ectoderme dorsal (Dealy *et al.*, 1993; Parr *et al.*, 1993) et induit l'expression de *Lmx1b* (un facteur de transcription de la famille lim-homéodomaine) dans le mésenchyme sous-jacent (mésenchyme dorsal) (Riddle *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1995). Les expériences de perte de fonction chez la souris et les expériences de surexpression ectopique chez le poulet ont démontré que *Wnt7a* et *Lmx1b* sont impliqués dans la spécification de l'identité dorsale du membre (Parr *et al.*, 1993; Parr and McMahon, 1995; Riddle *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998; Chen and Johnson, 1999). De plus, *Lmx1b* est muté dans certains cas de syndrome onycho-osteo-dysplasie héréditaire (« nail patella syndrome ») (Dreyer *et al.*,

1998;Vollrath *et al.*, 1998), et la perte de fonction chez la souris a un phénotype similaire au syndrome humain (Chen *et al.*, 1998). L'ectoderme ventral exprime quant à lui *En1*. Ce gène semble requis pour la spécification ventrale puisque les embryons *En1*^{-/-} ont un phénotype double-dorsal (Loomis *et al.*, 1996). Son rôle serait d'inhiber l'expression de *Wnt7a* (Loomis *et al.*, 1996;Cygan *et al.*, 1997;Logan *et al.*, 1997;Loomis *et al.*, 1998). L'expression de *En1* dans l'ectoderme ventral est sous le contrôle de la voie des BMPs via *BmpR1a* (Ahn *et al.*, 2001;Pizette *et al.*, 2001).

1.4.4 Les gènes *Meis* et la spécification proximale

Tout le programme distal impliquant *Shh* n'est pas requis pour le développement des structures proximales (Chiang *et al.*, 2001;Lewis *et al.*, 2001;Kraus *et al.*, 2001). Il existe un programme proximal qui implique les protéines *Meis*/*Pbx*/*Hox*. L'activité transcriptionnelle des protéines *Pbx* est entre autre régulée via sa localisation cellulaire : l'interaction avec des protéines de la famille *Meis* permet sa translocation au noyau (Berthelsen *et al.*, 1999). Le complexe *Pbx*/*Meis* nucléaire va réguler la transcription de gènes cibles en interagissant notamment avec certains *Hox* (Chang *et al.*, 1997;Williams *et al.*, 2005). Ainsi, même si *Pbx* est exprimé dans tout le mésenchyme des membres, la protéine *Pbx1* est nucléaire seulement dans la partie proximale du bourgeon parce que l'expression de *Meis1/2* est restreinte à la partie proximale du bourgeon (Mercader *et al.*, 1999). Les embryons *Pbx1*^{-/-} ont des malformations squelettiques au niveau du stylo-pode (proximal), tandis que les éléments distaux sont parfaitement normaux (Selleri *et al.*, 2001). De plus, l'expression ectopique des *Meis* dans la partie distale réprime le programme distal d'expression des gènes (Capdevila *et al.*, 1999;Mercader *et al.*, 1999;Mercader *et al.*, 2000). On sait depuis longtemps qu'il y a de l'acide rétinoïque à la

base du membre, où elle est synthétisée par la *Raldh2* (Niederreither et al., 2002), grâce aux souris *RaR β _LacZ* (Rossant et al., 1991). Il existe en fait un gradient P/D d'acide rétinoïque dans le membre, parce que l'enzyme *Cyp26b*, qui médie sa dégradation, est exprimée dans la partie distale (Swindell et al., 1999). Ce gradient participe à la restriction de l'expression des gènes *Meis* dans la partie proximale des membres (Mercader et al., 2000; Qin et al., 2002). Il existe donc un antagonisme entre le programme proximal (*Meis/Pbx/Hox*) qui dépend de l'acide rétinoïque, et le programme distal (*Shh* dépendant) qui dépend des Fgfs.

1.4.5 Liens entre centres organisationnels

Il existe des liens importants entre chacun des centres organisationnels mentionnés précédemment (Niswander, 2002). Ce phénomène est illustré par l'existence d'une boucle de régulation entre l'AER et la ZPA (boucle de régulation *Fgfs-Shh*). En effet, *Shh* est important pour le maintien de l'expression des *Fgfs* dans l'AER (via l'expression de *Gremlin*) et les *Fgfs* participent à l'initiation et surtout au maintien de *Shh* dans la ZPA (Laufer et al., 1994; Niswander et al., 1994a; Chiang et al., 2001; Kraus et al., 2001; Sun et al., 2002; Boulet et al., 2004). Des signaux provenant de l'ectoderme dorsal participent également à la régulation de l'expression de *Shh*, *Wnt7a* étant requis pour obtenir un niveau maximal d'expression (Parr et al., 1995; Yang and Niswander, 1995). Donc, les *Fgfs* (croissance P/D) et *Wnt7a* (différentiation D/V) permettent le positionnement exact de la ZPA dans la partie dorsale, mais surtout distale, du mésenchyme des bourgeons des membres. Par ailleurs, la formation de l'AER et la polarité D/V sont également initiées par des mécanismes communs : la voie des BMPs contrôle l'axe D/V en permettant la restriction de *Wnt7a* dans l'ectoderme dorsal, et elle

participe aussi à l'induction de *Fgf8* dans le pré-AER (Ahn *et al.*, 2001; Pizette *et al.*, 2001). Il existe donc une certaine coordination entre les centres organisationnels qui est essentielle pour le développement normal des bourgeons, en permettant la croissance et la spécification nécessaires à la complexité du membre mature.

1.5 Détermination de l'identité des membres

Les membres antérieurs et les membres postérieurs ont des morphologies et des fonctions très différentes dans la plupart des espèces. C'est particulièrement évident chez le poulet où il y a des distinctions évidentes entre les ailes et les pattes, notamment au niveau des éléments squelettiques (trois doigts vs quatre doigts), des muscles, des tendons et de l'épiderme (plumes vs écailles). Très tôt, les bourgeons des membres antérieurs et postérieurs sont très similaires et les différences morphologiques ne deviennent apparentes que plus tard. Pourtant, la décision de devenir un membre antérieur ou postérieur se fait très tôt, au stade le plus précoce de l'initiation des membres, dans le mll, avant même l'apparition des bourgeons : des expériences de transplantation chez le poulet ont montré que des cellules provenant du territoire présomptif du membre antérieur, transplantées de façon ectopique dans le flanc, produisent toujours un membre antérieur (le résultat réciproque est obtenu pour les membres postérieurs) (Hamburger, 1938). De plus, si on transplante du mésoderme de membre antérieur sous de l'ectoderme postérieur, le membre aura une identité antérieure (même au niveau de l'ectoderme) et vice versa, ce qui prouve que l'identité est induite par le mésoderme et non l'ectoderme (Zwilling, 1956a; Zwilling, 1956b), et l'ectoderme prend l'identité du mésenchyme (Saunders *et al.*, 1968).

En fait, la plupart des gènes ont le même patron d'expression dans les membres antérieurs et postérieurs (Margulies et al., 2001). Aussi, globalement, les structures osseuses sont similaires : un stylopode avec un seul os (humérus ou fémur), un zeugopode composé de deux os (radius/cubitus ou tibia/péroné) et un autopode composé de plusieurs doigts. Par contre, des différences moléculaires spécifiques doivent exister pour créer les différences morphologiques observées. Les cellules des membres antérieurs et celles des membres postérieurs répondent aux mêmes signaux de croissance et de spécification provenant des centres organisateurs communs aux deux types de membres (comme l'AER et la ZPA), et malgré tout, elles produisent quand même des structures caractéristiques à chaque membre (Logan, 2003). Depuis quelques années, on connaît certains gènes qui sont exprimés spécifiquement dans les membres antérieurs ou postérieurs. *Pitx1*, un membre de la famille des protéines à homéodomaine, est spécifiquement exprimé dans tout le mésenchyme des membres postérieurs (Lamonerie et al., 1996; Szeto et al., 1996; Shang et al., 1997). Les molécules de la famille des Tbx, soient *Tbx5* et *Tbx4* sont également spécifiquement exprimées dans tout le mésenchyme des membres antérieurs et postérieurs respectivement (Simon et al., 1997; Isaac et al., 1998; Gibson-Brown et al., 1998a; Logan et al., 1998b; Takabatake et al., 2000; Ruvinsky and Gibson-Brown, 2000a). Cette spécificité d'expression se retrouve dans la plupart des espèces de vertébrés, des poissons à l'humain.

Des expériences montrent que des facteurs provenant des structures médianes (mésoderme intermédiaire et mésoderme somitique) sont impliqués dans la détermination de l'identité des membres, probablement en contrôlant l'expression de *Pitx1/Tbx4* et *Tbx5*. Aussi, lors de transplantations de mésenchyme, leur expression est stable et

maintenue, correspondant toujours à l'identité postérieure pour *Pitx1/Tbx4* et antérieure pour *Tbx5* (Isaac *et al.*, 1998;Gibson-Brown *et al.*, 1998a). Il est possible d'induire des membres ectopiques en appliquant des billes de Fgfs dans le flanc embryonnaire. L'identité de ces membres dépend du niveau rostro-caudal où les billes ont été appliquées et elle corrèle toujours avec l'expression de *Pitx1/Tbx4* pour les membres postérieurs et *Tbx5* pour les membres antérieurs (Cohn *et al.*, 1995;Ohuchi *et al.*, 1995). De plus, lorsqu'on surexprime *Pitx1* ou *Tbx4* dans les membres antérieurs, où ils ne sont pas normalement exprimés ou *Tbx5* dans les membres postérieurs, on observe une transformation partielle des ailes en pattes et vice-versa (Logan and Tabin, 1999;Takeuchi *et al.*, 1999). Enfin, les embryons *Pitx1*^{-/-} montrent une transformation partielle des pattes postérieures en pattes antérieures (Szeto *et al.*, 1999;Lanctot *et al.*, 1999b). Donc, à cause de leur patron d'expression si spécifique et des résultats de surexpression ectopique chez le poulet et de perte de fonction chez la souris, on pense que *Pitx1* et *Tbx4* (probablement en agissant de concert) sont les déterminants des membres postérieurs et *Tbx5*, celui des membres antérieurs. Certains gènes *Hox* sont également différenciellement exprimés dans les membres antérieurs et postérieurs (Tabin, 1989;Simon and Tabin, 1993;Nelson *et al.*, 1996). Par contre, ils ne sont pas exprimés dans tout le mésenchyme de chacun des bourgeons et ils sont exprimés relativement tard. Ils pourraient plutôt se situer en aval des molécules qui dictent l'identité. On sait qu'ils sont importants pour la spécification et/ou la croissance de différents segments P/D des membres. Ils pourraient agir en régulant de façon différentielle les niveaux de prolifération locale et les propriétés d'adhésion cellulaire, qui pourraient être importantes pour la spécification précise de l'identité (Logan, 2003).

1.6 Rôles des *Pitx* au cours du développement embryonnaire

1.6.1. Famille des *Pitx*

Les protéines à homéodomaines jouent un rôle fondamental au cours du développement, autant chez les vertébrés que chez les invertébrés, en contrôlant différents processus de spécification de segments et la détermination de différents types cellulaires (Banerjee-Basu and Baxevanis, 2001). Ce sont des facteurs de transcription qui lient spécifiquement l'ADN grâce à un motif conservé hélice-boucle-hélice appelé homéodomaine (Banerjee-Basu *et al.*, 2001). Les membres les plus connus de cette famille de facteurs de transcription sont les gènes du complexe Hox. Les *Pitx* font partie de la classe « paired » des homéodomaines ; ils appartiennent à la sous-famille bicoïde puisque leur homéodomaine ressemble à celui du gène de drosophile *bicoïde* (Drouin *et al.*, 1998c). Cette sous-famille est caractérisée par la présence d'une lysine en position 50 de l'homéodomaine qui dicte la spécificité de liaison à l'ADN (reconnaît la séquence TAAT/GCC où le premier C est reconnu par la lysine) (Hanes and Brent, 1989; Treisman *et al.*, 1989). La sous-famille bicoïde ne comprend que quelques membres chez les vertébrés dont les *Pitx*, *goosecoïde* et les *Otx* (Drouin *et al.*, 1998c). La famille des *Pitx* comprend trois membres, soient *Pitx1* (*Ptx1/P-Otx/Backfoot*), *Pitx2* (*Ptx2, Rieg, Arp1*) et *Pitx3* (*Ptx3*). Les *Pitx* sont très homologues au niveau de leur homéodomaine (voir **figure 1.3**, p.28). Par contre, ils diffèrent dans leurs parties amino et carboxy-terminales. *In vitro*, les trois protéines ont une capacité de liaison à l'ADN et une activité transcriptionnelle similaire (Drouin *et al.*, 1998a; Drouin *et al.*, 1998b; Tremblay *et al.*, 2000). Comme les *Pitx* reconnaissent un site de liaison à 6 pb (relativement fréquent dans le génome), on pense que leur activité de liaison à l'ADN est modulée par des interactions protéines-protéines.

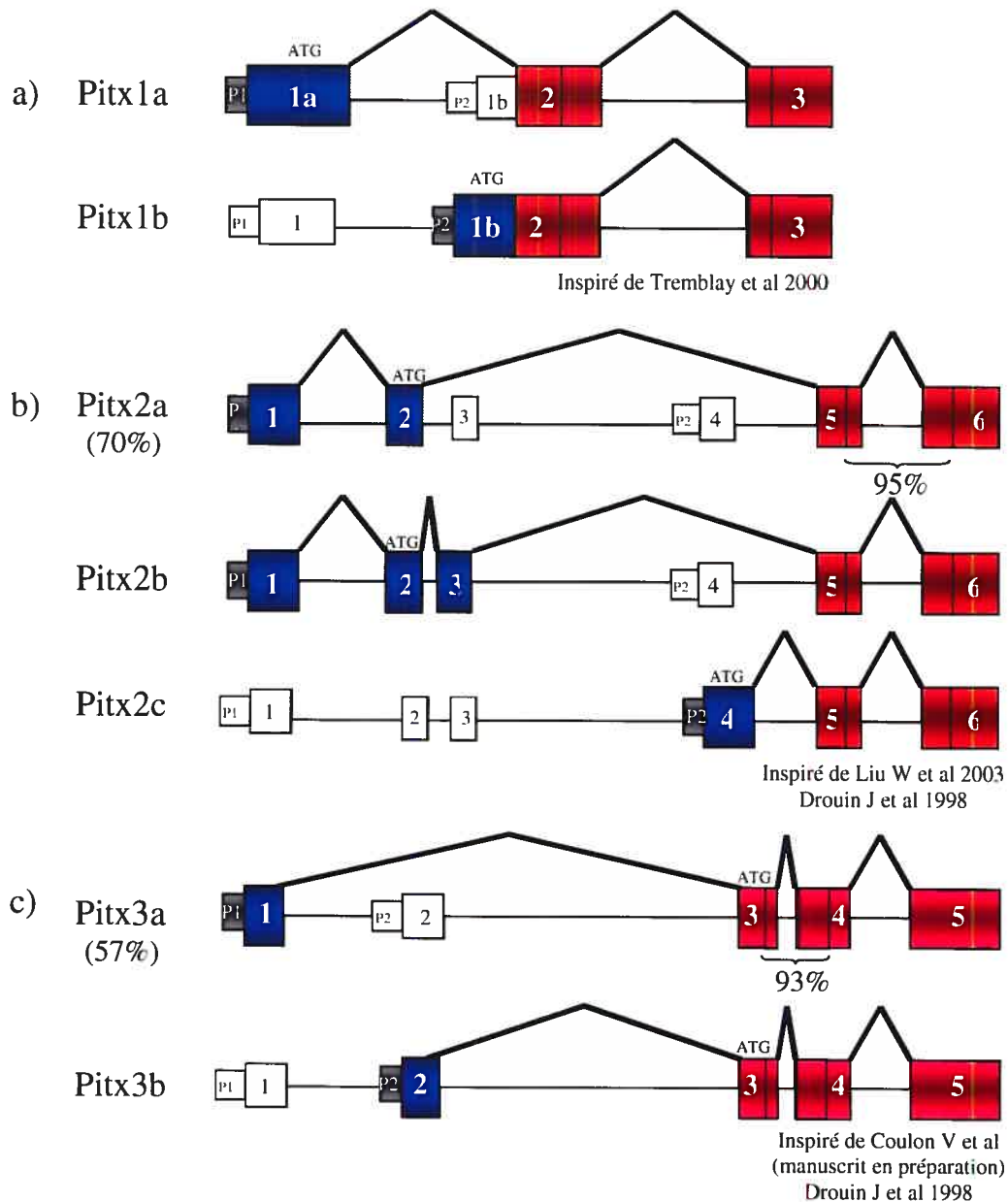


Figure 1.3: La famille *Pitx*:

Le gène *Pitx1* code pour deux isoformes qui diffèrent dans l'exon1 (en N-terminal) parce qu'ils utilisent deux promoteurs différents et deux ATG différents (a). Le gène *Pitx2* (70% d'homologie avec *Pitx1*) code pour 3 isoformes: le a et le b proviennent d'épissage alternatif, et le c provient de l'utilisation d'un promoteur et d'un ATG différent. L'homéodomaine de *Pitx2* a 95% d'homologie avec celui de *Pitx1* (b). Les deux isoformes du gène *Pitx3* (57% d'homologie avec *Pitx1*) codent pour une seule et même protéine, mais en utilisant deux promoteurs différents qui s'expriment dans différents tissus. L'homéodomaine de *Pitx3* a 93% d'homologie avec celui de *Pitx1* (c). La boîte hachurée correspond aux parties d'exons codant pour l'homéodomaine. Les exons rouges sont conservés parmi chaque isoformes.

1.6.2 *Pitx1*

Pitx1 a été cloné et caractérisé au laboratoire pour son rôle dans la transcription du gène hypophysaire de la POMC (*Ptx1*) (Lamonerie et al., 1996). Il a également été cloné suite à un double-hybride avec Pit1, un facteur de transcription de la famille Pou exprimé spécifiquement dans l'hypophyse (*P-Otx1*) (Szeto et al., 1999). *Pitx1* est exprimé dans deux domaines distincts au cours du développement embryonnaire, dans un domaine antérieur et un postérieur (voir **figure 1.4 a**, p.30). Dans la partie antérieure, *Pitx1* est exprimé dans le stomodeum et ses dérivés, comme l'ectoderme oral, la poche de Rathke et l'hypophyse, le palais et l'épithélium olfactif, ainsi que dans certaines cellules du mésenchyme de la première arche branchiale, la mandibule et la langue qui proviennent de la crête neurale (Lanctot et al., 1997). Dans l'hypophyse, *Pitx1* est exprimé dans toutes les cellules, et non pas seulement dans les cellules corticotropes qui expriment la POMC (Lamonerie et al., 1996; Tremblay et al., 1998; Lanctot et al., 1999a). Il est également exprimé dans la plupart des cellules en culture dérivées de l'hypophyse, avec des niveaux d'expression plus élevés dans les cellules modèles gonadotropes comme les α -T3 et les L β T2 (Tremblay et al., 1998). Dans la partie postérieure, *Pitx1* est exprimé très tôt, avant e7, dans le mll postérieur dont une partie formera les membres postérieurs et plus tard, dans tout le mésenchyme de ces membres (et pas dans le mésenchyme des membres antérieurs) (Lamonerie et al., 1996; Szeto et al., 1996; Lanctot et al., 1997; Shang et al., 1997). *Pitx1* est également exprimé dans le tissu extra-embryonnaire, la paroi abdominale, les glandes surrénales, les poumons, le thymus et de

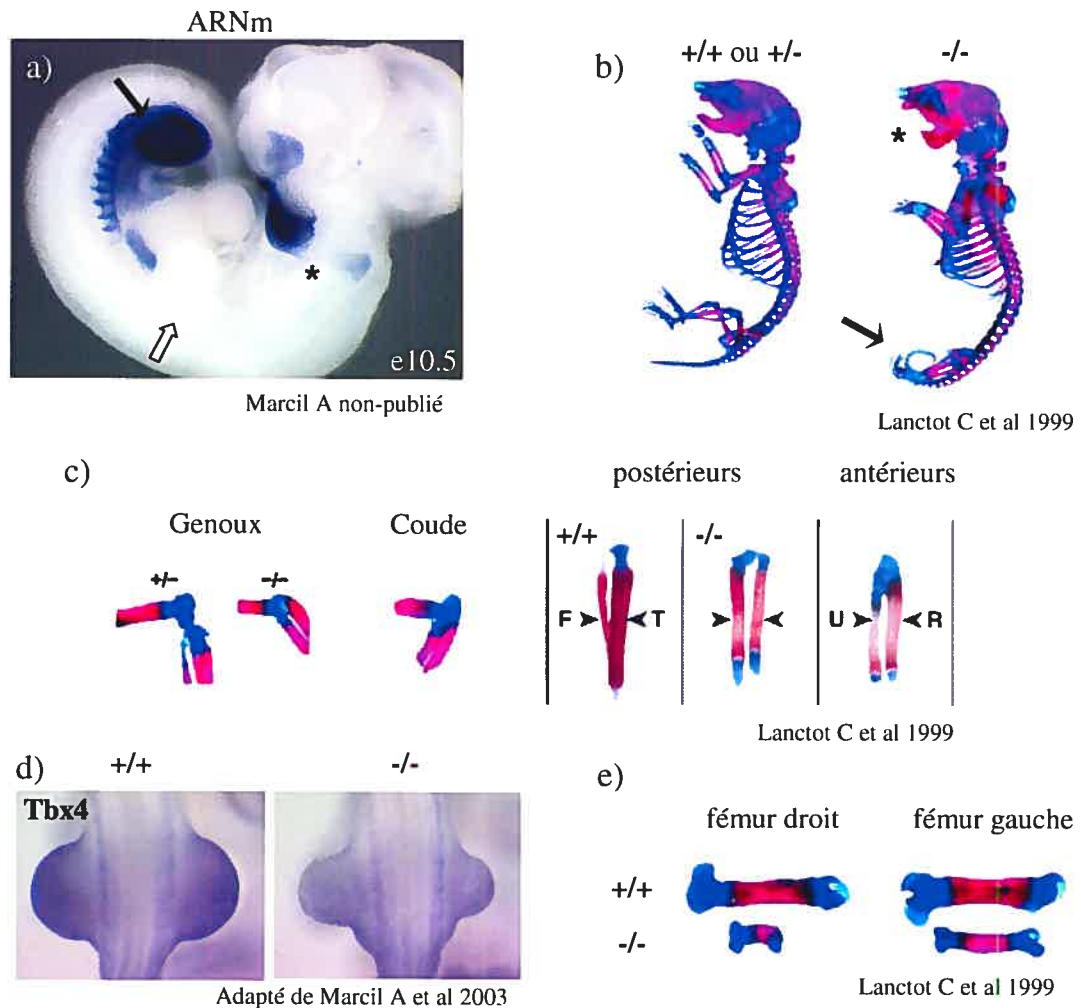


Figure 1.4: *Pitx1*: *Pitx1* est exprimé spécifiquement dans le mésenchyme des membres postérieurs (flèche noire), vs celui des membres antérieurs (flèche blanche) au cours du développement embryonnaire. Il est également exprimé dans le mésenchyme de la première arche branchiale ainsi que dans l'ectoderme oral (astérisque*) (a). Les ko *Pitx1* ont une hypoplasie de la mandibule (astérisque*) et des anomalies au niveau des pattes postérieures (flèche noire) (b). L'identité des membres postérieurs des embryons *Pitx1*^{-/-} est partiellement transformée en identité antérieure. Ces transformations sont caractérisées par l'absence de cartilage au niveau de l'articulation du genou qui font que celui-ci ressemble à un coude, ainsi que la grosseur relative du tibia (T) et du péroné (ou fibula (F)) qui ressemble plus à celle du radius (R) et du cubitus (ou ulna (U)) (c). Au niveau moléculaire, l'expression de *Tbx4*, un gène spécifiquement exprimé dans les membres postérieurs, est diminué dans les embryons *Pitx1*^{-/-} (d). Il existe également une asymétrie gauche/droite dans la pénétrance du phénotype, le fémur droit étant beaucoup plus réduit que celui de gauche par exemple (e).

façon transitoire dans le pelvis et dans le sinus urogénital, ainsi que dans certains organes internes du système gastro-intestinal comme l'intestin, l'estomac et la vessie (Lanctot *et al.*, 1997;Shang *et al.*, 1997).

Pitx1 active la transcription de plusieurs gènes hypophysaires en liant la séquence TAAT/GCC sur l'ADN et en coopérant par des interactions protéines-protéines avec des facteurs de transcription spécifiques à chaque lignée hypophysaire. Par exemple, *Pitx1* interagit avec NeuroD1 (via le bHLH ubiquitaire Pan1 dans l'hétérodimère NeuroD/Pan) (Poulin *et al.*, 2000) et TPit (Tbox) (Lamolet *et al.*, 2001) dans les cellules corticotropes pour activer la transcription de la POMC; *Pitx1* interagit aussi avec SF1 (steroidogenic factor 1, récepteur nucléaire) dans les gonadotropes pour activer le promoteur de la LH β (Tremblay *et al.*, 1998;Tremblay *et al.*, 1999;Tremblay and Drouin, 1999). *Pitx1* interagit avec Pit1 (facteur de la famille Pou) dans les somato-lactotropes (somatotropes, thyrotropes et lactotropes) pour activer la transcription du promoteur de la pro-lactine (PRL) (Szeto *et al.*, 1996;Tremblay *et al.*, 1998). Ce code combinatoire permet l'expression spécifique des hormones dans chacune des lignées hypophysaires. Donc, plusieurs gènes cibles ont été identifiés dans l'hypophyse (*PRL*, *α -GSU*, *POMC*, *GH*, *TSH β* , *LH β* , *FSH β* et *GnRHR*) et la plupart du temps, on a identifié un site précis semblable au consensus qui semble médier l'action de *Pitx1* (Lamonerie *et al.*, 1996;Tremblay *et al.*, 1998;Melamed *et al.*, 2002;Zakaria *et al.*, 2002;Jeong *et al.*, 2004). Par exemple, dans les cellules α -T3 (précurseurs de cellules gonadotropes), des expériences d'antisens ont montré qu'en plus de réguler le gène de la *β LH*, *Pitx1* était important pour l'expression de l' *α -GSU* et de *Lhx3*, et un site précis dans le promoteur de l' *α -GSU* a été identifié (Lamonerie *et al.*, 1996;Tremblay *et al.*, 1998) (l' *α -GSU* est la

première sous-unité hormonale à être exprimée dans l'hypophyse à e11.5). Par contre, dans le cas du *GnRHR*, aucun site précis n'a été identifié, mais une interaction entre Pitx1 avec AP1 (c-jun) suggère que celui-ci pourrait agir comme un co-facteur (Jeong et al., 2004).

Pitx1 contient deux domaines de trans-activation dans la partie amino et carboxy-terminale respectivement, et seulement un de ces deux domaines est requis pour l'activation d'un promoteur simple comme l'élément central provenant du promoteur de la POMC trimérisé. Cependant, sur les promoteurs plus complexes comme celui de la LH β , le domaine d'activation situé dans la partie amino-terminale ne semble pas suffisant pour la trans-activation (les deux domaines d'activation pourraient être actifs selon le contexte du promoteur) (Tremblay et al., 1999).

Il existe deux isoformes de *Pitx1*, *Pitx1b* étant généré par l'utilisation d'un promoteur alternatif. Ces isoformes sont différents dans la partie amino-terminale (Tremblay et al., 2000) (voir **figure 1.3 a**, p.28). Par contre, aucune différence entre les deux isoformes n'a été trouvée jusqu'à maintenant : ils ont une spécificité de liaison à l'ADN semblable *in vitro* et ils trans-activent de la même façon les différents promoteurs hypophysaires. L'activité transcriptionnelle de Pitx1 ne semble donc pas dépendre de la partie amino-terminale (Tremblay *et al.*, 1999; Tremblay *et al.*, 2000)

Le patron d'expression de *Pitx1* est particulièrement intéressant au niveau des membres. C'est un des rares gènes, avec *Tbx4*, à être exprimé spécifiquement dans le mésenchyme des membres postérieurs (GibsonBrown *et al.*, 1996; Simon *et al.*,

1997;Lanctot *et al.*, 1997;Shang *et al.*, 1997;Gibson-Brown *et al.*, 1998a). Des expériences de perte de fonction par recombinaison homologue chez la souris ont permis de montrer que *Pitx1* joue un rôle important dans la spécification de l'identité des membres postérieurs : en absence de *Pitx1*, les membres postérieurs sont transformés partiellement en membres antérieurs (Szeto *et al.*, 1999;Lanctot *et al.*, 1999b) (voir **figure 1.4**, p.30). L'analyse détaillée des embryons *Pitx1*^{-/-} montre que globalement, les bourgeons de ces membres postérieurs sont plus petits et plus étroits que ceux des embryons de type sauvage, ce qui suggère un rôle possible de *Pitx1* dans la croissance. Par ailleurs, les membres postérieurs sont plus courts et l'ossature ressemble plus à des membres antérieurs : il y a des changements structuraux dans la forme, la grosseur et le diamètre relatifs des os tibia/péroné (qui sont de même grosseur, comme les os radius/cubitus des membres antérieurs); il y a également des altérations au niveau de la spécification de l'articulation du genou (absence de rotule) et au niveau de l'autopode proximal (apparition d'un simili-pisiforme) qui suggèrent l'apparition d'une identité antérieure, puisque ces structures (rotule dans membres postérieurs et pisiforme dans membres antérieurs) sont conservées au cours de l'évolution et sont des caractéristiques spécifiques à chaque membre (Szeto *et al.*, 1999;Lanctot *et al.*, 1999b). La grosseur du pelvis et la longueur des os longs comme le fémur sont aussi réduites, par contre, leur morphologie est normale. Aussi, il est intéressant de noter que le phénotype est asymétrique : les pattes droites sont presque toujours plus affectées que celles de gauche (c'est évident par rapport à la longueur du fémur, voir **figure 1.4 e**, p.30). Au niveau moléculaire, on remarque une diminution de l'expression de *Tbx4*, l'autre molécule exprimée uniquement dans les membres postérieurs (voir **figure 1.4 d**, p.30). Les embryons *Pitx1*^{-/-} ont également des défauts au niveau cranio-facial : fente palatine,

langue raccourcie et fourchue et hypoplasie de la mandibule. Ces embryons meurent d'insuffisance respiratoire juste après la naissance.

Chez le poulet, des expériences de surexpression ectopique dans les membres antérieurs (ailes) ont permis de soutenir le rôle de *Pitx1* dans la spécification de l'identité des membres postérieurs puisque celles-ci entraînent des transformations partielles des ailes en pattes (Logan *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999). Cette transformation s'accompagne d'une induction de l'expression de *Tbx4*, et de certains *Hox* qui sont habituellement restreints aux membres postérieurs. Il est intéressant de noter que *Pitx2*, même s'il est très semblable à *Pitx1*, n'est pas capable d'induire ni les transformations phénotypiques, ni l'expression de *Tbx4* dans ces mêmes expériences (Logan *et al.*, 1999).

D'autres molécules sont exprimées spécifiquement dans le mésenchyme des membres postérieurs et ces molécules pourraient également jouer un rôle dans la spécification de l'identité postérieure : il y a *Tbx4* et certains gènes *Hox* dont *Hoxc10* et *Hoxc11*. Le modèle actuel prône que *Pitx1* et *Tbx4* agiraient de façon coordonnée pour dicter l'identité des membres postérieurs, et que les *Hox* spécifiques se situeraient en aval dans ce processus (Logan *et al.*, 1999). Par contre, on ne connaît aucune cible transcriptionnelle directe pour chacun de ces facteurs et donc, c'est un processus très peu connu à l'heure actuelle. Quelques études ont tenté de faire la lumière sur les différences entre les membres antérieurs et les membres postérieurs, dont une étude où on comparait les niveaux d'expression des ARNm, avec l'aide de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), entre les deux types de mésenchyme. Malheureusement, à part les gènes

déjà connus pour être différentiellement exprimés (*Pitx1*, *Tbx4/5*, certains *Hox*), aucun nouveau gène n'est ressorti de cette étude (Margulies et al., 2001).

1.6.3 *Pitx2*

Pitx2 a été cloné par plusieurs groupes : tout d'abord par clonage positionnel afin d'identifier le gène causant le syndrome de Rieger (*Rieg*) (Semina et al., 1996), en cherchant de nouvelles homéoprotéines à partir d'une banque d'ADN_c d'hypophyse (*Ptx2*) (Gage and Camper, 1997) et aussi comme une cible du gène *All1*, impliqué dans les leucémies (*Arp1*) (Arakawa et al., 1998). Tout comme *Pitx1*, *Pitx2* est exprimé dans la poche de Rathke et l'hypophyse (voir **figure 1.5 a**, p.36). En plus, *Pitx2* est exprimé dans le mésenchyme péri-oculaire, l'épithélium dentaire, les épithélia de la mandibule et du maxillaire, le cordon ombilical et les membranes extra-embryonnaires (Semina *et al.*, 1996;Gage *et al.*, 1997). Ces patrons d'expression sont conséquents avec les phénotypes observés chez les patients qui souffrent du syndrome de Rieger. *Pitx2* est également exprimé dans les somites et dans les myoblastes en migration au niveau des membres, dans la langue et dans certains neurones du cerveau (Semina *et al.*, 1996;Gage *et al.*, 1997;Westmoreland et al., 2001;Nicholson et al., 2001;Martin et al., 2002). Enfin, *Pitx2* est exprimé dans le mll, principalement du côté gauche, et cette expression asymétrique est maintenue dans les organes dérivés comme le cœur, les intestins et les poumons (Yoshioka et al., 1998;Patel et al., 1999;Lu et al., 1999b).

Plusieurs groupes ont publié les résultats de perte de fonction du gène *Pitx2* et les embryons meurent à e14.5. L'utilisation d'un allèle hypomorphe (*néo*) qui permet à quelques embryons homozygotes *néo/néo* de survivre jusqu'à la naissance (P1) a permis

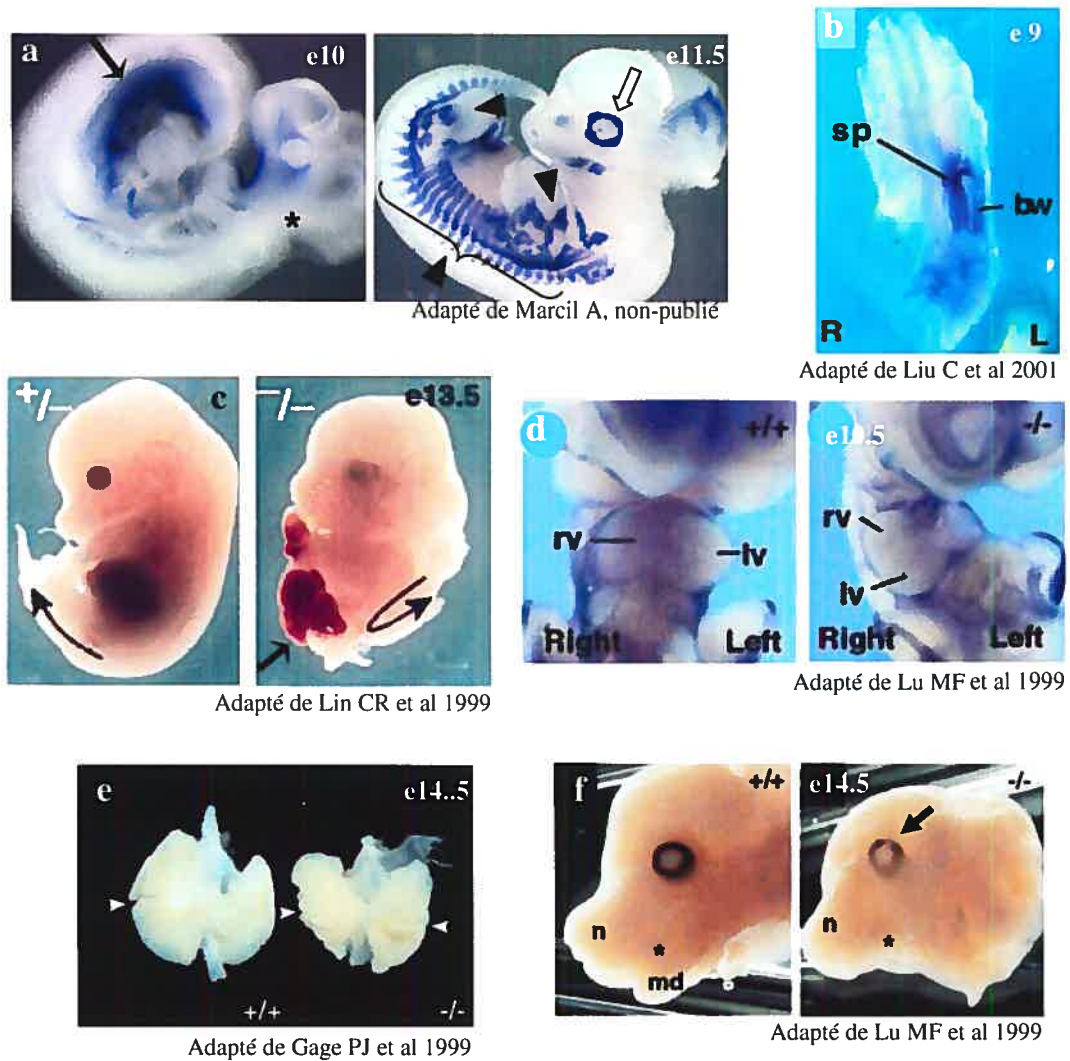


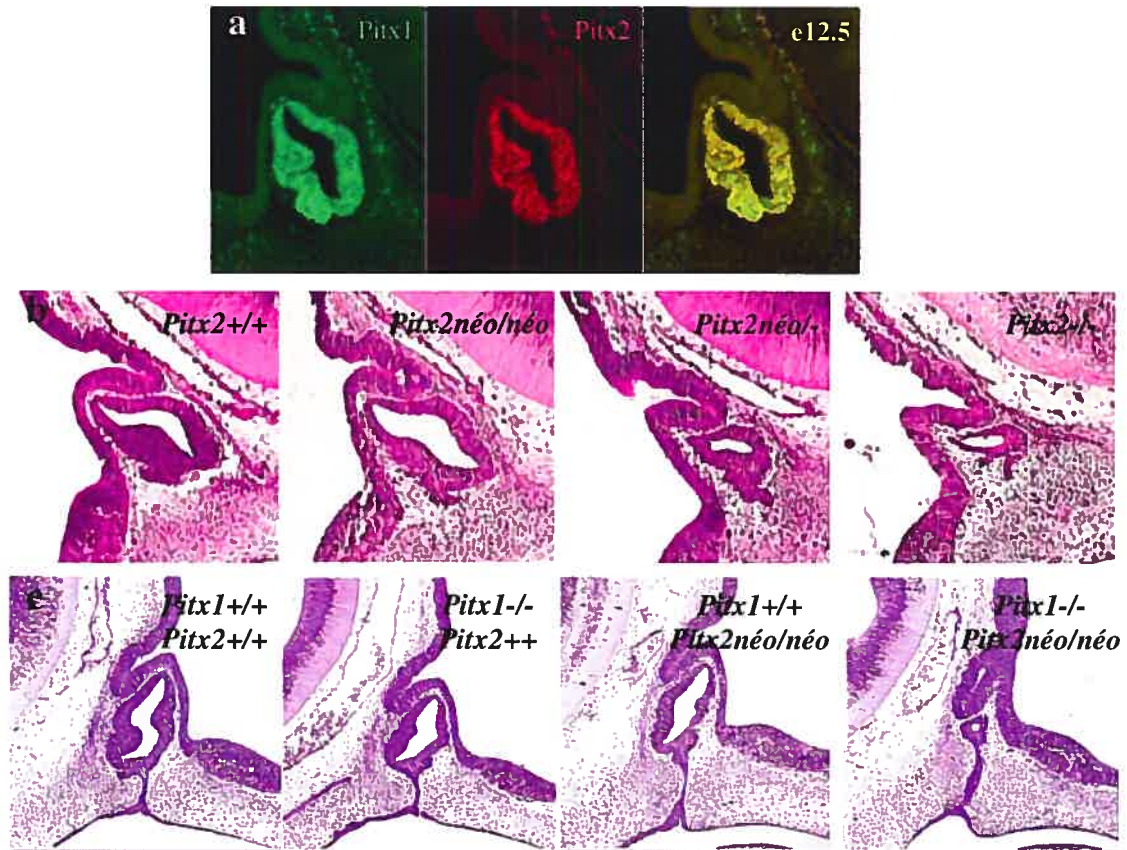
Figure 1.5: *Pitx2*: *Pitx2* est exprimé à e10 dans la région de la cavité abdominale (flèche noire) et au niveau cranio facial (astérisque*), à e11.5 dans l'œil (flèche blanche), dans les somites et les myoblastes en migration (têtes de flèches noires) (a). Il est également exprimé de façon asymétrique dans le mll de gauche (b). Les embryons *Pitx2*^{-/-} ont de multiples anomalies: rotation incomplète de l'embryon (flèche recourbée), mauvaise fermeture de la cavité abdominale (flèche noire) (c); nombreuses malformations cardiaques, dont la formation des deux ventricules du côté droit (mais ils sont bien formés) (d); isomérisme pulmonaire droit (e); hypoplasie de la mandibule (astérisque*) et épaissement de la cornée au niveau des yeux (flèche noire) (f). R: Right, L: left, sp: splanchnopleure, bw: body wall, rv: right ventricule, lv: left ventricule, n: nasal structure, md: mandibule.

de déterminer que différents dosages de *Pitx2* étaient requis pour le développement de différents organes (Gage et al., 1999). Les embryons *Pitx2*^{-/-} ont plusieurs phénotypes (voir **figure 1.5**, p.36) : une absence de fermeture au niveau de la paroi abdominale (là où s'attache le cordon ombilical), une perte d'asymétrie de différents organes (isomérisme pulmonaire droit, position du cœur altérée, problèmes de rotation des intestins), un blocage dans la détermination et la prolifération de l'hypophyse et des dents, problèmes importants au niveau du développement des yeux (qui sont plus petits et mal orientés, la cornée est plus épaisse et il y a absence des muscles péri-oculaires) et du développement cranio-facial (voir **figure 1.5**, p.36) (Lin et al., 1999; Kitamura et al., 1999; Gage et al., 1999; Lu and Martin, 1999a). Les phénotypes observés concordent avec les anomalies décrites pour le syndrome de Rieger, un syndrome autosomal dominant : hypoplasie des dents, léger dimorphisme cranio-facial, anomalies de la chambre antérieure de l'œil qui causent le glaucome, problèmes au niveau du cordon ombilical et anomalies cardiaques (Lin et al., 1999; Kitamura et al., 1999; Gage et al., 1999; Lu et al., 1999b). De plus, même les embryons *Pitx2*^{+/-} ont parfois un phénotype aux yeux et aux dents, ce qui rappelle ce syndrome (Gage et al., 1999). L'analyse des ko a également permis à plusieurs groupes de caractériser le rôle essentiel de *Pitx2* dans la détermination de l'asymétrie gauche/droite, où il semble être un facteur de transcription important en aval de la cascade de signalisation *Shh/Nodal* impliquée dans l'asymétrie des organes dérivés du mll (Meno et al., 1998; Yoshioka et al., 1998; Patel et al., 1999). Enfin, la surexpression ectopique de *Pitx2* dans le mll de droite change la rotation du cœur et des intestins, et l'expression de *Pitx2* dans les mutants ayant des défauts de latéralité corrèle avec les changements d'asymétrie observés, ce qui confirme le rôle essentiel de *Pitx2* dans la

spécification de l'asymétrie gauche/droite (Meno *et al.*, 1998; Piedra *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1998; Logan *et al.*, 1998a; Campione *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999b; Linask *et al.*, 2002).

