

Université de Montréal

Remodelage de la chromatine lors de l'activation transcriptionnelle
synergique de *cdx1* par l'acide rétinoïque et par Wnt3a

par

Daphné Dupéré-Richer

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 science (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Janvier 2006

©Daphné Dupéré-Richer, 2006



QH

506

U54

2006

v. C12

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 :

Remodelage de la chromatine lors de l'activation transcriptionnelle
synergique de *cdx1* par l'acide rétinoïque et par Wnt3a

Présenté par
Daphné Dupéré-Richer

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry, Ph.D
Présidente-rapporteuse

David Lohnes, Ph.D
Directeur de recherche

Edward Bradley, Ph.D
Membre du jury

RÉSUMÉ

Les gènes *cdx*, des homologues au gène *caudal* chez la drosophile, codent pour des facteurs de transcription à homéodomains impliqués dans la spécification de la partie postérieure de l'embryon. Un de ces membres, *cdx1*, est directement régulé par la voie des Wnts et par la voie des rétinoïdes. En fait, Wnt3a et l'acide rétinoïque (AR) exercent ensemble une forte synergie sur l'expression de *cdx1*. Les effecteurs en aval dans la voie des rétinoïdes et dans la voie des Wnts, soit les récepteurs à l'AR et LEF/TCF (lymphoïd enhancer factor/T-cell factor) respectivement, altèrent l'activité de leur gènes cibles en recrutant une panoplies de cofacteurs transcriptionnels qui ajoutent des modifications covalentes sur les histones et qui déplacent les histones sur l'ADN. Ainsi, la synergie d'activation transcriptionnelle de *cdx1* pourrait être en partie expliquée par une modification particulière de la chromatine. Par l'utilisation d'un inhibiteur d'histones desacétylase, nous démontrons que l'état d'acétylation des histones influence l'expression d'un rapporteur de *cdx1*. Des expériences d'immunoprecipitation de chromatine montrent que la synergie d'induction de *cdx1* par l'AR et par Wnt3a est corrélée à une augmentation en histones H3 et H4 acétylés et à une diminution en histones H3 diméthylés en lysines 4 dans le promoteur de *cdx1*. Ces particularités dans la configuration de la chromatine pourraient être les éléments qui mènent à un plus grand recrutement de la machinerie transcriptionnelle. L'étude de l'organisation des nucléosomes sur le promoteur de *cdx1* permettrait d'éclaircir le rôle de ces modifications et de la chromatine dans l'induction de l'expression.

MOTS-CLÉS : Histone, immunoprecipitation de chromatine (ChIP), Wnt, rétinoïde, récepteur à l'acide rétinoïque (RAR), lymphoïd enhancer factor/T-cell factor (LEF/TCF).

SUMMARY

The *Cdx* genes encode homeodomain transcription factors and are implicated in the development of the posterior embryo. One of these members, *cdx1*, is directly regulated by retinoid and Wnt signalling. Interestingly, retinoic acid and Wnt3a exert a synergistic effect on *cdx1* expression. The downstream effectors of retinoid and wnt signalling, the retinoic acid receptors and the lymphoid enhancer factor/T-cell factor respectively, control the expression of their target genes by recruiting cofactors with chromatin modifying activities including addition of covalent modifications on histone tails and displacement of histones on DNA. Thus, the synergistic activation of *cdx1* could be in part explained by a particular change in chromatin. In this study, using histone desacetylase inhibitor, we show that the histone acetylation state impacts on the expression of a *cdx1* reporter. Chromatin immunoprecipitation experiments reveal that synergistic induction of *cdx1* by RA and Wnt3a is correlated with an increase in histone H3 and H4 acetylation and with a decrease in histone H3 dimethylation on lysine 4. These particularities in the chromatin configuration could be the events leading to a higher recruitment of the transcriptional machinery. The study of nucleosome organisation on *cdx1* promoter would further clarify the role of chromatin in the induction of expression.

KEY WORDS : Histone, chromatin immunoprecipitation (ChIP), Wnt, retinoid, retinoic acid receptor (RAR), lymphoid enhancer factor/T-cell factor (LEF/TCF)

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
SUMMARY.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS.....	ix
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1 LA SIGNALISATION PAR LES RETINOÏDES.....	2
1.1.1 Métabolisme des rétinoïdes	2
1.1.1a Apport et biosynthèse des rétinoïdes	2
1.1.1b Catabolisme des rétinoïdes.....	4
1.1.1c Protéines de liaison aux rétinoïdes.....	5
1.1.2 Les récepteurs aux rétinoïdes	6
1.1.2a Structure de RAR et RXR	7
1.1.2b Liaison de RAR-RXR à l'ADN	8
1.1.2c Liaison de RAR-RXR au ligand	9
1.1.3 La régulation transcriptionnelle par RAR-RXR.....	10
1.1.3 a Les Coactivateurs de RAR-RXR	10
1.1.3 b Les corépresseurs de RAR-RXR	14
1.2 LA VOIE DES WNTS	16
1.2.1 La voie canonique.....	16
1.2.2 La signalisation à la surface cellulaire.....	17
1.2.2 La signalisation à l'intérieur de la cellule.....	18
1.2.2a La modulation de l'activité de la β -caténine.....	19
1.2.3 La régulation transcriptionnelle des gènes cibles des Wnts	19
1.2.3a Les facteurs LEF/TCFs	19
1.2.3b L'activation transcriptionnelle par la β -caténin.....	20
1.2.3c Répression transcriptionnelle par TCF	21
1.4 LA CHROMATINE	23
1.4.1 La structure de la chromatine	23

1.4.2 Les facteurs remodelant la chromatine.....	24
1.4.3 Le code des histones.....	24
1.4.3a L'acétylation et la désacétylation des histones.....	26
1.4.3b La méthylation des histones.....	27
1.4.3c La phosphorylation des histones.....	29
1.4.3d Les autres modifications des histones.....	29
1.3 LES RETINOÏDES ET LES WNTS DANS LE DEVELOPPEMENT.....	31
1.3.1 Les gènes <i>Hox</i>.....	31
1.3.2 La régulation des <i>hox</i> par l'AR et par les <i>Wnts</i>.....	31
1.3.3 La famille de gènes <i>cdx</i>.....	32
1.3.4 Expression de <i>cdx1</i> durant le développement.....	33
1.3.5 Le rôle de <i>Cdx1</i> durant le développement vertébral.....	33
1.3.6 La régulation de la transcription par <i>cdx1</i>.....	34
1.3.7 La régulation de la transcription de <i>cdx1</i>.....	35
1.4 HYPOTHÈSE.....	36
1.5 OBJECTIFS.....	37
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....	38
2.1 Lignées cellulaires et transfections.....	39
2.2 Northern blot.....	40
2.3 ChIP (immunoprécipitation de la chromatine).....	40
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	42
3.1 Étude de la régulation du promoteur de <i>cdx1</i>.....	43
3.2 Étude de l'expression de <i>cdx1</i>.....	46
3.3 La modification des histones sur le promoteur de <i>cdx1</i>.....	47
3.3.1 L'acétylation des histones.....	48
3.3.2 La méthylation des histones.....	51
3.4 <i>CARM-1</i> régule l'expression de <i>cdx1</i>.....	52
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	54
4.1 Les éléments cis régulant le promoteur de <i>cdx1</i>.....	55

4.2 L'acétylation des histones sur le promoteur de cdx1.....	58
4.3 La méthylation des histones sur le promoteur de cdx1	61
4.4 Études futures	64
4.5 Conclusion.....	65
LISTE DE RÉFÉRENCES	66

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Voies régulant le métabolisme et la biodisponibilité des rétinoïdes.
- Figure 2 :** Échanges de corégulateurs sur le promoteur des gènes cible de RAR-RXR.
- Figure 3 :** Activation de la voie canonique des Wnts.
- Figure 4 :** Modèles pour la formation de l'hétérochromatine et de l'euchromatine par des modifications sur les histones.
- Figure 5 :** Structure du promoteur de *cdx1*.
- Figure 6 :** Étude de la régulation du promoteur de *cdx1*.
- Figure 7 :** Analyse de l'expression de *cdx1*.
- Figure 8 :** Diagramme présentant les oligonucléotides utilisés sur le locus de *cdx1* pour amplifier l'ADN isolées par les expériences ChIP.
- Figure 9 :** Dynamique de l'acétylation des histones lors de l'activation transcriptionnelle de *cdx1*.
- Figure 10 :** Quantification relative de l'intensité des bandes obtenues par les expériences de ChIP sur l'acétylation des histones H3 et H4.
- Figure 11 :** Dynamique de la diméthylation en lysine 4 des histones lors de l'activation transcriptionnelle de *cdx1*.
- Figure 12 :** CARM-1 induit l'expression d'un rapporteur de *cdx1* en coopération avec RAR-RXR et en coopération avec LEF-1- β -caténine.

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

AIB1	amplified in breast cancer 1
ACTR	activator of the thyroid and retinoic acid receptor
ADH	alcool déshydrogénases cytoplasmiques à chaînes médium
AR	acide rétinoïque
APC	adenomatous polyposis coli
ASC-2	activating signal cointegrator-2
CARM-1	coactivator associated arginine methyltransferase-1
CBP	Creb binding protein
p/CAF	p300/CBP associated factor
CDK	kinases cyclin-dépendante kinases
cdk2	Cyclin Dependant Kinase 2
CHD	chromodomain helicase/ATPase DNA binding protein
CKI	caséine kinase
CRABPI et CRABPII	cellular retinoic acid binding protein
CRBPI et CRBPII	cellular retinoid binding protein
CRD	cysteine-rich domain
CtBP	c-terminal binding protein
FRP	frizzled related protein
FRZB	Frizbee
GRIP-1	glucocorticoïde receptor interacting protein 1
GSK3	glycogen synthase kinase 3
HAT	histone acétyltransférase
HDAC	histone désacétylase
HMG	high mobility group
HMT	histone méthyltransférase
HP1	heterochromatine protein 1 G9a, hSet9 et PR-SET7
INO80	inositol
ISWI	imitation of switch
LEF	lymphoïd enhancer factor
LRE	élément de réponse au facteurs LEF/TCF
LRP	LDL receptor related protein
LSD1	lysine specific demethylase-1
MAP	mitogen-activated-protein

MSK-1 MAP and Stress Kinase
NCoA-1 nuclear receptor coactivator
NCoA-2 nuclear receptor coactivator 2
NCoR nuclear receptor corepressor
NLK Nemo-like kinase
pCIP p300 co-integrator associate protein
PKA Protein Kinase A
PRMT protein arginine methyltransferase
RALDH rétinaldéhyde déshydrogénases cytoplasmiques
RAR récepteurs à l'AR
RARE élément de réponse à l'acide rétinoïque
RBP retinol binding protein
RIP140 human receptor interacting protein140
RN récepteur nucléaire
RSK-2 Ribosomal S6 Kinase 2
RXR récepteur X aux rétinoïde
SDR déshydrogénases/réductases microsomales à courte chaîne
SET Su(var)3-9, Enhancer of zeste E(z), Thiritorax, TRX
Sir2p silent mating type information regulator
SMCC Srb and mediator containing complex
SMRT silencing mediator for retinoid and thyroid receptor
SRC stéroïd receptor coactivator
SWI/SNF switch/sucrose nonfermenting
Tak-1 transforming-growth-factor- β -activated kinase-1
TAF TATA binding protein-associated factors
TBP TATA-binding protein
TCF T-cell factor
TGF β transforming growth factor β
TIF-2 transcriptional intermediary factor 2
TLE transducin-like enhancer of split
TR récepteurs thyroïdiens
TRAP/DRIP
WIF Wnt inhibitory factor

Chapitre 1 : Introduction

1.1 La signalisation par les rétinoïdes

Les rétinoïdes sont des dérivés de la vitamine A et sont essentiels à diverses fonctions biologiques d'apoptose, de différenciation et de prolifération cellulaire (Ross *et al.*, 2000). La nécessité de la vitamine A chez l'animal adulte a premièrement été démontrée dans les années 20, où l'on a observé sa contribution aux fonctions reproductrices, à la vision et au maintien des tissus épithéliaux (Wolbach et Howe, 1925). D'autres études ont démontré subséquemment que la vitamine A joue un rôle crucial dans le développement normal de l'embryon étant donnée les diverses malformations congénitales occasionnées par sa carence (Hale, 1933).

La vitamine A accomplit ses fonctions par sa capacité d'altérer l'expression génique d'une façon spécifique à certains tissus. Pour ce faire, il existe de nombreuses composantes qui agissent à différents niveaux pour participer à la régulation de son activité. Le niveau physiologique et la distribution spatio-temporelle de l'acide rétinoïque (AR), le métabolite actif de la vitamine A, sont très strictement régulés par plusieurs enzymes de synthèse et de dégradation (figure 1).

1.1.1 Métabolisme des rétinoïdes

1.1.1a Apport et biosynthèse des rétinoïdes

La vitamine A ou rétinol, est le rétinoïde parental (substrat) naturel et ainsi, il ne possède pas d'activité biologique en soi. Il est obtenu par l'alimentation végétale sous forme de caroténoïde, ou sous forme d'ester rétinyl lorsque l'alimentation est d'origine animale. Ces deux composés sont converti en rétinol dans l'intestin puis subséquemment en ester de rétinyl et c'est sous cette forme qu'ils seront enrobés dans des lipoprotéines. De cette façon, ils seront véhiculés dans la lymphe jusqu'aux hépatocytes, et à cet endroit, l'ester de rétinyl sera emmagasiné ou hydrolysé en rétinol pour une mobilisation subséquente (Blomhoff *et al.*, 1991).

Dans la circulation sanguine, la vitamine A circule principalement sous forme de rétinol lié à RBP (retinol binding protein) mais on retrouve aussi de faibles concentrations d'ester rétinyl lié à des lipoprotéines et de l'AR lié à l'albumine (Gottesman *et al.*, 2001).

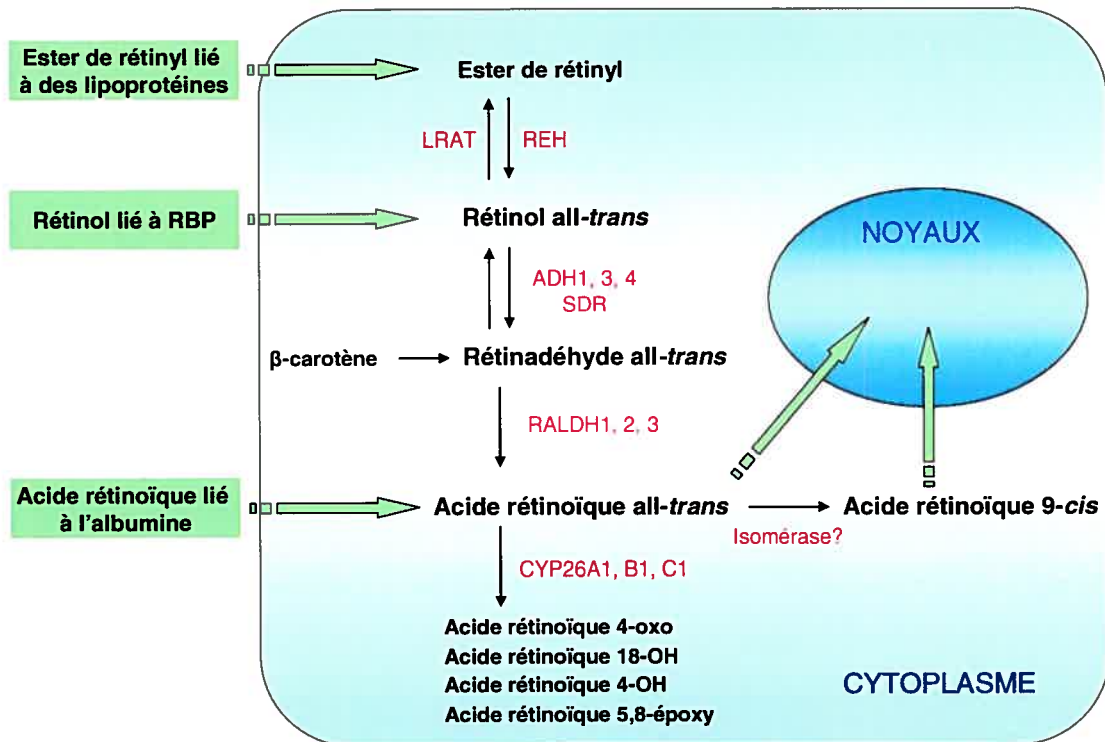


FIGURE 1 : Voies régulant le métabolisme et la disponibilité des rétinoïdes.

La plupart des tissus acquièrent la vitamine A dont ils ont besoin à partir du complexe rétinol-RBP. À l'intérieur des cellules, la conversion du rétinol en RA se fait par une voie métabolique en deux étapes (revue par Duester *et al.*, 2003, Ross *et al.*, 2000). La première étape est l'oxydation réversible du rétinol en rétinaldéhyde qui peut être effectuée principalement par des alcool déshydrogénases cytoplasmiques à chaînes de taille moyennes (ADH) mais aussi par des déshydrogénases/réductases microsomaux à courte chaîne (SDR). Toutefois, les preuves indiquant l'implication des SDRs dans le processus de synthèse de l'AR sont insuffisantes. La famille des ADHs comprend ADH1, ADH3 et ADH4 fonctionnant tous d'une façon dépendante de la présence du NAD (Duester, 2000). L'oxydation du rétinol est assurée de façon ubiquitaire par ADH3 alors que ADH1 et ADH4 semblent apporter une contribution supplémentaire en étant exprimés plus spécifiquement dans certains tissus. Les souris *adh3^{-/-}* présentent un taux de survie plus bas et des anomalies congénitales pouvant être rétablis par des suppléments alimentaires en rétinol tandis que la perte de ADH1 ou ADH4 amènent des malformations uniquement lorsque la vitamine A est en déficience ou en excès dans la l'alimentation (Molotkov *et al.*, 2002).

La deuxième étape de synthèse est irréversible et consiste essentiellement en l'oxydation du rétinaldéhyde en AR *all-trans* (Napoli, 1996). Par la suite, l'AR *all-trans* peut être métabolisé en AR-9-*cis* par l'action d'une isomérase mais la formation de cet isomère est moins bien connue. L'oxydation du rétinaldéhyde en AR *all-trans* est soutenue par une famille de rétinaldéhyde déshydrogénases cytoplasmiques (RALDH) comprenant les membres RALDH1, RALDH2 et RALDH3. C'est RALDH2 qui démontre la plus grande spécificité envers le rétinaldéhyde et semble jouer le rôle le plus important dans la synthèse de l'AR. Chez l'embryon de souris, l'inactivation de RALDH2 rend impossible la synthèse d'AR dans la majeure partie du mésoderme et du neuroectoderme ce qui entraîne un arrêt précoce de la morphogénèse et la létalité au stade embryonnaire, tandis que l'absence de RALDH1 élimine la synthèse d'AR dans la rétine dorsale seulement et ceci n'amène aucun effet flagrant sur le développement de l'embryon (Niederreither *et al.*, 1999). Dans l'ensemble, les études démontrent que l'oxydation du rétinol en rétinaldéhyde est globalement ubiquitaire, soit par l'action de ADH3, et que c'est l'expression sélective des RALDHs qui limite les tissus où la signalisation par les rétinoïdes a lieu (revue par Duester, 2003).

1.1.1b Catabolisme des rétinoïdes

La famille de gènes *CYP26* fait partie de la large superfamille des cytochromes P450 et comprend trois membres A1, B1 et C1, qui sont tous capables de catalyser l'hydroxylation de la vitamine A. Les gènes *CYP26* sont hautement inductibles par l'AR suggérant qu'une autorégulation est nécessaire pour normaliser les concentrations locales d'AR lorsque le niveau physiologique devient trop élevé (Petkovich *et al.*, 2001). *CYP26A1*, intervient spécifiquement dans l'oxydation de l'AR *all-trans* en métabolites plus polaires, soit en AR-4-oxo, en AR-4-hydroxy, en AR-18-hydroxy (Abu-Abed *et al.*, 1998, White *et al.*, 1997, 1996) et en AR-5,8-époxy (Fujii *et al.*, 1997). Le patron d'expression de *CYP26A1* et *CYP26B1* laisse suggérer qu'ils ont une fonction dans la distribution de l'AR dans l'embryon. En effet, l'expression de *CYP26A1* a lieu dans la partie antérieure de l'embryon complémentairement à RALDH-2 et à ADH-4 qui sont exprimés dans la région caudale de l'embryon (de Roos *et al.*, 1999). De plus, dans la rétine, *CYP26A1* est exprimé selon une ligne délimitant la frontière entre l'expression de deux enzymes de synthèse de l'AR (McCaffery *et al.*, 1993). Les mutants invalidant le gène codant pour *CYP26A1* indiquent que cette enzyme est nécessaire pour le développement du cerveau

postérieur et pour le développement de la partie caudale de l'embryon (Abu-Abed *et al.*, 2001 ; Sakai *et al.*, 2001). CYP26B1 est exprimé dans des régions restreintes des membres en développement (Abu-Abed *et al.*, 2002). L'inactivation génique de *CYP26B1* suggère que cette enzyme joue un rôle dans le développement des membres en prévenant l'apoptose et en stimulant la maturation des chondrocytes (Yashiro *et al.*, 2004). Quant à CYP26C1, il semble aussi jouer un rôle dans le métabolisme des rétinoïdes. Cependant, sa fonction biologique n'a pas encore été élucidée.

1.1.1c Protéines de liaison aux rétinoïdes

Afin de maintenir leur solubilité à l'intérieur des cellules, les rétinoïdes sont liés à des protéines qui, d'une certaine façon, participent à leur métabolisme. Parmi ces protéines, on retrouve celles capables de lier le rétinol et le rétinaldéhyde soit CRBPI et CRBP II (cellular retinoid binding protein) (revue par Noy, 2000). Ces deux protéines collaborent à l'absorption intestinale en permettant l'estérification du rétinol en rétinyl ester. D'un autre côté, CRBPI semble promouvoir la biosynthèse de l'AR en présentant le rétinol et le rétinal à leurs déshydrogénases respectives et aussi en agissant comme transporteur intracellulaire (Napoli, 2000). De plus, l'inactivation génique de CRBPI a montré une implication de cette protéine dans l'emmagasiner du rétinyl ester (Ghyselinck *et al.*, 1999). Cependant, ces processus ne semblent pas indispensables puisque les phénotypes des mutants invalidant CRBPI et CRBP II ne présentent aucune anomalie et survivent sans problème à une déficience en rétinoïdes pendant plusieurs semaines. Ainsi, ces protéines semblent plutôt aider l'organisme à maintenir une bonne réserve de rétinoïdes.

Les protéines de liaisons aux rétinoïdes impliquent aussi celles disposées à lier l'AR : CRABPI et CRABP II (cellular retinoic acid binding protein). Il semble que ces protéines assurent la solubilité et le transport intracellulaire de l'AR. D'un autre côté, CRABPI semble impliqué dans le processus de dégradation de l'AR puisqu'il interagit avec CYP26A1 (Fiorella et Napoli, 1994) et CRABP II quant à lui, pourrait guider l'AR du cytosol vers le noyau puisqu'il a montré interagir avec RAR-RXR (Delva *et al.*, 1999). L'inactivation génique de CRABPI et CRABP II indique que ces protéines ne sont pas essentielles. Toutefois, les double mutants CRABPI/CRABP II présentent des malformations au niveau des membres (Lampron *et al.*, 1995).

1.1.2 Les récepteurs aux rétinoïdes

L'action de l'AR se fait par son interaction avec les récepteurs à l'AR (RAR) et les récepteurs X aux rétinoïdes (RXR). Des études *in vitro* ont démontré que RAR a une forte affinité pour l'AR-9-*cis* et l'AR *all-trans* tandis que RXR ne lie que l'AR-9-*cis* (Soprano et Soprano, 2003). RAR et RXR font partie des récepteurs nucléaires (RN), une large superfamille de facteurs de transcription dont l'activité est principalement modulée par leurs liaisons à des ligands lipophiles. Selon des études évolutives, les RN ont été subdivisés en 6 sous-familles, mais plus couramment ils sont classés en 3 types selon leur mode de fonctionnement (Aranda et Pascual, 2001). Les récepteurs de type I incluent les récepteurs stéroïdiens tel le récepteur à l'œstrogène, à l'androgène et aux glucocorticoïdes. En absence de leur ligand, ces récepteurs sont en complexe avec des protéines chaperonnes. Lorsqu'ils lient leurs ligands, ils s'homodimèrisent et effectuent une translocation au noyau où ils reconnaissent des séquences consensus hexamériques inversées palindromiques sur l'ADN. Les récepteurs de type II dont fait partie RAR, impliquent entre autres les récepteurs thyroïdiens (TR) et les récepteurs à la vitamine D3. Ils sont constitutivement sur le promoteur de leurs gènes cibles et ainsi, l'activation de ces récepteurs est une étape subséquente à la reconnaissance de l'ADN. Ils fonctionnent tous en hétérodimères avec RXR et ils reconnaissent des séquences hexamériques directes répétées. Finalement, les récepteurs de type III sont les plus nombreux et sont appelés récepteurs orphelins puisque leur ligand respectif n'a pas encore été identifié (revue par Giguère, 1999). Ces derniers peuvent lier l'ADN en homodimère sur des séquences directes répétées, en hétérodimères avec RXR ou en monomère sur une séquence unique.