Pitx1 et *Pitx2* sont co-exprimés dans certaines régions du stomodeum et ses dérivés: la poche de Rathke et l'hypophyse, l'épithélium oral et olfactif (voir **figure 1.6 a**, p.39) (Suh *et al.*, 2002). Aussi, *Pitx2* est très homologue à *Pitx1*, particulièrement dans l'homéodomaine qui dicte la liaison à l'ADN (voir **figure 1.3 a et b**, p.28). Il n'est donc pas étonnant de constater qu'ils ont des fonctions redondantes, notamment lors du développement de l'hypophyse. Si dans le ko *Pitx1*, la formation de la poche de Rathke s'effectue normalement et quasi normalement dans les *Pitx2*néo/néo, dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*néo/néo, la poche de Rathke est hypoplasique, comme dans les embryons *Pitx2*^{-/-} (voir **figure 1.6**, p.39). Le dosage total des *Pitx* semble donc important pour l'expansion précoce de la poche de Rathke (Suh *et al.*, 2002).

Il existe trois isoformes de *Pitx2*, soit *Pitx2 a*, *b* et *c*. Ces isoformes proviennent d'épissage alternatif (a et b) et de l'utilisation d'un promoteur différent (c) (Semina *et al.*, 1996; Gage *et al.*, 1997; Arakawa *et al.*, 1998). Ils diffèrent dans la partie amino-terminale mais sont identiques dans leur homéodomaine et dans la partie carboxy-terminale (voir **figure 1.3 b**, p.28). Chez la souris, *Pitx2c* est le seul isoforme exprimé de façon asymétrique, à gauche dans le mll et dans les organes dérivés de ce tissu, tandis que les trois isoformes sont co-exprimés dans le mésenchyme de la tête, l'ectoderme oral, le cordon ombilical, les yeux et le système nerveux central (Liu *et al.*, 2001). Chez le poulet, *Pitx2c* est également exprimé de façon asymétrique dans le mésenchyme de la tête, et *Pitx2a* est le seul à être exprimé dans le mésoderme extra-embryonnaire ; il ne



Adapté de Suh H et al 2002

Figure 1.6 Redondance entre *Pitx1* et *Pitx2* dans l'hypophyse:

Pitx1 et *Pitx2* sont co-exprimés dans toute la poche de Rathke à e12,5 (a). *Pitx2* est important pour le développement de l'hypophyse. La grosseur de la poche de Rathke dépend du dosage de *Pitx2*: de gauche à droite, on voit une hypophyse normale à e12,5 dans les embryons de type sauvage, ensuite celle d'embryons *Pitx2néo/néo* est normale, celle des embryons *Pitx2néo/-* est beaucoup plus petite et celle des embryons *Pitx2-/-* est totalement hypoplasique (b). Les *Pitx* sont redondants au cours du développement de l'hypophyse: de gauche à droite, on voit la poche de Rathke normale, celle des embryons *Pitx1-/-* est normale, celle des embryons *Pitx2néo/néo* est également normale, par contre celle des embryons *Pitx1-/-;Pitx2néo/néo* est hypoplasique, de façon semblable à ce qu'on peut observer chez les embryons *Pitx2-/-*.

semble pas exister de *Pitx2b* (Yu et al., 2001). Il existe donc des différences importantes entre les espèces.

Un groupe a effectué l'inactivation spécifique de chaque isoforme chez la souris afin de déterminer le rôle de chacun. La double-inactivation des isoformes a et b produit des phénotypes cranio-faciaux (fissure du palais) et oculaires (Liu et al., 2003). Par contre, contrairement au ko total qui est léthal à e14.5, certains embryons *Pitx2ab*^{-/-} réussissent à survivre et ceux-ci sont fertiles. Ceci a permis de faire l'inactivation de l'isoforme c dans un fond génétique où les isoformes a et b sont délétés. Les résultats montrent que l'important, au cours du développement, serait la quantité totale de *Pitx2*, plutôt qu'une fonction spécifique de chaque isoforme. Ainsi, en utilisant un allèle néo hypomorphe pour l'isoforme c, ils ont démontré que différents organes nécessitent des seuils de concentration différents : le cœur nécessite de faibles concentrations de *Pitx2c* tandis que les poumons et l'intestin en nécessitent beaucoup plus. Ainsi, en augmentant la concentration en *Pitx2c*, le phénotype au niveau du duodénum passe d'un arrêt de la rotation à une rotation aléatoire puis à une rotation inverse et finalement à une rotation normale (Liu et al., 2001; Liu et al., 2002). Malgré l'absence de données qui montrent une spécificité d'action de chaque isoforme *in vivo*, plusieurs groupes ont récemment montré que les trois isoformes de *Pitx2* ont des activités transcriptionnelles différentes selon les promoteurs et selon les types cellulaires. Par exemple, une des cibles de *Pitx2* dans le cœur est le promoteur de l'ANF (Ganga et al., 2003; Toro et al., 2003; Toro et al., 2004). Les trois isoformes activent la transcription de ce promoteur (avec des efficacités variables), mais seulement l'isoforme c est capable de synergiser avec *Nkx2.5* (celui-ci inhibe même l'activation par l'isoforme a) (Ganga et al., 2003). La même chose a été

observée avec le promoteur de la procollagen lysyl hydroxylase (PLOD1) (Hjalt *et al.*, 2001;Cox *et al.*, 2002;Ganga *et al.*, 2003). D'autres gènes cibles de *Pitx2* ont été trouvés, notamment dans l'hypophyse où *Pitx2* active l'expression de facteurs de transcription importants pour la différenciation des différentes lignées hypophysaires, comme *Pit1* et *Gata2* (Suh *et al.*, 2002;Quentien *et al.*, 2002). Enfin, *Pitx2* semble également impliqué dans la voie Wnt/ β -caténine au cours du développement hypophysaire et cardiaque. *Pitx2* remplacerait sur certains promoteurs, dont celui de la *cyclinD2*, les membres de la famille Lef/Tcf pour médier les effets transcriptionnels de la β -caténine. Ceci expliquerait la diminution de prolifération observée au niveau de ces organes dans les embryons *Pitx2*^{-/-} (Kioussi *et al.*, 2002;Briata *et al.*, 2003;Baek *et al.*, 2003).

1.6.4 *Pitx3*

Le dernier membre de la famille a été identifié par criblage de banques d'ADN_c pour des séquences similaires aux *Pitx* (Semina *et al.*, 1997). *Pitx3* est exprimé dans l'œil (lentille), les somites et les muscles, la langue et spécifiquement dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale (Semina *et al.*, 1997;van den Munckhof *et al.*, 2003). Il existe une souris mutante (aphakia) qui contient une délétion du promoteur en 5' de *Pitx3* (Semina *et al.*, 1997;Semina *et al.*, 2000). Dans ces souris, l'expression de *Pitx3* est très fortement diminuée dans le cerveau et dans l'œil. Ces souris ont de petits yeux sous-développés sans lentilles ((Semina *et al.*, 1997;Semina *et al.*, 2000) ainsi qu'une perte de neurones dopaminergiques avec un phénotype qui ressemble à celui du Parkinson (van den Munckhof *et al.*, 2003). Ceci concorde bien avec les résultats qui montrent que *Pitx3* agit directement sur le promoteur de la *TH* (tyrosine hydroxylase), une enzyme spécifiquement exprimée dans les neurones dopaminergiques, qui participe à la synthèse

de la dopamine (Lebel et al., 2001). Des mutations dans la séquence codante du gène *Pitx3* ont également été impliquées dans le syndrome ASMD (« anterior segment mesenchymal dysgenesis ») et dans certaines cataractes (Semina et al., 1998).

1.7 Facteurs de transcription à boîte T (*Tbx*)

1.7.1 Généralités

Les protéines à boîte T sont des facteurs de transcription impliqués dans plusieurs processus au cours du développement embryonnaire. Par exemple, *brachyury (T)*, qui est le membre fondateur de cette famille, est essentiel pour la spécification du mésoderme puisque les embryons ko n'ont pas de structures d'origine mésodermale (Herrmann, 1992). *Tbx4* et *Tbx5* appartiennent à cette famille. *Tbx5* est exprimé spécifiquement dans les membres antérieurs, tandis que *Tbx4* est exprimé spécifiquement dans les membres postérieurs (GibsonBrown *et al.*, 1996; Gibson-Brown *et al.*, 1998a; Gibson-Brown *et al.*, 1998b). *Tbx4* et *Tbx5* font partie d'une sous-famille qui comprend les gènes *Tbx2/3/4* et *5*, qui forment deux paires de gènes provenant de la réplication d'une duplication en tandem ancestrale. Chez la souris, *Tbx5* et *Tbx3* se retrouvent sur le chromosome 5, tandis que *Tbx4* et *Tbx2* sont sur le chromosome 11 (Agulnik *et al.*, 1996; Ruvinsky and Silver, 1997). Plusieurs membres de la famille des *Tbx* ont été impliqués dans des syndromes ou des maladies humaines (Isphording et al., 2004) : au laboratoire, nous avons identifié *TPIT* comme étant responsable d'une déficience hypophysaire isolée en ACTH (Pulichino *et al.*, 2001; Lamolet *et al.*, 2001; Pulichino *et al.*, 2003a; Pulichino *et al.*, 2004); *TBX3* est impliqué dans le syndrome radio-mammaire caractérisé par un développement anormal des bras et des glandes mammaires (Bamshad *et al.*, 1995; Bamshad *et al.*, 1997; Bamshad *et al.*, 1999); *TBX5* est muté chez les patients qui

souffrent du syndrome Holt-Oram (HOS) (Basson *et al.*, 1997;Li *et al.*, 1997) tandis que *TBX4* est muté dans le syndrome coxo podo patellaire (« small patella syndrome ») (Bongers *et al.*, 2004). Les protéines Tbx2 et Tbx3 ont été caractérisées comme des répresseurs transcriptionnels, tandis que Tbx5 et Tbx4 sont des activateurs de la transcription.

1.7.2 *Tbx5*

Outre son expression dans les membres antérieurs, *Tbx5* est également exprimé dans le cœur (Chapman *et al.*, 1996;Li *et al.*, 1997). Ainsi, le syndrome Holt-Oram est caractérisé par de sévères anomalies cardiaques en plus de malformations aux bras (perte du pouce, diminution de la taille du radius) (Basson *et al.*, 1997;Li *et al.*, 1997). Le ko de *Tbx5* a démontré son rôle essentiel pour la croissance des bourgeons des membres antérieurs : dans les embryons *Tbx5*^{-/-}, le territoire présomptif des membres antérieurs est spécifié, mais ceux-ci ne poussent pas (Agarwal *et al.*, 2003). Ces embryons meurent assez tôt vers e10.5 en raison d'anomalies cardiaques. Un ko conditionnel dans les membres a donc été effectué et aucune structure osseuse ne se développe dans les membres antérieurs de ces embryons (même l'élément le plus proximal comme la jonction articulaire de l'épaule est absente) (Rallis *et al.*, 2003). *Tbx5* est donc un gène essentiel pour la croissance des membres antérieurs et ce rôle semble conservé dans plusieurs espèces puisqu'une mutation chez le zebrafish « *heartstrings* » causant des malformations au cœur ainsi qu'une absence de nageoires pectorales (l'équivalent des membres antérieurs chez les poissons) est également due à une mutation dans ce gène (Garrity *et al.*, 2002).

Ces études ont montré qu'au niveau moléculaire, *Tbx5* est important pour initier l'expression de *Fgf10* dans le mésenchyme des membres antérieurs (Agarwal *et al.*, 2003;Rallis *et al.*, 2003), empêchant ainsi l'initiation de l'expression de *Fgf8* dans l'AER, ce qui expliquerait l'absence de croissance des membres antérieurs (Agarwal *et al.*, 2003). L'action de *Tbx5* serait directe puisqu'il existe sur le promoteur de *Fgf10* un site pour les boîtes T permettant son l'activation en transfection transitoire (Ng *et al.*, 2002;Agarwal *et al.*, 2003). Ce promoteur contient également des sites Lef1 et Tcf1, ce qui suggère une régulation additionnelle par la voie Wnt (Ng *et al.*, 2002;Agarwal *et al.*, 2003). Donc, une interaction entre *Tbx5* et la voie de signalisation Wnt permettrait d'initier l'expression de *Fgf10* et par le fait même la croissance des membres dans la partie antérieure (Ng *et al.*, 2002;Garrity *et al.*, 2002;Takeuchi *et al.*, 2003;Agarwal *et al.*, 2003;Rallis *et al.*, 2003)

Par ailleurs, des études de gain de fonction chez le poulet avaient plutôt démontré que *Tbx5* jouait un rôle dans la spécification de l'identité des membres antérieurs puisque lorsqu'on le surexprime dans les membres postérieurs, il y a transformation partielle en pattes antérieures (Rodriguez-Esteban *et al.*, 1999;Takeuchi *et al.*, 1999). Par contre, les expériences de perte de fonction chez la souris ne nous permettent pas de déterminer si ce rôle est conservé à cause de l'absence de membres dans les embryons *Tbx5*^{-/-} (Agarwal *et al.*, 2003;Rallis *et al.*, 2003). Cependant, les molécules caractéristiques des membres postérieurs comme *Pitx1* et *Tbx4* ne sont pas induites, ce qui semble indiquer qu'il n'y a pas de changement d'identité en absence de *Tbx5* (Agarwal *et al.*, 2003). De plus, un article récent montre qu'il est possible de remplacer *Tbx5* par *Tbx4* et que ces embryons

développent des membres antérieurs avec une identité antérieure, indiquant que *Tbx5* n'est pas essentiel pour spécifier l'identité antérieure (Minguillon et al., 2005).

1.7.3 *Tbx4*

Tbx4 est exprimé spécifiquement dans les bourgeons des membres postérieurs. Par rapport à *Pitx1*, cette expression est plus tardive et plus restreinte seulement au mésenchyme des bourgeons (Lanctot et al., 1997). *Tbx4* est également exprimé dès e7.5 dans l'allantoïs, ainsi que dans le mésenchyme de la mandibule, dans le mésenchyme des poumons, dans une partie du cœur (qui va donner l'aorte) et dans la paroi abdominale (Naiche and Papaioannou, 2003). Il est impliqué dans le syndrome coxo podo patellaire caractérisé par une absence ou une hypoplasie de la rotule et des anomalies aux hanches (pelvis et fémur) et aux pieds (grand espace entre le gros orteil et le deuxième doigt de pied et quatrième et cinquième doigts de pied plus courts) (Bongers et al., 2004).

Des expériences de gain de fonction chez le poulet ont montré que, de façon similaire à *Pitx1*, la surexpression de *Tbx4* dans les membres antérieurs amène une transformation partielle de l'identité antérieure en identité postérieure. Donc, *Pitx1* et *Tbx4* semblent tous les deux impliqués dans la spécification de l'identité des membres postérieurs (GibsonBrown *et al.*, 1996; Ohuchi *et al.*, 1998; Gibson-Brown *et al.*, 1998a; Rodriguez-Esteban *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999; Niswander, 1999). Le ko de *Pitx1* a permis de confirmer ce rôle dans la spécification de l'identité des membres postérieurs. Par contre, le ko de *Tbx4* est létal vers e10.5 (Naiche *et al.*, 2003), ce qui empêche de connaître son rôle exact dans le processus de spécification des membres. Par contre, quand on remplace *Tbx5* par *Tbx4* dans les membres antérieurs, ceux-ci se

développent et ont une identité antérieure, ce qui signifie que chez la souris, *Tbx4* n'est pas suffisant pour transformer l'identité antérieure en identité postérieure (Minguillon et al., 2005). Aussi, l'étude d'autres marqueurs moléculaires dans les embryons *Tbx4*^{-/-} montre que l'expression de *Pitx1* est également intacte et celle de *Tbx5* n'est pas induite, ce qui semble indiquer que l'identité postérieure des membres est intacte, même en absence de *Tbx4*. Les embryons *Tbx4*^{-/-} n'ont aucun phénotype jusqu'à e8, où un problème à l'allantois devient évident (les embryons meurent à e10.5 à cause d'un problème dans la fusion chorioallantoïque) (Naiche et al., 2003). Entre 29 et 32 somites, juste avant de mourir, les embryons ko ont des bourgeons de membres postérieurs bien visibles, ce qui prouve que ceux-ci sont initiés normalement même en absence de *Tbx4*. De plus, les bourgeons des membres postérieurs entre 27 et 29 somites sont de grosseur comparable à ceux des embryons de type sauvage. Par contre, il semble qu'en culture, ces bourgeons aient un potentiel de croissance moindre comparativement aux contrôles, suggérant un rôle pour *Tbx4* dans la croissance. Au niveau moléculaire, contrairement au ko *Tbx5*, l'expression de *Fgf8* dans l'AER est tout à fait normale. L'expression précoce de *Fgf10* est aussi normale, mais celle-ci n'est pas maintenue dans le mésenchyme des membres (Naiche et al., 2003). Par ailleurs, il existe des liens entre *Tbx4* et *Fgf10* dans le poumon où l'expression ectopique de *Tbx4* induit l'expression de *Fgf10* (Sakiyama et al., 2003). Il est donc possible que *Tbx4* régule également *Fgf10* dans les membres postérieurs, de façon similaire à *Tbx5* dans les membres antérieurs, même si les résultats préliminaires du ko ne semblent pas en accord avec cette hypothèse. Aussi, chez le poulet, la surexpression de *Tbx4* dans le flanc, comme celle de *Tbx5*, est suffisante pour induire la formation d'un membre ectopique, suggérant que *Tbx4* est capable de jouer un rôle similaire à celui de *Tbx5* dans la croissance des membres (Takeuchi et al., 2003).

Ceci a été confirmé récemment par une étude de surexpression de *Tbx4* dans les membres antérieurs où *Tbx5* était absent. Cette étude confirme que *Tbx4* est capable de remplacer *Tbx5* dans la croissance des membres antérieurs (Minguillon et al., 2005). Par ailleurs, dans les embryons *Tbx4*^{-/-}, l'expression de *Tbx2* est également diminuée et *dHand* devient exprimé sur toute la largeur du membre au lieu d'être restreint à la partie postérieure (même si *Gli3* est exprimé normalement), ce qui semble aussi impliquer *Tbx4* dans la spécification A/P des membres postérieurs (Naiche *et al.*, 2003).

1.8 Perspectives évolutives

Les premiers membres sont apparus, au cours de l'évolution, sur des poissons. Les premiers poissons à développer une paire de nageoires, il y a ~ 400 millions d'années, s'appelaient les osteostracans et faisaient partie de la famille des agnathans (Coates, 1994;Ruvinsky et al., 2000b). Ces poissons ne possédaient pas de mâchoires et n'avaient qu'une seule paire de nageoires pectorales (qui correspondent aux membres antérieurs); il n'existe aucune évidence que les poissons de cette espèce aient possédé des nageoires pelviennes (membres postérieurs), ce qui semble indiquer que les membres antérieurs sont arrivés avant les membres postérieurs au cours de l'évolution (Coates, 1994;Ruvinsky *et al.*, 2000b). Plus tard, certains poissons primitifs appelés gnathostomes ont possédé à la fois une mâchoire et deux paires de membres soit des nageoires pectorales et des nageoires pelviennes (Coates, 1994;Ruvinsky *et al.*, 2000a). Il est intéressant de noter qu'au cours de l'évolution, deux régions comme la mâchoire et les membres postérieurs, caractérisées par une expression commune de *Pitx1*, semblent être apparues dans la même période.

Par ailleurs, on pense que la duplication des deux locus *Tbx4/5* et *Tbx2/3* pour donner les quatre gènes distincts que l'on connaît maintenant serait arrivée avant, ou en même temps que l'apparition des nageoires pelviennes. L'apparition du programme de croissance des membres dans un domaine où *Pitx1* était déjà présent aurait permis aux gènes *Pitx* et *Tbx* de co-évoluer et de co-opérer dans l'établissement de l'identité des membres postérieurs (Ruvinsky *et al.*, 2000a).

Récemment, plusieurs résultats sont parus portants sur un petit poisson fort intéressant, le « stickleback ». Ce poisson est particulièrement étudié dans le domaine de l'évolution puisqu'à l'intérieur de cette même espèce, il existe des individus qui ont acquis des caractéristiques morphologiques différentes selon leur vie en eau douce (dans des lacs) ou en eau salée (dans les mers) (Peichel *et al.*, 2001; Cole *et al.*, 2003; Shapiro *et al.*, 2004). Ces modifications sont notamment visibles au niveau de la structure du pelvis et des membres postérieurs : absence de membres postérieurs chez les poissons d'eau douce et présence chez les poissons d'eau salée (Secko, 2004). L'analyse de croisements entre ces deux variétés d'individus a démontré que l'absence de membres postérieurs chez les poissons d'eau douce était corrélée à une perte d'expression de *Pitx1* dans la région pelvienne, *Pitx1* étant normalement exprimé dans les régions antérieures, et aucune mutation n'a été détectée dans la séquence codante. Ces résultats suggèrent qu'un changement dans la régulation précise de l'expression de *Pitx1* dans cette région pourrait être responsable du phénotype observé. (Cole *et al.*, 2003; Shapiro *et al.*, 2004; Colosimo *et al.*, 2004; Cresko *et al.*, 2004).

1.9 Hypothèses de travail :

Pitx1 et *Pitx2* sont deux facteurs de transcription partageant une homologie de 95% dans leur homéodomaine. On a observé dans les embryons *Pitx1*^{-/-} une asymétrie au niveau de la pénétrance du phénotype, les membres postérieurs gauches étant plus sévèrement affectés que ceux à droite. Comme *Pitx2* est exprimé de façon asymétrique dans le mlI de gauche et que les membres se développent à partir d'un sous-ensemble de ces cellules, *Pitx2* pourrait compenser pour la perte de *Pitx1* à gauche. À mon arrivée au laboratoire, les souris *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} avaient été générées afin de répondre à cette hypothèse. De façon surprenante, au lieu d'obtenir un phénotype où les membres sont également affectés des deux côtés, le phénotype des membres postérieurs des embryons double-mutants était beaucoup plus sévère que celui du simple mutant *Pitx1*. Le phénotype squelettique de ces mutants est caractérisé, dans les cas les plus extrêmes, par la perte du doigt #1 (le doigt le plus antérieur), du tibia et du fémur et ce, autant à gauche qu'à droite; il ne reste plus qu'un seul os (la fibula) qui relie le bassin à l'autopode. L'expression de nombreux gènes importants pour le développement des membres avait été évaluée, et très peu étaient perturbés. Suite à l'analyse des doubles-mutants, la nécessité d'opter pour une approche globale sera discutée. Enfin, l'étude du locus *Tbx4*, dans la perspective de sa régulation transcriptionnelle par *Pitx1*, sera également présentée.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

Chapitre 2 Matériel et méthodes

2.1 Souris

Les embryons *Pitx1*^{-/-} et *Pitx2*^{-/-} et leurs phénotypes respectifs ont déjà été décrits (Gage et al., 1999; Lanctôt et al., 1999b). Le génotypage des embryons a été effectué par PCR tel que décrit précédemment (Gage et al., 1999; Lanctôt et al., 1999b) en utilisant l'ADN génomique isolé de queues des nouveaux-nés ou du cordon umbilical et/ou des membranes amniotiques des embryons disséqués. Des réactions de PCR séparées ont été effectuées pour le génotypage *Pitx1* et *Pitx2*. Toutes les souris utilisées dans cette étude provenaient d'un fond génétique mixte. L'âge approximatif des embryons était déterminé par les dates d'apparition d'un bouchon vaginal chez la femelle : à midi de cette journée, la portée était considérée à ~ e0,5. L'âge des embryons a par la suite été évalué de façon plus précise en comptant le nombre de somites, en commençant à 13 pour le 1^{er} somite situé après le bourgeon de membre antérieur (Lewandoski et al., 2000).

2.2 Whole-mount

Les hybridations *in situ* whole-mount ont été effectuées telles que décrites dans les protocoles du laboratoire du Dr. Janet Rossant. Ce protocole est disponible à l'adresse suivante : <http://www.mshri.on.ca/develop/rossant/protocols.html>. Les sondes ARN sont synthétisées par transcription *in vitro* en incorporant un nucléotide marqué, le Dig-UTP et sont purifiées en utilisant les colonnes Nuc Trap (Stratagene). Parmi les sondes utilisées, la sonde *Fgf8* provient de chez G. Martin, la sonde *Msx2* de chez R. Maas, la sonde *Fgf10* de chez N. Itoh, et la sonde *Gli3* de chez C.C Hui. Brièvement, les

embryons sont fixés dans 4% PFA dans PBS. Suite à un traitement à la protéinase K (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de 2 à 10 minutes (min.), selon la grosseur des embryons), suivi d'un lavage (glycine 2 mg/ml), les embryons sont refixés (0,2% glutaraldéhyde et 4% PFA dans PBS), lavés (0,1% Triton dans PBS), pré-hybridés pendant au moins 1 heure dans le tampon d'hybridation (50% formamide, 0,75 M NaCl, 10 mM PIPES, 1 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ARNt, 0,05% héparine, 0,1% BSA, 1% SDS) et hybridés toute la nuit à 65°C dans le tampon d'hybridation avec la sonde (pré-chauffée à 80°C 10 min.). Les embryons sont par la suite lavés abondamment (0,1% Triton dans PBS), incubés avec un anticorps α -Dig couplé à la phosphatase alcaline (Roche), relavés et la révélation est faite avec le substrat BM Purple (Roche).

2.3 Immunohistochimie

Les immunohistochimies ont été réalisées tel que décrit précédemment (Lanctot *et al.*, 1997; Marcil *et al.*, 2003; Pulichino *et al.*, 2003b). Le BrDU (50 μg par g de souris) a été injecté aux femelles gestantes de façon intra-péritoniale 1 heure avant qu'elles soient sacrifiées. L'apoptose a été détectée en utilisant le kit Apoptotag (Intergen), en suivant les recommandations du manufacturier. Les anticorps utilisés ont été dilués dans 5% BSA et 0,2% Tween20 dans PBS : α -BrDU (Boehringer, dilué 1 :10), α -PH3 (Cell Signaling, dilué 1 :100), α -souris biotinilé (Vector, dilué 1 :150) et la streptavidine-HRP (Perkin Elmer, diluée 1 :1000).

2.4 Génération des anticorps

Les anticorps polyclonaux ont été générés et purifiés tel que décrit précédemment (Lanctot *et al.*, 1999a; Lamolet *et al.*, 2001). Brièvement, deux lapins (A et B) ont tout

d'abord été injectés avec 100 µg de MBP-Pitx1 pleine longueur (la construction a déjà été décrite (Tremblay et al., 1999)), suivi de 3 rappels subséquents. La purification des anticorps a été effectuée en utilisant des colonnes MBP-Sepharose, pour se débarrasser des anticorps qui reconnaissent la partie MBP de l'épitope injecté, et ensuite des colonnes GST-Pitx1-Sepharose, pour retenir spécifiquement les anticorps qui reconnaissent Pitx1.

2.5 Extraits nucléaires et immunoprécipitation

Les extraits nucléaires ont été faits à partir de cellules AtT20, α -T3, L, 293 ou directement à partir de bourgeons de membres (les pattes arrières étaient préalablement disséquées, coupées et homogénéisées au Dounce), tel que décrit précédemment (Poulin et al., 2000). Les cellules sont tout d'abord rincées au PBS froid avant d'être fixées (ou non) avec 1% formaldéhyde dans PBS à 4°C. Elles sont resuspendues 15 min. dans le tampon A (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT, et 10 µg/ml d'inhibiteurs de protéases (leupeptin, aprotinin et pepstatin). Ensuite, du NP-40 est rajouté (0,1% final) et les cellules sont vortexées vigoureusement. Les noyaux sont resuspendus dans le tampon B (10 mM HEPES pH 7,9, 0,1 mM EGTA, 0,4 M NaCl, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT et inhibiteurs de protéase) pendant 30 min.. Les protéines nucléaires se retrouvent dans le surnageant.

Habituellement, 500 µg d'extraits nucléaires sont utilisés par réaction d'immunoprécipitation (IP). Ils sont dilués avec du TEN (50 mM Tris pH 8, 0,5 mM EDTA, 0,1% NP-40) pour obtenir une concentration finale de 150 mM NaCl. Suite à l'incubation avec l'anticorps, les complexes anticorps-protéines sont immunoprécipités en rajoutant des billes d'agarose couplées aux protéines A/G (Santa Cruze) pendant 1

heure, suivi de 2 lavages avec TNEN 250 (50 mM Tris pH 8, 250mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,1% NP-40) et 1 lavage TNEN 125 (50 mM Tris pH 8, 125mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,1% NP-40). Les billes sont ensuite resuspendues dans du tampon Laemli et analysées par Western blot.

2.6 Western blot

Les Western blots ont été faits tel que décrit précédemment (Tremblay et al., 1998). En bref, 100 ng d'extraits nucléaires provenant de cellules 293 transfectées avec les vecteurs d'expression de Pitx1/2 et 3 respectivement ou 50 µg d'extraits nucléaires provenant de cellules AtT20 ou de mésenchyme de membres sont dénaturés dans du tampon Laemli (contenant 1% SDS et 1% β-mercaptoéthanol). Les échantillons sont déposés sur un gel SDS-PAGE 10% dénaturant (migration : 125 V, 1 heure 30 min. dans mini-protéans Bio Rad). Les protéines sont ensuite transférées sur une membranes PVDF (Amersham) par électro-transfert (transfert : 100 V, 1 heure 15 min. dans tampon de transfert (25 mM Tris-HCl pH 8,4, 192 mM Glycine, 20% ethanol (vol./vol.))). Les membranes sont bloquées avec du 5% lait et 0,1% Tween20 dans PBS. Les anticorps utilisés sont dilués dans 5% lait et 0,1% Tween20 dans PBS : anticorps primaire Pitx1 dilué 1 :2500 ; anticorps secondaire α-lapin-HRP ou protéine A/G-HRP dilués 1/30000. La révélation se fait en utilisant le kit ECL-plus (Amersham).

2.7 Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Le protocole de ChIP a été adapté de (Thomas et al., 2001) et de UpState Technology. Brièvement, $\sim 10^7$ cellules (AtT20 ou α-T3) sont fixées avec du 1% formaldéhyde dans PBS froid (10 min.); la fixation est arrêtée avec de la glycine (125

mM dans PBS). Les cellules sont resuspendues 5 min. dans le tampon A (0,25% Triton, 10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,5 mM PMSF et inhibiteurs de protéases). Les noyaux sont resuspendus 30 min. dans le tampon B (200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,5 mM PMSF et inhibiteurs de protéases). Ensuite, les extraits sont resuspendus dans le tampon C (0,5% SDS, 0,5% Triton, 0,05% NaDOC, 140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,5 mM PMSF et inhibiteurs de protéases) et ils sont soniqués (5 fois ~ 20 secondes à force 5 avec le Sonic Dismembrator, Fischer), afin d'obtenir des fragments d'ADN entre 500 et 1000 pb (évaluation par gel d'agarose). Les débris sont éliminés par centrifugation (25 min.) et les extraits sont mélangés avec 30 µl de billes Sépharose couplées aux protéines A, pendant 15 à 30 min. (« pré-clear »), pour diminuer le niveau de liaison non-spécifique. L'IP se fait durant toute la nuit avec 6 µg d'anticorps α -Pitx1, et les complexes sont récupérés en rajoutant 80 µl de billes protéine A-Sépharose pendant 3 heures (dans 5 ml de tampon C). Les billes sont récupérées dans des eppendorfs, et lavées abondamment (W1 : 0,5% NP-40, 150 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA ; W2 : 0,5% Triton, 0,1% NaDOC, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 ; W3 : 0,5% Triton, 0,1% NaDOC, 400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 ; W4 : 0,5% NP-40, 0,5% NaDOC, 250 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA ; W5 : 1% NP-40, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). L'élution et la rupture des liens covalents induits par le formaldéhyde se font simultanément en chauffant les billes toute la nuit à 65°C avec 120 µl de tampon d'élution (1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA). Enfin, l'ADN est purifié soit par extraction phénol/chloroforme, soit en utilisant les colonnes Qiaquick (Qiagen).

Pour les double-ChIPs, l'élution se fait durant seulement 30 min. à 65°C dans le tampon d'élution avec 0,5 mM PMSF et inhibiteurs de protéases). Le surnageant est récupéré, mélangé 1 :1 (vol./vol.) avec le tampon D (1% Triton, 0,1% NaDOC, 280 mM NaCl, 0,5 mM PMSF et inhibiteurs de protéases). Habituellement, 3 simples ChIP sont regroupées après l'élution (pour avoir assez d'ADN à la fin) et tout le processus est recommencé.

L'ADN récupéré est par la suite analysé par Q-PCR. Voici les oligonucléotides utilisés : CGCTAAGCCTCTGTCCAGTTCTAA et GTTAGCACAGACCCGCTGAA entourant le site Pitx1 TAAGCC dans le promoteur POMC (cellules AtT20); ACCAAGTGCCATCCAATCACTG et GCCTGCAGTTAATAAAGTCTCCCAC entourant le site Pitx1 TAAGCT pour le promoteur de l' α -GSU (cellules α -T3); TGATGGTGGGAATGGGTCAGAA et TCCATGTCGTCCCAGTTGGTAA pour la β -actine; ACAGGACTTACTCCACAGCCTA et AGTTGCTACTGCCTGCTGTT pour TBP. Chaque paire d'oligonucléotides a été trouvée avec l'aide du programme Primer Quest d'IDT (<http://www.idtdna.com>). Ils sont spécifiques, puisqu'ils n'amplifiaient qu'un seul produit (courbe de dissociation Mx4000, Stratagene) avec la bonne taille (gel d'agarose).

2.8 Clonage des ChIPs et hybridation des colonies

Le protocole de clonage a été adapté du protocole du laboratoire du Dr Peggy Farnham, disponible à l'adresse suivante : <http://www.protocol-online.org>. Pour le clonage, l'ADN de 8 double-ChIPs a été regroupé. Les extrémités des fragments ont été traitées à la T4 DNA polymérase (30 min. à 37°C) pour qu'elles deviennent franches. La

ligation a été faite (16 heures à 16°C) avec le vecteur bluescript digéré Eco32I (isoschisomère de EcoRV), déphosphorylé à la phosphatase alcaline (30 min. à 37°C). Elle a été précipitée à l'éthanol afin de pouvoir transformer la moitié de la ligation dans des bactéries électro-compétentes. Les bactéries ont été étalées sur des pétris avec ampiciline.

Toutes les bactéries ont été repiquées, transférées sur membranes (Hybond N, Amersham), dénaturées et fixées aux UV avant de faire l'hybridation. La sonde utilisée a été marquée radioactivement en utilisant la méthode avec amorces aléatoires, à partir d'un fragment provenant du vecteur α -GSU_luciférase (Tremblay et al., 1998), et purifiée sur colonne (Bio-spin, Bio Rad). Suite à la pré-hybridation, 500000 cpm de la sonde dénaturée ont été utilisés par membrane. L'hybridation a été faite à 65°C (tampon d'hybridation : 4X SET, 0,2% SDS, 0,1% NaPyrPO₄, 100 µg/ml d'héparine), et après plusieurs lavages (1X SSC/0,1% SDS et 0,1X SSC/0,1% SDS) à 65°C, les membranes ont été exposées sur film X-Omat (Kodak).

2.9 Plasmides et oligos

Les plasmides rapporteurs du locus *Tbx4* ont été générés comme suit : chaque région a été amplifiée par PCR avec les oligonucléotides suivant : promoteur de 5 kb : GCATGGTACCTGACTTCACCCATCCTTTCC et GCATCTCGAGCTTAGGAGCCCTGTGACCGA; intron 1 : CGTAGGTACCAGAGGGATGAGCTAAATAGCGGGCAAC et GCATCTCGAGCTCCTGCGGGCACAGCACA; Région A : TCCGGTACCCAGAGGAACCTGGCTGAAGA et TCCCTCGAGCCAAGAGTCAACAGGCCCTA; Région B : ATAGGTACCTCCTCCCTGGGCAGTTTCAATT et ATACTCGAGCAGAGGGGA

GGGTAGCTGAAAT; Région C : *ATAGGTACCCCTCGGGATAGGGGTTGT* et *ATACTCGAGGCTCAGTCCCCAGACA*ACTG; l'ajout d'une séquence correspondant aux sites KpnI et XhoI (en *italique* dans la séquence) à l'extrémité de chaque oligonucléotide a permis de cloner ces fragments, en amont du gène luciférase, dans les sites KpnI et XhoI du vecteur pxp2. Le promoteur de 9,5 kb a été construit en ajoutant 4,5 kb, incluant la région A, amplifié par PCR avec les oligonucléotides *TCCGGATCCCAGAGGAACCTGGCTGAAGA* et *TGACTTCACCCATCCTTTCC* clonés dans les sites BamHI et SmaI du vecteur contenant le promoteur de 5 kb. Les oligonucléotides sont synthétisés par la compagnie Bio Corp. Le vecteur d'expression RSV_Pitx1 a déjà été caractérisé (Lamonerie et al., 1996).

2.10 Culture cellulaire et transfections

Les cellules L, qui sont des fibroblastes de souris, ont été cultivées dans du « Dulbecco's modified Eagle medium » (DMEM) supplémenté avec 10% de serum de veau foetal (FBS) et 1% pénicilline/streptomycine, tel que décrit précédemment (Tremblay et al., 1999).

Ces cellules ont été transfectées par la méthode de précipitation au phosphate de calcium. Brièvement, les cellules sontensemencées à ~ 80000 cellules par puits, dans des plaques de 12 puits, 24 heures avant la transfection. Les précipités contiennent habituellement 1,5 µg de plasmide rapporteur, de 50 à 500 ng de RSV_Pitx1 complété avec du vecteur RSV_vider pour avoir un total constant de 500 ng de vecteur d'expression RSV, 12,5 ng de CMV_βgal comme contrôle interne et de l'ADN entraîneur (psp64) jusqu'à un total de 3 µg par puit. Le milieu des cellules est changé une heure avant la

transfection. Suite à la transfection, les cellules sont rincées au PBS après 24 heures, et du milieu frais est remis sur les cellules pour un autre 24 heures (transfection de 48 heures). Les cellules sont lysées en appliquant directement 200 μ l de tampon d'essai luciférase (100 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% NP-40 et 5 mM DTT). 125 μ l de lysat est utilisé pour tester l'activité luciférase, avec un luminomètre LB953 de marque Berthold. 50 μ l sont ensuite utilisés pour tester l'activité β -galactosidase (kit Galacto-Star, Applied Biosystems). L'activité luciférase est normalisée par l'activité β -galactosidase. Les résultats représentent la moyenne de 3 à 9 expériences, faites en duplicata, +/- l'erreur standard sur la moyenne.

2.11 Analyses bio-informatiques

Les séquences utilisées proviennent des banques de données publiques, soit UCSC, NCBI ou Ensembl. Le programme qui permet d'aligner les séquences de différentes espèces est le programme Vista, disponible à l'adresse suivante : <http://genome.lbl.gov/vista>. J'ai également utilisé le programme R-Vista (regulatory-vista) qui permet de chercher des sites de facteurs de transcription parmi les régions conservées. Le programme de prédiction de promoteurs et de sites d'initiation que j'ai utilisé se trouve sur le site de Berkeley drosophila genome project et s'appelle Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

2.12 Extraction d'ARN et RT-PCR

L'extraction d'ARN, à partir de pattes arrières d'embryons (e11,5 ou e12,5), a été faite en utilisant le TRIZOL (Invitrogen), en suivant les recommandations du manufacturier. La synthèse d'ADN_c a été effectuée tel que décrit précédemment

(Lamolet et al., 2001). Les réactions de RT-PCR ont été réalisées avec l'enzyme AMV-RT (Promega) en suivant les recommandations du fabricant, en utilisant soit un oligonucléotide polyT, soit un oligonucléotide spécifique à *Tbx4*. Les réactions de PCR ont été effectuées en utilisant les oligonucléotides suivants : GCAGGCGAGAACTGATTGAC et CTCTCGGACAGGCCCTTATC (l'oligonucléotide antisens dans l'exon 2 avec l'ATG); GCAGGCGAGAACTGATTGAC, TAGGGCACAGGGCTGTAGAT et GTCTGGACCTCAGAGGCTGT avec l'oligonucléotide antisens TCGCAGCTGTCAATCAGTTC (dans le nouvel exon 1). Les réactions de PCR ont été faites avec 2,5 µl de la réaction de RT ou 0,5 µl d'ADN génomique (BAC RP23-462012 contenant le gène *Tbx4*), en présence de 50 pmoles de chaque oligonucléotide, 0,2 mM de dNTPs, 1 µl de DMSO, 5 µl de tampon de réaction 10X et 1U de Taq polymérase (Invitrogen), dans un volume total de 50 µl. Le programme de PCR utilisé : 1 min. à 94°C, 1 min. à 62°C, 30 sec. à 72°C pour 30 cycles. Les fragments d'ADN amplifiés ont été analysés sur gel d'agarose 2%.

Chapitre 3

Résultats

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Rôles des gènes *Pitx* au cours du développement des membres postérieurs

3.1.1 Retard spécifique de *Fgf8* dans l'AER des embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}

L'expression de *Fgf8* dans l'AER est essentielle à la croissance P/D des membres (Martin, 1998; Lewandoski *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002). De plus, *Fgf8* est l'un des premiers gènes à être exprimés dans l'AER (Heikinheimo *et al.*, 1994; Ohuchi *et al.*, 1994; Crossley and Martin, 1995; Mahmood *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1996; Crossley *et al.*, 1996). Puisque les bourgeons des membres des embryons *Pitx1*^{-/-}, et de façon encore plus importante ceux des embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}, sont plus petits et plus étroits que ceux des embryons de type sauvage, il était important d'étudier l'expression des gènes impliqués dans la croissance des membres. Avant mon arrivée, on avait déjà vérifié l'expression de *Fgf8* tardivement, vers 40 somites, lorsque les bourgeons des membres sont bien apparents (voir figure 4 b Marcil *et al.*, 2003 en **annexe I**, p.XIX) et celle-ci n'était pas affectée dans les embryons mutants. Par contre, puisque les bourgeons des membres postérieurs sont déjà plus petits à ce stade, on peut penser que le problème est dû à un phénomène plus précoce, possiblement au moment de l'initiation des bourgeons. D'ailleurs, dès que les bourgeons postérieurs deviennent visibles, ils sont déjà plus petits (on peut le voir sur la **figure 3.1 f, g et h**, p.63). Comme le montre la **figure 3.1 (a à h)**, l'expression de *Fgf8* au moment de son initiation est légèrement diminuée dans les embryons *Pitx1*^{-/-} (**b, d, g**) et est retardée d'environ 3 à 4 somites dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (**c, h**) par rapport aux embryons de type sauvage (**a, c, f**). Ce retard est spécifique aux bourgeons des membres postérieurs puisque dans ces embryons, il n'y a

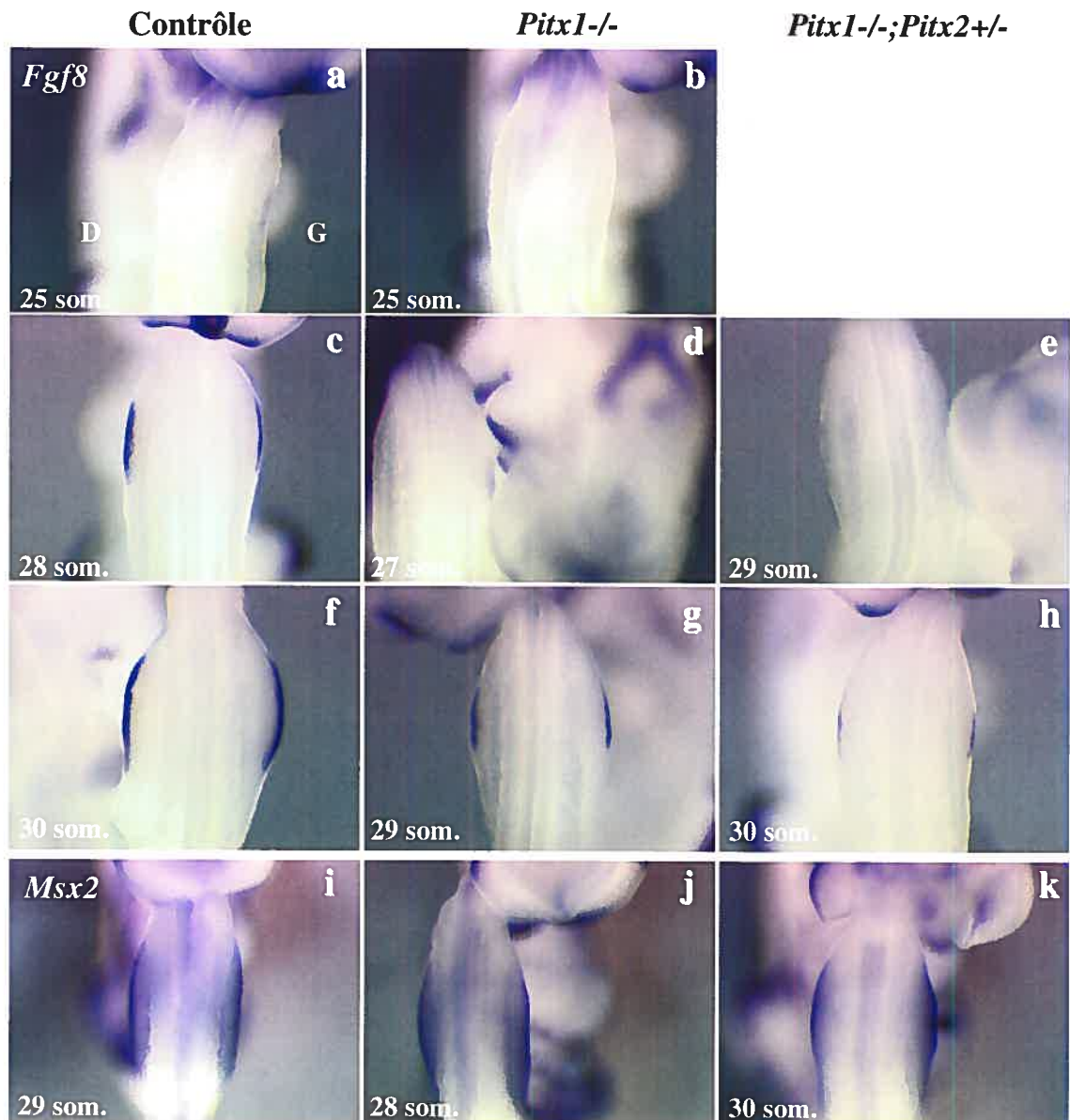


Figure 3.1: Retard spécifique de l'expression de *Fgf8* au moment de l'initiation de l'AER dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}:

L'expression de *Fgf8* est déjà apparente (bien que très faiblement) dans les embryons contrôles à 25 somites (a) et pas encore dans les embryons *Pitx1*^{-/-} du même âge (b). À 28 et 30 somites, il y a une forte expression de *Fgf8* dans l'AER des bourgeons des membres postérieurs chez les contrôles (c et f). Cette expression est légèrement diminuée dans les embryons *Pitx1*^{-/-} (d et g). Dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}, l'expression de *Fgf8* dans l'AER ne débute qu'à 29 somites (e) et est encore très faible à 30 somites (h). Ceci représente presque 4 somites de retard par rapport aux embryons de type sauvage. L'expression de *Msx2*, qui est également exprimé dans l'AER est identique dans les embryons contrôle (i), dans les embryons *Pitx1*^{-/-} (j) et dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (k). Tous les embryons sont photographiés avec une vue dorsale, la tête en haut. G = gauche, D = droite et som. = somites.

jamais de différence au niveau des membres antérieurs (ce qui concorde avec le patron d'expression spécifique de *Pitx1* dans les membres postérieurs). De plus, ce retard est spécifique à *Fgf8* puisque *Msx2*, qui est également exprimé dans l'AER aux mêmes stades, n'est pas affecté dans les embryons mutants (**figure 3.1 i ,j ,k**, p.63), ce qui suggère que ce retard n'est pas dû à un problème général dans la formation de l'AER.

3.1.2 L'expression précoce de *Fgf10* dans le mésenchyme de la lame latérale (mll) ne semble pas affectée dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}

Il existe une boucle de régulation entre *Fgf10* dans le mésenchyme et *Fgf8* dans l'ectoderme (voir introduction section 1.4.1 L'AER, p.11). *Fgf10* est exprimé très tôt dans le territoire présomptif des membres, avant même l'apparition des bourgeons; il contrôle l'induction de l'expression de *Fgf8* dans l'AER via la voie Wnt/ β -caténine (Ohuchi *et al.*, 1997;Kawakami *et al.*, 2001). Les embryons *Fgf10*^{-/-} n'ont pas de membres puisque l'expression de *Fgf8* dans l'AER n'est jamais initiée (Min *et al.*, 1998;Sekine *et al.*, 1999). Le retard dans l'induction de *Fgf8* pourrait logiquement être causé par un problème avec l'expression de *Fgf10*. Par contre, il n'y a pas de différence significative dans l'expression de *Fgf10* à 25 et 26 somites, juste avant l'initiation de l'expression de *Fgf8*, dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (voir **figure 3.2**, p.65). Donc, le retard d'expression de *Fgf8* ne semble pas dû à un problème avec l'expression de *Fgf10*.

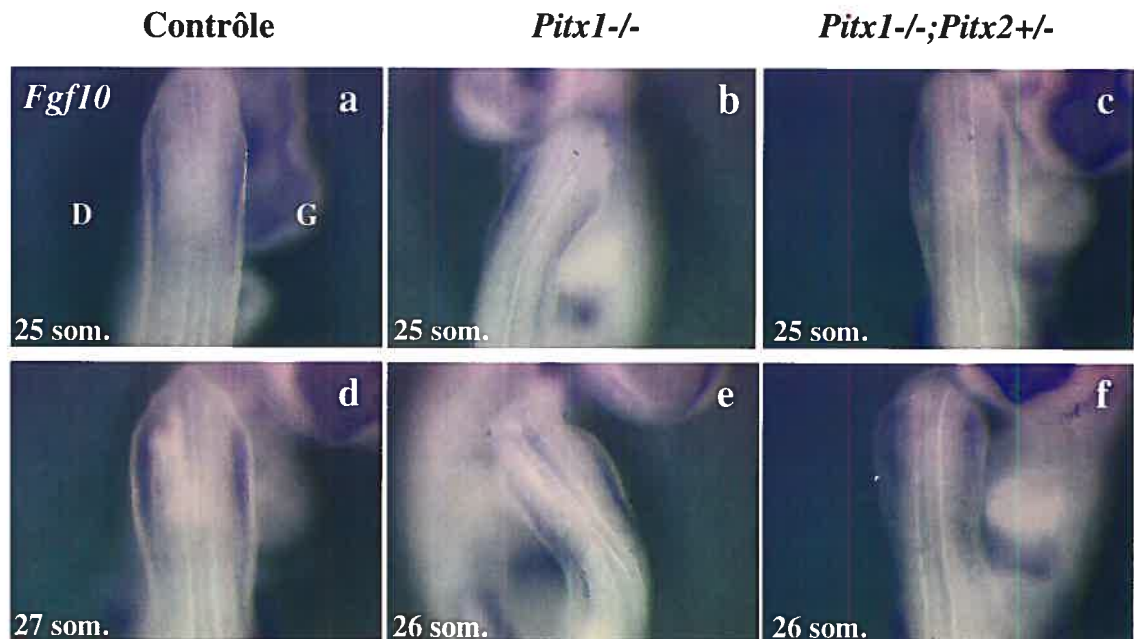


Figure 3.2: L'expression précoce de *Fgf10* ne semble pas affectée dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}:

Fgf10 est exprimé dans le mll au niveau du territoire présomptif des membres avant que ceux-ci n'apparaissent. *Fgf10* induit l'expression de *Fgf8* dans l'AER. Malgré le retard d'expression de *Fgf8* (voir **figure 3.1**), l'expression de *Fgf10* est semblable dans les embryons contrôles (a et d), dans les embryons *Pitx1*^{-/-} (b et e) et dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (c et f) au moment de l'initiation des membres, juste avant l'induction de l'AER. Tous les embryons sont photographiés avec une vue dorsale, avec la tête en haut. G = gauche, D = droite et som. = somites.

3.1.3 Analyse de la prolifération et de l'apoptose dans les embryons

Pitx1^{-/-};*Pitx2*^{+/-}

Les bourgeons des membres sont des sites de prolifération très actifs au cours du développement. L'étroitesse et la petitesse des bourgeons dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} pourraient provenir soit d'une diminution de la prolifération, soit de la présence de mort cellulaire.

J'ai utilisé deux méthodes pour mesurer la prolifération. Tout d'abord, j'ai injecté des souris gestantes avec du Brdu, qui est un nucléotide modifié qui s'incorpore dans l'ADN lorsque les cellules synthétisent les brins d'ADN complémentaires lors de la division cellulaire. Comme on peut le voir sur la **figure 3.3**, il n'y a pas de différence significative pour la prolifération dans les embryons à ~ e10,5-11, la grande majorité des cellules du bourgeon s'étant divisé durant l'heure suivant l'injection, autant dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (**b**) que dans les embryons de type sauvage (**a**). J'ai également vérifié l'expression d'un autre marqueur de prolifération, le PH3 (phospho-histone 3). Cette histone est phosphorylée spécifiquement au moment de la condensation des chromosomes pour la mitose (Nowak and Corces, 2004). Le marquage PH3 permet donc de visualiser les cellules en division. Les résultats de la **figure 3.3** montrent qu'il n'y a pas non plus de différence dans l'index mitotique entre l'embryon contrôle (**c**) et l'embryon *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (**d**).

Par ailleurs, j'ai également testé la présence de cellules en apoptose en faisant un marquage TUNEL, qui permet l'identification des cellules dont l'ADN est fragmenté, ce qui est une caractéristique des cellules apoptotiques (Gavrieli et al., 1992). Ce marquage

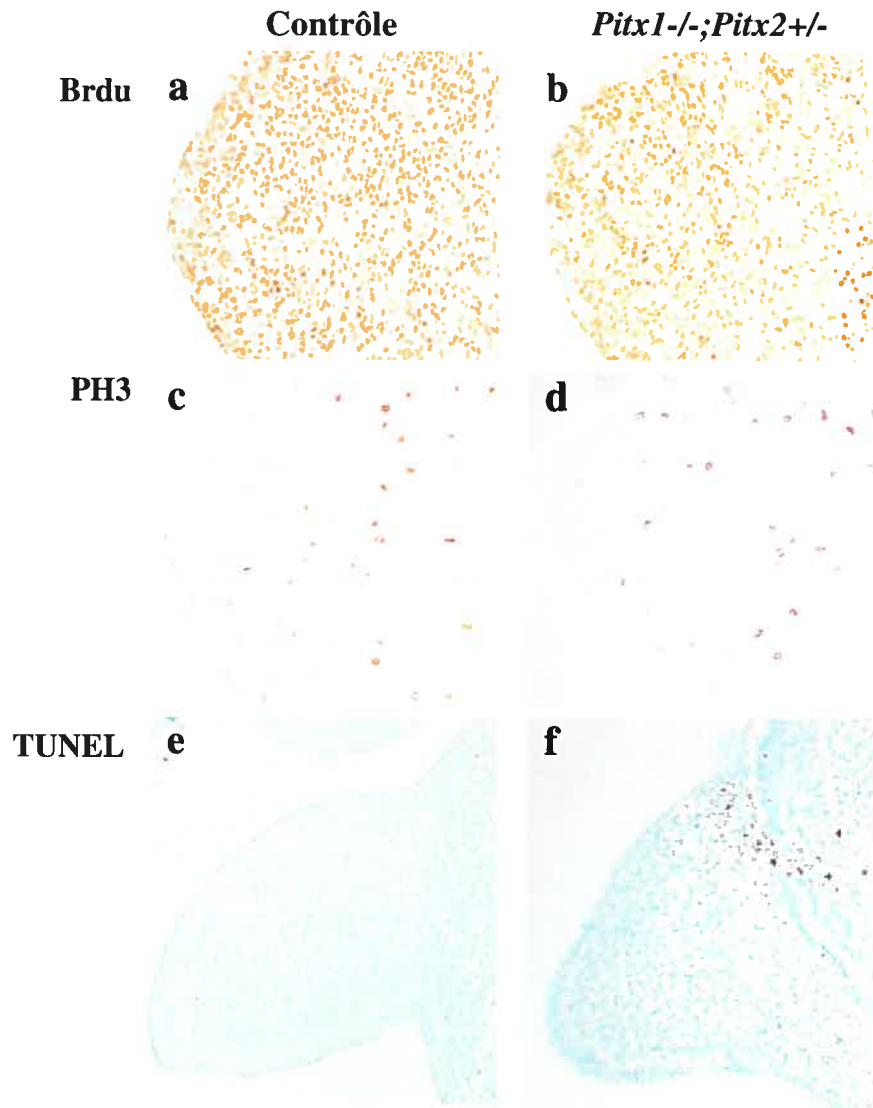


Figure 3.3: Analyse de la prolifération et de l'apoptose dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}: La prolifération, telle que mesurée par l'incorporation de Brdu, est très forte au niveau des bourgeons des membres postérieurs d'embryons à ~ e10,5-11. Il ne semble pas y avoir de différence entre l'embryon contrôle (a) et l'embryon *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (b). Une autre façon de vérifier la prolifération est de regarder la phosphorylation de l'histone H3 (PH3). Les cellules positives représentent les cellules en division active. Il n'y a pas de différence significative non plus entre l'embryon de type sauvage (c) et l'embryon mutant (d). Enfin, l'apoptose a été étudiée par la méthode TUNEL. Dans un bourgeon postérieur d'embryon de type sauvage à ~ e10,5-11, on n'observe pas vraiment d'apoptose (e). Par contre, dans les mutants, il y a l'apparition d'une zone d'apoptose qui se situe toujours à la base du membre, dans la partie proximale, du côté dorsal (f).

montre l'absence d'apoptose dans les embryons contrôles à $\sim e10,5-11$ (**figure 3.3 e**, p.67). Par contre, dans les embryons mutants (**figure 3.3 f**, p.67) il y a apparition d'une zone d'apoptose dans la partie proximo-dorsale du bourgeon.

3.1.4 La signalisation antéro/postérieure (A/P) et dorso/ventrale (D/V) sont intactes dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}

L'observation que les bourgeons des membres postérieurs des embryons *Pitx1*^{-/-}, et encore plus ceux des *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}, sont plus étroits dans l'axe A/P (la largeur du bourgeon) que ceux des embryons sauvages est intrigante. La figure 4 a de l'article Marcil *et al.*, 2003 (en **annexe I**, p.XIX), avec le marquage *Tbx4*, où les somites ont été mis en évidence, permet de constater qu'il n'y a pas de différence dans la position rostro-caudale des membres postérieurs : ils sont toujours centrés autour du somite 27. Par contre, il est évident que la limite antérieure du bourgeon est décalée : dans les embryons de type sauvage, la limite antérieure du bourgeon se situe au niveau du somite 25; dans les embryons *Pitx1*^{-/-}, elle est au somite 26; dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}, les bourgeons débutent au somite 26½ (plus postérieur). De plus, l'étude de marqueurs qui sont exprimés différemment selon l'axe A/P du bourgeon a permis de déterminer que l'étroitesse des bourgeons était due à une perte de mésenchyme antérieur (voir figure 5 a et b dans Marcil *et al.*, 2003 en **annexe I**, p.XIX). Un marqueur postérieur comme *Hoxc11* illustre bien cette perte de mésenchyme antérieur : son expression est inchangée dans les embryons mutants et débute toujours au niveau du somite 27, comme dans les embryons de type sauvage, par contre, la proportion de mésenchyme qui exprime *Hoxc11* est plus grande. C'est la même chose avec l'expression de *Shh*, un marqueur de la ZPA,

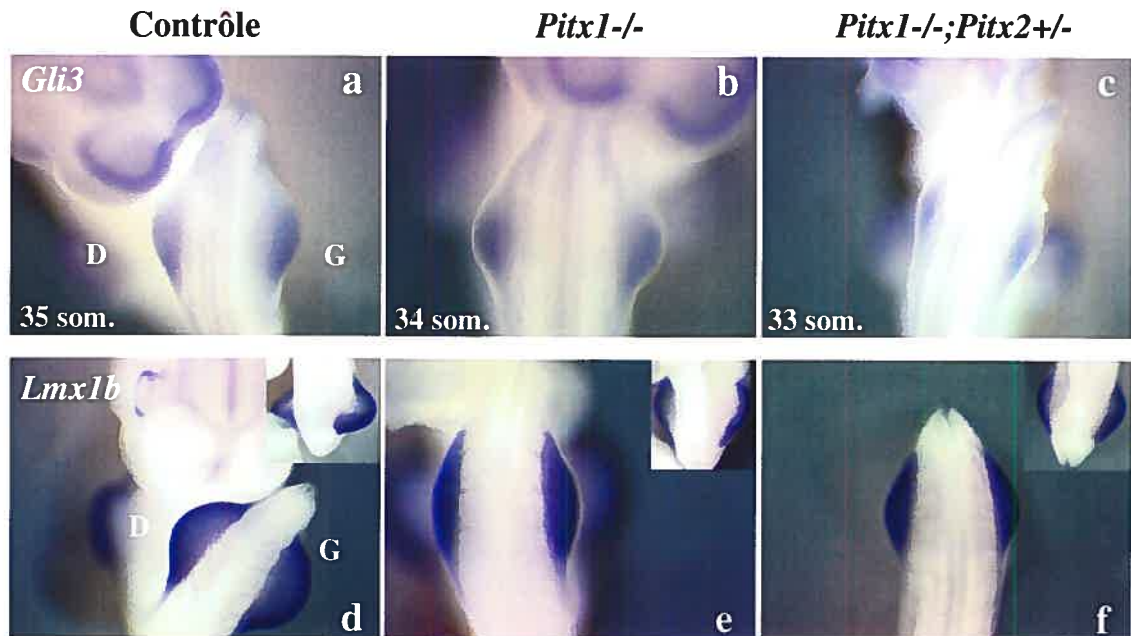


Figure 3.4: La signalisation antéro/postérieure (A/P) et dorso/ventrale (D/V) sont intactes dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}:

Gli3 est exprimé dans la partie antérieure du bourgeon de membre dans un domaine complémentaire à celui de *Shh* (ZPA). En comparaison avec l'embryon de type sauvage (a), l'expression de *Gli3* est inchangée et dans les embryons *Pitx1*^{-/-} (b) et dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (c). *Lmx1b* est exprimé spécifiquement dans le mésenchyme dorsal (embryon contrôle (d)). Son expression n'est pas différente ni dans les embryons *Pitx1*^{-/-} (e), ni dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (f) (la partie postérieure de cet embryon a été séparé du reste du corps). Tous les embryons sont photographiés avec une vue dorsale, la tête en haut. La partie antérieure est vers le bas et la partie postérieure vers le haut. En encart (d à f), il y a également une vue ventrale des embryons montrant qu'il n'y a pas de changement D/V dans l'expression de *Lmx1b*. G = gauche, D = droite et som. = somites.

le centre organisateur situé dans la partie postérieure du bourgeon, important pour la spécification A/P des membres. L'expression de *Shh* n'est pas vraiment affectée dans les mutants. Par contre, la proportion de mésenchyme qui exprime *Shh* est plus élevée. Pour vérifier si la signalisation A/P était affectée dans les mutants, j'ai vérifié l'expression de *Gli3*, un marqueur spécifique du mésenchyme antérieur. *Gli3* est exprimé dans la partie antérieure du bourgeon dans un domaine complémentaire à celui de *Shh*. Comme on peut l'observer dans la **figure 3.4 a à c**, l'expression de *Gli3* est toujours présente dans les embryons mutants. Donc, malgré la perte apparente de mésenchyme antérieur, la signalisation A/P semble intacte.

La signalisation D/V a été associée à la localisation de l'AER. Certains mutants ont à la fois un problème dans l'AER et dans l'axe D/V (Cygan *et al.*, 1997; Loomis *et al.*, 1998). Par contre, autant les embryons *Pitx1*^{-/-} que les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} semblent avoir un AER intact. De la même façon, la signalisation D/V semble elle aussi intacte puisque l'expression de *Lmx1b*, qui est exprimé spécifiquement dans le mésenchyme dorsal, est inchangée dans les mutants (**figure 3.4 d à f**, p.69).

3.1.5 Retard important de croissance des membres postérieurs chez le seul embryon *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{-/-} obtenu

Pendant les trois années de croisements, nous n'avons obtenu qu'un seul embryon *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{-/-}. Les simples ko *Pitx1* et *Pitx2* ne sont pas viables : les embryons *Pitx1*^{-/-} meurent peu après la naissance d'insuffisance respiratoire (Szeto *et al.*, 1999; Lanctot *et al.*, 1999b); les embryons *Pitx2*^{-/-} meurent à e14.5 à cause d'anomalies cardiaques (Lin *et al.*, 1999; Kitamura *et al.*, 1999; Gage *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999a). Donc, pour obtenir

des embryons sans *Pitx1* ni *Pitx2*, il faut croiser des souris hétérozygotes pour chaque allèle afin d'obtenir des double-hétérozygotes. Les souris hétérozygotes *Pitx1*^{+/-} n'ont aucun phénotype, tandis qu'il y a une très faible proportion de souris *Pitx2*^{+/-} avec des problèmes mineurs aux dents et aux yeux (Gage et al., 1999). Pourtant, nous n'avons obtenu que 2% de double-hétérozygotes *Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{+/-}, au lieu des 25% attendus par le ratio Mendélien. Ce faible taux de survie pourrait mettre en évidence l'importance des *Pitx* dans le mésenchyme extra-embryonnaire où ils sont tous les deux exprimés.

Comme on peut le voir dans la **figure 3.5**, la croissance des membres postérieurs est grandement perturbée chez le seul embryon *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{-/-} obtenu (comparer la **figure 3.5 d à c**, p.72). On détecte à peine un début d'expression de *Fgf8* dans l'AER, seulement dans le bourgeon de gauche, même si ces embryons sont à e12,5, soit deux jours après le début de l'expression de *Fgf8* dans l'AER chez les embryons de type sauvage (où l'expression débute vers e10). Ce résultat confirme ceux obtenus avec les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (retard dans l'expression de *Fgf8*) et démontre le rôle essentiel des *Pitx* dans la croissance des membres postérieurs.

La très faible quantité d'embryons double-mutants qu'il est possible d'obtenir avec les allèles existants nous empêche de pouvoir tester directement différentes molécules candidates. De plus, les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} ne sont que partiellement affectés en comparaison au *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{-/-} obtenu, et le phénotype de ces embryons est de pénétrance variable (voir figure 3 de Marcil *et al.*, 2003 en **annexe I**, p.XIX). D'ailleurs, ces études n'ont pas permis d'identifier de gènes cibles pour les *Pitx* dans les

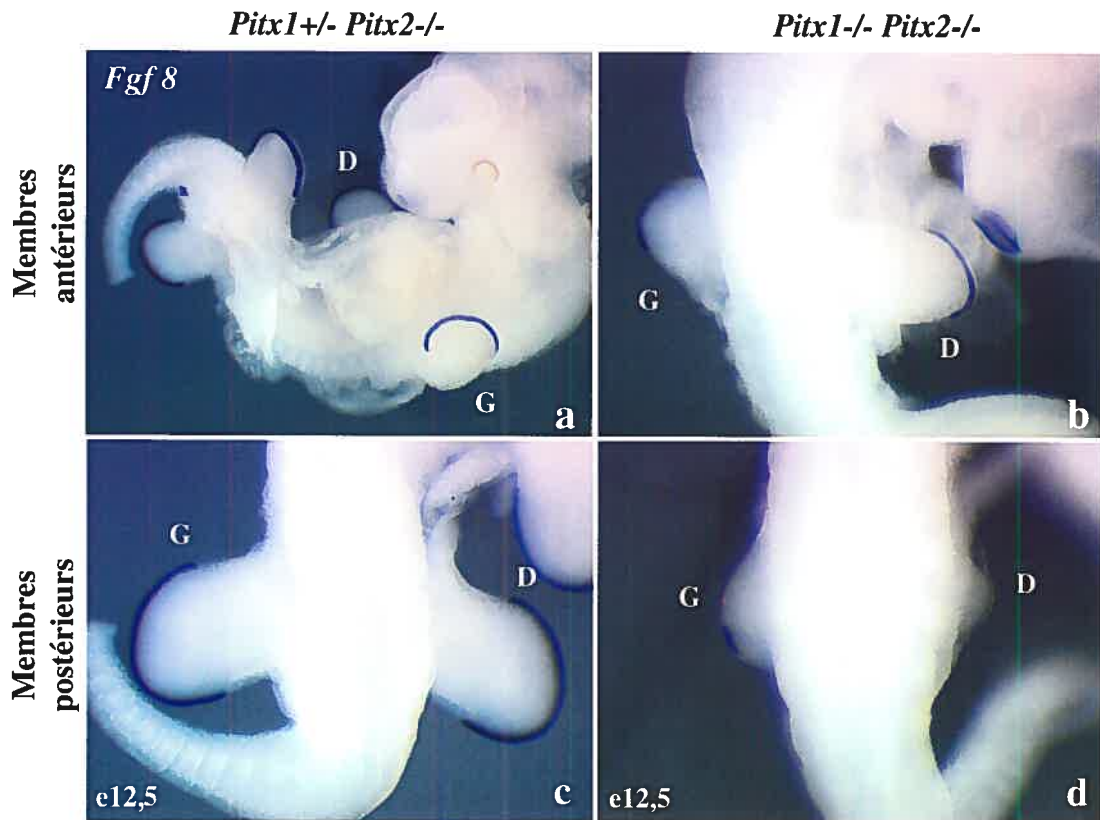


Figure 3.5: Retard important de croissance des membres postérieurs chez le seul embryon *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{-/-} obtenu:

La croissance des membres postérieurs est grandement affectée dans l'embryon *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{-/-} (d), en comparaison à ceux de l'embryon contrôle *Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{-/-} (c). Il y a un début d'expression de *Fgf8* dans le bourgeon de gauche du double-mutant, mais cette expression est grandement retardée comparativement au contrôle. Ces embryons sont à e12.5 et l'expression de *Fgf8* débute normalement vers e10. De plus, il est intéressant de noter que le phénotype est encore asymétrique même si *Pitx2* est totalement absent. Le contrôle est un embryon *Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{-/-} car ceux-ci ne sont pas affectés au niveau des membres postérieurs (comme les embryons de type sauvage). Le retard de croissance observé en (d) est spécifique aux membres postérieurs puisque les membres antérieurs de ce double-mutant (b) sont tout à fait normaux (comme sur le contrôle en a). Les embryons *Pitx2*^{-/-} ont des problèmes de rotation, ce qui complique l'orientation, donc chaque membre a été identifié. G = gauche et D = droite.

membres. Enfin, *Pitx1* n'est pas seulement important pour la croissance, il contrôle également la spécification de l'identité des membres postérieurs (voir introduction section 1.6.2 *Pitx1*, p.29) et nous ne connaissons presque rien de ce processus. Toutes ces raisons nous ont poussé à adopter une approche plus globale pour trouver des gènes cibles de *Pitx1* dans les membres postérieurs.

3.2 Recherche de gènes cibles

Nous avons choisi d'utiliser la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), une technique de plus en plus utilisée pour trouver de nouveaux gènes cibles (Boyd and Farnham, 1999;Kuo and Allis, 1999;Ren *et al.*, 2000;Wells *et al.*, 2000;Weinmann *et al.*, 2001;Weinmann and Farnham, 2002;Stevens *et al.*, 2004). La technique de ChIP consiste à immunoprécipiter une protéine d'intérêt avec l'aide d'un anticorps spécifique, à partir de cellules qui ont été fixées avec du formaldéhyde. Le formaldéhyde permet de créer des liens covalents entre les protéines qui interagissent, et entre les protéines et l'ADN qui sont en contact, et ces liens sont réversibles par un traitement prolongé à la chaleur. Ces extraits sont également soniqués ce qui permet de briser l'ADN génomique en fragments de 500 pb à 1 kb. Lorsque l'on immunoprécipite la protéine d'intérêt, on récupère tout un complexe comprenant aussi les séquences d'ADN avec lesquelles elle interagit. Pour un facteur de transcription comme *Pitx1*, ceci permet d'immunoprécipiter les régions de régulation sur lesquelles il est lié. À la fin de la procédure, l'ADN récupéré est purifié et peut être soit analysé directement pour l'enrichissement d'une cible connue par Q-PCR, soit cloné et séquencé afin de trouver, parmi ces fragments, des régions régulatrices qui se trouvent à proximité de différents gènes. Cette technique comporte plusieurs avantages : elle n'a pas le biais habituel des

approches génomiques comme les puces à ARNm, où la sensibilité de l'approche dépend du niveau d'expression de chaque transcrit. En théorie, peu importe le niveau d'expression, chaque locus est représenté également parmi le génome et donc, a autant de chances d'être repêché par ChIP que les autres.

3.2.1 Spécificité des anticorps α -Pitx1

Le succès de la technique de ChIP repose sur l'utilisation d'anticorps capables d'immunoprécipiter des protéines dans des conditions extrêmes où les cellules sont fixées. Nous avons donc généré de nouveaux anticorps contre Pitx1. Nous avons choisi la protéine en entier comme antigène afin d'obtenir des anticorps polyclonaux possiblement capables de reconnaître plusieurs épitopes différents situés à la surface de la protéine. Ceci permet d'éviter les situations où l'épitope reconnu est masqué, comme cela peut être le cas suite à la fixation au formaldéhyde qui crée des liens covalents entre les protéines. Donc, plus l'anticorps est capable de reconnaître différents épitopes à la surface de la protéine, plus il y a de chances que celui-ci fonctionne en ChIP.

Les deux nouveaux anticorps générés contre Pitx1 (A et B) reconnaissent les trois membres de la famille Pitx, soit Pitx1, 2 et 3 (voir **figure 3.6 a et b**, p.75). Ceci n'est pas très surprenant puisque les trois membres de la famille sont très semblables au niveau de l'homéodomaine (voir **figure 1.3**, p.28) (Drouin et al., 1998a). Ces anticorps reconnaissent également dans les extraits nucléaires de cellules AtT20 une bande qui migre vers 40 kDa, le poids moléculaire attendu pour Pitx1. De plus, ils reconnaissent une bande qui migre au même poids moléculaire dans les extraits provenant de membres postérieurs et cette bande semble spécifique puisqu'elle est absente des extraits de

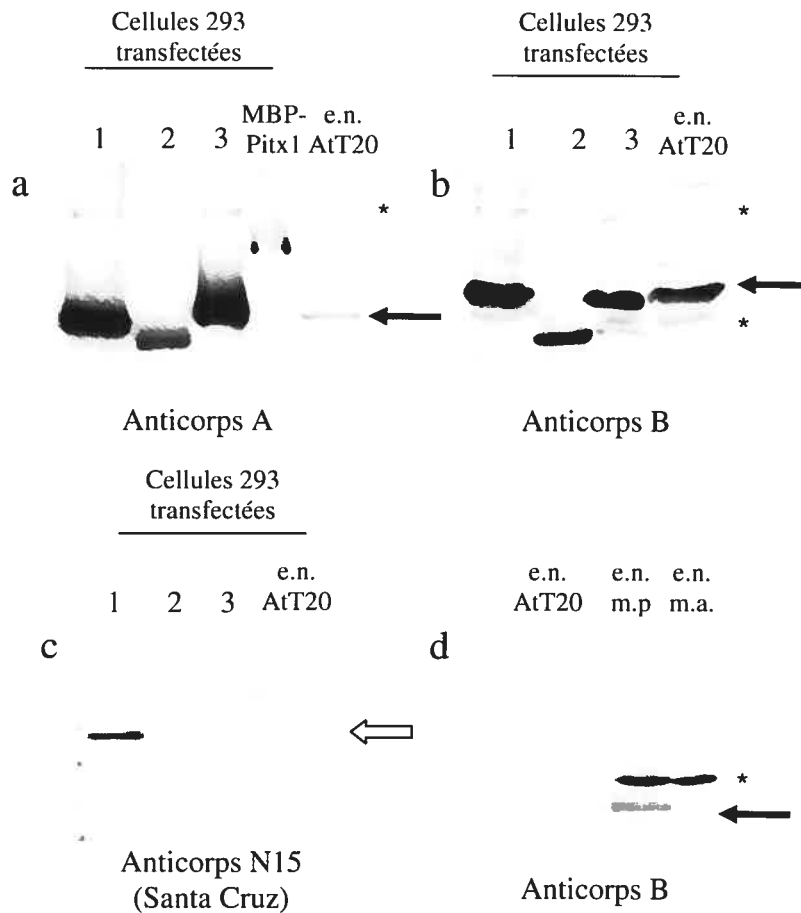


Figure 3.6: Spécificité des anticorps α -Pitx1:

Les deux anticorps α -Pitx1 de lapin ont été produits en utilisant la protéine entière comme antigène. Ces anticorps reconnaissent les trois membres de la famille *Pitx* (Pitx1, Pitx2 et Pitx3, surexprimés dans des cellules 293) ainsi qu'une bande dans les cellules AtT20 qui migre vers 40 kDa et qui semble correspondre au Pitx1 endogène (a et b). Un anticorps commercial (de chèvre), généré contre une portion du N-terminal, ne reconnaît que Pitx1 (c). Par contre, il ne semble pas assez sensible pour détecter une bande spécifique dans les extraits nucléaires d'AtT20. En plus de reconnaître Pitx1 dans les AtT20, l'anticorps B reconnaît une bande correspondant à Pitx1 spécifiquement dans les membres postérieurs (m.p.) et non dans les membres antérieurs (m.a.) (d). Les mêmes résultats sont obtenus avec l'anticorps A (résultats non-montrés). Les flèches noires correspondent à Pitx1. La flèche blanche montre l'absence de bande à cet endroit. Les astérisques (*) représentent du non-spécifique. Les pistes 1, 2 et 3 correspondent à Pitx1, 2 et 3 respectivement. e.n. = extraits nucléaires, m.p. = membres postérieurs, m.a. = membres antérieurs. Pitx1 est très faiblement exprimé dans les cellules AtT20 en comparaison au mésenchyme des m.p., ce qui explique la très faible bande observée en (d).

membres antérieurs (**figure 3.6 d**, p.75). Pitx1 est beaucoup plus fortement exprimé dans les membres postérieurs que dans les cellules AtT20, ce qui explique la faible intensité de la bande correspondant à Pitx1 dans les extraits d'AtT20 (**figure 3.6 d**). L'anticorps commercial (N15, Santa Cruz) semble reconnaître spécifiquement la protéine Pitx1 surexprimée dans des cellules 293, mais il n'est pas assez sensible pour détecter la protéine endogène dans les cellules AtT20 (**figure 3.6 c**, p.75).

3.2.2 Les anticorps α -Pitx1 immunoprécipitent spécifiquement Pitx1

Les nouveaux anticorps α -Pitx1 immunoprécipitent très efficacement la protéine endogène exprimée dans les cellules AtT20 (**figure 3.7 a**, p.77) ou dans les cellules α -T3 (**figure 3.7 b**), qu'elles soient fixées (comme c'est le cas dans la **figure 3.7**) ou non (résultats non-montrés) au formaldéhyde. Par contre, l'IP semble moins efficace à partir d'extraits de bourgeons de membres postérieurs fixés (**figure 3.7 c**). Par ailleurs, j'ai eu beaucoup de difficultés à révéler mes IP parce l'anticorps utilisé pour l'IP et pour la révélation était de la même espèce, entraînant ainsi un fort signal provenant des IgGs qui masquait le signal spécifique. Pour contourner ce problème technique, j'ai couplé mon anticorps de façon covalente aux billes (protéine A/G agarose), mais l'IP ne semblait plus très efficace (résultats non-montrés). De plus, j'ai utilisé l'anticorps N15 de chèvre pour la révélation, mais ce réactif n'est pas suffisamment sensible pour détecter les niveaux endogènes de Pitx1 (**figure 3.6 c** et résultats non-montrés). Enfin, les résultats présentés à la **figure 3.7 a** et **c** représentent des membranes qui, suite à une étape de déshybridation, étaient ré-hybridées avec un anticorps α -Pitx1 de lapin. Par la suite, j'ai directement révélé la présence de Pitx1 sur mes membranes avec la protéine A/G-HRP au lieu des anticorps secondaires (**figure 3.7 b, d et e**).

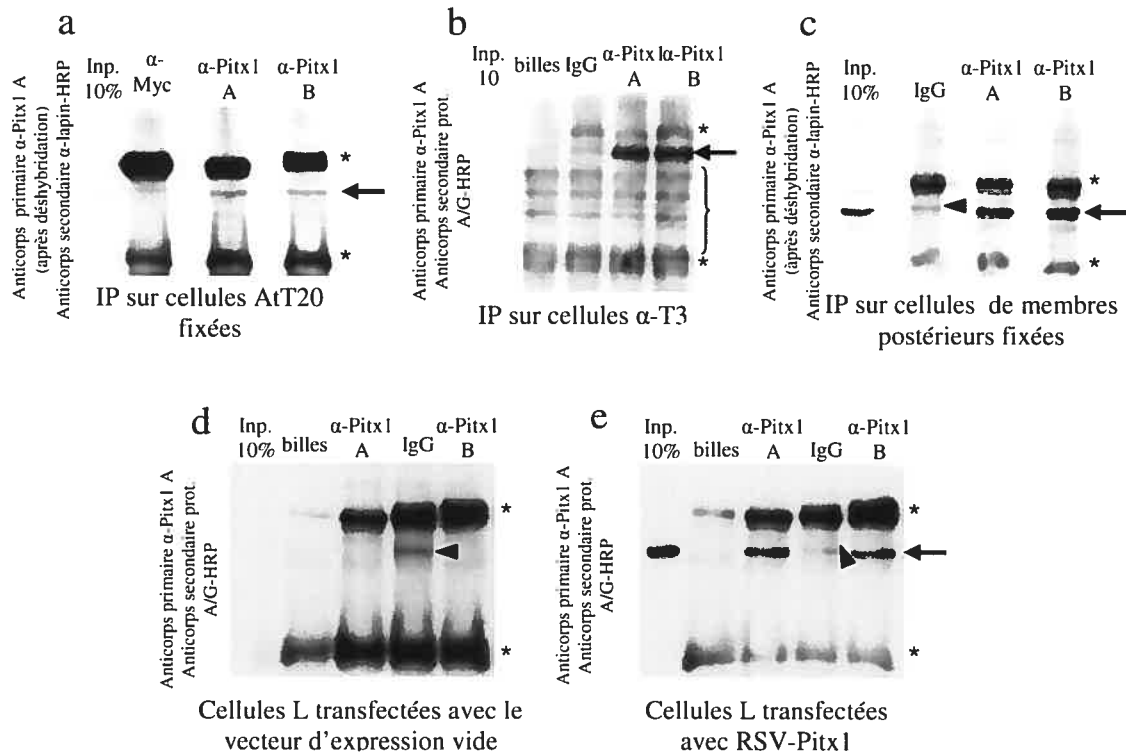


Figure 3.7: Les anticorps α -Pitx1 immunoprécipitent spécifiquement Pitx1: IP sur cellules AtT20 fixées au formaldéhyde (a). La révélation de la membrane après déshydratation. L'IP Pitx1 est très efficace (déterminer en comparant la bande de l'IP à celle de l'input). IP sur cellules α -T3 fixées au formaldéhyde (b). Ces cellules expriment beaucoup plus de Pitx1 que les cellules AtT20. L'IP semble être très efficace dans ces cellules. IP sur extraits de membres postérieurs fixés au formaldéhyde (c). L'IP Pitx1 est sensiblement moins efficace que dans les autres cellules. IP sur des cellules hétérologues L transfectées ou non avec le vecteur d'expression codant pour Pitx1 (d et e). On remarque que dans l'IP contrôle IgG de lapin (cellules transfectées ou non), il y a une bande de bruit de fond qui apparaît tout juste au-dessus de la bande correspondant à Pitx1. La flèche noire représente Pitx1. Les contrôles utilisés étaient soit un anticorps polyclonal de lapin (comme par exemple l' α -myc en (a)), soit des IgGs de lapin (IgG), soit les billes seules (billes). La tête de flèche représente le bruit de fond dû à l'IgG. Les astérisques (*) représentent les IgGs (chaînes lourdes et légères). L'accolade met en évidence possiblement de la dégradation.