Il existe trois isotypes de RAR(α , β et γ) (Mattei *et al.*, 1991) et de RXR(α , β et γ) codés par des gènes différents. Chaque isotype est exprimé en plusieurs isoformes qui diffèrent par leurs extrémités N-terminales. Chez RAR, on retrouve RAR α 1 et 2, RAR β 1 à 4 et RAR γ 1 et 2 tandis que chez RXR, on retrouve RXR α 1 et 2, RXR β 1 et 2 ainsi que RXR γ 1 et 2. Chaque isoforme est générée à partir d'un même gène soit par un épissage alternatif ou par l'usage de promoteurs différents. Le patron d'expression spatiotemporel et les affinités de liaison diffèrent légèrement pour chacun des isotypes. Les animaux déficients pour une isoforme de RAR ou RXR sont viables et la plupart sont normaux (Mark *et al.*, 1999). D'un autre côté, les doubles mutants pour une paire d'isotypes des RARs (RAR β /RAR γ , RAR α /RAR β , RAR α /RAR γ) meurent *in*

utero ou à la naissance et présentent un ensemble de défauts qui récapitulent ceux observés chez les animaux ayant une carence en vitamine A (Kastner et al., 1995; Lohnes et al., 1994; Lohnes et al., 1995; Mendelsohn et al., 1994). Ces mutants multiples pour RAR présentent aussi des défauts non associés à une carence en vitamine A, notons entre autres, des transformations homéotiques et des malformations des vertèbres cervicales. Des transformations dites homéotiques signifient que des segments, le long de l'axe antéropostérieur, prennent l'identité de d'autres segments. Globalement, toutes ces expériences laissent suggérer un rôle essentiel des RARs dans la survie post-natale et une certaine redondance de fonction des RARs. De plus, ces expériences démontrent que les RARs dirigent tous les rôles de la vitamine A durant le développement.

1.1.2a Structure de RAR et RXR

RAR et RXR partagent une structure modulaire semblable à celle de tous les RN, impliquant six domaines fonctionnels (Rochette-Egly, 2002, Aranda et Pascual, 2001). La région N-terminale (domaine A/B), est la moins conservée et code pour une fonction d'activation transcriptionnelle qui agit indépendamment de la liaison au ligand (AF-1) (Nagpal *et al.*, 1993). L'activité de cette région est soupçonnée être spécifique au type de cellules où elle agit et aux promoteurs qu'elle régule. Cependant, les mutants des différents isotypes de RAR (différents dans leur partie N-terminale) laissent croire à une redondance fonctionnelle entre les récepteurs, indiquant qu'ils peuvent reconnaître les mêmes cibles. Un aspect intéressant de ce domaine est la présence de plusieurs sites consensus de phosphorylation ciblés par des kinases proline-dépendantes telles les kinases cyclin-dépendantes (CDK) et les kinases MAP (mitogen-activated-proline) et aussi par des kinases de stress tel les JNKs (Adam-Stitah *et al.*, 1999). La phosphorylation de ce domaine affecte significativement l'activité transcriptionnelle du RN (revue par Rochette-Egly, 2003).

La région la plus conservée dans la structure des RN, soit le domaine de liaison à l'ADN (région C), comprend deux doigts de zinc incluant deux hélices α et une extension COOH terminale (Zechel *et al.*, 1994a,b). À la base du premier doigt de zinc se trouve la boîte P responsable de la reconnaissance des motifs hexamériques sur l'ADN, tandis que la boîte D à la base du second doigt de zinc est impliquée dans la dimérisation du récepteur (Lee *et al.*, 1993).

Le domaine de liaison au ligand (région E) est aussi très conservé. Il est fonctionnellement complexe puisqu'en plus de lier le ligand, il spécifie les propriétés de dimérisation (homo versus hétéro) et il transmet l'activité transcriptionnelle dépendante du ligand par sa fonction AF-2. Des analyses cristallographiques ont démontré que la région E est composée de douze hélices α au centre desquelles se trouve une cavité hydrophobique qui permet de recevoir le ligand. La dernière hélice (H12) retrouvée à l'extrémité COOH contient la fonction AF-2. Elle se tient en retrait du centre de la région E en l'absence du ligand et elle subit un repositionnement majeur lors de la liaison du ligand.

Entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand se trouve une région charnière (région D) qui par définition, permet la rotation d'un domaine sur l'autre (Mader *et al.*, 1993b). Le domaine F est absent chez RXR et, il semble servir de cible pour la phosphorylation chez RAR ce qui mènerait à sa dégradation par le protéasome (Rochette-Egly *et al.*, 1997 ; Srinivas *et al.*, 2005).

1.1.2b Liaison de RAR-RXR à l'ADN

Selon le modèle général, lorsque l'AR est absente, les récepteurs aux rétinoïdes sont liés aux promoteurs de leurs gènes cibles et agissent comme répresseur de la transcription de la même façon que tous les récepteurs de type II. Le motif reconnu par les récepteurs aux rétinoïdes dans les régions régulatrices de leurs gènes cibles est appelé élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE). Le RARE est typiquement composé de deux répétitions directes du motif hexamérique 5'-PuG(G/T)TCA (Pu est n'importe quelle purine soit A ou G) (Aranda et Pascual, 2001). Les répétitions du RARE classique sont séparées par 5 nucléotides (DR5) mais RAR-RXR reconnaît aussi les répétitions directes séparées par un (DR1) ou deux nucléotides (DR2). Sur DR2 et DR5, RXR occupe le motif en 5' et son partenaire RAR lie le motif en 3' alors que le contraire est observé sur l'élément DR1 (Chambon, 1996) ce qui rend impossible l'activation des récepteurs. L'affinité du récepteur pour son élément de réponse est influencé par les séquences flanquantes du RARE, par les espacements entre les répétitions de même que par la séquence de chaque répétition (Mader *et al.*, 1993a et b). L'analyse cristallographique de la structure de

RAR-RXR sur l'ADN a permis de démontrer que l'arrangement en tête à queue de RAR-RXR sur le RARE amène une coopération des domaines de liaisons à l'ADN. Ainsi, chaque partenaire dicte la spécificité de reconnaissance au RARE et l'établissement de l'interface de dimérisation renforce l'efficacité de liaison avec l'ADN (Rastinejad *et al.*, 2000).

1.1.2c Liaison de RAR-RXR au ligand

La présence d'AR amène des changements de conformation du domaine de liaison au ligand de RAR ayant pour effet global sa stabilisation et sa compaction (Gronemeyer et Miturski, 2001, Nagy *et al.*, 2004). Le changement le plus considérable est le repliement de l'hélice 12 (contenant l'AF-2) contre l'hélice 3 et 4. Cette hélice agit comme une trappe à souris qui se referme sur l'AR et stabilise la liaison du ligand en créant des interactions additionnelles avec le domaine de liaison au ligand (Wurtz *et al.*, 1996). Ce mouvement et d'autres, ont pour effet de favoriser l'interaction entre RAR et RXR ce qui augmente leurs affinités pour l'ADN (Rastinejad *et al.*, 2000). Aussi, la présence du ligand amène un changement de structure impliquant le relâchement des corépresseurs et le recrutement combinatoire de coactivateurs qui amèneront la reconfiguration de la chromatine et occasionneront l'engagement du système de transcription basal. La surface du domaine de liaison au ligand impliquée dans la liaison des coactivateurs et des corépresseurs se chevauche grandement et, l'affinité de cette surface pour les corépresseurs basculerait vers les coactivateurs suite au repositionnement de l'hélice 12 (Benko *et al.*, 2003). Cette caractéristique s'avère astucieuse puisqu'elle rend mutuellement exclusive la liaison des régulateurs aux effets opposés.

1.1.3 La régulation transcriptionnelle par RAR-RXR

Le RN agit comme un interrupteur moléculaire qui alterne entre des états transcriptionnels de répression et d'activation selon la présence ou l'absence d'AR. Cet interrupteur modifie son rôle en recrutant des corégulateurs aux activités diverses (figure 2).

1.1.3 a Les Coactivateurs de RAR-RXR

Les coactivateurs agissent comme des adaptateurs qui transmettent la réponse transcriptionnelle du récepteur au système de transcription basal. Une caractéristique structurale retrouvée chez de nombreux coactivateurs des récepteurs nucléaires, est la présence d'un motif spécifique appelé boîte à récepteurs nucléaires (revue par Savkur et Burris, 2004). Ce motif en forme d'hélice α dont la séquence est LXXLL (ou L est une leucine et X est n'importe quel acide aminé) contacte directement le domaine AF-2 du RN. La séquence et le nombre de motifs LXXLL varient considérablement d'un coactivateur à l'autre et semblent expliquer la différence d'affinité de liaison observée pour un RN (Heery *et al.*, 1997).

De façon générale, les coactivateurs peuvent se subdiviser en deux groupes : premièrement, les complexes qui permettent le remodelage ou la modification de la chromatine et, deuxièmement, les adaptateurs qui recrutent le système de transcription basal (figure 2). Les complexes qui altèrent la chromatine se classent en deux catégories : soit les facteurs qui remodelent la chromatine de façon ATP-dépendante en déplaçant les histones sur l'ADN, et les enzymes qui catalysent l'ajout de modifications post-traductionnelles sur les parties N-terminales des histones. Parmi les modifications sur les histones, on retrouve principalement la méthylation, la phosphorylation et l'acétylation. Plusieurs complexes de coactivateurs partagent des sous-unités communes et semblent être assemblés de façon modulaire.

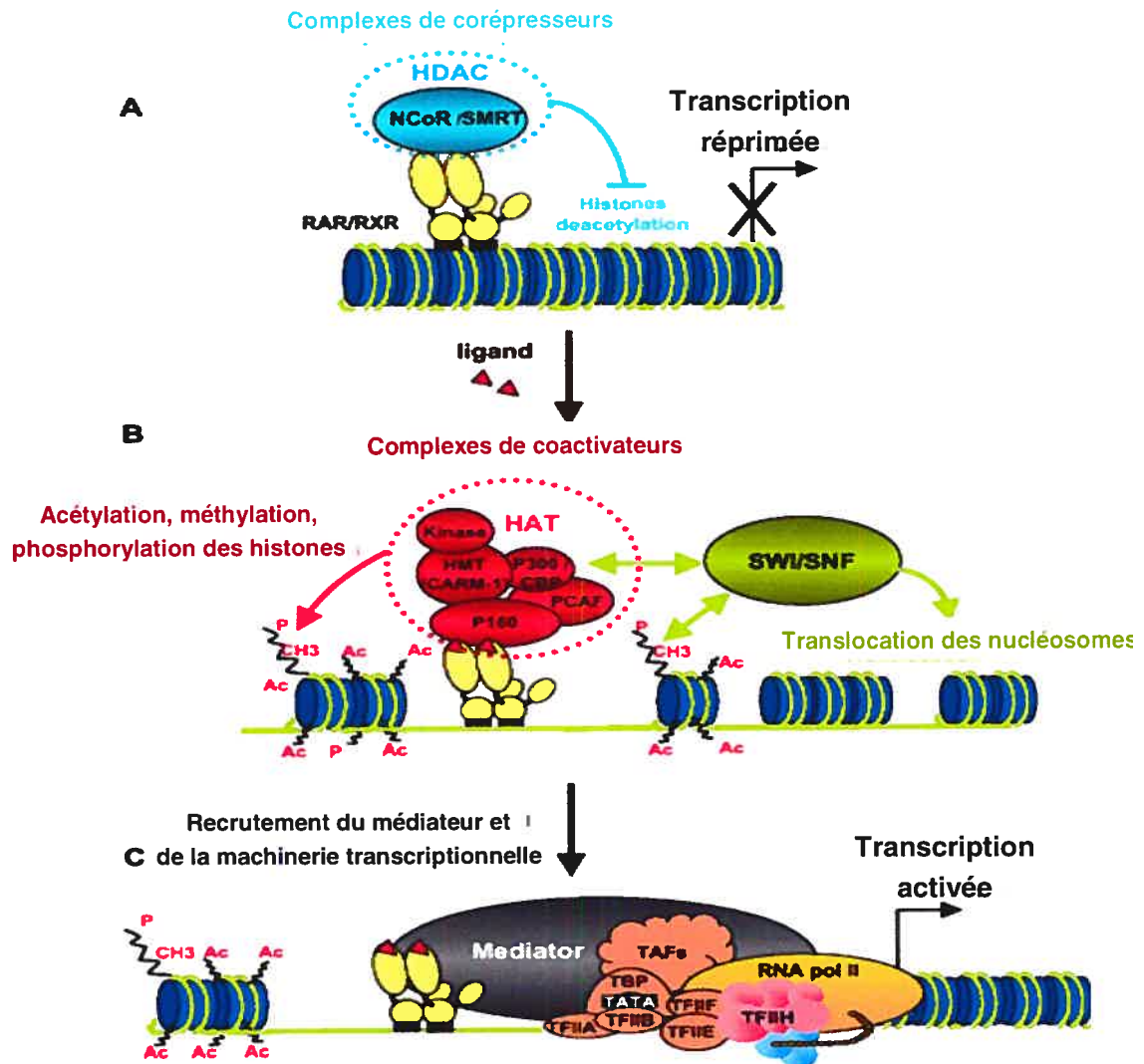


FIGURE 2 : Échange de corégulateurs sur le promoteur des gènes cibles de RAR-RXR (modifié de Bastien et Rochette-Egly, 2004).

L'acétylation des histones est la modification covalente la plus couramment associée à l'activation de la transcription. À cet effet, les RNs recrutent principalement deux classes de régulateurs positifs à activité histone acétyltransférase (HAT) soit CBP (Creb binding protein)/p300 (revue par Chan et La Tangué, 2001) et p/CAF (p300/CBP associated factor) (Blanco *et al.*, 1998). Même si ces coactivateurs peuvent se lier directement à la région E des RARs, leur mode d'interaction avec les RNs se fait principalement via leurs associations à la famille de coactivateurs p160 (Edwards, 2000) dont je discuterai plus bas. En plus de pouvoir modifier la chromatine, CBP/p300 et p/CAF semblent servir d'adaptateurs facilitant le recrutement du complexe d'initiation de la transcription. Effectivement, CBP/p300 lie directement les facteurs de transcription dans l'holoenzyme de l'ARN polymérase II (Kee *et al.*, 1996) tandis que p/CAF fait partie d'un complexe comprenant les facteurs TAFs (TATA binding protein-associated factors) et quelques composantes de TFIID (Ogryzko *et al.*, 1998). Ces deux coactivateurs peuvent aussi acétyler des protéines non-histones et ainsi agir comme médiateurs de plusieurs voies cellulaires (Brown *et al.*, 2003). En ce qui concerne CBP et son homologue fonctionnel p300, ils possèdent un rôle supplémentaire. Ils semblent fonctionner comme des protéines d'échafaudage permettant la formation de complexes régulateurs de la transcription pouvant transmettre l'action d'une multitude de facteurs de transcription. C'est pourquoi on les qualifie de cointégrateurs (Aranda et Pascual, 2001). Par exemple, CBP/p300 interagit avec les facteurs de transcription AP-1, myoD, Jun, Fos, NF- κ B, Pit-1 (Shikama *et al.*, 1999).

La famille de coactivateurs SRC (steroïd receptor coactivator)/p160 fut la première identifiée. Elle comprend trois membres étroitement reliés soit SRC1 /NCoA-1 (nuclear receptor coactivator-1), SRC-2/TIF-2 (transcriptional intermediary factor 2) /GRIP-1 (glucocorticoïde receptor interacting protein 1)/NCoA-2 (nuclear receptor coactivator 2) et SRC-3/pCIP (p300 co-integrator associate protein)/ACTR (activator of the thyroid and retinoic acid receptor)/A1B1 (amplified in breast cancer 1)/RAC3 /TRAM-1 (revue par Leo et Chen, 2000). Ces coactivateurs interagissent avec l'AF-2 de RAR d'une façon dépendante de la présence du ligand et plusieurs évidences montrent qu'ils peuvent même lier la fonction AF-1. Cependant, même s'ils possèdent un domaine de liaison à l'ADN bHLH, leur liaison directe à l'ADN n'a pas été démontrée. Ils possèdent deux domaines d'activation transcriptionnelle autonomes, soit AD1 qui sert de site de liaison à CBP/p300 (Korzus *et al.*, 1998), et AD2, qui permet la liaison à CARM-1 (coactivator associated arginine methyltransferase-1)

(Chen *et al.*, 1999 et Koh *et al.*, 2001) un cofacteur à activité histone méthyltransférase (HMT). D'une autre part, les protéines SRC possèdent une activité HAT intrinsèque, mais elles ne semblent pas indispensables à leur activité puisque SRC-2 ne la possède pas et même si le domaine HAT est aboli ils peuvent toujours assumer leur rôle de coactivateur. De plus, les membres de la famille p160 possèdent des domaines très conservés bHLH-PAS impliqués dans les interactions protéine-protéine. Pour ces raisons entre autres, les membres de la famille p160 semblent principalement servir de molécules plates-formes pour l'assemblage de complexes de coactivateurs possédant des activités variées. Entre autres, des activités HAT ou HMT (Edwards, 2000) servent de pivot dans la signalisation par les RNs.

Les régulateurs positifs de la transcription par les RNs incluent aussi des enzymes à activité HMT. CARM-1 potentialise l'activation transcriptionnelle par RAR-RXR ((Xu *et al.*, 2001). CARM-1 est considéré comme analogue à PRMT-1 puisque lui aussi agit en coactivateur des RNs, et ce, d'une façon qui nécessite la présence des protéines p160 (Koh *et al.*, 2001). D'une façon intéressante, chacun de ces HMTs peut agir en synergie avec les RNs pour contrôler l'expression d'un gène (Koh *et al.*, 2001). D'un autre côté, ces deux coactivateurs sont distincts puisqu'ils n'ont pas les mêmes substrats (voir section plus loin) et il existe une différence temporelle dans leur recrutement respectif relativement au recrutement des activités HAT (Daujat *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2001). Il est noter que CARM-1 détient la capacité de méthyler des protéines autres que les histones, dont l'HAT CBP/p300 ce qui lui confère un autre mécanisme par lequel il peut réguler la transcription (Xu *et al.*, 2001). Le complexe ASC-2 (activating signal cointegrator-2) impliqué dans l'activation transcriptionnelle dépendante du ligand par RAR-RXR, possède aussi une activité HMT mais son mécanisme d'action reste plutôt obscur (Tsai et Fondell, 2004).

D'autres études ont aussi montré que RAR-RXR interagit avec Brg-1, la sous-unité catalytique du complexe SWI/SNF (Chiba *et al.*, 1994). Le complexe SWI/SNF participe aux déplacements des nucléosomes sur l'ADN (Owen-Hugues et Workman, 1996a et b ; Whitehouse *et al.*, 1999). Ces déplacements rendent l'ADN plus accessible et faciliteraient donc l'engagement de la machinerie transcriptionnelle.

Selon le modèle général, une fois la chromatine remodelée, des échanges de régulateurs se font sur les récepteurs aux rétinoïdes afin de permettre l'assemblage

du complexe de préinitiation de la transcription comprenant l'ARN polymérase II et les facteurs généraux de transcription (figure 2). Une hypothèse récente soutient que les facteurs p160 se dissocient des RNs suite à leur acétylation ce qui permettrait le recrutement de complexes médiateurs de la transcription (Chen *et al.*, 1999 ; Rachez *et al.*, 1998). Le complexe médiateur, appelé TRAP/DRIP, s'associe avec l'ARN polymérase II et il est apparemment impliqué dans son recrutement et dans son activation. RAR-RXR recrutent le complexe médiateur SMCC (Srb and mediator containing complex) dont les nombreuses composantes (14 à 16) ne possèdent pas d'activité capable de modifier les histones et sont différentes des protéines retrouvées dans les autres complexes mentionnés précédemment (Aranda et Pascual, 2001 ; Woychik et Hampsey, 2002). Le coactivateur DRIP205, aussi communément appelé TRAP220, a été identifié comme la sous-unité du complexe SMCC responsable de l'interaction avec l'AF-2 de RAR-RXR (Rachez *et al.*, 2000).

1.1.3 b Les corépresseurs de RAR-RXR

Lorsque les gènes cibles de l'AR sont silencieux, ils sont compactés dans une structure organisée de nucléoprotéines. Pour maintenir cet état, l'hétérodimère RAR-RXR lie des corépresseurs qui vont maintenir la chromatine avoisinante dans un état condensé et ainsi inactif. Les corépresseurs possèdent aussi un motif nécessaire pour leur interaction avec les RN. Ce motif, nommé boîte NcoRNR, est composé de la séquence I/LXXI/VI (où I est une isoleucine et V, une valine) et il interagit avec l'AF-2 du RN de la même façon que le fait le motif LXXL des coactivateurs (Hu et Lazard, 1999). L'hélice formée par la boîte NcoRNR semble être à la base de la discrimination faite par l'AF-2 entre les coactivateurs et des corépresseurs (Perissi *et al.*, 1999).

Deux corépresseurs reliés, SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid receptor) et NCoR (nuclear receptor corepressor), ont été identifiés par criblage au double-hybride chez la levure en utilisant RAR et TR non associés à leur ligand comme appât (Chen et Evans, 1995 ; Horlein *et al.*, 1995). Ils sont composés de larges protéines possédant plusieurs domaines de répression en N-terminal et des domaines d'interactions avec le récepteur nucléaire en C-terminal. Ils partagent aussi plusieurs domaines conservés SANT, responsables de l'association à des histone désacétylase (HDAC) (Zhang *et al.*, 2002) et requis pour l'activité désacétylase. De plus, ces

domaines ont montré être impliqué dans la liaison aux histones (Yu *et al.*, 2003). Ainsi, les domaines SANT semblent agir en synergie afin de promouvoir et maintenir la désacétylation. Les corépresseurs SMRT et NCoR peuvent aussi recruter des HDAC via la formation de complexes avec Sin3A et Sin3B entre autres (Heinzel *et al.*, 1997). Également, ces corégulateurs interagissent directement avec certains facteurs généraux de la transcription tel TFIIB, TAFII32 et TAFII70 (Wong et Privalsky, 1998 ; Muscat *et al.*, 1998). Il est à noter que ces corépresseurs ne peuvent exercer une fonction compensatrice un pour l'autre puisque des invalidations géniques de NcoR, conduisent à une létalité au stade embryonnaire (Jensen *et al.*, 2000).

RIP140 (human receptor interacting protein140) agit comme corépresseur pour plusieurs facteurs de transcription incluant notamment RAR-RXR (Lee et Wei, 1999). Contrairement aux autres corépresseurs de RN, RIP140 agit d'une façon dépendante de la liaison au ligand et c'est pourquoi il a tout d'abord été catégorisé comme coactivateur des RNs. Plusieurs données ont démontré qu'en présence d'AR, RIP140 amenait la formation de complexes tétramoléculaires RAR-RXR-RIP140-HDAC et qu'il supprimait ainsi l'expression d'un gène rapporteur d'une façon directement proportionnelle à la dose d'AR (Wei *et al.*, 2001). D'autre part, des données ont démontré l'existence d'une compétition substantielle entre RIP140 et le coactivateur p/CAF pour la liaison à RAR-RXR en forme holo (Wei, 2003). Son habileté à recruter des HDAC et à compétitionner pour l'holo-récepteur semble impliquée dans son mécanisme de répression (Hu *et al.*, 2004).

1.2 La voie des Wnts

L'activation de la voie des Wnts régule de nombreux processus lors du développement embryonnaire et dans l'homéostasie chez l'adulte (revue par Nusse, 2005). Les protéines Wnts sont sécrétées par les cellules et agissent sur leurs cellules cibles par plusieurs voies inhabituellement complexes.

1.2.1 La voie canonique

La voie canonique est la première voie des Wnts identifiée et la mieux connue (revue par Moon *et al.*, 2002a, b ; Hecht et Kemler, 2000) (figure 3). Une des manifestations les plus importantes de cette voie est l'élévation de la β -caténine cytoplasmique. La β -caténine est habituellement dégradée par l'action du complexe d'échafaudage dont elle fait partie. Dans ce complexe se retrouvent notamment l'APC (adenomatous polyposis coli), l'axin, CKI (caséine kinase) et la GSK3 (glycogen synthase kinase 3). La GSK3 phosphoryle la β -caténine, ce qui permet sa reconnaissance par β -TrCP, une composante de l'ubiquitine ligase E3, et la dirige ainsi vers sa dégradation par le protéasome 26S (Hart *et al.*, 1999). Lorsque les protéines Wnts lient le récepteur membranaire Frizzled à la surface cellulaire, celui-ci active les protéines cytoplasmiques Dishevelled (Dsh) qui conséquemment inhibent la GSK3 (Smalley *et al.*, 1999). De cette façon, la β -caténine n'est plus phosphorylée et son accumulation au niveau du cytoplasme occasionne sa translocation nucléaire. À l'intérieur du noyau, la β -caténine active la transcription de ces gènes cibles en s'hétérodimérisant avec la famille de facteurs de transcription LEF (lymphoid enhancer factor)/TCF (T-cell factor).

Il existe d'autres voies non canoniques qui n'impliquent pas la médiation de la transcription par la β -caténine et par TCFs mais qui partagent certaines composantes avec la voie des Wnts canonique (revue par McEwen et Peifer, 2000). La voie générant la polarité cellulaire est la mieux caractérisée. Cependant les voies non canoniques restent très mal connues et ne font donc pas l'objet de la présente revue de littérature.

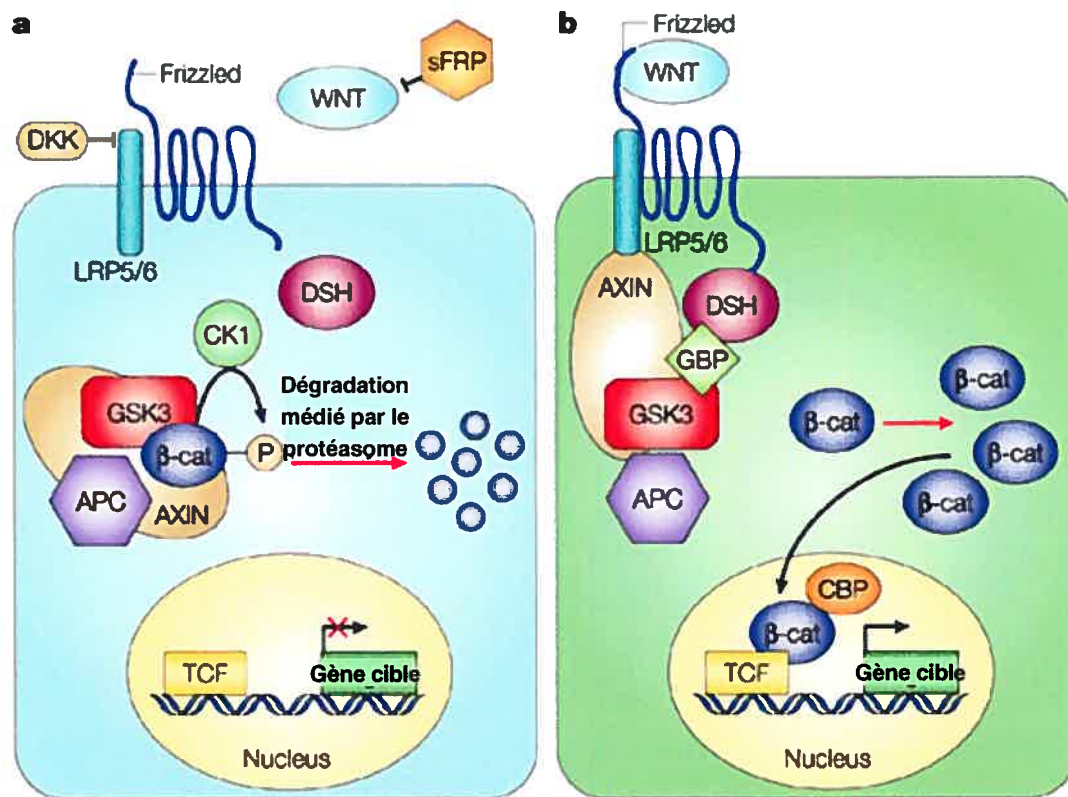


FIGURE 3 : Activation de la voie canonique des Wnts (modifié de Moon *et al.*, 2004).