Ce réactif diminue considérablement le bruit de fond car il reconnaît préférentiellement les anticorps non-dénaturés.

On remarque que dans l'IP contrôle avec les IgG de lapin (Sigma) sur les cellules de membres postérieurs, une bande est présente légèrement au-dessus de la bande correspondant à Pitx1 (tête de flèche). Afin de s'assurer que cette bande ne correspond pas à Pitx, j'ai eu recours à des cellules qui n'expriment pas de Pitx, les cellules L. On peut observer que dans les cellules transfectées ou non avec un RSV-Pitx1, l'IP contrôle avec les IgG de lapin génère une bande à la même hauteur (tête de flèche, **figure 3.7**, p.77), confirmant qu'elle ne représente pas la protéine Pitx1.

Enfin, peu importe la technique utilisée pour la révélation, les résultats indiquent clairement que les anticorps utilisés immunoprécipitent la protéine Pitx1 endogène provenant de différents types cellulaires dans des conditions où les cellules sont fixées au formaldéhyde.

3.2.3 Les anticorps α -Pitx1 fonctionnent en ChIP :

J'ai utilisé les cellules AtT20 afin de mettre les conditions de ChIP au point. Ces cellules expriment *Pitx1* et représentent un modèle de cellules corticotropes, un type de cellules d'origine hypophysaire. Dans ces cellules, POMC est le seul gène cible connu de Pitx1. Il se lie à un site qui se situe dans la partie centrale du promoteur (Lamonerie et al., 1996). Pour tester l'efficacité des ChIP, on utilise l'ADN purifié à la fin de la procédure afin de tester l'enrichissement, par Q-PCR, de cette cible suite à une ChIP Pitx1 par rapport à une ChIP contrôle. Chaque ChIP est aussi testée pour une région non

spécifiquement enrichie; les résultats présentés sont normalisés par l'enrichissement de cette région afin d'éliminer la contribution de tout enrichissement non spécifique (nous utilisons une région qui provient d'un exon de l'actine ou de TBP par exemple).

Les ChIP effectuées avec les deux anticorps α -Pitx1 dans les cellules AtT20 montrent un enrichissement du promoteur de la POMC de ~ 5 fois relativement aux ChIP contrôles (**figure 3.8 a**, p.80). On sait que dans ces mêmes cellules, le bHLH NeuroD participe également à la régulation de POMC (Poulin et al., 1997). Lorsqu'on effectue une ChIP avec un anticorps α -NeuroD, un anticorps polyclonal de lapin produit au laboratoire de façon similaire à ceux pour les Pitx, on voit qu'il permet d'enrichir de ~ 45 fois le promoteur de la POMC (**figure 3.8 b**, p.80).

Les cellules AtT20 ne semblent pas un très bon modèle pour valider la technique de ChIP avec les anticorps α -Pitx1. J'ai donc décidé de changer de type cellulaire afin de tester si le manque d'efficacité des ChIP était dû à un manque de sensibilité des anticorps ou à un effet spécifique au promoteur POMC, Pitx1 pouvant être masqué sur ce promoteur mais disponible sur d'autres. Les cellules α -T3 représentent un modèle de cellules pré-gonadotropes, également d'origine hypophysaire. Elles expriment beaucoup plus fortement *Pitx1* que les cellules AtT20 (Tremblay et al., 1998), ce qui s'apparente plus à la réalité des cellules du mésenchyme des membres postérieurs qui expriment très fortement Pitx1 et sur lesquelles j'aimerais appliquer la technique. De plus, dans ces cellules, Pitx1 régule l'expression du gène de l' α -GSU via un site situé à -70 pb de l'initiation, dans la partie proximale du promoteur (Tremblay et al., 1998). Comme on peut le voir sur la **figure 3.8 c**, l'enrichissement du promoteur de l' α -GSU suite aux ChIP

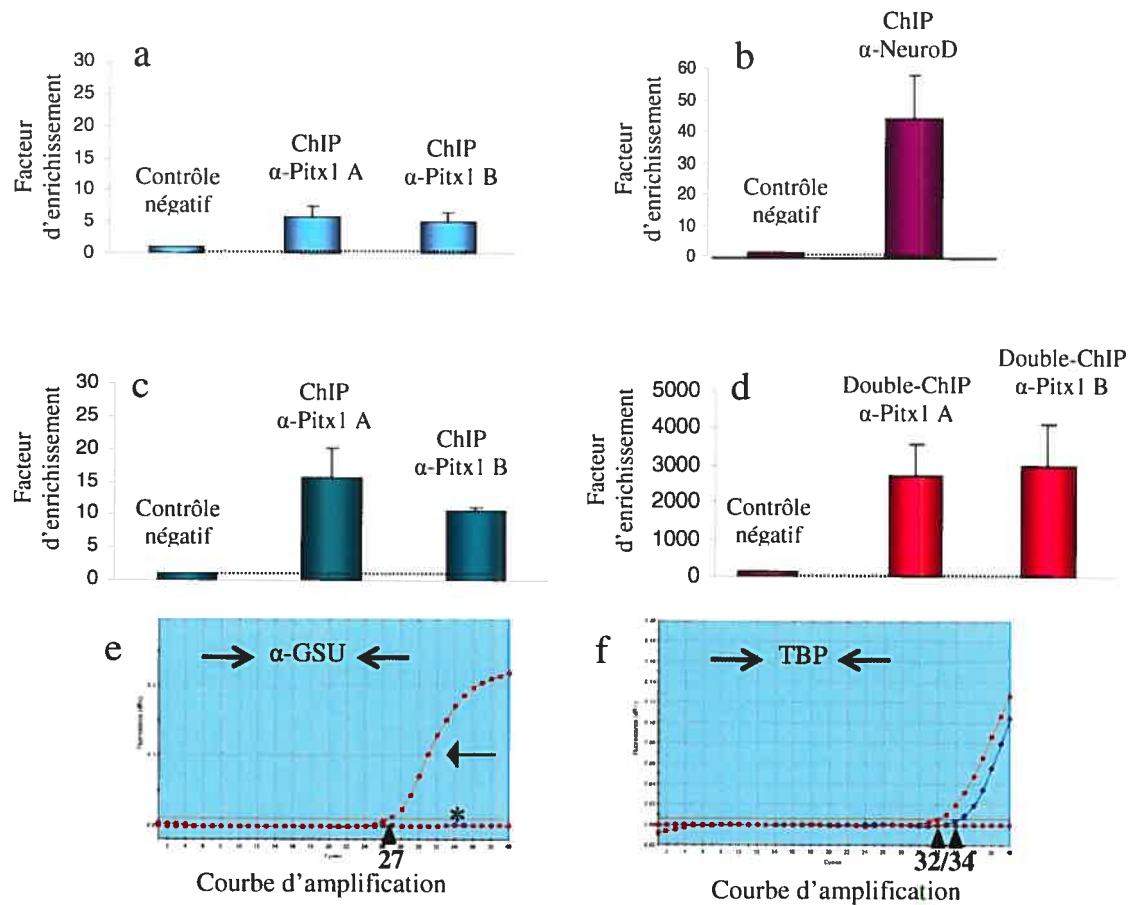


Figure 3.8: Résultats de ChIP (Q-PCR):

Dans les cellules AtT20, Pitx1 régule le gène de la POMC. Dans ces cellules, les deux anticorps α -Pitx1 ne sont pas très efficaces pour enrichir le promoteur de la POMC. L'enrichissement observé est de ~ 5 fois (a). Dans ces mêmes cellules, l'anticorps α -NeuroD permet un enrichissement de ~ 45 fois de POMC (b). Les cellules α -T3 expriment fortement Pitx1. Dans ces cellules, Pitx1 régule le gène de l' α -GSU. Les simples ChIP permettent un enrichissement du promoteur de l' α -GSU de ~ 15 fois (c). Les doubles-ChIP permettent un enrichissement beaucoup plus important (d). Un exemple d'une courbe d'amplification de Q-PCR, après une double-ChIP, qui montre que le promoteur de l' α -GSU n'est amplifié que dans la double-ChIP Pitx1 (flèche) et non dans la double-ChIP contrôle (*) (e). Lorsqu'on mesure le bruit de fond, en amplifiant une autre région génomique, dans ce cas-ci un intron de TBP, on observe que les niveaux d'amplification sont très faibles et que l'enrichissement suite à la double-ChIP Pitx est également très faible. Les enrichissements présentés en a, b, c et d sont calculés par le programme Mx4000 (Stratagène) et sont toujours normalisés avec ceux d'une séquence génomique « non-enrichie » comme contrôle négatif.

Pitx1 (par rapport aux ChIP contrôles) est de ~ 15 fois, ce qui est un peu mieux que dans les cellules AtT20. Dans ces cellules, j'ai également utilisé avec succès la technique de double-ChIP, ce qui permet d'augmenter considérablement l'enrichissement par rapport aux contrôles, et de diminuer également la quantité totale de bruit de fond. Ce bruit de fond provient de l'ADN génomique qui se colle de façon non-spécifique aux billes. La technique de double-ChIP consiste simplement à refaire une deuxième IP, avec les mêmes anticorps, sur l'élution de la première IP et ce, sans briser les liens covalents. Ceci a déjà été utilisé pour cloner directement l'ADN immunoprécipité (Slack et al., 2005). Comme on peut le voir sur la **figure 3.8 d** (p.80), en effectuant une double-ChIP, je réussi à enrichir l' α -GSU de plus de 1000 fois (évaluée par le programme Mx4000 de Stratagène). Je montre également sur la **figure 3.8 e** un exemple d'une courbe d'amplification qui montre que le promoteur de l' α -GSU n'est amplifié que dans la double-ChIP Pitx1 (flèche) et non dans la double-ChIP témoin (astérisque*), ce qui suggère un très bon enrichissement des cibles de Pitx1 dans cette expérience. Sur la **figure 3.8 f**, on observe l'enrichissement d'une région contrôle (TBP), qui montre un très léger enrichissement dans la double-ChIP Pitx (cet enrichissement peut être observé avec n'importe quelle région, comme si il y avait toujours une quantité plus importante d'ADN immunoprécipité avec l'anticorps α -Pitx1 qu'avec l'IgG de lapin qui nous sert de témoin), mais le niveau d'enrichissement ainsi que la quantité totale de TBP est beaucoup moindre par rapport à l' α -GSU, ainsi que par rapport aux simples ChIP.

La technique de double-ChIP semble diminuer le bruit de fond et permettre d'enrichir davantage les cibles de Pitx1. J'ai donc essayé de cloner directement l'ADN provenant de ces doubles-ChIP Pitx1 afin de vérifier si c'était possible, avec mes

anticorps, de trouver de nouvelles cibles de Pitx1 dans les cellules α -T3. Pour cloner, j'ai utilisé la T4 DNA polymérase pour rendre les extrémités des fragments d'ADN soniqués franches, pour pouvoir les cloner directement dans un vecteur bluescript digéré par Eco32I (isoschizomères de EcoRV) et déphosphorylé. Ce vecteur avait été testé au préalable et était très efficace pour cloner des fragments avec des bouts francs sans qu'il ne se referme trop sur lui-même. Parmi toutes les colonies obtenues suite au clonage des doubles-ChIP Pitx1, je devrais théoriquement obtenir des colonies qui contiennent le promoteur de l' α -GSU puisque je sais que celui-ci est grandement enrichi dans mes ChIP. J'ai obtenu deux fois plus de colonies avec l'ADN provenant des doubles-ChIP Pitx1 (~ 400 colonies) qu'avec l'ADN provenant des ChIP contrôles (~ 175 colonies) (le vecteur seul produisait dans ces conditions ~ 10 colonies). Donc, même si le bruit de fond observé en Q-PCR est relativement faible, il reste quand même beaucoup d'ADN non-spécifique. J'ai ensuite hybridé les colonies avec une sonde correspondant au promoteur de l' α -GSU afin de vérifier si certains clones contenaient ce fragment d'ADN. Suite à l'hybridation, il n'y avait aucune colonie positive, ni dans la ChIP Pitx1, ni dans la ChIP contrôle et ce, même si mon contrôle positif (bactéries transformées avec le vecteur contenant le promoteur α -GSU devant le gène de la luciférase) était positif (résultats non-montrés).

Ce résultat montre que même si l'enrichissement paraît excellent par Q-PCR, il est difficile de trouver de nouvelles cibles en clonant directement les séquences obtenues suite aux ChIP. Il faudrait possiblement hybrider des milliers de colonies avant d'en trouver qui contiennent le promoteur de l' α -GSU. Donc, vraisemblablement, il faudrait séquencer plusieurs milliers de clones pour trouver des cibles potentielles pour Pitx1 (des

fragments qui reviennent plus qu'une fois). C'est pourquoi nous travaillons au laboratoire sur une technique permettant d'éliminer le bruit de fond des ChIP avant le clonage.

3.3 *Tbx4*, gène cible potentiel de Pitx1

3.3.1 Organisation génomique du gène *Tbx4*

Tbx4 est une cible potentielle particulièrement intéressante pour *Pitx1* puisque plusieurs évidences suggèrent que ce dernier puisse agir en amont de *Tbx4*. Tout d'abord, ils sont exprimés dans les mêmes régions au cours du développement embryonnaire, notamment dans les membres postérieurs, où l'expression de *Pitx1* précède celle de *Tbx4* dans le mll (Lanctot *et al.*, 1997; Gibson-Brown *et al.*, 1998a). De plus, l'expression ectopique de *Pitx1* dans les membres antérieurs chez le poulet induit l'expression de *Tbx4* (Logan *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999). Enfin, les embryons *Pitx1*^{-/-} montre une diminution importante de l'expression de *Tbx4* dans les membres postérieurs (Szeto *et al.*, 1999; Lanctot *et al.*, 1999c). Par contre, jusqu'à ce jour, on ne sait pas si *Tbx4* est une cible transcriptionnelle directe de Pitx1.

Pour répondre à cette question, j'ai étudié le locus de *Tbx4*. Ce gène est situé sur le chromosome 11 de souris et le gène le plus proche, *Tbx2*, se trouve à ~ 50 kb du côté 5'. Le tandem *Tbx2/4* proviendrait d'une duplication ancestrale d'un locus *Tbx2-4/Tbx3-5* (voir **section 1.7 Protéines à boîte T**, p.42). De l'autre côté, le gène le plus proche *Brip1* se situe à presque 150 kb (**figure 3.9 a**, p.85). Selon les données disponibles dans les banques informatiques, le gène *Tbx4* est composé de 8 exons avec l'ATG qui se situe au tout début de l'exon 1 (**figure 3.9 b**, p.85). Il existe également des banques de séquences exprimées (ESTs), qui représentent des bouts d'ARNm, souvent incomplets, provenant

de différentes banques d'ADNc. Pour *Tbx4*, en plus de l'ARNm décrit (AY075134), il existe une EST, le BY008430, qui contient un exon capable de s'épisser avec les deux premiers exons de l'ARNm (**figure 3.9 c**, p.85). Cette séquence provient d'une banque d'ADNc de placenta où *Tbx4* est exprimé. De plus, un article qui porte sur l'étude du locus *Tbx4* par des moyens bio-informatiques, prédit la présence d'un exon 1 non codant, comme il en existe un dans le locus *Tbx5* (Yi et al., 2000).

Savoir où se situe l'exon 1, même si il est non-codant, est très important pour étudier la régulation transcriptionnelle d'un gène, puisque le promoteur se situe juste en amont du site d'initiation. J'ai vérifié la présence de cet exon supplémentaire (possiblement non-codant) en utilisant la technique de RT-PCR sur de l'ADNc fait à partir d'ARN provenant de membres postérieurs. J'ai tout d'abord utilisé un oligonucléotide antisens situé dans l'exon 1, qui contient l'ATG, avec un oligonucléotide sens dans l'exon potentiel, ce qui m'a permis d'amplifier une bande de la taille attendue à partir de l'ADNc, ainsi qu'une bande beaucoup plus grande à partir de l'ADN génomique (à cause de la présence d'un grand intron entre les 2 exons) (résultats non-montrés). Ceci venait donc prouver l'existence d'un ARNm contenant l'exon supplémentaire provenant de l'EST. J'ai utilisé des programmes bio-informatiques afin de déterminer où commençait cet exon : trois sites potentiels d'initiation (A/B/C sur la **figure 3.9 d**, p.85) (programme utilisé : http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). Ensuite, j'ai pris un oligonucléotide antisens directement situé dans le nouvel exon afin de diminuer la longueur des fragments à amplifier, pour que la réaction de PCR soit plus efficace, jumelé avec des oligonucléotides sens situés entre chacun des sites potentiels d'initiation afin de déterminer, toujours par RT-PCR, quel site d'initiation prédit était le bon. Comme

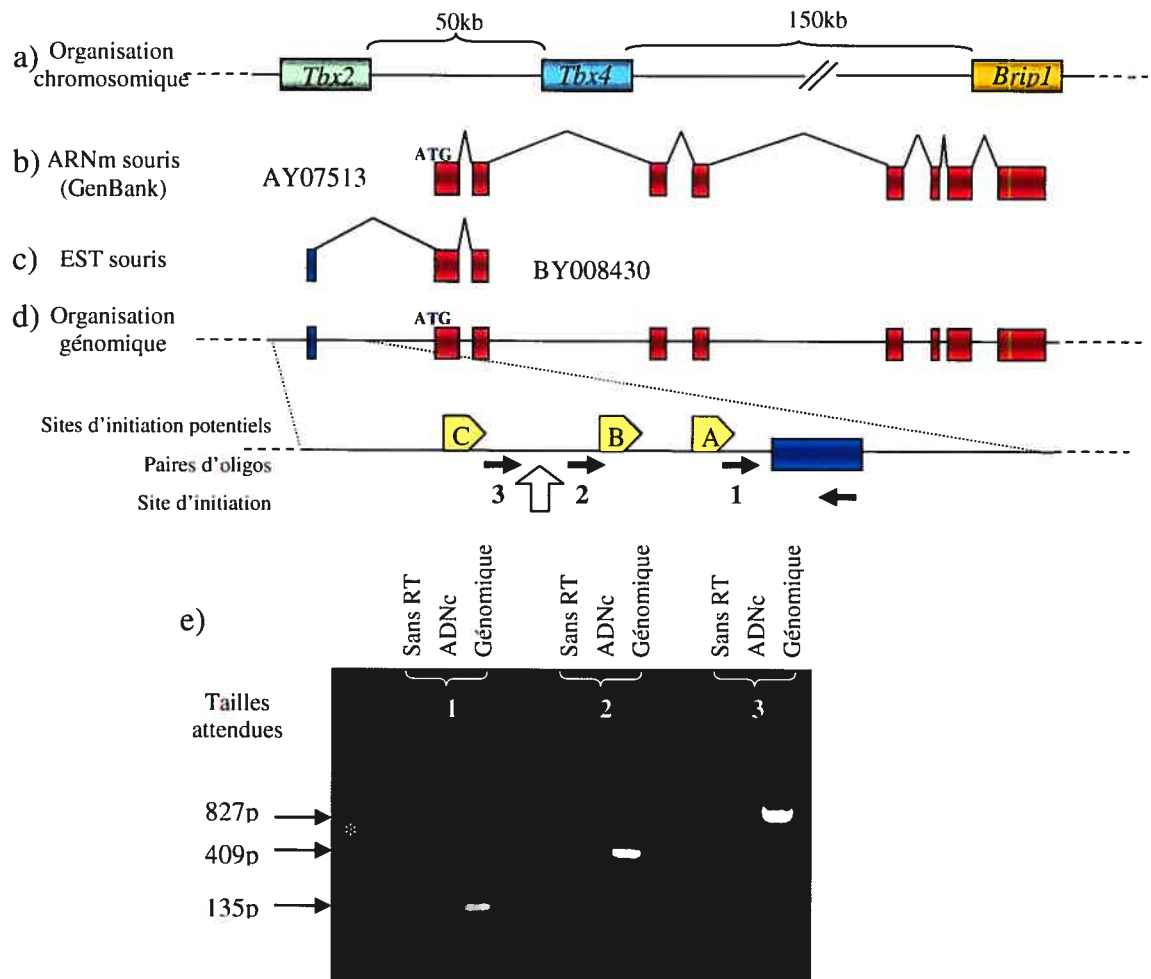


Figure 3.9: Détermination d'un nouveau site d'initiation pour le gène *Tbx4*:

Organisation chromosomique (a) : *Tbx4* forme avec *Tbx2* une paire de gènes situés sur le chromosome 11 chez la souris. L'ARNm de *Tbx4* (souris) AY075134 comprend 8 exons, avec l'ATG dans l'exon 1 (b). Dans les banques informatiques, il existe un EST, le BY008430, qui contient un exon qui s'épisse avec les deux premiers exons de *Tbx4* (c). Organisation génomique de *Tbx4* avec le nouvel exon (d). En amont du nouvel exon, 3 sites potentiels d'initiation sont prédits par bio-informatique (A/B/C). Les paires d'oligonucléotides utilisés en RT-PCR sont illustrées (1/2/3). Résultats de RT-PCR (e) en utilisant toujours le même oligonucléotide antisens situé dans le nouvel exon. Les oligonucléotides 1 et 2, qui se trouvent en amont des sites A et B respectivement, sont capables d'amplifier l'ADNc et l'ADN génomique. Par contre, le 3, qui se situe entre les sites B et C, n'amplifie que le génomique. Le site d'initiation se situe donc entre les oligonucléotides 2 et 3 (flèche blanche), dans un interval de 418 pb qui ne correspond à aucun des sites prédits. L'ADNc n'est pas contaminé par de l'ADN génomique puisque aucune bande n'est amplifiée dans les contrôles sans RT. L'astérisque* correspond au 600 pb du marqueur.

on peut le voir sur la photo de gel à la **figure 3.9 e** (p.85), les oligonucléotides 1 et 2 sont capables d'amplifier une bande de la bonne taille autant à partir de l'ADNc que de l'ADN génomique. Pour ce qui est de l'oligonucléotide 3, il ne peut amplifier une bande qu'à partir de l'ADN génomique. Comme contrôle négatif, j'ai utilisé de l'ARNm qui n'avait pas subi de réaction de RT afin de m'assurer que celui-ci n'était pas contaminé par de l'ADN génomique. Ces résultats démontrent que la région de 418 pb entre l'oligonucléotide 2 et 3 contient le site d'initiation de *Tbx4*. De façon surprenante, ce site ne correspond à aucun des sites potentiels identifiés par bio-informatique. De plus, il n'y a aucune séquence ressemblant à une boîte TATA ou à un site d'initiation potentiel dans cet intervalle.

J'ai également essayé d'identifier plus précisément la séquence correspondant à l'initiation par la technique de 5'RACE. Cette technique consiste à rajouter une série de nucléotides modifiés à l'extrémité 5' de l'ADNc. Ces nucléotides sont reconnus par un oligonucléotide spécifique (Invitrogen), permettant de faire des PCR, ce qui permet d'amplifier l'extrémité 5', de la séquencer et ainsi déterminer de façon précise l'extrémité 5' des ARNm. Par contre, je n'ai pas réussi à amplifier de fragments spécifiques avec cette technique.

3.3.2 Régions conservées du locus *Tbx4*

Avec l'aide du programme Vista (<http://pipeline.lbl.gov>), qui fait la comparaison entre les séquences du génome humain et celui de souris, j'ai identifié plusieurs régions conservées entre les deux espèces dans le locus *Tbx4*. Ces régions d'homologie représentent des régions qui ont subi une pression sélective pour être gardée au cours de

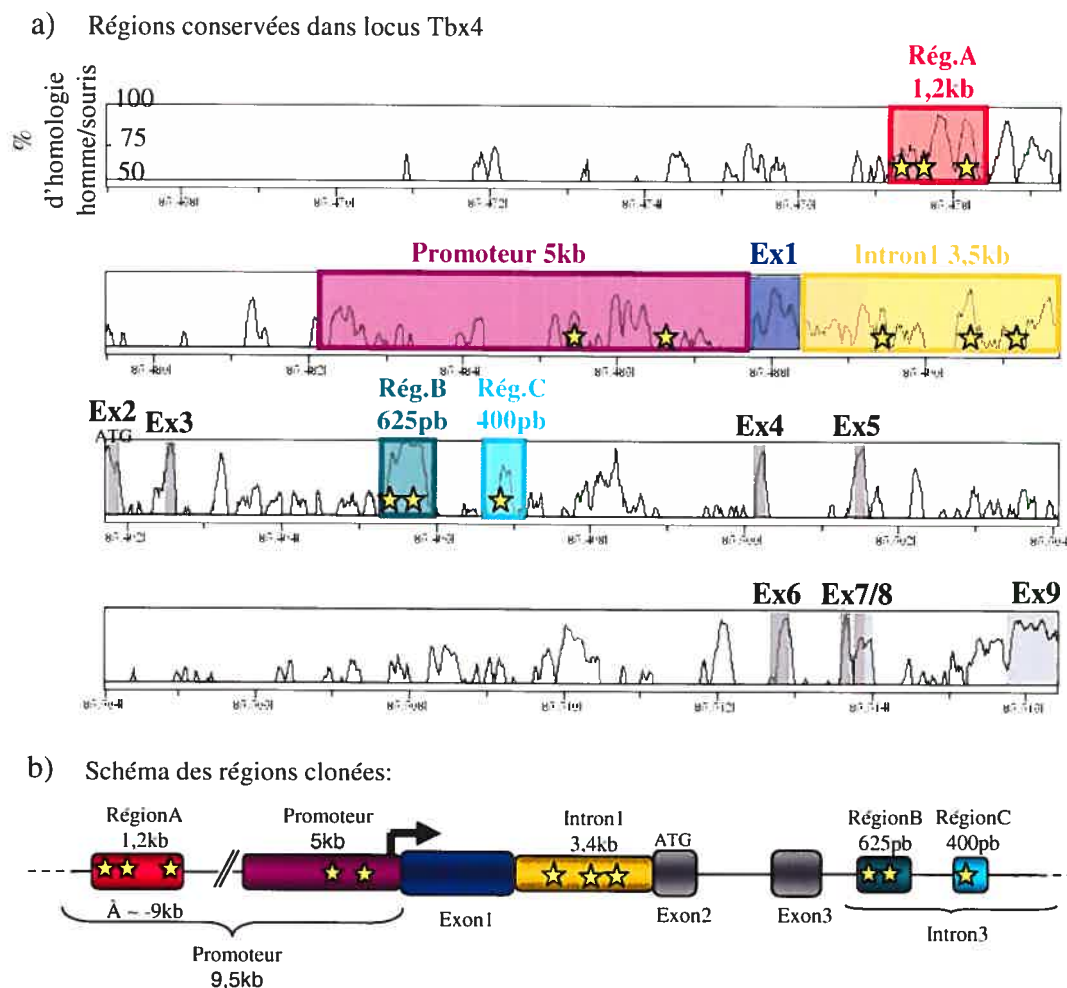


Figure 3.10: Régions conservées du locus *Tbx4* :

Régions génomiques conservées dans le locus *Tbx4* telles qu'évaluées par le programme Vista (a). Les pics représentent le % (entre 50% et 100%) de conservation entre la séquence du génome humain et celle de souris. Les régions colorées en bleu et gris représentent les 9 exons du gène *Tbx4*. Les boîtes colorées sont des régions conservées contenant des sites Pitx1 potentiels (étoiles jaunes) qui ont été clonées. Représentation schématique du locus *Tbx4* (b) avec les régions conservées qui ont été clonées.

l'évolution, possiblement parce qu'elles sont importantes pour la régulation. Les pics sur le graphique de la **figure 3.10 a** représentent les régions avec plus de 50% d'homologie. Les exons, qui sont très conservés, sont représentés en gris, avec le nouvel exon en bleu. Certaines de ces régions contiennent des sites potentiels qui pourraient médier l'activation de *Tbx4* par Pitx1. J'ai cloné certaines de ces régions génomiques conservées (représentées par des boîtes de couleurs sur le graphique) dans un vecteur luciférase vide (pxp2) afin de tester leur activité en transfection. Dans la **figure 3.10 b** (p.87), on voit, schématisées, les régions qui ont été clonées, avec les sites potentiels Pitx1 en jaune.

3.3.3 Pitx1 active trois régions conservées du locus *Tbx4* en transfection

Afin de mesurer l'activité de chacune des régions clonées et pour voir si celles-ci pouvaient répondre à Pitx1, j'ai transfecté ces différents rapporteurs (illustrés à la **figure 3.10 b**, p.87), en présence ou non de quantités croissantes de vecteur d'expression codant pour Pitx1. J'ai effectué ces transfections dans des cellules hétérologues (les cellules L, qui sont des fibroblastes de souris) qui n'expriment pas de Pitx. Les résultats présentés à la **figure 3.11** sont exprimés en activation par Pitx1 par rapport à l'activité en présence du vecteur d'expression vide. De plus, toutes les données ont été normalisées par l'activité du CMV_β-gal comme contrôle interne de transfection.

J'ai utilisé deux contrôles positifs différents de transfection. Tout d'abord, j'ai utilisé le trimère d'un élément de la partie centrale du promoteur de la *POMC* (le CE3 trimérisé est situé en aval du promoteur minimal de la *POMC*). Cette région du promoteur contient entre autre un site Pitx TAAGCC (Lamonerie et al., 1996) (le site classique pour les membres de la famille bicoïde est TAATCC (Driever and

Nussleinvohard, 1989)). Ce promoteur simple est facilement activable (jusqu'à 25 fois) par des doses croissantes de Pitx1 (**figure 3.11 a**, p.90). Cette construction est assez active dans ces cellules, avec un taux de base de ~ 5000 RLU brutes. L'autre contrôle positif utilisé est le promoteur de la *LHB*, également un promoteur d'origine hypophysaire (Tremblay et al., 1998). Ce promoteur a été caractérisé au laboratoire et un site Pitx1 TAATCC est essentiel pour son activation (Tremblay et al., 1998). Ce promoteur peut-être activé jusqu'à 6 fois par Pitx1 dans les conditions utilisées (**figure 3.11 b**, p.90) et son taux de base est beaucoup plus faible avec moins de 1000 RLU.

Le vecteur vide que j'ai utilisé pour cloner ces régions, pxp2 n'est ni actif (moins de 100 RLU d'activité de base) ni activable par Pitx1 (résultats non-montrés). Ensuite, parmi les régions du locus *Tbx4* clonées, seulement trois courtes régions peuvent être faiblement activées par Pitx1. Ces trois régions ne se retrouvent pas dans le promoteur, mais plutôt à ~ -9 kb en 5' pour la région A, et ~ +9 kb (intron 3) pour les régions B et C.

J'ai tout d'abord cloné, 5 kb de promoteur, qui contient le nouveau site d'initiation (**figure 3.9 d**, p.85 et **3.10**, p.87). Ce promoteur contient deux sites potentiels pour Pitx1 qui se situe à ~ 1 kb et 2 kb respectivement de ce site d'initiation. Il est à peu près aussi peu actif que le promoteur de la *LHB* dans les cellules L, avec ~ 1000 RLU de taux de base, mais il n'est pas activable par Pitx1 (**figure 3.11 c**, p.90).

Ensuite, j'ai cloné l'intron 1 qui contient 3,5 kb de régions très conservées (plus de 75% de conservation) et qui contient trois sites Pitx1 potentiels. Celui-ci a un niveau de base très élevé dans les cellules L, ~ 50000 RLU, ce qui est beaucoup plus actif que la

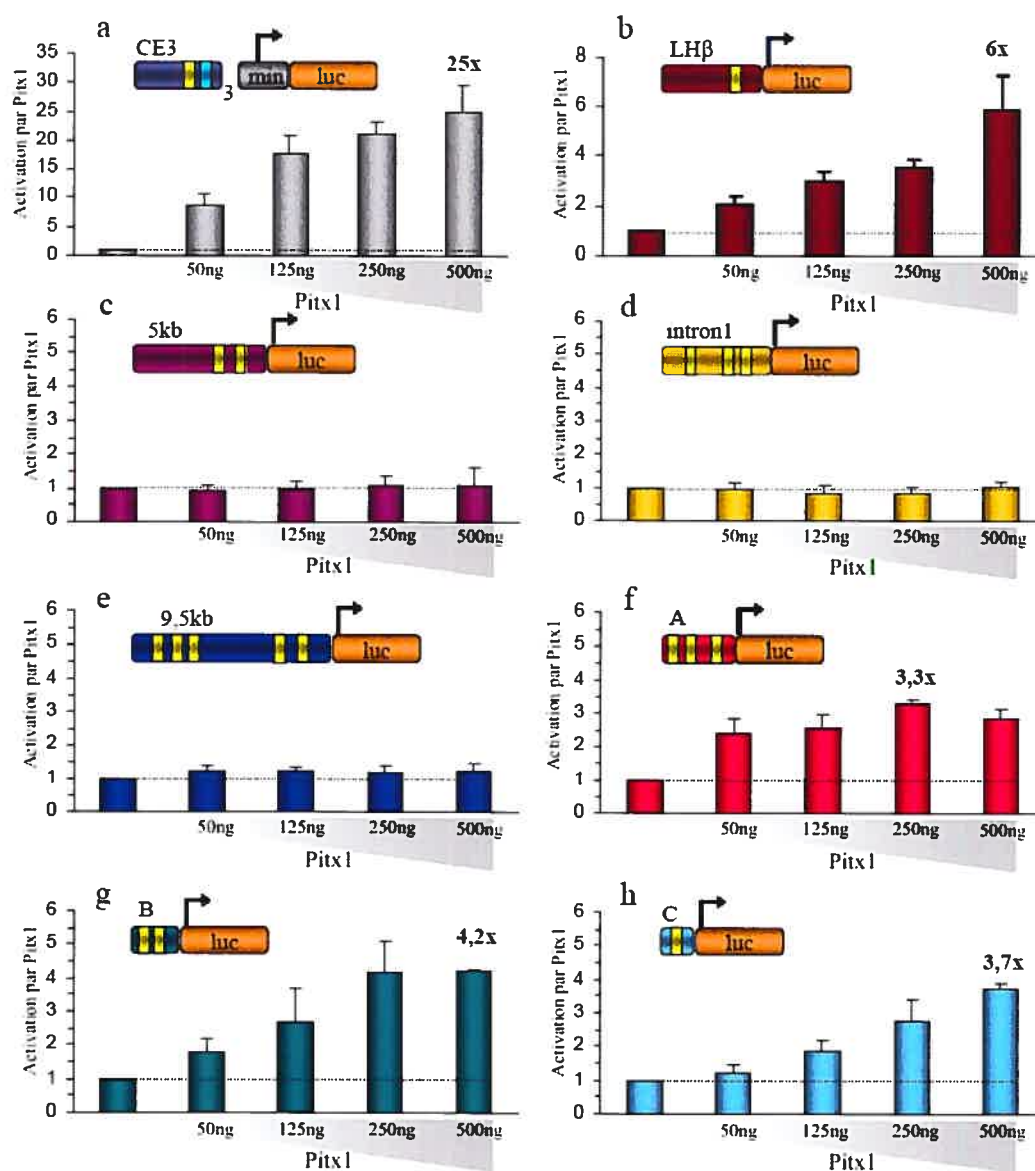


Figure 3.11: Activité des régions clonées du locus *Tbx4* en transfection:

La partie centrale trimérisée (CE3)₃ devant le promoteur minimal de la POMC (a), contenant un site Pitx1, et le promoteur de la LHβ, qui contient également un site Pitx1 servent de contrôle positif (ces vecteurs ont déjà été caractérisés). Effet de doses croissantes de Pitx1 sur les différentes régions conservées contenant des sites Pitx1 et qui ont été clonées en amont du gène luciférase dans le vecteur pxp2 (c à h). Seules 3 courtes régions situées à ~ -9kb (région A (f)) et dans l'intron 3 (région B (g) et région C (h)) semblent répondre faiblement à Pitx1, tandis que le promoteur (autant le 5 kb (c) que le 9,5 kb (e)) et l'intron 1 (d) ne répondent pas. Les transfections ont été effectuées dans des cellules hétérologues L, qui n'expriment pas de *Pitx1*.

région promotrice de 5 kb. Par contre, il n'est pas plus actif lorsqu'on rajoute du Pitx1 (**figure 3.11d**, p.90).

Parmi les trois régions qui répondent à Pitx1, on retrouve la région A qui fait 1,2 kb et qui se situe à ~ 9 kb de l'initiation. Cette région contient trois sites potentiels pour Pitx1. Son activité est relativement élevée, avec près de 7500 RLU de taux de base. De plus, cette construction est activée environ 3 fois par Pitx1 (**figure 3.11 f**, p.90). Par contre, lorsque cette région est clonée dans le contexte du promoteur long de 9,5 kb (**figure 3.11 e**, p.90), Pitx1 n'est plus capable d'activer via cette région. De plus, ce promoteur long n'est pas plus actif que le promoteur court de 5 kb (~750 RLU pour le 9,5 kb comparé au 1000 RLU pour le 5 kb), ce qui représente un taux de base beaucoup moins élevé que celui de la région A seule (7500 RLU).

Par ailleurs, deux autres courtes régions provenant de l'intron 3, les régions B et C, sont également activables par Pitx1. La région B est constituée de 625 pb extrêmement conservées (entre 75 et 90%) contenant deux sites Pitx1 conservés. Ce segment est activable près de 4 fois par Pitx1 (**figure 3.11 g**, p.90) et son taux de base ressemble à celui de la région A (~ 7000 RLU). La région C consiste en 400 pb (entre 50 et 80% d'homologie) qui contient également un site potentiel pour Pitx1. Cette région peut également être activée un peu moins que 4 fois par Pitx1 (**figure 3.11 h**, p.90). Cette construction est la plus active des trois régions activables, avec près de 20000 RLU de taux de base.

3.4 Conclusion

En conclusion, la génération des doubles-mutants *Pitx1/2* a permis de mettre en valeur un nouveau rôle pour les *Pitx* dans la croissance des membres postérieurs. Ce rôle vient s'ajouter à celui, déjà établi, dans la spécification de l'identité des membres postérieurs qui avait été mis en évidence par le simple ko *Pitx1*.

L'analyse des doubles-mutants a permis de montrer que l'effet sur la croissance est principalement médié via le contrôle de l'expression de *Fgf8* dans l'AER. Par contre, on ne comprend pas encore comment les *Pitx* participent à ce phénomène, eux qui ne sont exprimés que dans le mésenchyme des membres sous l'AER.

L'utilisation de la technique de CHIP pour permettre l'identification de gènes cibles pourrait permettre de mieux comprendre le rôle des *Pitx* dans les membres postérieurs. Par contre, il reste beaucoup de mise au point à faire afin de diminuer la quantité d'ADN non-spécifique, qui est quantitativement plus important que les cibles spécifiques.

Enfin, *Tbx4* est un des gènes qui semble en aval de *Pitx1*. C'est très intéressant de constater que certaines régions du locus *Tbx4* sont capables de répondre à *Pitx1* en transfection dans des cellules hétérologues. Ces régions pourraient permettre le contrôle de l'expression de *Tbx4* par *Pitx1* *in vivo*.

Chapitre 4

Discussion

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Analyse des embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}

Les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} ont un phénotype plus sévère que celui des embryons *Pitx1*^{-/-}. Dans ces derniers, tous les éléments squelettiques sont présents, mais leur identité est transformée. Par contre, dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}, il y a perte de plusieurs éléments squelettiques, dont le fémur (stylo-pode), le tibia (zeugopode) et le doigt #1 (le doigt le plus antérieur). Il ne reste qu'un seul os, la fibula, qui relie le bassin à l'autopode. Ceci indique que *Pitx1*, en plus d'être important pour la spécification de l'identité, est également important avec *Pitx2* pour la croissance des membres postérieurs.

Il y a perte d'éléments squelettiques dans ces mutants, des deux côtés, mais toujours avec une sévérité du phénotype plus grande à droite qu'à gauche, ce qui signifie que *Pitx2* doit être exprimé bilatéralement à un stade donné, durant le développement des membres. Pourtant, *Pitx2* était décrit comme étant exprimé de façon asymétrique dans le mll de gauche (Semina *et al.*, 1996; Gage *et al.*, 1997; Yoshioka *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999b). Premièrement, l'expression de *Pitx2* n'est pas augmentée en absence de *Pitx1*. Ensuite, sur la figure 7 de l'article Marcil *et al.*, 2003 (en annexe I, p.XIX), on voit que *Pitx1* et *Pitx2* sont co-exprimés dans le mll, des deux côtés, très tôt, entre 7 et 15 somites (e8,5-9), bien avant l'apparition des bourgeons des membres, qui se fait vers 27-30 somites (e9,5-10). Même à ce stade, l'expression de *Pitx2* est plus importante du côté gauche. Qu'est-ce qui peut bien se passer de si important dans cet intervalle de temps bien précis pour le développement des membres? Cette co-

expression très précoce pourrait révéler une période où les *Pitx* jouent un rôle essentiel soit dans la croissance, soit dans la détermination d'un nombre suffisant de cellules pour former les bourgeons des membres.

Plus tard, *Pitx2* n'est exprimé que dans les myoblastes des membres, mais pas dans le mésenchyme. Les souris *plotch* ont démontré que les muscles n'étaient pas nécessaires ni à la croissance des bourgeons des membres, ni au développement squelettique de ceux-ci (ces souris ont une mutation dans le gène *Pax3*, bloquant ainsi la migration des myoblastes, ce qui résulte en une absence de muscles dans les membres) (Franz *et al.*, 1993; Goulding *et al.*, 1993; Bober *et al.*, 1994; Goulding *et al.*, 1994; Daston *et al.*, 1996). Pour s'assurer que cette expression musculaire de *Pitx2* ne contribue pas au phénotype, il faudrait obtenir des embryons *plotch ; Pitx1^{-/-}* et étudier leur phénotype osseux, pour s'assurer qu'il n'est pas comme les souris *Pitx1^{-/-} ; Pitx2^{+/-}*.

La principale anomalie moléculaire observée dans les embryons *Pitx1^{-/-} ; Pitx2^{+/-}* est le retard dans l'expression précoce de *Fgf8* dans l'AER. *Fgf8* est un des Fgfs capable à lui seul de remplacer la fonction de l'AER (Mahmood *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1996). On sait depuis longtemps que l'AER est une structure essentielle au développement des membres, puisque les expériences d'embryologie chez le poulet ont montré que l'ablation chirurgicale de l'AER bloque la croissance des membres (Saunders, 1948; Todt *et al.*, 1984). Dépendant du moment de la chirurgie, ceux-ci sont plus ou moins tronqués dans l'axe P/D. Plus récemment, l'importance de l'expression de *Fgf8* aux stades très précoces du développement des membres a été démontrée par les différentes expériences de perte de fonction chez la souris. Tout d'abord, le simple ko conditionnel de *Fgf8* dans l'AER a

des défauts importants de croissance des membres, surtout au niveau du segment proximal (stylopode) (Lewandoski *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2000b). Ces embryons ont des phénotypes différents dans les membres antérieurs et dans les membres postérieurs parce que l'allèle Cre utilisée (*Msx2_Cre*) est exprimée très tôt dans les membres postérieurs, créant ainsi un ko complet, mais un peu trop tard dans les membres antérieurs (Lewandoski *et al.*, 2000). Cette situation permet d'étudier l'importance de l'expression précoce de *Fgf8*. Au niveau des membres postérieurs, le phénotype est caractérisé par des bourgeons plus petits, la perte du fémur (stylopode) et du doigt #1. Par contre, ces embryons ont un zeugopode presque normal (Lewandoski *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2000b). Au niveau des membres antérieurs, le stylopode, (l'humérus) est présent, mais hypoplasique. La présence très tôt de *Fgf8*, même de façon transitoire, est suffisante dans les membres antérieurs pour permettre l'apparition du segment proximal. L'importance de *Fgf8* semble venir du fait qu'il est le seul *Fgf* à être exprimé au moment de l'initiation de l'AER (de 27 à 33 somites dans les membres postérieurs), après quoi *Fgf4* devient exprimé (Lewandoski *et al.*, 2000)). Aux stades plus tardifs, ce dernier semble compenser pour la perte de *Fgf8*; les embryons *Fgf4*^{-/-};*Fgf8*^{-/-} dans l'AER ayant un blocage complet de croissance des membres postérieurs (Sun *et al.*, 2002; Boulet *et al.*, 2004). Nos résultats viennent confirmer l'importance de l'expression précoce de *Fgf8* pour le développement du stylopode, puisque les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} n'expriment pas *Fgf8* précocement, et le fémur ne se développe pas. Par contre, les effets sur l'expression de *Fgf8* ne peuvent être qu'indirects, puisque les *Pitx* sont exprimés uniquement dans le mésenchyme des membres, et non dans l'ectoderme.

Ces résultats argumentent en faveur du modèle de pré-spécification des cellules dans les trois segments stylo-pode, zeugopode et autopode, puisque le segment du stylo-pode est absent, tandis que l'autopode et le zeugopode sont relativement normaux. L'AER étant intact et la prolifération des cellules du mésenchyme n'étant pas affectée dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (voir **figure 3.3 a à d**, p.67), les résultats sont donc difficilement conciliables avec le modèle de la PZ. Les cellules précurseur du stylo-pode pourraient plutôt ne pas être spécifiées, ou ne pas proliférer à cause de l'absence de *Fgf8* dans l'AER à ce moment-là, ou mourir si elles se situent dans la zone proximale d'apoptose (voir **figure 3.3 e et f**, p.67).

Fgf10 est exprimé assez tôt dans le mll, spécifiquement où les bourgeons vont émerger (Ohuchi et al., 1997). Le rôle principal de *Fgf10* semble être d'induire l'expression de *Fgf8* dans les cellules qui formeront l'AER (Min et al., 1998; Sekine et al., 1999; Kawakami et al., 2001). Dans les embryons *Fgf10*^{-/-}, l'expression de *Fgf8* n'est jamais initiée, et les bourgeons des membres ne poussent pas (Min 1998, Sekine 1999). Le retard dans l'expression de *Fgf8* pourrait logiquement venir d'une absence ou d'un retard dans l'expression de *Fgf10*, et comme la co-expression des *Pitx* a lieu très tôt, il serait plausible que ceux-ci participent au maintien de son expression. Par contre, dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}, il n'y a pas de différence significative dans l'expression précoce de *Fgf10*, vers 25 et 27 somites, tout juste avant et pendant l'initiation normale de *Fgf8* (voir **figure 3.2**, p.65). Donc, le retard dans l'initiation de *Fgf8* ne semble pas relié à un problème avec l'expression de *Fgf10*.

Fgf10 est le seul gène exprimé dans le mésenchyme et connu pour participer à l'initiation de l'expression de *Fgf8* dans l'ectoderme. Comment les *Pitx* peuvent-ils contribuer à l'initiation de *Fgf8* dans l'AER, eux qui ne sont exprimés que dans le mésenchyme des membres? Dans nos mutants, soit *Fgf10* ne parvient pas à signaler normalement à l'ectoderme, même s'il est bien exprimé, soit la signalisation en amont de *Fgf10* dans l'AER est incorrecte. Une hypothèse serait que les *Pitx* participent à la signalisation Fgf en contrôlant l'expression de gènes qui aident ou qui contribuent positivement à cette voie de signalisation, comme des co-facteurs. On sait que les Fgfs ont besoin d'interagir avec des composantes de la matrice extracellulaire, comme l'héparane sulfate, qui aide à l'interaction entre le Fgf et son récepteur.

La première possibilité implique que *Fgf10* ne parvienne pas à signaler normalement jusqu'à l'ectoderme. Peut-être que son expression est intacte en ARNm, mais que la protéine ne l'est pas. Par contre, ceci est peu plausible puisque l'expression de *Fgf8* redevient normale par la suite, ce qui implique que *Fgf10* doit être éventuellement fonctionnel. De plus, les *Pitx* n'ont jamais été impliqués dans des processus post-traductionnels. On pourrait s'assurer de l'intégrité de la protéine par western blot sur du mésenchyme de membres mutants. On pourrait également vérifier si la signalisation en aval de *Fgf10* est intacte. On sait que les Fgfs signalent via les FgfRs, des récepteurs à tyrosine kinase qui activent la voie MapK (Wilkie et al., 2002). Dans l'AER, le récepteur *FgfR2* semble médier l'effet de *Fgf10*, puisque le ko de ce récepteur est une phénocopie de celui de *Fgf10* (Xu et al., 1998). Il n'existe cependant pas d'anticorps qui puisse reconnaître la forme activée (phosphorylée) de ce récepteur. Par contre, son expression pourrait être vérifiée dans nos mutants. L'activation de ce

récepteur pourrait également être étudiée, notamment en regardant si la voie MapK est activée dans l'AER. Il existe un anticorps double-phospho Erk1-2 qui fonctionne bien en immunohistologie autant en coupe qu'en whole-mount qui pourrait être utilisé (Corson et al., 2003). Par contre, il faut savoir que la voie Pi3K (Akt) a aussi été décrite en aval des Fgfs, mais l'implication de cette autre voie au cours du développement des membres n'est pas connue (Dudley *et al.*, 2002;Eblaghie *et al.*, 2003;Kawakami *et al.*, 2003).

Une autre façon de s'assurer que *Fgf10* est capable de signaler à l'AER serait d'étudier ce qui se passe en aval de sa signalisation dans l'ectoderme. On sait que la voie Wnt se situe en aval du récepteur de *Fgf10* dans l'AER (Kengaku *et al.*, 1998;Barrow *et al.*, 2003). La signalisation *Wnt3/β-caténine* médie l'induction de *Fgf8* par *Fgf10*. Récemment, l'importance primordiale de WNT3 a été mise en lumière par la découverte de mutations dans ce gène causant une malformation humaine appelée *tetra amelia* caractérisée par une absence totale des quatre membres (Niemann et al., 2004). De plus, les embryons qui n'expriment pas la β -caténine spécifiquement dans l'AER n'expriment pas non plus *Fgf8* (dans les membres postérieurs) et ce, sans que l'expression de *Fgf10* ne soit affectée (McQueeney et al., 2002). Le gène *Sp8* est une des cibles de Wnt3 dans ce processus (Kawakami et al., 2004). L'expression de *Sp8*, de *Wnt3*, ainsi que la localisation nucléaire de la β -caténine devraient donc être vérifiés dans nos mutants.

Les *Pitx* ont déjà été impliqués dans certains phénomènes de croissance, notamment dans l'hypophyse. Les embryons *Pitx2*^{-/-} ont une poche de Rathke hypoplasique et autant *Pitx1* que *Pitx2* peuvent participer à ce processus où ils sont partiellement redondants (voir **figure 1.6**, p.39) (Suh et al., 2002). Ils contrôlent

l'expression du gène *Hesx1*, une homéoprotéine essentielle pour la croissance de l'hypophyse (Suh et al., 2002). D'autres études ont également relié *Pitx2* avec la croissance via la signalisation de la voie Wnt/ β -caténine (Kioussi et al., 2002). *Pitx2* agirait en aval de la voie Wnt, un peu comme les facteurs de transcription Lef/Tcf, en interagissant avec la β -caténine sur certains promoteurs de gènes qui contrôlent la croissance, comme celui de la *cyclineD2* (Kioussi et al., 2002).

Dans les membres, le phénotype des embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} se rapproche, sur plusieurs aspects, à celui des embryons *Fgf8*^{-/-}. C'est évident au niveau de la perte de certains éléments squelettiques, mais également au niveau de la réduction de la grosseur des bourgeons des membres, qui sont beaucoup plus petits, et ce, dès leur apparition. L'analyse du niveau de prolifération indique que ce phénomène n'est pas relié à une diminution de la prolifération des cellules du mésenchyme des bourgeons, autant dans nos mutants (voir **figure 3.3 a à d**, p.67) que dans les embryons *Fgf8*^{-/-} (Lewandoski et al., 2000), et même dans les embryons *Fgf4*^{-/-};*Fgf8*^{-/-} (Sun et al., 2002). Dans ces derniers, la prolifération a été étudiée tout au long du développement des membres, et même au moment de l'initiation (vers 28 somites), il n'y a pas de différence avec les embryons de type sauvage. Dans nos mutants, la prolifération n'a été étudié qu'à un seul stade, à \sim e10,5-11, au moment où les bourgeons sont déjà bien formés (voir **figure 3.3 a à d**, p.67). Il serait intéressant de vérifier, notamment au stade de l'initiation, si la prolifération est également inchangée comme dans les embryons *Fgf8*^{-/-}.

L'apparition d'une zone d'apoptose dans la partie proximo-dorsale des bourgeons à e10,5-11 (voir **figure 3.3 e,f**, p.67) concorde également avec les résultats obtenus dans les embryons *Fgf8*^{-/-} (Lewandoski *et al.*, 2000) et dans les embryons *Fgf4*^{-/-};*Fgf8*^{-/-} (Sun *et al.*, 2002). Le même phénomène a été rapporté dans les embryons *FgfR2b*^{-/-} (Revest *et al.*, 2001). Cette zone d'apoptose plutôt tardive semble donc directement reliée au retard d'expression de *Fgf8* dans l'AER des embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}. Par contre, cette zone d'apoptose est beaucoup moins importante que dans les embryons *Fgf4*^{-/-};*Fgf8*^{-/-}. Nous n'avons pas fait une étude détaillée à différents stades du développement, mais dans les doubles-ko *Fgf4/8*, cette zone d'apoptose apparaît vers 34 somites (~ e10,5), après l'initiation des membres. Dans ces embryons, elle est localisée au centre dans l'axe A/P. Nous avons observé l'apoptose environ au même stade de développement, mais il est difficile d'évaluer la localisation exacte de cette zone dans l'axe A/P, avec les différentes coupes étudiées.

Donc, les bourgeons des membres dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} apparaissent, dès le tout début, plus petits et plus étroits que ceux des embryons de type sauvage, et ce phénotype ne semble pas vraiment relié à l'apoptose observée plus tardivement, ni à un problème de prolifération. Par contre, ce problème semble intimement lié avec le retard d'expression de *Fgf8* dans l'AER. Donc, les *Pitx* pourraient ne pas être requis de façon autonome dans chaque cellule pour permettre leur survie ou leur prolifération, comme ça semble être le cas dans l'hypophyse. Leur rôle dans la croissance serait plutôt de permettre indirectement l'initiation de l'expression de *Fgf8* dans l'AER.

Par ailleurs, tous les marqueurs postérieurs étudiés montrent que les bourgeons sont plus étroits, à cause d'une perte de mésenchyme antérieur. Ce phénomène n'est pas relié à une absence de polarité A/P, puisque *Gli3* est exprimé normalement dans la partie antérieure des bourgeons (voir **figure 3.4 a à c**, p.69), et *Shh* et *dHand* dans la partie postérieure (voir **figure 5 b et e**, **Annexe I**, p.XIX). Par contre, la proportion de mésenchyme postérieur est plus élevée que dans les embryons contrôles.

Cette perte de mésenchyme antérieure a deux conséquences principales. Tout d'abord, elle corrèle avec la perte de certains éléments squelettiques d'origine antérieure (tibia, doigt #1). Ceci concorde avec des expériences de chirurgies où on enlevait la moitié antérieure du bourgeon, ce qui résultait en la perte d'éléments squelettiques antérieurs comme les doigts antérieurs, le radius (l'équivalent du tibia), ainsi que la partie proximale de l'humérus (stylo-pode) (Warren A.E., 1934;Saunders, 1948). De plus, la surexpression de *dHand* dans la partie antérieure résulte également en la perte du tibia (qui est un élément antérieur) (Charite et al., 2000).

En ce qui concerne la signalisation D/V, l'expression de *Lmx1b*, exprimé normalement dans le mésenchyme dorsal (Riddle *et al.*, 1995;Vogel *et al.*, 1995), est inchangée dans les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (voir **figure 3.4 d à f**, p.69). Même si dans certains cas, l'axe D/V et l'initiation de l'AER sont reliés (surtout via la voie des BMPs) (Ahn *et al.*, 2001;Pizette *et al.*, 2001), il y a plusieurs résultats qui montrent que ce sont des processus bien séparés. Donc, tout porte à croire que les *Pitx* ne jouent aucun rôle dans l'établissement de la polarité D/V.

Le seul embryon obtenu qui n'exprime ni *Pitx1* ni *Pitx2* a un phénotype beaucoup plus sévère que les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}. Ces derniers ont une fibula, qui relie le bassin à l'autopode, qui est morphologiquement plutôt normale. La présence d'une seule copie du gène *Pitx2* semble suffisante pour permettre le développement de ces structures, puisque lorsqu'il n'y a pas du tout de *Pitx1* ni de *Pitx2*, il y a un arrêt presque complet de la croissance des bourgeons des membres postérieurs (voir **figure 3.5**, p.72). Cette importance de *Pitx2* ne devient évidente que lorsque *Pitx1* est absent, puisque dans les simples ko *Pitx2*, il n'y a aucun phénotype apparent au niveau des membres. Il est intéressant de noter que dans la partie antérieure de l'embryon, au niveau de l'hypophyse, il y a aussi une redondance entre ces deux gènes (**figure 1.6** dans l'**introduction**, p.39) (Suh et al., 2002). Les *Pitx* sont donc importants pour la croissance et la formation des bourgeons des membres postérieurs et, la sévérité du phénotype est dose dépendante. Enfin, il serait important de vérifier que le phénotype observé est bien indépendant du contrôle de l'expression de *Fgf10* en vérifiant son expression dans un embryon de ce génotype.

Le phénotype de cet embryon est intrigant car il est encore asymétrique, le côté gauche étant moins affecté que le droit. L'asymétrie dans la pénétrance du phénotype, apparue dans le ko *Pitx1*, a toujours été attribuée à la compensation par *Pitx2* dans le mlI de gauche. Une autre molécule est sans doute exprimée de façon asymétrique et coopère avec les *Pitx* pour permettre la croissance des membres postérieurs. Il est connu que l'expression de la *connexine43* débute de façon asymétrique dans l'AER (Meyer et al., 1997). Cette protéine fait partie des jonctions intercellulaire, importantes dans différents processus de signalisation et possiblement impliquées dans la croissance et la

spécification des membres. Le rôle exact de cette molécule n'est, par contre, pas connue puisque le ko de ce gène n'a pas de phénotype au niveau des membres (Reaume et al., 1995). Aussi, l'initiation de l'expression de *Fgf8* dans l'AER se fait souvent de façon asymétrique, même dans les embryons de type sauvage. Ceci indiquerait que intrinsèquement, l'initiation des bourgeons des membres se fait de façon asymétrique, sans que *Pitx2* ne soit nécessairement impliqué.

4.2 Recherche de gènes cibles

Pitx1 joue plusieurs rôles au cours du développement des membres postérieurs. En plus du rôle dans la croissance, mis en évidence par les doubles-mutants *Pitx1/2*, les simples mutants *Pitx1* avaient déjà établis l'importance de ce gène pour la spécification de l'identité des membres postérieurs (Szeto et al., 1999; Lanctot et al., 1999b). Ce phénomène de spécification d'identité est, encore aujourd'hui, très mal compris. À part peut-être *Tbx4* (quoi que son rôle dans la spécification a été récemment remis en question (Minguillon et al., 2005)), et certains *Hox* qui sont exprimés spécifiquement dans chaque type de membres (Peterson et al., 1994; Nelson et al., 1996; Cohn et al., 1997), il n'y a pas vraiment de gènes impliqués dans ce processus. Certaines approches plus globales ont été utilisées afin de mieux comprendre ce phénomène. Par exemple, une première tentative, en utilisant la technique de SAGE, pour comparer les gènes exprimés dans le mésenchyme des membres antérieurs et celui des membres postérieurs, n'a pas permis de découvrir de nouveaux gènes différentiellement exprimés, régulant possiblement l'identité (Margulies et al., 2001). Peut-être que cela signifie que les différences entre les membres antérieurs et les membres postérieurs sont trop subtiles, que ces gènes sont trop faiblement exprimés pour être détectés par cette méthode, ou encore qu'elles sont dues à

des changements spatio-temporels dans l'expression de gènes présents dans les deux types de membres. Ce phénomène semble donc extrêmement difficile à étudier. Pour cette raison, ainsi qu'à cause du nombre très limité d'embryons *Pitx1*^{-/-}; *Pitx2*^{+/-} disponibles, nous avons décidé d'adopter une approche globale différente, la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), afin d'essayer de trouver des gènes cibles de *Pitx1* dans les membres postérieurs.

L'avantage de cette approche est qu'elle permet de travailler avec des embryons de type sauvage. De plus, il y a la possibilité de découvrir de nouvelles cibles, des gènes inconnus qui seraient absents des puces. Enfin, cette approche n'est pas biaisée par rapport au niveau d'expression de chaque gène, qui doit être ni trop élevé, ni trop faible dans les expériences de puces à ARNm, puisque les régions régulatrices sont toutes présentes en 2 copies sur chacun des chromosomes.

Une des grandes contraintes de la technique de ChIP est la capacité de l'anticorps utilisé à immunoprécipiter la protéine dans un contexte où les protéines sont fixées entre elles et avec l'ADN par des liens covalents suite au traitement avec le formaldéhyde. Ceci peut entraîner le masquage ou la dénaturation de certains épitopes reconnus par l'anticorps. Si celui-ci reconnaît mal la protéine d'intérêt, l'enrichissement spécifique des cibles ne sera pas assez élevé et celles-ci seront perdues parmi l'ADN non-spécifique. Nous avons donc produit des anticorps α -*Pitx1* dirigés contre la protéine entière afin de maximiser les chances que ceux-ci puissent reconnaître plusieurs épitopes différents situés à la surface de la protéine.

Les anticorps que nous avons obtenus ne sont pas spécifiques à *Pitx1*, mais reconnaissent les trois membres de la famille *Pitx* (voir **figure 3.6 a et b**, p.75). Cette absence de spécificité n'est pas surprenante vu la taille de l'épitope injecté, et l'homologie existante entre les trois *Pitx*, surtout dans l'homéodomaine (voir **figure 1.3**, p.28) (Drouin et al., 1998a). Par contre, ce n'est pas vraiment un problème pour l'utilisation qu'on voulait en faire, puisque *Pitx1* est exprimé très fortement dans le mésenchyme des membres postérieurs, et que *Pitx2* est capable de compenser partiellement pour la perte de *Pitx1* (Suh et al., 2002; Marcil et al., 2003), ce qui signifie qu'il est capable de réguler les mêmes gènes. Quant à *Pitx3*, il n'est exprimé que dans les myoblastes et les cellules musculaires qui ont migré dans les membres, donc dans un type cellulaire bien défini (Coulon et al, manuscrit en préparation).

Avant de tester si ces anticorps sont efficaces en ChIP, il fallait s'assurer qu'ils étaient efficaces en IP. Ces anticorps sont en effet capables d'immunoprécipiter la protéine endogène efficacement à partir de cellules en culture (voir **figure 3.7 a et b**, p.77). Malheureusement, il n'existe pas de bon modèle de cellules de mésenchyme de membres postérieurs en culture. Il faut donc partir directement d'une grande quantité d'embryons de souris à chaque expérience, et ces IP semblent moins efficaces (voir **figure 3.7 c**, p.77). Possiblement que les conditions de fixation et d'extraction, directement à partir des bourgeons de membres, pourraient être optimisées.

Pour les expériences de ChIP, j'ai tout d'abord testé les conditions sur les cellules en culture. On sait que *Pitx1* a une activité de liaison à l'ADN qui ressemble à celle de la protéine bicoïde de drosophile, qui lie la séquence TAATCC de 6 pb (Hanes et al.,

1989; Treisman *et al.*, 1989). J'ai tout d'abord choisi d'utiliser les cellules AtT20 parce que le rôle de Pitx1 dans ces cellules, sur le promoteur de la POMC, était bien caractérisé. Pitx1 active la transcription de POMC en se liant à un site TAAGCC situé dans la partie centrale du promoteur (Lamonerie *et al.*, 1996). Cette région peut donc nous servir pour tester, par PCR, l'enrichissement général des cibles de Pitx dans ces cellules. Aussi, en commençant par trouver des cibles dans des cellules en culture, même si elles sont d'origine hypophysaire, ceci pourrait permettre de valider la technique et de trouver des cibles de Pitx1 ubiquitaires, et donc, possiblement exprimées également dans les membres. Il est essentiel de connaître au moins une cible de Pitx1 dans les membres pour pouvoir mettre les conditions de ChIP au point. Par contre, les enrichissements de POMC suite aux ChIP Pitx1 dans les cellules AtT20 n'étaient pas tellement élevés (voir **figure 3.8 a**, p.80). Même en changeant de type cellulaire et en utilisant les cellules α -T3, qui expriment plus fortement Pitx1, les enrichissements sur l' α -GSU n'étaient pas tellement plus élevés (voir **figure 3.8 c**, p.80). Pourtant, on sait que Pitx1 lie fortement l'ADN. Il devrait donc se retrouver sur ces gènes cibles dans la majorité des cellules. Par contre, la fixation peut introduire un biais vis-à-vis la disponibilité des épitopes, et celle-ci peut être variable d'un locus génomique à un autre. Aussi, les facteurs de transcription se retrouvent directement liés à l'ADN, et les épitopes peuvent être masqués par des interactions que l'on suppose nombreuses non seulement avec l'ADN, avec d'autres facteurs de transcription, mais également avec les co-facteurs qui habituellement sont très volumineux. Il aurait été intéressant de pouvoir tester l'enrichissement d'autres cibles de Pitx1 dans ces cellules. La POMC et l' α -GSU codent pour des hormones ou des sous-unités hormonales et sont donc fortement exprimées dans ces cellules, et les sites Pitx dans ces promoteurs sont relativement près de l'initiation. Il est possible que dans ces

cas, la protéine Pitx1 soit masquée par toute la machinerie transcriptionnelle et que d'autres cibles auraient pu être plus enrichies que celles qu'on a testé.

L'utilisation des doubles-ChIP m'a permis d'obtenir de meilleurs enrichissements dans les cellules α -T3. Cette technique permet d'éliminer considérablement le bruit de fond, mais beaucoup de matériel est perdu, et il reste encore trop de bruit de fond pour cloner directement l'ADN recueilli. Le principal problème de la technique de ChIP est la quantité incroyable de bruit de fond, d'ADN qui colle non-spécifiquement aux billes par rapport à l'ADN qui correspond aux vraies cibles. Les cibles spécifiques, même si elles sont bien enrichies, correspondent à une très faible fraction de tout l'ADN recueilli. Cela met en lumière la nécessité de développer une technique pour éliminer le non-spécifique, c'est pourquoi plusieurs personnes travaillent sur ce sujet au laboratoire.

Enfin, un autre des problèmes important de cette technique est la façon avec laquelle on identifie les gènes cibles. On se base principalement sur la proximité des séquences codantes par rapport à la région immunoprécipitée et séquencée afin d'identifier les gènes cibles. De plus en plus, il y a des exemples de régions régulatrices qui se situent très loin des gènes qu'elles régulent, avec des « enhancers » parfois à des millions de pb de leur gène cible (Sagai et al., 2004). Dans ces cas-là, c'est impossible de trouver ces cibles par ChIP. De plus, s'il y a plusieurs gènes dans une même région, ça devient difficile de définir la vraie cible. Ceci met en évidence l'importance d'avoir des expériences complémentaires, comme les puces à ARNm, qui peuvent nous indiquer rapidement si une cible varie en absence du facteur de transcription en question.

La conclusion des expériences de ChIP que j'ai effectuées est que les anticorps α -Pitx1 que nous avons faits ne sont pas très efficaces. Une des façons de contourner ce problème serait d'ajouter un épitope artificiel à Pitx1 et de faire des lignées cellulaires stables exprimant cette protéine étiquetée. Les étiquettes sont normalement très fonctionnelles en IP. Par contre, cette solution est loin d'être parfaite. Premièrement, les clones obtenus exprimeraient toujours la protéine endogène; il y aurait donc constamment une compétition entre les deux sur chaque site de liaison sur l'ADN. Si l'épitope artificiel diminue légèrement la capacité de liaison à l'ADN ou l'interaction avec des co-régulateurs, la protéine endogène sera favorisée. Aussi, l'expression de cette protéine a pour effet d'augmenter la quantité totale de Pitx1, ce qui peut avoir des effets non désirés. On sait que la surexpression de Pitx1 affecte la croissance de certaines cellules. La surexpression pourrait également forcer la protéine à occuper des sites sur l'ADN qui ne le sont pas en situation normale. Finalement, il ne faut pas oublier que mon but était d'utiliser cette technique afin d'étudier les rôles de Pitx dans les membres. Ceci impliquerait donc de faire des souris transgéniques, et le problème de surexpression du transgène demeure présent.

4.3 *Tbx4*, gène cible potentiel de *Pitx1*

Tbx4 est le seul autre gène avec *Pitx1* à être exprimé de façon spécifique dans tout le mésenchyme des membres postérieurs, et son expression semble débiter peu après celle de *Pitx1* (Lanctot *et al.*, 1997; Gibson-Brown *et al.*, 1998b). Dans les embryons *Pitx1*^{-/-}, l'expression de *Tbx4* est grandement diminuée (Szeto *et al.*, 1999; Lanctot *et al.*, 1999b). Aussi, des expériences de gain de fonction chez le poulet ont montré que la surexpression de *Pitx1* dans les membres antérieurs induit l'expression de *Tbx4*, et

ultimement la transformation partielle des ailes en pattes (Ohuchi *et al.*, 1998; Gibson-Brown *et al.*, 1998a; Rodriguez-Esteban *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999). Tous ces résultats semblent impliquer *Pitx1* dans une cascade transcriptionnelle en amont de *Tbx4*.

Est-ce que *Tbx4* est une cible directe de *Pitx1* dans le mésenchyme des membres postérieurs? Pour répondre à cette question, j'ai commencé par étudier le locus *Tbx4* par des moyens bioinformatiques. Dans les banques de données publiques, le gène *Tbx4* est composé de 8 exons, tous codants. Par contre, les banques d'EST (expressed sequence tags) contiennent un EST composé d'un exon situé en amont, et qui s'épisse avec les deux premiers exons de *Tbx4*. Celui-ci provient d'une banque de placenta, où *Tbx4* est normalement exprimé. Les résultats de RT-PCR que j'ai obtenus montrent que cet exon semble bien s'épisser avec le premier exon de *Tbx4*. Cet exon semble non-codant puisque tous les ATG présents sont en phase avec des codons stop. La découverte de cet exon est importante puisque le site d'initiation d'un gène nous permet de situer le promoteur. De plus, la majorité des cibles connues de *Pitx1* sont régulées via un site qui se situe dans le promoteur, assez près de l'initiation (Lamonerie *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1998). Je n'ai pas réussi, avec les techniques utilisées de RT-PCR et de 5' RACE, à déterminer précisément le site d'initiation de *Tbx4*. Par contre, j'ai identifié une région d'environ 400 pb qui semble le contenir. D'autres techniques pourraient être utilisées pour déterminer de façon plus précise où se situe le +1, comme par exemple la technique de protection à la RNase (de Groot *et al.*, 2000). Cette technique est très sensible et permet de trouver précisément le site d'initiation. Elle permet également de trouver, dans les cas où il y a plusieurs isoformes, les différentes extrémités 5' des transcrits. Pour *Tbx4*, il ne serait pas surprenant qu'il existe plusieurs isoformes, puisque le gène *Tbx5*, son plus

proche parent dans la famille des *Tbx*, code pour plus d'un isoforme. Par contre, ces isoformes proviennent plutôt d'épissage alternatif et non de l'utilisation de différents promoteurs et sites d'initiation.

L'analyse bio-informatique de la région de 400 pb qui semble contenir le site d'initiation de *Tbx4* n'a pas révélé la présence d'une boîte TATA ou d'un site d'initiation consensus. Il semble donc que ce soit un site d'initiation non-traditionnel. *Tbx4* se situe sur le chromosome 11 de souris, en tandem avec *Tbx2*. D'un point de vue évolutif, ces deux gènes proviendraient de la duplication d'un tandem ancestral qui aurait donné *Tbx2/Tbx4* et *Tbx3/Tbx5* (Agulnik *et al.*, 1996; Ruvinsky *et al.*, 1999). *Tbx4* et *Tbx5* sont donc très homologues, puisqu'ils ont une origine commune. Il est intéressant de noter que contrairement à *Tbx4*, *Tbx5* est exprimé spécifiquement dans tout le mésenchyme des membres antérieurs. L'organisation génomique de *Tbx5* a été déterminée de façon expérimentale. *Tbx5* contient un exon 1 non-codant, et son site d'initiation est également non-traditionnel, sans boîte TATA, et non reconnu par les programmes utilisés (Li *et al.*, 1997). Peut-être que cette caractéristique aurait été héritée du gène ancestral.

Ensuite, j'ai porté mon attention sur la conservation, dans le locus *Tbx4*, entre les séquences génomiques de souris et les séquences humaines. Une pression sélective est exercée, à travers les espèces, sur les séquences qui sont essentielles à la fonction d'un gène. Ainsi, la conservation se manifeste surtout dans les séquences codantes et dans les éléments de régulation transcriptionnelle. Le locus *Tbx4* contient plusieurs régions conservées, notamment la région correspondant au nouvel exon 1 que j'ai défini, qui est presque aussi conservé que les autres exons.

Parmi les régions conservées entre les séquences humaines et celles de souris, certaines d'entre elles contenaient des sites potentiels pour les Pitx. Le site de liaison des membres de la famille Pitx est composé de 6 pb, TAAT/GCC. Un site avec seulement 6 pb se retrouve, statistiquement, assez fréquemment dans le génome. Pour cette raison, je me suis concentrée uniquement sur les sites potentiels qui étaient situés dans des régions conservées. J'ai cloné cinq régions provenant du locus *Tbx4*, soit 5 kb de promoteur, l'intron 1, qui se situe entre le nouvel exon que j'ai déterminé et l'exon contenant l'ATG, ainsi que trois courtes régions situées, la première à ~ -9 kb en 5' et les deux autres à ~ +9 kb dans l'intron 3. Chacune de ces régions a un degré de conservation élevé, et contient un ou des sites potentiels conservés pour Pitx1.

Les résultats de transfection montrent que même si chacun des fragments clonés contient un site Pitx1 potentiel, ils ne répondent pas tous à des doses croissantes de vecteur d'expression codant pour *Pitx1* (voir **figure 3.11**, p.90). Ces expériences montrent aussi que les trois courtes régions clonées (A/B/C) sont capables d'être activées par Pitx1 (voir **figure 3.11 f, g et h**, p.90). Il est intéressant de noter que ces régions ont une activité de base non négligeable, même si le vecteur utilisé ne contient pas de promoteur minimum. Ceci pourrait s'expliquer par la présence d'un promoteur cryptique soit dans chacune de ces régions, soit dans le plasmide (pxp2), qui, en présence d'une forte activité « enhancer », permettrait l'activation de la transcription de la luciférase. Par ailleurs, il serait intéressant de voir si l'activation par Pitx1 peut être additive. Par exemple, si on clonait les deux régions de l'intron 3 ensembles, dans le même vecteur, est-ce que l'activation par Pitx1 pourrait être plus importante? La région A est également

activable par Pitx1. Par contre, lorsque cette région est clonée dans le contexte du promoteur de 9,5kb, Pitx1 n'est plus capable d'activer cette construction (voir **figure 3.11 e**, p.90). Une différence entre les deux constructions est la distance entre les sites Pitx1 situés dans la région A avec le site d'initiation de la transcription. Lorsque les sites sont plus éloignés, l'activation n'est plus efficace. Il serait intéressant de tester ces deux constructions (toutes les autres aussi d'ailleurs) dans un autre type cellulaire. Les cellules utilisées pour ces expériences étaient des cellules L, qui sont des fibroblastes de souris qui n'expriment pas Pitx1 (ni Tbx4 d'ailleurs). Peut-être qu'il manque, dans ces cellules, des (co)-facteurs permettant l'activation à distance, en temps que médiateur ou permettant le repliement correct de l'ADN. L'absence d'activation pourrait également provenir de séquences inhibitrices qui pourraient se trouver dans le promoteur de 9,5kb.

L'idéal serait de tester ces constructions, ainsi que la réponse à Pitx1, dans un type cellulaire qui exprime normalement *Tbx4*, mais aucun n'est décrit dans la littérature. Je pourrais tester ces constructions dans des cultures primaires de membres, pour voir si les résultats sont semblables. Le contexte cellulaire se rapprocherait alors plus de la réalité. L'étude dans un contexte cellulaire plus approprié pourrait permettre de clarifier ou de confirmer l'importance de chacune des régions clonées, car il y a peut-être des effets qu'on manque, ou qui sont beaucoup plus faibles en absence des co-facteurs appropriés. Je pourrais ainsi comparer l'activité de base de chacune des constructions, pour voir si celle-ci varie d'un type cellulaire à un autre. Dans des cellules hétérologues, l'intron1 est la région avec la plus grande activité de base, beaucoup plus élevée que celle du promoteur de 5kb. Il serait intéressant de vérifier si c'est la même chose dans d'autres

types cellulaires. Ceci pourrait indiquer qu'il existe plus d'un isoforme et que l'intron1 est en fait le promoteur de l'isoforme qui commence à l'ATG.

En outre, pour m'assurer que l'effet que je vois en transfection est bien spécifique, il serait important de muter le ou les sites *Pitx1* présents dans les régions qui répondent pour voir si cela fait perdre la réponse à *Pitx1*. Ceci pourrait aussi permettre d'identifier le ou les site(s) qui médie(nt) la réponse.

Pour s'assurer que les régions que j'ai clonées contribuent véritablement à l'expression de *Tbx4* dans le mésenchyme des membres postérieurs, il faudrait les tester en transgénique. Le grand avantage des transgéniques, c'est qu'on est sûr qu'il y a tous les facteurs nécessaires et importants pour l'expression dans la souris. Il serait intéressant de tester si les régions qui répondent à *Pitx1* sont suffisantes pour permettre l'expression dans les membres postérieurs, et si cette expression est perdue lorsque le ou les sites *Pitx* sont mutés. Peut-être que les régions plus grandes, mais qui ne sont pas activées par *Pitx1*, comme l'intron 1, qui est très conservé sur toute sa longueur, et qui est très actif en transfection, ou encore le promoteur de 9,5kb, pourrait également permettre l'expression. Il faut se rappeler que dans le ko *Pitx1*, l'expression de *Tbx4* est diminuée, mais il en reste quand même, ce qui montre que *Pitx1* n'est pas essentiel ou absolument requis pour l'expression de *Tbx4* dans les membres postérieurs. Par contre, ces régions pourraient participer à l'expression sans être nécessairement suffisantes à elles seules.

Ensuite, il serait intéressant de montrer que *Pitx1* est capable d'induire l'expression de *Tbx4*. Les expériences de surexpression chez le poulet ont montré que

l'induction de *Tbx4* est tardive, et serait possiblement restreinte aux cellules prolifératives. Est-ce que l'induction observée se situe dans les mêmes cellules? Un moyen de répondre à cette question serait d'utiliser les cellules provenant de cultures primaires de membres postérieurs d'embryons *Pitx1*^{-/-}. Ces cellules devraient exprimer moins de *Tbx4* que les cellules provenant d'embryons de type sauvage. Théoriquement, en ré-exprimant *Pitx1* dans ces cellules, l'expression de *Tbx4* devrait être augmentée. Les cultures primaires sont difficiles à transfecter par les méthodes traditionnelles, mais on pourrait utiliser des infections virales qui seraient sans doute plus efficaces. La cinétique d'expression de *Pitx1* et de *Tbx4* pourra être vérifiée par western blot, puisque nous avons des anticorps α -*Pitx1* et α -*Tbx4* qui fonctionnent très bien. Si l'induction de *Tbx4* se fait rapidement après celle de *Pitx1*, ceci pourrait indiquer que l'effet est direct. Une façon encore plus directe de vérifier si l'induction de *Tbx4* se fait dans la même cellule serait d'utiliser la technique de micro-injection pour rajouter du *Pitx1* dans une cellule en particulier, et vérifier par la suite par immunocytologie si *Tbx4* devient exprimé.

Finalement, la présence de *Pitx1* sur les régions génomiques que j'ai identifiées en transfection et qui semblent capables de médier l'activation, devrait être vérifiée par ChIP. J'ai tenté une fois cette expérience, sans succès, mais les conditions de ChIP à partir de bourgeons de membres doivent être mises au point. Un résultat positif de ChIP viendrait prouver hors de tout doute que *Tbx4* est une cible transcriptionnelle directe de *Pitx1*.

En résumé, *Pitx1* participe à la spécification de l'identité des membres postérieurs, ainsi qu'au contrôle de la croissance de ces membres. Des rôles semblables

avaient été suggérés pour *Tbx4*. Par contre, une étude récente a remis en question le rôle de *Pitx1* dans la croissance et le rôle de *Tbx4* dans la spécification de l'identité postérieure (Minguillon et al., 2005). Les résultats que nous avons obtenus avec le double-mutant *Pitx1/2* sont assez probants en ce qui concerne l'importance des *Pitx* dans la croissance des membres postérieurs. De plus, les études qui portent sur les poissons « stickleback » ont montré que l'absence ou la diminution importante des nageoires pelviennes, l'équivalent des membres postérieurs, était liée principalement à une perte d'expression de *Pitx1* dans ces structures (Cole et al., 2003; Shapiro et al., 2004). Donc, dans ces études, *Pitx1* est le principal locus responsable de la perte des membres postérieurs, mais le locus *Tbx4*, tout comme celui de *Pitx2* d'ailleurs, sont également ressortis comme des locus contribuant faiblement au changement. D'ailleurs, l'expression de *Tbx4* est également absente dans la région pelvienne des poissons n'ayant pas de nageoire. Ces résultats renforcent l'idée que *Pitx1* pourrait jouer un rôle important dans la croissance des membres postérieurs et que ce rôle a été conservé dans les différentes espèces au cours de l'évolution. Ce rôle pourrait impliquer le contrôle de l'expression de *Tbx4*. De plus, on sait que *Pitx1* est capable d'interagir et de synergiser avec T-Pit, un membre de la famille des protéines à boîte T (Lamolet et al., 2001). *Pitx1* pourrait donc, en plus de contrôler l'expression de *Tbx4*, participer avec lui au contrôle de gènes cibles communs.

Bibliographie

Bibliographie

- Agarwal,P., Wylie,J.N., Galceran,J., Arkhitko,O., Li,C.L., Deng,C.X., Grosschedl,R., and Bruneau,B.G. (2003). Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development*, **130**, 623-633.
- Agulnik,S.I., Garvey,N., Hancock,S., Ruvinsky,I., Chapman,D.L., Agulnik,I., Bollag,R., Papaioannou,V., and Silver,L.M. (1996). Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion. *Genetics*, **144**, 249-254.
- Ahn,K., Mishina,Y., Hanks,M.C., Behringer,R.R., and Crenshaw,E.B. (2001). BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development*, **128**, 4449-4461.
- Altabef,M., Clarke,J.D.W., and Tickle,C. (1997). Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development*, **124**, 4547-4556.
- Arakawa,H., Nakamura,T., Zhadanov,A.B., Fidanza,V., Yano,T., Bullrich,F., Shimizu,M., Blechman,J., Mazo,A., Canaani,E., and Croce,C.M. (1998). Identification and characterization of the ARP1 gene, a target for the human acute leukemia ALL1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 4573-4578.
- Baek,S.H., Kiousi,C., Briata,P., Wang,D.G., Nguyen,H.D., Ohgi,K.A., Glass,C.K., Wynshaw-Boris,A., Rose,D.W., and Rosenfeld,M.G. (2003). Regulated subset of G(1) growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 3245-3250.
- Bamshad,M., Krakowiak,P.A., Watkins,W.S., Root,S., Carey,J.C., and Jorde,L.B. (1995). A Gene for Ulnar-Mammary Syndrome Maps to 12Q23-Q24.1. *Human Molecular Genetics*, **4**, 1973-1977.
- Bamshad,M., Le,T., Watkins,W.S., Dixon,M.E., Kramer,B.E., Roeder,A.D., Carey,J.C., Root,S., Schinzel,A., Van Maldergem,L., Gardner,R.J.M., Lin,R.C., Seidman,C.E., Seidman,J.G., Wallerstein,R., Moran,E., Sutphen,R., Campbell,C.E., and Jorde,L.B. (1999). The spectrum of mutations in TBX3: Genotype phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome. *American Journal of Human Genetics*, **64**, 1550-1562.
- Bamshad,M., Lin,R.C., Law,D.J., Watkins,W.S., Krakowiak,P.A., Moore,M.E., Franceschini,P., Lala,R., Holmes,L.B., Gebuhr,T.C., Bruneau,B.G., Schinzel,A., Seidman,J.G., Seidman,C.E., and Jorde,L.B. (1997). Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nature Genetics*, **16**, 311-315.
- Banerjee-Basu,S. and Baxevanis,A.D. (2001). Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic Acids Research*, **29**, 3258-3269.