1.2.2 La signalisation à la surface cellulaire

Plusieurs années de recherche ont permis de découvrir une panoplie de gènes codants pour des ligands Wnts, par exemple, chez la souris, on retrouve plus de 19 membres dans la famille des Wnts. Le terme *Wnt* est un acronyme des gènes orthologues *wingless* chez *drosophila* et *Int-1* chez *mus musculus* (maintenant appelé *Wnt-1*), les premiers membres de la famille *Wnt* à être identifiés. Les gènes *Wnts* sont définis par leur séquence codant pour des glycoprotéines ayant un patron conservé de 23 cystéines. La palmitation de certains de ces résidus cystéines assure l'hydrophobicité des Wnts et s'avère essentielle dans leurs activités (Willert *et al.*, 2003).

À la surface cellulaire, plusieurs protéines sécrétées permettent la régulation de la transduction du signal Wnt. Les protéines FRP (frizzled related protein), comprenant Frizbee (FRZB), possèdent le domaine de liaison au ligand de frizzled ce qui leur permettent de lier Wnt et ainsi d'empêcher son interaction avec frizzled (Leyns *et al.*,

1997 ; Wang *et al.*, 1997). WIF (Wnt inhibitory factor), un autre facteur sécrété et non relié structurellement aux FRP, lie directement Wnt pour inhiber sa signalisation (Hsieh *et al.*, 1999). Il en est de même pour Cerebrus, qui antagonise la voie des Wnts (Piccolo *et al.*, 1999).

Les récepteurs Frizzleds, hautement reliés au récepteurs couplés à la protéine G, comprennent 7 domaines transmembranaires en plus d'une extension N-terminale CRD (cysteine-rich domain) qui permet la liaison directe des Wnts (Dann *et al.*, 2001). La molécule transmembranaire LRP (LDL receptor related protein) est considéré comme un corécepteur de Frizzled puisque son association avec Wnt est tout aussi nécessaire pour activer la voie canonique (Mao *et al.*, 2001 ; Wherli *et al.*, 2000 ; Tamai *et al.*, 2000). La découverte de protéines liant LRP, tel Dickkopf et son récepteur Kremen, a permis d'établir une nouvelle façon par laquelle la voie des Wnts est régulée (Mao *et al.*, 2002). En effet, LRP est internalisé lorsqu'il lie le complexe Dickkopf-Kremen et alors Wnt ne peut plus transmettre son signal à la voie canonique.

1.2.2 La signalisation à l'intérieur de la cellule

La variation du niveau de β -caténine disponible dans le cytoplasme influence aussi la régulation par la voie des Wnts. La β -caténine est principalement associée aux complexes d'E-cadhérines. De cette façon, elle participe à l'adhésion cellulaire. Le relâchement de la β -caténine de ces complexes semble être un mécanisme d'activation de la voie des Wnts alternatif à l'activation via la déstabilisation du complexe GSK3 (revue par Nelson et Nusse, 2004). Par exemple, la répression de l'expression des cadhérines ou la perturbation des complexes cadhérines mènent à l'accumulation de la β -caténine cytoplasmique et diminuent le seuil d'activation de la voie des Wnts ce qui permet d'amplifier et/ou de soutenir l'activation de la voie des Wnts.

L'APC constitue un autre joueur important dans la voie. Sa fonction exacte n'est pas encore très claire. Cependant, il semble que l'APC contrôle aussi le niveau de β -caténine cytoplasmique en assurant son exportation nucléaire et subséquentement sa dégradation cytoplasmique. En effet, l'APC possède plusieurs signaux d'exportation nucléaire et elle est retrouvée autant dans le noyau que dans le cytoplasme.

1.2.2a La modulation de l'activité de la β -caténine

Puisque la β -caténine est l'effecteur central de la transduction du signal par les Wnts, son activité est modulée de façons multiples. Certaines voies de signalisation peuvent restreindre spatialement et temporellement l'activité du complexe β -caténine-TCF, entre autres par l'expression de facteurs compétitionnant pour lier la β -caténine. Par exemple, chez *Xenopus*, la surexpression de *Xsox17 β* inhibe la voie des Wnts. La famille des Sox comprend des protéines à boîte HMG qui participent à la décision des destins cellulaires et qui nécessitent l'interaction avec des facteurs auxiliaires pour exercer leurs fonctions, de la même façon que les TCFs (Pevny et Lovell-Badge, 1997). Plusieurs membres des Sox lient la β -caténine et compétitionnent avec les TCFs pour cette liaison (Zorn *et al.*, 1994 ; Hudson *et al.*, 1997). De la même façon, les RARs utilisent un mécanisme de séquestration comparable à celui employé par les Sox. Cependant, la liaison des RARs à la β -caténine est dépendante de leur liaison à l'AR (Easwaran *et al.*, 1999).

La coopération de la β -caténine à plusieurs voies de signalisations permet une modulation plus fine de la voie des Wnts. Un exemple de ceci est observé sur le promoteur de *Twin* qui pour son activation, nécessite un élément de réponse à TCF et un élément de réponse à Smad4, un médiateur de la voie des TGF β (transforming growth factor β). De cette façon, la β -caténine forme un complexe avec TCF et Smad4 ce qui crée une double spécificité de reconnaissance sur l'ADN (Nishita *et al.*, 2000).

1.2.3 La régulation transcriptionnelle des gènes cibles des Wnts

1.2.3a Les facteurs LEF/TCFs

Les facteurs de transcription LEF/TCFs sont les effecteurs les plus en aval de la voie des Wnts. Le génome mammifère comprend 4 membres dans cette famille soit TCF-1, LEF, TCF-3 et TCF-4 qui peuvent tous générer plusieurs variantes par épissage alternatif de leur transcrit. Les membres TCFs ont une homologie dans leur domaine de liaison à l'ADN avec la famille de facteurs de transcription à boîte HMG (high mobility group). La boîte HMG permet la reconnaissance de séquences spécifiques

sur l'ADN mais aussi, elle a la capacité d'induire des courbures sur l'ADN (Dooijes *et al.*, 1993). L'élément de réponse aux facteurs LEF/TCF (LRE) est très conservé et il comprend la séquence suivante : AGATCAAAGGG (van Beest *et al.*, 2000). Les facteurs TCF ne peuvent activer la transcription par eux même. Comme ils ont la capacité de courber l'ADN, un rôle architectural leur a été attribué. L'activation de leurs promoteurs cibles se fait lorsqu'ils lient la β -caténine, à l'exception de LEF-1 (lymphoid enhancer factor-1). Ce dernier possède un domaine d'activation dépendant du contexte (Carlsson *et al.*, 1993) capable d'activer la transcription en présence du coactivateur ALY (Bruhn *et al.*, 1997 ; Hsu *et al.*, 1998). Contrairement à la β -caténine qui est ubiquitaire, les facteurs TCFs sont exprimés de façon spécifique à certains tissus ce qui permet de restreindre spatialement la voie canonique (Hecht *et Kemler*, 2000).

1.2.3b L'activation transcriptionnelle par la β -caténine

Les mécanismes par lesquels la voie des Wnts peut promouvoir l'activation de la transcription varient : chez les vertébrés, les études indiquent que l'activation de la voie des Wnts fait basculer le rôle de TCF de répresseur à activateur de la transcription tandis que chez les invertébrés, les données suggèrent que la stimulation de la voie des Wnts ne fait que prévenir l'activité répressive de TCF. Dans les deux cas, pour moduler positivement la transcription, les facteurs TCFs lient la β -caténine.

Chez les vertébrés, la β -caténine recrute divers coactivateurs par son domaine de transactivation en C-terminal ce qui reflète différents mécanismes utilisés pour activer la transcription de ces gènes cibles. Chez les vertébrés, CBP et son partenaire relié p300 sont nécessaires pour l'activation de plusieurs promoteurs par la β -caténine (Hetch *et al.*, 2000 ; Takemaru *et Moon*, 2000). En effet, ces coactivateurs lient directement la région C-terminal de la β -caténine et ils agissent en synergie pour activer la transcription comme montré chez *Xenopus* (Vleminckx *et al.*, 1999). Comme mentionné précédemment, ces coactivateurs opèrent en assurant un lien avec le système de transcription basal et surtout, en modifiant la chromatine avoisinante par l'action de leur domaine HAT. Des études plus récentes ont montrés que la β -caténine interagit avec une autre enzyme capable de modifier la chromatine, l'HMT CARM-1 (Koh *et al.*, 2002). Aussi, la β -caténine interagit avec Brg-1, la sous-

unité essentielle du complexe SWI/SNF qui permet de remodeler la chromatine (Barker *et al.*, 2001). Ces données indiquent que la structure de la chromatine influence l'état transcriptionnel des gènes ciblés par les Wnts.

Un autre mécanisme utilisé par la β -caténine pour stimuler la transcription consiste en l'établissement d'un contact avec le système de transcription basal. Certains éléments de transactivation de la β -caténine lient directement TBP (TATA-binding protein) (Hetch *et al.*, 1999). Cependant, cette interaction semble secondaire dans la régulation transcriptionnelle par la β -caténine (Hetch et Kemler, 1999). La β -caténine peut aussi interagir indirectement avec TBP via sa liaison directe à Pontin52 (Bauer *et al.*, 1998 ; Wood *et al.*, 2000). Pontin52 est une protéine nucléaire possédant une séquence similaire à l'hélicase ADN-dépendante RuvB qui co-immunoprécipite avec l'ARN polymérase II. Globalement, les mécanismes de régulation transcriptionnelle utilisés par les facteurs de transcription LEF/TCF restent plutôt obscurs puisqu'un nombre très limité de gènes a été utilisé afin d'étudier la transactivation par la β -caténine.

1.2.3c La répression transcriptionnelle par TCF

Plusieurs observations ont confirmé que les facteurs TCFs répriment activement la transcription de leurs gènes cibles lorsque la voie des Wnts n'est pas activée. Entre autres, des expériences ont montré que la perte de régulation par les facteurs TCF résulte en l'augmentation de l'expression de leurs gènes cibles (Brannon *et al.*, 2000). Pour réprimer la transcription, les facteurs TCFs peuvent s'associer à des membres de la famille de corépresseurs Groucho (Cavallo *et al.*, 1998 ; Roose *et al.*, 1998). Groucho est le premier membre, découvert chez la drosophile, d'une famille de corépresseurs transcriptionnels comprenant 5 membres chez la souris, appelé TLE (transducin-like enhancer of split) (Chen et Courey, 2000). Les protéines Groucho (TLE) interagissent avec l'HDAC Rdp3 (Chen *et al.*, 1999) suggérant que la répression de la transcription des gènes ciblés par les Wnts se fait via la formation d'une structure chromatinienne non permissive. Cependant, même si l'activité HDAC est très importante, elle n'assume pas la totalité de l'effet répresseur (Mannervik et Levine, 1999). D'autres études sur l'activité répressive de TCF chez *Xenopus*, ont identifié le corépresseur transcriptionnel CtBP (c-terminal binding protein) comme partenaire d'interaction de TCF (Brannon *et al.*, 1999). CtBP diffère de Groucho tout d'abord parce qu'il agit sur de courtes distances, soit d'environ 100 pb (Nibu *et al.*,

1998), contrairement à Groucho qui a une longue portée d'action allant jusqu'à 1 kb (Zhang et Levine, 1999). Aussi, CtBP diffère de Groucho par le fait qu'il n'est pas sensible au TSA, un inhibiteur d'HDAC de classe I et II (Phippen *et al.*, 2000).

D'une autre part, les facteurs TCFs peuvent subir certaines modifications empêchant l'activation transcriptionnelle de leur gènes cibles. Chez *drosophila*, l'analogue de CBP, dCBP, lie TCF et acétyle son domaine de liaison à la β -caténine ce qui diminue son affinité pour celle-ci (Waltzer et Bienz, 1998). L'activité de dCBP antagonise la voie des Wnts lorsque les cellules sont faiblement stimulées.

Chez *caenorhabditis elegans*, l'analogue de TCF, POP-1 est soumis à la phosphorylation par des kinases orthologues de NLK (Nemo-like kinase) et Tak-1 (transforming-growth-factor- β -activated kinase-1). Cette phosphorylation altère la distribution subcellulaire de POP-1 et de cette façon diminue sa disposition à lier l'ADN (Meneghini *et al.*, 1999 ; Rocheleau *et al.*, 1999). Chez les vertébrés, NLK confère un mécanisme de répression transcriptionnelle puisqu'elle libère le promoteur du complexe TCF- β -catenin (Hetch et Kemler, 2000).

1.4 La chromatine

La régulation de la transcription des gènes est un processus très complexe et hautement diversifié qui passe impérativement par le remodelage de la chromatine. Ainsi, les histones jouent un rôle intégral dans la régulation de l'expression génique.

1.4.1 La structure de la chromatine

La chromatine est une structure hautement dynamique comprenant les protéines histones et non-histone qui servent d'échafaudage pour l'organisation de l'ADN génomique de toute cellule eucaryote (revue par Vaquero *et al.*, 2003, Khorasanizadeh, 2004). L'unité de base de la chromatine est le nucléosome : il comprend un octamère d'histones sur lequel est enroulé une super hélice d'ADN d'environ 146 pb. Chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 sont en deux copies dans chaque nucléosome. H3 et H4 forment un hétérodimère qui s'assemble pour former une particule tétramérique (H3-H4)₂ tandis que H2A et H2B s'hétérodimérisent pour s'associer de part et d'autre du tétramère (Horn et Peterson, 2002). Chaque histone possède un domaine globulaire impliqué dans les interactions histone-histone et une partie N-terminale hydrophile qui émane radialement de chaque nucléosome (figure 4). De cette manière, les queues N-terminales protubérantes forment des surfaces idéales pour des modifications covalentes post-traductionnelles et elles permettent l'interaction fonctionnelle avec l'ADN, avec les nucléosomes adjacents et avec divers facteurs liant la chromatine.

Les micrographies électroniques ont permis de voir le premier niveau d'arrangement des nucléosomes : un à la suite de l'autre ils forment une fibre de 11nm de diamètre que l'on appelle plus souvent « collier de perle ». Le deuxième niveau de compaction de la chromatine, correspondant à une fibre de 30 nm qu'on appelle hétérochromatine. Celle-ci est stabilisée par la présence de l'histone H1 qui immobilise le nucléosome à la jonction où l'ADN sort et entre dans celui-ci. L'histone H1 permet aussi le repliement intramoléculaire de la fibre de chromatine en interagissant avec les autres H1 (revue par Hansen, 2002). La disposition des histones dans la fibre de 30 nm n'a pas été élucidée mais deux modèles ont été proposés soit le modèle zig zag et le modèle solénoïde (revue dans Wolffe, 1998).

1.4.2 Les facteurs remodelant la chromatine

La cellule utilise plusieurs facteurs qui altèrent la structure de la chromatine et qui exercent ainsi un contrôle sur la transcription génique. Suivant leur mécanisme d'action, ces facteurs peuvent se catégoriser en deux groupes: les facteurs qui remodelent la chromatine d'une façon ATP-dépendante et les enzymes qui ajoutent des modifications covalentes sur la queue N-terminale des histones.

Les facteurs ATP-dépendant se divisent en quatre familles selon la similarité de leur sous-unité ATPasique : ISWI (imitation of switch), SWI/SNF (switch/sucrose nonfermenting), INO80 (inositol 80) et CHD (chromodomain helicase/ATPase DNA binding protein). De plus, ces ATPases démontrent des différences mécanistiques quant à leurs stimulations face à l'ADN nu et la nécessité des parties N-terminales des histones pour leur fonctionnement (Flaus et Owen-Hughes, 2001). L'état final de la réorganisation de la chromatine diffère aussi pour chacun de ces facteurs. Le transfert *trans*, promu par SWI/SNF, est caractérisé par le transport du nucléosome dans une autre région d'ADN et il peut amener la rupture des nucléosomes. Par opposition, le transfert *cis*, observé entre autres chez ISWI, occasionne le glissement des octamères d'histones sur l'ADN et ce, sans causer leur bris (Varga-Weisz, 2001).

Plusieurs modèles ont été considérés quant à la façon dont le remodelage de la chromatine se réalisait (Flaus et Owen-Hughes, 2001). La microscopie électronique a permis de voir que la liaison de SWI/SNF à l'ADN se faisait en deux points et que de cette façon, il y avait formation de différentes boucles. Cette observation a conduit à l'établissement d'un modèle selon lequel la boucle créée par la liaison du facteur à l'ADN se propagerait dans le nucléosome ce qui occasionnerait son glissement sur l'ADN (Bazatt-Jones *et al.*, 1999).

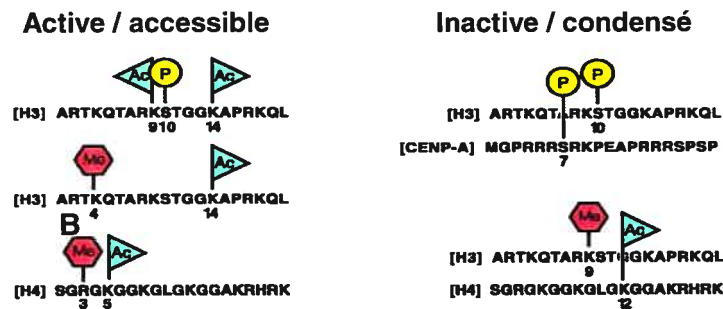
1.4.3 Le code des histones

Strahl et Allis (2000) ont élaboré une hypothèse qui décrit un système par lequel certaines parties du génome sont marquées par les modifications sur les histones. Plus précisément, leur théorie stipule que les modifications covalentes sur les parties N-terminales des histones sur le promoteur d'un gène constituent un code qui détermine son état transcriptionnel. Le code dépend de deux types d'enzymes soit premièrement, celles qui écrivent le code en ajoutant ou en enlevant des

modifications sur des sites spécifiques des partie N-terminales des histones et deuxièmement, celles qui interprètent le code en ayant la capacité de reconnaître des patrons spécifiques de modifications et d'interagir avec d'autres cofacteurs pour traduire l'état transcriptionnel du gène. De façon encore plus sophistiqués et précise, chaque patron de modifications engendrerait un nouveau contexte où d'autres modifications pourraient être possibles, ce qui permet de communiquer un effet en aval singulier. De la sorte, le code des histones étend l'information au-delà du code génétique.

Globalement la théorie du code des histones suggère que le moment, le type, l'emplacement et la séquence des modifications sur les parties N-terminales des histones englobent un code qui guide la spécificité envers divers substrats et ainsi guide le remodelage de la chromatine au service de la régulation transcriptionnelle.

A



B

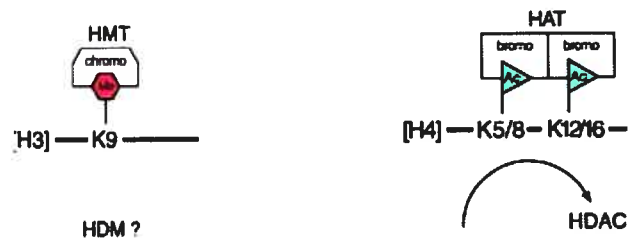


FIGURE 4 : Modèles pour la formation de l'hétérochromatine et de l'euchromatine par des modifications sur les histones (A) Exemples de modifications combinatoires sur les parties N-terminales des histones. (B) Modules de reconnaissance ayant montrés interagir avec des sites spécifiques de méthylation (chromodomaine) ou d'acétylation (bromodomaines) sur les parties N-terminales des histones (modifié de Jenuwein et Allis, 2001).

1.4.3a L'acétylation et la désacétylation des histones

L'acétylation de la chromatine a lieu sur les résidus lysines le plus souvent des queues des histones H3 et H4 mais aussi sur celles de H2A et H2B (Berger, 2002). Les HATs qui effectuent cette tâche peuvent se subdiviser en deux types selon leur localisation dans la cellule. Les HAT de type B sont cytoplasmiques et sont impliqués dans la déposition des histones (Verreault *et al.*, 1996). Le type A est nucléaire et il comporte essentiellement des coactivateurs transcriptionnels. Il existe trois familles de HAT de type A, soit la famille GNAT dont les membres sont reliés à la première HAT découverte GCN5 chez la levure (comprenant entre autres PCAF), la famille MYST, et CBP/p300. Ces familles se retrouvent et agissent à l'intérieur de complexes aux activités diverses comprenant de multiples sous-unités. Ces différents complexes ont des spécificités divergentes et sont impliqués dans des fonctions biologiques distinctes. Par exemple, il a été suggéré que GCN5 joue un rôle clé dans la prolifération cellulaire et dans le développement tandis que CBP/p300 sert de régulateur global impliqué dans l'activation de la transcription (Fry et Peterson, 2001).

L'acétylation du groupement amine ϵ de la lysine amène une diminution de la charge globale de l'histone. Étant donné que les parties N-terminales sont hautement basiques, certains ont postulé que l'acétylation des lysines diminuent leur affinité pour l'ADN négativement chargé (Hong *et al.*, 1993) et aussi altère les interactions entre nucléosomes (Fletcher et Hansen, 1996). De la sorte, l'acétylation génère une structure permissive qui facilite l'accès aux protéines régulant la transcription (Lee *et al.*, 1993).

D'une autre part, l'acétylation peut réguler de façon spécifique des processus divers comme la déposition des histones sur l'ADN, la réplication et la réparation de l'ADN, par le recrutement de protéines qui renferment un module de reconnaissance spécifique au lysine acétylé qu'on appelle bromodomaine (Khorasanizadeh, 2004). Le bromodomaine est une séquence conservée d'environ 100 a.a. retrouvée chez beaucoup de protéines associées à la chromatine. L'affinité de liaison d'un bromodomaine pour une lysine acétylée augmente dramatiquement lorsque des bromodomains en tandem reconnaissent plusieurs sites acétylés adjacents sur une même histone (Owen *et al.*, 2000). Aussi, la spécificité de liaison peut être renforcée lorsque le bromodomaine effectue des contacts additionnels avec d'autres résidus sur l'histone (Owen *et al.*, 2000). Le bromodomaine est présent chez beaucoup de

régulateurs transcriptionnels possédant une activité HAT dont entre autres p/CAF et TAFII₂₅₀. Plusieurs de ces protéines présentent plusieurs bromodomaines régulièrement espacés (jusqu'à six), ce qui permettrait la liaison à des combinaisons spécifiques de groupements acétyles (Jenuwein et Allis, 2001).

L'acétylation des histones est un processus hautement dynamique. Ainsi, la réversibilité de cette modification est tout aussi importante dans sa fonction et c'est pourquoi elle doit être efficace et précise. Pour ce faire il existe une multitude d'histone désacétylases (HDACs) subdivisée en trois classes, i.e. selon leur homologie à des HDACs retrouvées chez la levure. La classe I inclue les HDACs 1, 2, 3 et 8, homologues à Rpd3, la classe II comprend les HDACs 4, 5, 6, 7, 9 et 10, homologues à Hda1, tandis que la classe III comprend les HDAC homologues à Sir2p (silent mating type information regulator). Les membres de la classe I sont tous nucléaires et sont ubiquitaires. Ils sont retrouvés associés à une variété de complexes dont entre autres les complexes corépresseurs comprenant le remodelleur de la chromatine ATP-dépendant NurD et le corépresseur général de la transcription Sin3. Aussi, ces complexes peuvent interagir avec les corépresseurs NCoR et SMRT. Les membres de la classe II sont exprimés d'une façon spécifique à certains tissus et ils sont cytoplasmiques, quoique certains sont transloqués au noyau suite à leur phosphorylation. Les membres de cette famille interagissent directement avec SMRT et NCoR (Kao *et al.*, 2000). La classe III se distingue des deux premières puisque ces membres ne sont pas sensibles au trichostatine A (TSA), un inhibiteur spécifique aux HDACs (Yoshida *et al.*, 1990). Les protéines Sir, représentants les HDAC de classe III, sont impliquées dans une multitude de processus. Le facteur SIR2 a permis d'établir le premier lien précis entre le remodelage de la chromatine et le processus de vieillissement. Les mutants SIR2 ont une durée de vie plus courte tandis qu'un allongement de la durée de vie est observé lors de l'ajout d'une copie du gène (Kaeberlein *et al.*, 1999).

1.4.3b La méthylation des histones

La méthylation est autant associée à l'activation qu'à la répression de la transcription. Les histones méthyltransférases (HMTs) catalysent le transfert des groupements méthyles du S-adenosyl-L-méthionine sur les résidus arginines et lysines des histones et ce, principalement sur H3 et H4 (Vaquero *et al.*, 2003). Les HMTs à domaines SET

(Su(var)3-9, Enhancer of zeste E(z), Thritorax, TRX) méthylent les résidus lysines tandis que les PRMTs (proteine arginine methyltransferase) ont comme substrat les résidus arginines. Contrairement à l'acétylation, la méthylation n'altère pas la charge totale de la queue N-terminale des histones. Cependant l'addition de groupements méthyles augmente sa basicité et son hydrophobicité donc, son affinité pour les molécules anioniques comme l'ADN (Baxter et Byovet, 1975 ; Byovet *et al.*, 1972). Par conséquent, la méthylation des histones semble altérer l'interaction de l'histone avec l'ADN et donc altérer la structure du nucléosome au même titre que le fait l'acétylation (Rice et Allis, 2001).

Le lien entre la méthylation des histones et l'assemblage de l'hétérochromatine s'est fait par la découverte des premières HMT, les protéines à domaines SET Su(var) (supressor of variegation) (Rea *et al.*, 2000). La méthylation des lysines 9 en H3 par ces protéines permet la reconnaissance de HP1 (heterochromatine protein 1) qui est une composante constitutive de l'hétérochromatine et qui joue un rôle direct dans la condensation de la chromatine (Bannister *et al.*, 2001). D'un autre côté, la méthylation des lysines 4 sur H3 est reliée à l'activation de la transcription (Schneider *et al.*, 2004). Chez les cellules mammifères, les protéines à domaine SET comprennent les membres G9a, hSet9 et PR-SET7 qui possèdent des fonctions surtout reliées à la régulation de la transcription mais aussi à l'établissement de région épigénétiques silencieuses et d'empreintes génomiques (Lachner et Jenuwein, 2002). Les groupements méthyles sur les résidus lysines sont reconnus par les chromodomaines retrouvés dans différents types de protéines d'où les fonctions diverses associées à la méthylation. Par exemple, HP1 reconnaît les résidus méthylés par son chromodomaine (Bannister *et al.*, 2001). En contraste, les chromodomaines sont aussi retrouvés chez des protéines à activité HAT.

La méthylation des résidus arginine sur les histones H3 et H4 est corrélée à l'activation de la transcription. Les PRMTs responsables de ces modifications comprennent PRMT-1 et PRMT-4, plus couramment appelé CARM-1 (Zhang *et al.*, 2001). CARM-1 a aussi la capacité de métyler plusieurs protéines non-histone comme CBP/p300 et semble ainsi jouer un rôle important dans l'activation transcriptionnelle par les RN (Xu *et al.*, 2001). Certains modules PRMT sont impliqués dans la formation d'un diméthylarginine symétrique tandis que d'autres produisent un diméthylarginine asymétrique.

Contrairement à l'acétylation, la méthylation des histones a longtemps été considérée comme une modification irréversible (ne pouvant être supprimée que par la mitose), puisque aucune déméthylase n'avait été identifiée. Tout récemment, la méthylation des histones s'est avérée être régulée de façon dynamique par la découverte que LSD1 (lysine specific demethylase-1), une amine oxidase, pouvait promouvoir spécifiquement la déméthylation des lysines 4 des histones H3 et ainsi agir comme corépresseur transcriptionnel (Shi *et al.*, 2004).

1.4.3c La phosphorylation des histones

La phosphorylation est une modification covalente réversible promue par diverses kinases dont Aurora/AIK, PKA (Protein Kinase A), RSK-2 (Ribosomal S6 Kinase 2), MSK-1 (MAP and Stress Kinase) et cdk2 (Cyclin Dependant Kinase 2). Ces kinases semblent cibler les résidus sérines et thréonines entourés de résidus basique. La phosphorylation sur la sérine 10 et 28 de H3 est la mieux connue et elle est impliquée dans la condensation et la ségrégation des chromosomes (Hsu *et al.*, 2000). La phosphorylation sur S10 semble en plus, être impliquée dans l'activation de la transcription (Thompson *et al.*, 1999). Aucun site de reconnaissance pour les phosphoserine n'a été identifié jusqu'à maintenant. Il semble que la phosphorylation agit en régulant les modifications ayant lieu à proximité. En effet, sur l'histone H3 la phosphorylation en serine 10 antagonise la méthylation en lysine 9 (Rea *et al.*, 2000) mais elle stimule l'acétylation sur la lysine 14 et elle coopère avec cette dernière pour activer la transcription (Lo *et al.*, 2000). Il est intéressant de noter que la phosphorylation sur H1 influence la régulation transcriptionnelle par les RNs : la perte de la phosphorylation sur les H1 amène un état réfractaire rendant impossible l'activation par les récepteurs aux glucocorticoïdes (Lee et Archer, 1998). La phosphorylation des histones est reliée aussi à d'autres fonctions comme l'induction de l'apoptose et la réponse aux dommages à l'ADN (Cheung *et al.*, 2000).

1.4.3d Les autres modifications des histones

Les résidus lysines des histones peuvent aussi être modifiés par la conjugaison d'une protéine ubiquitine. La poly ou la mono-ubiquitination reflètent des fonctions et substrats différents (Vaquero *et al.*, 2003). Étant donné que la polyubiquitination est une marque qui dirige les protéines vers la dégradation par le protéasome 26S

(Pickart, 2001), elle est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires comme entre autres, dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la différenciation cellulaire. La monoubiquitination est quant à elle reliée à l'activation ou à la répression de la transcription. Chez *Tetrahymena*, la chromatine en état transcriptionnel actif s'est avérée monoubiquitinée (Davie *et al.*, 1991). De plus, le coactivateur TAFII250 a montré posséder une activité de monoubiquitination chez *drosophila* (Pham et Sauer, 2000). En opposition, d'autres expériences chez la levure ont montré que l'ubiquitination est nécessaire pour la répression transcriptionnelle et pour la réparation de l'ADN (Huang *et al.*, 1997). Plusieurs évidences laissent supposer une analogie entre la monoubiquitination et l'acétylation : cette modification semble affecter la structure de la chromatine (Li *et al.*, 1993) et elle semble être requise pour établir d'autres modifications (Sun et Allis, 2002). Toutefois, la monoubiquitination reste très mal connue chez les organismes eucaryotes.

L'ajout de groupements ADP-ribose se fait sur les acides glutamiques ou sur les arginines de toutes les histones mais principalement sur H1 et H2B (Kappus *et al.*, 1993). Le poly-ADP-ribose est une immense structure polymérique en branche qui contient plus de 100 ADP-riboses ce qui laisse croire que son effet sur la chromatine est principalement structural. D'ailleurs, des effets sur la structure du nucléosome et de l'ADN sous-jacente ont été démontrés (Huletsky *et al.*, 1989) (D'amours *et al.*, 1999). Cette modification s'avère intéressante puisqu'elle nécessite le NAD⁺ comme source d'ADP-ribose ce qui établit un lien avec les HDACs de classe III et avec l'état métabolique de la cellule. De plus, elle est très rapidement dégradée, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle elle joue un rôle dans l'adaptation à l'environnement cellulaire (Pieper *et al.*, 1999). L'identification et la caractérisation d'ADP-ribosylases spécifiques aux histones fourniraient des points de repères pertinents pour l'élaboration de la fonction de cette modification.

Finalement, des études ont montrés que les histones étaient aussi biotinylés à l'intérieur du noyau des cellules, cependant cette modification est très mal connue.

1.3 Les rétinoïdes et les Wnts dans le développement

Par leur capacité d'altérer l'expression de certains gènes, l'AR et les membres des Wnts jouent des rôles capitaux lors du développement embryonnaire. En effet, ces deux molécules ont montré jouer des rôles importants dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur, plus précisément dans le patterning vertébral, dans le développement de la partie postérieure de l'embryon et dans le développement du système nerveux central. Ils sont catégorisés comme des facteurs postériorisants puisqu'ils peuvent réprimer des marqueurs de l'identité antérieure et induire l'expression de gènes associés à des destins cellulaires postérieurs chez l'embryon (Nieuwkoop, 1999 ; Altmann et Brivanlou, 2001). Cette fonction semble entre autres être due à leur capacité d'altérer l'expression des gènes *Hox*.

1.3.1 Les gènes *Hox*

Les gènes *Hox* codent pour des facteurs de transcription à homéodomaine impliqués dans le patterning antéro-postérieur. Chez la souris, il existe 39 gènes *Hox* organisés en 4 blocs soit *Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc* et *Hoxd*. De plus, ils sont divisés en 13 groupes paralogues selon leur emplacement dans chaque bloc. Les gènes *Hox* situés en 3' de chaque bloc sont exprimés plus précocement et dans des régions plus rostrales de l'embryon, en opposition aux gènes situés en 5' qui s'expriment plus tardivement et dans des régions plus postérieures. Cette organisation spatiale et temporelle de l'expression des gènes *Hox* est appelée colinéarité (Krumlauf, 1994). La colinéarité impose l'expression d'une combinaison unique de gènes *Hox* à chaque niveau de l'axe antéropostérieur. Ce phénomène constitue le code *Hox* et il dirige l'organisation des destins cellulaires le long de l'axe antéropostérieur. Ainsi, une perturbation dans le code *Hox* occasionnera des transformations homéotiques.

1.3.2 La régulation des *hox* par l'AR et par les Wnts

Plusieurs évidences ont démontré que l'AR et les Wnts affectent l'expression de gènes *Hox*. Des mutants invalidant *Wnt3a* présentent des transformations homéotiques qui corrèlent avec une altération de l'expression des gènes *Hox* (Ikeya et Takada, 2001). D'un autre côté l'AR induit l'expression des gènes *hox* d'une façon colinéaire (Simeone *et al.*, 1990). En culture, un excès en AR lors du développement

embryonnaire amène un décalage rostral du patron d'expression des gènes *Hox* (Kessel et Gruss, 1991). En opposition, des souris mutantes invalidant RAR présentent un patron d'expression des gènes *Hox* décalé vers des régions plus postérieures (Dupé *et al.*, 1999) et dans les deux cas, il y a présence de transformations homéotiques (Lohnes *et al.*, 1994). De plus, la présence de RAREs fonctionnels dans les régions régulatrices de certains gènes *Hox* suggère que l'AR régule directement l'expression des gènes *Hox*. Cependant, ces RAREs semblent important pour la fonction des *Hox* seulement dans le neuroectoderme et la relation directe entre la régulation de l'expression des gènes *Hox* par l'AR et le patterning vertébral n'a pas été clairement établie. Ainsi, ces observations laissent croire que l'AR pourrait altérer l'expression des gènes *Hox* et le patterning vertébral par un mécanisme indirect.

Un autre joueur dans la spécification de la partie postérieure de l'embryon, *cdx1*, semble servir d'intermédiaire dans ces processus d'altération de l'expression des gènes *Hox* (revue par Lohnes, 2003). En effet, *cdx1* est directement régulé par la voie des rétinoïdes et par la voie des Wnts et il régule l'expression des gènes *Hox*. Ainsi, *Cdx1* semble servir de relais pour intégrer les signaux spécifiant la partie postérieure de l'embryon.

1.3.3 La famille de gènes *cdx*

Une sonde correspondant à la séquence de la boîte homéo du facteur de transcription *ultrabithorax* a permis la découverte du premier membre de la famille *cdx*, *caudal* chez *drosophila* (Mlodzik et Gerhing, 1987; Levine *et al.*, 1985). Le nom *caudal* dérive de sa fonction essentielle dans la spécification de la partie postérieure de l'embryon. Plusieurs homologues de *cad* furent ultérieurement identifiés notamment les membres *cdx1*, *cdx2* et *cdx4* chez la souris (Duprey *et al.*, 1988 ; James et Kazenwadel, 1991; Gamer et Wright, 1993).

1.3.4 Expression de *cdx1* durant le développement

Au cours du développement embryonnaire, l'expression de *cdx1* est tout d'abord détectée lors de la gastrulation précoce au niveau du sac vitellin (McGrath et Palis, 1997). Au jour embryonnaire 7.5, les transcrits de *cdx1* sont observés dans l'ectoderme et le mésoderme naissant de la région élargie de la ligne primitive (Meyer et Gruss, 1993). L'expression de *cdx1* à ce moment et à cet endroit est corrélée avec la présence d'AR (Rossant *et al.*, 1991). Peu de temps après, au jour 7.75, l'expression de *cdx1* se retrouve antérieurement au nœud dans la plaque neurale et le mésoderme paraxial. Au jour 8.5, *cdx1* est exprimé dans le tube neural, dans les somites et dans le bourgeon de la queue où la limite rostrale de l'expression se situe au niveau du sulcus préotique. À mesure que le développement avance, la limite antérieure de l'expression de *cdx1* dans le tube neural régresse vers des régions plus postérieures. Au niveau de l'ectoderme neural, *cdx1* est plus précisément localisé dans la région dorsale du pli neural et se retrouve même dans certaines populations de cellules migratoires de la crête neurale. Au jour 9.0, lorsque les somites se différencient, l'expression de *cdx1* se retrouve plus limitée aux régions dorsales qui donneront naissance au dermamyotome. L'expression de *cdx1* se maintient dans le bourgeon de la queue et dans le mésenchyme des bourgeons des membres antérieures au jour 9.5 et de façon plus faible dans les bourgeons des membres inférieurs au jour 10.5. *Cdx1* est aussi exprimé dans le cordon néphrogénique puis plus tard dans les canaux mésonéphriques. L'expression de *cdx1* dans l'embryon diminue graduellement pour disparaître complètement au jour 12. Ce n'est qu'au jour 14 que *cdx1* est à nouveau détecté et ceci, dans l'endoderme de l'intestin selon un gradient antéropostérieur partant du futur duodénum jusqu'au colon distal (James *et al.*, 1994). Chez l'adulte, l'expression de *cdx1* se perpétue dans l'intestin au niveau des cellules de cryptes (James et Kazenwadel, 1991 ; Subramanian *et al.*, 1995).

1.3.5 Le rôle de *Cdx1* durant le développement vertébral

Plusieurs expériences chez *drosophila* ont démontré des fonctions de *cad* dans l'établissement de l'axe antéropostérieur et dans la spécification de la partie postérieure de l'embryon. La fonction de *cad* dans le patterning semble être conservée chez certains membres *cdx* comme l'a démontré notamment l'invalidation génique de *cdx1* et *cdx2* chez la souris (Subramanian *et al.*, 1995 ;

Chawengsaksophak *et al.*, 1997). Les souris ayant *cdx1* invalidé sont viables, fertiles et semblent à première vue normales. Cependant, leur squelette axial présente des transformations homéotiques antérieures ce qui signifie que des segments postérieurs prennent l'identité de segments plus antérieurs. Ces transformations ont lieu au niveau des vertèbres cervicales et aussi au niveau des vertèbres thoraciques antérieures. La présence de certains de ces défauts chez l'hétérozygote, quoiqu'à une fréquence moindre, indique l'importance d'un niveau d'expression adéquat de *Cdx1* pour l'établissement d'un axe antéropostérieur normal. Il est à noter que même si *cdx1* est exprimé dans le dermamyotome, l'intestin et le mésonephros, aucune anomalie n'a été rapportée dans ses tissus chez les souris sans *cdx1*. D'un autre côté, l'invalidation génique de *cdx2* rend impossible l'implantation de l'embryon et amène donc le décès des embryons au jour 3.5 (Chawengsaksophak *et al.*, 1997). Toutefois, les hétérozygotes pour *cdx2* démontrent des transformations homéotiques au niveau de la colonne vertébrale chevauchant celles observées chez les mutants homozygotes pour *cdx1* mais s'étendant plus postérieurement. Les souris *cdx2*^{+/-} présentent une queue sous-développée et ce défaut est accentué lors de l'invalidation combinée de *cdx1* (Van Den *et al.*, 2002). Ces observations suggèrent que *cdx1* et *cdx2* coopèrent pour spécifier la partie postérieure de l'embryon et qu'ils sont impliqués dans la régulation de l'expression de certains gènes Hox.

1.3.6 La régulation de la transcription par *cdx1*

Cdx1, de même que tous les membres *cdx*, arbore plusieurs domaines modulaires. Ceux-ci consistent en une région N-terminale nécessaire à la localisation subcellulaire, une boîte homéo permettant la reconnaissance de certains motifs sur l'ADN et une séquence hexapeptide très conservée en N-terminale de la boîte homéo. La séquence hexapeptide a démontré être essentielle pour l'interaction entre certains facteurs de transcription notamment entre les protéines Pbx et Hox (Chang *et al.*, 1995 ; Phélan *et al.*, 1995; revue par Mann et Affolter, 1998), cependant ce motif n'a pas été étudié chez *cdx1*.

Comme tous les facteurs de transcription, les protéines *Cdx* régulent la transcription de leurs gènes cibles en liant des séquences consensus bien précises. Ces éléments de réponse (CDRE), reconnus par la boîte homéo des membres *Cdx*, se retrouvent entre autres dans les régions régulatrices de certains gènes *Hox* (Subramanian *et al.*,

1995), notamment *hoxa7* et *hoxb8* possèdent des CDRE dans leur locus ce qui soutient un rôle pour *cdx1* dans la régulation de l'expression des gènes Hox.

1.3.7 La régulation de la transcription de *cdx1*

Plusieurs évidences démontrent que l'expression de *cdx1* est directement régulée par l'AR et par les Wnts. Il semble que l'AR régule l'expression de *cdx1* jusqu'au jour embryonnaire 7.5 et que *Wnt3a* vient maintenir l'expression à partir du jour 8.5 et plus tard. Le promoteur de *cdx1* possède un RARE atypique (Houle *et al.*, 2000) et deux éléments de réponse au facteur de transcription LEF/TCF (LRE) (Prinos *et al.*, 2001 ; Lickert *et al.*, 2000) (figure 4). *In vivo*, ces éléments se sont tous avérés nécessaires pour l'expression normale d'un transgène rapporteur de *cdx1* (Lickert et Kemler, 2002). L'importance du RARE a d'autant plus été supportée par le fait que sa destruction entraîne une partie des défauts vertébraux observés chez le mutant de *cdx1* (Houles *et al.*, 2003). Cependant, l'AR semble réguler l'expression de *cdx1* à une période tardive de la gastrulation (au jour embryonnaire 7.5) seulement, c'est-à-dire dans l'ectoderme et le mésoderme naissant de la région élargie de la ligne primitive. En effet, chez les souris mutantes invalidant RAR, l'expression de *cdx1* n'est pas diminuée au jour 8.5 et après (Houle *et al.*, 2000). De plus, l'AR n'est plus détectée dans la partie postérieure de l'embryon au moment où *cdx1* continue d'être exprimé.

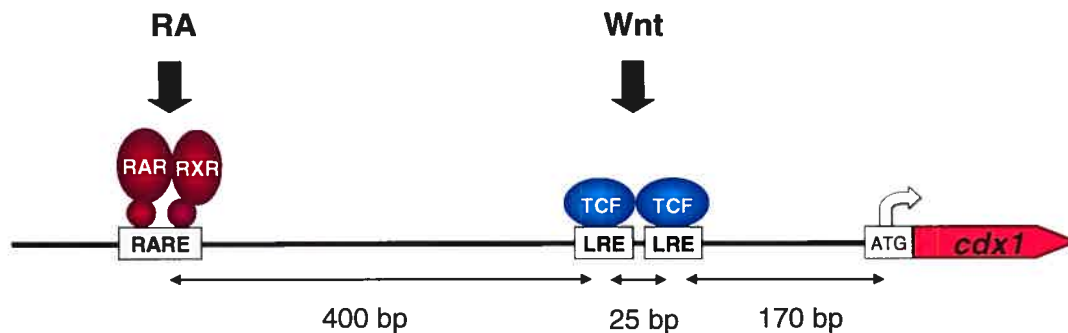


FIGURE 5 : Structure du promoteur de *cdx1*.

Au jour 8.5, il semble que ce soit Wnt qui maintienne l'expression de *cdx1*. En effet, le patron d'expression de *Wnt3a* chevauche celui de *cdx1* dans la partie caudale de l'embryon (Charité *et al.*, 1998). De plus, chez les mutants invalidant *Wnt3a* et chez les hypomorphes de *Wnt3a*, l'expression de *cdx1* est diminuée (Ikeya et Takada, 2001 ; Prinos *et al.*, 2001). Chez *Xenopus*, des morpholinos contre *Wnt3a/Wnt8*

entraînent une perte des structures de la queue tout comme des morpholinos contre *cdx1/cdx4* (Shimizu *et al.*, 2005) suggérant que *cdx1* intègre le signal des Wnts pour former la partie postérieure de l'embryon.

Il a été montré que l'AR et Wnt3a non seulement induisaient l'expression d'un rapporteur de *cdx1* chez des lignées stables mais qu'ils exerçaient ensemble une forte synergie sur l'expression de ce rapporteur (Prinos *et al.*, 2001). Finalement, il est intéressant de noter que des expériences *in vivo* chez *Xenopus* montrent que ces deux voies de signalisation exercent un effet synergique sur la postériorisation de l'embryon (Sasai et Robertis, 1997).

1.4 Hypothèse

Diverses expériences ont démontré que la voie des Wnts et la voie des rétinoïdes régulent directement l'expression de *cdx1*. Entre autres, les mutants invalidant RAR (Houle *et al.*, 2000) et Wnt3a (Ikeya et Takada, 2001), le patron d'expression de Wnt3a (Charité *et al.*, 1998) et la distribution de l'AR dans l'embryon ont fourni plusieurs preuves indiquant leurs capacités à réguler l'expression de *cdx1*. D'autre part, le promoteur de *cdx1* possède un RARE atypique (Houle *et al.*, 2000) et deux LREs (Prinos *et al.*, 2001) qui se sont tous avérés nécessaires pour l'expression normal de *cdx1 in vivo* (Lickert et Kemler, 2002). De façon intéressante, d'autres expériences ont montré que l'AR et Wnt3a exercent ensemble une forte synergie sur l'expression d'un rapporteur de *cdx1* chez des lignées cellulaires stables (Prinos *et al.*, 2001).

Les effecteurs en aval dans la voie des rétinoïdes et dans la voie des Wnts, soit RAR et LEF/TCF respectivement, altèrent l'activité de leur gènes cibles en recrutant une panoplie de coactivateurs transcriptionnels avec des activités diverses capables de modifier la chromatine. Ces activités impliquent, entre autres, l'ajout de modifications covalentes post traductionnelles sur les histones et le déplacement des histones sur l'ADN, ce qui a pour effet de faciliter l'engagement de la machinerie transcriptionnelle. Puisque le remodelage de la chromatine joue un rôle intégral dans l'activation transcriptionnelle, nous avons comme hypothèse que la synergie d'activation transcriptionnelle de *cdx1* passe impérativement par une modification particulière de la chromatine.

1.5 Objectifs

L'observation d'une synergie dans l'expression de *cdx1* lors de l'activation simultanée par l'AR et par Wnt3a apporte des interrogations sur les mécanismes moléculaires employés par ces deux voies pour engager la transcription. Le travail a pour but général d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation transcriptionnelle de *cdx1* pour plus précisément d'établir une corrélation entre la synergie d'activation et le remodelage de la chromatine. On sait que la configuration des histones sur l'ADN joue un rôle essentiel au contrôle de l'expression génique. Encore plus, selon la théorie de Strahl et Allis, les modifications covalentes sur les parties N-terminales des histones constituent un code qui reflète l'état transcriptionnel du gène sous jacent. Dans cette optique, l'objectif consiste à établir une corrélation entre l'activation transcriptionnelle synergique de *cdx1* et la reconfiguration de la chromatine dans sa région promotrice.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

2.1 Lignées cellulaires et transfections

Les cellules de carcinome embryonnaires de souris F9 ont été maintenues dans un milieu DMEM (Life Technologies) complétement de glucose (4.5g/litre), de sérum bovin foetal (10%) et de gentamicin (10 µg/ml). Les cellules de carcinome embryonnaire de souris P19 ont été maintenues dans un milieu α -MEM complétement avec 10% de sérum bovin foetal et de gentamicin (10 µg/ml). Pour la culture cellulaire, les F9 et les P19 ont subi des passages aux deux jours dans des plaques de cultures cellulaires de 100 mm (préalablement gélatinisées dans le cas des F9) et elles ont été maintenues à 37°C en présence de 5% CO₂.

Les milieux conditionnés (MC) Wnt3a ont été préparés à partir de lignées stables de cellules L (fibroblastes de souris) intégrant l'ADNc de Wnt3a (Shibamoto et al., 1998). Pour ce faire, un vecteur pGKWnt3a a été construit en insérant le gène de Wnt3a de la souris dans pGKnéo. Ces cellules ont étéensemencées à une densité de 1×10^6 par pètri de 100mm et ont été maintenues dans un milieu DMEM (Life Technologies) complétement de glucose (4.5g/litre), de sérum bovin foetal(10%) et de gentamicin (10 µg/ml) à 37°C dans 5% CO₂. Le milieu a été prélevé lorsque les cellules ont atteint une pleine confluence, soit quatre jours après l'ensemencement. Les milieux de tout les pètris ont été poolés, aliquotés et conservés à -80°C. Ce même lot a été utilisé pour toutes les expériences. À titre de contrôle, des MC ont été récoltés à partir de lignées stables de cellules L intégrant le vecteur pGKnéo. La présence de Wnt3a dans le MC a été détectée par immunoblot (Shibamoto et al., 1998)

Pour les transfections transitoires, environ 0.4×10^6 cellules P19 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits gélatinisées et transfectées 6 heures après à l'aide de la méthode au phosphate de calcium. Le mélange d'ADN comprenait 1.0 µg de vecteur rapporteur luciférase, et un maximum de 2.0 ug de vecteurs d'expression pour un total de 3 µg d'ADN par transfection. Le jour suivant, le milieu a été remplacé par du milieu frais après que les cellules aient été lavées deux fois au PBS. Au même moment, les cellules ont été traitées à l'acide rétinoïque *all-trans* dissous dans le DMSO. Le lendemain (24 heures plus tard), les cellules en monocouches ont été rincées deux fois au PBS froid pour ensuite être lysées avec 250 µl de tampon de lyse (0.1 M Tris-HCl pH 8, 1% igepal A-630, 1 µM dithithreitol) 5 minutes à la température de la pièce. Enfin, 100 µl du surnageant du lysat cellulaire a été prélevé et l'activité luciférase a été évalué dans un luminomètre AutoLumat LB953(Berthold Technologies).

Pour générer les lignées stables, 2×10^6 cellules F9 ont été électroporées avec 30 μg de vecteur rapporteur intégrant un vecteur d'expression de néomycine. Un pool de cellules transformées stables a été sélectionné dans un milieu supplémenté de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G410 (gentamycine) pendant 10 jours.

Pour le Northern blot, environ 1×10^6 cellules F9 ont étéensemencées dans des plaques de cultures cellulaires de 100 mm gélatinisées. Le lendemain les cellules ont été traitées avec l'acide rétinoïque *all-trans* resuspendue dans du DMSO, la trichostatine A resuspendue dans du DMSO ou avec milieu conditionné Wnt3a à une dilution de $\frac{1}{2}$.