Barrow, J.R., Thomas, K.R., Boussadia-Zahui, O., Moore, R., Kemler, R., Capecchi, M.R., and McMahon, A.P. (2003). Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes & Development*, **17**, 394-409.

Basson, C.T., Bachinsky, D.R., Lin, R.C., Levi, T., Elkins, J.A., Soultz, J., Grayzel, D., Kroumpouzou, E., Traill, T.A., Leblanc-Straceski, J., Renault, B., Kucherlapati, R., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (1997). Mutations in human cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nature Genetics*, **15**, 30-35.

Berthelsen, J., Kilstrup-Nielsen, C., Blasi, F., Mavilio, F., and Zappavigna, V. (1999). The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes & Development*, **13**, 946-953.

Bober, E., Franz, T., Arnold, H.H., Gruss, P., and Tremblay, P. (1994). Pax-3 Is Required for the Development of Limb Muscles - A Possible Role for the Migration of Dermomyotomal Muscle Progenitor Cells. *Development*, **120**, 603-612.

Bongers, E.M.H.F., Duijf, P.H.G., van Beersum, S.E.M., Schoots, J., van Kampen, A., Burckhardt, A., Hamel, B.C.J., Losan, F., Hoefsloot, L.H., Yntema, H.G., Knoers, N.V.A.M., and van Bokhoven, H. (2004). Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome. *American Journal of Human Genetics*, **74**, 1239-1248.

Boulet, A.M., Moon, A.M., Arenkiel, B.R., and Capecchi, M.R. (2004). The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Developmental Biology*, **273**, 361-372.

Boyd, K.E. and Farnham, P.J. (1999). Coexamination of site-specific transcription factor binding and promoter activity in living cells. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 8393-8399.

Briata, P., Ilengo, C., Corte, G., Moroni, C., Rosenfeld, M.G., Chen, C.Y., and Gherzi, R. (2003). The Wnt/beta-catenin -> Pitx2 pathway controls the turnover of Pitx2 and other unstable mRNAs. *Molecular Cell*, **12**, 1201-1211.

Burke, A.C., Nelson, C.E., Morgan, B.A., and Tabin, C. (1995). Hox Genes and the Evolution of Vertebrate Axial Morphology. *Development*, **121**, 333-346.

Buscher, D., Bosse, B., Heymer, J., and Ruther, U. (1997). Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by Gli3 in mouse limb development. *Mechanisms of Development*, **62**, 175-182.

Buscher, D. and Ruther, U. (1998). Expression profile of Gli family members and Shh in normal and mutant mouse limb development. *Developmental Dynamics*, **211**, 88-96.

Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L.A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R., and Blum, M. (1999). The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development*, **126**, 1225-1234.

- Capdevila, J. and Belmonte, J.C.I. (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **17**, 87-132.
- Capdevila, J., Tsukui, T., Esteban, C.R., Zappavigna, V., and Belmonte, J.C.I. (1999). Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Molecular Cell*, **4**, 839-849.
- Celli, J., Duijf, P., Hamel, B.C.J., Bamshad, M., Kramer, B., Smits, A.P.T., Newbury-Ecob, R., Hennekam, R.C.M., Van Buggenhout, G., van Haeringen, B., Woods, C.G., van Essen, A.J., de Waal, R., Vriend, G., Haber, D.A., Yang, A., McKeon, F., Brunner, H.G., and van Bokhoven, H. (1999). Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell*, **99**, 143-153.
- Chang, C.P., Jacobs, Y., Nakamura, T., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Cleary, M.L. (1997). Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 5679-5687.
- Chapman, D.L., Garvey, N., Hancock, S., Alexiou, M., Agulnik, S.I., Gibson-Brown, J.J., Cebra-Thomas, J., Bollag, R.J., Silver, L.M., and Papaioannou, V.E. (1996). Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Developmental Dynamics*, **206**, 379-390.
- Charite, J., McFadden, D.G., and Olson, E.N. (2000). The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development*, **127**, 2461-2470.
- Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K.C., Pepicelli, C.V., Gan, L., Lee, B., and Johnson, R.L. (1998). Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nature Genetics*, **19**, 51-55.
- Chen, H.X. and Johnson, R.L. (1999). Dorsoventral patterning of the vertebrate limb: a process governed by multiple events. *Cell and Tissue Research*, **296**, 67-73.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Harris, M.P., Simandl, B.K., Li, Y., Beachy, P.A., and Fallon, J.F. (2001). Manifestation of the limb prepatterning: Limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Developmental Biology*, **236**, 421-435.
- Christ, B., Jacob, H.J., and Jacob, M. (1977). Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anatomy and Embryology*, **150**, 171-186.
- Coates, M.I. (1994). The Origin of Vertebrate Limbs. *Development*, 169-180.
- Cohn, M.J., Izpisua-Belmonte, J.C., Abud, H., Heath, J.K., and Tickle, C. (1995). Fibroblast Growth-Factors Induce Additional Limb Development from the Flank of Chick-Embryos. *Cell*, **80**, 739-746.
- Cohn, M.J., Patel, K., Krumlauf, R., Wilkinson, D.G., Clarke, J.D.W., and Tickle, C. (1997). Hox9 genes and vertebrate limb specification. *Nature*, **387**, 97-101.

- Cohn, M.J. and Tickle, C. (1999). Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. *Nature*, **399**, 474-479.
- Cole, N.J., Tanaka, M., Prescott, A., and Tickle, C. (2003). Expression of limb initiation genes and clues to the morphological diversification of threespine stickleback. *Current Biology*, **13**, R951-R952.
- Colosimo, P.F., Peichel, C.L., Nereng, K., Blackman, B.K., Shapiro, M.D., Schluter, D., and Kingsley, D.M. (2004). The genetic architecture of parallel armor plate reduction in threespine sticklebacks. *Plos Biology*, **2**, 635-641.
- Corson, L.B., Yamanaka, Y., Lai, K.M.V., and Rossant, J. (2003). Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development*, **130**, 4527-4537.
- Cox, C.J., Espinoza, H.M., McWilliams, B., Chappell, K., Morton, L., Hjalt, T.A., Semina, E.V., and Amendt, B.A. (2002). Differential regulation of gene expression by PITX2 isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 25001-25010.
- Cresko, W.A., Amores, A., Wilson, C., Murphy, J., Currey, M., Phillips, P., Bell, M.A., Kimmel, C.B., and Postlethwait, J.H. (2004). Parallel genetic basis for repeated evolution of armor loss in Alaskan threespine stickleback populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 6050-6055.
- Crossley, P.H. and Martin, G.R. (1995). The Mouse Fgf8 Gene Encodes A Family of Polypeptides and Is Expressed in Regions That Direct Outgrowth and Patterning in the Developing Embryo. *Development*, **121**, 439-451.
- Crossley, P.H., Minowada, G., MacArthur, C.A., and Martin, G.R. (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell*, **84**, 127-136.
- Cygan, J.A., Johnson, R.L., and McMahon, A.P. (1997). Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in Wnt-7a and En-1 mutants. *Development*, **124**, 5021-5032.
- Daston, G., Lamar, E., Olivier, M., and Goulding, M. (1996). Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development*, **122**, 1017-1027.
- de Groot, E., Veltmaat, J., Caricasole, A., Defize, L., and van den Eijnden-van Raaij (2000). Cloning and analysis of the mouse follistatin promoter. *Molecular Biology Reports*, **27**, 129-139.
- Dealy, C.N., Roth, A., Ferrari, D., Brown, A.M.C., and Kosher, R.A. (1993). Wnt-5A and Wnt-7A Are Expressed in the Developing Chick Limb Bud in A Manner Suggesting Roles in Pattern-Formation Along the Proximodistal and Dorsoventral Axes. *Mechanisms of Development*, **43**, 175-186.

- Dierick,H. and Bejsovec,A. (1999). Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction. *Current Topics in Developmental Biology, Vol 43*, **43**, 153-190.
- Dreyer,S.D., Zhou,G., Baldini,A., Winterpacht,A., Zabel,B., Cole,W., Johnson,R.L., and Lee,B. (1998). Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nature Genetics*, **19**, 47-50.
- Driever,W. and Nussleinvolhard,C. (1989). The Bicoid Protein Is A Positive Regulator of Hunchback Transcription in the Early Drosophila Embryo. *Nature*, **337**, 138-143.
- Drouin,J., Lamolet,B., Lamonerie,T., Lanctot,C., and Tremblay,J.J. (1998a). The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **140**, 31-36.
- Drouin,J., Lanctot,C., and Tremblay,J.J. (1998b). The Ptx family of homeodomain transcription factors. *MS-Medecine Sciences*, **14**, 335-339.
- Drouin,J., Lanctot,C., and Tremblay,J.J. (1998c). The Ptx family of homeodomain transcription factors (vol 14, p 335, 1998). *MS-Medecine Sciences*, **14**, 514.
- Dudley,A.T., Ros,M.A., and Tabin,C.J. (2002). A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature*, **418**, 539-544.
- Dudley,A.T. and Tabin,C.J. (2003). Deconstructing phosphatases in limb development. *Nature Cell Biology*, **5**, 499-501.
- Eastman,Q. and Grosschedl,R. (1999). Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Current Opinion in Cell Biology*, **11**, 233-240.
- Eblaghie,M.C., Lunn,J.S., Dickinson,R.J., Munsterberg,A.E., Sanz-Ezquerro,J.J., Farrell,E.R., Mathers,J., Keyse,S.M., Storey,K., and Tickle,C. (2003). Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. *Current Biology*, **13**, 1009-1018.
- Fallon,J.F., Lopez,A., Ros,M.A., Savage,M.P., Olwin,B.B., and Simandl,B.K. (1994). Fgf-2 - Apical Ectodermal Ridge Growth Signal for Chick Limb Development. *Science*, **264**, 104-107.
- Fernandez-Teran,M., Piedra,M.E., Kathiriya,I.S., Srivastava,D., Rodriguez-Rey,J.C., and Ros,M.A. (2000). Role of dHAND in the anterior-posterior polarization of the limb bud: implications for the Sonic hedgehog pathway. *Development*, **127**, 2133-2142.
- FernandezTeran,M., Piedra,M.E., Simandl,B.K., Fallon,J.F., and Ros,M.A. (1997). Limb initiation and development is normal in the absence of the mesonephros. *Developmental Biology*, **189**, 246-255.
- Franz,T., Kothary,R., Surani,M.A.H., Halata,Z., and Grim,M. (1993). The Splotch Mutation Interferes with Muscle Development in the Limbs. *Anatomy and Embryology*, **187**, 153-160.

- Gage,P.J. and Camper,S.A. (1997). Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Human Molecular Genetics*, **6**, 457-464.
- Gage,P.J., Suh,H.Y., and Camper,S.A. (1999). Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development*, **126**, 4643-4651.
- Galceran,J., Farinas,I., Depew,M.J., Clevers,H., and Grosschedl,R. (1999). Wnt3a(-/-)-like phenotype and limb deficiency in Lef1(-/-)Tcf1(-/-) mice. *Genes & Development*, **13**, 709-717.
- Ganga,M., Espinoza,H.M., Cox,C.J., Morton,L., Hjalt,T.A., Lee,Y., and Amendt,B.A. (2003). PITX2 isoform-specific regulation of atrial natriuretic factor expression - Synergism and repression with Nkx2.5. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 22437-22445.
- Garrity,D.M., Childs,S., and Fishman,M.C. (2002). The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome. *Development*, **129**, 4635-4645.
- Gaunt,S.J. (2000). Evolutionary shifts of vertebrate structures and Hox expression up and down the axial series of segments: a consideration of possible mechanisms. *International Journal of Developmental Biology*, **44**, 109-117.
- Gavrieli,Y., Sherman,Y., and Bensasson,S.A. (1992). Identification of Programmed Cell-Death In situ Via Specific Labeling of Nuclear-Dna Fragmentation. *Journal of Cell Biology*, **119**, 493-501.
- Geduspan,J.S. and Maccabe,J.A. (1989). Transfer of Dorsoventral Information from Mesoderm to Ectoderm at the Onset of Limb Development. *Anatomical Record*, **224**, 79-87.
- Geduspan,J.S. and Solursh,M. (1992a). A Growth-Promoting Influence from the Mesonephros During Limb Outgrowth. *Developmental Biology*, **151**, 242-250.
- Geduspan,J.S. and Solursh,M. (1992b). Cellular Contribution of the Different Regions of the Somatopleure to the Developing Limb. *Developmental Dynamics*, **195**, 177-187.
- Gibson-Brown,J.J., Agulnik,S.I., Silver,L.M., Niswander,L., and Papaioannou,V.E. (1998a). Involvement of T-box genes Tbx2-Tbx5 in vertebrate limb specification and development. *Development*, **125**, 2499-2509.
- Gibson-Brown,J.J., Agulnik,S.I., Silver,L.M., and Papaioannou,V.E. (1998b). Expression of T-box genes Tbx2-Tbx5 during chick organogenesis. *Mechanisms of Development*, **74**, 165-169.
- GibsonBrown,J.J., Agulnik,S.I., Chapman,D.L., Alexiou,M., Garvey,N., Silver,L.M., and Papaioannou,V.E. (1996). Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mechanisms of Development*, **56**, 93-101.

Gorivodsky,M. and Lonai,P. (2003). Novel roles of Fgfr2 in AER differentiation and positioning of the dorsoventral limb interface. *Development*, **130**, 5471-5479.

Goulding,M., Lumsden,A., and Paquette,A.J. (1994). Regulation of Pax-3 Expression in the Dermomyotome and Its Role in Muscle Development. *Development*, **120**, 957-971.

Goulding,M., Sterrer,S., Fleming,J., Balling,R., Nadeau,J., Moore,K.J., Brown,S.D.M., Steel,K.P., and Gruss,P. (1993). Analysis of the Pax-3 Gene in the Mouse Mutant Splotch. *Genomics*, **17**, 355-363.

Hamburger, V. Morphogenetic and axial self-determination of transplanted limb primordia of 2-day chick embryos. *J.Exp.Zool.* **77**, 379-399. 1938.

Ref Type: Generic

Hanes,S.D. and Brent,R. (1989). Dna Specificity of the Bicoid Activator Protein Is Determined by Homeodomain Recognition Helix Residue-9. *Cell*, **57**, 1275-1283.

Harrison, R. G. Experiments on the development of the fore-limb of *Amblystoma*, a self differentiating equipotential system. *J.Exp.Zool.* **25**, 413-461. 1918.

Ref Type: Generic

Heikinheimo,M., Lawshe,A., Shackelford,G.M., Wilson,D.B., and MacArthur,C.A. (1994). Fgf-8 Expression in the Post-Gastrulation Mouse Suggests Roles in the Development of the Face, Limbs and Central-Nervous-System. *Mechanisms of Development*, **48**, 129-138.

Herrmann,B.G. (1992). Action of the Brachyury Gene in Mouse Embryogenesis. *Ciba Foundation Symposia*, **165**, 78-91.

Hjalt,T.A., Amendt,B.A., and Murray,J.C. (2001). PITX2 regulates procollagen lysyl hydroxylase (PLOD) gene expression: Implications for the pathology of Rieger syndrome. *Journal of Cell Biology*, **152**, 545-552.

Hsu,D.R., Economides,A.N., Wang,X.R., Eimon,P.M., and Harland,R.M. (1998). The *Xenopus* dorsalizing factor gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Molecular Cell*, **1**, 673-683.

Hsu,D.R., Trinh,M., and Harland,R.M. (1999). Characterization of the BMP antagonist Gremlin during mouse development. *Developmental Biology*, **210**, 219.

Huang,H.C. and Klein,P.S. (2004). The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biology*, **5**.

Hui,C.C. and Joyner,A.L. (1993). A Mouse Model of Greig Cephalopolysyndactyly Syndrome - the Extra-Toes(J) Mutation Contains An Intragenic Deletion of the Gli3 Gene. *Nature Genetics*, **3**, 241-246.

Hui,C.C., Slusarski,D., Platt,K.A., Holmgren,R., and Joyner,A.L. (1994). Expression of 3 Mouse Homologs of the *Drosophila* Segment Polarity Gene *Cubitus-Interruptus*, *Gli*, *Gli-*

- 2, and Gli-3, in Ectoderm-Derived and Mesoderm-Derived Tissues Suggests Multiple Roles During Postimplantation Development. *Developmental Biology*, **162**, 402-413.
- Ianakiev,P., Kilpatrick,M.W., Toudjarska,I., Basel,D., Beighton,P., and Tsipouras,P. (2000). Split Hand-Split Foot malformation is caused by mutations in the p63 gene. *Developmental Dynamics*, **219**, 445-446.
- Irving,C., Malhas,A., Guthrie,S., and Mason,I. (2002). Establishing the trochlear motor axon trajectory: role of the isthmus organizer and Fgf8. *Development*, **129**, 5389-5398.
- Isaac,A., Rodriguez-Esteban,C., Ryan,A., Altabef,M., Tsukui,T., Patel,K., Tickle,C., and Izpisua-Belmonte,J.C. (1998). Tbx genes and limb identity in chick embryo development. *Development*, **125**, 1867-1875.
- Isphording,D., Leylek,A.M., Yeung,J., Mischel,A., and Simon,H.G. (2004). T-box genes and congenital heart/limb malformations. *Clinical Genetics*, **66**, 253-264.
- Jacob M, Christ,B., and Jacob H (1979). The migration of myogenic cells from the somites into the leg region of avian embryos. *Anatomy and Embryology*, **157**, 291-309.
- Jeong,K.H., Chin,W.W., and Kaiser,U.B. (2004). Essential role of the homeodomain for pituitary homeobox 1 activation of mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression through interactions with c-Jun and DNA. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 6127-6139.
- Kawakami,Y., Capdevila,J., Buscher,D., Itoh,T., Esteban,C.R., and Belmonte,J.C.I. (2001). WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell*, **104**, 891-900.
- Kawakami,Y., Esteban,C.R., Matsui,T., Rodriguez-Leon,J., Kato,S., and Belmonte,J.C.I. (2004). Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development*, **131**, 4763-4774.
- Kawakami,Y., Rodriguez-Leon,J., Koth,C.M., Buscher,D., Itoh,T., Raya,A., Ng,J.K., Esteban,C.R., Takahashi,S., Henrique,D., Schwarz,M.F., Asahara,H., and Belmonte,J.C.I. (2003). MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nature Cell Biology*, **5**, 513-519.
- Kengaku,M., Capdevila,J., Rodriguez-Esteban,C., De La Pena,J., Johnson,R.L., Belmonte,J.C.I., and Tabin,C.J. (1998). Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science*, **280**, 1274-1277.
- Kengaku,M., Twombly,V., and Tabin,C. (1997). Expression of Wnt and Frizzled genes during chick limb bud development. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **62**, 421-429.

- Khokha, M.K., Hsu, D., Brunet, L.J., Dionne, M.S., and Harland, R.M. (2003). Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nature Genetics*, **34**, 303-307.
- Kinzler, K.W., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., and Vogelstein, B. (1988). The Gli Gene Is A Member of the Kruppel Family of Zinc Finger Proteins. *Nature*, **332**, 371-374.
- Kioussi, C., Briata, P., Baek, S.H., Rose, D.W., Hamblet, N.S., Herman, T., Ohgi, K.A., Lin, C.J., Gleiberman, A., Wang, J.B., Brault, V., Ruiz-Lozano, P., Nguyen, H.D., Kemler, R., Glass, C.K., Wynshaw-Boris, A., and Rosenfeld, M.G. (2002). Identification of a Wnt/Dvl/beta-catenin -> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell*, **111**, 673-685.
- Kitamura, K., Miura, H., Miyagawa-Tomita, S., Yanazawa, M., Katoh-Fukui, Y., Suzuki, R., Ohuchi, H., Suehiro, A., Motegi, Y., Nakahara, Y., Kondo, S., and Yokoyama, M. (1999). Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development*, **126**, 5749-5758.
- Knezevic, V., De Santo, R., Schughart, K., Huffstadt, U., Chiang, C., Mahon, K.A., and Mackem, S. (1997). Hoxd-12 differentially affects preaxial and postaxial chondrogenic branches in the limb and regulates Sonic hedgehog in a positive feedback loop. *Development*, **124**, 4523-4536.
- Kosaki, R., Ohashi, H., Yoshihashi, H., Suzuki, T., and Kosaki, K. (2001). A de novo mutation (R279C) in the P63 gene in a patient with EEC syndrome. *Clinical Genetics*, **60**, 314-315.
- Kraus, P., Fraidenraich, D., and Loomis, C.A. (2001). Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mechanisms of Development*, **100**, 45-58.
- Kuhl, M. (2004). The Wnt/calcium pathway: Biochemical mediators, tools and future requirements. *Frontiers in Bioscience*, **9**, 967-974.
- Kuo, M.H. and Allis, C.D. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein: DNA associations in chromatin environment. *Methods*, **19**, 425-433.
- Lamolet, B., Pulichino, A.M., Lamonerie, T., Gauthier, Y., Brue, T., Enjalbert, A., and Drouin, J. (2001). A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell*, **104**, 849-859.
- Lamonerie, T., Tremblay, J.J., Lanctot, C., Therrien, M., Gauthier, Y., and Drouin, J. (1996). Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes & Development*, **10**, 1284-1295.
- Lanctot, C., Gauthier, Y., and Drouin, J. (1999a). Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology*, **140**, 1416-1422.

Lanctot,C., Lamolet,B., and Drouin,J. (1997). The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development*, **124**, 2807-2817.

Lanctot,C., Moreau,A., Chamberland,M., Tremblay,M.L., and Drouin,J. (1999b). Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development*, **126**, 1805-1810.

Lanctot,C., Moreau,A., Chamberland,M., Tremblay,M.L., and Drouin,J. (1999c). Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. (vol 126, pg 1805, 1999). *Development*, **126**, U5.

Laufer,E., Dahn,R., Orozco,O.E., Yeo,C.Y., Pisenti,J., Henrique,D., Abbott,U.K., Fallon,J.F., and Tabin,C. (1997). Expression of radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature*, **386**, 366-373.

Laufer,E., Nelson,C.E., Johnson,R.L., Morgan,B.A., and Tabin,C. (1994). Sonic Hedgehog and Fgf-4 Act Through A Signaling Cascade and Feedback Loop to Integrate Growth and Patterning of the Developing Limb Bud. *Cell*, **79**, 993-1003.

Lebel,M., Gauthier,Y., Moreau,A., and Drouin,J. (2001). Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site. *Journal of Neurochemistry*, **77**, 558-567.

Lewandoski,M., Sun,X., and Martin,G.R. (2000). Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nature Genetics*, **26**, 460-463.

Lewis,P.M., Dunn,M.P., McMahon,J.A., Logan,M., Martin,J.F., St Jacques,B., and McMahon,A.P. (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell*, **105**, 599-612.

Li,Q.Y., NewburyEcob,R.A., Terrett,J.A., Wilson,D.I., Curtis,A.R.J., Yi,C.H., Gebuhr,T., Bullen,P.J., Robson,S.C., Strachan,T., Bonnet,D., Lyonnet,S., Young,I.D., Raeburn,J.A., Buckler,A.J., Law,D.J., and Brook,J.D. (1997). Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nature Genetics*, **15**, 21-29.

Lin,C.R., Kioussi,C., O'Connell,S., Briata,P., Szeto,D., Liu,F., Izpisua-Belmonte,J.C., and Rosenfeld,M.G. (1999). Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature*, **401**, 279-282.

Linask,K.K., Yu,X.Y., Chen,Y.P., and Han,M.D. (2002). Directionality of heart looping: Effects of Pitx2c misexpression on flectin asymmetry and midline structures. *Developmental Biology*, **246**, 407-417.

Litingtung,Y., Dahn,R.D., Li,Y.N., Fallon,J.F., and Chiang,C. (2002). Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*, **418**, 979-983.

Liu,C.Y., Liu,W., Lu,M.F., Brown,N.A., and Martin,J.F. (2001). Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development*, **128**, 2039-2048.

Liu,C.Y., Liu,W., Palie,J., Lu,M.F., Brown,N.A., and Martin,J.F. (2002). Pitx2c patterns anterior myocardium and aortic arch vessels and is required for local cell movement into atrioventricular cushions. *Development*, **129**, 5081-5091.

Liu,W., Selever,J., Lu,M.F., and Martin,J.F. (2003). Genetic dissection of Pitx2 in craniofacial development uncovers new functions in branchial arch morphogenesis, late aspects of tooth morphogenesis and cell migration. *Development*, **130**, 6375-6385.

Logan,C., Hornbruch,A., Campbell,I., and Lumsden,A. (1997). The role of Engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development*, **124**, 2317-2324.

Logan,C.Y. and Nusse,R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **20**, 781-810.

Logan,M. (2003). Finger or toe: the molecular basis of limb identity. *Development*, **130**, 6401-6410.

Logan,M., Pagan-Westphal,S.M., Smith,D.M., Paganessi,L., and Tabin,C.J. (1998a). The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell*, **94**, 307-317.

Logan,M., Simon,H.G., and Tabin,C. (1998b). Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity. *Development*, **125**, 2825-2835.

Logan,M. and Tabin,C.J. (1999). Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science*, **283**, 1736-1739.

Loomis,C.A., Harris,E., Michaud,J., Wurst,W., Hanks,M., and Joyner,A.L. (1996). The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature*, **382**, 360-363.

Loomis,C.A., Kimmel,R.A., Tong,C.X., Michaud,J., and Joyner,A.L. (1998). Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse Engrailed-1 mutant limbs. *Development*, **125**, 1137-1148.

Lu,M.F. and Martin,J.F. (1999a). The function of pitx2 during embryogenesis. *Developmental Biology*, **210**, 234.

Lu,M.F., Pressman,C., Dyer,R., Johnson,R.L., and Martin,J.F. (1999b). Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature*, **401**, 276-278.

Maccabe, J. A., Errick, J., and Saunders, J. W. Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Developmental Biology* 39, 69-82. 1974.
Ref Type: Generic

- Mahmood,R., Bresnick,J., Hornbruch,A., Mahony,C., Morton,N., Colquhoun,K., Martin,P., Lumsden,A., Dickson,C., and Mason,I. (1995). A Role for Fgf-8 in the Initiation and Maintenance of Vertebrate Limb Bud Outgrowth. *Current Biology*, **5**, 797-806.
- Marcil,A., Dumontier,E., Chamberland,M., Camper,S.A., and Drouin,J. (2003). Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development*, **130**, 45-55.
- Margulies,E.H., Kardia,S.L.R., and Innis,J.W. (2001). A comparative molecular analysis of developing mouse forelimbs and hindlimbs using Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). *Genome Research*, **11**, 1686-1698.
- Marigo,V., Johnson,R.L., Vortkamp,A., and Tabin,C.J. (1996). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Developmental Biology*, **180**, 273-283.
- Martin,D.M., Skidmore,J.M., Fox,S.E., Gage,P.J., and Camper,S.A. (2002). Pitx2 distinguishes subtypes of terminally differentiated neurons in the developing mouse neuroepithelium. *Developmental Biology*, **252**, 84-99.
- Martin,G.R. (1998). The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes & Development*, **12**, 1571-1586.
- Masuya,H., Sagai,T., Moriwaki,K., and Shiroishi,T. (1997). Multigenic control of the localization of the zone of polarizing activity in limb morphogenesis in the mouse. *Developmental Biology*, **182**, 42-51.
- McPherron,A.C., Lawler,A.M., and Lee,S.J. (1999). Regulation of anterior posterior patterning of the axial skeleton by growth differentiation factor 11. *Nature Genetics*, **22**, 260-264.
- McQueeney,K., Soufer,R., and Dealy,C.N. (2002). beta-catenin-dependent Wnt signaling in apical ectodermal ridge induction and FGF8 expression in normal and limbless mutant chick limbs. *Development Growth & Differentiation*, **44**, 315-325.
- Melamed,P., Koh,M., Preklathan,P., Bei,L., and Hew,C. (2002). Multiple mechanisms for Pitx-1 transactivation of a luteinizing hormone beta subunit gene. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 26200-26207.
- Meno,C., Shimono,A., Saijoh,Y., Yashiro,K., Mochida,K., Ohishi,S., Noji,S., Kondoh,H., and Hamada,H. (1998). lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell*, **94**, 287-297.
- Mercader,N., Leonardo,E., Azpiazu,N., Serrano,A., Morata,G., Martinez,C., and Torres,M. (1999). Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature*, **402**, 425-429.

Mercader,N., Leonardo,E., Piedra,M.E., Martinez,A., Ros,M.A., and Torres,M. (2000). Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development*, **127**, 3961-3970.

Methot,N. and Basler,K. (2001). An absolute requirement for Cubitus interruptus in Hedgehog signaling. *Development*, **128**, 733-742.

Meyer,R.A., Cohen,M.F., Recalde,S., Zakany,J., Bell,S.M., Scott,W.J., and Lo,C.W. (1997). Developmental regulation and asymmetric expression of the gene encoding Cx43 gap junctions in the mouse limb bud. *Developmental Genetics*, **21**, 290-300.

Mic,F.A., Sirbu,I.O., and Duester,G. (2004). Retinoic acid synthesis controlled by Raldh2 is required early for limb bud initiation and then later as a proximodistal signal during apical ectodermal ridge formation. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 26698-26706.

Michaud,J.L., Lapointe,F., and LeDouarin,N.M. (1997). The dorsoventral polarity of the presumptive limb is determined by signals produced by the somites and by the lateral somatopleure. *Development*, **124**, 1453-1463.

Min,H.S., Danilenko,D.M., Scully,S.A., Bolon,B., Ring,B.D., Tarpley,J.E., DeRose,M., and Simonet,W.S. (1998). Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to Drosophila branchless. *Genes & Development*, **12**, 3156-3161.

Minguillon,C., Del Buono,J., and Logan,M.P. (2005). Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Developmental Cell*, **8**, 75-84.

Mo,R., Freer,A.M., Zinyk,D.L., Crackower,M.A., Michaud,J., Heng,H.H.Q., Chik,K.W., Shi,X.M., Tsui,L.C., Cheng,S.H., Joyner,A.L., and Hui,C.C. (1997). Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development*, **124**, 113-123.

Moon,A.M., Boulet,A.M., and Capecchi,M.R. (2000a). Normal limb development in conditional mutants of Fgf4. *Development*, **127**, 989-996.

Moon,A.M. and Capecchi,M.R. (2000b). Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nature Genetics*, **26**, 455-459.

Moran,J.L., LeVorse,J.M., and Vogt,T.F. (1999). Limbs move beyond the Radical fringe. *Nature*, **399**, 742-743.

Naiche,L.A. and Papaioannou,V.E. (2003). Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. *Development*, **130**, 2681-2693.

Nelson,C.E., Morgan,B.A., Burke,A.C., Laufer,E., DiMambro,E., Murtaugh,L.C., Gonzales,E., Tessarollo,L., Parada,L.F., and Tabin,C. (1996). Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development*, **122**, 1449-1466.

- Ng, J.K., Kawakami, Y., Buscher, D., Raya, A., Itoh, T., Koth, C.M., Esteban, C.R., Rodriguez-Leon, J., Garrity, D.M., Fishman, M.C., and Belmonte, J.C.I. (2002). The limb identity gene *Tbx5* promotes limb initiation by interacting with *Wnt2b* and *Fgf10*. *Development*, **129**, 5161-5170.
- Nicholson, L.F.B., Ma, L., and Goulding, M. (2001). Cloning and expression of *Munc 30*: A member of the paired-like homeodomain gene family. *Cell Biology International*, **25**, 351-365.
- Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbaur, B., Chambon, P., and Dolle, P. (2002). Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development*, **129**, 3563-3574.
- Niemann, S., Zhao, C.F., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J.L., and Muller, U. (2004). Homozygous *WNT3* mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *American Journal of Human Genetics*, **74**, 558-563.
- Niswander, L. (1999). Developmental biology - Legs to wings and back again. *Nature*, **398**, 751-752.
- Niswander, L. (2002). Interplay between the molecular signals that control vertebrate limb development. *International Journal of Developmental Biology*, **46**, 877-881.
- Niswander, L. (2003). Pattern formation: Old models out on a limb. *Nature Reviews Genetics*, **4**, 133-143.
- Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G.R., and Tickle, C. (1994a). A Positive Feedback Loop Coordinates Growth and Patterning in the Vertebrate Limb. *Nature*, **371**, 609-612.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., and Martin, G.R. (1993). *Fgf-4* Replaces the Apical Ectodermal Ridge and Directs Outgrowth and Patterning of the Limb. *Cell*, **75**, 579-587.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., and Martin, G. (1994b). Function of *Fgf-4* in Limb Development. *Molecular Reproduction and Development*, **39**, 83-89.
- Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Muto, K., Ohyama, K., Aoki, Y., Tamura, K., Ohsugi, K., Ide, H., Taniguchi, S., and Saito, T. (1991). Retinoic Acid Induces Polarizing Activity But Is Unlikely to be A Morphogen in the Chick Limb Bud. *Nature*, **350**, 83-86.
- Nowak, S.J. and Corces, V.G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics*, **20**, 214-220.
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N., and Noji, S. (1997). The mesenchymal factor, *FGF10*, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with *FGF8*, an apical ectodermal factor. *Development*, **124**, 2235-2244.

Ohuchi,H., Nakagawa,T., Yamauchi,M., Ohata,T., Yoshioka,H., Kuwana,T., Mima,T., Mikawa,T., Nohno,T., and Noji,S. (1995). An Additional Limb Can be Induced from the Flank of the Chick-Embryo by Fgf4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **209**, 809-816.

Ohuchi,H., Takeuchi,J., Yoshioka,H., Ishimaru,Y., Ogura,K., Takahashi,N., Ogura,T., and Noji,S. (1998). Correlation of wing-leg identity in ectopic FGF-induced chimeric limbs with the differential expression of chick Tbx5 and Tbx4. *Development*, **125**, 51-60.

Ohuchi,H., Yoshioka,H., Tanaka,A., Kawakami,Y., Nohno,T., and Noji,S. (1994). Involvement of Androgen-Induced Growth-Factor (Fgf-8) Gene in Mouse Embryogenesis and Morphogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **204**, 882-888.

Oliver,G., Derobertis,E.M., Wolpert,L., and Tickle,C. (1990). Expression of A Homeobox Gene in the Chick Wing Bud Following Application of Retinoic Acid and Grafts of Polarizing Region Tissue. *Embo Journal*, **9**, 3093-3099.

Orrurtreger,A., Bedford,M.T., Burakova,T., Arman,E., Zimmer,Y., Yayon,A., Givol,D., and Lonai,P. (1993). Developmental Localization of the Splicing Alternatives of Fibroblast Growth-Factor Receptor-2 (Fgfr2). *Developmental Biology*, **158**, 475-486.

Park,H.L., Bai,C., Platt,K.A., Matise,M.P., Beeghly,A., Hui,C.C., Nakashima,M., and Joyner,A.L. (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development*, **127**, 1593-1605.

Parr,B.A. and McMahon,A.P. (1995). Dorsalizing Signal Wnt-7A Required for Normal Polarity of D-V and A-P Axes of Mouse Limb. *Nature*, **374**, 350-353.

Parr,B.A., Shea,M.J., Vassileva,G., and McMahon,A.P. (1993). Mouse Wnt Genes Exhibit Discrete Domains of Expression in the Early Embryonic Cns and Limb Buds. *Development*, **119**, 247-261.

Partanen,J., Vainikka,S., and Alitalo,K. (1993). Structural and Functional Specificity of Fgf Receptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **340**, 297-303.

Patel,K., Isaac,A., and Cooke,J. (1999). Nodal signalling and the roles of the transcription factors SnR and Pitx2 in vertebrate left-right asymmetry. *Current Biology*, **9**, 609-612.

Pautou, M. P. Dorso-ventral axis determination of chick limb bud development. Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis ed. DA Ede, JR Hinchliffe, M Balls Cambridge, UK: Cambridge University Press, 257-266. 1977.
Ref Type: Generic

Peichel,C.L., Nereng,K.S., Ohgi,K.A., Cole,B.L.E., Colosimo,P.F., Buerkle,C.A., Schluter,D., and Kingsley,D.M. (2001). The genetic architecture of divergence between threespine stickleback species. *Nature*, **414**, 901-905.

Peters,K.G., Werner,S., Chen,G., and Williams,L.T. (1992). 2 Fgf Receptor Genes Are Differentially Expressed in Epithelial and Mesenchymal Tissues During Limb Formation and Organogenesis in the Mouse. *Development*, **114**, 233-243.

Peterson,R.L., Papenbrock,T., Davda,M.M., and Awgulewitsch,A. (1994). The Murine Hoxc Cluster Contains 5 Neighboring Abdb-Related Hox Genes That Show Unique Spatially Coordinated Expression in Posterior Embryonic Subregions. *Mechanisms of Development*, **47**, 253-260.

Piedra,M.E., Icardo,J.M., Albajar,M., Rodriguez-Rey,J.C., and Ros,M.A. (1998). Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell*, **94**, 319-324.

Pizette,S., Abate-Shen,C., and Niswander,L. (2001). BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development*, **128**, 4463-4474.

Pizette,S. and Niswander,L. (1999). BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development*, **126**, 883-894.

Poulin,G., Lebel,M., Chamberland,M., Paradis,F.W., and Drouin,J. (2000). Specific protein-protein interaction between basic helix-loop-helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 4826-4837.

Poulin,G., Turgeon,B., and Drouin,J. (1997). NeuroD1/beta 2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Molecular and Cellular Biology*, **17**, 6673-6682.

Pulichino,A.M., Lamolet,B., Brue,T., Enjalbert,A., David,M., Malpuech,G., and Drouin,J. (2001). Tpit, a pituitary cell-restricted T-box factor, involved in ACTH deficiency. *M S-Medecine Sciences*, **17**, 1203-1207.

Pulichino,A.M., Vallette-Kasic,S., Couture,C., Brue,T., and Drouin,J. (2004). Tpit mutations reveal a new model of pituitary differentiation and account for isolated ACTH deficiency. *M S-Medecine Sciences*, **20**, 1009-1013.

Pulichino,A.M., Vallette-Kasic,S., Couture,C., Gauthier,Y., Brue,T., David,M., Malpuech,G., Deal,C., Van Vliet,G., De Vroede,M., Riepe,F.G., Partsch,C.J., Sippell,W.G., Berberoglu,M., Atasay,B., and Drouin,J. (2003a). Human and mouse TPIT gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes & Development*, **17**, 711-716.

Pulichino,A.M., Vallette-Kasic,S., Tsai,J.P.Y., Couture,C., Gauthier,Y., and Drouin,J. (2003b). Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes & Development*, **17**, 738-747.

Qin,P., Cimildoro,R., Kochhar,D.M., Soprano,K.J., and Soprano,D.R. (2002). PBX, MEIS, and IGF-I are potential mediators of retinoic acid-induced proximodistal limb reduction defects. *Teratology*, **66**, 224-234.

Qu,S.M., Niswender,K.D., Ji,Q.S., vanderMeer,R., Keeney,D., Magnuson,M.A., and Wisdom,R. (1997). Polydactyly and ectopic ZPA formation in Alx-4 mutant mice. *Development*, **124**, 3999-4008.

Quentien,M.H., Pitoia,F., Gunz,G., Guillet,M.P., Enjalbert,A., and Pellegrini,I. (2002). Regulation of prolactin, GH, and Pit-1 gene expression in anterior pituitary by Pitx2: An approach using Pitx2 mutants. *Endocrinology*, **143**, 2839-2851.

Rallis C., Buono J.D., and Logan, M. P. O. Tbx3 can alter limb position along the rostrocaudal axis of the developing embryo. *Development* 132, 1961-1970. 2005.
Ref Type: Generic

Rallis C. and Logan M. A potential role for the T-box gene Tbx3 in positioning the forelimb along the rostro-caudal axis of the embryo. 8th International Conference on Limb Development and Regeneration Dundee, Scotland. 2004.
Ref Type: Abstract

Rallis,C., Bruneau,B.G., Del Buono,J., Seidman,C.E., Seidman,J.G., Nissim,S., Tabin,C.J., and Logan,M.P.O. (2003). Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. *Development*, **130**, 2741-2751.

Rancourt,D.E., Tsuzuki,T., and Capecchi,M.R. (1995). Genetic Interaction Between Hoxb-5 and Hoxb-6 Is Revealed by Nonallelic Noncomplementation. *Genes & Development*, **9**, 108-122.

Reaume,A.G., Desousa,P.A., Kulkarni,S., Langille,B.L., Zhu,D.G., Davies,T.C., Juneja,S.C., Kidder,G.M., and Rossant,J. (1995). Cardiac Malformation in Neonatal Mice Lacking Connexin43. *Science*, **267**, 1831-1834.

Ren,B., Robert,F., Wyrick,J.J., Aparicio,O., Jennings,E.G., Simon,I., Zeitlinger,J., Schreiber,J., Hannett,N., Kanin,E., Volkert,T.L., Wilson,C.J., Bell,S.P., and Young,R.A. (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, **290**, 2306-+.

Revest,J.M., Spencer-Dene,B., Kerr,K., De Moerlooze,L., Rosewell,I., and Dickson,C. (2001). Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb acts upstream of Shh and Fgf4 and is required for limb bud maintenance but not for the induction of Fgf8, Fgf10, Msx1, or Bmp4. *Developmental Biology*, **231**, 47-62.

Riddle,R.D., Ensini,M., Nelson,C., Tsuchida,T., Jessell,T.M., and Tabin,C. (1995). Induction of the Lim Homeobox Gene Lmx1 by Wnt7A Establishes Dorsoventral Pattern in the Vertebrate Limb. *Cell*, **83**, 631-640.

Riddle,R.D., Johnson,R.L., Laufer,E., and Tabin,C. (1993). Sonic-Hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the Zpa. *Cell*, **75**, 1401-1416.

Rodriguez-Esteban,C., Tsukui,T., Yonei,S., Magallon,J., Tamura,K., and Belmonte,J.C.I. (1999). The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature*, **398**, 814-818.

- RodriguezEsteban,C., Schwabe,J.W.R., delaPena,J., Foys,B., Eshelman,B., and Belmonte,J.C.I. (1997). Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature*, **386**, 360-366.
- Ros,M.A., Dahn,R.D., Fernandez-Teran,M., Rashka,K., Caruccio,N.C., Hasso,S.M., Bitgood,J.J., Lancman,J.J., and Fallon,J.F. (2003). The chick oligozeugodactyly (ozd) mutant lacks sonic hedgehog function in the limb. *Development*, **130**, 527-537.
- Rossant,J., Zirngibl,R., Cado,D., Shago,M., and Giguere,V. (1991). Expression of A Retinoic Acid Response Element-HsplacZ Transgene Defines Specific Domains of Transcriptional Activity During Mouse Embryogenesis. *Genes & Development*, **5**, 1333-1344.
- Rowe,D.A., Cairns,J.M., and Fallon,J.F. (1982). Spatial and Temporal Patterns of Cell-Death in Limb Bud Mesoderm After Apical Ectodermal Ridge Removal. *Developmental Biology*, **93**, 83-91.
- Ruppert,J.M., Kinzler,K.W., Wong,A.J., Bigner,S.H., Kao,F.T., Law,M.L., Seuanez,H.N., Obrien,S.J., and Vogelstein,B. (1988). The Gli-Kruppel Family of Human Genes. *Molecular and Cellular Biology*, **8**, 3104-3113.
- Ruvinsky,I. and Gibson-Brown,J.J. (2000a). Genetic and developmental bases of serial homology in vertebrate limb evolution. *Development*, **127**, 5233-5244.
- Ruvinsky,I., Gibson-Brown,J.J., Oates,A.C., Ho,R.K., and Silver,L.M. (1999). T-box genes and the evolution of paired vertebrate appendages. *American Zoologist*, **39**, 15A.
- Ruvinsky,I. and Silver,L.M. (1997). Newly identified paralogous groups on mouse chromosomes 5 and 11 reveal the age of a T-box cluster duplication. *Genomics*, **40**, 262-266.
- Ruvinsky,I., Silver,L.M., and Gibson-Brown,J.J. (2000b). Phylogenetic analysis of T-Box genes demonstrates the importance of amphioxus for understanding evolution of the vertebrate genome. *Genetics*, **156**, 1249-1257.
- Ryan,A.K., Blumberg,B., Rodriguez-Esteban,C., Yonei-Tamura,S., Tamura,K., Tsukui,T., De La Pena,J., Sabbagh,W., Greenwald,J., Choe,S., Norris,D.P., Robertson,E.J., Evans,R.M., Rosenfeld,M.G., and Belmonte,J.C.I. (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature*, **394**, 545-551.
- Sagai,T., Masuya,H., Tamura,M., Shimizu,K., Yada,Y., Wakana,S., Gondo,Y., Noda,T., and Shiroishi,T. (2004). Phylogenetic conservation of a limb-specific, cis-acting regulator of Sonic hedgehog (Shh). *Mammalian Genome*, **15**, 23-34.
- Sakiyama,J., Yamagishi,A., and Kuroiwa,A. (2003). Tbx4-Fgf10 system controls lung bud formation during chicken embryonic development. *Development*, **130**, 1225-1234.
- Saunders, J. W. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J.Exp.Zool.* 108, 363-404. 1948.

Ref Type: Generic

Saunders, J. W. and Gasseling, M. T. Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of the limb symmetry. Fleischmeyer R. and Billingham R.E. In *Epithelial-Mesenchymal Interactions*. 78-97. 1968. Baltimore; Williams & Wilkins.

Ref Type: Generic

Schimmang, T., Lemaistre, M., Vortkamp, A., and Ruther, U. (1992). Expression of the Zinc Finger Gene *Gli3* Is Affected in the Morphogenetic Mouse Mutant Extra-Toes (Xt). *Development*, **116**, 799-804.

Secko, D. (2004). "Big cross" lands sticklebacks in the spotlight. *Scientist*, **18**, 16-17.

Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., and Kato, S. (1999). *Fgf10* is essential for limb and lung formation. *Nature Genetics*, **21**, 138-141.

Selleri, L., Depew, M.J., Jacobs, Y., Chanda, S.K., Tsang, K.Y., Cheah, K.S.E., Rubenstein, J.L.R., O'Gorman, S., and Cleary, M.L. (2001). Requirement for *Pbx1* in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*, **128**, 3543-3557.

Semina, E.V., Ferrell, R.E., Mintz-Hittner, H.A., Bitoun, P., Alward, W.L.M., Reiter, R.S., Funkhauser, C., Daack-Hirsch, S., and Murray, J.C. (1998). A novel homeobox gene *PITX3* is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nature Genetics*, **19**, 167-170.

Semina, E.V., Murray, J.C., Reiter, R., Hrstka, R.F., and Graw, J. (2000). Deletion in the promoter region and altered expression of *Pitx3* homeobox gene in aphakia mice. *Human Molecular Genetics*, **9**, 1575-1585.

Semina, E.V., Reiter, R., Leysens, N.J., Alward, W.L.M., Small, K.W., Datson, N.A., Siegelbartel, J., Bierke-Nelson, D., Bitoun, P., Zabel, B.U., Carey, J.C., and Murray, J.C. (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, *RIEG*, involved in Rieger syndrome. *Nature Genetics*, **14**, 392-399.

Semina, E.V., Reiter, R.S., and Murray, J.C. (1997). Isolation of a new homeobox gene belonging to the *Pitx/Rieg* family: Expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Human Molecular Genetics*, **6**, 2109-2116.

Shang, J., Luo, Y., and Clayton, D.A. (1997). *Backfoot* is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb. *Developmental Dynamics*, **209**, 242-253.

Shapiro, M.D., Marks, M.E., Peichel, C.L., Blackman, B.K., Nereng, K.S., Jonsson, B., Schluter, D., and Kingsley, D.M. (2004). Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature*, **428**, 717-723.

Sherman,L., Wainwright,D., Ponta,H., and Herrlich,P. (1998). A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. *Genes & Development*, **12**, 1058-1071.

Simon,H.G., Kittappa,R., Khan,P.A., Tsilfidis,C., Liversage,R.A., and Oppenheimer,S. (1997). A novel family of T-box genes in urodele amphibian limb development and regeneration: Candidate genes involved in vertebrate forelimb/hindlimb patterning. *Development*, **124**, 1355-1366.

Simon,H.G. and Tabin,C.J. (1993). Analysis of Hox-4.5 and Hox-3.6 Expression During Newt Limb Regeneration - Differential Regulation of Paralogous Hox Genes Suggest Different Roles for Members of Different Hox Clusters. *Development*, **117**, 1397-1407.

Slack,A., Chen,Z.W., Tonelli,R., Pule,M., Hunt,L., Pession,A., and Shohet,J.M. (2005). The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 731-736.

South,A.P., Ashton,G.H.S., Willoughby,C., Ellis,I.H., Bleck,O., Hamada,T., Mannion,G., Wessagowit,V., Hashimoto,T., Eady,R.A.J., and McGrath,J.A. (2002). EEC (Ectrodactyly, Ectodermal dysplasia, Clefting) syndrome: heterozygous mutation in the p63 gene (R279H) and DNA-based prenatal diagnosis. *British Journal of Dermatology*, **146**, 216-220.

Stevens,T.A., Iacovoni,J.S., Edelman,D.B., and Meech,R. (2004). Identification of novel binding elements and gene targets for the homeodomain protein BARX2. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 14520-14530.

Strecker,T.R. and Stephens,T.D. (1983). Peripheral-Nerves do Not Play A Trophic Role in Limb Skeletal Morphogenesis. *Teratology*, **27**, 159-167.

Suh,H., Gage,P.J., Drouin,J., and Camper,S.A. (2002). Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification. *Development*, **129**, 329-337.

Summerbell,D. and Lewis,J.H. (1975). Time, place and positional value in the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol.*, **33**, 621-643.

Summerbell, D., Lewis, J. H., and Wolpert, L. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 224, 492-496. 1973.

Ref Type: Generic

Sun,X., Lewandoski,M., Meyers,E.N., Liu,Y.H., Maxson,R.E., and Martin,G.R. (2000). Conditional inactivation of Fgf4 reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nature Genetics*, **25**, 83-86.

Sun,X., Mariani,F.V., and Martin,G.R. (2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*, **418**, 501-508.

Swindell,E.C., Thaller,C., Sockanathan,S., Petkovich,M., Jessell,T.M., and Eichele,G. (1999). Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. *Developmental Biology*, **216**, 282-296.

Szeto,D.P., Rodriguez-Esteban,C., Ryan,A.K., O'Connell,S.M., Liu,F., Kiousi,C., Gleiberman,A.S., Izpisua-Belmonte,J.C., and Rosenfeld,M.G. (1999). Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb in morphogenesis and pituitary development. *Genes & Development*, **13**, 484-494.

Szeto,D.P., Ryan,A.K., OConnell,S.M., and Rosenfeld,M.G. (1996). P-OTX: A PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 7706-7710.

Tabin,C.J. (1989). Isolation of Potential Vertebrate Limb-Identity Genes. *Development*, **105**, 813-820.

Takabatake,Y., Takabatake,T., and Takeshima,K. (2000). Conserved and divergent expression of T-box genes Tbx2-Tbx5S in Xenopus. *Mechanisms of Development*, **91**, 433-437.

Takeuchi,J.K., Koshiba-Takeuchi,K., Matsumoto,K., Vogel-Hopker,A., Naitoh-Matsuo,M., Ogura,K., Takahashi,N., Yasuda,K., and Ogura,T. (1999). Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature*, **398**, 810-814.

Takeuchi,J.K., Koshiba-Takeuchi,K., Suzuki,T., Kamimura,M., Ogura,K., and Ogura,T. (2003). Tbx5 and Tbx4 trigger limb initiation through activation of the Wnt/Fgf signaling cascade. *Development*, **130**, 2729-2739.

Thomas,D.M., Carty,S.A., Piscopo,D.M., Lee,J.S., Wang,W.F., Forrester,W.C., and Hinds,P.W. (2001). The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Molecular Cell*, **8**, 303-316.

Tickle,C. (2003). Patterning systems - From one end of the limb to the other. *Developmental Cell*, **4**, 449-458.

Tickle,C., Alberts,B., Wolpert,L., and Lee,J. (1982). Local Application of Retinoic Acid to the Limb Bud Mimics the Action of the Polarizing Region. *Nature*, **296**, 564-566.

Todt,W.L. and Fallon,J.F. (1984). Development of the Apical Ectodermal Ridge in the Chick Wing Bud. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **80**, 21-41.

Toro,R., Saadi,I., Kuburas,A., Nemer,M., and Russo,A.F. (2004). Cell-specific activation of the atrial natriuretic factor promoter by PITX2 and MEF2A. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 52087-52094.

Toro,R., Saadi,I., Kuburas,A., and Russo,A.F. (2003). PITX2 and MEF2A synergistically activate the ANF promoter. *Faseb Journal*, **17**, A591-A592.

Treisman, J., Gonczy, P., Vashishtha, M., Harris, E., and Desplan, C. (1989). A Single Amino-Acid Can Determine the Dna-Binding Specificity of Homeodomain Proteins. *Cell*, **59**, 553-562.

Tremblay, J.J. and Drouin, J. (1999). Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone beta gene transcription. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 2567-2576.

Tremblay, J.J., Goodyer, C.G., and Drouin, J. (2000). Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinology*, **71**, 277-286.

Tremblay, J.J., Lanctot, C., and Drouin, J. (1998). The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Molecular Endocrinology*, **12**, 428-441.

Tremblay, J.J., Marcil, A., Gauthier, Y., and Drouin, J. (1999). Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *Embo Journal*, **18**, 3431-3441.

van Bokhoven, H., Hamel, B.C.J., Bamshad, M., Sangiorgi, E., Gurrieri, F., Duijf, P.H.G., Vanmolkot, K.R.J., van Beusekom, E., Van Beersum, S.E.C., Celli, J., Merkx, G.F.M., Tenconi, R., Fryns, J.P., Verloes, A., Newbury-Ecob, R.A., Raas-Rotschild, A., Majewski, F., Beemer, F.A., Janecke, A., Chitayat, D., Crisponi, G., Kayserili, H., Yates, J.R.W., Neri, G., and Brunner, H.G. (2001). p63 gene mutations in EEC syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *American Journal of Human Genetics*, **69**, 481-492.

van den Munckhof, P., Luk, K.C., Ste-Marie, L., Montgomery, J., Blanchet, P.J., Sadikot, A.F., and Drouin, J. (2003). Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development*, **130**, 2535-2542.

Vogel, A., Rodriguez, C., and IzpisuaBelmonte, J.C. (1996). Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development*, **122**, 1737-1750.

Vogel, A., Rodriguez, C., Warnken, W., and Belmonte, J.C.I. (1995). Dorsal Cell Fate Specified by Chick Lmx1 During Vertebrate Limb Development. *Nature*, **378**, 716-720.

Vogt, T.F., Jacksongrusby, L., Rush, J., and Leder, P. (1993). Formins - Phosphoprotein Isoforms Encoded by the Mouse Limb Deformity Locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 5554-5558.

Vollrath, D., Jaramillo-Babb, V.L., Clough, M.V., McIntosh, I., Scott, K.M., Lichter, P.R., and Richards, J.E. (1998). Loss-of-function mutations in the LIM-homeodomain gene, LMX1B, in nail-patella syndrome. *Human Molecular Genetics*, **7**, 1091-1098.

Wanek, N., Gardiner, D.M., Muneoka, K., and Bryant, S.V. (1991). Conversion by Retinoic Acid of Anterior Cells Into Zpa Cells in the Chick Wing Bud. *Nature*, **350**, 81-83.

Wang,B.L., Fallon,J.F., and Beachy,P.A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*, **100**, 423-434.

Warren A.E. (1934). Experimental studies on the development of the wing in the embryo of *Gallus domesticus*. *Am. J. Anat.*, **54**, 449-486.

Weinmann,A.S., Bartley,S.M., Zhang,T., Zhang,M.Q., and Farnham,P.J. (2001). Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 6820-6832.

Weinmann,A.S. and Farnham,P.J. (2002). Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods*, **26**, 37-47.

Wells,J., Boyd,K.E., Fry,C.J., Bartley,S.M., and Farnham,P.J. (2000). Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 5797-5807.

Welscher,P.T., Fernandez-Teran,M., Ros,M.A., and Zeller,R. (2002a). Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes & Development*, **16**, 421-426.

Welscher,P.T., Zuniga,A., Kuijper,S., Drenth,T., Goedemans,H.J., Meijlink,F., and Zeller,R. (2002b). Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science*, **298**, 827-830.

Wessagowit,V., Mellerio,J.E., Pembroke,A.C., and McGrath,J.A. (2000). Heterozygous germline missense mutation in the p63 gene underlying EEC syndrome. *Clinical and Experimental Dermatology*, **25**, 441-443.

Westmoreland,J.J., McEwen,J., Moore,B.A., Jin,Y.S., and Condie,B.G. (2001). Conserved function of *Caenorhabditis elegans* UNC-30 and mouse Pitx2 in controlling GABAergic neuron differentiation. *Journal of Neuroscience*, **21**, 6810-6819.

Wilkie,A.O.M., Patey,S.J., Kan,S., van den Ouweland,A.M.W., and Hamel,B.C.J. (2002). FGFs, their receptors, and human limb malformations: Clinical and molecular correlations. *American Journal of Medical Genetics*, **112**, 266-278.

Williams,T.M., Williams,M.E., and Innis,J.W. (2005). Range of HOX/TALE superclass associations and proteins domain requirements for HOXA13 : MEIS interaction. *Developmental Biology*, **277**, 457-471.

Wodarz,A. and Nusse,R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **14**, 59-88.

Xu,X.L., Weinstein,M., Li,C.L., and Deng,C.X. (1999). Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) and their roles in limb development. *Cell and Tissue Research*, **296**, 33-43.

- Xu, X.L., Weinstein, M., Li, C.L., Naski, M., Cohen, R.I., Ornitz, D.M., Leder, P., and Deng, C.X. (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development*, **125**, 753-765.
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P.T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A., and Tickle, C. (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development*, **124**, 4393-4404.
- Yang, Y.Z. and Niswander, L. (1995). Interaction Between the Signaling Molecules Wnt7A and Shh During Vertebrate Limb Development - Dorsal Signals Regulate Anteroposterior Patterning. *Cell*, **80**, 939-947.
- Yi, C.H., Russ, A., and Brook, J.D. (2000). Virtual cloning and physical mapping of a human T-box gene, TBX4. *Genomics*, **67**, 92-95.
- Yonei-Tamura, S., Endo, T., Yajima, H., Ohuchi, H., Ide, H., and Tamura, K. (1999). FGF7 and FGF10 directly induce the apical ectodermal ridge in chick embryos. *Developmental Biology*, **211**, 133-143.
- Yoshioka, H., Meno, C., Koshiba, K., Sugihara, M., Itoh, H., Ishimaru, Y., Inoue, T., Ohuchi, H., Semina, E.V., Murray, J.C., Hamada, H., and Noji, S. (1998). Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell*, **94**, 299-305.
- Yu, X.Y., St Amand, T.R., Wang, S.S., Li, G.Y., Zhang, Y.D., Hu, Y.P., Nguyen, L., Qiu, M.S., and Chen, Y.P. (2001). Differential expression and functional analysis of Pitx2 isoforms in regulation of heart looping in the chick. *Development*, **128**, 1005-1013.
- Zakany, J., Kmita, M., and Duboule, D. (2004). A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science*, **304**, 1669-1672.
- Zakaria, M.M., Jeong, K.H., Lacza, C., and Kaiser, U.B. (2002). Pituitary homeobox 1 activates the rat FSH beta (rFSH beta) gene through both direct and indirect interactions with the rFSH beta gene promoter. *Molecular Endocrinology*, **16**, 1840-1852.
- Zeng, X., Goetz, J.A., Suber, L.M., Scott, W.J., Schreiner, C.M., and Robbins, D.J. (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature*, **411**, 716-720.
- Zhang, N., Norton, C.R., and Gridley, T. (2002). Segmentation defects of notch pathway mutants and absence of a synergistic phenotype in lunatic fringe/radical fringe double mutant mice. *Genesis*, **33**, 21-28.
- Zhang, N.A. and Gridley, T. (1999). Limbs move beyond the Radical fringe - Reply. *Nature*, **399**, 743.

Zuniga,A. and Zeller,R. (1999). Gli3 (Xt) and formin (Id) participate in the positioning of the polarising region and control of posterior limb-bud identity. *Development*, **126**, 13-21.

Zwilling, E. Ectoderm-mesoderm relationship in the development of the chick embryo limb bud. *J.Exp.Zool.* 128, 423-441. 1956a.

Ref Type: Generic

Zwilling, E. Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. I. axis establishment. *J.Exp.Zool.* 132, 157-171. 1956b.

Ref Type: Generic

Annexe I

***PITX1* AND *PITX2* ARE REQUIRED FOR DEVELOPMENT
OF HINDLIMB BUDS**

***Pitx* genes and hindlimb development**

Alexandre Marcil¹, Émilie Dumontier¹, Michel Chamberland¹,
Sally A. Camper², Jacques Drouin^{1*}

¹Laboratoire de génétique moléculaire
Institut de recherches cliniques de Montréal
110 avenue des Pins Ouest
Montréal QC Canada H2W 1R7

²Department of Human Genetics
University of Michigan Medical School
Ann Arbor MI 48109-0638 USA

Keywords: Pitx1 (*Ptx1*), Pitx2, limb development, patterning

***Corresponding author:** Dr Jacques Drouin
Unité de recherche en génétique moléculaire
Institut de recherches cliniques de Montréal
110 avenue des Pins Ouest
Montréal QUÉBEC Canada H2W 1R7
Tel: 514-987-5680
Fax: 514-987-5575
[REDACTED]

SUMMARY

Two closely related homeobox transcription factors, *Pitx1* and *Pitx2*, have been implicated in patterning of lateral plate mesoderm derivatives, *Pitx1* for specification of hindlimb identity and *Pitx2* for determination of laterality. We now show that together *Pitx1* and *Pitx2* are required for formation of hindlimb buds, and when present in limited dosage, for development of proximal (femur) and anterior (tibia and digit 1) hindlimb structures. While *Pitx1* is expressed throughout developing hindlimb buds, *Pitx2* is not expressed in limb bud mesenchyme itself but is co-expressed with *Pitx1* in the presumptive hindlimb field before bud growth. Thus, *Pitx1* and *Pitx2* genes are required for sustained hindlimb bud growth and formation of hindlimbs.

INTRODUCTION

Limb patterning and growth appear to be intimately interrelated as the same signals have been implicated in both processes. In particular, members of the fibroblast growth factor (Fgf) family are associated with early events of limb induction, outgrowth and maintenance (Martin, 1998). An early marker of limb field specification is provided by the restriction of *Fgf10* expression within the lateral plate mesoderm (lpm) corresponding to this field (Ohuchi et al., 1997). Signals for restriction of *Fgf10* expression to this field may involve *Fgf8* in the corresponding intermediate mesoderm (Crossley et al., 1996) and/or Wnt signalling molecules (Kawakami et al., 2001). This early restricted expression of *Fgf10* appears responsible for induction of *Fgf8* in the overlying surface ectoderm destined to become the apical ectodermal ridge (AER) of the growing limb. This initial action of *Fgf10* appears essential for limb outgrowth since *Fgf10* deficient mice failed to develop limbs (Min et al., 1998; Sekine et al., 1999). In turn, the AER and growth factors it produces, including *Fgf8*, play an essential role for limb bud outgrowth (Fallon et al., 1994; Sun et al., 2002; Lewandoski et al., 2000; Crossley et al., 1996; Niswander et al., 1993). One of these roles is for the maintenance of *Fgf10* expression in the growing limb mesenchyme (Crossley et al., 1996; Ohuchi et al., 1997). In addition, the AER and *Fgf8* are important for induction of anterior/posterior (A/P) polarity. Indeed, *Fgf8* is required for induction of the zone of polarising activity (ZPA), a structure that expresses the posteriorizing signal molecule sonic hedgehog (*Shh*) (Lewandoski et al., 2000). In turn, *Shh* feedbacks on the AER to induce expression of another growth factor, *Fgf4* (Zuniga et al., 1999).

En-1 and *Lmx1b* are both transcription factors of the homeodomain family and they appear to play roles in marking the identity of ventral or dorsal limb domains

respectively (Chen and Johnson, 1999). Indeed, the knockout of these genes lead to the loss of ventral (*En-1*) (Logan et al., 1997; Loomis et al., 1998) or dorsal (*Lmx1b*) structures in mice (Chen et al., 1998; Dreyer et al., 1998). Similarly, the identity of proximo-distal domains in the limb appears to be defined very early in the growing limb bud. In particular, the proximal limb domain where stylopod (femur or humerus) will form is marked by expression of other homeobox-containing transcription factors, *Meis1* and *Meis2*, and gain-of-function experiments in chick embryos have suggested that this restricted expression is required for specification of both zeugopod and stylopod domains of the limb (Capdevila et al., 1999; Mercader et al., 2000).

The scheme described above for limb induction, patterning, and growth is thought to be a generic one acting both at forelimbs (FL) and hindlimbs (HL). However, the appearance of distinct HL during evolution has likely required a new set of signals and transcription factors to mark the identity of HL by comparison to FL. The extent to which FL represent a default pathway for limb formation remains a subject of debate although FL-specific transcription factors such *Tbx5* have been identified (Chapman et al., 1996; Gibson-Brown et al., 1996; Gibson-Brown et al., 1998; Logan et al., 1998b) and involved in FL formation (Basson et al., 1997; Li et al., 1997; Rodriguez-Esteban et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). The implication of transcription factors for specification of HL identity is clearer. Indeed, the homeobox containing transcription factor *Pitx1* (*Ptx1*) was shown to become specifically restricted to HL mesenchyme following its early expression throughout posterior lpm (Lanctôt et al., 1997). The role of *Pitx1* in HL identity was clearly supported by gene inactivation experiments in mice that resulted in HLs showing features of FL in particular at the level of zeugopod and knee joint (Lanctôt et al., 1999b; Szeto et al., 1999). The interpretation of these studies

were further supported by gain-of-function experiments using retrovirus-mediated *Pitx1* expression in FL buds of chick embryos: the resulting wings developed with partial features of legs both at the level of skeleton and muscle (Logan and Tabin, 1999). Another transcription factor, a member of the T-box family *Tbx4*, was also implicated in specification of HL identity but its expression appears to be downstream and, in part, under control of *Pitx1* (Lanctôt et al., 1999b; Szeto et al., 1999; Logan and Tabin, 1999).

A surprising observation made on *Pitx1*^{-/-} embryos was a relatively frequent left-right (L-R) asymmetry in the severity of the phenotype (Lanctôt et al., 1999b). Indeed, femur length was found to be more often reduced on the right compared to left HLs. Since the *Pitx1*-related homeobox factor *Pitx2* was shown to be an effector for L-R asymmetry in the lpm (Logan et al., 1998a; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Yoshioka et al., 1998), we have suggested that redundancy between the *Pitx* genes may explain the L-R asymmetry in the phenotype of *Pitx1*^{-/-} embryos. This redundancy is somewhat counter-intuitive because under normal conditions both limbs are symmetrical and are not subject to L-R patterning. In part to verify this hypothesis, we generated mice that are double mutants for *Pitx1* and *Pitx2*. The analysis of these mice not only confirmed an apparent redundancy between the two factors but unexpectedly highlighted a co-operative role of both *Pitx* genes in formation of HL buds.

MATERIALS AND METHODS

Mice

The *Pitx1* and *Pitx2* mutant alleles (Fig.1A) and their phenotypes were described previously (Gage et al., 1999; Lanctôt et al., 1999b). Genotyping of embryos or pups was done by PCR as described (Gage et al., 1999; Lanctôt et al., 1999b) using DNA

isolated from the newborn's tail or umbilical cord/amniotic membrane. Separate PCR reactions were done for *Pitx1* and *Pitx2* genotyping. Except for *Pitx1*^{-/-} mice in the 129sv background, all other mice used in this study were in mixed genetic background. Noon of the day on which a vaginal plug was detected was considered as ~E0.5. Embryos were staged more precisely by counting the number of somites posterior to the forelimb bud and scoring the first one counted as somite 13 (Lewandoski et al., 2000).

Skeletal preparation and staining

E17.5 or E16.5 embryos were stained with alcian blue and alizarin red, and younger embryos (E13.5) were only stained with alcian blue as described (McLeod, 1980).

Wholemound embryo staining

Wholemound *in situ* hybridization and immunohistochemistry was done as described in protocols from Dr. Janet Rossant's laboratory. These two protocols used can be found at <http://www.mshri.on.ca/develop/rossant/protocols.html>.

Immunohistochemistry

Section immunohistochemistry was performed as described (Lanctôt et al., 1999a) using previously characterized *Pitx1* and *Pitx2* primary antibodies (Tremblay et al., 1998; Hjalt et al., 2000). MyoD antibody was purchased from Pharmingen. Biotinylated anti-rabbit (Vector Labs, 1/150), was used as secondary antibody and revealed using streptavidin-HRP (NEL750, NEN, 1/1000) and DAB. Slides were counter-stained with methyl green.

RESULTS

Inactivation of the mouse *Pitx1* (Fig. 1A) resulted in loss of some HL-specific features and their replacement by features reminiscent of FL (Lanctôt et al., 1999b; Szeto et al., 1999). More specifically, the diameters of tibia and fibula were similar, unlike the normal bones but much like radius and ulna of FL, and secondary cartilage of the knee joints did not form in *Pitx1*^{-/-} mice, resembling instead the FL articulation. Also, the fibula contacted directly the femur in *Pitx1*^{-/-} mice as opposed to contacting the tibia in wild-type or heterozygous littermates. Femur length was also reduced in *Pitx1*^{-/-} HLs. Surprisingly, this reduction was often greater (in about 2/3 of mice) on the right compared to left side (Fig. 1B). In a mixed genetic background (129sv / Balb/c), *Pitx1*^{-/-} mice occasionally exhibited loss of digit one of the right but not left HL. However, loss of the right HL digit one occurred in all homozygous mice when the knockout allele was present in a pure 129sv background (Fig. 1C). Also occasionally, the attachment of pelvic bones to vertebrae was displaced posteriorly in *Pitx1*^{-/-} mice. Normally, the anterior tip of the ilium is attached to first sacral vertebra, S1. In knockout embryos which lack ilium, this attachment is through the acetabulum and in some embryos, it is displaced posteriorly to S2 or S3. In a few cases, this posterior displacement was asymmetrical with greater displacement on the right than left side (Fig. 1D). Taken together, these observations point to greater penetrance of the *Pitx1* null phenotype on the right than left side. In view of the predominant expression of *Pitx2*, a factor closely related to *Pitx1*, in left-side lpm, we put forward the hypothesis of a partial redundancy between these two *Pitx* genes.

In order to ascertain the putative redundancy between *Pitx1* and *Pitx2* genes, *Pitx1*^{+/-} mice were crossed with mice carrying either a hypomorphic (*neo*) or null allele of the *Pitx2* gene (Fig. 1A) (Gage et al., 1999). To obtain double mutant mice, we crossed *Pitx1*^{+/-} mice with *Pitx2*^{+/-} mice. Surprisingly, we did not get the expected Mendelian ratio of 25% double heterozygotes (*Pitx1*^{+/-},*Pitx2*^{+/-}) but only 2%. We cannot explain the poor viability of these mice. This was not observed with the *Pitx2neo* allele, which gave close to the expected yield (20%) when crossed with *Pitx1*^{+/-} mice. Double mutant embryos (*Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-}) were obtained by crossing *Pitx1*^{+/-} mice with *Pitx1*^{+/-},*Pitx2*^{+/-} mice. We only ever got one *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{-/-} embryo by intercrossing double heterozygotes and a few *Pitx1*^{-/-},*Pitx2neo*^{-/-} embryos were obtained by crossing double heterozygotes of each *Pitx2* allele.

Mutant (*Pitx1*^{-/-},*Pitx2neo/neo*) mice with the most extreme phenotype showed a much more extensive phenotype than single mutant mice (Fig. 2). Whereas *Pitx1*^{-/-} mice exhibit the patterning defects described above, *Pitx2* mutant embryos do not exhibit any obvious limb defect (Gage et al., 1999; Kitamura et al., 1997; Lin et al., 1999; Lu et al., 1999). In contrast, double mutant mice have lost three HL skeletal elements. Indeed, both right and left femur, tibia and digit one are missing in these embryos (Fig. 2). The pelvis is not more severely affected than in *Pitx1*^{-/-} mice. The identification of the only remaining zeugopodal element as fibula is based on the contact between this bone and the calcaneus. Except for the loss of digit one, it is striking how the autopod is unaffected by the double gene mutation.

In agreement with the hypothesis of a gene dosage-dependent phenotype, the loss of HL skeletal elements followed a reproducible pattern in series of embryos deficient for *Pitx1*, either carrying the *Pitx2neo/neo* alleles (data not shown) or the *Pitx2*^{+/-} alleles

(Fig. 3). The order of bone loss with progressive penetrance of the phenotype is as follows. Right digit 1 was the most sensitive to loss of Pitx function (Fig. 3B) as was observed in some *Pitx1*^{-/-} mice (Fig. 1C). In more affected embryos, the right tibia partially or completely failed to develop (Fig. 3C) and then, the right femur was lost (Fig. 3D). On the left side, dependence on Pitx function followed a similar sequence: digit 1 (Fig. 3D), tibia (Fig. 3E) followed by reduction (Fig. 3F) and loss of left femur (Fig. 2). All skeletal preparations examined (over 20 embryos) fit within this sequence of bone losses. The phenotype of these double mutant mice is in part reminiscent of embryos deficient for limb AER *Fgf8* expression. Indeed, these mice also failed to develop femur and digit 1 and the tibia is hypoplastic ((Lewandoski et al., 2000).

Analysis of early limb bud development revealed smaller HL buds (in all of over 100 embryo pairs examined), both in *Pitx1*^{-/-} and *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} embryos compared to wild-type littermates (Fig. 4). In most cases ($\approx 60\%$ of pair comparisons), limb bud size reduction was greater for double than single mutant embryos (Fig. 4A). Greater reduction was observed on right compared to left side in about 50% of either *Pitx1*^{-/-} or double mutant embryos. The reduction in *Pitx1*^{-/-} HL bud size is surprising since these embryos show patterning defects but no loss of skeletal elements, except for reduction in femur size. This observation could however be consistent with a joint role of *Pitx1* and *Pitx2* genes in early expansion of lpm in the HL field and of early limb bud mesenchyme. When measured relative to somites (Fig. 4A), the reduction in HL bud size observed in mutant embryos is striking since it results from a narrowing of the HL bud from a length of about $3\frac{1}{2}$ / 4 somites (approx. somites $24\frac{1}{2}$ to $28\frac{1}{2}$) to a length $2\frac{1}{2}$ somites in *Pitx1*^{-/-} embryos (approx. somites $25\frac{1}{2}$ to 28) and to a length about 2 somites in *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} embryos (approx. somites 26 to $27\frac{1}{2}$ -28). In all cases, the limb bud is centered on somite

27. This narrowing along the A/P axis was best revealed in embryos labelled by wholemount *in situ* hybridization with a probe for *Tbx4*, a HL-specific marker which was previously shown to be decreased in *Pitx1*^{-/-} embryos (Lanctôt et al., 1999b; Szeto et al., 1999) and which is similarly decreased in double mutant embryos (Fig. 4A). Thus, HL bud size reduction affects both outgrowth and width of the bud along the A/P axis.

Bud outgrowth is thought to be controlled by growth factors produced by the AER. In particular, *Fgf8* is the earliest growth factor to mark the AER and at E10.5, this *Fgf8* expression appears similar in single and double mutant embryos compared to wild-type (Fig. 4B). *Fgf10* expressed throughout the mesenchyme of the limb bud is also thought to play a role in growth control (Ohuchi et al., 1997). *Fgf10* expression did not appear to be affected in the single or double mutant embryos (Fig. 4C). Although expression of *Fgf8* and *Fgf10* are not grossly affected in mutant embryos, the loss of skeletal elements in double mutant embryos may reveal a failure to specify limb bud segments, for example the proximal segment from which the stylopod (femur) develops. Since this proximal segment is marked by expression of *Meis* genes, we investigated *Meis* gene expression in embryos mutant for *Pitx1*, or for *Pitx1* and *Pitx2*. In both, *Meis2* expression was similar to that of wild-type embryos (Fig. 4D); similar results were obtained for *Meis1* (data not shown). These data suggest that failure to develop stylopod (femur) in *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} embryos does not result from a failure to specify the proximal limb domain.

However, limb outgrowth could be curtailed if early expression of *Fgfs* was delayed, (Min et al., 1998; Sekine et al., 1999; Lewandoski et al., 2000; Moon and Capecchi, 2000). For this reason, we investigated early expression of *Fgf10*, *Fgf8* and other markers. As shown in Figure 4E, early HL expression (25 somites) of *Fgf10* was

not significantly altered in either *Pitx1*^{-/-} or *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} embryos. Examination of 5-10 embryos/genotype suggested a slight decrease of *Fgf10* expression, but this proved difficult to substantiate objectively. Similarly, early HL expression of *Bmp7* was not different in double compared to single mutant embryos (Fig. 4F) and AER expression of *Msx2* was also unaffected in mutant embryos (Fig. 4G). AER expression of *Fgf8* in HL starts at stage 27 somites in wild-type embryos. A similar onset was observed for *Pitx1*^{-/-} embryos although expression could be slightly reduced (Fig. 4H). AER expression of *Fgf8* was delayed in *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} embryos with an onset at stage 30 somites (Fig. 4H). Hence, a delay and/or reduction in AER expression of *Fgf8* may account in part for the phenotype of double mutant embryos, as proposed to explain the differential effect in FL or HL of conditional *Fgf8* knockout (Lewandoski et al., 2000).

The reduction in HL bud size along the A/P axis suggests that A/P patterning of the limb bud might be altered. In order to assess this within the context of global AP patterning, the expression in HL of posterior *Hox* genes was ascertained by wholemount *in situ* hybridization. At E11.5, the anterior border of *HoxC11* expression was found to be on the rostral side of somite 27 which lies in the middle of the developing HL buds (Fig. 5A). In *Pitx1*^{-/-} and *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} embryos, the anterior border of *HoxC11* expression was the same relative to somite 27 (Fig. 5A) but the narrowing of the HL bud in mutant embryos appeared to result in loss of anterior bud mesenchyme. In agreement with this, the strong band of *HoxC11* expression observed in the posterior third of wild-type HL buds is similarly posterior in mutant limb buds but the band now accounts for about half of the bud mesenchyme, as if anterior bud mesenchyme was missing (Fig. 5A). Expression of *HoxC9* and *HoxC10* was not affected in these mutant embryos (data not shown).

In order to further investigate A/P patterning within the buds, we assessed *Shh* and *Gli3* expression by wholemount *in situ* hybridization. *Shh* labels the ZPA which is known to play an important organizer function to define A/P polarity in the limb bud and *Gli3* marks the anterior bud mesenchyme. In both wild-type and *Pitx1*^{-/-} embryos, *Shh* expression was similar at the posterior margin of the limb bud (Fig. 5B). In contrast, *Shh* expression extended halfway up the limb bud in *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} embryos (Fig. 5B). Thus, the ZPA of double mutant embryos appears to extend further anteriorly compared to wild-type or *Pitx1*^{-/-} embryos. In contrast, anterior bud expression of *Gli3* was similar in mutant and wild-type embryos (Fig. 5C), indicating that anterior signals are still present in *Pitx* mutant embryos. AER expression of *Fgf4* was also extended anteriorly in mutant embryos (Fig. 5D). Given the narrowing of the limb bud, the apparent extension of the ZPA may be secondary to the loss of mesenchyme and/or extension of posterior signal. This was further assessed using another marker of posterior limb mesenchyme, *dHand*, that was previously associated with A/P patterning defects at the zeugopod and autopod levels (Charité et al., 1995; Fernandez-Teran et al., 2000). Indeed, overexpression of *dHand* in the HL has resulted in loss of tibia, similar to our double mutant mice (Charité et al., 1995). Expression of *dHand* was found to extend more into the anterior half of the HL bud in mutant embryos and a striking example of this is shown in Figure 5E where *dHand* expression extends the entire width of the right limb bud at zeugopod level but still only covers the posterior side of the left HL. Thus, the effect of the loss of *Pitx* genes, in particular at the zeugopod level, might be in part ascribed to a more anterior expression of *dHand* within the limb bud.

Clearly, the role of *Pitx* genes would be best revealed in double null mutant embryos. We only obtained one such embryo in almost two years of breeding and we got

a few *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{neo/-} embryos, which should express less *Pitx2* than null heterozygotes. These latter embryos had more severely affected HL, in particular autopods (Fig. 6A-C). Indeed, both embryos shown in Figure 6 have three remaining digits on the left side and only two on the right as revealed either by alcian blue staining of cartilage (Fig. 6B) or by in situ hybridization for *Sox9* which also marks cartilaginous condensations (Fig. 6C). The further loss of digits as *Pitx2* gene dosage was decreased is suggestive of a dependence on *Pitx* genes for expansion of limb bud mesenchyme. This idea is further supported by the single *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{-/-} embryo that we obtained (Fig. 6D). Indeed, at e12.5, this embryo had severely retarded HL development. Furthermore, the left HL bud exhibited some AER expression of *Fgf8* and it was bigger than the right HL bud. This L-R asymmetry cannot be attributed to *Pitx2* and may suggest involvement of other regulators. It thus appears that induction of AER function was not prevented in absence of both *Pitx* genes, although growth of HL buds was severely curtailed. Total *Pitx* gene expression level appears to be the most important parameter for HL bud growth as *Pitx1*^{+/-},*Pitx2*^{-/-} embryos from the same litter (Fig. 6D) had relatively normal HL bud development, in agreement with the idea that *Pitx1* has the highest expression level and is the most important for HL bud formation.

The genetic requirement for both *Pitx1* and *Pitx2* during growth and patterning of HL is surprising in view of the previously characterized expression of these genes. Whereas *Pitx1* was known to be expressed from early-on throughout the HL mesenchyme, *Pitx2* is not known to be expressed in this mesenchyme (Campione et al., 1999; Kitamura et al., 1997; Logan et al., 1998a; Mucchielli et al., 1996; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Semina et al., 1997; Yoshioka et al., 1998). It was therefore surprising to observe such strong genetic requirement for both genes and this led us to

reinvestigate in detail the expression of both *Pitx* genes from early development throughout limb growth. Both wholemount and sectioned embryos were analyzed for mRNA expression using *in situ* hybridization and for protein using immunohistochemistry. Wholemount histochemical analysis of Pitx1 and Pitx2 in early E8.5-E9.0 embryos revealed that, in addition to their joint expression in the stomodeum, both factors are also co-expressed in the tail bud region presumed to become the HL field (Fig. 7). As previously reported (Lancôt et al., 1997), Pitx1 expression was restricted to the lpm of the posterior end of the embryo (Fig. 7A, B, C, D). Pitx2 immunoreactivity was observed in left lpm as previously reported (Logan et al., 1998a; Piedra et al., 1998; Ryan et al., 1998; Yoshioka et al., 1998). However, this expression appeared to extend throughout the length of the embryo down to the tail bud and weak expression was also detected on the right side of the tail bud (Fig. 7A, B, C, D). This expression is much weaker than that of Pitx1. The unexpected observation of co-expression of Pitx1 and Pitx2 in the tail bud region destined to become HL may offer the explanation for the genetic interaction between the two *Pitx* genes. Later in development, Pitx1 expression is maintained throughout HL mesenchyme (Fig. 7E, F) whereas Pitx2 is not present in HL mesenchyme (Fig. 7E). The only limb bud expression of Pitx2 was observed in myoblasts (Fig. 7F) as indicated by the similarity with the pattern of MyoD (Fig. 7F) and Pax3 (data not shown) expression. It had previously been shown that *Pitx2* is expressed in chick myotomes and myoblasts (Logan et al., 1998a; Piedra et al., 1998). It is very unlikely that *Pitx2* expression in muscle cells may be an important determinant for the growth and patterning defects observed in double mutant mice since *plotch* mice which do not form limb muscle still form all skeletal elements (Henderson et al., 1999). Thus,

co-expression of *Pitx1* and *Pitx2* is limited to the mesoderm of the very early HL field and both genes appear required for early expansion of limb bud mesenchyme.