Pour les CHIP, environ 3×10^6 cellules F9 ont étéensemencées dans des plaques de cultures cellulaires de 100 mm gélatinisées. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec l'acide rétinoïque *all-trans* et/ou avec le milieu conditionné Wnt3a.

2.2 Northern blot

Les cellules F9 ont été rincées deux fois au PBS traité au DEPC, 2 à 24 heures post-traitement puis l'ARN a été extrait à l'aide du Trizol (Life Technologies) selon les recommandations du fabricant. Quinze microgrammes d'ARN ont été résolus par électrophorèse sur gel de formaldéhyde et transférés sur membrane de nylon Magna (Osmotic inc.) tel que décrit par le fabricant. L'hybridation a été effectuée toute la nuit à 65°C dans un tampon d'hybridation (6 X SSC, 5 X de solution de Denhardt, 0.5% SDS, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ARN de levure) complété de 0.1 mg/ml d'ADN de sperme de saumon et d'environ 10^6 cpm/ml de sonde dénaturée (1X SSC correspond à 0.15M NaCl, 0.015M citrate de sodium). La sonde a été préparée à l'aide de Rediprime II (Amersham). La membrane a par la suite été lavée deux fois 30 minutes dans du 2X SSC 0.1% SDS à 65°C . Le signal a été révélé par autoradiographie avec un film X-Omat (Kodak).

2.3 ChIP (immunoprécipitation de la chromatine)

De une à six heures post-traitement, les cellules F9 ont été fixées 10 minutes au formaldéhyde à une concentration finale de 1%. La fixation a été arrêtée par l'ajout de glycine à une concentration finale de 0,125M pendant 5 minutes. Les cellules ont été lavées deux fois et collectées en présence de PBS froid contenant des inhibiteurs de protéases (1 mM fluorure phenylmethylsulfonyl, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinine, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A, leupeptine 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Des extraits nucléaires ont été effectués dans 400 μl de tampon A (10 mM tris-HCl pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT) avec inhibiteurs de protéases plus 50 μl d'igepal A-630 par plaque. L'équivalent de 1×10^6 noyaux a été resuspendue dans 100 μl de tampon de lyse SDS (1% SDS, 10 mM EDTA,

50 mM Tris-HCl pH8.1) avec inhibiteurs de protéases sur glace 10 minutes. L'extrait nucléaire a par la suite été soumis à la sonication 10 fois 15 sec avec un sonicateur de Fisher Scientific « sonic dismembrator model 100 », jusqu'à ce que les fragments d'ADN aient une taille d'environ 800 à 1000 pb. L'extrait de chromatine a été dilué 10X dans un tampon de dilution (16.7 mM Tris HCL pH 8.1, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 167 mM NaCl) avec inhibiteurs de protéases et pré-incubé 1h à l'aide de billes d'agarose couplées à la protéine A et d'ADN de sperme de saumon. La chromatine a ensuite été incubée toute la nuit avec l'anticorps (voir les anticorps utilisés dans le tableau I). Pour chaque expérience, 5 µg d'anticorps ont été utilisés pour 1X10⁶ cellules. Les complexes de chromatine-anticorps ont été récupérés 1h à 4⁰C avec l'aide de billes d'agarose couplées à la protéine A pré-incubées avec de l'ADN de sperme de saumon. Les billes ont été lavées une fois dans un tampon à faible salinité (0.1% SDS, 1% triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl), une fois dans un tampon à forte salinité (0.1% SDS, 1% triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 500 mM NaCl), une fois dans un tampon de chlorure de lithium (0.25M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.1) et deux fois dans un tampon TE (1 mM EDTA, 10mM tris-HCl pH8.0). La chromatine a été éluée des billes à 65⁰C dans un tampon d'éluion 1% SDS, 0.1M carbonate de sodium. La fixation a été renversé à 65⁰C pendant 4h dans le même tampon contenant 200 mM NaCl. La chromatine a été digérée à la protéinase K et l'ADN a été extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol. Cinq pourcent du matériel immunoprécipité a été utilisé pour chaque réaction de PCR. Les produits de PCR ont été migrés sur un gel de 1.5% d'agarose et visualisés par coloration au bromure d'éthidium. Les séquences des oligonucléotides utilisés sont indiquées dans le tableau I.

Tableau I : Anticorps utilisés pour les expériences de ChIP.

Histone reconnue	compagnie
H3 acétylé	Upstate Biotechnologies
H4 acétylé	Upstate Biotechnologies
H3 méthylé en lysine 4	Upstate Biotechnologies

Tableau II : Séquence des oligonucléotides utilisés pour les ChIP.

Région génique	Oligonucléotide sense	Oligonucléotide antisense	Longueur produit (pb)
Promoteur de <i>cdx1</i>	CCTCACACCCGCCACAGAGC	CAGACTGGCTATCTGCATATG	206
Exon 3 de <i>cdx1</i>	TAAAGATCTGGTTCCAGAACCGCC	TAGGGTAGAACTCCTCCTTGACG	214
Exon 3 de <i>β-actin</i>	TGATGGTGGGAATGGGTCAGAA	TCCATGTCGTCGCCAGTTGGTAA	105

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Étude de la régulation du promoteur de *cdx1*

Cdx1 est régulé par la voie des Wnts et par la voie des rétinoïdes; sur son promoteur proximal on retrouve un élément de réponse à l'AR (RARE) et deux éléments de réponse aux facteurs de transcription LEF/TCF (LRE) (Prinos *et al.*, 2001; Houle *et al.*, 2000; Houle *et al.*, 2003 ; Lickert et Kemler, 2002 ; Lickert *et al.*, 2000 ; Ikeya et Takada, 2001). Pour mieux comprendre les effets des éléments *cis* impliqués dans l'induction de *cdx1*, nous avons généré des pools de cellules F9 stables intégrant un rapporteur de *cdx1* wild type ainsi que des rapporteurs de *cdx1* mutés pour le RARE, pour les LREs et mutés pour tous les éléments de réponses. Comme déjà démontré auparavant, chez les lignées sauvages, on constate une forte synergie d'activation transcriptionnelle du rapporteur de 4165 fois en présence de l'AR et de Wnt3a comparativement à une activation de 35 fois lors du traitement à l'AR seul et de 340 fois suite au traitement par un milieu conditionné (MC) Wnt3a seul (figure 6A). L'effet synergique de l'AR et de Wnt3a sur l'expression de *cdx1* semble spécifique et direct puisque tous les éléments de réponse sont nécessaires : la synergie d'activation transcriptionnelle du rapporteur de *cdx1* par l'AR et par le MC Wnt3a est perdue lorsque le RARE (figure 6B) et/ou les LREs (figure 6C) sont mutés.

L'acétylation des histones est un processus dynamique qui a couramment été associée à l'activation de la transcription. Pour investiguer sur l'implication de l'acétylation des histones dans l'activation transcriptionnelle de *cdx1*, nous avons donc utilisé le trichostatine A (TSA), un inhibiteur spécifique aux HDACs de classe I et II. Chez les lignées sauvages, le TSA seul induit l'expression de *cdx1* et il agit en synergie faiblement avec l'AR et très fortement avec Wnt3a (figure 6A). Les résultats démontrent que la perturbation de l'équilibre acétylation/désacétylation influence le taux d'induction du rapporteur de *cdx1* manifestant ainsi que l'acétylation des histones pourrait être impliquée dans la synergie d'activation transcriptionnelle de *cdx1*. D'autre part, la potentialisation par le TSA est plus faible lors de la perte du RARE (figure 6B) et elle est absente lorsque les LREs sont abolis (figure 6C) Ces données suggèrent que le TSA agit en synergie avec les LREs.

Également, il est à noter que l'expression du rapporteur muté pour le RARE (figure 6B) est plus faible que l'expression observée chez le rapporteur sauvage pour les traitements par Wnt3a seul, par le TSA seul et aussi par Wnt3a en combinaison avec le TSA. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence d'AR dans le sérum.

Une autre donnée importante à souligner est l'induction importante du rapporteur chez les lignées mutantes pour les LREs, lors du traitement combiné par l'AR et par Wnt3a (419 fois). Cette induction pourrait s'expliquer par les autres LREs existant dans le promoteur proximal de *cdx1* (Lickert et Kemler, 2002).

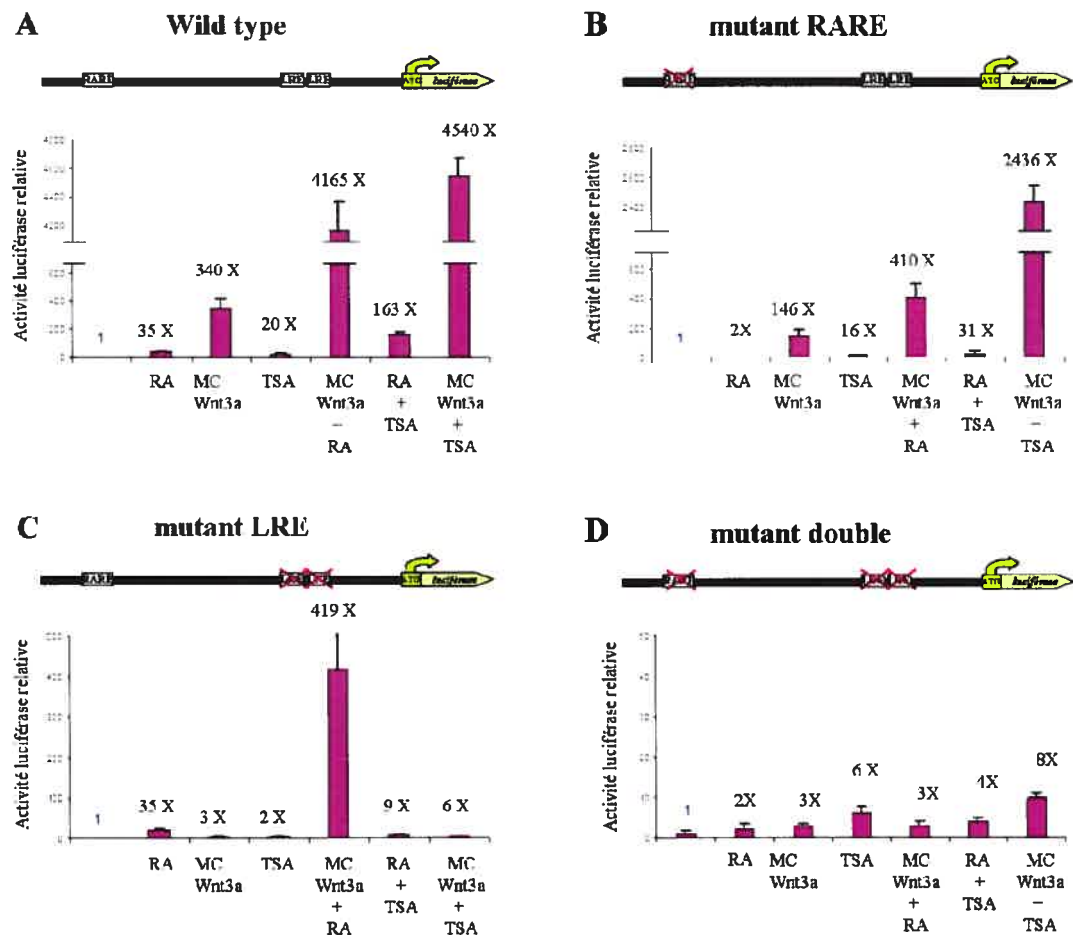


FIGURE 6 : Étude de la régulation du promoteur de *cdx1*. Des pools de cellules F9 stables intégrant un rapporteur de *cdx1* de 2 kb wild type (A) ou muté pour le RARE (B), muté pour les LREs (C) ou muté pour tous les éléments de réponse (C) ont été traités avec l'RA 10^{-6} M et/ou le TSA 10^{-7} M et/ou un milieu conditionné (MC) Wnt3a tel qu'indiqué sur chaque graphique. L'activité luciférase a été évaluée 24 heures post-traitement tel que décrit dans la section matériel et méthodes.

3.2 Étude de l'expression de *cdx1*

Par la suite, afin de déterminer si *cdx1* endogène répond aussi à l'AR et à Wnt d'une façon synergique, nous avons observé le patron d'expression de *cdx1* par Northern blot dans les cellules F9 (figure 7). Le niveau d'ARNm de la β -actine a aussi été évalué comme contrôle et s'est avéré constant durant tous les traitements. Le DMSO est le véhicule dans lequel l'AR et le TSA ont été resuspendus et correspond donc à l'état non traité. *Cdx1* n'est pas détectable lors du traitement par le DMSO et chacun des traitements induit différemment son expression dans les cellules F9. L'effet de chacun des traitements sur l'expression de *cdx1* à partir du promoteur endogène est sensiblement le même que celui observé sur le gène rapporteur lors des essais luciférases. On observe une légère induction par l'AR et par Wnt3a, cependant l'induction par le TSA n'est pas observable. Le TSA potentialise l'effet de l'AR et de Wnt3a sur l'induction de l'expression de *cdx1* ce qui indique une implication de l'acétylation des histones dans la synergie d'activation de la transcription. L'AR et Wnt3a augmentent ensemble le niveau de transcrite de *cdx1* d'une façon synergique dès deux heures après le traitement et cette synergie est maintenue pendant au moins 24 heures. Une membrane sous-exposée est présentée ici afin de pouvoir clairement discerner la synergie d'induction et c'est pourquoi on retrouve une induction plutôt faible par le traitement à l'AR ou Wnt3a seul.

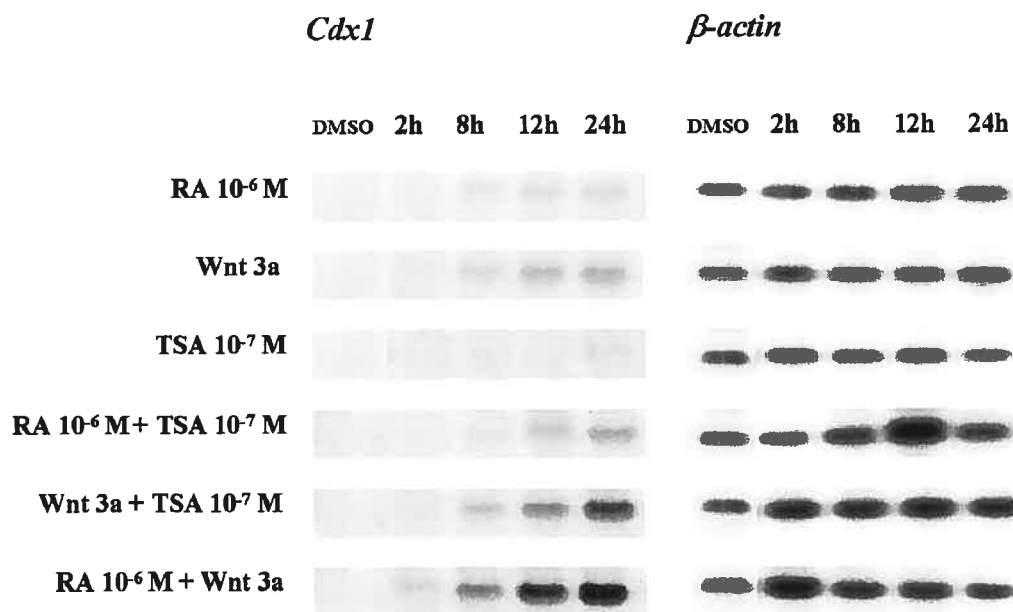


FIGURE 7 : Analyse de l'expression de *cdx1*. Northern blot de l'ARN des cellules F9 traités tel qu'indiqué sur la figure.

3.3 La modification des histones sur le promoteur de *cdx1*

Généralement l'activation de la transcription implique le remodelage de la chromatine qui se fait entre autre par l'ajout de modifications covalentes sur les parties N-terminales des histones dans la région promotrice du gène. Il est bien connu maintenant que l'activation de la transcription par les RAR implique la restructuration de la chromatine et plusieurs indices laissent croire qu'il en est de même pour LEF. À cet effet, RAR recrute divers coactivateurs transcriptionnels dont des HATs tel les facteurs p160, CBP/p300, PCAF, des HMT tel CARM-1 et des facteurs capables de déplacer les histones sur l'ADN comme SWI/SNF. L'activité des facteurs de transcription LEF/TCF est un peu moins bien connue, cependant on sait qu'ils interagissent avec CBP/p300, CARM-1 et SWI/SNF. Ainsi, il apparaît intéressant de croire que la synergie d'activation transcriptionnelle de *cdx1* passe par une reconfiguration particulière de la chromatine dictée par le code des histones. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons quantifié l'association des histones modifiés dans le promoteur endogène de *cdx1* dans les cellules F9 suivant l'induction par l'AR et/ou Wnt3a et ce, par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

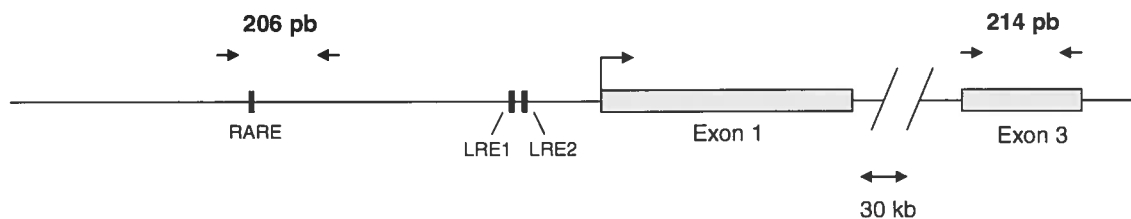


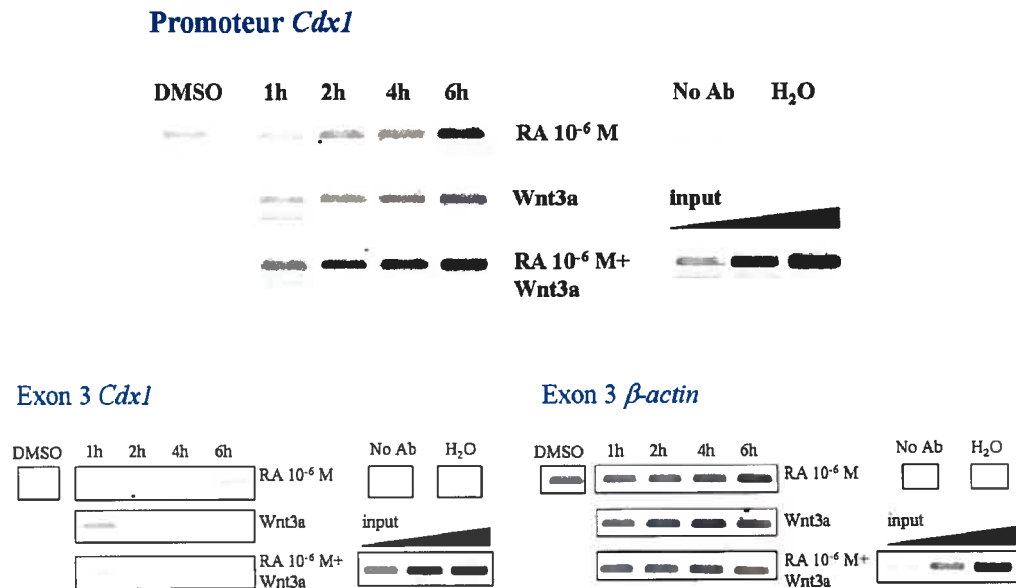
FIGURE 8 : Diagramme présentant les oligonucléotides utilisés sur le locus de *cdx1* pour amplifier l'ADN isolées par la méthode ChIP.

3.3.1 L'acétylation des histones

Beaucoup de coactivateurs transcriptionnel de RAR et LEF/TCF possèdent une activité HATs. Ainsi, on observe une augmentation en histones H3 et H4 acétylés au niveau de promoteurs inductibles par l'AR lors de leur activation (Rastegar et al., 2004 ; Lefèbvre et al., 2002) mais ceci n'a cependant pas été montré chez des promoteurs régulé par LEF/TCF. L'acétylation des histones a une importance plus particulière puisqu'en plus de permettre un relâchement de la chromatine, elle joue un rôle dans le code des histones en constituant un site de reconnaissance pour une variété de protéines ayant un bromodomaine. Cette modification est la mieux connue et elle est très couramment associée à l'activation de la transcription. De façon intéressante, des essais luciférase et des analyses Northern blot démontrent que l'inhibition de la désacétylation (figure 6 et 7), par le traitement au TSA, peut induire une synergie d'activation transcriptionnelle d'une importance comparable à celle observée lors du traitement par l'AR et Wnt3a. Pour cette raison nous avons observé l'acétylation des histones sur le promoteur de *cdx1* et utilisé des anticorps reconnaissant les histone H3 et H4 acétylés sur la totalité de leurs résidus lysine en N-terminal (Upstate Biotechnologies).

Sur le promoteur endogène de *cdx1* dans les cellules F9, un enrichissement graduel en histones H3 et H4 acétylés (figure 9A et B respectivement) est observé suivant l'induction par l'AR et aussi par Wnt3a. Cette augmentation se fait de façon encore plus marquée lorsque les cellules subissent le traitement à l'AR et à Wnt3a combinés. Avec le contrôle d'immunoprécipitation sans anticorps, on n'observe qu'un léger bruit de fond correspondant à un signal non-spécifique. Parallèlement, l'évaluation des fluctuations de ces modifications sur l'exon 3 de *cdx1* et sur l'exon 3 du gène de la β -actine a aussi été effectuée à titre de contrôle négatif. Les exons sont des régions où la chromatine ne subit pas d'altérations lors de l'activation transcriptionnelle d'autant plus que l'exon 3 de *cdx1* se trouve à environ 30 kpb du promoteur.

A H3 acétylés



B H4 acétylé

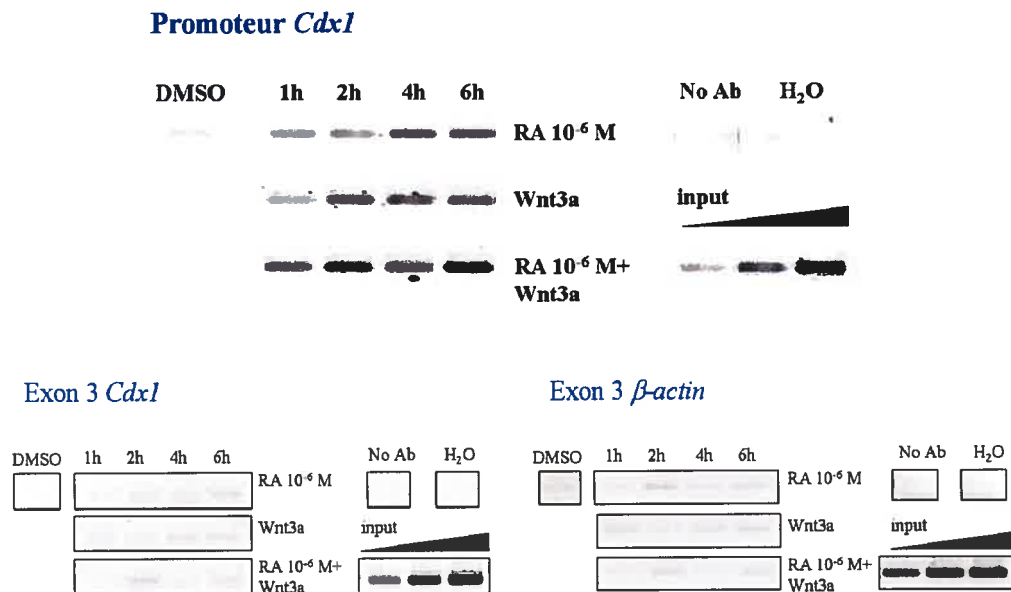


FIGURE 9 : Dynamique de l'acétylation des histones lors de l'activation transcriptionnelle de *cdx1*. Les cellules F9 ont été traitées tel qu'indiqué sur la figure et fixées avec le formaldéhyde. L'extrait de chromatine a été soumis à une immunoprécipitation avec un anticorps contre les histones H3 acétylés (A) et H4 acétylés (B). Le matériel immunoprécipité et un contrôle d'immunoprécipitation sans anticorps (No Ab) ont été amplifiés par PCR avec une paire d'oligos couvrant le promoteur de *cdx1*, l'exon 3 de *cdx1* et l'exon 3 de la *β-actine*. Plusieurs dilutions du matériel de départ ont été amplifiées parallèlement afin de voir la linéarité de la réaction de PCR.

Pour estimer l'augmentation relative de chacune de ces modifications suivant les différents traitements, chacune de ces expériences a été reprise trois fois indépendamment et l'intensité des bandes obtenues a été évaluée par alpha-imager (figure 10). Les graphiques illustrent qu'il y a une corrélation entre le niveau d'histones H3 et H4 acétylés dans la région promotrice de *cdx1* et son taux de transcription. Aussi, les moyennes obtenues révèlent que l'enrichissement en H3 acétylés est légèrement plus élevé que l'augmentation en H4 acétylés pour tous les traitements. Toutefois, ces données ne sont pas d'une pertinence particulière puisqu'il n'y pas de différence entre la synergie d'activation et l'activation par chacune des deux voies. Des études ont suggéré que la fonction de l'acétylation sur H3 était parallèle au rôle essentiel de l'acétylation sur H4 (Howe *et al.*, 2001).