DISCUSSION

The present work indicates that *Pitx* genes play essential roles for patterning and growth of HL structures. At least one function of these genes appears to take place much before the onset of limb bud outgrowth and may determine the potential of the HL field. This was not expected from analysis of *Pitx1*-deficient embryos because *Pitx1* was primarily associated with patterning defects during HL specification (Lanctôt et al., 1999b; Szeto et al., 1999). We have found that HL buds of *Pitx1*^{-/-} and, even more so, *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} embryos are significantly narrower (along the A/P axis) and shorter (along the P/D axis) than those of littermate controls (Fig. 4 and 5). Although these smaller limb buds are similarly positioned along the A/P axis (centered around somite 27), the loss of bud mesenchyme appeared greater on the anterior side upon inactivation of the *Pitx1* gene, and further loss was observed in double mutant embryos (Fig. 4 and 6). This stepwise loss of limb bud mesenchyme leads to a different ratio of anterior compared to posterior mesenchyme. Indeed, using *HoxC11*, *Shh* or *dHand* as markers of posterior bud mesenchyme, it is clear that the proportion of the limb bud expressing those posterior marker genes becomes greater in *Pitx1*^{-/-} and *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} mice (Fig. 5). The greater loss of skeletal elements observed in the few *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{neo/-} embryos that we obtained (Fig. 6A, B, C) might have resulted from even greater losses of early limb bud mesenchyme than that shown in Figure 4. This is supported by the very small HL buds observed on the single *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{-/-} embryo obtained (Fig. 6D). This embryo may be similar to *Fgf10*^{-/-} embryos which have almost no limb buds (Min et al., 1998;

Sekine et al., 1999). Be that as it may, the loss of skeletal structures (Fig. 2 and 3) observed in the single and double mutant embryos appeared most likely to result from an essential and dosage-dependent role of *Pitx* genes in early mesoderm (Fig. 7), much before the initiation of limb bud outgrowth. Since *Pitx2* is not expressed in the growing HL bud (Fig. 7), we are left to speculate that the early coexpression of *Pitx1* and *Pitx2* in mesoderm either determines the growth potential of this tissue in the HL forming region and/or that the two *Pitx* genes are essential for patterning the limb field (Fig. 8).

Hindlimb specification and patterning role of *Pitx1*

Pitx1 was identified as the most upstream gene in a cascade that also includes *Tbx4* for specification of HL identity. This model derived from knockout of the *Pitx1* gene in mice (Lanctôt et al., 1999b; Szeto et al., 1999), and overexpression of *Pitx1* (Logan and Tabin, 1999) and of *Tbx4* (Takeuchi et al., 1999) in chick wing buds. The consequences of these manipulations were mostly observed at the level of zeugopod and at the boundary between zeugopod and stylopod. Indeed, the autopod is not drastically affected by *Pitx1* inactivation in mice. Other HL-specific factors include *HoxC10* and *C11* (Nelson et al., 1996; Peterson et al., 1994) and these were shown to be induced by ectopic expression of *Pitx1* in FL (Logan and Tabin, 1999), suggesting that they may be downstream of *Pitx1*. Our results do not agree with this interpretation as *HoxC10* and *C11* expression is unaffected in *Pitx1*^{-/-} or double mutants.

In view of the effect of *Pitx1* deficiency on early HL bud outgrowth (Fig. 4 and 5), it is worthwhile re-visiting the phenotype of *Pitx1*^{-/-} mice in order to differentiate, if possible, *Pitx1* functions that may be truly involved in specification as opposed to those that involve dosage-dependence and redundancy with *Pitx2*. Two aspects of the *Pitx1* knockout qualitatively affect HL skeletal structures producing a resemblance to FL

structures. These are the absence of secondary cartilage development leading to the formation of an articulation that is more elbow- than knee-like, and the contact of fibula with femur instead of tibia much like the contact between equivalent bones in FLs (Lanctôt et al., 1999b). These transformations are most likely to reflect a true HL specification role of *Pitx1*. In contrast, the reduction in femur length may be associated with defects in growth regulation rather than specification or patterning.

***Pitx* gene expression in posterior mesoderm and in HL bud mesenchyme**

The demonstration of strong genetic interaction between the *Pitx1* and *Pitx2* genes poses the question of where and when might the two genes be co-expressed or, if not co-expressed, what might be the tissues that interact to account for the phenotype of the double mutants. The expression of *Pitx1* from very early in posterior lpm and throughout the HL bud mesenchyme was already well established (Lanctôt et al., 1997). However, *Pitx2* did not appear to be present in limb buds, except in myoblasts, and, when re-assessed using immunocytochemistry, we confirmed that *Pitx2* is not expressed in HL mesenchyme (Fig. 7E). However, *Pitx1* and *Pitx2* were detected with similar patterns of expression on both sides of the tail bud at the 7-15 somite stages of development (E8.5-E9.0), with *Pitx2* showing L-R asymmetry (Fig. 7A-D). Thus, this very early co-expression of *Pitx* factors likely accounts for their function in limb bud formation. The higher *Pitx1* protein levels (compared to *Pitx2*) in this area would be consistent with the absence of marked HL phenotype in *Pitx2*^{-/-} embryos (Gage et al., 1999; Kitamura et al., 1999; Lin et al., 1999; Lu et al., 1999) or in *Pitx*^{+/-}, *Pitx2*^{-/-} embryos (Fig. 6D). In normal conditions, the function of *Pitx* genes in the HL field would thus be primarily served by *Pitx1* and it is only in its absence that the contribution of *Pitx2* to limb bud growth

becomes evident. This interpretation would also be consistent with the fact that asymmetrical development of HL is only observed in the absence of *Pitx1*.

Mesoderm outgrowth and limb development

The earliest phenotype observed in *Pitx*-deficient embryos is the reduction in HL bud size both along the A/P and P/D axes (Fig. 4). The observation that this phenotype is sometimes asymmetrical is consistent with the partial penetrance of the *Pitx2* alleles in the *Pitx1*^{-/-} background (Fig. 3). Hence, this phenotype is correlated with *Pitx* gene dosage effects observed in the present study. In *Pitx1*^{-/-} embryos, the variable reduction in femur length with its strong bias for the right side correlates well with the reduction of HL bud size (both right side biases observed in 50-60% embryos). The impairment of HL bud growth was almost complete in absence of both *Pitx* genes (Fig. 6D), despite relatively conserved AER and bud functions in *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} embryos as revealed using markers such as *Fgf8*, *Fgf10*, *Bmp7*, *Msx2*, *Fgf4*, *HoxC11*, *dHand*, *Shh*, *Gli3* and *Meis* (Fig. 4, 5, 6). The similarity of HL phenotypes produced by inactivation of both *Pitx* genes (Fig. 6D) or of *Fgf10* (Min et al., 1998; Sekine et al., 1999) suggests that they may be mediated through similar mechanisms. Although both mutant mice initiate bud outgrowth, *Fgf10*^{-/-} embryos did not exhibit AER function whereas *Pitx* mutant embryos do. Since *Fgf10* expression was not significantly affected in double mutant embryos (Fig. 4C, 4E), it may not be the production of *Fgf10* or of another signal [such as *Fgf8* which was still induced in AER of the *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{-/-} embryo (Fig. 6D)], that is dependent on *Pitx* genes. Rather, it may be the ability to respond to signals that is *Pitx*-dependent. The simplest model for the role of *Pitx1* and 2 genes in HL bud formation may thus be that these genes are required for appropriate growth response of HL field mesenchyme to growth factors, such as *Fgf10* (Fig. 8A). Alternatively, we cannot exclude the possibility

that *Pitx* genes are required for *Fgf10* expression itself (Fig. 8B) since we could not assess its expression in a double null mutant.

How could *Pitx* genes be essential for formation of proximal (femur) and anterior (tibia and first digit) structures? Given their early co-expression, *Pitx* genes may be required for patterning the proximal/anterior domain of the HL field. The *Pitx* genes would thus be essential for expression of an anterior-specific factor that remains to be identified. Indeed, a factor with the expected expression or function is not currently known. The *Pitx* genes themselves do not appear to be the anterior-specific signal since their expression did not show A-P differences at the HL level (Fig. 7), but they may nonetheless serve a permissive function. Alternatively, the progressive loss of anterior and proximal structures first on the right and then on the left side (Fig. 3) would be consistent with an impairment of bud mesenchyme growth dependent on *Pitx* gene dosage.

The loss of anterior HL bud mesenchyme (Fig. 4A) is associated with loss of anterior skeletal elements, first digit and tibia (Fig. 2 and 3). These observations correlate well with excision experiments performed on chick wing buds in which removal of the anterior half bud resulted in loss of anterior structures, i.e. anterior digit and radius (FL equivalent of tibia), together with proximal part of humerus (Warren, 1934; Saunders, Jr., 1948). Thus, the primary defects associated with *Pitx* genes deficiency is the early loss of bud mesenchyme, which may result in loss of anterior skeletal elements. Since most signalling appears to be intact in double *Pitx* mutant embryos, including *Shh* and *Gli3*, their reduced HL buds may be subjected to disproportionate posteriorizing activity (Fig. 5) and this may also contribute to the loss of anterior skeletal elements.

It is interesting to compare *Pitx1* and *Pitx2* deficiency with conditional inactivation of AER *Fgf8*. In one study, HL knockout of *Fgf8* resulted in loss of femur and first digit, but not tibia (Lewandoski et al., 2000). In another study in which *Fgf8* knockout was targeted to FL, radius and first digit were lost in 100% embryos and humerus in 70% (Moon and Capecchi, 2000). It was proposed that rescue of the zeugopod might be ascribed to AER expression of *Fgf4* which is expressed later and more posteriorly than *Fgf8* (Lewandoski et al., 2000; Tickle and Munsterberg, 2001). This is consistent with the double knockout of limb *Fgf8* and *Fgf4* which abrogated limb bud development (Sun et al., 2002); this latter work also supported a model of sequential growth of bud mesenchyme pre-specified for proximo-distal structures. In *Pitx* double mutant embryos, the delay in AER expression of *Fgf8* (Fig. 4H) may thus contribute to the reduced size of proximal structures. However, although AER expression of *Fgf8* was delayed from stage 27 somites to 30 somites (Fig. 4H), it is noteworthy that other AER or bud markers are not significantly affected in mutant embryos. These include *Fgf10* (Fig. 4E), which is essential for *Fgf8* expression (Ohuchi et al., 1997), *Bmp7* (Fig. 4F), *Msx2* (Fig. 4G), *Gli3* (Fig. 5C), and *Fgf4* (Fig. 5D). Also, the presence of AER *Fgf8* in HL bud of the *Pitx1*^{-/-}, *Pitx2*^{-/-} embryo (Fig. 6D) argues against a primary role of *Pitx* genes in establishment of AER function. Taken together with intact *Fgf10* expression in *Pitx1*^{-/-}, *Pitx2*^{+/-} embryos and with the restricted co-expression of *Pitx* genes in early limb field lpm, these data are consistent with a role of *Pitx* genes in determining the growth capacity of limb bud mesenchyme (Fig. 8A).

Limb malformations resulting from thalidomide exposure may resemble to some extent the loss of HL skeletal elements in *Pitx* deficient mice. In children with thalidomide defects, upper limbs are affected more frequently than lower limbs but the

sequence of limb loss with severity is usually thumb (1st digit), radius, humerus and ulna (Smithells and Newman, 1992). In legs, tibia and femur are most often affected. These deficiencies are similar to those observed for HL in *Pitx* mutant embryos, suggesting a possible relationship in mechanism.

What about forelimbs?

The present study suggests an important function of *Pitx* gene dosage in the growth and patterning of HLs. However, none of the mutant embryos described in the present work has any phenotype in FL. We must therefore conclude that *Pitx* genes do not play any role in FL development and this is consistent with the absence of *Pitx1* or *Pitx2* expression in FL buds, except in myoblasts. This is a somewhat surprising conclusion but the later appearance of HL during evolution would not be incompatible with the recruitment of *Pitx* genes for growth and patterning of HLs independently of mechanisms acting at FLs. It is unlikely that another *Pitx* gene may fulfill a similar function in FLs as the only other *Pitx* gene known, *Pitx3*, is not expressed in early FL buds (unpublished observations by *in situ* hybridization and immunohistochemistry). In this context, the control of HL bud growth by *Pitx* genes may be viewed as a recent function.

Recent work suggests that the *Tbx5* gene plays an essential role for outgrowth of forelimb buds that resembles that of *Pitx* genes in HL. Indeed, FL buds do not develop in *Tbx5*^{-/-} mouse embryos [(Agarwal et al., 2002) and M. Logan, pers. comm.]. In contrast, the HL-specific *Tbx4* gene does not appear to play a similar limiting role for HL bud outgrowth since *Tbx4*^{-/-} embryos develop HL buds (V. Papaioannou, pers. Comm.). The role of *Tbx4* thus appears to be primarily in specification of HL identify. Taken together, these studies suggest different mechanisms for outgrowth and specification in HL and FL

(Fig. 8C). In FL, the primary gene controlling both outgrowth and specification appears to be *Tbx5* whereas in HL, these roles are taken by *Pitx1*, with the downstream *Tbx4* contributing together with *Pitx1* only for specification of HL identity.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Cliff Tabin and David Lohnes, as well as to members of the lab, for critical comments on the manuscript. We are thankful to Julie D'Amours for managing the mouse colony and to Alain Moreau for setting up our mouse database. We also thank Jennifer Farrah, Pascale Blaise, Marta Camilot and Thi Som Mai Le for genotyping. We are grateful to Jeff Murray and Tord Hjalt for the *Pitx2* antiserum. The *HoxC10* and *C11* probes were kindly provided by Mario Cappechi, *Fgf8* by Gail Martin, *Fgf10* by Nobu Itoh, *Meis2* by Guy Sauvageau and *dHand* by Jay Cross. We are grateful for the efficient help of Claire Crevier for preparation of histology sections and Lise Laroche for secretarial help. A.M. was supported by a studentship from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). This work was supported by the Canadian Institute of Health Research.

REFERENCES

- Agarwal P., Wylie J. N., Galceran J., Arkhitko O., Li C., Deng C., Grosschedl R. and Bruneau B. G. (2002).** Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development* **In press**,
- Basson C. T., Bachinsky D. R., Lin R. C., Levi T., Elkins J. A., Soultz J., Grayzel D., Kroumpouzou E., Traill T. A., Leblanc-Straceski J., Renault B., Kucherlapati R., Seidman J. G. and Seidman C. E. (1997).** Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat.Genet.* **15**, 30-35.
- Campione M., Steinbeisser H., Schweickert A., Deissler K., van Bebber F., Lowe L. A., Nowotschin S., Viebahn C., Haffter P., Kuehn M. R. and Blum M. (1999).** The homeobox gene Ptx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* **126**, 1225-1234.
- Capdevila J., Tsukui T., Esteban C. R., Zappavigna V. and Belmonte J. C. I. (1999).** Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Mol.Cell* **4**, 839-849.
- Chapman D. L., Garvey N., Hancock S., Alexiou M., Agulnik S. I., Gibson-Brown J. J., Cebra-Thomas J., Bollag R. J., Silver L. M. and Papaioannou V. E. (1996).** Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev.Dynamics* **206**, 379-390.
- Charité J., de Graaff W., Vogels R., Meijlink F. and Deschamps J. (1995).** Regulation of the Hoxb-8 gene: synergism between multimerized cis-acting elements increases responsiveness to positional information. *Dev.Biol.* **171**, 294-305.

- Chen H. and Johnson R. L.** (1999). Dorsoventral patterning of the vertebrate limb: a process governed by multiple events. *Cell Tissue Res.* **296**, 67-73.
- Chen H., Lun Y., Ovchinnikov D., Kokubo H., Oberg K. C., Pepicelli C. V., Gan L., Lee B. and Johnson R. L.** (1998). Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of *LMX1B* in human nail patella syndrome. *Nat. Genet.* **19**, 51-55.
- Crossley P. H., Minowada G., MacArthur C. A. and Martin G. R.** (1996). Roles for *FGF8* in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **84**, 127-136.
- Dreyer S. D., Zhou G., Baldini A., Winterpacht A., Zabel B., Cole W., Johnson R. L. and Lee B.** (1998). Mutations in *LMX1B* cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat. Genet.* **19**, 47-50.
- Fallon J. F., Lopez A., Ros M. A., Savage M. P., Olwin B. B. and Simandl B. K.** (1994). *FGF-2*: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* **264**, 104-107.
- Fernandez-Teran M., Piedra M. E., Kathiriya I. S., Srivastava D., Rodriguez-Rey J. C. and Ros M. A.** (2000). Role of *dHAND* in the anterior-posterior polarization of the limb bud: implications for the Sonic hedgehog pathway. *Development* **127**, 2133-2142.
- Gage P. J., Suh H. Y. and Camper S. A.** (1999). Dosage requirement of *Pitx2* for development of multiple organs. *Development* **126**, 4643-4651.
- Gibson-Brown J. J., Agulnik S. I., Chapman D. L., Alexiou M., Garvey N., Silver L. M. and Papaioannou V. E.** (1996). Evidence of a role for T-box genes in the

evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech.Dev.* **56**, 93-101.

Gibson-Brown J. J., Agulnik S. I., Silver L. M., Niswander L. and Papaioannou V. E. (1998). Involvement of T-box genes Tbx2-Tbx5 in vertebrate limb specification and development. *Development* **125**, 2499-2509.

Henderson D. J., Conway S. J. and Copp A. J. (1999). Rib truncations and fusions in the Sp2H mouse reveal a role for Pax3 in specification of the ventro-lateral and posterior parts of the somite. *Dev.Biol.* **209**, 143-158.

Hjalt T. A., Semina E. V., Amendt B. A. and Murray J. C. (2000). The Pitx2 protein in mouse development. *Dev.Dyn.* **218**, 195-200.

Kawakami Y., Capdevila J., Buscher D., Itoh T., Rodriguez E. C. and Izpisua Belmonte J. C. (2001). WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* **104**, 891-900.

Kitamura K., Miura H., Miyagawa-Tomita S., Yanazawa M., Katoh-Fukui Y., Suzuki R., Ohuchi H., Suehiro A., Motegi Y., Nakahara Y., Kondo S. and Yokoyama M. (1999). Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, e. *Development* **126**, 5749-5758.

Kitamura K., Miura H., Yanazawa M., Miyashita T. and Kato K. (1997). Expression patterns of /brx1 (Rieg gene), Sonic hedgehog, Nkx2.2, D1x1 and Arx during zona limitans intrathalamica and embryonic ventral lateral geniculate nuclear formation. *Mech.Dev.* **67**, 83-96.

Lanctôt C., Gauthier Y. and Drouin J. (1999a). Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* **140**, 1416-1422.

- Lancôt C., Lamolet B. and Drouin J. (1997).** The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124**, 2807-2817.
- Lancôt C., Moreau A., Chamberland M., Tremblay M. L. and Drouin J. (1999b).** Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development* **126**, 1805-1810.
- Lewandoski M., Sun X. and Martin G. R. (2000).** Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat.Genet.* **26**, 460-463.
- Li Q. Y., Newbury-Ecob R. A., Terrett J. A., Wilson D. I., Curtis A. R., Yi C. H., Gebuhr T., Bullen P. J., Robson S. C., Strachan T., Bonnet D., Lyonnet S., Young I. D., Raeburn J. A., Buckler A. J., Law D. J. and Brook J. D. (1997).** Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat.Genet.* **15**, 21-29.
- Lin C. R., Kioussi C., O'Connell S., Briata P., Szeto D., Liu R., Izpisua Belmonte J. C. and Rosenfeld M. G. (1999).** Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* **401**, 279-282.
- Logan C., Hornbruch A., Campbell I. and Lumsden A. (1997).** The role of Engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development* **124**, 2317-2324.
- Logan M., Pagán-Westphal S. M., Smith D. M., Paganessi L. and Tabin C. J. (1998a).** The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* **94**, 307-317.
- Logan M., Simon H. G. and Tabin C. (1998b).** Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity. *Development* **125**, 2825-2835.

- Logan M. and Tabin C. J.** (1999). Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* **283**, 1736-1739.
- Loomis C. A., Kimmel R. A., Tong C. X., Michaud J. and Joyner A. L.** (1998). Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse Engrailed-1 mutant limbs. *Development* **125**, 1137-1148.
- Lu M. F., Pressman C., Dyer R., Johnson R. L. and Martin J. F.** (1999). Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* **401**, 276-278.
- Martin G. R.** (1998). The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.* **12**, 1571-1586.
- McLeod M. J.** (1980). Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue and alizarin red S. *Teratology* **22**, 299-301.
- Mercader N., Leonardo E., Piedra M. E., Martinez A., Ros M. A. and Torres M.** (2000). Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Dev.Suppl.* **127**, 3961-3970.
- Min H., Danilenko D. M., Scully S. A., Bolon B., Ring B. D., Tarpley J. E., DeRose M. and Simonet W. S.** (1998). Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev.* **12**, 3156-3161.
- Moon A. M. and Capecchi M. R.** (2000). Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat.Genet.* **26**, 455-459.
- Mucchielli M. L., Martinez S., Pattyn A., Goridis C. and Brunet J. F.** (1996). *Otx2*, an *Otx*-related homeobox gene expressed in the pituitary gland and in a restricted pattern in the forebrain. *Mol.Cell.Neurosci.* **8**, 258-271.

- Nelson C. E., Morgan B. A., Burke A. C., Laufer E., DiMambro E., Murtaugh L. C., Gonzales E., Tessarollo L., Parada L. F. and Tabin C. (1996).** Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development* **122**, 1449-1466.
- Niswander L., Tickle C., Vogel A., Booth I. and Martin G. R. (1993).** FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* **75**, 579-587.
- Ohuchi H., Nakagawa T., Yamamoto A., Araga A., Ohata T., Ishimaru Y., Yoshioka H., Kuwana T., Nohno T., Yamasaki M., Itoh N. and Noji S. (1997).** The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* **124**, 2235-2244.
- Peterson R. L., Papenbrock T., Davda M. M. and Awgulewitsch A. (1994).** The murine Hoxc cluster contains five neighboring AbdB-related Hox genes that show unique spatially coordinated expression in posterior embryonic subregions. *Mech.Dev.* **47**, 253-260.
- Piedra M. E., Icardo J. M., Albajar M., Rodriguez-Rey J. C. and Ros M. A. (1998).** Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* **94**, 319-324.
- Rodriguez-Esteban C., Tsukui T., Yonei S., Magallon J., Tamura K. and Izpisua Belmonte J. C. (1999).** The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature* **398**, 814-818.
- Ryan A. K., Blumberg B., Rodriguez-Esteban C., Yonei-Tamura S., Tamura I., Tsukui T., de la Peña J., Sabbagh W., Greenwald J., Choe S., Norris D. P., Robertson E. J., Evans R. M., Rosenfeld M. G. and Izpisua Belmonte J. C.**

- (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**, 545-551.
- Saunders J. W., Jr.** (1948). The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. 1948. *J.Exp.Zool.* **108**, 363-403.
- Sekine K., Ohuchi H., Fujiwara M., Yamasaki M., Yoshizawa T., Sato T., Yagishita N., Matsui D., Koga Y., Itoh N. and Kato S.** (1999). Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat.Genet.* **21**, 138-141.
- Semina E. V., Reiter R. S. and Murray J.** (1997). Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum.Mol.Genet.* **6**, 2109-2116.
- Smithells R. W. and Newman C. G.** (1992). Recognition of thalidomide defects. *J.Med.Genet.* **29**, 716-723.
- Sun X., Mariani F. V. and Martin G. R.** (2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* **418**, 501-508.
- Szeto D. P., Rodriguez-Esteban C., Ryan A. K., O'Connell S. M., Liu F., Kioussi C., Gleiberman A. S., Izpisua-Belmonte J. C. and Rosenfeld M. G.** (1999). Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* **13**, 484-494.
- Takeuchi J. K., Koshiba-Takeuchi K., Matsumoto K., Vogel-Hopker A., Naitoh-Matsuo M., Ogura K., Takahashi N., Yasuda K. and Ogura T.** (1999). Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* **398**, 810-814.
- Tickle C. and Munsterberg A.** (2001). Vertebrate limb development--the early stages in chick and mouse. *Curr.Opin.Genet.Dev* **11**, 476-481.

- Tremblay J. J., Lanctôt C. and Drouin J.** (1998). The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol.Endocrinol.* **12**, 428-441.
- Warren A. E.** (1934). Experimental studies on the development of the wing in the embryo of *Gallus domesticus*. *Am.J.Anat.* **54**, 449-486.
- Yoshioka H., Meno C., Koshiha K., Sugihara M., Itoh H., Ishimaru Y., Inoue T., Ohuchi H., Semina E. V., Murray J. C., Hamada H. and Noji S.** (1998). Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* **94**, 299-305.
- Zuniga A., Haramis A. P., McMahon A. P. and Zeller R.** (1999). Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* **401**, 598-602.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Pitx gene alleles and L-R asymmetry during hindlimb development. **A)** Schematic representation of the mouse *Pitx1* and *Pitx2* genes and of mutant alleles used in the present study. Numbered boxes represent exons and in each case, the null (-) alleles were produced by deletion of the homeodomain encoding exon. In the *Pitx2neo* allele, arrows indicate the position of loxP sites used by CRE recombinase to yield the null allele. **B)** Size reduction in femur length observed in *Pitx1*^{-/-} embryos. Dissected femurs from right and left side of the same skeleton stained at E17.5 for bone (red) and cartilage (blue) are shown for wild-type and knockout (-/-) embryos. **C)** All *Pitx1*^{-/-} embryos examined in the pure 129sv genetic background showed a loss of HL digit 1 on the right side only, whereas in mixed genetic background (129sv / Balb/c) all five digits were present on both sides. **D)** Ventral view of skeletal preparations showing vertebrae and HL of E17.5 mice either heterozygous (+/-) or homozygous (-/-) for the *Pitx1* knockout allele. The first sacral vertebra is indicated (S1); pelvic bones are normally (+/-) attached to S1 by the distal end of the ilium. In the majority of *Pitx1*^{-/-} embryos, this attachment is through the acetabulum since the ilium does not form in *Pitx1*^{-/-} embryos (Lanctôt et al., 1999b). However, in few rare cases, femur and pelvic bone attachment to the vertebrae is displaced posteriorly, usually to S2, and in some cases like the one shown here, displacement is even greater (S3) on the right than left side.

Figure 2. Loss of proximal (femur) and anterior (tibia and first digit) bones in HL of mice mutant for both *Pitx1* and *Pitx2*. Skeletal preparations (alizarin red, bone; alcian blue, cartilage) of E16.5 wild-type (WT) and *Pitx1*^{-/-},*Pitx2neo/neo* embryo showing the pelvic area (top right), the right and left dissected HL with one remaining

zeugopod bone and four digits (bottom right), as well as an enlargement of the right HL autopod (bottom left) showing the remaining zeugopod bone contacting the calcaneus (Ca). Based on this, it is concluded that the remaining bone is the fibula. Small cartilaginous remnants (arrowheads) between the pelvic bone and fibula could be the only remain of the femur. This skeleton represents the most extreme phenotype seen in this embryo series.

Figure 3. Progressive penetrance of HL phenotype observed in series of *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} embryos. All embryos observed fitted the sequence of bone losses illustrated here. All dissected HL are positioned similar to the wild-type preparation (A). B) The first digit of the right HL is missing. C) The right tibia is severely affected. D) The right tibia and femur did not form and the left digit 1 has disappeared. E) The left tibia is partially lost. F) There is only a remnant of the left femur. Fe, femur; T, tibia; Fi, fibula; digit number is shown in parentheses.

Figure 4. Analysis of HL bud formation in wild-type, *Pitx1*^{-/-} and *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{+/-} embryos. Dorsal views of embryos are shown with assessment of developmental stage provided by somite (so) count. A) The HL-specific transcription factor *Tbx4* mRNA was revealed by wholemount *in situ* hybridization and found to be downregulated in mutant embryos (~E10.5). This staining offered the best contrast to outline the position of somites along the A/P axis and these are indicated by numbers for each embryo. Both mutant embryos show smaller right and left HL bud compare to WT, with greater reduction on the right side. B) *In situ* hybridization for *Fgf8* revealing the AER. C) *In situ* hybridization for *Fgf10* marking the HL bud mesenchyme (~E10.0). D) *In situ* hybridization for *Meis2* mRNA revealing the proximal segment of the HL bud (~E11.5). Similar results were obtained with *Meis1* (data not shown). E) *In situ*

hybridization for *Fgf10* in HL field of 25 somite embryos (~E9). **F)** *In situ* hybridization for *Bmp7* in HL field at onset of bud growth. **G)** *In situ* hybridization for *Mxs2*. **H)** *In situ* hybridization for *Fgf8* (~E9.5) revealing early expression of *Fgf8* and initiation of HL bud outgrowth. *Fgf8* expression is delayed in *Pitx1*^{-/-}, *Pitx2*^{+/-} embryos from about 27- to 30-somite stages of development.

Figure 5. HL antero-posterior markers reveal apparent loss of anterior bud mesenchyme. Dorsal views of wholemount *in situ* hybridization embryos are shown. **A)** The anterior border of *HoxC11* mRNA is revealed at the junction between somites 26 and 27. In mutant embryos, the proportion of *HoxC11*-negative anterior mesenchyme relative to *HoxC11*-positive mesenchyme is reduced, consistent with the loss of anterior bud mesenchyme revealed in Figure 5A. **B)** The zone of polarizing activity (ZPA) is revealed by hybridization for *sonic hedgehog* (*Shh*). Whereas in WT and *Pitx*^{-/-} embryos, the ZPA occupies the posterior quadrant of the HL bud, this structure extends all the way up to half the HL buds of *Pitx1*^{-/-}, *Pitx2*^{+/-} embryos. **C)** Expression of *Gli3* in anterior hindlimb buds is present in embryos of the three genotypes. **D)** Expression of *Fgf4* in AER. The extent of *Fgf4* expression appears anteriorized in mutant embryos compared to wild-type, again in agreement with the loss of anterior mesenchyme. **E)** Expression of the posterior limb bud mesenchyme marker, *dHand*, is also extended anteriorly. Two examples at different developmental stages are shown with L-R differences in the anterior extension of *dHand* expression. Anterior bud expression of *dHand* is shown in the right HL bud of a ~E11.5 *Pitx1*^{-/-} embryo, and in the right HL of a E12.5 *Pitx1*^{-/-}, *Pitx2*^{+/-} embryo.

Figure 6. Further loss of digits in *Pitx1*^{-/-}, *Pitx2neo*^{-/-} embryos. A few *Pitx1*^{-/-}, *Pitx2neo*^{-/-} embryos were obtained and found to miss more than one HL digit. **A-B)**

Photograph (A) and skeletal preparations (B) of E13.5 wild-type and *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{neo/-} embryos showing loss of one digit on the left side and of two digits on the right side. Note absence of FL defects. C) Similar embryos in which cartilaginous condensation of the digits were revealed at E12.5 using wholemount *in situ* hybridization for *Sox9*. The *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{neo/-} embryo has three digits on left and two digits on right side. The left HL of the wild-type embryo was damaged during preparation. D) Wholemount *in situ* hybridization of AER *Fgf8* in the single *Pitx1*^{-/-},*Pitx2*^{-/-} embryo obtained. This embryo (E12.5) was underdeveloped and smaller than the *Pitx1*^{+/-},*Pitx2*^{-/-} embryo shown for comparison. Whereas FL bud development appeared normal in those embryos, very small HL buds were present in the double null embryo with a small patch of *Fgf8* expressing tissue on the left side.

Figure 7. Early expression of Pitx1 and Pitx2 proteins revealed by wholemount and section immunohistochemistry. Pitx1 protein is revealed in stomodeum (oral ectoderm) of 9 (A) and 15 (C) somites embryos. Expression in posterior lpm of 9 somites (A), 11 somites (B) and 15 somites (C, right side view; D, ventral view) is shown to be bilateral. Pitx2 protein is revealed in the head (bilateral) and in left lpm of 7 somites (A), 11 (B) and 15 (C) somites embryos. In tail bud area, note stronger expression on left side and weaker but significant expression on the right side. E) Immunohistochemical analysis of Pitx1, Pitx2 and MyoD protein expression in consecutive transverse sections of E10.5 embryos revealing Pitx1 only in HL buds. F) Consecutive sections of E11.5 HL revealing Pitx1 protein throughout the mesenchyme and Pitx2 protein in muscle cells that co-localize with MyoD-positive cells.

Figure 8. Role of Pitx genes in limb bud development. A) Model for role *Pitx1* and *Pitx2* genes in hindlimb bud formation. The early co-expression of *Pitx* genes

in the mesoderm of the limb bud field appears to be required for growth of bud mesenchyme in response to signals such as *Fgf10*. At this time, we do not have specific evidence to implicate *Fgf10* more than other signals, except for the early expression of *Pitx* genes. This model is consistent with relatively normal signaling in *Pitx* mutant embryos. **B)** Since double null *Pitx* mutants could not be studied extensively, it cannot be excluded that *Pitx* genes are required for expression of *Fgf10* and that they control the growth capacity of hindlimb bud mesenchyme in this way. **C)** Differential control of limb bud outgrowth and specification by *Pitx* and *Tbx* genes. Previous work suggested that *Tbx5* is a determinant for specification of FL identity whereas *Pitx1* and the downstream *Tbx4* gene both contribute to specification of HL identity. The present work shows that *Pitx1* and *Pitx2* genes are required for HL bud outgrowth but this function does not appear to require mouse *Tbx4* (V. Papaioannou, pers. comm.). In contrast, *Tbx5* appears to fulfill in FL an outgrowth function similar to that of *Pitx* genes in HL (Agarwal et al., 2002).

Figure 1

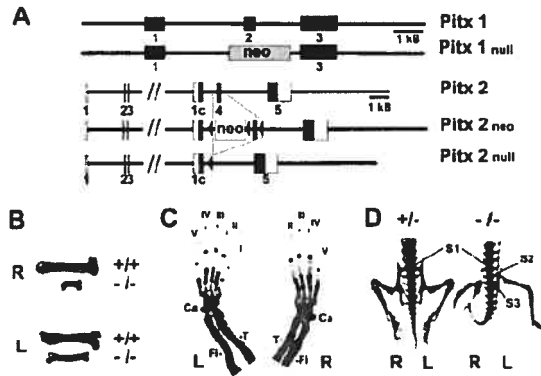


Figure 2

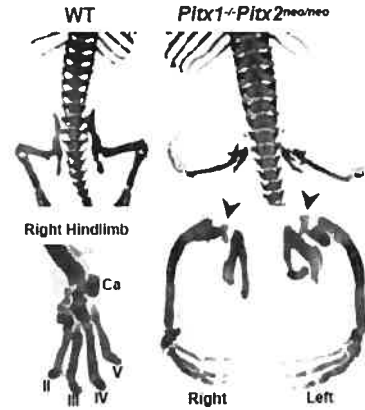


Figure 3

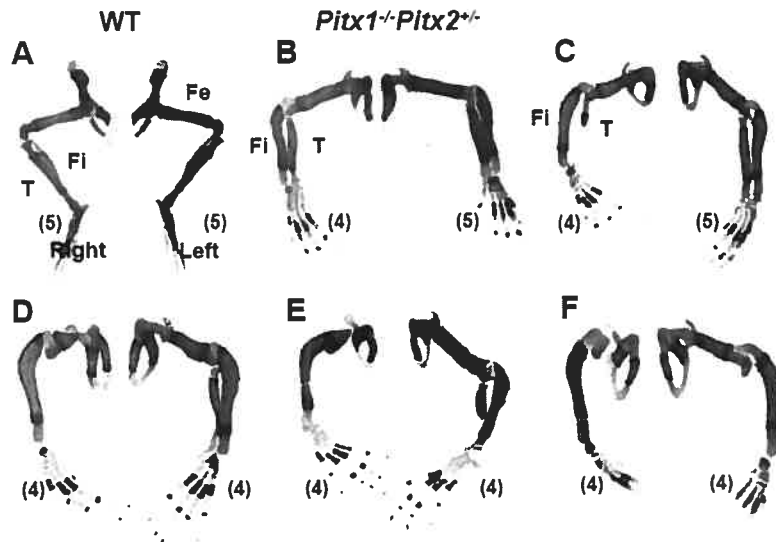


Figure 4

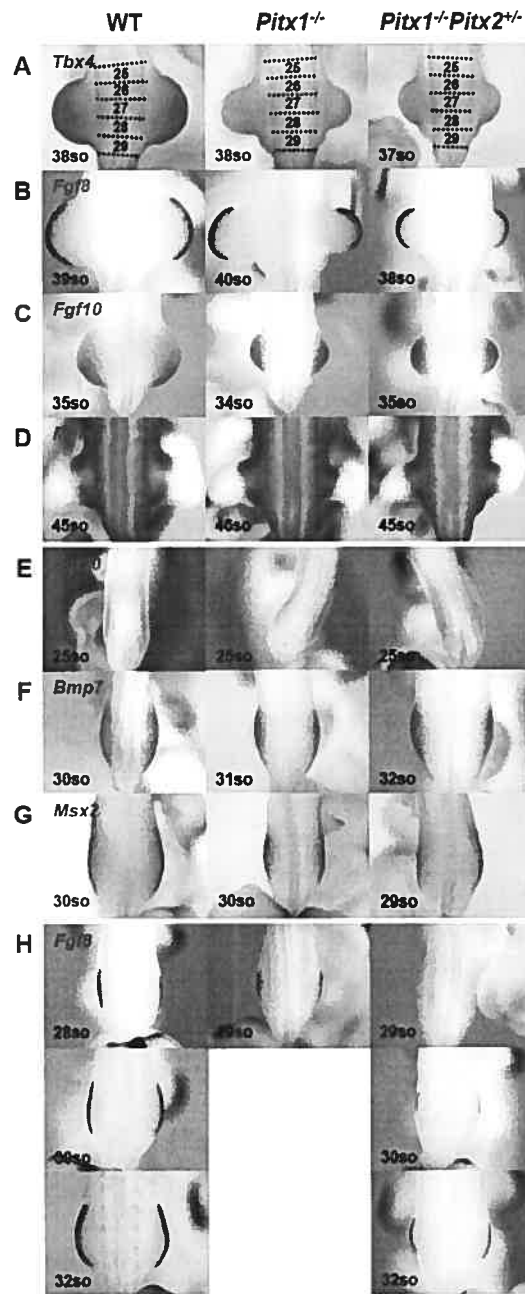


Figure 5

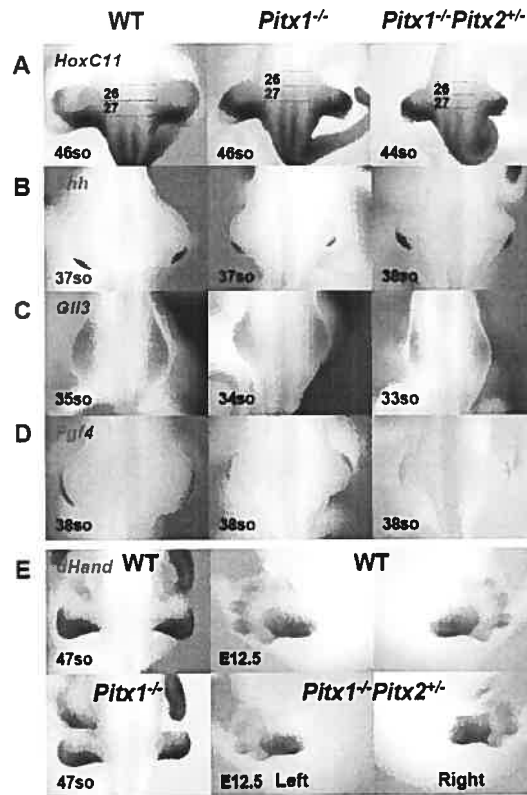


Figure 6

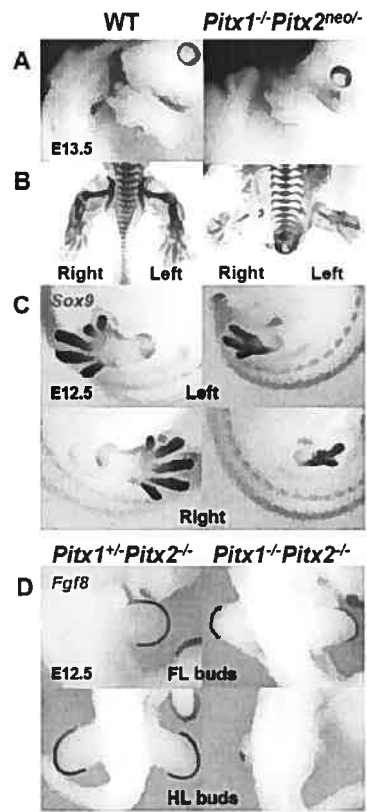


Figure 7

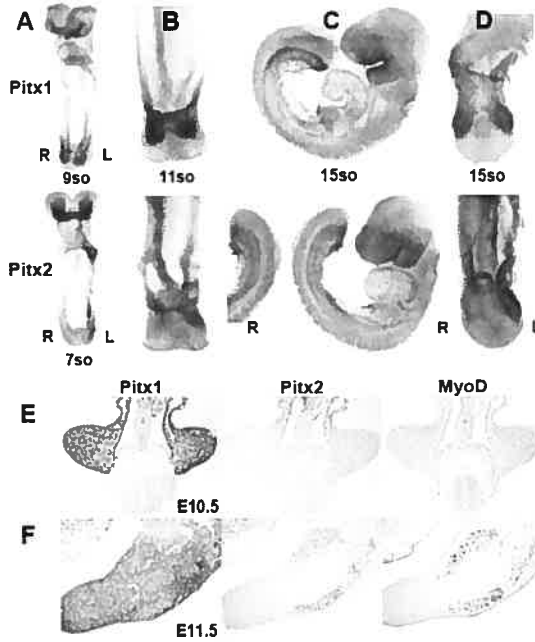
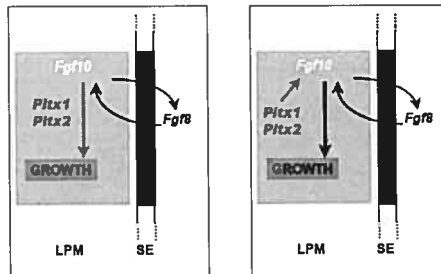


Figure 8

Dependence on Pitx genes in HL buds:

A) growth response B) expression of *Fgf10*



C) Differential control of limb bud outgrowth and specification

	Limb bud outgrowth	Specification of identity
Forelimb	<i>Tbx5</i>	<i>Tbx5</i>
Hindlimb	<i>Pitx1</i> <i>Pitx2</i>	<i>Pitx1</i> → <i>Tbx4</i>