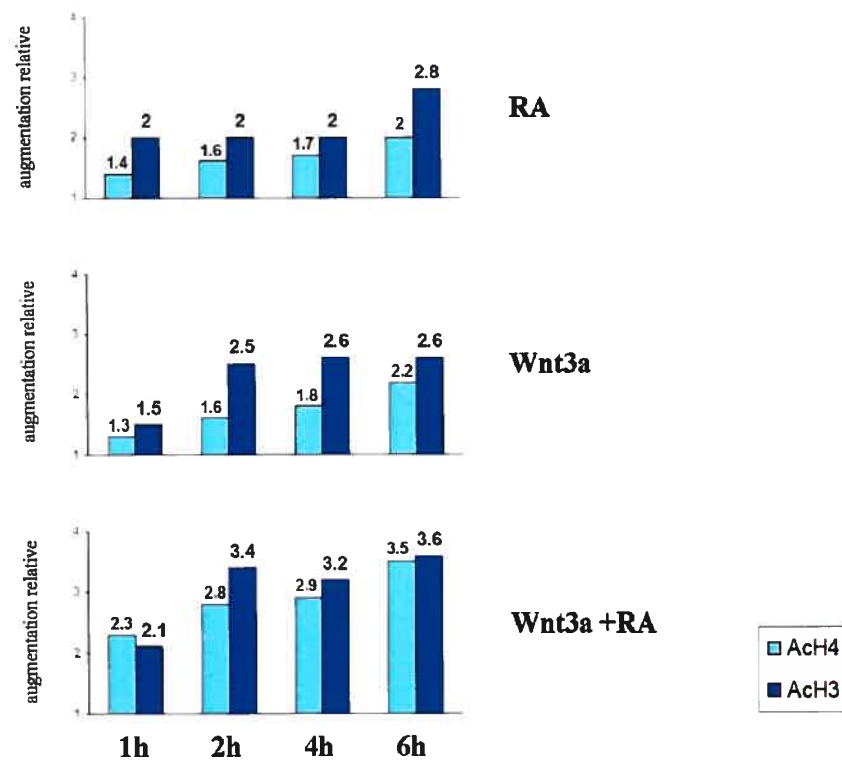


FIGURE 10 : Quantification relative de l'intensité des bandes obtenues par les expériences de CHIP sur l'acétylation des histones H3 et H4. Les intensités des bandes obtenues ont été évaluées par densitométrie à l'aide de Alphamager et représentent l'intensité relative par rapport à l'état non-traité selon une moyenne basée sur trois expériences indépendantes.

3.3.2 La méthylation des histones

Les histones possèdent plusieurs résidus lysine et arginine sujet à la méthylation et cette modification joue une variété de rôles dans la régulation de la structure de la chromatine et dans la régulation de la transcription. Des évidences ont montré que la diméthylation des lysines 4 des histones H3 était induite sur des promoteurs régulés par RAR suivant leur activation (Rastegar et al., 2004). D'un autre côté, ceci n'a pas été montré pour des régions régulatrices contrôlées par LEF/TCF mais en général, la diméthylation des lysines 4 des histones H3 est une marque d'un état où la chromatine est ouverte et accessible aux facteurs de transcriptions ainsi qu'à la machinerie transcriptionnelle (Jenuwein et al., 2001 ; Featherstone, 2002 ; Lee et al., 2005). Suivant l'activation de la transcription par le traitement à l'AR et/ou par Wnt3a, il y a une multiplication des histones diméthylés en lysine 4 sur le promoteur de *cdx1* après 1 heure d'induction pour tous les traitements (figure 11). Lors de l'induction avec l'AR, la diméthylation des lysines 4 des histones H3 est maintenue tandis que lors de l'induction avec Wnt3a, elle revient à son état basal après deux heures de traitement. L'augmentation de cette modification par le traitement à l'AR était anticipée puisqu'elle a déjà été montrée comme impliquée dans l'activation transcriptionnelle par les RAR (Rastegar *et al.*, 2004) et par les récepteurs thyroïdiens qui sont du même type que RAR (Li *et al.*, 2002). Cependant, les variations de cette modification lors du traitement par Wnt3a n'ont jamais été observées. Donc, nous observons pour la première fois que la diméthylation des lysines 4 sur H3 est associée à l'activation transcriptionnelle par les facteurs de transcription LEF/TCF.

Lorsque les cellules subissent les deux traitements simultanément, on constate que l'enrichissement en histones H3 diméthylés en lysine 4 diminue dès deux heures après traitement pour disparaître complètement après 6 heures. Ainsi, le taux d'histones H3 diméthylés en lysine 4 dans le promoteur de *cdx1* semble inversement proportionnel à son taux de transcription. La diminution des histones H3 méthylés en lysine 4 sous l'état basal lors de l'activation par le traitement par l'AR et par Wnt3a combiné n'était pas anticipée. Uniquement des expériences chez la levure ont montré que l'absence de la diméthylation des lysines 4 était associée à l'activation de la transcription (Briggs et al., 2001). Ainsi, la disparition de cette modification lors de l'induction de *cdx1* par l'AR et Wnt3a pourrait suggérer l'existence d'une voie d'activation transcriptionnelle différente. Cette expérience n'a été effectuée qu'une

seule fois et il est donc essentiel qu'elle soit refaite pour l'élaboration d'une conclusion solide.

H3 diméthylé en K4

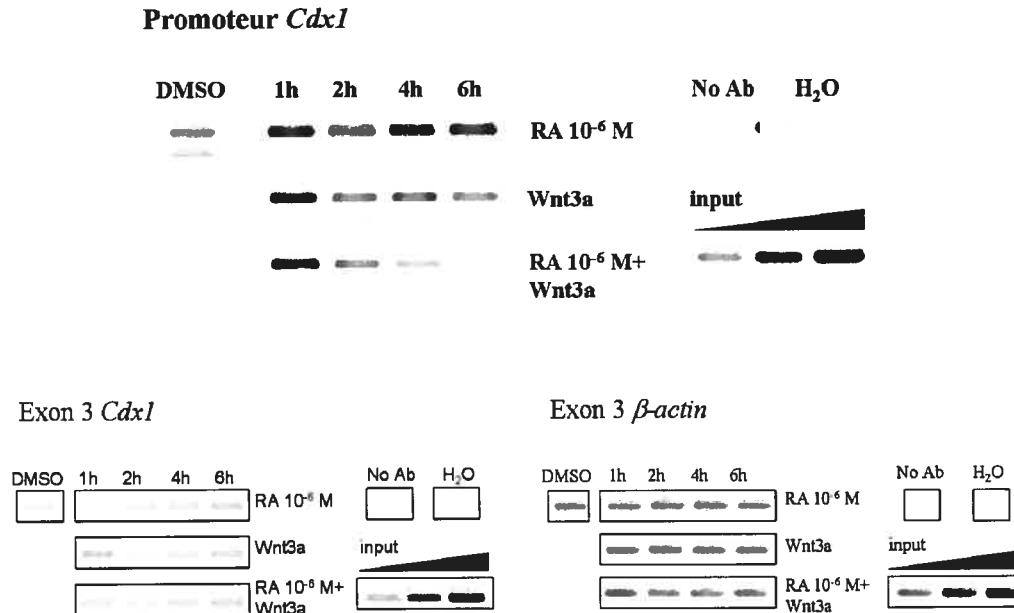


FIGURE 11 : Dynamique de la diméthylation en lysine 4 des histones lors de l'activation transcriptionnelle de *cdx1*. Les cellules F9 ont été traités tel qu'indiqué sur la figure et fixé avec le formaldéhyde. L'extrait de chromatine a été soumis à une immunoprécipitation avec un anticorps contre les histones H3 méthylés en lysine 4. Le matériel immunoprécipité et un contrôle d'immunoprécipitation sans anticorps (No Ab) ont été amplifiés par PCR avec une paire d'oligos couvrant le promoteur de *cdx1*, l'exon 3 de *cdx1* et l'exon 3 de la *β-actine*. Plusieurs dilutions du matériel de départ ont été amplifiées parallèlement afin de voir la linéarité de la réaction de PCR.

3.4 *CARM-1* régule l'expression de *cdx1*

Plusieurs coactivateurs capables de catalyser la modification des histones agissent en synergie dans l'activation de la transcription d'un gène. Parmi ceux-ci on retrouve *CARM-1* (cofactor associated arginine méthyltransferase), un coactivateur de RAR (Xu *et al.*, 2001) et de la β -caténine (Koh *et al.*, 2002), qui a démontré agir en synergie avec certains coactivateurs des RN (Chen *et al.*, 1999). Nous avons donc utilisé des transfections transitoires pour examiner l'effet de *CARM-1* sur l'expression d'un rapporteur de *cdx1* dans des cellules P19 (figure 12). Tel que démontré auparavant (Prinos *et al.*, 2001), l'AR et LEF-1 induisent l'expression du rapporteur de *cdx1*. *CARM-1* induit l'expression du rapporteur et coopère d'une façon additive avec

RAR-RXR et l'AR (figure 12A) ainsi qu'avec la protéine de fusion LEF-1- β -caténine (figure 12B). Cependant, l'effet observé n'est pas synergique laissant suggérer que CARM-1 contribue à l'activation de la transcription de *cdx1*, mais qu'il n'est peut-être pas responsable de la synergie d'activation de *cdx1*. On remarque une expression réduite par LEF-1- β -caténine avec des doses plus élevées de CARM-1. Ceci peut s'expliquer par un phénomène de squelching, où une trop forte concentration en coactivateur peut séquestrer le facteur de transcription et restreindre son interaction avec son élément de réponse.

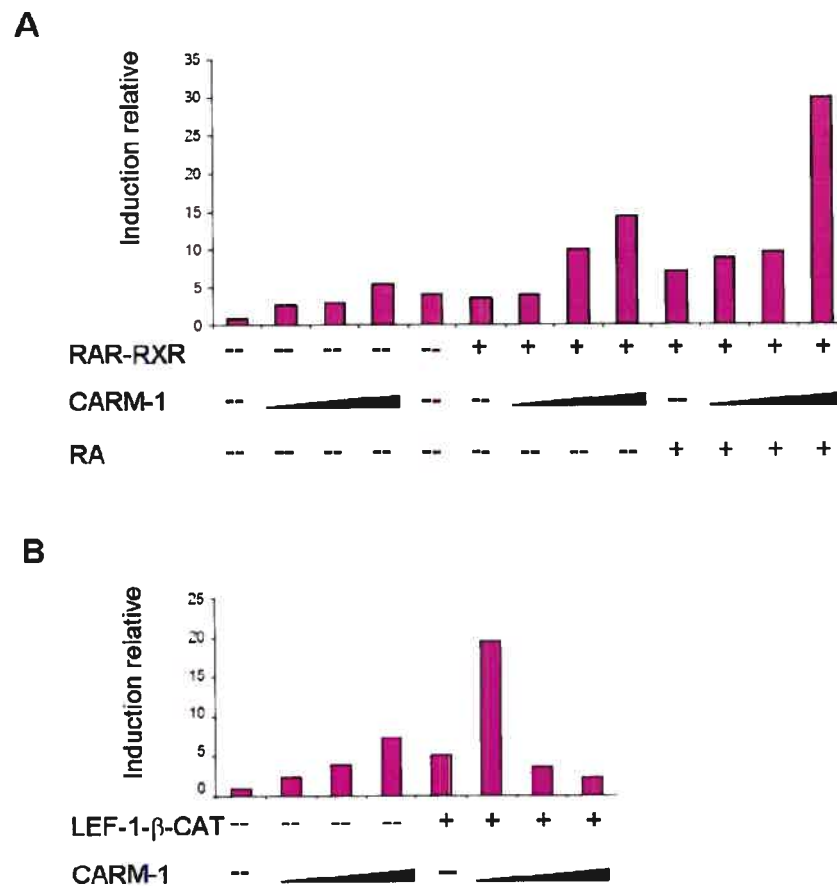


FIGURE 12 : CARM-1 induit l'expression d'un rapporteur de *cdx1* en coopération avec RAR-RXR (A) et en coopération avec LEF-1- β -caténine (B). Des cellules P19 ont été transfectées avec un rapporteur de type sauvage de 2 kb de *cdx1* seul ou en combinaison avec diverses quantités de vecteurs d'expression (tel qu'indiqué). Les cellules ont été traitées à l'AR rétinoïque 24 heures post-transfection et l'activité luciférase a été évaluée 48 heures post-transfection tel que décrit dans la section matériel et méthodes.

Chapitre 4 : Discussion

Plusieurs données ont montré que *cdx1* est régulé par la voie des Wnts et par la voie des rétinoïdes, deux voies de signalisations cruciales pour la formation des axes antéro-postérieur. De façon intéressante, l'AR et Wnt3a exercent ensemble une forte synergie sur l'expression de *cdx1*. Puisque de nombreuses études ont souligné l'importance de l'organisation de la chromatine dans la régulation transcriptionnelle d'un gène, nous avons donc observé l'implication de celle-ci dans l'activation transcriptionnelle de *cdx1*. Dans cette étude, par des essais luciférase et l'utilisation d'un inhibiteur de HDAC nous démontrons que l'état d'acétylation des histones influence le taux d'expression d'un rapporteur de *cdx1*. Par des expériences de ChIP, nous observons que l'activation transcriptionnelle de *cdx1* par Wnt3a et par l'AR implique des fluctuations d'acétylation et de méthylation des histones dans son promoteur. L'effet synergique d'induction de *cdx1* par l'activation simultanée de ces deux voies est spécifique et direct et il est corrélé à un taux d'histones acétylés plus élevés dans sa région promotrice. D'une autre part, la synergie d'induction de *cdx1* est caractérisée par une diminution en histones H3 diméthylés en lysines 4 dans son promoteur.

4.1 Les éléments cis régulant le promoteur de cdx1

Plusieurs évidences ont démontré que l'expression de *cdx1* est directement régulée par la voie des Wnts et par la voie des rétinoïdes. Entre autres, les mutants homozygotes de RAR (Houle *et al.*, 2000) et de Wnt3a (Ikeya et Takada, 2001), le patron d'expression de Wnt3a (Takada *et al.*, 1994), et la distribution de l'AR dans l'embryon ont fournis plusieurs indices quant à leurs capacités à réguler l'expression de *cdx1*. Le promoteur de *cdx1* possède un RARE atypique (Houle *et al.*, 2000) et deux LREs (Prinos *et al.*, 2001) qui sont nécessaires pour l'expression normal de *cdx1 in vivo* (Lickert et Kemler, 2002). Par la suite, il a été démontré que le traitement par l'AR et par Wnt3a induisait l'expression d'un rapporteur de *cdx1* dans des lignées stables (Prinos *et al.*, 2001) et que le traitement simultané par ces deux composés induisait une forte synergie d'activation de ce même rapporteur. Puisque nous avons comme hypothèse que cette observation peut s'expliquer par un remodelage particulier de la chromatine (car celle-ci est indispensable à l'initiation de la transcription) et notamment l'acétylation des histones est la modification la plus couramment associée à l'activation de la transcription, nous avons utilisé un agent

capable de déséquilibrer le taux d'acétylation des histones, le TSA. Le TSA inhibe les HDACs de classe I et II et ainsi, peut nous indiquer si la perturbation de l'état d'acétylation influence le taux d'expression de *cdx1*. De plus, l'emploi de vecteurs rapporteurs de *cdx1* mutés pour ses différents éléments de réponses nous permet de connaître l'implication de ceux-ci dans l'expression de *cdx1*.

L'inhibition de la désacétylation des histones par le traitement au TSA augmente l'expression du rapporteur de *cdx1* ce qui nous indique que l'expression de *cdx1* est maintenue réprimée par l'action d'HDAC. D'autre part, on constate que le TSA potentialise l'effet de l'AR et de Wnt3a. Toutes ces observations étaient anticipées puisqu'on sait qu'en absence de son ligand, RAR interagit avec les complexes de corépresseurs NCoR et SMRT recrutent des HDACs. Aussi, on sait que les facteurs de transcription LEF/TCF ont la capacité d'interagir avec le corépresseur TLEs qui, recrute aussi des HDACs. De plus, des études plus récentes indiquent que RAR lié à son ligand a la capacité d'interagir avec le corépresseur RIP140 qui recrute des HDACs. Ainsi, les données obtenues par le traitement au TSA chez les lignées cellulaires de type sauvage suggèrent que l'hyperactivation du promoteur de *cdx1* pourrait passer par l'acétylation des histones.

Également, nous avons observé que le TSA induit l'expression de *cdx1* uniquement lorsque les LREs sont fonctionnels et aussi, le TSA potentialise l'effet de Wnt3a sur l'expression de *cdx1* de la même façon que le fait l'AR. Ainsi, le TSA remplace d'une certaine façon l'effet de l'AR et il agit en synergie avec les LREs. Or, nous savons que l'AR occasionne un échange de corégulateurs sur le RAR se reflétant principalement par un gain d'activité HAT et une perte de l'activité HDAC. Les résultats suggèrent que c'est essentiellement cette simultanéité entre la perte d'activité HDAC et le gain d'activité HAT qui permet au RARE d'agir en synergie avec les LREs.

Une autre donnée à souligner dans les résultats obtenus par les essais luciférase, est la forte expression induite par la combinaison de l'AR avec Wnt, observée chez le rapporteur où le RARE est muté (figure 1B). On sait que l'expression de *cdx1* peut être maintenue par une boucle d'autorégulation. On a observé par des transfections transitoires que *cdx1* pouvait induire l'expression d'un rapporteur de son activité (Prinos *et al.*, 2001). Très récemment, il a été démontré que l'homéodomaine de *cdx1* avait la capacité d'interagir avec LEF1 et qu'ensemble, ils pouvaient agir en synergie

pour activer l'expression d'un rapporteur de *cdx1* (Béland *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que *cdx1* pouvait s'associer à son propre promoteur. Ainsi, une importante augmentation du niveau de *cdx1* endogène par l'induction à l'AR et à Wnt3a pourrait engendrer une régulation positive sur le rapporteur et de la sorte, expliquer la forte augmentation de l'expression du rapporteur de *cdx1*. Ces résultats pourraient donc supporter l'idée selon laquelle *cdx1* s'autorégule via la formation d'un complexe avec LEF-1 en interagissant avec les LREs.

Finalement, un phénomène intéressant est l'induction relativement importante du rapporteur par les deux traitements simultanés (419X) lorsque les LREs sont inactifs (figure 1C). Il a déjà été suggéré que les RARs avaient la capacité de coopérer avec la β -caténine pour activer la transcription de leurs gènes cibles (Easwaran *et al.*, 1999). Ainsi, l'augmentation de la β -caténine intracellulaire par le traitement par Wnt3a pourrait influencer l'activation de la transcription du rapporteur de *cdx1* en étant recrutée par les RARs sur son promoteur. Cependant, l'explication la plus probable est la présence de deux autres LREs dans le locus de *cdx1*, en position -1923 et -950, qui pourrait possiblement influencer son expression. Des expériences ont montré que ces LREs n'étaient pas nécessaires à l'expression normale d'un rapporteur de *cdx1 in vivo* (Lickert et Kemler, 2002). Toutefois, *in vitro* il est probable que la régulation soit différente. Ainsi, la présence de certains cofacteurs dans le modèle cellulaire employé pourrait permettre à ces deux LREs de contribuer à l'induction de *cdx1*.

Il est important de mentionner que le traitement par Wnt3a a été fait à partir d'un milieu conditionné. Ce milieu est un surnageant dans lequel des fibroblastes de souris (cellules L) ont été mises en croissance pendant quatre jours. En conséquence, plusieurs molécules sont sécrétées dans ce milieu dont, entre autres, des facteurs de croissances. Au même titre que l'AR et Wnt3a, les FGFs (fibroblast growth factors) sont impliqués dans le développement de la partie postérieure de l'embryon. Chez le poulet, une relation entre les FGFs et l'expression de *cdxA* (l'homologue de *cdx1*) a été suggérée (Bel-Vialar *et al.*, 2002). Les FGFs pourraient donc avoir une responsabilité dans l'effet synergique observé sur l'expression du rapporteur. Il est tout aussi possible que d'autres molécules se retrouvent dans ce milieu et influencent d'une façon quelconque l'expression du rapporteur.

4.2 L'acétylation des histones sur le promoteur de *cdx1*

RAR et LEF/TCF altèrent l'activité de leurs gènes cibles en recrutant plusieurs coactivateurs transcriptionnels avec des activités diverses capables de modifier la chromatine. À partir de cette idée, nous avons émis l'hypothèse qu'une différente configuration des histones dans le promoteur de *cdx1* pourrait influencer son taux de transcription et que l'acétylation serait une modification particulièrement intéressante à considérer. Il a déjà été montré par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine chez des cellules mammifères et chez la levure que les régions géniques actives (euchromatine) étaient corrélées à un haut niveau d'acétylation des histones H3 et H4 (Turner, 2000 ; Braunstein *et al.*, 1993). De plus, certains coactivateurs de RAR et/ou de LEF/TCF possèdent des activités HATs comme CBP/p300 et PCAF. Finalement, les essais luciférase et l'utilisation du TSA nous montrent que la perturbation de l'équilibre d'acétylation des histones a un impact majeur sur l'expression de *cdx1*. Pour ces raisons, nous avons donc voulu observer la dynamique d'association d'histones acétylés sur le promoteur de *cdx1*.

Avec nos expériences de ChIP, nous démontrons que l'activation transcriptionnelle de *cdx1* par l'AR et/ou par Wnt3a passe par un enrichissement en H3 acétylés et en H4 acétylés dans sa région promotrice. L'augmentation en histones H3 et H4 acétylés suivant l'activation de la transcription est un phénomène général couramment observé. On sait que plusieurs coactivateurs de RAR et LEF/TCF possèdent une activité HAT. Notamment, CBP/p300 est recruté à la fois par RAR et par LEF/TCF et il acétyle les résidus lysines préférentiellement sur les histones H3 et H4. Aussi, plusieurs gènes inductibles par l'AR présentent une augmentation en histones H3 et H4 acétylés dans leur région régulatrice suivant leur activation, notamment, RAR β (Lefèbre *et al.*, 2002) et *Hoxd4* (Rastegar *et al.*, 2004). Aussi, des études portant sur la régulation de gènes ciblés par la voie des Wnts ou par les facteurs de transcription LEF/TCF, ont manifesté une augmentation de l'acétylation des histones sur leurs régions régulatrices lors de l'activation de la transcription (Feng *et al.*, 2003). De façon intéressante, la synergie d'induction de *cdx1* par le traitement simultané à l'AR et à Wnt3a, est corrélée à un plus grand taux d'histones acétylés sur son promoteur. Ainsi, nous observons pour la première fois une relation entre le taux d'histones acétylés et l'importance de l'induction de *cdx1*.

Plusieurs raisons pourraient expliquer la corrélation entre l'augmentation de la transcription et un taux d'histones acétylés élevé. L'acétylation des histones pourrait avoir un effet général ou spécifique sur l'activation de la transcription de *cdx1*. Dans le cas premier, un plus grand taux d'acétylation des histones occasionnerait un relâchement global de la chromatine plus important ayant pour effet de faciliter l'interaction des facteurs de transcription avec l'ADN ce qui mènerait ainsi à un recrutement plus intensif des facteur généraux de transcription. Dans cette idée, nous avons voulu comparer l'association des histones modifiés avec la dynamique d'occupation de l'ARN polymérase II sur le promoteur de *cdx1* mais ces expériences ont échoué. Aucun signal n'a été obtenu avec l'anticorps contre l'ARN polymérase II lors des expériences de ChIP, ce qui pourrait suggérer une mauvaise mise au point des étapes du protocole. La validité du ChIP est donc remise en question, néanmoins, chaque anticorps est fonctionnel dans des conditions strictes et souvent non chevauchantes.

Dans un cas second plus spécifique, l'acétylation pourrait aussi mener à des événements transcriptionnels divergents. Puisque l'acétylation est une marque spécifique permettant la reconnaissance de protéines à bromodomaines, l'acétylation de sites supplémentaires sur les histones H3 et H4 pourrait permettre le recrutement de facteurs différents pour déclencher une voie d'activation transcriptionnelle divergente. Dans cette idée, nous pourrions observer par le ChIP le recrutement de différentes protéines à bromodomaines. Des études *in vitro* indiquent que la liaison d'une lysine acétylée par un bromodomaine est caractérisée par une faible affinité et cette affinité peut être dramatiquement augmentée lorsqu'un bromodomaine en tandem reconnaît plusieurs sites acétylés sur la protéine cible. Un exemple intéressant est la plus large sous-unité de TFIID initiant l'assemblage du système de transcription basal, TAFII₂₅₀, qui possède un double bromodomaine et dont la constante de dissociation pour H4 diminue de 40 fois lorsque l'histone H4 est diacétylé au lieu d'être monoacétylé (Jacobson et al., 2000). Ce phénomène pourrait illustrer un moyen spécifique par lequel un taux d'acétylation plus élevé peut mener à une synergie d'activation transcriptionnelle. Ainsi, il serait d'intéressant d'observer le recrutement de TAFII₂₅₀ sur le promoteur de *cdx1* suivant son induction d'autant plus qu'aucune étude portant sur des gènes régulés par la voie des Wnts ou des rétinoïdes n'a examiné l'implication de TAFII₂₅₀.

Il existe évidemment beaucoup de protéines à bromodomains dont il serait intéressant de détecter la présence sur le promoteur de *cdx1* suivant son activation par les deux voies. Parmi les protéines à bromodomains, on retrouve entre autres le complexe capable de remodeler la chromatine, SWI/SNF. La présence de bromodomaine sur des complexes comme SWI/SNF crée donc un lien entre l'acétylation des histones et le remodelage de la chromatine. Par nos expériences de ChIP, il n'a pas été possible de détecter la présence de sa composante ATPasique, BRG-1, et étant donnée l'absence de contrôle positif, sa présence sur le promoteur de *cdx1* reste incertaine. Cependant, certains faits peuvent nous laisser croire que ce complexe est impliqué dans l'activation transcriptionnelle de *cdx1*. Notamment, il a déjà été démontré que BRG-1 était nécessaire pour l'activité de RAR (Direnzo et al., 2000) et il est aussi impliqué dans l'activation transcriptionnelle par les facteurs de transcription LEF/TCF (Barker et al., 2001). Dans le cas où BRG-1 (SWI/SNF) pourrait être détecté de façon plus importante dans un état synergique, il serait intéressant d'effectuer des expériences pour étudier la configuration des nucléosomes sur le promoteur de *cdx1*. D'un autre côté, il existe des lignées cellulaires déficientes pour le complexe SWI/SNF qui auraient permis d'évaluer l'effet de ce complexe sur l'activation de la transcription de *cdx1* et sur les autres modifications des histones.

CBP/p300 est une autre protéine à bromodomaine dont la présence sur le promoteur de *cdx1* aurait été particulièrement intéressante à observer mais qui n'a pu être détectée. Encore une fois, aucun contrôle positif n'a été utilisé ce qui rend donc les conclusions impossibles. Il existe un inhibiteur synthétique d'HAT spécifique à CBP/p300, Lys-CoA qui aurait pu permettre d'évaluer l'implication de l'acétylation par CBP/p300 dans l'activation de la transcription de *cdx1*.

Il est à noter que les anticorps utilisés pour les expériences de ChIP reconnaissent les histones acétylés sur la totalité de leurs résidus lysines en N-terminale. Or, il reste à savoir si c'est l'acétylation de plus de résidus lysines à l'intérieur de chaque histone ou si c'est plus d'histones acétylés qui corrèle avec l'augmentation de la transcription. Des expériences de ChIP avec l'utilisation d'anticorps plus spécifiques à certains résidus acétylés auraient permis d'observer si certains résidus lysines sont d'une plus grande importance dans l'activation de la transcription de *cdx1*.

L'état d'acétylation des histones sur le promoteur d'un gène est maintenu par un équilibre de recrutement entre des HDACs et des HATs. Puisque le taux d'acétylation

des histones est un processus dynamique qui dépend autant de l'acétylation que de la désacétylation, l'état d'acétylation des histones observé sur le promoteur de *cdx1* est vraisemblablement occasionné par un équilibre différent de recrutement des HDACs. D'ailleurs, cet équilibre semble jouer un rôle déterminant sur la régulation de l'expression de *cdx1* : les résultats avec le TSA ont montré que l'inhibition de la désacétylation augmentait l'expression du rapporteur de *cdx1* et que le TSA potentialisait l'effet de Wnt3a et de l'AR. Ainsi, il est probable que le taux de recrutement des HDACs soit directement impliqué dans la synergie d'activation transcriptionnelle de *cdx1*. Le TSA inhibe les HDAC de classe I et II. Les HDACs de classe I sont ubiquitaires et nucléaires contrairement aux HDACs de classe II qui sont cytoplasmiques et spécifiques à certains tissus. À la lumière de ces connaissances, nous avons donc observé la présence d'un membre de la classe I, l'HDAC 1. Malencontreusement, la détection de cette enzyme a encore une fois échoué par les expériences de CHIP, mais reste toutefois d'un intérêt des plus particuliers.

4.3 La méthylation des histones sur le promoteur de cdx1

Il existe plusieurs sites lysine et arginine sujets à la méthylation sur les histones et ils jouent des rôles importants dans la régulation de la structure de la chromatine et dans la régulation de la transcription (Lee *et al.*, 2005 ; Stallcup, 2001 ; Zhang et Reinberg, 2001). Par exemple, la diméthylation des lysines 4 sur les histones H3 est une modification post-traductionnelle qui a souvent été associée à l'activation de la transcription. De cette idée, nous avons observé la dynamique de l'association de cette modification sur le promoteur de *cdx1* suivant son activation transcriptionnelle par l'AR et/ou par Wnt3a par des expériences de CHIP. Plusieurs études montrent que la modification des histones a lieu très rapidement suivant l'activation du promoteur, soit à un moment précédant la transcription. Nous avons donc observé les événements sur la chromatine dès 1 heure post traitement car nous avons constaté par Northern blot (figure 7) que la transcription de *cdx1* est amorcée dès deux heures post-traitement..

Des études récentes ont démontré que les lysines 4 triméthylées des histones H3 étaient hautement corrélées à des gènes actifs tandis que les lysines 4 diméthylées étaient une marque pour l'euchromatine active ou inactive (Santos-Rosa *et al.*, 2002). Ainsi, la diméthylation des lysines 4 est une indication qui détermine la permissivité transcriptionnelle du gène pour démarquer les régions d'euchromatine des régions

d'hétérochromatine tandis que l'état triméthylé sur le même résidu joue un rôle direct dans l'activation transcriptionnelle. Ainsi, nos résultats révèlent que *cdx1* est dans une région d'euchromatine puisque lorsque les cellules ne sont pas traitées, la diméthylation des histones est présente. Cette constatation est aussi supportée par le fait qu'il semble y avoir un niveau basal d'acétylation des histones dans le promoteur de *cdx1* lorsque celui-ci n'est pas activé (figure 8). Beaucoup de gènes impliqués dans le développement se retrouvent dans des régions active (d'euchromatine) mais plusieurs se retrouvent aussi dans des région d'hétérochromatine.

Après 1 heure de traitement par l'AR et/ou par Wnt3a, il y a un enrichissement en H3 diméthylés sur le promoteur de *cdx1*. La méthylation des lysines 4 sur H3 a montré promouvoir l'acétylation des histone H3 par p300 (Wang et al., 2001), ce qui corrèle bien avec l'augmentation décalée en histones H3 acétylés retrouvé sur le promoteur de *cdx1*, soit à partir de deux heures post-traitement par l'AR ou par Wnt3a (figure 8A). Cependant, lors du traitement simultané par l'AR et par Wnt3a, cette modification disparaît complètement à 6 heures post-traitement. Ceci pourrait indiquer que l'état triméthylé prédomine à ce moment. Ainsi, la combinaison des deux traitements correspondrait à une voie d'activation transcriptionnelle divergente qui pourrait être dirigée par la triméthylation des lysines 4 des H3. L'utilisation d'anticorps spécifiques à cette modification serait donc pertinente pour évaluer son implication dans l'activation transcriptionnelle de *cdx1*.

Il est tout aussi possible et intéressant de proposer que la méthylation en K4 sur H3 disparaît complètement. En effet, des études ont suggéré que la méthylation en K4 sur H3 serait impliquée dans l'atténuation de la transcription. Ces études ont montré que la méthylation des K4 en H3 permet le recrutement de Isw1p (Santos-Rosa et al., 2003), une enzyme remodelant la chromatine et impliquée dans la répression et l'arrêt de la transcription (Alen et al, 2002). Dans notre cas, la transcription de *cdx1* se poursuit, mais il est probable qu'un déplacement différent des nucléosomes n'arrête pas la transcription mais plutôt qu'il l'atténue. Il serait encore une fois intéressant d'observer le déplacement des nucléosomes sur l'ADN. Toutefois, les résultats obtenus avec le ChIP contre les histones H3 diméthylés ne sont pas irrévocables puisque l'expérience n'a été effectuée qu'une seule fois. La confirmation reste impérative pour l'établissement d'une conclusion consistante.

La méthylation des résidus arginines des histones est aussi impliquée dans l'activation de la transcription. D'un intérêt plus particulier, la méthylation des R17 des histones H3 est catalysé par CARM-1 un coactivateur qui a montré augmenter l'activation transcriptionnelle par des RN du même type que RAR-RXR (Koh et al., 2001 ; Chen et al., 1999) et qui a montré interagir avec les facteurs de transcription LEF-1/TCF4 (Koh et al., 2002). Aussi, la méthylation des R17 des H3 a été associée à l'activation de promoteurs hormones-inductibles (Ma et al., 2001). Les expériences de ChIP ont échoué pour la détection de H3 méthylés en R17 dans la région promotrice de *cdx1*, cependant par des transfections transitoires, nous avons démontré que CARM-1 induit l'expression du rapporteur de *cdx1* en synergie avec RAR-RXR et aussi en coopération avec la protéine de fusion LEF- β -caténine. Ces résultats suggèrent que la méthylation des R17 sur H3 doit avoir lieu et que ce sont plutôt de mauvaises conditions du ChIP qui rendent impossible la détection de cette modification. Cependant, l'utilisation d'un contrôle positif reste nécessaire pour l'obtention d'une conclusion définitive.

Plusieurs particularités relatives à CARM-1 font de lui un joueur pertinent à envisager comme responsable dans la synergie d'activation transcriptionnelle. Premièrement, ce coactivateur est une composante du complexe remodelleur de chromatine ATP-dépendant SWI/SNF et il a démontré stimuler son activité ATPase (Xu et al., 2004). Deuxièmement, en plus de catalyser la méthylation des histones, CARM-1 a la capacité de méthyler des protéines non-histones dont plusieurs coactivateurs transcriptionnels. Entre autres, le recrutement de CARM-1 par les RN et par p160 occasionne la méthylation des résidus arginines de CBP/p300 et il a été proposé que cette méthylation préviendrait la séquestration de CBP/p300 par CREB (Chevallard et al., 2002). Ainsi, l'élévation importante de l'acétylation pourrait s'expliquer par une plus grande disponibilité de HAT CBP/p300. D'un autre côté, il a été démontré que l'acétylation par p300 stimule la liaison de CARM-1 et augmente son activité enzymatique sur les parties N-terminales des histones H3 (Daujat et al., 2002). Ainsi, il devient fort attrayant de considérer le coactivateur CARM-1 comme candidat majeur impliqué dans l'activation transcriptionnelle synergique du promoteur de *cdx1* étant donné ses caractéristiques permettant une certaine amplification de l'activation transcriptionnelle.

4.4 Études futures

Des expériences de CHIP supplémentaires permettraient d'établir un modèle plus élaboré sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation transcriptionnelle de *cdx1*. Comme mentionné précédemment, il faudrait utiliser des anticorps contre divers coactivateurs transcriptionnels impliqués dans le remodelage de la chromatine, notamment SWI/SNF, CBP/p300, CARM-1 et contre diverses histones modifiées, comme H3 méthylé en R17, H3 triméthylés en K4, etc.

Dans un cas échéant, où il serait possible de détecter la présence de ce SWI/SNF sur le promoteur de *cdx1*, l'observation de l'organisation des nucléosomes sur cette même région s'impose. Un plus grand taux d'acétylation pourrait suggérer un plus grand déplacement des histones sur l'ADN, ce qui pourrait directement influencer le taux de transcription de *cdx1*. L'analyse de l'architecture de la chromatine sur l'ADN a déjà été décrite (Fryer et Archer, 1998) et peut s'étudier de diverses façons. Notamment, des analyses de digestion à la Mnase micrococcale permettent de cartographier la position des nucléosomes sur la région génique ciblée et permettent ainsi d'évaluer le niveau de relaxation de la chromatine. De la même façon, l'hypersensibilité à des enzymes de restriction (l'accessibilité à des sites de restriction) est une technique plus sensible qui permet la détection de changements dans l'architecture de la chromatine suivant l'activation transcriptionnelle. En fait, cette technique n'indique pas de façon précise les événements ayant lieu sur la région d'ADN observée mais elle donne plutôt une représentation du niveau de compaction de l'ADN sur la chromatine. D'autres aperçus sur la régulation transcriptionnelle d'un gène peuvent être obtenus par des expériences d'empreintes par l'exonucléase III. Cette technique fournit des informations complémentaires sur les endroits où la liaison des facteurs de transcriptions se fait sur l'ADN. Finalement, les altérations dans la chromatine peuvent aussi être détectées par des techniques permettant d'estimer la densité superhélicale de l'ADN c'est-à-dire par des essais pouvant déterminer les changements topologiques de l'ADN (Germond et al., 1975 ; Simpson et al., 1985). Contrairement aux autres techniques mentionnées plus haut qui se pratiquent *in vivo*, cette méthode se fait *in vitro* à l'aide d'un plasmide circulaire. Cette technique se base sur le fait que chaque nucléosome comprime un tour de superhélice négatif. Ainsi, la perturbation de l'architecture des nucléosomes peut occasionner des changements dans la topologie de l'ADN même si les histones ne sont pas déplacés sur l'ADN (Bauer et al., 1994). Ces techniques d'analyse de la

chromatine pourraient élargir les évidences sur le rôle de la structure de la chromatine dans la régulation du promoteur de *cdx1*. De plus, ces expériences permettraient d'observer un lien entre l'acétylation des histones, le remodelage de la chromatine et l'activation de la transcription.

4.5 Conclusion

Le code des histones participe au développement en jouant un rôle clé sur la décision des destins cellulaires. Ainsi, les modifications covalentes sur les histones sont d'une importance cruciale pour l'établissement d'un patron d'expression génique spatio-temporel précis nécessaire pour la détermination des différentes étapes du développement. Une optimisation plus adéquate du ChIP reste essentielle pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires employés par la voie des Wnts et la voie des rétinoïdes dans la régulation transcriptionnelle de *cdx1*. De plus, des ChIP *in vivo* pourraient nous éclairer sur les différences existant possiblement dans la régulation de l'expression de *cdx1* à différentes étapes du développement où il est exprimé. Afin de mieux comprendre la relation existant entre les modifications covalentes sur les histones et la restructuration de la chromatine dans la régulation transcriptionnelle, il serait aussi d'un intérêt particulier d'observer l'architecture de la chromatine sur la région génique de *cdx1*.

Liste de références

- Abu-Abed,S.S., Beckett,B.R., Chiba,H., Chithalen,J.V., Jones,G., Metzger,D., Chambon,P., et Petkovich,M. (1998). Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **273**, 2409-2415.
- Adam-Stitah,S., Penna,L., Chambon,P., et Rochette-Egly,C. (1999). Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha by activated c-Jun NH2-terminal kinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 18932-18941.
- Alen,C., Kent,N.A., Jones,H.S., O'Sullivan,J., Aranda,A., et Proudfoot,N.J. (2002). A role for chromatin remodeling in transcriptional termination by RNA polymerase II. *Mol. Cell* **10**, 1441-1452.
- Altmann,C.R. et Brivanlou,A.H. (2001). Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int. Rev. Cytol.* **203**, 447-482.
- Aranda,A. et Pascual,A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* **81**, 1269-1304.

- Bannister,A.J., Zegerman,P., Partridge,J.F., Miska,E.A., Thomas,J.O., Allshire,R.C., et Kouzarides,T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.
- Barker,N., Hurlstone,A., Musisi,H., Miles,A., Bienz,M., et Clevers,H. (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J.* 20, 4935-4943.
- Bastien,J. et Rochette-Egly,C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1-16.
- Bauer,A., Huber,O., et Kemler,R. (1998). Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 14787-14792.
- Baxter,C.S. et Byvoet,P. (1975). Intercalating agents as probes of the spatial relationship between chromatin components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 286-291.
- Bazett-Jones,D.P., Cote,J., Landel,C.C., Peterson,C.L., et Workman,J.L. (1999). The SWI/SNF complex creates loop domains in DNA and polynucleosome arrays and can disrupt DNA-histone contacts within these domains. *Mol. Cell Biol.* 19, 1470-1478.
- Beland,M., Pilon,N., Houle,M., Oh,K., Sylvestre,J.R., Prinos,P., and Lohnes,D. (2004). Cdx1 autoregulation is governed by a novel Cdx1-LEF1 transcription complex. *Mol. Cell Biol.* 24, 5028-5038.
- Bel-vialar S., Itasaki N. et Krumlauf R. (2002). Initiating Hox gene expression : in the early chick neural tubedifferential sensitivity to FGF and RA signalling subdivides the Hox B genes into distinct groups. *Develop.* 129, 5103-5115.
- Benko,S., Love,J.D., Beladi,M., Schwabe,J.W., et Nagy,L. (2003). Molecular determinants of the balance between co-repressor and co-activator recruitment to the retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 43797-43806.
- Berger,S.L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 142-148.
- Bienz,M. (1998). TCF: transcriptional activator or repressor? *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 366-372.
- Blanco,J.C., Minucci,S., Lu,J., Yang,X.J., Walker,K.K., Chen,H., Evans,R.M., Nakatani,Y., et Ozato,K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.* 12, 1638-1651.
- Brannon,M., Gomperts,M., Sumoy,L., Moon,R.T., and Kimelman,D. (1997). A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.* 11, 2359-2370.
- Brannon,M., Brown,J.D., Bates,R., Kimelman,D., et Moon,R.T. (1999). XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* 126, 3159-3170.

- Braunstein,M., Rose,A.B., Holmes,S.G., Allis,C.D., et Broach,J.R. (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* 7, 592-604.
- Briggs,S.D., Bryk,M., Strahl,B.D., Cheung,W.L., Davie,J.K., Dent,S.Y., Winston,F., et Allis,C.D. (2001). Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 15, 3286-3295.
- Brown,K., Chen,Y., Underhill,T.M., Mymryk,J.S., et Torchia,J. (2003). The coactivator p/CIP/SRC-3 facilitates retinoic acid receptor signaling via recruitment of GCN5. *J. Biol. Chem.* 278, 39402-39412.
- Bruhn,L., Munnerlyn,A., et Grosschedl,R. (1997). ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function. *Genes Dev.* 11, 640-653.
- Byvoet,P., Shepherd,G.R., Hardin,J.M., et Noland,B.J. (1972). The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 148, 558-567.
- Carlsson,P., Waterman,M.L., et Jones,K.A. (1993). The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells. *Genes Dev.* 7, 2418-2430.
- Cavallo,R.A., Cox,R.T., Moline,M.M., Roose,J., Polevoy,G.A., Clevers,H., Peifer,M., et Bejsovec,A. (1998). *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395, 604-608.
- Chambon,P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10, 940-954.
- Chan,H.M. et La Thangue,N.B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell Sci.* 114, 2363-2373.
- Chang,C.P., Shen,W.F., Rozenfeld,S., Lawrence,H.J., Largman,C., et Cleary,M.L. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev.* 9, 663-674.
- Charite,J., de Graaff,W., Consten,D., Reijnen,M.J., Korving,J., et Deschamps,J. (1998). Transducing positional information to the Hox genes: critical interaction of cdx gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* 125, 4349-4358.
- Chawengsaksophak,K., James,R., Hammond,V.E., Kontgen,F., et Beck,F. (1997). Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386, 84-87.
- Chen,D., Ma,H., Hong,H., Koh,S.S., Huang,S.M., Schurter,B.T., Aswad,D.W., et Stallcup,M.R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284, 2174-2177.
- Chen,D., Ma,H., Hong,H., Koh,S.S., Huang,S.M., Schurter,B.T., Aswad,D.W., et Stallcup,M.R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284, 2174-2177.

- Chen,G., Fernandez,J., Mische,S., et Courey,A.J. (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev.* *13*, 2218-2230.
- Chen,G. et Courey,A.J. (2000). Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene* *249*, 1-16.
- Chen,J.D. et Evans,R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* *377*, 454-457.
- Cheung,P., Allis,C.D., et Sassone-Corsi,P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* *103*, 263-271.
- Chevillard-Briet,M., Trouche,D., et Vandell,L. (2002). Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *EMBO J.* *21*, 5457-5466.
- Chiba H., Muramatsu,M., Nomoto,A. and Kato,H. (1994) Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila* brahma are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1815–1820
- D'Amours,D., Desnoyers,S., D'Silva,I., et Poirier,G.G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* *342 (Pt 2)*, 249-268.
- Dann,C.E., Hsieh,J.C., Rattner,A., Sharma,D., Nathans,J., et Leahy,D.J. (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* *412*, 86-90.
- Daujat,S., Bauer,U.M., Shah,V., Turner,B., Berger,S., et Kouzarides,T. (2002). Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr. Biol.* *12*, 2090-2097.
- Daujat,S., Bauer,U.M., Shah,V., Turner,B., Berger,S., et Kouzarides,T. (2002). Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr. Biol.* *12*, 2090-2097.
- Davie,J.R., Lin,R., et Allis,C.D. (1991). Timing of the appearance of ubiquitinated histones in developing new macronuclei of *Tetrahymena thermophila*. *Biochem. Cell Biol.* *69*, 66-71.
- de Roos,K., Sonneveld,E., Compaan,B., ten Berge,D., Durston,A.J., et van der Saag,P.T. (1999). Expression of retinoic acid 4-hydroxylase (CYP26) during mouse and *Xenopus laevis* embryogenesis. *Mech. Dev.* *82*, 205-211.
- Delva,L., Bastien,J.N., Rochette-Egly,C., Kraiba,R., Balitrand,N., Despouy,G., Chambon,P., et Chomienne,C. (1999). Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol. Cell Biol.* *19*, 7158-7167.
- Dilworth F., Fromental-Ramain C., Yamamoto K., Chambon P. (2000). ATP-driven chromatin remodelling activity and histone acetyltransferase act sequentially during transactivation by RAR/RXR in vitro. *Mol. cell.* *6*, 1049-1058.

DiRenzo,J., Shang,Y., Phelan,M., Sif,S., Myers,M., Kingston,R., et Brown,M. (2000). BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol. Cell Biol.* 20, 7541-7549.

Dooijes,D., van de,W.M., Knippels,L., et Clevers,H. (1993). The *Schizosaccharomyces pombe* mating-type gene *mat-Mc* encodes a sequence-specific DNA-binding high mobility group box protein. *J. Biol. Chem.* 268, 24813-24817.

Duester,G., Mic,F.A., et Molotkov,A. (2003). Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem. Biol. Interact.* 143-144, 201-210.

Dupe,V., Ghyselinck,N.B., Wendling,O., Chambon,P., et Mark,M. (1999). Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* 126, 5051-5059.

Duprey,P., Chowdhury,K., Dressler,G.R., Balling,R., Simon,D., Guenet,J.L., et Gruss,P. (1988). A mouse gene homologous to the *Drosophila* gene *caudal* is expressed in epithelial cells from the embryonic intestine. *Genes Dev.* 2, 1647-1654.

Easwaran,V., Pishvaian,M., Salimuddin, et Byers,S. (1999). Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr. Biol.* 9, 1415-1418.

Edwards,D.P. (2000). The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 5, 307-324.

Farooqui,M., Franco,P.J., Thompson,J., Kagechika,H., Chandraratna,R.A., Banaszak,L., et Wei,L.N. (2003). Effects of retinoid ligands on RIP140: molecular interaction with retinoid receptors and biological activity. *Biochemistry* 42, 971-979.

Featherstone,M. (2002). Coactivators in transcription initiation: here are your orders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 149-155.

Feng,Y., Lee,N., et Fearon,E.R. (2003). TIP49 regulates beta-catenin-mediated neoplastic transformation and T-cell factor target gene induction via effects on chromatin remodeling. *Cancer Res.* 63, 8726-8734.

Fiorella,P.D. et Napoli,J.L. (1994). Microsomal retinoic acid metabolism. Effects of cellular retinoic acid-binding protein (type I) and C18-hydroxylation as an initial step. *J. Biol. Chem.* 269, 10538-10544.

Flaus,A. et Owen-Hughes,T. (2001). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 148-154.

Fletcher,T.M. et Hansen,J.C. (1996). The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 6, 149-188.

Fry,C.J. et Peterson,C.L. (2001). Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr. Biol.* 11, R185-R197.

Fryer C.J. et Archer T.K. (1998) Analyzing the contributions of chromatin structure in nuclear hormone receptor activated transcription in vivo. In *Method in molecular biology*, vol.176 : Steroid receptor methods : protocols and assays. Édité par B.A. Lieberman Humana Press Inc., Towota, NJ., 283-296

Fujii,H., Sato,T., Kaneko,S., Gotoh,O., Fujii-Kuriyama,Y., Osawa,K., Kato,S., et Hamada,H. (1997). Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J.* 16, 4163-4173.

Gamer,L.W. et Wright,C.V. (1993). Murine Cdx-4 bears striking similarities to the *Drosophila* caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech. Dev.* 43, 71-81.

Germond,J.E., Hirt,B., Oudet,P., Gross-Bellark,M., et Chambon,P. (1975). Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72, 1843-1847.

Ghyselinck,N.B., Bavik,C., Sapin,V., Mark,M., Bonnier,D., Hindelang,C., Dierich,A., Nilsson,C.B., Hakansson,H., Sauvant,P., Azais-Braesco,V., Frasson,M., Picaud,S., et Chambon,P. (1999). Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.* 18, 4903-4914.

Giguere,V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* 20, 689-725.

Gottesman,M.E., Quadro,L., et Blaner,W.S. (2001). Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 23, 409-419.

Gronemeyer,H. et Miturski,R. (2001). Molecular mechanisms of retinoid action. *Cell Mol. Biol. Lett.* 6, 3-52.

Hale, F. (1933). Pig born without eye balls. *Journal of heredity* 24, 105-106.

Hansen,J.C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 361-392.

Hart,M., Concordet,J.P., Lassot,I., Albert,I., del los,S.R., Durand,H., Perret,C., Rubinfeld,B., Margottin,F., Benarous,R., et Polakis,P. (1999). The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr. Biol.* 9, 207-210.

Hecht,A., Litterst,C.M., Huber,O., et Kemler,R. (1999). Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 18017-18025.

Hecht,A. et Kemler,R. (2000). Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over Wnt target gene expression. *EMBO Rep.* 1, 24-28.

Hecht,A., Vleminckx,K., Stemmler,M.P., van Roy,F., et Kemler,R. (2000). The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.* 19, 1839-1850.

Heery,D.M., Kalkhoven,E., Hoare,S., et Parker,M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.

Heinzel,T., Lavinsky,R.M., Mullen,T.M., Soderstrom,M., Laherty,C.D., Torchia,J., Yang,W.M., Brard,G., Ngo,S.D., Davie,J.R., Seto,E., Eisenman,R.N., Rose,D.W.,

Glass,C.K., et Rosenfeld,M.G. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387, 43-48.

Hong,L., Schroth,G.P., Matthews,H.R., Yau,P., et Bradbury,E.M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J. Biol. Chem.* 268, 305-314.

Horlein,A.J., Naar,A.M., Heinzel,T., Torchia,J., Gloss,B., Kurokawa,R., Ryan,A., Kamei,Y., Soderstrom,M., et Glass,C.K. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Horn,P.J. et Peterson,C.L. (2002). Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science* 297, 1824-1827.

Houle,M., Prinos,P., Iulianella,A., Bouchard,N., et Lohnes,D. (2000). Retinoic acid regulation of Cdx1: an indirect mechanism for retinoids and vertebral specification. *Mol. Cell Biol.* 20, 6579-6586.

Houle,M., Sylvestre,J.R., et Lohnes,D. (2003). Retinoic acid regulates a subset of Cdx1 function in vivo. *Development* 130, 6555-6567.

Howe,L., Auston,D., Grant,P., John,S., Cook,R.G., Workman,J.L., et Pillus,L. (2001). Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. *Genes Dev.* 15, 3144-3154.

Hsieh,J.C., Kodjabachian,L., Rebbert,M.L., Rattner,A., Smallwood,P.M., Samos,C.H., Nusse,R., Dawid,I.B., et Nathans,J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431-436.

Hsu,J.Y., Sun,Z.W., Li,X., Reuben,M., Tatchell,K., Bishop,D.K., Grushcow,J.M., Brame,C.J., Caldwell,J.A., Hunt,D.F., Lin,R., Smith,M.M., et Allis,C.D. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102, 279-291.

Hsu,S.C., Galceran,J., et Grosschedl,R. (1998). Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol. Cell Biol.* 18, 4807-4818.

Hu,X. et Lazar,M.A. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402, 93-96.

Hu,X., Chen,Y., Farooqui,M., Thomas,M.C., Chiang,C.M., et Wei,L.N. (2004). Suppressive effect of receptor-interacting protein 140 on coregulator binding to retinoic acid receptor complexes, histone-modifying enzyme activity, and gene activation. *J. Biol. Chem.* 279, 319-325.

Huang,H., Kahana,A., Gottschling,D.E., Prakash,L., et Liebman,S.W. (1997). The ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 17, 6693-6699.

Huletsky,A., de Murcia,G., Muller,S., Hengartner,M., Menard,L., Lamarre,D., et Poirier,G.G. (1989). The effect of poly(ADP-ribosyl)ation on native and H1-depleted

- chromatin. A role of poly(ADP-ribosyl)ation on core nucleosome structure. *J. Biol. Chem.* *264*, 8878-8886.
- Ikeya, M. et Takada, S. (2001). Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of *cdx-1* expression. *Mech. Dev.* *103*, 27-33.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., et Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* *288*, 1422-1425.
- James, R. et Kazenwadel, J. (1991). Homeobox gene expression in the intestinal epithelium of adult mice. *J. Biol. Chem.* *266*, 3246-3251.
- James, R., Erler, T., et Kazenwadel, J. (1994). Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.* *269*, 15229-15237.
- Jenuwein, T. et Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074-1080.
- Jenuwein, T. (2001). Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol.* *11*, 266-273.
- Jenuwein, T. (2002). Molecular biology. An RNA-guided pathway for the epigenome. *Science* *297*, 2215-2218.
- Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T.M., Gleiberman, A.S., Lunyak, V., McEilly, R.J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E., Hedrick, S.M., Mandel, G., Glass, C.K., Rose, D.W., et Rosenfeld, M.G. (2000). Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* *102*, 753-763.
- Kaeberlein, M., McVey, M., et Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* *13*, 2570-2580.
- Kao, H.Y., Downes, M., Ordentlich, P., et Evans, R.M. (2000). Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev.* *14*, 55-66.
- Kappus, S., Apweiler, R., White, C.J., et Whish, W.J. (1993). In vitro poly-(ADP-ribosyl)ation of chromatin proteins in the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Comp Biochem. Physiol B* *104*, 711-716.
- Kastner P., Mark M., Chambon P. (1995) Non steroid nuclear receptor what are genetics studies telling about role in real life. *Cell* *83*, 859-869.
- Kee, B.L., Arias, J., et Montminy, M.R. (1996). Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J. Biol. Chem.* *271*, 2373-2375.
- Kessel, M. et Gruss, P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* *67*, 89-104.
- Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* *116*, 259-272.

- Koh,S.S., Chen,D., Lee,Y.H., et Stallcup,M.R. (2001). Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J. Biol. Chem.* 276, 1089-1098.
- Koh,S.S., Li,H., Lee,Y.H., Widelitz,R.B., Chuong,C.M., et Stallcup,M.R. (2002). Synergistic coactivator function by coactivator-associated arginine methyltransferase (CARM) 1 and beta-catenin with two different classes of DNA-binding transcriptional activators. *J. Biol. Chem.* 277, 26031-26035.
- Korzus,E., Torchia,J., Rose,D.W., Xu,L., Kurokawa,R., McInerney,E.M., Mullen,T.M., Glass,C.K., et Rosenfeld,M.G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279, 703-707.
- Krumlauf,R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.
- Lachner,M. et Jenuwein,T. (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 286-298.
- Lampron,C., Rochette-Egly,C., Gorry,P., Dolle,P., Mark,M., Lufkin,T., LeMeur,M., et Chambon,P. (1995). Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 121, 539-548.
- Lee,C.H. et Wei,L.N. (1999). Characterization of receptor-interacting protein 140 in retinoid receptor activities. *J. Biol. Chem.* 274, 31320-31326.
- Lee,D.Y., Hayes,J.J., Pruss,D., et Wolffe,A.P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72, 73-84.
- Lee,D.Y., Teyssier,C., Strahl,B.D., et Stallcup,M.R. (2005). Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr. Rev.* 26, 147-170.
- Lee,H.L. et Archer,T.K. (1998). Prolonged glucocorticoid exposure dephosphorylates histone H1 and inactivates the MMTV promoter. *EMBO J.* 17, 1454-1466.
- Lee,M.S., Kliewer,S.A., Provencal,J., Wright,P.E., et Evans,R.M. (1993). Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* 260, 1117-1121.
- Lefebvre,B., Ozato,K., et Lefebvre,P. (2002). Phosphorylation of histone H3 is functionally linked to retinoic acid receptor beta promoter activation. *EMBO Rep.* 3, 335-340.
- Leo,C. et Chen,J.D. (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245, 1-11.
- Levine,M., Harding,K., Wedeen,C., Doyle,H., Hoey,T., et Radomska,H. (1985). Expression of the homeo box gene family in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 50, 209-222.
- Leyns,L., Bouwmeester,T., Kim,S.H., Piccolo,S., et De Robertis,E.M. (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88, 747-756.

- Li, J., Lin, Q., Yoon, H.G., Huang, Z.Q., Strahl, B.D., Allis, C.D., et Wong, J. (2002). Involvement of histone methylation and phosphorylation in regulation of transcription by thyroid hormone receptor. *Mol. Cell Biol.* *22*, 5688-5697.
- Li, W., Nagaraja, S., Delcuve, G.P., Hendzel, M.J., et Davie, J.R. (1993). Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *Biochem. J.* *296 (Pt 3)*, 737-744.
- Lickert, H., Domon, C., Huls, G., Wehrle, C., Duluc, I., Clevers, H., Meyer, B.I., Freund, J.N., et Kemler, R. (2000). Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Development* *127*, 3805-3813.
- Lickert, H. et Kemler, R. (2002). Functional analysis of cis-regulatory elements controlling initiation and maintenance of early *Cdx1* gene expression in the mouse. *Dev. Dyn.* *225*, 216-220.
- Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R., et Berger, S.L. (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell* *5*, 917-926.
- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A., et Chambon, P. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* *120*, 2723-2748.
- Lohnes D., Mark M., Mendelsohn C., Dolle P., Decimo D. Lemeur M., Dierich A., Gorry P. et Chambon P. (1995). Developmental roles of the retinoic acid receptor. *J. of steroid Biochem. Mol. Biol.* *1-6*, 475-486
- Lohnes, D. (2003). The *Cdx1* homeodomain protein: an integrator of posterior signaling in the mouse. *Bioessays* *25*, 971-980.
- Ma, H., Baumann, C.T., Li, H., Strahl, B.D., Rice, R., Jelinek, M.A., Aswad, D.W., Allis, C.D., Hager, G.L., et Stallcup, M.R. (2001). Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Curr. Biol.* *11*, 1981-1985.
- Mader, S., Chen, J.Y., Chen, Z., White, J., Chambon, P., et Gronemeyer, H. (1993a). The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J.* *12*, 5029-5041.
- Mader, S., Leroy, P., Chen, J.Y., et Chambon, P. (1993b). Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J. Biol. Chem.* *268*, 591-600.
- Mann, R.S. et Affolter, M. (1998). Hox proteins meet more partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *8*, 423-429.
- Mannervik, M. et Levine, M. (1999). The Rpd3 histone deacetylase is required for segmentation of the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 6797-6801.

- Mao,B., Wu,W., Li,Y., Hoppe,D., Stannek,P., Glinka,A., et Niehrs,C. (2001). LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411, 321-325.
- Mao,B., Wu,W., Davidson,G., Marhold,J., Li,M., Mechler,B.M., Delius,H., Hoppe,D., Stannek,P., Walter,C., Glinka,A., et Niehrs,C. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417, 664-667.
- Mark,M., Ghyselinck,N.B., Wendling,O., Dupe,V., Mascrez,B., Kastner,P., et Chambon,P. (1999). A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 609-613.
- Mattei,M.G., Riviere,M., Krust,A., Ingvarsson,S., Vennstrom,B., Islam,M.Q., Levan,G., Kautner,P., Zelent,A., et Chambon,P. (1991). Chromosomal assignment of retinoic acid receptor (RAR) genes in the human, mouse, and rat genomes. *Genomics* 10, 1061-1069.
- McCaffery,P. et Drager,U.C. (1993). Retinoic acid synthesis in the developing retina. *Adv. Exp. Med. Biol.* 328, 181-190.
- McEwen,D.G. et Peifer,M. (2000). Wnt signaling: Moving in a new direction. *Curr. Biol.* 10, R562-R564.
- McGrath,K.E. et Palis,J. (1997). Expression of homeobox genes, including an insulin promoting factor, in the murine yolk sac at the time of hematopoietic initiation. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 145-153.
- McKendry,R., Hsu,S.C., Harland,R.M., et Grosschedl,R. (1997). LEF-1/TCF proteins mediate wnt-inducible transcription from the *Xenopus nodal*-related 3 promoter. *Dev. Biol.* 192, 420-431.
- Mendelsohn,C., Lohnes,D., Decimo D., Lufkin T., Lemeur M., Chambon P. et Mark,M., (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 120, 2749-2771.
- Meneghini,M.D., Ishitani,T., Carter,J.C., Hisamoto,N., Ninomiya-Tsuji,J., Thorpe,C.J., Hamill,D.R., Matsumoto,K., et Bowerman,B. (1999). MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 399, 793-797.
- Meyer,B.I. et Gruss,P. (1993). Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development* 117, 191-203.
- Mlodzik,M. et Gehring,W.J. (1987). Expression of the caudal gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell* 48, 465-478.
- Mlodzik,M. et Gehring,W.J. (1987). Expression of the caudal gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell* 48, 465-478.
- Molotkov,A., Fan,X., et Duester,G. (2002). Excessive vitamin A toxicity in mice genetically deficient in either alcohol dehydrogenase Adh1 or Adh3. *Eur. J. Biochem.* 269, 2607-2612.

- Molotkov,A., Fan,X., Deltour,L., Foglio,M.H., Martras,S., Farres,J., Pares,X., et Duester,G. (2002). Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 5337-5342.
- Molotkov,A., Deltour,L., Foglio,M.H., Cuenca,A.E., et Duester,G. (2002). Distinct retinoid metabolic functions for alcohol dehydrogenase genes Adh1 and Adh4 in protection against vitamin A toxicity or deficiency revealed in double null mutant mice. *J. Biol. Chem.* *277*, 13804-13811.
- Moon,R.T., Bowerman,B., Boutros,M., et Perrimon,N. (2002). The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* *296*, 1644-1646.
- Moon,R.T. et Shah,K. (2002). Developmental biology: signalling polarity. *Nature* *417*, 239-240.
- Moon,R.T., Kohn,A.D., De Ferrari,G.V., et Kaykas,A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 691-701.
- Muscat,G.E., Burke,L.J., et Downes,M. (1998). The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13Delta1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70. *Nucleic Acids Res.* *26*, 2899-2907.
- Nagpal,S., Friant,S., Nakshatri,H., et Chambon,P. (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J.* *12*, 2349-2360.
- Nagy,L. et Schwabe,J.W. (2004). Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 317-324.
- Napoli,J.L. (1996). Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin. Immunol. Immunopathol.* *80*, S52-S62.
- Napoli,J.L. (1996). Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* *10*, 993-1001.
- Napoli,J.L. (2000). A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism. *Nutr. Rev.* *58*, 230-236.
- Nelson,W.J. et Nusse,R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* *303*, 1483-1487.
- Nibu,Y., Zhang,H., et Levine,M. (1998). Interaction of short-range repressors with Drosophila CtBP in the embryo. *Science* *280*, 101-104.
- Niederreither,K., Subbarayan,V., Dolle,P., et Chambon,P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat. Genet.* *21*, 444-448.
- Nieuwkoop,P.D. (1999). The neural induction process; its morphogenetic aspects. *Int. J. Dev. Biol.* *43*, 615-623.
- Nishita,M., Hashimoto,M.K., Ogata,S., Laurent,M.N., Ueno,N., Shibuya,H., et Cho,K.W. (2000). Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* *403*, 781-785.

- Nishita,M., Hashimoto,M.K., Ogata,S., Laurent,M.N., Ueno,N., Shibuya,H., et Cho,K.W. (2000). Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 403, 781-785.
- Noy,N. (2000). Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem. J.* 348 Pt 3, 481-495.
- Nusse,R. (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* 15, 28-32.
- Ogryzko,V.V., Kotani,T., Zhang,X., Schiltz,R.L., Howard,T., Yang,X.J., Howard,B.H., Qin,J., et Nakatani,Y. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94, 35-44.
- Owen-Hughes,T. et Workman,J.L. (1996). Remodeling the chromatin structure of a nucleosome array by transcription factor-targeted trans-displacement of histones. *EMBO J.* 15, 4702-4712.
- Owen-Hughes,T., Utley,R.T., Cote,J., Peterson,C.L., et Workman,J.L. (1996). Persistent site-specific remodeling of a nucleosome array by transient action of the SWI/SNF complex. *Science* 273, 513-516.
- Owen,D.J., Ornaghi,P., Yang,J.C., Lowe,N., Evans,P.R., Ballario,P., Neuhaus,D., Filetici,P., et Travers,A.A. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J.* 19, 6141-6149.
- Perissi,V., Staszewski,L.M., McInerney,E.M., Kurokawa,R., Krones,A., Rose,D.W., Lambert,M.H., Milburn,M.V., Glass,C.K., et Rosenfeld,M.G. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev.* 13, 3198-3208.
- Petkovich,P.M. (2001). Retinoic acid metabolism. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45, S136-S142.
- Pevny,L.H. et Lovell-Badge,R. (1997). Sox genes find their feet. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 338-344.
- Pham,A.D. et Sauer,F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* 289, 2357-2360.
- Phelan,M.L., Rambaldi,I., et Featherstone,M.S. (1995). Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol. Cell Biol.* 15, 3989-3997.
- Phippen,T.M., Sweigart,A.L., Moniwa,M., Krumm,A., Davie,J.R., et Parkhurst,S.M. (2000). *Drosophila* C-terminal binding protein functions as a context-dependent transcriptional co-factor and interferes with both mad and groucho transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 275, 37628-37637.
- Piccolo,S., Agius,E., Leyns,L., Bhattacharyya,S., Grunz,H., Bouwmeester,T., et De Robertis,E.M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707-710.
- Pickart,C.M. (2001). Ubiquitin enters the new millennium. *Mol. Cell* 8, 499-504.

- Pieper,A.A., Verma,A., Zhang,J., et Snyder,S.H. (1999). Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol. Sci.* *20*, 171-181.
- Prinos,P., Joseph,S., Oh,K., Meyer,B.I., Gruss,P., et Lohnes,D. (2001). Multiple pathways governing Cdx1 expression during murine development. *Dev. Biol.* *239*, 257-269.
- Rachez,C., Suldan,Z., Ward,J., Chang,C.P., Burakov,D., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., et Freedman,L.P. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* *12*, 1787-1800.
- Rachez,C., Gamble,M., Chang,C.P., Atkins,G.B., Lazar,M.A., et Freedman,L.P. (2000). The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol. Cell Biol.* *20*, 2718-2726.
- Rastegar,M., Kobrossy,L., Kovacs,E.N., Rambaldi,I., et Featherstone,M. (2004). Sequential histone modifications at Hoxd4 regulatory regions distinguish anterior from posterior embryonic compartments. *Mol. Cell Biol.* *24*, 8090-8103.
- Rastinejad,F., Wagner,T., Zhao,Q., et Khorasanizadeh,S. (2000). Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *EMBO J.* *19*, 1045-1054.
- Rea,S., Eisenhaber,F., O'Carroll,D., Strahl,B.D., Sun,Z.W., Schmid,M., Opravil,S., Mechtler,K., Ponting,C.P., Allis,C.D., et Jenuwein,T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* *406*, 593-599.
- Rea,S., Eisenhaber,F., O'Carroll,D., Strahl,B.D., Sun,Z.W., Schmid,M., Opravil,S., Mechtler,K., Ponting,C.P., Allis,C.D., et Jenuwein,T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* *406*, 593-599.
- Rice,J.C. et Allis,C.D. (2001). Code of silence. *Nature* *414*, 258-261.
- Rice,J.C. et Allis,C.D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 263-273.
- Rocheleau,C.E., Yasuda,J., Shin,T.H., Lin,R., Sawa,H., Okano,H., Priess,J.R., Davis,R.J., et Mello,C.C. (1999). WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in *C. elegans*. *Cell* *97*, 717-726.
- Rochette-Egly,C., Adam,S., Rossignol,M., Egly,J.M., et Chambon,P. (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* *90*, 97-107.
- Rochette-Egly,C. (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal.* *15*, 355-366.
- Roose,J., Molenaar,M., Peterson,J., Hurenkamp,J., Brantjes,H., Moerer,P., van de,W.M., Destree,O., et Clevers,H. (1998). The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* *395*, 608-612.
- Ross,S.A., McCaffery,P.J., Drager,U.C., et De Luca,L.M. (2000). Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.* *80*, 1021-1054.

- Rossant,J., Zirngibl,R., Cado,D., Shago,M., et Giguere,V. (1991). Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* *5*, 1333-1344.
- Santos-Rosa,H., Schneider,R., Bannister,A.J., Sherriff,J., Bernstein,B.E., Emre,N.C., Schreiber,S.L., Mellor,J., et Kouzarides,T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* *419*, 407-411.
- Sasai,Y. et De Robertis,E.M. (1997). Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev. Biol.* *182*, 5-20.
- Savkur,R.S. et Burris,T.P. (2004). The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J. Pept. Res.* *63*, 207-212.
- Schneider,R., Bannister,A.J., Myers,F.A., Thorne,A.W., Crane-Robinson,C., et Kouzarides,T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell Biol.* *6*, 73-77.
- Shi,Y., Lan,F., Matson,C., Mulligan,P., Whetstine,J.R., Cole,P.A., Casero,R.A., et Shi,Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* *119*, 941-953.
- Shikama,N., Lee,C.W., France,S., Delavaine,L., Lyon,J., Krstic-Demonacos,M., et La Thangue,N.B. (1999). A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol. Cell* *4*, 365-376.
- Shikama,N., Chan,H.M., Krstic-Demonacos,M., Smith,L., Lee,C.W., Cairns,W., et La Thangue,N.B. (2000). Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators. *Mol. Cell Biol.* *20*, 8933-8943.
- Shimizu,T., Bae,Y.K., Muraoka,O., et Hibi,M. (2005). Interaction of Wnt and caudal-related genes in zebrafish posterior body formation. *Dev. Biol.* *279*, 125-141.
- Simeone,A., Acampora,D., Arcioni,L., Andrews,P.W., Boncinelli,E., et Mavilio,F. (1990). Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* *346*, 763-766.
- Simpson,R.T., Thoma,F., et Brubaker,J.M. (1985). Chromatin reconstituted from tandemly repeated cloned DNA fragments and core histones: a model system for study of higher order structure. *Cell* *42*, 799-808.
- Smalley,M.J. et Dale,T.C. (1999). Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *18*, 215-230.
- Smalley,M.J., Sara,E., Paterson,H., Naylor,S., Cook,D., Jayatilake,H., Fryer,L.G., Hutchinson,L., Fry,M.J., et Dale,T.C. (1999). Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J.* *18*, 2823-2835.
- Soprano,D.R. et Soprano,K.J. (2003). Pharmacological doses of some synthetic retinoids can modulate both the aryl hydrocarbon receptor and retinoid receptor pathways. *J. Nutr.* *133*, 277S-281S.
- Stallcup,M.R. (2001). Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene* *20*, 3014-3020.

- Strahl,B.D. et Allis,C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Subramanian,V., Meyer,B.I., et Gruss,P. (1995). Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* 83, 641-653.
- Sun,Z.W. et Allis,C.D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104-108.
- Takada,S., Stark,K.L., Shea,M.J., Vassileva,G., McMahon,J.A., et McMahon,A.P. (1994). *Wnt-3a* regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev.* 8, 174-189.
- Takemaru,K.I. et Moon,R.T. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.* 149, 249-254.
- Tamai,K., Semenov,M., Kato,Y., Spokony,R., Liu,C., Katsuyama,Y., Hess,F., Saint-Jeannet,J.P., et He,X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530-535.
- Thomson,S., Clayton,A.L., Hazzalin,C.A., Rose,S., Barratt,M.J., et Mahadevan,L.C. (1999). The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J.* 18, 4779-4793.
- Trinh,K.Y., Jin,T., et Drucker,D.J. (1999). Identification of domains mediating transcriptional activation and cytoplasmic export in the caudal homeobox protein *Cdx-3*. *J. Biol. Chem.* 274, 6011-6019.
- Tsai,C.C. et Fondell,J.D. (2004). Nuclear receptor recruitment of histone-modifying enzymes to target gene promoters. *Vitam. Horm.* 68, 93-122.
- Turner,B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22, 836-845.
- van Beest,M., Dooijes,D., van de,W.M., Kjaerulff,S., Bonvin,A., Nielsen,O., et Clevers,H. (2000). Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs. *J. Biol. Chem.* 275, 27266-27273.
- van den,A.E., Forlani,S., Chawengsaksophak,K., de Graaff,W., Beck,F., Meyer,B.I., et Deschamps,J. (2002). *Cdx1* and *Cdx2* have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* 129, 2181-2193.
- Vaquero,A., Loyola,A., et Reinberg,D. (2003). The constantly changing face of chromatin. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 2003, RE4.
- Varga-Weisz,P. (2001). ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene* 20, 3076-3085.
- Verreault,A., Kaufman,P.D., Kobayashi,R., et Stillman,B. (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* 87, 95-104.

- Vleminckx,K., Kemler,R., et Hecht,A. (1999). The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/beta-catenin complex in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* *81*, 65-74.
- Waltzer,L. et Bienz,M. (1998). *Drosophila* CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature* *395*, 521-525.
- Wang,A., Kurdistani,S.K., et Grunstein,M. (2002). Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science* *298*, 1412-1414.
- Wang,H., Huang,Z.Q., Xia,L., Feng,Q., Erdjument-Bromage,H., Strahl,B.D., Briggs,S.D., Allis,C.D., Wong,J., Tempst,P., et Zhang,Y. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* *293*, 853-857.
- Wang,H., Cao,R., Xia,L., Erdjument-Bromage,H., Borchers,C., Tempst,P., et Zhang,Y. (2001). Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol. Cell* *8*, 1207-1217.
- Wang,H., Huang,Z.Q., Xia,L., Feng,Q., Erdjument-Bromage,H., Strahl,B.D., Briggs,S.D., Allis,C.D., Wong,J., Tempst,P., et Zhang,Y. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* *293*, 853-857.
- Wang,S., Krinks,M., Lin,K., Luyten,F.P., et Moos,M., Jr. (1997). Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* *88*, 757-766.
- Wehrli,M., Dougan,S.T., Caldwell,K., O'Keefe,L., Schwartz,S., Vaizel-Ohayon,D., Schejter,E., Tomlinson,A., et DiNardo,S. (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* *407*, 527-530.
- Wei,L.N., Farooqui,M., et Hu,X. (2001). Ligand-dependent formation of retinoid receptors, receptor-interacting protein 140 (RIP140), and histone deacetylase complex is mediated by a novel receptor-interacting motif of RIP140. *J. Biol. Chem.* *276*, 16107-16112.
- White,J.A., Guo,Y.D., Baetz,K., Beckett-Jones,B., Bonasoro,J., Hsu,K.E., Dilworth,F.J., Jones,G., et Petkovich,M. (1996). Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* *271*, 29922-29927.
- White,J.A., Beckett-Jones,B., Guo,Y.D., Dilworth,F.J., Bonasoro,J., Jones,G., et Petkovich,M. (1997). cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J. Biol. Chem.* *272*, 18538-18541.
- Whitehouse,I., Flaus,A., Cairns,B.R., White,M.F., Workman,J.L., et Owen-Hughes,T. (1999). Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* *400*, 784-787.
- Willert,K., Brown,J.D., Danenberg,E., Duncan,A.W., Weissman,I.L., Reya,T., Yates,J.R., III, et Nusse,R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* *423*, 448-452.

Wolbach S.B. et Howe P.R. (1925) Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamine. *Journal of experimental med.* *42*, 753-777.

Wolffe,A.P. (1998). Packaging principle: how DNA methylation and histone acetylation control the transcriptional activity of chromatin. *J. Exp. Zool.* *282*, 239-244.

Wong,C.W. et Privalsky,M.L. (1998). Transcriptional repression by the SMRT-mSin3 corepressor: multiple interactions, multiple mechanisms, and a potential role for TFIIB. *Mol. Cell Biol.* *18*, 5500-5510.

Woychik,N.A. et Hampsey,M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* *108*, 453-463.

Wurtz,J.M., Bourguet,W., Renaud,J.P., Vivat,V., Chambon,P., Moras,D., et Gronemeyer,H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* *3*, 87-94.

Xu,W., Chen,H., Du,K., Asahara,H., Tini,M., Emerson,B.M., Montminy,M., et Evans,R.M. (2001). A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* *294*, 2507-2511.

Xu,W., Cho,H., Kadam,S., Banayo,E.M., Anderson,S., Yates,J.R., III, Emerson,B.M., et Evans,R.M. (2004). A methylation-mediator complex in hormone signaling. *Genes Dev.* *18*, 144-156.

Yoshida,M., Kijima,M., Akita,M., et Beppu,T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* *265*, 17174-17179.

Yu,J., Li,Y., Ishizuka,T., Guenther,M.G., et Lazar,M.A. (2003). A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *EMBO J.* *22*, 3403-3410.

Zechel,C., Shen,X.Q., Chen,J.Y., Chen,Z.P., Chambon,P., et Gronemeyer,H. (1994). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J.* *13*, 1425-1433.

Zechel,C., Shen,X.Q., Chambon,P., et Gronemeyer,H. (1994). Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *EMBO J.* *13*, 1414-1424.

Zhang,H. et Levine,M. (1999). Groucho and dCtBP mediate separate pathways of transcriptional repression in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 535-540.

Zhang,J., Kalkum,M., Chait,B.T., et Roeder,R.G. (2002). The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol. Cell* *9*, 611-623.

Zhang,Y. et Reinberg,D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* *15*, 2343-2360.

Zhang, Y. et Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343-2360.

Zorn, A.M., Barish, G.D., Williams, B.O., Lavender, P., Klymkowsky, M.W., et Varmus, H.E. (1999). Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Mol. Cell* 4, 487-498.

